

Aus dem Centrum für Anatomie  
Institut für Zell- und Neurobiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Regulationsmechanismen bioaktiver Lipide bei Entwicklungs- und  
Regenerationsprozessen des ZNS und bei der Karzinogenese**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae  
(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Maria Linda Rocha  
aus Hoyerswerda

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. medic. A. U. Bräuer  
2. Prof. Dr. rer. nat. B. Heimrich  
3. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. O. Ullrich

Datum der Promotion: 04. Februar 2011



*Daß die Sonne morgen aufgehen wird, ist eine Hypothese; und das heißt:  
wir wissen nicht, ob sie aufgehen wird.*

— *Ludwig Wittgenstein, Tractatus logico-philosophicus*



## Abstract

Lysophosphatidic acid (LPA) plays a key role as a signaling molecule and lipid mediator in inter- and intracellular processes, both under physiological and pathophysiological conditions and, when bound to specific LPA receptors (LPA<sub>1-7</sub>), shows a broad and complex range of effects primarily comprising processes such as stimulation of proliferation, survival, differentiation and migration. The modulation of receptor-active LPA thus represents a sensitive process influenced by numerous factors, mainly Autotaxin (ATX), the phospholipases A (PLAs), lipid phosphate phosphatases (LPPs) and LPA receptors (LPA-R). Initial work has addressed, on the one hand, the recently identified LPA-modifying LPP-related molecule *Plasticity-related Gene-1* (PRG-1), the first representative of a vertebrate-specific and, under physiological conditions, exclusively neuronally expressed class of integral membrane proteins (PRGs; PRG-1-5), that has been viewed under the aspect of developmental biological panencephalic distribution and for the first time suggested to have a potential role in the oncogenesis of human prostate cancer. On the other hand, the important LPA-generating protein and enzyme ATX/LysoPLD has also been characterized, a long enigmatic autocrine tumor cell motility stimulating factor, described for the first time in regard to its gene expression and cellular distribution in the CNS during development and in regeneration processes following neurotrauma (ECL).

The molecular mechanisms and cell cycles underlying LPA generation and degradation are, as with the LPA receptors, the subject of intensive research, as they are thought to represent potential new opportunities for pharmacological intervention in neuroimmunological and neurodegenerative diseases as well as in tumor genesis.



## Zusammenfassung

Die Lysophosphatidsäure (LPA) nimmt eine Schlüsselrolle als Signalmolekül und Lipid-Mediator in inter- und intrazellulären Prozessen sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen ein und weist infolge der Bindung an spezifische LPA-Rezeptoren (LPA<sub>1-7</sub>) ein breites und komplexes Wirkungsspektrum auf, welches primär Prozesse wie die Stimulation von Proliferation, Überleben, Differenzierung und Migration umfasst. Die Modulation rezeptoraktiver LPA stellt hierbei einen sensiblen Prozess dar, welcher von verschiedensten Faktoren – im Wesentlichen von Autotaxin (ATX), den Phospholipasen A (PLA), den Lipidphosphatphosphatasen (LPPs) und den LPA-Rezeptoren (LPA-R) – beeinflusst wird. Die zugrunde liegende Arbeit widmete sich zum einen dem jüngst identifizierten LPA-modifizierenden und LPP-verwandten Molekül *Plasticity-related Gene-1* (PRG-1), dem ersten Vertreter einer vertebratenspezifisch und, unter physiologischen Bedingungen, ausschließlich neuronal exprimierten Klasse integraler Membranproteine (PRGs; PRG-1–5), das unter dem Aspekt einer entwicklungsbiologisch panenzephalen Verteilung betrachtet und für welches eine potentielle Rolle in der Onkogenese des humanen Prostatakarzinoms erstmalig nahe gelegt wurde. Zum anderen wurde das maßgebende LPA-generierende Protein und Enzym ATX/LysoPLD, ein lange Zeit enigmatischer autokriner Tumorzellmotilität stimulierender Faktor, erstmals hinsichtlich seiner Genexpression und zellulären Distribution im ZNS sowohl während der Entwicklung als auch im Rahmen von Regenerationsprozessen nach einem Neurotrauma (ECL) charakterisiert. Die der LPA-Generierung bzw. -Degradierung zugrunde liegenden molekularen Mechanismen und zellulären Abläufe sind ebenso wie die LPA-Rezeptoren Ausgangspunkt intensiver Forschung, da hier potentiell neue Angriffsstellen für eine pharmakologische Intervention bei neuroimmunologischen und -degenerativen Erkrankungen sowie bei der Tumorgenese angenommen werden.



# Publikationen

Bestandteile dieser Arbeit wurden auszugsweise gleichartig oder in partiell abgewandelter Form *ad publicandum* wie nachfolgend aufgeführt verwendet:

---

## PEER-REVIEW PUBLIKATIONEN

SAVASKAN, N.E.; **ROCHA, L.**; KOTTER, M.R.; BAER, A.; LUBEC, G.; VAN MEETEREN, L.A.; KISHI, Y.; AOKI, J.; MOOLENAAR, W.H.; NITSCH, R.; BRÄUER, A.U.: Autotaxin (NPP-2) in the brain: cell-type specific expression and regulation during development and after neurotrauma. In: *Cell Mol Life Sci* 64 (2007), Nr. 2, S. 230–43.

**ROCHA, L.**; BRÄUER, A.U.; SAVASKAN, N.E.; NITSCH, R.; STEPHAN, C.; SEERS, C.; FRITZSCHE, F.R.; DIETEL, M.; JUNG, K.; KRISTIANSEN, G.: PRG-1 expression in Prostate Cancer: prognostic marker of early PSA relapse. (In Überarbeitung)

---

## ABSTRACTS

BRÄUER, A.U.; **KLEIN, L.**; AOKI, J.; NITSCH, R.; SAVASKAN, N.E.: The role of phospholipids and their signalling cascades during development and regenerative processes in the brain. *VII. European Meeting on Glial Cell Functions in Health and Disease* (2005), Amsterdam, The Netherlands.

**ROCHA, L.**; BRÄUER, A.U.; SAVASKAN, N.E.; NITSCH, R.; STEPHAN, C.; SEHRS, C.; FRITZSCHE, F.R.; DIETEL, M.; JUNG, K.; KRISTIANSEN, G.: The role of PRG-1 in the pathophysiology of human prostate carcinoma. *19th European Students' Conference* (2008), Charité - Universitätsmedizin Berlin.

# Inhaltsverzeichnis

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Abstract</b>  | <b>v</b>    |
| <b>Zusammenfassung</b>   | <b>vii</b>  |
| <b>Publikationen</b>   | <b>ix</b>   |
| <b>Abbildungsverzeichnis</b>   | <b>xiii</b> |
| <b>Tabellenverzeichnis</b>   | <b>xiv</b>  |
| <b>1 Einführung</b>  | <b>1</b>    |
| Plasticity-related Gene-1 . . . . .  | 1           |
| 1.1.1 Identifizierung der PRGs . . . . .                                     | 1           |
| 1.1.2 Strukturelle Architektur von PRG-1 und erste Funktionen . . . . .      | 2           |
| 1.1.3 PRG-1-Expression im Rahmen von Entwicklungsprozessen des ZNS . . . . . | 3           |
| 1.1.4 Spezifität der PRG-1-Expression im ZNS . . . . .                       | 3           |
| 1.1.5 Der Hippocampus und das Modell der entorhinalen Kortexläsion           | 3           |
| 1.1.6 PRG-1-Expression nach Neurotrauma (ECL) . . . . .                      | 5           |
| Autotaxin, eine Mammalia kennzeichnende LysoPLD . . . . .                    | 5           |
| 1.2.1 Historische Perspektive . . . . .                                      | 5           |
| 1.2.2 Isoformen, Domänenstruktur, Prozessierung und Substrate . . . . .      | 6           |
| 1.2.3 Expressionsprofil und biologisches Wirkungsspektrum . . . . .          | 7           |
| 1.2.4 Spezifität der ATX-Expression im ZNS . . . . .                         | 8           |
| Lysophosphatidsäure . . . . .  | 9           |
| 1.3.1 Physiologische und pathophysiologische Wirkungen der LPA . . . . .     | 9           |
| 1.3.2 LPA – Spezifischer Ligand der LPA-Rezeptoren . . . . .                 | 11          |
| 1.3.3 Pfade der extrazellulären LPA-Generierung . . . . .                    | 12          |
| 1.3.4 LPA-Degradation . . . . .  | 14          |
| <b>2 Thesen und Fragestellung</b>  | <b>15</b>   |
| <b>3 Material und Methoden</b>   | <b>17</b>   |
| Materialien . . . . .  | 17          |
| 3.1.1 Gewebe und Zelllinien . . . . .  | 17          |
| Tiere . . . . .  | 17          |
| Mikroorganismen . . . . .  | 17          |



|          |  |           |
|----------|--|-----------|
|          | Zelllinien . . . . .   | 17        |
| 3.1.2    | Antikörper . . . . .   | 18        |
| 3.1.3    | Kits und Assays . . . . .  | 19        |
| 3.1.4    | Vektoren . . . . .   | 19        |
| 3.1.5    | Konstrukte . . . . .   | 20        |
| 3.1.6    | Primer für die PCR . . . . .   | 20        |
| 3.1.7    | Primer und TaqMan <sup>®</sup> -Sonden für die qRT-PCR . . . . .                 | 21        |
| 3.1.8    | Sonden für die In-situ-Hybridisierung . . . . .                                  | 21        |
| 3.1.9    | Geräte . . . . .   | 22        |
| Methoden | . . . . .  | 22        |
| 3.2.1    | Proteinanalytik . . . . .  | 22        |
|          | Die entorhinale Kortexläsion (ECL) - Modus procedendi der Stereotaxie . . . . .  | 22        |
|          | Gewebeisolation . . . . .  | 23        |
|          | Proteinisolierung und Proteinbestimmung . . . . .                                | 23        |
|          | Immunologische Nachweisverfahren . . . . .                                       | 24        |
| 3.2.2    | Nukleinsäureanalytik . . . . .   | 26        |
|          | Grundlegende molekularbiologische Methoden und Analyseverfahren . . . . .        | 26        |
|          | Sequenzierung . . . . .  | 28        |
|          | Hybridisierung . . . . .   | 28        |
| 3.2.3    | Funktionsanalytik . . . . .  | 29        |
|          | Grundlegende Methoden der Zellkultivierung . . . . .                             | 29        |
|          | Transfektionsmethoden . . . . .  | 30        |
|          | Quantitative Polymerasekettenreaktion . . . . .                                  | 31        |
|          | Viabilitäts-/Zytotoxizitätsassay . . . . .                                       | 32        |
| <b>4</b> | <b>Resultate</b>   | <b>33</b> |
|          | Expression des Plasticity-related Gene-1 im Gehirn . . . . .                     | 33        |
| 4.1.1    | Zerebrale Verteilung des Proteins PRG-1 im Verlauf der Hirnentwicklung . . . . . | 33        |
| 4.1.2    | Spezifizierung der neuronalen Lokalisation von PRG-1 . . . . .                   | 36        |
|          | Expression und Regulation von Autotaxin im Gehirn . . . . .                      | 38        |
| 4.2.1    | Regulation der ATX-mRNA-Expression im Verlauf der Hirnentwicklung . . . . .      | 38        |
| 4.2.2    | Regulation der ATX-mRNA-Expression nach Neurotrauma . . . . .                    | 38        |
| 4.2.3    | Distribution des Proteins ATX im adulten Gehirn . . . . .                        | 41        |
| 4.2.4    | Zerebrale Distribution des Proteins ATX nach Neurotrauma . . . . .               | 42        |
| 4.2.5    | Proteinbiochemischer Nachweis von ATX nach Neurotrauma . . . . .                 | 45        |
|          | Expression von PRG-1 im Rahmen der Karzinogenese . . . . .                       | 47        |
| 4.3.1    | PRG-1-Expression am Beispiel des humanen Prostataadenokarzinoms . . . . .        | 47        |
| 4.3.2    | PRG-1-Nachweis in der humanen Prostatakarzinomzelllinie DU-145 . . . . .         | 48        |

## Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| Verifizierung der cDNA-Synthese nach Gesamt-RNA-Isolation . . . . .                            | 48        |
| PCR-Nachweis von PRG-1 in der Zelllinie DU-145 . . . . .                                       | 49        |
| Quantitative Genexpressionsanalyse der PRGs und des ATX in<br>DU-145-Zellen . . . . .          | 49        |
| Proteinbiochemische Analyse von PRG-1 in DU-145-Zellen . . . . .                               | 50        |
| Immunhistochemische Analyse der PRG-1-Lokalisation in DU-<br>145-Zellen . . . . .              | 51        |
| 4.3.3 LPA-Rezeptoren und LPA-Wirkungen . . . . .   | 52        |
| Quantitative Genexpressionsanalyse der LPA-Rezeptoren in DU-<br>145-Zellen . . . . .           | 52        |
| Untersuchungen zur biologischen Viabilität von DU-145-Zellen . . . . .                         | 54        |
| Untersuchungen zur Signaltransduktion nach Stimulation von DU-<br>145-Zellen mit LPA . . . . . | 55        |
| <b>5 Diskussion</b>  | <b>57</b> |
| PRG-1 - ein gehirnspezifischer Modulator im Phospholipid-Metabolismus? . . . . .               | 57        |
| ATX/LysoPLD - zerebrale Distribution und Regulation . . . . .                                  | 60        |
| PRG-1 & LPA/LPA-R im humanen Prostatakarzinom - ein Paradigma . . . . .                        | 63        |
| <b>Appendix</b>  | <b>69</b> |
| Lösungen und Puffer . . . . .  | 69        |
| Verbrauch . . . . .  | 71        |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>   | <b>75</b> |
| <b>Danksagung</b>  | <b>79</b> |
| <b>Curriculum Vitae</b>  | <b>81</b> |
| <b>Literaturverzeichnis</b>  | <b>83</b> |
| <b>Deklaration</b>   | <b>97</b> |

# Abbildungsverzeichnis

|      |  |    |
|------|--|----|
| 1.1  | Stammbaum der humanen <i>Plasticity-related Gene</i> -Familie . . . . .                              | 1  |
| 1.2  | Strukturmodell des humanen Proteins PRG-1 . . . . .  | 2  |
| 1.3  | Organisation der neuronalen Verschaltung im entorhino-hippocampalen System . . . . .                 | 4  |
| 1.4  | Strukturformel der LPA . . . . .   | 9  |
| 1.5  | Pfade der LPA-Produktion durch gelöstes ATX und deren Wirkungen . . . . .                            | 13 |
| 4.1  | Immunhistochemische Analyse der PRG-1-Expression . . . . .   | 37 |
| 4.2  | ATX-mRNA-Expressionsmuster während der Hirnentwicklung . . . . .                                     | 39 |
| 4.3  | ATX-mRNA-Expression anhand ausgewählter Entwicklungsstadien . . . . .                                | 40 |
| 4.4  | ATX-mRNA-Expression nach ECL . . . . .   | 41 |
| 4.5  | Kolokalisierung von ATX mit dem OL-Marker Anti-CNPase . . . . .                                      | 42 |
| 4.6  | Kolokalisierung von ATX mit den OL-Markern NG2, A2B5 und CC-1 . . . . .                              | 43 |
| 4.7  | Immunhistochemische Analyse von ATX nach ECL . . . . .   | 44 |
| 4.8  | Semiquantitative Analyse der ATX-Immunoblots nach ECL . . . . .                                      | 44 |
| 4.9  | Kolokalisierung von ATX mit Anti-GFAP in der Zirkumferenz der Läsion . . . . .                       | 45 |
| 4.10 | Proteinbiochemischer Nachweis von ATX nach ECL im Western-Blotting . . . . .                         | 46 |
| 4.11 | Immunhistochemischer Nachweis von PRG-1 im humanen Prostataadenokarzinom . . . . .                   | 48 |
| 4.12 | Gelelektrophorese nach $\beta$ -Aktin-Amplifikation . . . . .  | 48 |
| 4.13 | Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte nach PRG-1-Amplifikation . . . . .                         | 49 |
| 4.14 | Distinktes Expressionsprofil der Gene PRG-1-5, ATX und LPA <sub>1-7</sub> in DU-145-Zellen . . . . . | 51 |
| 4.15 | Western-Blot-Analyse von PRG-1 in DU-145-Zellen . . . . .  | 51 |
| 4.16 | Immunfluoreszenz-Darstellung von PRG-1 in DU-145-Zellen . . . . .                                    | 53 |
| 4.17 | Einfluss von Buthioninsulfoximin, Glutamat und LPA auf DU-145-Zellen . . . . .                       | 55 |

# Tabellenverzeichnis

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 1.1 | Biologische Wirkungen von ATX . . . . .  | 7  |
| 1.2 | Biologische Wirkungen der LPA . . . . .  | 10 |
| 1.3 | LPA-Rezeptoren und ihre Funktionen . . . . .   | 12 |
| 3.1 | Index der verwendeten primären resp. sekundären Antikörper . . . . .                           | 18 |
| 3.2 | Charakteristika der verwendeten Expressionsvektoren . . . . .                                  | 20 |
| 3.3 | Auswahl eingesetzter Oligonukleotide im Rahmen der PCR . . . . .                               | 20 |
| 3.4 | Auflistung der verwendeten TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Assays . . . . .                | 21 |
| 3.5 | Kennzeichnung der eingesetzten Oligonukleotid-Sonden . . . . .                                 | 21 |
| 3.6 | Einstellungen des PCR-Programms . . . . .  | 28 |
| 3.7 | Übersicht der getesteten Transfektionsmethoden . . . . .                                       | 30 |
| 3.8 | Einstellungen des Amplifikationsprogramms . . . . .  | 31 |
| 4.1 | Distribution des Proteins PRG-1 im Gehirn – Stadienvergleich . . . . .                         | 33 |
| 4.2 | Kolokalisierung von Autotaxin mit den Oligodendrozyten-Markern NG2,<br>A2B5 und CC-1 . . . . . | 43 |
| 4.3 | Modifiziertes Programm für die PRG-1-Amplifikation . . . . .                                   | 49 |
| 4.4 | PCR-Amplifikationseffizienz (PRGs, ATX) . . . . .  | 50 |
| 4.5 | PCR-Amplifikationseffizienz (LPA-R) . . . . .  | 54 |

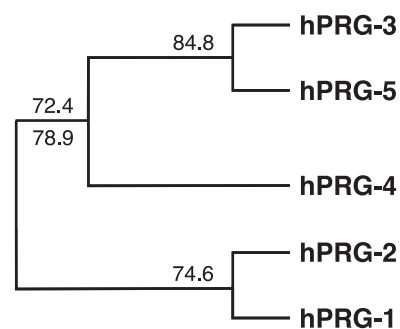
# 1 Einführung

## PLASTICITY-RELATED GENE-1

### 1.1.1 Identifizierung der PRGs

Intensive Untersuchungen zum Verständnis der molekularen, funktionellen und regulatorischen Mechanismen neuronaler Plastizität sowie regenerativer, reorganisierender Prozesse im zentralen Nervensystem, und hier insbesondere im entorhino-hippocampalen System, führten in den letzten Jahren zur Identifizierung und Charakterisierung einer Vielzahl von verschiedensten exzitativ oder inhibitorisch wirkenden, diffusiblen und membran-assoziierten Faktoren sowie Komponenten der EZM (u. a. Cadherine, NCAM, LAMP, Neurotractin/Kilon, Semaphorine, Netrine, Slit, Laminine, Ephrine), die eine enorme Komplexität des zugrunde liegenden sensiblen Netzwerkes nahe legen [23, 37, 60, 112].

Im Zuge von Screening-Verfahren wie der *Differential Display RT-PCR (DDRT-PCR)* und der *Suppression Subtractive Hybridization (SSH)* sowie In-silico-Analysen gelang es der Arbeitsgruppe um Prof. Nitsch in jüngster Vergangenheit, eine gehirnspezifisch exprimierte Klasse integraler Membranproteine, als *Plasticity-related Genes (PRGs)* erstmalig benannt, zu identifizieren [14, 15, 111]. Entsprechende Datenbankanalysen offenbarten sehr starke Homologien (95 % auf Sequenzebene zwischen Maus, Ratte und Mensch) zu den bisher bekannten Mitgliedern der Lipidphosphatphosphatasen-Superfamilie (LPPs; LPP1-3, LPP1A). Im Gegensatz zu den Letztgenannten werden die PRGs spezifisch von Vertebraten und unter physiologischen Bedingungen ausschließlich neuronal exprimiert, wobei deren jeweilige Expression im Verlauf der Hirnentwicklung einer signifikanten Regulation unterliegt. Anhand übereinstimmender Aminosäuresequenzen konnte eine weitere phylogenetische Einteilung (hier human) unter Verwendung der *NCBI*-Datenbank vorgenommen werden (Abb. 1.1, *GenBank* Accession No. für hPRG-1/LRP-3 AF541281, hPRG-2/LRP-2 NM\_024888, hPRG-3/LRP-1 AY337718, hPRG-4/LRP-4 AY339628, hPRG-5/PAP2d\_v1 NM\_001010861).

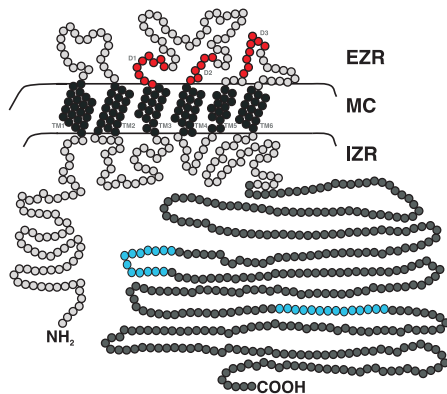


**Abbildung 1.1: Phylogenetischer Stammbaum der humanen *Plasticity-related Gene*-Familie.** Der Baum wurde anhand einer nukleotidbasierten Aufstellung aller PRGs (DNASIS Max; Clustal W Algorithmus) abgeleitet. Die jeweilige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz (angegeben in %) ist an den die Sequenzen verbindenden Ästen wiedergegeben.

## 1 Einführung

### 1.1.2 Strukturelle Architektur von PRG-1 und erste Funktionen

PRG-1 (syn. LPR-3, *lipid phosphatase-related protein-3*) ist ebenso wie die anderen Mitglieder der LPP-Familie durch sechs Transmembrandomänen (TM1-6), drei extrazelluläre und zwei intrazelluläre Schleifen (*Loops*) sowie jeweils einen zytoplasmatischen C- und N-Terminus gekennzeichnet (Abb. 1.2). Zudem teilen PRG-1 und andere den LPPs zugehörige Proteine hoch konservierte Phosphatase-Domänen in den extrazellulären Schleifen 2 und 3 [142, 15, 118]. Ein wesentlicher Unterschied zu den LPPs besteht in der vergleichsweise äußerst langen hydrophilen Domäne (ca. 400 aa) am C-terminalen Ende des Proteins (Abb. 1.2).



**Abbildung 1.2: Strukturmodell des humanen Proteins PRG-1 (764 aa).** Eine C-terminale hydrophile Domäne mit einer Länge von etwa 400 aa charakterisiert die zweite Hälfte des Proteins im Gegensatz zu den LPPs (mittelgrau unterlegt). In eben jenem Abschnitt befinden sich überdies die Erkennungssequenzen für die generierten PRG-1-Antikörper (blau). EZR, Extrazellularraum; IZR, Intrazellularraum; MC, Membrana cellularis (Zellmembran); D1-3, katalytische Motivsequenzen (rot); TM1-6, Transmembrandomänen.

Drei hoch konservierte, katalytische Motivsequenzen kennzeichnen die Phosphatase-Superfamilie (Lipidphosphatasen/-phosphotransferasen, LPTs). Sie gewährleisten deren enzymatische Aktivität und ermöglichen somit die Konversion einer Vielzahl bioaktiver Phospholipide wie der Lysophosphatidsäure (LPA), der Phosphatidsäure (PA), des Ceramid-1-phosphats (C1P), Sphingosin-1-phosphats (S1P) sowie anderen strukturanalogen Substraten [17, 154]. Über die biologischen Funktionen der LPPs ist bislang nur wenig bekannt. So wurde etwa für die LPP-1, zu welcher PRG-1 Homologien aufweist, gezeigt, dass diese durch Dephosphorylierung exogener LPA das zelluläre *Signaling* beeinflusst und LPA-assoziierte Wirkungen abschwächt [145]. Die von einem vergleichbaren antagonistischen Effekt ausgehende Annahme für PRG-1 führte in bislang mehreren Untersu-

chungen zu dem Ergebnis, dass auch PRG-1 an der Regulation der im Extrazellularraum vorhandenen bioaktiven Phospholipide maßgeblich beteiligt ist und deren lokale Konzentration, insbesondere die der LPA, zu reduzieren vermag [15, 136]. In-vitro-Studien veranschaulichten beispielsweise eine im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen deutliche Reduktion der wieder aufgenommenen Phospholipide bei PRG-1-defizienten Neuronen [136]. Allerdings wird ein aberranter, mit den LPTs nicht kongruenter katalytischer Mechanismus aufgrund der nichtkonservierten Substitution kritischer Aminosäuren in aktiven Zentren angenommen [17, 61, 80, 118, 154]. Der derzeitige Kenntnisstand zu den möglichen Funktionen von PRG-1 im ZNS während der Entwicklung und im Rahmen von Regenerationsprozessen legt eine wesentliche Beteiligung an den bekannten Mechanismen neuronaler Plastizität nahe.

### 1.1.3 PRG-1-Expression im Rahmen von Entwicklungsprozessen des ZNS

Inmitten der Entwicklung des Gehirns zeigt die PRG-1-Expression eine deutliche Regulation. Auf Transkriptionsebene kann PRG-1-mRNA erstmals im späten Embryonalstadium E19, insbesondere in der Zona subventricularis (SVZ) sowie in der *Formatio hippocampalis*, nachgewiesen werden. Kennzeichnend ist weiterhin eine starke Zunahme der postnatalen Expression sowohl im Hippocampus als auch im entorhinalen Kortex [15]. Das zeitlich regulierte Aufkommen jener PRG-1-Expression und die seither veröffentlichten Resultate sprechen PRG-1 zweifelsohne eine gewichtige Rolle im Fortlauf der neuronalen Genese zu, denn es sind ebensolche essentiellen Funktionen wie das aktive Auswachsen von Dendriten, axonale Wegfindungsprozesse und die Modulation Phospholipid-vermittelter Signaltransduktionswege, mit denen PRG-1 unmittelbar in Verbindung gebracht wird [15, 136].

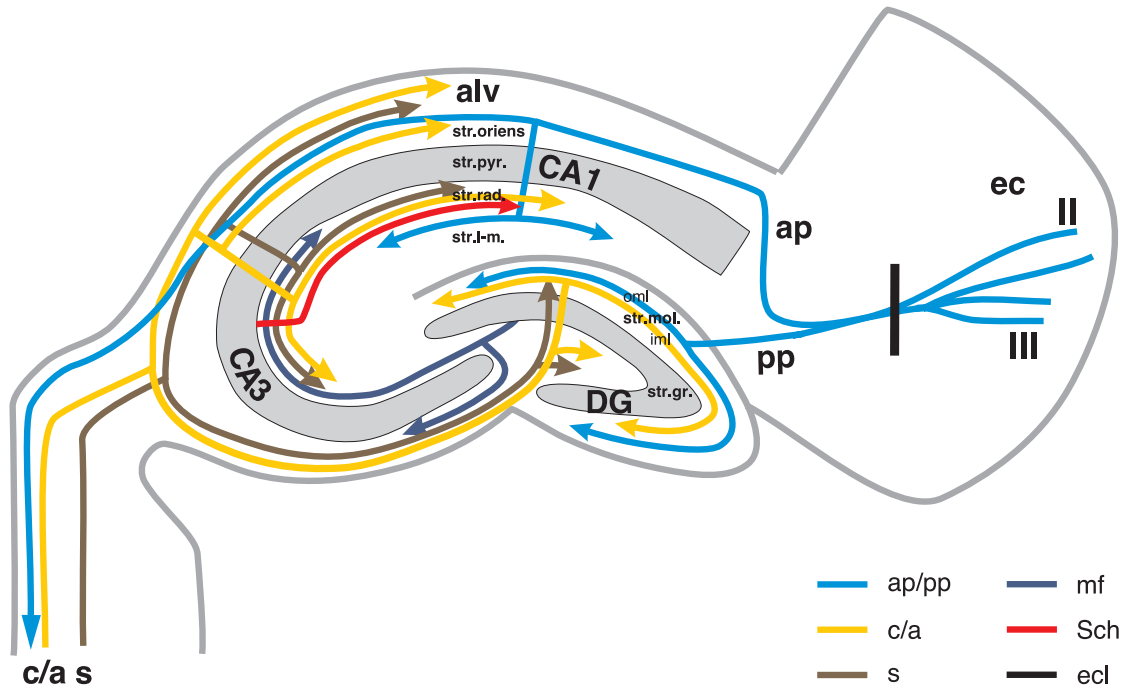
### 1.1.4 Spezifität der PRG-1-Expression im ZNS

Anhand immunhistochemischer Untersuchungen wurde für PRG-1 eine neuronenspezifische Expression nachgewiesen [15]. Unlängst konnten diese Ergebnisse in einer eingehenden Kolokalisierungsstudie nicht nur bestätigt, sondern weiter konkretisiert werden. So ermöglichte beispielsweise der Einsatz spezifischer Marker (NeuN als neuronaler Marker; ProSAP2 und Homer1 als Marker der Postsynapse glutamaterger Neurone) im Rahmen von In-situ-Hybridisierungs- und immunhistochemischen Analysen die Identifizierung von PRG-1 auf der postsynaptischen Seite glutamaterger Neurone im Hippocampus [136]. Erste umfassende Untersuchungen an PRG-1-Knockout-Mäusen (KO) ergaben ein signifikant erhöhtes epileptogenes Potential, welches in elektrophysiologischen Messungen mit einer gesteigerten Erregbarkeit exzitatorischer (glutamaterger) hippocampaler Neurone korrelierte und als Folge einer Desynchronisation neuronaler Netzwerke angesehen wird [136].

### 1.1.5 Der Hippocampus und das Modell der entorhinalen Kortexläsion

Der Hippocampus (syn. Cornu ammonis; Ammonshorn), eine phylogenetisch archikortikale und zum Telenzephalon zählende, dreischichtige Struktur im beidseitigen Bereich des medialen Temporallappens, repräsentiert ein multimodales Integrationsorgan im limbischen Systems, welches eine Vielzahl qualitativ unterschiedlicher Impulse (i. e., visuelle, auditive, taktile, viszerale, olfaktorische) empfängt, beeinflusst und weiterleitet. Der Hauptteil kortikaler Afferenzen aus der Regio entorhinalis erreicht die *Formatio hippocampalis* über den Gyrus dentatus als Tractus perforans (*perforant path*), welcher in einer Kette nacheinander geschalteter Neurone den Gyrus dentatus mit den anatomisch funktionellen CA3- und CA1-Regionen des Cornu ammonis verknüpft. Dorthin gelangen nur wenige Fasern über den Alveus hippocampi (*alvear path*) (Abb. 1.3) [3, 19]. Weitere Afferenzen bilden Assoziations- und Kommissurenfasern, die den Gyrus dentatus über Rückkopplungen aus andernorts lokalisierten Körnerzellen, aus der CA4-Region des Cornu ammonis bzw. dem kontralateralen Gyrus dentatus er-

## 1 Einführung



**Abbildung 1.3: Organisation der neuronalen Verschaltung im entorhino-hippocampalen System.** Schema zur schichtspezifischen Neuronenschaltung im murinen Hippocampus. ap, alveare path; alv, Alveus hippocampi; c/a, kommissurale/assoziative Afferenzen; CA, Cornu ammonis; DG, Gyrus dentatus; ec, entorhinaler Kortex; ecl, entorhinale Kortexläsion; mf, Moosfasern; pp, perforant path; s, septale Afferenzen; Sch, Schaffer-Kollaterale; str. gr., Stratum granulosum; str. l-m., Stratum lacunosum-moleculare; str. mol., Stratum moleculare: oml, äußere Molekularschicht; iml, innere Molekularschicht; str. oriens, Stratum oriens; str. pyr., Stratum pyramidale; str. rad., Stratum radiatum; II, III, Schichten des entorhinalen Kortex.

reichen (Abb. 1.3). Die Verschaltungsprinzipien der Formatio hippocampalis erweisen sich als hoch komplex, da eine Sammlung vorwärts und rückwärts hemmender Interneurone zwischengeschaltet ist und die afferenten Faserbahnen in Abhängigkeit ihrer Herkunftsgebiete schichtspezifisch terminieren [36, 37]. Eingebunden in mannigfaltige, efferente Bahnsysteme projiziert der Hippocampus beispielsweise über den präkommissuralen Fornix in die Area septalis, die Regio praeoptica und den Hypothalamus, über den postkommissuralen Fornix in die Corpora mamillaria, den Ncl. anterior thalami und ebenfalls den Hypothalamus. Faktisch schließen sich damit ganze Regelkreise, von denen der Papez-Circuit (Hippocampus – Fornix – Corpus mamillare – Vicq d’Azyr-Bündel – Ncl. anterior thalami – Gyrus cinguli – Cingulum – Hippocampus) am namhaftesten ist.

Die Bedeutung des Hippocampus bzw. der hippocampalen Formation für die Grundlagenforschung resultiert zum einen aus der intensiv umforschten und relativ klaren Zytoarchitektur und dem raren Potential der Neurogenese [2, 9], zum anderen aus seiner unmittelbar klinischen Relevanz. Die Intaktheit des beiderseitigen Hippocampus bildet die Grundlage für den Erwerb sowie die Koordinierung von Lern- und Gedächtnisinhalten (Langzeitgedächtnis; synaptische Plastizität) und beeinflusst darüber hinaus sowohl Emotionen als auch das somatosensorische und endokrine Gesche-



hen. Schädigungen in diesem Bereich, wie sie exemplarisch bei der limbischen Form der neurodegenerativen Alzheimer-Krankheit in Erscheinung treten, haben u. a. einen schwersten Verlust der Merk- und Gedächtnisfähigkeit zur Folge [13, 141]. Zudem spielt der Hippocampus eine gewichtige Rolle im Rahmen der Epileptogenese. Insbesondere die Temporallappenepilepsie (TLE mit mesialer temporaler Sklerose) ist als spezifische hippocampale Pathologie zu nennen [27]. Fernerhin gelten Veränderungen des entorhino-hippocampalen Systems als morphologisches Korrelat für psychiatrische Erkrankungen wie beispielsweise die Schizophrenie oder Depression [66, 75, 88]. Das entorhino-hippocampale System hat sich in der Vergangenheit für anatomisch-biologische resp. neuropathologische Fragestellungen als geeignet erwiesen und bietet im alteingeführten tierexperimentellen Modell der stereotaktischen entorhinalen Kortexläsion (ECL) die Möglichkeit, die der Entwicklung sowie den Degenerations- und Regenerationsprozessen zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen [23, 36, 97, 101].

### 1.1.6 PRG-1-Expression nach Neurotrauma (ECL)

Unter physiologischen Bedingungen terminieren die entorhinalen Afferenzen als Tractus perforans in der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus, einer Schicht, die für PRG-1 kein spezifisches Detektionssignal kenntlich macht. Im Gefolge einer stereotaktischen entorhinalen Kortexläsion (ECL) jedoch unterliegt ebenjene Zone einem Denervierungs- und Regenerationsprozess und resultierte in einem für PRG-1 positiven Immunnachweis [15]. Semiquantitative Analysen ergaben hierbei eine eminente Hochregulation von PRG-1 (um 50 %) im läsionsseitigen Hippocampus. Zugleich konnte im Rahmen funktioneller Untersuchungen gezeigt werden, dass PRG-1 die lokale, auf Neurone wachstumshemmend wirkende Konzentration bioaktiver Phospholipide im EZR nachhaltig beeinflusst. Dies impliziert eine Reduktion des LPA-induzierten Kollapses der Neuriten sowie eine Förderung neuronaler Auswuchsprozesse [15]. Diese und vergleichbare Daten nach extrakranieller Transsektion des N. facialis sprechen für PRG-1 als ein Neuritenwachstum-assoziiertes Protein, welches an Mechanismen der neuronalen Regeneration und Reorganisation partizipiert [104].

---

## AUTOTAXIN, EINE MAMMALIA KENNZEICHNENDE LYSOPLD

### 1.2.1 Historische Perspektive

Zwei Jahrzehnte datiert es zurück, als Tokumura *et al.* anhand von Phospholipidanalysen im Plasma von Ratten erstmalig die Beteiligung einer Lysophospholipase D (LysoPLD) an der extrazellulären Lysophosphatidsäure (LPA)-Generation beobachteten [135]. In den frühen 1990ern wurde dann die Bezeichnung Autotaxin (ATX) in der wissenschaftlichen Literatur eingeführt, wengleich im Rahmen von Screening-Verfahren, mittels derer autokrine, die zelluläre Motilität stimulierende Faktoren, welche zur Invasivität von Tumorzellen beitragen, identifiziert wurden [126, 123]. Entsprechende Se-

## 1 Einführung

quenzanalysen ergaben in der Folge sehr starke Homologien im Bereich aktiver katalytischer Domänen zu Proteinen, die zu jener Zeit als (E)NPP (*ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase*)-Familie bekannt waren, und gaben letztlich den Anlass zur Namensgebung: (E)NNP2 [126, 125]. Molekularbiologische Methoden ebneten schließlich den Weg zur Identifizierung einer ZNS-spezifischen, alternativen Splice-Variante (Isoform) von ATX, die unter Bezugnahme auf ihre enzymatische Aktivität als Phosphodiesterase I $\alpha$  (PD-I $\alpha$ ) klassifiziert wurde. Geraume Zeit später erst, im Zuge von intensiven Untersuchungen zur Phospholipid-vermittelten Signaltransduktion, wurde eine extrazelluläre, die LPA-Konversion aus Lysophosphatidylcholin (LPC) vermittelnde LysoPLD entdeckt, die sich als identisch mit dem bereits bekannten autokrinen Motilitätsfaktor Autotaxin (ATX / (E)NNP2) erwies [32, 134, 139]. Mit der Eigenschaft einer LysoPLD-Aktivität nimmt ATX, welches ohnehin durch eine höhere Affinität zu LPC als zu den Nukleotid-Substraten gekennzeichnet ist, eine einzigartige Stellung innerhalb der (E)NPP-Familie ein [134, 139]. Diese Erkenntnisse markierten einen Wendepunkt im wissenschaftlichen Interesse um ATX, welches fortan die mannigfaltigen biologischen Wirkungen, die mit dem Phospholipid-vermittelten *Signaling* verbunden sind, in den Mittelpunkt rückte.

### 1.2.2 Isoformen, Domänenstruktur, Prozessierung und Substrate

Gegenwärtig sind drei Isoformen des Typ-2-Transmembranproteins ATX (125 kDa) bekannt, die als Autotaxin  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bezeichnet wurden, wobei Autotaxin  $\gamma$  der ZNS-spezifischen Phosphodiesterase I $\alpha$  (PD-I $\alpha$ ) entspricht. Diese Splice-Varianten zeigen zwar ein jeweils einzigartiges Expressionsmuster, jedoch keine maßgeblichen Unterschiede hinsichtlich ihrer Substratspezifität und funktionellen enzymatischen Aktivität [43]. ATX offenbart wie auch andere Mitglieder der (E)NPP-Familie zwei N-terminal lokalisierte Cystein-reiche Somatomedin-B-ähnliche Domänen, eine zentrale katalytische Phosphodiesterase (PDE)-Domäne (ca. 400 aa) sowie eine N-terminal befindliche, vermutlich enzymatisch inaktive Nuklease-ähnliche Domäne und ein EF-Hand-Motiv [45, 122], wobei die zwei Letztgenannten als Teil der MORFO (*Modulator of Oligodendrocyte Remodeling and Focal adhesion Organization*)-Domäne betrachtet werden, für welche die Bindung an einen noch unbekanntem Zelloberflächenrezeptor angenommen wird [151]. Im N-terminalen Bereich verfügt ATX über eine Transmembrandomäne mit der hydrophoben Sequenz eines Signalpeptides und einer C-terminal davon gelegenen Furin-Spaltungsstelle, die das als Prä-Pro-Enzym synthetisierte ATX sukzessive abspaltet und folglich aktiviert [67, 74]. Im EZR wird ATX schließlich in erheblicher Weise glykosyliert, gleichwohl diese Form der posttranslationalen Modifikation keinen nachweislichen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms ATX nimmt [124]. Vielmehr ist für das Maß der enzymatischen Aktivität entscheidend, wie stark ATX selbst exprimiert wird und dass korrespondierende Substrate – hier vor allem das von der Leber sezernierte Lysophosphatidylcholin (LPC) oder auch das Sphingosylphosphorylcholin (SPC) und Analoga – lokal verfügbar sind [21, 22]. Die Regulation der Enzymaktivität erfolgt sowohl über positive als auch über negative Feedback-Mechanismen der von ATX konvertierten Produkte LPA und S1P [83, 106, 109].

### 1.2.3 Expressionsprofil und biologisches Wirkungsspektrum

Autotaxin bedingt relevante Prozesse in einer Vielzahl von Gewebearten (z. B. Gehirn, Ovar, Lunge, Herz, Milz, Leber, Intestinum, Niere) im Verlaufe der physiologischen Entwicklung und im Adulten (Tab. 1.1) [7, 43, 100, 113]. Darüber hinaus lassen sich auch in verschiedenen Körperflüssigkeiten (z. B. Serum, zerebrospinale Flüssigkeit, Seminalplasma) hohe Proteinkonzentrationen ermitteln [110, 128, 134, 139]. In multiplen (primären) Zelllinien kann ATX konstitutiv nachgewiesen, induziert, hochreguliert und supprimiert werden [73, 96, 132]. Gleichwohl wird ATX mit einer Reihe pathophysiologischer Prozesse in Verbindung gebracht, die zu Krankheitsentstehung und -perseverieren beitragen (Tab. 1.1). Jenes breit gefächerte Expressionsmuster wurde dennoch um einen ganz wesentlichen Aspekt ergänzt. ATX wurde in Tumorzellen verschiedener Entitäten nachgewiesen und es ist anzunehmen, dass es aufgrund der prädominanten Rolle bei der Bildung des bioaktiven Signalmoleküls LPA maßgeblich zur Initiation sowie Progression maligner Tumoren im Sinne metastatischer Kaskaden beiträgt (Stimulation von Tumorzellmotilität, Tumoraggressivität, Invasivität, Metastasierung und Angiogenese, s. Tab. 1.1) [86].

**Tabelle 1.1:** Biologische Wirkungen von ATX. Referenzen: 1, Fuss *et al.* (1997); 2, Narita *et al.* (1994); 3, van Meeteren *et al.* (2006); 4, Tanaka *et al.* (2006); 5, Nam *et al.* (2001); 6, Rogers *et al.* (2004); 7, Black *et al.* (2004); 8, Kanda *et al.* (2008); 9, Sato *et al.* (2005); 10, Murata *et al.* (1994); 11, Stracke *et al.* (1997); 12, Chen *et al.* (2005); 13, Kishi *et al.* (2006); 14, Khurana *et al.* (2008); 15, Nam *et al.* (2000); 16, Umezu-Goto *et al.* (2002); 17, Song *et al.* (2005); 18, Baumforth *et al.* (2005); 19, Yang *et al.* (2002); 20, Baker *et al.* (2006); 21, Nohu *et al.* (2009); 22, Umemura *et al.* (2006); 23, Inoue und Xie *et al.* (2008); 24, Inoue und Ma *et al.* (2008); 25, Hammack *et al.* (2004); 26, Ferry *et al.* (2003); 27, Boucher *et al.* (2005); 28, Watanabe und Ikeda *et al.* (2007); 29, Watanabe und Ikeda *et al.* (2007); 30, Zhao *et al.* (2008); 31, Santos *et al.* (1996).

| Effekt   | Zelltyp/ Anmerkungen  | Referenz    |
|--|---|-------------|
| Differenzierung und Myelinisierung                                   | Oligodendrozyten  | (1)         |
| Sekretion/Transport via Blut-Liquor-Schranke und Blut-Augen-Schranke | Epithelzellen des Plexus choroideus, Ziliarepithelzellen, retinale Pigmentepithelzellen   | (2)         |
| Entwicklung und Stabilisierung embryonaler Gefäße                    | ATX-Knockout-Maus   | (3, 4)      |
| Angiogenese, Vaskulogenese   | murines Angiogenese-Modell; HU-VECs, murine Kornea  | (5–7)       |
| Beeinflussung des Immunsystems                                       | Eintritt von Lymphozyten in sekundär lymphatische Organe  | (8)         |
| Neuronale Entwicklung  | Neuralrohrdefekte, asymmetrische Kopffalten   | (3)         |
| Morphologie der Neuriten   | Neuritenretraktion  | (9)         |
| Stimulation zellulärer Motilität                                     | Tumorzellen und -zelllinien; Glioblastomzellen, MDA-MB-435-Zellen; glatte Muskelzellen der Koronararterien; intestinale Zellen; FLS | (10–15, 30) |

## 1 Einführung

Tabelle 1.1: fortgesetzt

| Effekt                                     | Zelltyp/ Anmerkungen  | Referenz        |
|--|---|-----------------|
| Zellproliferation und -überleben (mitogen) | EBV-infizierte HL-Zellen (Hodgkin-Lymphomzellen); Apoptoseinhibition von Fibroblasten   | (15–18)         |
| Tumorprogression, Invasion, Metastasierung | Glioblastoma multiforme; Mamma-Ca; Ovarial-Ca; Prostata-Ca                              | (13, 15, 19–21) |
| Demenz vom Alzheimer-Typ                   | erhöhte Expression im frontalen Kortex  | (22)            |
| Neuropathische Schmerzzinduktion           |   | (23, 24)        |
| Multiple Sklerose                          | De-novo-Nachweis in der CSF; EAE-Mausmodell (experimentelle Autoimmunenkephalomyelitis) | (1, 25)         |
| Adipositas                                 | Aktivierung präadipozytärer Proliferation, Adipogenese                                  | (26)            |
| Diabetes mellitus, Typ II                  | erhöhte Expression in Adipozyten, Kontribution zur adipozytären Insulinresistenz        | (27)            |
| Chronische Hepatitis C                     | erhöhte Serumkonzentration, verbunden mit erhöhten LPA-Plasmaspiegeln                   | (28, 29)        |
| Rheumatoide Arthritis                      | Nachweis in der Synovialflüssigkeit   | (30, 31)        |

### 1.2.4 Spezifität der ATX-Expression im ZNS

Das physiologische Vorkommen von Autotaxin im zentralen Nervensystem erweist sich in Anbetracht der bisher identifizierten Zelltypen als vergleichsweise vielgestalt. Sekretorische epitheliale Zellen, und hierbei insbesondere jene Epithelzellen des Plexus choroideus, Iris- und Ziliarepithelzellen sowie retinale Pigmentepithelzellen, sind im adulten Gehirn von einem hohen ATX-Expressionsniveau ebenso gekennzeichnet wie Oligodendrozyten, leptomeningeale und an der Vaskularisation beteiligte Zellen [41, 56, 110]. Dabei legt das Vorhandensein von ATX in sekretorischen Epithelzellen des ZNS eine Beteiligung an der Blut-Liquor-Schranke bzw. Blut-Augen-Schranke nahe [41]. Im Fortgang der ZNS-Entwicklung lässt sich murine ATX-mRNA in der Bodenplatte des Neuralrohres (E8.5-E14.5), im Plexus choroideus (ab E12.5), in Oligodendrozyten resp. in den Leptomeningen von Gehirn und Rückenmark darstellen [7, 41]. Dabei unterliegt die ATX-Expression einer signifikanten Regulation, die von einer steilen Zunahme des Expressionssignals (bis etwa P20) meistens in Bereichen der Substantia alba geprägt ist und mit dem Beginn aktiver Myelinisierungsprozesse koinzi-

diert, weshalb ATX eine wesentliche Funktion im Differenzierungsgeschehen der Oligodendrozyten und in der von ihnen vermittelten Markreifung von Nervenfasern zugewiesen wird [41]. Wissenschaftliche Untersuchungen zur Multiplen Sklerose (MS) (Encephalomyelitis disseminata, ED), einer chronisch-inflammatorischen Erkrankung des ZNS, welche mit einer progredienten Entmarkung (Demyelinisierung) der Nervenzellfortsätze einhergeht, bekräftigen diese Annahmen. ATX wurde in supraphysiologischer Konzentration in der zerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) MS-betroffener Patienten detektiert [52]. Daneben zeigten sich in einem etablierten, der Immunpathogenese der MS ähnelnden Mausmodell (EAE-Modell; experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis) signifikant reduzierte mRNA-Niveaus von Autotaxin in Gehirn und Rückenmark noch vor dem Eintreten einer klinischen Symptomatik [41]. Darüber hinaus ergab eine Arbeit, innerhalb derer 50 Tumorzelllinien auf eine etwaige ATX-Expression hin analysiert wurden, höchste Expressionslevel für die aus dem ZNS abgeleiteten immortalisierten Zelllinien [73].

## LYSOPHOSPHATIDSÄURE

### 1.3.1 Physiologische und pathophysiologische Wirkungen der LPA

Die Lysophosphatidsäure (LPA; 1- oder 2-Acyl-*sn*-glycerin-3-phosphat) repräsentiert den derzeit renommiertesten und am umfassendsten charakterisierten Vertreter der Lysophospholipid (LPL)-Familie, der trotz seiner simplen chemischen Struktur (Abb. 1.4) eine faszinierende Zellbiologie zeigt.



**Abbildung 1.4: Strukturformel der LPA.** Schematische Darstellung des LPA-Moleküls, welches sich aus einer Phosphatgruppe, einem Glyceringerüst (Linker-Region) und einer Monocarbonsäure (Fettsäure), die an Länge und im Grad der Sättigung variieren kann, zusammensetzt.

Sinngemäß handelt es sich hierbei um ein in physiologisch signifikanter Konzentration (1-5  $\mu\text{M}$ ) im Serum bzw. Plasma als auch in einer Vielzahl anderer Körperflüssigkeiten (Speichel, Seminalplasma, Follikelflüssigkeit, maligne Effusionen) vorkommendes bioaktives Signalmolekül, das als Regulator zahlreicher relevanter inter- und intrazellulärer Prozesse gilt, die im weit gefassten Sinne Wachstumsfaktor-ähnliche zelluläre Wirkungen wie die Induktion von Proliferation, Migration, Differenzierung und Überleben implizieren. Deduktiv wird der LPA eine gewichtige Rolle u. a. in Aspekten der morphologischen und differenzierenden Zell- und Gewebeumgestaltung, im Zuge der neuralen und neuronalen Genese, im Myelinisationsgeschehen sowie im Rahmen immunologischer und reproduktiver Abläufe zugesprochen (Tab. 1.2). Auch unter pathophysiologischen Bedingungen, in Wundheilungsprozessen, in der Entstehung

## 1 Einführung

von Thromben und arteriosklerotischen Plaques, in der Adipogenese, in der Initiation neuropathischer Schmerzen beispielsweise, ist die LPA maßgeblich involviert (Tab. 1.2) [134, 90]. Die wohl bedeutendste Erkenntnis auf dem Gebiet der LPA-Forschung ist jedoch der Nachweis von LPA als elementaren Faktor in der Pathogenese und Progression maligner Tumoren (u. a. Ovarial-Ca, Mamma-Ca, Prostata-Ca, Gliom, Neuroblastom, malignes Melanom) (Tab. 1.2) [31, 62, 73, 86].

**Tabelle 1.2:** Biologische Wirkungen der LPA. *Referenzen.* 1, Jalink *et al.* (1993); 2, Boucharaba *et al.* (2004); 3, Yang *et al.* (2005); 4, Boucharaba *et al.* (2006); 5, Jonkers *et al.* (2009); 6, Mills *et al.* (1990); 7, Xu *et al.* (1995); 8, Xie *et al.* (2002); 9, Liu *et al.* (2009); 10, Balazs *et al.* (2001); 11, Sturm und Dignass (2002); 12, Tomasek *et al.* (1999); 13, Rayan *et al.* (1996); 14, Haseruck *et al.* (2004); 15, Pamuklar *et al.* (2009); 16, Yoshida *et al.* (2003); 17, Zhang *et al.* (2004); 18, Siess *et al.* (1999); 19, Schulze *et al.* (1997); 20, van Nieuw Amerongen *et al.* (2000); 21, Tanaka *et al.* (2006); 22, Jalink *et al.* (1995); 23, Ramakers und Moolenaar (1998); 24, Fukushima *et al.* (2000); 25, Campbell und Holt (2001); 26, Yuan *et al.* (2003); 27, Fukushima *et al.* (2002); 28, Hayashi *et al.* (2001); 29, Kingsbury *et al.* (2003); 30, Inoue *et al.* (2004); 31, Fujita *et al.* (2007); 32, Weiner *et al.* (2001); 33, Postma *et al.* (1998); 34, Postma *et al.* (1996); 35, Dubin *et al.* (1999); 36, Postma *et al.* (2001); 37, Ye *et al.* (2005).

| Effekt  | Zelltyp/ Anmerkungen   | Referenz    |
|---|--|-------------|
| Zellproliferation und -überleben  | normale/transformierte Zelltypen   |             |
| Zellmigration und Invasion  | normale/transformierte Zelltypen   | (1)         |
| Tumorprogression  | xenotransplantierte Mäuse (Überexpression/ Knockdown von LPA-Rezeptoren); Glioblastoma multiforme; Mamma-Ca; Ovarial-Ca; Prostata-Ca                               | (2–9)       |
| Wundheilung <i>in vivo</i>  | Haut, intestinale Epithelzellen  | (10, 11)    |
| Zellkontraktion   | glatte Muskelzellen, Myofibroblasten (M. Dupuytren)  | (12, 13)    |
| Thrombozytenaktivierung, Thrombozytenaggregation, Einfluss auf Hämostase und Thrombosierung | LPA in arteriosklerotischen Plaques; Synergie mit ADP; hämorrhagische Diathese bei erhöhten LPA-Spiegeln im murinen Serum (nach transgener Überexpression von ATX) | (14, 15)    |
| Vaskuläres Remodeling, Neointimaformation <i>in vivo</i> , Arteriosklerose                  | A.-carotis-Modell der Ratte; LPA-Akkumulation in arteriosklerotischen Läsionen; Dedifferenzierung vaskulärer glatter Muskelzellen                                  | (16–18, 26) |
| Erhöhung der Endothelpermeabilität  | Endothelzellen der Hirnkapillaren, makrovaskuläre Endothelzellen   | (19, 20)    |
| Stabilisierung embryonaler Gefäße   |  | (21)        |

Tabelle 1.2: fortgesetzt

| Bezeichnung   | Inhalt  |         |
|---|---|---------|
| Zytokin-/Chemokinproduktion (CCL2/MCP-1, IL-1b, IL-3, IL-6, IL-8/CXCL8, CXCL1/Gro- $\alpha$ , GM-CSF) | Fibroblasten, Astrozyten, Leukozyten, Epithelzellen, Endothelzellen, Karzinomzellen                   | (22)    |
| Intrazelluläre Calcium-Freisetzung  | humane A431-Zellen  | (22)    |
| Neuritenretraktion, Wachstumskegelkollaps, Zellabrundung  | Neuroblastomzellen, primäre Neurone   | (23–27) |
| Inhibition/Umkehr der Differenzierung   | Neuroblastom- und Gliomzellen, Astrozyten, Präadipozyten, glatte Gefäßmuskelzellen                    | (28)    |
| Wachstum und Faltung des Kortex <i>ex vivo</i>  | Wirkung auf neurale Progenitorzellen; nicht in LPA <sub>1</sub> /LPA <sub>2</sub> -defizienten Mäusen | (29)    |
| Neuropathische Schmerzzinitiatiion, Demyelinisierung der Hinterwurzel <i>in vivo</i>                  | nicht in LPA <sub>1</sub> -defizienten Mäusen   | (30)    |
| Demyelinisierung der Hinterwurzel <i>ex vivo</i>  | direkte Wirkung auf myelinisierende Schwann-Zellen  | (31)    |
| Bildung von Zellclustern (N-Cadherin-vermittelt)  | Schwann-Zellen  | (32)    |
| Hemmung der Zellkommunikation via Gap Junctions   | Hepatomzellen, Fibroblasten   | (33)    |
| Membrandepolarisierung  | neuronale Zellen, Fibroblasten  | (34–36) |
| Blastozystenimplantation  | LPA <sub>3</sub> -vermittelt  | (37)    |

### 1.3.2 LPA – Spezifischer Ligand der LPA-Rezeptoren

Seit geraumer Zeit ist bekannt, dass die überwiegende Zahl biologischer Wirkungen der LPA, die *in vivo* zudem in verschiedenen Formen nachzuweisen ist (mit gesättigten FS 16:0, 18:0; mit ungesättigten FS 16:1, 18:1, 18:2, 20:4), über membranständige G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs; LPA<sub>1–7</sub>) in unterschiedlichem Ausmaße vermittelt wird. Entsprechend dem Grad ihrer Homologien im Aminosäuresequenzbereich wurden jene Rezeptoren fernerhin kategorisiert, wodurch zwei Subtypen, und zwar die EDG (*endothelial differentiation gene*)-Familie und die P2Y (Nukleotid-Rezeptor)-Familie, in der Nomenklatur Einzug fanden (Tab. 1.3). Die Vielfalt der LPA-vermittelten sowohl physiologischen als auch pathophysiologischen Reaktionen wird

## 1 Einführung

|                    | Syn.           | G-Protein   | Zelluläre Reaktion   | Physiologie          | Pathophys.  | Ref.    |
|--------------------|----------------|---|--|----------------------|---|---------|
| <b>EDG-Familie</b> |                |   |  |                      |   |         |
| LPA <sub>1</sub>   | EDG2           | G <sub>i/o</sub> , G <sub>q</sub> ,<br>G <sub>12/13</sub>                     | Proliferation, Chemotaxis,<br>Faserausdehnung, Apoptosehemmung | Gehirnentwicklung    | Neuropathischer Schmerz,<br>Fibrose, Metastasierung | (1-6)   |
| LPA <sub>2</sub>   | EDG4           | G <sub>i/o</sub> , G <sub>q</sub> ,<br>G <sub>12/13</sub>                     | Proliferation, Chemotaxis,<br>Faserausdehnung, Apoptosehemmung | Schutz vor Strahlung |   | (6-8)   |
| LPA <sub>3</sub>   | EDG7           | G <sub>i/o</sub> , G <sub>q</sub>   | Proliferation, Chemotaxis                                      | Embryoimplantation   |   | (9-11)  |
| <b>P2Y-Familie</b> |                |   |  |                      |   |         |
| LPA <sub>4</sub>   | GPR23,<br>P2Y9 | G <sub>s</sub> , G <sub>i/o</sub> ,<br>G <sub>q</sub> ,<br>G <sub>12/13</sub> | Stressfaserformation,<br>Neuritenretraktion, Zelladhäsion      |                      |   | (12)    |
| LPA <sub>5</sub>   | GPR92          | G <sub>i/o</sub> , G <sub>q</sub>   | Stressfaserformation,<br>Neuritenretraktion                    |                      |   | (13)    |
| LPA <sub>6</sub>   | GPR87          |   | Proliferation, Apoptosehemmung                                 |                      |   | (14)    |
| LPA <sub>7</sub>   | P2Y5           | G <sub>s</sub> , G <sub>i/o</sub>   |  | Haarwuchs            |   | (15,16) |

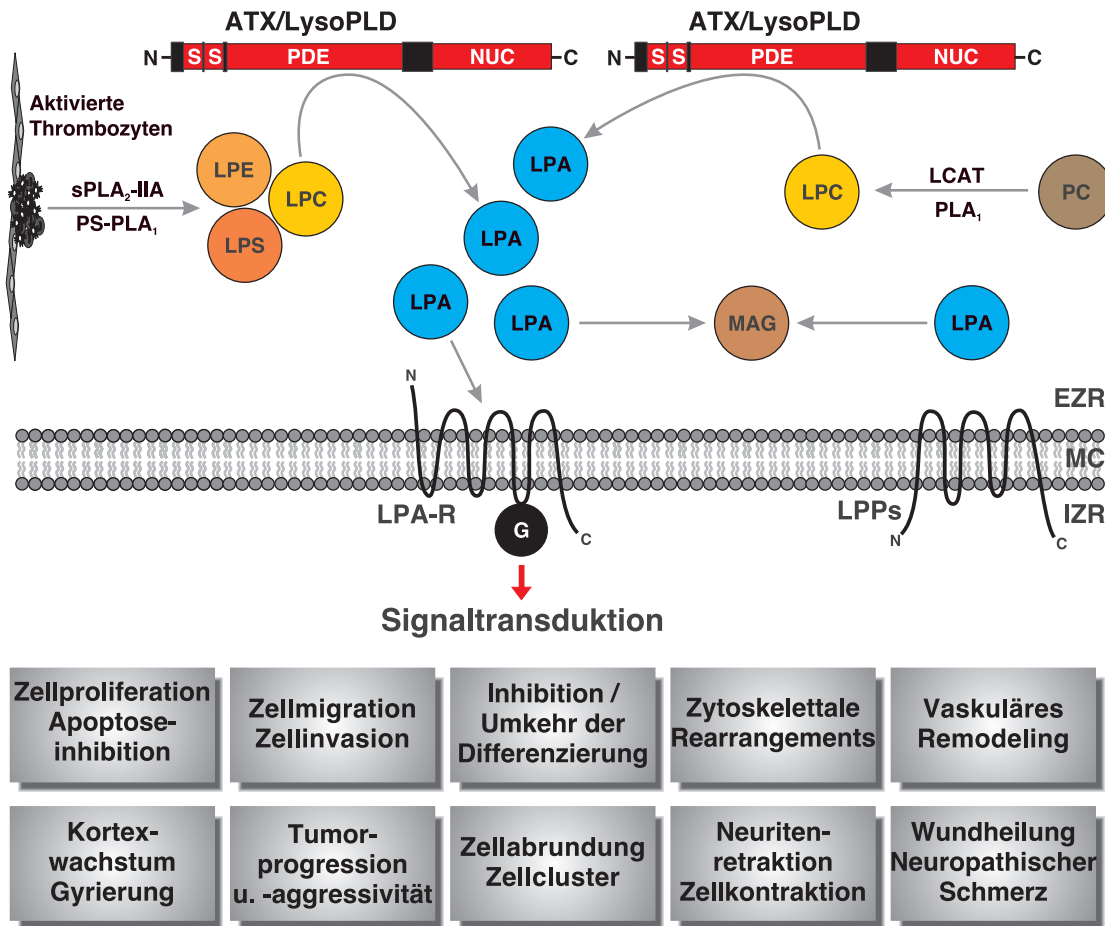
**Tabelle 1.3:** LPA-Rezeptoren und ihre Funktionen. *Referenzen.* 1, Hecht *et al.* (1996); 2, Ishii *et al.* (2004); 3, McIntyre *et al.* (2003); 4, Murakami *et al.* (2008); 5, Contos *et al.* (2000); 6, Pradere *et al.* (2007); 7, An *et al.* (1998); 8, Inoue *et al.* (2004); 9, Bandoh *et al.* (1999); 10, Tager *et al.* (2008); 11, Hama *et al.* (2004); 12, Noguchi *et al.* (2003); 13, Lee *et al.* (2006); 14, Tabata *et al.* (2007); 15, Pasternack *et al.* (2008); 16, Shimomura *et al.* (2008).

in Anbetracht der Möglichkeit, nach mediater extrazellulärer Bindung von Lysophosphatidsäure an den jeweiligen Rezeptor unterschiedliche, intrazellulär gelegene G-Protein-Subtypen (G<sub>i/o</sub>, G<sub>q</sub>, G<sub>s</sub>, G<sub>12/13</sub>) zu binden und zu aktivieren, erklärt (Tab. 1.3). Neben den zuvor Genannten gilt auch der nukleäre Rezeptor und Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor*  $\gamma$ ) als spezifische LPA-Bindungsstelle, wenngleich die mit der PPAR $\gamma$ -Assoziation verbundenen Funktionen der LPA als *second messenger* hier bislang noch ungeklärt sind [81]. Mit der Identifizierung von P2Y10, einem weiteren Mitglied der P2Y-Familie, wurde ein neuer LPA (und S1P)-Rezeptor postuliert, welcher die stetig anwachsende Liste potentieller LPA-Bindungsstellen nunmehr ergänzen soll [92].

### 1.3.3 Pfade der extrazellulären LPA-Generierung

Gegenwärtig werden die für LPA nachstehend genannten Synthesewege im EZR als wesentlich erachtet: (i) die LPA-Produktion durch die LysoPLD (ATX), (ii) durch die Phospholipasen A (PLAs), (iii) die Monoacylglycerin-Kinase und (iv) durch die Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase (GPAT). Der erste Syntheseweg impliziert die Konversion zuvor freigesetzter Lysophospholipide (LPLs), für die derzeit zwei Mechanismen angenommen werden. Demnach können LPLs, die da sind Lysophosphatidyl-





**Abbildung 1.5: Pfade der LPA-Produktion durch gelöstes ATX und deren Wirkungen.** ATX, Autotaxin; EZR, Extrazellulärraum; G, G-Protein; IZR, Intrazellulärraum; LCAT, Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase; LPA, Lysophosphatidsäure; LPA-R, LPA-Rezeptor; LPC, Lysophosphatidylcholin; LPE, Lysophosphatidylethanolamin; LPPs, Lipidphosphatphosphatasen; LPS, Lysophosphatidylserin; LysoPLD, Lysophospholipase D; MAG, Monoacylglycerol; MC, Membrana cellularis (Zellmembran); NUC, Nuclease-ähnliche Domäne; PC, Phosphatidylcholin; PDE, Phosphodiesterase-Domäne; PLA<sub>1</sub>, Phospholipase A<sub>1</sub>; PS-PLA<sub>1</sub>, Phosphatidylserin-spezifische PLA<sub>1</sub>; s, Somatomedin-B-ähnliche Domänen; sPLA<sub>2</sub>-IIA, sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub>-IIA.

cholin (LPC), Lysophosphatidylethanolamin (LPE) und Lysophosphatidylserin (LPS), einerseits über die sekretorische PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>-IIA) resp. die Phosphatidylserin-spezifische PLA<sub>1</sub> (PS-PLA<sub>1</sub>) aus aktivierten Thrombozyten freigesetzt werden (Abb. 1.5). LPC allein kann andererseits im Plasma aus Phosphatidylcholin (PC) über die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) sowie über PLA<sub>1</sub>-Isoformen generiert werden (Abb. 1.5) [5, 6, 29, 33]. Der zweite LPA-Syntheseweg umfasst die von Phospholipasen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> (u. a. PS-PLA<sub>1</sub>, mPA-PLA<sub>1α</sub>, mPA-PLA<sub>1β</sub>, sPLA<sub>2</sub>) getriggerte Umsetzung der Phosphatidsäure (PA) insbesondere unter pathophysiologischen Bedingungen [11, 55, 121]. Ob und inwieweit die PLAs auch unter physiologischen Bedingungen an der extrazellulären LPA-Generierung beteiligt sind, bleibt vorerst unklar. Fernerhin kann die LPA über einen dritten und vierten Weg, und zwar in Folge der Phosphory-

## 1 Einführung

lierung von Monoacylglycerol (MAG) beziehungsweise der Acylierung von Glycerin-3-phosphat, synthetisiert werden [11, 25].

Extrazelluläre Lysophosphatidsäure wird schließlich in hohem Maße an Serumalbumin, einem der vergleichsweise niedrig-affinen Transportproteine gebunden und an die entsprechenden Rezeptoren vermittelt [131, 133]. Daneben konnten auch hoch-affine Transportproteine für die LPA, wie beispielsweise das Gelsolin, identifiziert werden. So soll etwa Gelsolin die diffuse Bindung der zirkulierenden LPA an niedrig-affine Transportproteine resp. Effektoren (u. a. Thrombozyten, Endothelzellen) und den physiologischen LPA-Abbau im Falle eines Traumas verhindern [46].

### 1.3.4 LPA-Degradation

Das Vorhandensein rezeptoraktiver LPA *in vivo* in unterschiedlichen Konzentrationen legt nahe, dass den komplexen und sensiblen Mechanismen der LPA-Produktion ebensolche Mechanismen gegenüberstehen, die zur Inaktivierung und / oder *Clearance* derselbigen beitragen. Als integraler Bestandteil jener gegenregulativen Prozesse gilt hierbei die Familie der Lipidphosphatphosphatasen (LPPs; LPP1/LPP1a, LPP2, LPP3), integrale Transmembranproteine, deren Ektoenzymaktivitäten die Dephosphorylierung extrazellulärer LPA gewährleisten und diese in das biologisch inaktive Monoacylglycerol (MAG) umsetzen (Abb. 1.5) [114, 154]. Darüber hinaus konnten *in loco* auch gesonderte Mechanismen der LPA-Konvertierung identifiziert werden, wie es beispielsweise für die Prostata-spezifische saure Phosphatase (PAP) in dem weitestgehend von der Prostata sezernierten Seminalplasma dargestellt wurde [128]. Die intrazellulären Kontrollmechanismen sind dagegen bislang ungeklärt.

## 2 Thesen und Fragestellung

1. Unter den Phospholipiden nimmt die Lysophosphatidsäure (LPA) eine zentrale Position als Signalmolekül und Regulator in mannigfaltigen inter- und intrazellulären Prozessen ein und vermittelt im Allgemeinen Prozesse wie die Stimulation von Proliferation, Überleben, Differenzierung und Migration. Die unermessliche Vielfalt der LPA-vermittelten biologischen Wirkungen resultiert hierbei zum einen aus der Tatsache, dass die LPA an zahlreiche membranständige G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCRs; LPA<sub>1-7</sub>) bindet und diese aktiviert, zum anderen aus dem Potential jener LPA-Rezeptoren, variable intrazellulär gelegene G-Protein-Subtypen zu konnektieren. Konsekutiv wird der LPA eine eminente Rolle u. a. in der neuralen und neuronalen Genese, im Myelinisierungsgeschehen sowie in immunologischen Prozessen zuerkannt.
2. Die zeitliche und räumliche Regulation rezeptoraktiver LPA stellt hierbei einen komplexen Prozess dar, in dem unterschiedliche Faktoren – im Wesentlichen Autotaxin (ATX), die Phospholipasen A (PLA), die Lipidphosphatphosphatasen (LPPs) und die LPA-Rezeptoren (LPA-R) – intervenieren.
3. Neben den LPPs, deren Ektoenzymaktivitäten die Degradierung von extrazellulärer LPA gewährleisten, rückte in jüngster Vergangenheit zunehmend auch das LPP-verwandte Molekül PRG-1 (*Plasticity-related Gene-1*) in den wissenschaftlichen Fokus, da auch dieses ZNS- und Vertebraten-spezifische integrale Membranprotein die LPA-vermittelten Signaltransduktionswege zu beeinflussen vermag.
4. In Anbetracht der progressiven Erkenntnisse über die Funktionen von PRG-1 während der Entwicklung und im Rahmen regenerativer Prozesse nach einem Neurotrauma (ECL), die eine Partizipation an Systemen neuronaler beziehungsweise synaptischer Plastizität nahe legen und bislang vornehmlich auf das entorhino-hippocampale System beschränkt waren, galt es im Rahmen dieser Arbeit, den nachstehend genannten Fragen nachzugehen: Wie ist das Protein PRG-1 panenzephal verteilt, um Rückschlüsse über möglicherweise weitere Funktionen und Interaktionsbereiche von PRG-1 ziehen zu können? Zeigen andere Regionen des zentralen Nervensystems eine maturationsabhängige Regulation der Proteinexpression?
5. Aufgrund der Gegebenheiten, dass sich die Handhabung der LPA *in praxi* als diffizil erweist und die technischen Möglichkeiten einer lokal-geweblichen, intrazerebralen LPA-Messung derzeit limitiert sind, sollten hier folgende Fragen

## 2 Thesen und Fragestellung

zum primären und entscheidenden LPA-generierenden Protein und Enzym Autotaxin (ATX) Klärung finden: Wie ist das Gen ATX unter entwicklungsbiologischen Aspekten im zentralen Nervensystem exprimiert beziehungsweise reguliert? Welche zelluläre Distribution offenbart Autotaxin hierbei?

6. Seit geraumer Zeit nun ist bekannt, dass Veränderungen der physiologischen LPA-Homöostase mit gravierenden Folgen auf zellulärer Ebene einhergehen. In der wissenschaftlich mehrfach geäußerten Annahme, dass es infolge von Neurotraumata zu einem Anstieg extrazellulärer LPA-Spiegel kommt, lag der Impuls, das LPA-produzierende Enzym ATX exemplarisch anhand des etablierten Modells der entorhinalen Kortexläsion (ECL) unter folgender Fragestellung zu analysieren: Werden Gen- und Proteinexpression von Autotaxin durch ein Neurotrauma alteriert? Sind gegebenenfalls zellmorphologische Veränderungen festzustellen?
7. Unabhängige Untersuchungen einer Vielzahl von Tumorzelllinien und Tumorzellen verschiedenster Entitäten haben gezeigt, dass die LPA infolge der Stimulation von Tumorzellen ebenso an Prozessen wie der Initiation und Progression maligner Tumoren maßgeblich beteiligt ist. Interessanterweise wurden im Zuge dieser Untersuchungen wiederholt erhöhte extrazelluläre LPA-Konzentrationen beobachtet. Ein richtungsweisender Beleg für einen kausalen Zusammenhang zwischen der LPA und der Karzinogenese war mit der Identifizierung von ATX, dem primären LPA-generierenden Enzym, als pro-metastatischen Faktor gegeben. Demgemäß stimuliert ATX die Motilität und Aggressivität sowie das invasive Wachstumsverhalten von Tumorzellen und gilt als essentiell in Aspekten der Neoangiogenese.
8. Konsequenterweise stellte sich vor diesem Hintergrund die Frage nach einer etwaigen Beteiligung von PRG-1, einem LPA-modifizierenden Protein, an jenen pathophysiologischen Prozessen. Hierfür sollten im Vorfeld (in Kooperation mit dem Institut für Pathologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) Karzinome unterschiedlichen Gewebeerstammes sowie variative Tumorzelllinien auf eine mögliche Genexpression hin analysiert werden. In Entsprechung der Resultate galt es dann, die PRG-1-Expression exemplarisch für eine Tumorentität näher zu beschreiben.
9. Mit der nachfolgenden Etablierung einer korrespondierenden Karzinomzelllinie sollten erste einleitende und funktionelle Untersuchungen durchgeführt werden. Gibt es Hinweise für einen potentiellen Einfluss von PRG-1 etwa auf die Morphologie, das Proliferations- und Migrationsverhalten dieser Tumorzellen?
10. Als ursächlich für die pro-karzinogene Wirkung der Lysophosphatidsäure werden gegenwärtig auch veränderte Expressionen der spezifischen LPA-Rezeptoren erachtet. Demgemäß sollte im Rahmen dieser Arbeit schließlich die Frage nach dem Genexpressionsprofil der derzeit bekannten LPA-Rezeptoren (LPA<sub>1-7</sub>) für jene modellhafte Karzinomzelllinie Klärung finden.

# 3 Material und Methoden

---

## MATERIALIEN

### 3.1.1 Gewebe und Zelllinien

#### Tiere

Die männlichen Versuchstiere (Wistar- und Sprague Dawley-Ratten, C57/BL6-Mäuse) wurden durch die Firma Charles River WIGA (Sulzfeld, Deutschland) beziehungsweise durch die *Tierexperimentelle Einrichtung* der Charité – Universitätsmedizin Berlin bereitgestellt und in einem Tierstall unter standardisierten Laborbedingungen gehalten. In Übereinstimmung mit dem deutschen Gesetz und den Richtlinien der Europäischen Kommission (Direktive 86/609/EEC) über die Verwendung von Labortieren für experimentelle und andere wissenschaftliche Zwecke wurden die chirurgischen Eingriffe nach hinreichender Anästhesie durchgeführt. Die Zahl der Versuchstiere wurde dabei auf das notwendige Minimum begrenzt.

#### Mikroorganismen

E. coli XL-1Blue (Stratagene)  
E. coli XL10-Gold® (Stratagene)

#### Zelllinien

COS-7 (DMSZ No. ACC60; Niere des Affen)  
DU-145 (DSMZ No. ACC 261; humanes Prostatakarzinom)  
HEK 293 (ATCC No. CRL-1573; humane Niere)

### 3 Material und Methoden

#### 3.1.2 Antikörper

**Tabelle 3.1:** Index der verwendeten primären resp. sekundären Antikörper.

| Antikörper   | Herkunft                   | Produkt-Nr. | Anwendung    | Einsatz          |
|--|----------------------------|-------------|--------------|------------------|
| Monoclonal Anti- $\beta$ -Actin Clone AC-15                              | Sigma                      | A-5441      | ICC, IB      | 1:1000<br>1:5000 |
| Monoclonal Anti-Autotxin/LysoPLD 030731                                  | Aoki <sup>1</sup>          |             | IHC, ICC, IB | 1:200 1:500      |
| Monoclonal Anti-Autotxin/LysoPLD Clone 4F1                               | Aoki <sup>1</sup>          |             | IHC, ICC, IB | 1:200 1:500      |
| Lysophospholipase D Polyclonal Antibody (ATX/NPP-2)                      | Cayman Chemical            | 10005375    | ICC, IB      | 1:200            |
| Monoclonal Anti-CNPase Clone 11-5B                                       | Sigma                      | C-5922      | IHC          | 1:100            |
| Anti-A2B5, Clone A2B5-105  | Chemicon                   | MAB312      | IHC          | 1:500            |
| Anti-NG2 Chondroitin Sulfate Proteoglycan                                | Chemicon                   | MAB5384     | IHC          | 1:500            |
| Anti-O4, Clone 81  | Chemicon                   | MAB345      | IHC          | 1:500            |
| Monoclonal Anti-APC CC1  | Calbiochem                 | OP80-100UG  | IHC          | 1:200            |
| Monoclonal Anti-Flag <sup>®</sup> M2 Antibody                            | Sigma                      | F-1804      | ICC          | 1:1000           |
| Polyclonal Anti-Flag <sup>®</sup> Antibody                               | Sigma                      | F-7425      | ICC          | 1:1000           |
| Mouse Anti-GFAP Monoclonal Antibody                                      | Chemicon                   | MAB360      | IHC          | 1:400            |
| A.v. Monoclonal Antibody (JL-8)  | Becton Dickinson           | 632.380     | IB           | 1:2500           |
| p38 MAPK Antibody  | Cell Signaling             | 9212        | IB           | 1:1000           |
| Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Antibody                                | Cell Signaling             | 9211        | IB           | 1:500            |
| p44/42 MAPK (ERK1/2) Antibody  | Cell Signaling             | 9102        | IB           | 1:1000           |
| Monoclonal Anti-MAP Kinase, Activated (Diphosphorylated ERK1/2) Antibody | Sigma                      | M8159       | IB           | 1:10000          |
| MEK1/2 Antibody  | Cell Signaling             | 9122        | IB           | 1:1000           |
| Phospho-MEK1/2 (Ser217/221) Antibody                                     | Cell Signaling             | 9121        | IB           | 1:1000           |
| Anti-PRG-1 <sup>2</sup>  | Nitsch/Bräuer <sup>3</sup> |             | IHC, IB      | 1:1000           |
| Anti-PRG-1 <sup>2</sup>  | Nitsch/Bräuer <sup>3</sup> |             | ICC, IB      | 1:500<br>1:200   |
| Phalloidin-Tetramethylrhodamine isothiocyanate                           | B Sigma                    | P-1951      | ICC          | 1:1000           |
| Monoclonal Anti- $\alpha$ -Tubulin Clone DM 1A (mouse)                   | Sigma                      | T-9026      | ICC          | 1:1000           |

<sup>1</sup>Department of Molecular and Cellular Biochemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Miyagi, Japan

<sup>2</sup>Es fanden sowohl ein Serum-Antikörper als auch ein aufgereinigter Antikörper Verwendung.

<sup>3</sup>Centrum für Anatomie, Institut für Zell- und Neurobiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Deutschland

Tabelle 3.1: fortgesetzt

| Antikörper   | Herkunft             | Produkt-Nr. | Anwendung | Einsatz         |
|--|----------------------|-------------|-----------|-----------------|
| Polyclonal $\beta$ -Tubulin (H-235) (rabbit)                                   | Santa Cruz           | sc-9104     | ICC       | 1:1000          |
| Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L)                         | Molecular Probes     | A11029      | ICC       | 1:1.500         |
| Alexa Fluor <sup>®</sup> 568 Goat Anti-Mouse IgG (H+L)                         | Molecular Probes     | A11031      | IHC       | 1: 400          |
| Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)                        | Molecular Probes     | A11034      | IHC, ICC  | 1:1500<br>1:500 |
| Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Goat Anti-Rat IgG                                 | Molecular Probes     | A11006      | IHC, ICC  | 1:500 1:400     |
| Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) (goat)                                      | Vector Laboratories  | BA-1000     | IHC       | 1:500           |
| Biotinylated Anti-Rat IgG (H+L) (rabbit)                                       | Vector Laboratories  | BA-4000     | IHC       | 1:500           |
| Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase-linked whole antibody (sheep)           | Amersham Biosciences | NA931V      | IB        | 1:5000          |
| Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-linked whole antibody (donkey)         | Amersham Biosciences | NA934V      | IB        | 1:5000          |
| Anti-rat Ig, Horseradish Peroxidase-linked F(ab') <sub>2</sub> fragment (goat) | Amersham Biosciences | NA9350V/AB  | IB        | 1:5000          |

### 3.1.3 Kits und Assays

BCA Protein Assay Kit (Perbio, 23225)

Cell Line Nucleofector<sup>™</sup> Kit V (Amaxa Biosystems, VCA-1003)

CellTiter-Blue<sup>®</sup> Cell Viability Assay (Promega, G8080)

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 4368814)

$\mu$ MACS<sup>™</sup> GFP Tagged Protein Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec, 130-091-125)

NucleoBond<sup>®</sup> PC 500 EF (Macherey-Nagel, 740550)

SLH-Plasmid-Minipräp Kit 100 (Sequence Laboratories)

TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays (Applied Biosystems)

VECTASTAIN ABC Elite Kit (Vector Laboratories, PK-6200)

### 3.1.4 Vektoren

pEGFP-C1 (Clontech, 6084-1)

pEGFP-N1 (Clontech, 6085-1)

pEGFP-N3 (Clontech, 6080-1)

p3XFLAG-CMV7.1 (Sigma, E4026)

pSUPER.neo+GFP (OligoEngine, VEC-PBS-0006)

### 3 Material und Methoden

#### 3.1.5 Konstrukte

**Tabelle 3.2:** Charakteristika der verwendeten Expressionsvektoren.

| Name                                  | Bakterielle Resistenz | Größe   | Kontrollverdau                    |
|---------------------------------------|-----------------------|---------|-----------------------------------|
| pEGFP-C1 <sup>4</sup>                 | Kanamycin             | 4700 bp | Not1 / Bgl2 (3910 bp / 790 bp)    |
| pEGFP-N1 <sup>4</sup>                 | Kanamycin             | 4700 bp | Not1 / Bgl2 (3910 bp / 790 bp)    |
| pEGFP-hATX-cmyc <sup>5</sup>          | Kanamycin             | 7300 bp | Apa1 / Kpn1 (4700 bp / 2600 bp)   |
| pEGFP-C1-hPRG-1 <sup>6</sup>          | Kanamycin             | 7000 bp | BamH1 / Bgl2 (4700 bp / 2300 bp)  |
| pEGFP-N1-hPRG-1 <sup>6</sup>          | Kanamycin             | 6850 bp | Xho1 / BamH1 (4700 bp / 2150 bp)  |
| p3XFLAG-mPRG-1 <sup>6</sup>           | Ampicillin            | 7000 bp | Hind3 / BamH1 (4700 bp / 2300 bp) |
| pSuper-siRNA-PRG-1-848 <sup>67</sup>  | Ampicillin            | 5200 bp | EcoR1 / Hind3 (4920 bp / 280 bp)  |
| pSuper-siRNA-Luziferase <sup>67</sup> | Ampicillin            | 5200 bp | EcoR1 / Hind3 (4920 bp / 280 bp)  |

#### 3.1.6 Primer für die PCR

**Tabelle 3.3:** Auswahl eingesetzter Oligonukleotide im Rahmen der PCR.

| Name   | Oligonukleotidsequenz <sup>9</sup>   |
|--|--|
| ΔN HA-hPRG-1 ( <i>forward</i> ) <sup>8</sup> | 5'-AT GGT ACC ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCG TGC TTT TAT TTC GTC GAG TTG CCT-3' |
| 3.1R-hPRG-1 ( <i>reverse</i> ) <sup>8</sup>  | 5'-ATA GAG CCT GAG CCT GGC AGT CA AGC GGC CGC CTA-3'                                     |
| β-Actin ( <i>forward</i> ) <sup>9</sup>      | 5'-GTA CAA CTT CCT TGC AGC TC -3'  |
| β-Actin ( <i>reverse</i> ) <sup>9</sup>      | 5'-TTG CCG ATA GTG ATG ACC TG -3'  |

<sup>4</sup>Clontech

<sup>5</sup>Moolenaar, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande

<sup>6</sup>Nitsch/Bräuer, Centrum für Anatomie, Institut für Zell- und Neurobiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Deutschland

<sup>7</sup>Das Resistenzgen gegen Neomycin wurde vor dem Inserieren der zu untersuchenden DNA entfernt.

<sup>8</sup>Sequenzierung via Eurofins MWG Operon, Deutschland (GenBank Accession No. AF541281).

<sup>9</sup>Metabion, Deutschland



### 3.1.7 Primer und TaqMan<sup>®</sup>-Sonden für die qRT-PCR

**Tabelle 3.4:** Auflistung der verwendeten TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays.

| Gen-Name   | Assay-ID       | Part.-Nr. |
|--|----------------|-----------|
| Ectonukleotide Pyrophosphatase/ Phosphodiesterase 2 (ATX)        | Hs00196470_m1  | 4331182   |
| Plasticity-related Gene 1 (PRG-1)                                | Hs01592363_m1  | 4351372   |
| Plasticity-related Gene 2 (PRG-2)                                | Hs00227602_m1  | 4331182   |
| Plasticity-related Gene 3 (PRG-3)                                | Hs01121344_m1  | 4351372   |
| Plasticity-related Gene 4 (PRG-4)                                | Hs01106565_m1  | 4331182   |
| Plasticity-related Gene 5 (PRG-5)                                | Hs01396533_m1  | 4351372   |
| Lysophosphatidic Acid Receptor 1 (LPA <sub>1</sub> /EDG2/ VZG-1) | Hs00173500_m1  | 4331182   |
| Lysophosphatidic Acid Receptor 2 (LPA <sub>2</sub> /EDG4)        | Hs00173704_m1  | 4331182   |
| Lysophosphatidic Acid Receptor 3 (LPA <sub>3</sub> /EDG7)        | Hs00173857_m1  | 4331182   |
| Lysophosphatidic Acid Receptor 4 (LPA <sub>4</sub> /P2Y9/ GPR23) | Hs01108417_s1  | 4351372   |
| Lysophosphatidic Acid Receptor 5 (LPA <sub>5</sub> /GPR92)       | Hs01051307_m1  | 4331182   |
| Lysophosphatidic Acid Receptor 6 (LPA <sub>6</sub> /GPR87)       | Hs00225057_m1  | 4331182   |
| Lysophosphatidic Acid Receptor 7 (LPA <sub>7</sub> /P2Y5)        | Hs 00271758_s1 | 4331182   |
| Human GAPD (GAPDH) Endogenous Control                            | Hs99999905_m1  | 4333764T  |
| Human Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT)            | Hs01003270_g1  | 4331182   |

### 3.1.8 Sonden für die In-situ-Hybridisierung

**Tabelle 3.5:** Kennzeichnung der eingesetzten Oligonukleotid-Sonden<sup>9</sup>.

| Name                     | Oligonukleotidsequenz   |
|--------------------------|---|
| ATX-as91 <sup>10</sup>   | 5'-ATA TTA CCT GGA ATG ACC CGA GAC AGC<br>CTT GTC TTG CCA TG-3' |
| ATX-as2361 <sup>10</sup> | 5'-CAC GTA GGC CAT CGT AAT TGT AGT CAA<br>AAA TCG GTC CAC-3'    |

<sup>10</sup>GenBank Accession No. NM\_057104

### 3 Material und Methoden

#### 3.1.9 Geräte

|   |   |
|---|---|
| Axiovert 135 (Zeiss)                                  | Nucleofector™ System (Amaxa)                                |
| BioMate 3 (Thermo Electron Corporation)               | Photometer (Pharmacia Biotech)                              |
| 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)   | PTC-100™ (MJ Research Inc., Biozym)                         |
| FL 600 Platerreader (Biotek)                          | Sonopuls GM 70 (Bandelin)                                   |
| Fluoreszenzmikroskop BX 50F (Olympus)                 | Spectral Confocal Microscope TCS SL (Leica)                 |
| Leica CM1900 (Leica Mikrosysteme)                     | Synergy 2 Plate Reader (BioTek)                             |
| LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter (Beckman) | Transblot SD – Semi-dry Transfer Cell (Bio-Rad)             |
| Microprocessor pH-Meter pH537 (WTW)                   | Ultra-Turrax® T 25 Basic (IKA-Werke)                        |
|   | Vibratome Series 1000 (Vibratome® Tissue Sectioning System) |

---

## METHODEN

### 3.2.1 Proteinanalytik

#### Die entorhinale Kortexläsion (ECL) - Modus procedendi der Stereotaxie

Die stereotaktischen Eingriffe wurden routinemäßig durch technisches Personal, teilweise auch eigenständig vorgenommen und erfolgten an männlichen adulten Wistar-Ratten (200-250 g KG) nach einer intraperitonealen Anästhesie, bestehend aus einem Gemisch nachfolgend genannter Narkotika und Sedativa: 25 mg/ml Ketamin, 1,2 mg/ml Xylazin und 0,35 mg/ml Acepromazin in 0,9 % NaCl-Lösung, mit einer Applikationsdosis von 2,5 ml/ kg KG. Die Tiere wurden daraufhin in einem für stereotaktische Operationen üblichen Kopfhalter (Stoelting, USA) eingespannt. Nach Eröffnung des Neurocraniums wurden unter Verwendung eines Standardelektrokoagulators unilaterale Inzisionen (jeweils nur linksseitig) in der Frontal- sowie Sagittalebene zwischen entorhinalem Kortex und Hippocampus vorgenommen (4 Einzelpulse à 3 sec mit 2,5  $\mu$ A). Bezugnehmend auf Paxinos und Watson [103] wurden folgende Koordinaten gemessen von  $\lambda$  (lambda) verwendet: (1) Frontale Inzision: AP + 1,2 mm; L + 3,1 mm zu + 6,1 mm; DV bis auf die Tiefe des Craniums; (2) Sagittale Inzision: AP + 1,2 mm zu + 4,2 mm; L + 6,1 mm; DV bis auf die Tiefe des Craniums. Nach Blutstillung wurde die Operationswunde mit einem Gelaspon-Schwamm versorgt und geklammert. Die Tiere wurden im Anschluss unter unveränderten Laborbedingungen für einen determinierten Zeitraum ( $\pm\frac{1}{2}$  d) gehalten. Unbehandelte Tiere (n=4) dienten als Kontrolle.

## Gewebeisolation

**Herstellung von Schnittpräparaten für die IHC** Das Verfahren zur Gewebepräparation für immunhistochemische Zwecke wurde modifiziert und übernommen von Bräuer *et al.* [16]. Zu determinierten Entwicklungszeitpunkten bzw. nach entorhinaler Kortexläsion wurden die Tiere (n=3 / Stadium) nach entsprechender Anästhesierung transkardial zunächst mit ca. 200 ml einer NaCl-Lösung (0,9 %), dann mit ca. 250 ml Immundefixativ (4 % PFA, 0,1 % Glutaraldehyd in 0,1 M PB; pH 7.5) perfundiert. Nach Dekapitation wurden die Gehirne entnommen und in 4 % PFA über Nacht bei 4°C nachfixiert, anschließend in 0,1 M PB bis zum weiteren Gebrauch verwahrt. Es wurden Vibratomeschnitte einer Stärke von 30 bis 40  $\mu\text{m}$  angefertigt.

**Herstellung von Schnittpräparaten für die ISH** Für die In-situ-Hybridisierung wurden die Tiere nach angemessener Narkotisierung zu festgelegten Entwicklungszeitpunkten bzw. nach erfolgter entorhinaler Kortexläsion (n=4 / Stadium) dekapitiert, die Gehirne unverzüglich unter sterilen Bedingungen entnommen und in 0,1 M PB überführt, bevor sie in der Gasphase von Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt wurden.

Für die Präparation der Embryonalstadien wurden die trächtigen Muttertiere zunächst mit einem Gemisch bestehend aus Ketamin (50 mg/ml), Rompun® (2 % Xylazin) und Vetranquil (1 % Acepromazin) anästhesiert (0,1 ml / 10 g KG; i. p.). Nach medianer Laparotomie erfolgte die Inspektion des Peritoneums sowie die Darstellung und Eröffnung des Uterus mit anschließender Entwicklung der einzelnen Embryonen. Diese wurden *in toto* in 2-Methylbutan überführt und schließlich bei -80°C gelagert.

Es wurden Kryostatschnitte von 20  $\mu\text{m}$  Schnittdicke angefertigt, die in 4 % PFA (4°C) fixiert und in 0,1 M PB gewaschen wurden. Die Dehydrierung der Präparate erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 % / 70 % / 96 % / 96 % / 100 % Ethanol). Die Schnitte wurden in 96 % Ethanol bei 4°C aufbewahrt.

**Gewebe für die Proteinpräparation** Die Tiere wurden nach adäquater Anästhesierung durch Inhalation von Diethylether dekapitiert, die Organe nach Maßgabe entnommen und in der Gasphase von Flüssigstickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

## Proteinisolierung und Proteinbestimmung

**Gesamtprotein-Präparation von Hippocampusgewebe nach ECL** Die Hippocampi wurden nach Isolation in der Gasphase von Flüssigstickstoff schockgefroren, dann unter sterilen Bedingungen zerrieben und in *Lysis Buffer II* vollständig resuspendiert. Es folgte eine dreimalige Ultraschallbehandlung der Homogenate ( $\approx 3$  sec). Nach Zentrifugation (14.000 rpm, 10 min, 4°C) konnten die im Überstand befindlichen Membran- und zytosolischen Proteine von anderen Zellbestandteilen getrennt und in neue Eppendorfreaktionsgefäße überführt werden. Diese wurden in der Gasphase von Flüssigstickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### 3 Material und Methoden

**Gesamtprotein-Präparation aus Zelllinien** Nach Entfernen des Mediums vier annähernd konfluenter T 75-Zellkulturflaschen ( $\equiv 75 \text{ cm}^2$ ) wurden die Zellen in  $1 \times \text{PBS}$  ( $4^\circ\text{C}$ ) gewaschen und mittels *Scraper* gelöst. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (1.000 rpm, 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ), das resultierende Zellpellet in *Lysis Buffer II* vollständig resuspendiert. Das weitere Vorgehen entspricht der zuvor beschriebenen Verfahrensweise.

**Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)** Die Quantifizierung von Proteinen ( $n=3/c$ ) erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit (Perbio) nach Angaben des Herstellers für Mikrotiterplatten. BSA-Lösungen aufsteigender Konzentrationen (100–800  $\mu\text{g/ml}$ ;  $n=2/c$ ) dienten hierbei als Referenz. Das Absorptionsmaximum des gebildeten Farbkomplexes wurde spektralphotometrisch (562 nm) ermittelt.

**Isolation von Fusionsproteinen aus Zelllinien ( $\mu\text{MACS}$ )** Die auf 5 Petrischalen ausplattierten COS-7-Zellen (jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen) wurden nach Transfektion mit HEPES-Puffer gewaschen und mit 1 ml Lysispuffer (150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 50 mM Tris HCl; pH 8,0) versetzt. Das Lysat wurde mit 100  $\mu\text{l}$  Complete<sup>®</sup>-Lösung gemischt, ultraschallbehandelt (1  $\times$  3 sec), 30 min auf Eis belassen und mit  $10.000 \times g$  für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Die im Überstand lokalisierten Membran- und zytosolischen Proteine wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und unter Verwendung des  $\mu\text{MACS}^{\text{TM}}$  GFP Tagged Protein Isolation Kits (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben behandelt. Die Fusionsproteine wurden nach Isolation bei  $-20^\circ\text{C}$  konserviert.

#### Immunologische Nachweisverfahren

**Immunhistochemie (1) – ABC/DAB-Methode** Vibratonschnitte wurden mit je 500  $\mu\text{l}$  einer 0,3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung 30 min bei RT inkubiert, um die im Gewebe vorhandenen (endogenen) Peroxidasen zu blocken. Danach wurden die Schnitte 3  $\times$  10 min in 0,1 M PB gewaschen und für 15 min bei RT in einer 50 mM Ammoniumchlorid-Lösung ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) inkubiert und erneut 3  $\times$  10 min in 0,1 M PB gewaschen. Die Schnitte wurden 1 h bei RT in *Blocking Solution* (BS; 10 % FCS, 0,1 % Saponin in 0,1 M PB) belassen. Es folgte die Inkubation des in BS aufgenommenen Primärantikörpers über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  bzw. für 2 h bei RT. Die Schnitte wurden 3  $\times$  20 min in BS gewaschen, bevor der biotinylierte Sekundärantikörper zugegeben und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  bzw. für 2 h bei RT inkubiert wurde. Schließlich wurden die Schnitte erneut 3  $\times$  20 min in BS gewaschen. Bezeichnung, Art und Konzentration der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 3.1 dargelegt.

Der Ansatz des ABC-Reagenzes (Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories Inc.) erfolgte nach Herstellerangaben. Die Schnitte wurden mit dem ABC-Komplex für 2–6 h bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden darauf 3  $\times$  10 min in 0,1 M PB gewaschen. In jeweils 1 ml der DAB-Kobalt-Nickel-Lösung, bestehend aus 0,07 % DAB, 0,001 % Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 0,024 % Kobaltchlorid ( $\text{CoCl}_2$ ) und 0,02 % Ammoniumnickelsulfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{Ni}(\text{SO}_4)_2$ ), wurden die Schnitte bis zum Eintreten der Farbreaktion (Schwarz-

graufärbung) inkubiert, dann  $3 \times 10$  min in 0,1 M PB gewaschen. Von ausgewählten Schnitten wurden zusätzlich Kernfärbungen mit HOECHST 33258 (1:12.000, 10 min) angefertigt. Schließlich wurden die Schnitte  $3 \times 10$  min in 0,1 M PB gewaschen, auf gelatinisierte OT aufgezogen und 12–24 h luftgetrocknet. Die Dehydrierung der Präparate erfolgte in aufsteigender Alkoholreihe (60 % / 70 % / 80 % / 96 % / 96 % / 100 % / 100 % Ethanol à 2 min), danach wurden diese in Xylol überführt und mit Entellan eingedeckelt. Kontrollschnitte wurden mit Ausnahme der unterbliebenen Primärantikörperapplikation nach selbigem Protokoll erstellt.

**Immunhistochemie (2) – Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)** Die Verfahrensweise bei Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen als Amplifikatoren stimmt mit den unter Immunhistochemie (1) zusammengestellten Arbeitsschritten bis zur Inkubation des Sekundärantikörpers überein. Aufgenommen in BS wurde der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper unter Schutz vor Lichteinwirkung über Nacht bei 4°C inkubiert.

Im Anschluss wurden die Schnitte in BS  $3 \times 20$  min bei RT gewaschen. Bezeichnung, Art und Konzentration der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind Tabelle 3.1 zu entnehmen. Gegebenenfalls wurden die Zellkerne mit HOECHST 33258 gegengefärbt. Die Schnitte wurden schließlich mit Immu-Mount eingedeckt und bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt. Kontrollschnitte wurden mit Ausnahme der unterbliebenen Primärantikörperapplikation nach selbigem Protokoll erstellt.

**Immunzytochemie – Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)** Etwa  $5\text{--}6 \times 10^4$  Zellen der Zelllinie DU-145 wurden in einer 12-Lochplatte je *Well* ausplattiert. Diese wurden unbehandelt bzw. nach Transfektion in  $1 \times$  PBS gewaschen und mit einem Immunfixativ (4 % PFA, 15 % Sucrose) für 20 min bei RT inkubiert. Die Permeabilisierung der Zellen wurde nach erneutem Waschen mit  $1 \times$  PBS ( $3 \times 10$  min bei RT) durch Zugabe von 0,1 % Triton-X 100 und 0,1 % Natriumcitrat (in  $1 \times$  PBS) für 3–5 min bei 4°C gewährleistet. Die Zellen wurden abermals in  $1 \times$  PBS ( $3 \times 10$  min bei RT) gewaschen, dann für 1 h bei RT in *Blocking Solution* (BS; 5 % FCS in  $1 \times$  PBS) belassen. Die Zugabe des primären und fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers erfolgte in ebendieser BS, die Inkubation verlief lichtgeschützt über Nacht bei 4°C. Die Bezeichnung, Art und Konzentration der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind Tabelle 3.1 zu entnehmen. Ferner wurden das Zytoskelett etwa durch Phalloidin-TRITC ( $0,5 \mu\text{g}$  in 5 ml  $1 \times$  PBS,  $300 \mu\text{l}$  FCS; 30 min lichtgeschützt bei RT) sowie die Zellkerne durch HOECHST 33258 (1:10.000, 5 min) gegengefärbt. Die behandelten Zellen wurden mit Immu-Mount auf OT fixiert.

**SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)** Die in dem zugrunde liegenden elektrophoretischen Verfahren verwendeten Polyacrylamidgele variierten in der Zusammensetzung wie folgt: das Trenngel mit 12 % (10 % / 7,5 %) beinhaltete 4 ml (3 ml / 3 ml) TRIS II, 6,4 ml (4 ml / 3 ml) Acrylamid, 2,56 ml (1,6 ml / 1,2 ml) Bisacrylamid, 3,04 ml (3,4 ml / 4,8 ml) dH<sub>2</sub>O,  $20 \mu\text{l}$  ( $16 \mu\text{l}$  /  $16 \mu\text{l}$ ) TEMED und  $160 \mu\text{l}$  ( $120 \mu\text{l}$  /  $120 \mu\text{l}$ ) APS (10 %); das Sammelgel mit 3,75 % (3 %) enthielt 1,5 ml (1,5 ml) TRIS I,  $750 \mu\text{l}$  ( $600 \mu\text{l}$ ) Acrylamid,  $300 \mu\text{l}$  ( $240 \mu\text{l}$ ) Bisacrylamid, 3,45 ml (3,66 ml) dH<sub>2</sub>O,  $7,8 \mu\text{l}$  ( $7,8 \mu\text{l}$ ) TEMED

### 3 Material und Methoden

und 60  $\mu\text{l}$  (60  $\mu\text{l}$ ) APS (10 %). Das jeweilige Probenvolumen vermaß 30  $\mu\text{l}$ , welches 10  $\mu\text{l}$  des 3 $\times$ Probenpuffers, die entsprechende Proteinmenge (20–80  $\mu\text{g}$ ) und in der Differenz 20 mM Tris (pH 7,5) umfasste. 1  $\mu\text{l}$   $\beta$ -ME wurde dann vor und nach dem Aufkochen der Proben (5 min bei 95°C) zugegeben. In einer entsprechenden Elektrophoresekammer, befüllt mit 1 $\times$ SDS-PAGE-Laufpuffer, wurden die Gele mit den Proteinproben beladen. Der Lauf der Proben durch das Sammelgel erfolgte bei einer Spannung von 60 V, jener durch das Trenngel bei 80–140 V. Der Endpunkt der Elektrophorese konnte anhand der voranschreitenden BPB-Markierung der Proben sowie der erscheinenden Banden des Standardproteinmarkers determiniert werden.

**Western-Blotting** Zum Proteintransfer auf entsprechende Nitrocellulosemembranen wurden nach der Elektrophorese das Polyacrylamidgel, die Blotmembran sowie zwei Filterpapiere - getränkt in Semi-dry-Transferpuffer - sandwichartig zwischen Plattenelektroden platziert. Die Apparatur des Semidry-Blotting wurde verschlossen und über Plattenelektroden mit einer Spannung von 16 V versorgt. Der Vorgang des Elektroblo-tting endete nach 55 min. Zur Kontrolle der eluierten Proteine wurden spezielle Färbun-gen sowohl des Polyacrylamidgels (Coomassie-Brillant-Blau) als auch der Blotmem-bran (Ponceau-Rot) vorgenommen. Die Nitrocellulosemembranen wurden schließlich in 10 % Magermilch (in 1 $\times$ PBS bzw. 1 $\times$ PBS, 0,1 % Tween 20) über Nacht bei 4°C inkubi-ert, dann 3  $\times$  5 min in 1 $\times$ PBS (bzw. 1 $\times$ PBS-T) gewaschen.

Die in der nachfolgenden Immundetektion verwendeten Primär- und Meerrettich-peroxidase (HRP)-markierten Sekundärantikörper sind nach Bezeichnung, Art und Konzentration in Tabelle 3.1 aufgeführt. Aufgenommen in 1 $\times$ PBS (bzw. 1 $\times$ PBS-T) wur-den diese in der Regel über Nacht bei 4°C bzw. für 2 h bei RT inkubiert. (Mit Ausnah-me der ATX/LysoPLD-Antikörper, die für 48 h bei 4 °C auf der Blotmembran belassen wurden.) Nachstehend wurden die Blotmembranen erneut 3  $\times$  10 min in 1 $\times$ PBS (resp. 1 $\times$ PBS-T) gewaschen und mit Hilfe des ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers entwickelt. In der Dunkelkammer wurden hierbei ein Detection Reagent 1 und 2 zu jeweils gleichen Teilen auf die Blotmembranen aufgetragen, die fluoreszierenden Träger in Overheadfolien in einer Expositionskasset-te platziert und mit einem Autoradiographiefilm (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) pro-teinseitig bedeckt. Die Dauer der Exposition variierte in Abhängigkeit des zu untersu-chenden Proteins. Die Filme wurden daraufhin unter Sichtkontrolle (30–60 sec) entwi-ckelt, in einer Stop-Lösung geschwenkt, fixiert (10 min), in Wasser klargespült (10 min) und schließlich luftgetrocknet.

#### 3.2.2 Nukleinsäureanalytik

##### Grundlegende molekularbiologische Methoden und Analyseverfahren

**Restriktionsverdau** Die Restriktionsansätze ( $V_{end} = 50 \mu\text{l}$ ) setzten sich wie folgt zu-sammen: je 1  $\mu\text{l}$  des entsprechenden Typ-II-Restriktionsenzym (Fermentas), 5  $\mu\text{l}$  des zugehörigen 10 $\times$ Restriktionsenzym-Puffers, 0,5  $\mu\text{l}$  100 $\times$ BSA (sofern nicht anders ange-führt) sowie 1–2  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden dsDNA-Moleküle (Plasmide). Die Differenz

wurde mit ddH<sub>2</sub>O beglichen. Zur hydrolytischen Spaltung der betreffenden Phosphodiesterbindungen wurde der Restriktionsansatz für 1 h bei 37°C inkubiert.

**Nichtdenaturierende Agarosegelelektrophorese (AGE) / Restriktionsanalyse** Zur Anfertigung eines 1%igen Agarosegels wurden 1 g Agarose in 100 ml 1×TBE-Puffer bis zur vollständigen Lösung aufgekocht. Dem noch flüssigen Gel wurden 0,3 µg/ml Ethidiumbromid zur Markierung der DNA zugegeben. Es wurden die Gelkammer mit 1×TBE-Puffer befüllt und die Proben mit 10×DNA-Laufpuffer versehen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 V, die Visualisierung der Gelbanden unter UV-Licht.

**Transformation hitzekompetenter Zellen** Ein 700 µl-Aliquot chemokompetenter E. coli (XL-1Blue resp. XL10-Gold<sup>®</sup>) wurde nach dem Auftauen auf Eis (30 min) mit 1 µg der entsprechenden Plasmid-DNA versehen. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für weitere 30 min auf Eis belassen. Nachfolgend wurde dieser einem Hitzeschock für 40–45 sec bei 42°C unterzogen und umgehend wieder auf Eis gestellt. Dem Ansatz wurden dann 700 µl DYT-Medium zugegeben und es folgte eine Vorinkubation des Gemisches für 1 h bei 37°C. Schließlich wurde der Ansatz in 200 ml DYT-Medium unter Zugabe des korrespondierenden Antibiotikums (Kanamycin bzw. Ampicillin) über Nacht bei 37°C kultiviert.

**Plasmidaufreinigung aus Bakterien (Maxi-/Mini-Präp)** E. coli-Kolonien aus dem Glykostock (-80°C) wurden über Nacht (12–16 h) in 200 ml DYT-Medium unter Zugabe des zugehörigen Antibiotikums (400 µl Kanamycin;  $c_{end} = 25 \mu\text{g/ml}$ ) bei 37°C im Inkubator kultiviert. Die Plasmidaufreinigung erfolgte als Maxi-Präpvariante unter Verwendung des NucleoBond<sup>®</sup> PC 500 EF Kits (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben. Die gewonnene DNA wurde in 100 µl TE-EF-Buffer aufgenommen und nach einer DNA-Konzentrations- resp. -Reinheitsbestimmung auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl mit TE-EF-Buffer eingestellt sowie bei -20°C gelagert. Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgte bei der Mini-Präpvariante analog (5 ml DYT-Medium, 10 µl Kanamycin;  $c_{end} = 25 \mu\text{g/ml}$ ), wohingegen für die Plasmidaufreinigung das SLH-Plasmid-Minipräp Kit 100 (Sequence Laboratories) nach Angaben des Herstellers verwendet wurde.

**RNA-Isolation mit Konzentrations- und Reinheitsbestimmung** DU-145-Zellen in 6 T 75-Zellkulturflaschen (Konfluenz 80-90 %) wurden mit 1×PBS von verbliebenem Medium befreit und in insgesamt 5 ml TRIZOL<sup>®</sup>-Reagenz (Invitrogen) lysiert. Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung RNase-freier Einwegmaterialien entsprechend Herstellerangaben isoliert und bei -80°C aufbewahrt. Die RNA-Konzentration, deren optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge ( $\lambda$ ) von 260 nm als 1 definiert ist und einer Konzentration von 40 µg/ml entspricht, wurde photometrisch ermittelt:  $c [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$ . Die Reinheit der RNA ergab sich nachfolgend aus der Ratio der Extinktionen bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  (DNA) und  $\lambda = 280 \text{ nm}$  (Proteine), wobei ein Koeffizient von  $A_{260} / A_{280} = 1,8\text{--}2,0$  entsprechend dem Normbereich erzielt wurde.

### 3 Material und Methoden

**cDNA-Synthese** Für die reverse Transkription der extrahierten Gesamt-RNA in Einzelstrang-cDNA wurde das High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) gemäß Herstellerangaben verwendet. Zum Ausschluss einer etwaigen Kontamination mit DNA wurden parallel Ansätze ohne Zugabe des Enzyms (MultiScribe™ Reverse Transcriptase) als Kontrollen angefertigt.

**PCR** Zur Evaluierung der Umschreibung von Gesamt-RNA in cDNA wurde das nicht regulierte Gen  $\beta$ -Aktin (sog. *Housekeeping Gene*) amplifiziert. Der PCR-Ansatz (25  $\mu$ l) umfasste : 15,8  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l 5 $\times$ Green GoTaq™ Reaction Buffer, 1  $\mu$ l dNTPs (10 mM), 1  $\mu$ l 5'-Primer (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ l 3'-Primer (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ l der zu amplifizierenden cDNA bzw. der Kontrollen und 1  $\mu$ l GoTaq® Polymerase. Für die Durchführung der PCR galten die nachfolgend (Tab. 3.6) aufgeführten Bedingungen. Die anschließende Analyse der PCR-Produkte erfolgte im 1 %igen Agarosegel und wurde digital dokumentiert.

Tabelle 3.6: Einstellungen des PCR-Programms.

| No. | Temperatur | Dauer    | Zyklenzahl |
|-----|------------|----------|------------|
| 1   | 95°C       | 2 min    | 1          |
| 2   | 95°C       | 30 sec   |            |
| 3   | 70°C       | 30 sec   | 30         |
| 4   | 72°C       | 1 min    |            |
| 5   | 72°C       | 5 min    | 1          |
| 6   | 12°C       | $\infty$ |            |

#### Sequenzierung

Die Sequenzieranalysen entsprechender Proben (Plasmide, PCR-Produkte, etc.) wurden der Fa. Eurofins MWG Operon (Deutschland) in Auftrag gegeben und nachfolgend durch ein *BLAST GenBank-Alignment* verifiziert ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

#### Hybridisierung

**In-situ-Hybridisierung mit dem Radioisotop <sup>35</sup>S** Zwei synthetische Antisense-Oligonukleotidsonden (Tab. 3.5) wurden zum Nachweis ATX-spezifischer mRNA (der Ratte) von der Firma Metabion bezogen. Die Markierungsreaktion erfolgte enzymatisch und resultierte in einer 3'-Endmarkierung der Oligonukleotidsonden mit multiplen <sup>35</sup>S-markierten Nukleotiden (sog. *Tailing*). Hierfür wurden folgende Reagenzien eingesetzt: 12,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 4,0  $\mu$ l TdT 5 $\times$ Reaction Buffer, 1,2  $\mu$ l Kobaltchlorid (25 mM), 1,0  $\mu$ l Oligonukleotid ATX-as2361 bzw. ATX-as91 (0,3 pmol/ $\mu$ l), 1,5  $\mu$ l radioaktives [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] dATP (37 TBq/mmol) sowie 1,0  $\mu$ l Terminale Transferase. Der Ansatz wurde danach



für 10 min bei 37°C inkubiert, die Markierungsreaktion durch Zugabe von 35 µl TNES-Puffer beendet. Die anschließende Aufreinigung der [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-markierten Proben erfolgte über Bio Spin 6 Chromatography Columns (Bio-Rad) gemäß Herstellerangaben. Zur Quantifizierung der Radioaktivität, d. h. zur Ermittlung der sog. spezifischen Aktivität, angegeben in *counts per minute* (cpm), wurden jeweils 2 µl der aufgereinigten Proben, gelöst in 5 ml Szintilösung, im Szinti-Counter ermittelt. Dem Leerwert entsprachen 5 ml Szintilösung allein. Für die Gewährleistung einer optimalen Hybridisierung wurde ein Mindestmaß von 120.000 cpm/2 µl vorausgesetzt.

Die radioaktiv markierten Oligonukleotidsonden wurden in 50 µl Hybridisierungspuffer (H-Mix) aufgenommen und auf ausgewählte Kryostatschnitte (20 µm) gegeben. Mit sterilen Deckgläschen versehen, erfolgte die Hybridisierung der Gewebeschnitte für 16 h in einer Feuchtkammer bei 42°C. Als Kontrollen dienten jene Ansätze, die sowohl [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-markierte Antisense-Oligonukleotide (0,3 pmol/µl) als auch in 100-fach höherer Konzentration vorliegende, nicht markierte Antisense-Oligonukleotide (30 pmol/µl) im Hybridisierungspuffer umfassten. Im Anschluss wurden die Schnitte zunächst in 0,1×SSC-Lösung für 1 h bei 57°C, dann in 0,05×SSC-Lösung für 5 min sowie in dH<sub>2</sub>O für 30 sec bei RT gewaschen. Mittels aufsteigender Alkoholreihe (50 % / 70 % / 96 % / 100 % Ethanol, je 1 min) wurden die Präparate dehydriert. Zur Detektion wurden die Schnitte in einer entsprechenden Expositionskassette mit einem Röntgenfilm versehenen für 15–20 d (± 1 d) bei RT verwahrt. Die Filme wurden danach in der Dunkelkammer unter Sichtkontrolle entwickelt, gewässert, fixiert und getrocknet. Von den verbleibenden Gewebeschnitten wurden Toluidinblau-Färbungen (1 % Toluidinblau / ddH<sub>2</sub>O / 70 % / 80 % / 100 % Ethanol, je 30 sec / Xylol für 10 sec / Xylol für 5 min / Eindeckeln mit Entellan) angefertigt. Nach Digitalisierung der autoradiographischen Filme wurden mit Hilfe eines computergestützten Video-Densitometrie-Systems (Metamorph, Universal Imaging Systems, USA) Intensitätsmessungen der Signale auf Pixel-ebene vorgenommen. Statistischen Untersuchungen wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (U-Test) (StatView II, Abacus Concepts, USA) zugrunde gelegt.

### 3.2.3 Funktionsanalytik

#### Grundlegende Methoden der Zellkultivierung

**Kultur und Passage** Die Zellen wurden in T 75- bzw. T 175-Zellkulturflaschen bei 37°C in einer 5%-CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in einem Inkubator gehalten und je nach Zellart 2–3×/Woche in einem Verhältnis von 1:3, 1:4, 1:5 oder 1:6 passagiert. Hierbei wurden die Zellen in 10 ml Medium mittels Zellschaber gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 900 ×g für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde resuspendiert und auf mit Medium versehene Zellkulturflaschen (T 75 20 ml, T 175 45 ml) verteilt.

**Kryokonservierung von Zellen** Die Zellen einer annähernd konfluenten T 75-Zellkulturflasche wurden in sterilem PBS gewaschen und gelöst. Sie wurden mit 900× g für 5 min bei RT abzentrifugiert, das entstandene Pellet in 1,5 ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension (0,5 ml) wurde in ein Kryoröhrchen gegeben und mit 0,5 ml 2×Ein-

### 3 Material und Methoden

| Varierte Parameter <sup>11</sup> | Calcium-phosphat-präzipitation            | FuGENE® 6                                       | Lipofectamine™ Reagent                          | Lipofectamine™ Reagent (L) incl. Plus™ Reagent (P) |
|----------------------------------|---|---|---|--|
| Zelldichte                       | 2 × 10 <sup>4</sup>                       | 4–6 × 10 <sup>4</sup>                           | 2 × 10 <sup>4</sup> /4–6 × 10 <sup>4</sup>      |  |
| DNA-Menge                        | 0,5/1 µg                                  | 0,5/1 µg  | 0,5/1 µg  | 0,5/1/1,5/2 µg                                     |
| Transfektionsreagenzmenge        | 6 µl 2,5 M CaCl <sub>2</sub><br>44 µl HBS | 1,5/3/6 µl                                      | 1/ 2/ 3/ 4/ 6/<br>8/ 12 µl                      | 3 µl (L)<br>10 µl (P)                              |
| Inkubationszeit                  | 24 h                                      | 24/36 h   | 24/36/48 h                                      |  |
| Handhabung vor Transfektion      |   | 1 h zuvor: Medium ersetzt durch 400 µl Opti-MEM | 2 h zuvor: Medium ersetzt durch 400 µl Opti-MEM |  |

**Tabelle 3.7:** Übersicht der getesteten Transfektionsmethoden.

friermedium versehen. Das Gemisch wurde stufenweise abgekühlt (-80°C) und in Flüssigstickstoff aufbewahrt. Für die erneute Inkulturnahme wurden die Zellen bei 37°C / 5 % CO<sub>2</sub> aufgetaut, in 10 ml Medium überführt und mit 900×g für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde schließlich in 1 ml Medium resuspendiert und die Zellsuspension in einer mit 10 ml Medium versehenen T 25-Zellkulturflasche kultiviert.

#### Transfektionsmethoden

**Transfektion von COS-7-Zellen mittels Elektroporation (Amaxa)** Die Zellen wurden in T 75-Zellkulturflaschen in 1×PBS gewaschen, mittels Zellschaber gelöst und mit 900×g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Nucleofector™ Solution V resuspendiert und auf 40 ml ergänzt. Zur Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer wurden 10 µl dieser Zellsuspension herangezogen. Die zur Transfektion eingesetzte Zellzahl belief sich auf 1 × 10<sup>6</sup> Zellen / Petrischale (d = 10 cm). Die nachfolgende Transfektion mit Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des Cell Line Nucleofector™ Kits V (Amaxa Biosystems) nach Angaben des Herstellers.

**Transfektionsetablierung für DU-145-Zellen - Methoden im Überblick** Das Eruiere einer geeigneten Transfektionsmethode für die Zelllinie DU-145 bezog die in Tabelle 3.7 genannten Verfahren mit ein. Im Vorfeld jeder Transfektion wurden 5–6 × 10<sup>4</sup> Zellen in einer 12-Lochplatte je Well in 1 ml Medium ausplattiert und für 24 h bei 37°C / 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Transfektionen mittels FuGENE® 6 (Roche), Lipofectamine™ Reagent (Invitrogen) ± Plus™ Reagent (Invitrogen) erfolgten gemäß Herstellerangaben.

**Transfektion von DU-145-Zellen mittels Effectene®** 5–6 × 10<sup>4</sup> Zellen wurden in einer 12-Lochplatte je Well in 1 ml Medium ausplattiert und 24 h bei 37°C / 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Transfektionsansatz erfolgte unter Verwendung des Effectene® Transfection

<sup>11</sup>Angaben beziehen sich auf 1 Well einer 12-Lochplatte.

Reagent (Qiagen) nach Herstellerangaben und umfasste (pro *Well*): 75  $\mu\text{l}$  Buffer EC, 1  $\mu\text{g}$  DNA, 5  $\mu\text{l}$  Enhancer und 8  $\mu\text{l}$  Effectene<sup>®</sup>. Der Ansatz wurde 10 min bei RT inkubiert, mit 200  $\mu\text{l}$  Medium versehen und in ein *Well* gegeben. Die Zellen wurden 1 h bei 37°C / 5% CO<sub>2</sub> in dem Transfektionsgemisch inkubiert, anschließend in 1×PBS gewaschen und mit frischem Medium versehen. Die Transfektionsdauer betrug 24–36 h.

### Quantitative Polymerasekettenreaktion

**Nachweis und Quantifizierung von PRG-1-mRNA in DU-145-Zellen** Für die zu untersuchenden Zielgene wurden TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays (Applied Biosystems) (Tab. 3.4) kommerziell erworben. Jeder Assay umfasste neben zwei unmarkierten PCR-Primern eine zweifach-markierte TaqMan<sup>®</sup> Probe (5' FAM<sup>™</sup> Reporter-Fluoreszenzfarbstoff / 3' NFQ-Farbstoff TAMRA<sup>™</sup>). Im Vorfeld galt es, die PCR-Amplifikationseffizienz des jeweiligen Assays zu bestimmen. Hierbei wurden die Sonden in Duplikaten unterschiedlicher Verdünnungsstufen (1:1, 1:4, 1:4<sup>2</sup>, 1:4<sup>3</sup>, 1:4<sup>4</sup>) getestet und als Standardkurve in Form einer Regressionsgeraden graphisch dargestellt (Zyklenzahl [*C<sub>T</sub>*-Wert] vs. eingesetzte cDNA-Menge [*logInput cDNA*]). Über den Anstieg (*slope*) der Standardkurve konnte die Effizienz (*E*) nach folgender Gleichung ermittelt werden:

$$E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100 \quad (3.1)$$

Es ergaben sich Effizienzwerte von 100 % ( $\pm 10\%$ ). Die PCR-Ansätze ( $V_{\text{end}} = 20 \mu\text{l}$ ) setzten sich wie nachstehend genannt zusammen: 8  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O, 10  $\mu\text{l}$  TaqMan<sup>®</sup> Fast Universal PCR Master Mix (2X), 1  $\mu\text{l}$  20×TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay, 1  $\mu\text{l}$  cDNA. Als Kontrollen dienten jene Ansätze, denen keine cDNA zugegeben wurde. Ubiquitär exprimierte Referenzgene (sog. *Housekeeping Genes*) GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) und HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1) waren in die Untersuchungen einbezogen. Die Ansätze wurden in Triplikaten pipettiert und unter Verwendung des 7500 Fast Real-Time PCR Systems analysiert. Für die Durchführung galten die in Tabelle 3.8 gelisteten Konditionen.

Die digital erhobenen Daten wurden mit Hilfe der 7500 Fast System SDS Software

| No. | Temperatur | Dauer    | Zyklenzahl |
|-----|------------|----------|------------|
| 1   | 50°C       | 2 min    | 1          |
| 2   | 95°C       | 10 min   | 1          |
| 3   | 95°C       | 15 sec   | 40         |
| 4   | 60°C       | 1 min    |            |
| 5   | 25°C       | $\infty$ |            |

Tabelle 3.8: Einstellungen des Amplifikationsprogramms.

### 3 Material und Methoden

(Applied Biosystems) erfasst. Die Auswertung, d. h. die relative Quantifizierung im Anschluss erfolgte nach der von Applied Biosystems in der *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR* beschriebenen sog. komparativen  $C_T$ -Methode (syn.  $\Delta\Delta C_T$ -Methode) unter Verwendung des folgenden Berechnungsmodells:

$$\Delta C_T = C_{T\text{Zielgen}} - C_{T\text{Referenzgen}} \quad (3.2)$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{Behandlung}} - \Delta C_{T\text{Kontrolle}} \quad (3.3)$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (3.4)$$

Dabei wird der  $C_T$ -Wert als Maß für die Quantifizierung der cDNA-Startmenge zunächst mittels eines Referenzgens (GAPDH resp. HPRT) normalisiert (3.2). Der relative Expressionsunterschied (Ratio) eines Gens zwischen Behandlung und Kontrolle (3.3), normalisiert zu einem Referenzgen, ergibt sich dann aus Gleichung 3.4.

#### Viabilitäts-/Zytotoxizitätsassay

**Untersuchungen zur Viabilität von DU-145-Zellen** Die zugrunde liegenden Versuche erfolgten unter Verwendung des CellTiter-Blue<sup>®</sup> Cell Viability Assays (Promega) nach Angaben des Herstellers. In Kürze:  $5 \times 10^3$  Zellen wurden in  $90 \mu\text{l}$  Medium (incl. FCS) in einer 96-Lochplatte je *Well* ausplattiert und für 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden LPA sowie die zytotoxischen Substanzen BSO (Buthioninsulfoximin; syn. S-n-Butyl-Homocystein Sulfoximin) und Glutamat (Glutaminsäure), gelöst in  $10 \mu\text{l}$  Medium, in aufsteigender Konzentration je *Well* appliziert. Die einzelnen Testkonzentrationen und Kontrollen wurden in Quadruplikaten je 96-Lochplatte erfasst, die Versuchsrerien insgesamt dreimalig durchgeführt.

Nach Beendigung der jeweiligen Inkubationszeit von 48 bzw. 72 h wurden jedem *Well*  $20 \mu\text{l}$  CellTiter-Blue<sup>®</sup> Reagent hinzugegeben und die Ansätze für 3 h unter Standard-Zellkulturbedingungen belassen. Zur Auswertung wurden die Absorptionsmaxima der gebildeten Farbkomplexe bei  $\lambda = 573 \text{ nm}$  (Resorufin) sowie bei  $\lambda = 605 \text{ nm}$  (Resazurin) spektralphotometrisch ermittelt und schließlich graphisch dargestellt.

## 4 Resultate

### EXPRESSION DES PLASTICITY-RELATED GENE-1 IM GEHIRN

#### 4.1.1 Zerebrale Verteilung des Proteins PRG-1 im Verlauf der Hirnentwicklung

Anknüpfend an den gegenwärtigen Kenntnisstand zur Lokalisation und Funktion von PRG-1, insbesondere im Bereich der Hippocampusformation, galt es im Rahmen dieser Arbeit, einen Überblick zur PRG-1-Expression in weiteren Bereichen des zentralen Nervensystems zu erstellen. Wistar-Ratten verschiedener Entwicklungsstadien (n=3 / Stadium) wurden hierfür immunhistochemisch, anschließend mikroskopisch analysiert und durch zwei weitere Begutachter (Dipl.-Ing. I. Przesdzing, A. Bennert) verifiziert. Die erfassten Intensitäten (Mittelwerte) der PRG-1-Expression zweier Stadien sind in Tabelle 4.1 vergleichend gegenüber gestellt. Als Grundlage der exakten anatomischen Zuordnung diente der Atlas *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* von George Paxinos und Charles Watson [103].

**Tabelle 4.1:** PRG-1-Expression im ZNS – zwei Entwicklungsstadien im Vergleich. Expressionsintensität: keine [—]; kaum [(+)]; gering [+]; mittel [++]; stark [+++]; sehr stark [++++].

| Region/Struktur <sup>1</sup> | Abk. <sup>1</sup> | P 5 | Adult |
|------------------------------|-------------------|-----|-------|
| <b>Telencephalon</b>         |                   |     |       |
| Cortex Layer I               |                   | ++  | ++    |
| Cortex Layer II              |                   | +++ | +++   |
| Cortex Layer III             |                   | ++  | ++    |
| Cortex Layer IV              |                   | ++  | +++   |
| Cortex Layer V               |                   | ++  | ++    |
| Cortex Layer VI              |                   | ++  | ++    |
| Corpus callosum              | cc                | —   | —     |
| Caudate-putamen              | Cpu               | ++  | ++(+) |
| Taenia tecta                 | TT                | ++  | +++   |
| Olfactory tubercle           | Tu                | +++ | +++   |
| <b>Septum</b>                |                   |     |       |
| Septohippocampal nucleus     | Shi               | +++ | +     |
| Lateral septal nucleus       | LSV,D,I           | +++ | +++   |
| Medial septal nucleus        | MS                | +++ | +++   |

Tabelle 4.1: fortgesetzt

| Region/Struktur <sup>1</sup>                   | Abk. <sup>1</sup> | P 5      | Adult |
|--|-------------------|----------|-------|
| <b>Hippocampus</b>                             |                   |          |       |
| CA1, CA2, CA3 (pyramidal cell layer)           |                   | +++      | ++++  |
| Dentate gyrus granule cells                    | DG                | ++++     | +++   |
| Hilus  | Hil               | ++       | ++    |
| Fimbria hippocampi                             | fi                | —        | —     |
| Subiculum                                      | S                 | ++       | +++   |
| Parasubiculum                                  | PaS               | +++      | +++   |
| Presubiculum                                   | PrS               | +++      | +++   |
| <b>Diencephalon</b>                            |                   |          |       |
| Medial habenular nucleus                       | MHb               | ++       | ++    |
| <b>Thalamus</b>                                |                   |          |       |
| Reuniens thalamic nucleus                      | Re                | ++       | ++    |
| Reticular thalamic nucleus                     | Rt                | +        | +++   |
| Ventroposterior thalamic nucleus, lateral part | VPL               | +        | +++   |
| Ventroposterior thalamic nucleus, medial part  | VPM               | ++       | +++   |
| Intermediodorsal thalamic nucleus              | IMD               | +        | +     |
| Posterior thalamic nuclear group               | Po                | +        | +++   |
| Rhomboid thalamic nucleus                      | Rh                | +        | ++    |
| Subthalamic nucleus                            | STh               | +        | ++    |
| Stria terminalis                               | st                | ++       | +++   |
| <b>Hypothalamus</b>                            |                   |          |       |
| Posterior hypothalamic nucleus                 | PH                | +        | ++    |
| Dorsomedial hypothalamic nucleus               | DMc               | ++       | ++    |
| Anterior hypothalamic area                     | AH                | +        | ++    |
| Septohypothalamic nucleus                      | Shy               | ++       | ++    |
| Premammillary nucleus                          | PMD,<br>PMV       | no slice | ++    |
| <b>Truncus cerebri</b>                         |                   |          |       |
| Dorsal lateral geniculate nucleus              | DLG               | ++       | +++   |
| Medial geniculate nucleus                      | MG                | +++      | ++    |
| Pontine nuclei                                 | Pn                | no slice | +++   |
| Pontine reticular nucleus                      | PnO, C, V         | no slice | +++   |
| Median raphe nucleus                           | MnR               | +        | +++   |
| Substantia nigra, compact                      | SNC               | +++      | +++   |
| Substantia nigra, reticular                    | SNR               | +++      | +++   |
| Red nucleus                                    | R                 | +        | +++   |

#### 4.1 Expression des Plasticity-related Gene-1 im Gehirn

Tabelle 4.1: fortgesetzt

| Region/Struktur <sup>1</sup>                                 | Abk. <sup>1</sup> | P 5 | Adult |
|--|-------------------|-----|-------|
| Central gray   | CGPn              | +   | +     |
| Laterodorsal tegmental nucleus                               | LDTg              | ++  | +     |
| Dorsal tegmental nucleus                                     | DTg               | +   | +     |
| Decussation of the superior cerebellar peduncle (Wernekinck) | xscp              | —   | —     |
| Deep mesencephalic nucleus                                   | DpMe              | ++  | ++    |
| Trochlear nucleus  | 4                 | +   | +++   |
| Medial (fastigial) cerebellar nucleus                        | MedDL             | ++  | +++   |
| Principal oculomotor nucleus                                 | 3                 | —   | +++   |
| <b>Cerebellum</b>  |                   |     |       |
| Granular layer   |                   | +   | ++    |
| Purkinje layer   |                   | +++ | +++   |
| Molecular layer  |                   | ++  | +     |
| <b>Additional structures<sup>2</sup></b>                     |                   |     |       |
| Basal nucleus of Meynert                                     |                   |     | +++   |
| Bed nucleus stria terminalis                                 |                   |     | +++   |
| Caudal linear nucleus raphe                                  |                   |     | +++   |
| Rostral linear nucleus raphe                                 |                   |     | +++   |
| Fasciculus retroflexus                                       |                   |     | +++   |
| Globus pallidus  |                   |     | ++    |
| Interpositus cerebellar nucleus, anterior                    |                   |     | +++   |
| Interpositus cerebellar nucleus, posterior                   |                   |     | +++   |
| Lateral cerebellar nucleus                                   |                   |     | +++   |
| Nucleus of Darkschewitsch                                    |                   |     | +++   |
| Paracentral thalamic nucleus                                 |                   |     | +++   |
| Paraventricular thalamic nucleus                             |                   |     | +++   |
| Triangular septal nucleus                                    |                   |     | +++   |

Die hier vorgelegten Daten zeigen, dass es im Bereich des ZNS sowohl Areale gibt, die einer deutlichen Regulation der PRG-1-Expression im Verlauf der Entwicklung unterliegen wie zum Beispiel die Gebiete des Zwischenhirns und des Hirnstammes, als auch solche, deren Expressionsstärken im Verlauf mehr oder weniger konstant bleiben wie beispielsweise in den aufgeführten Bereichen des Endhirns. Fernerhin konnten in den untersuchten Abschnitten des zentralen Nervensystems deutliche Intensitätsunterschiede, und zwar von einer fehlenden bis hin zu einer sehr starken Expression, ermit-

<sup>1</sup>Nach Paxinos und Watson [103].

<sup>2</sup>Auffällige Strukturen insbesondere im adulten Gehirn.

## 4 Resultate

telt werden. Eine starke bis sehr starke PRG-1-Expression wurde in Bereichen der Hippocampusformation (Pyramidenzellband der CA1–3-Regionen (Stratum pyramidale), Körnerzellband des Gyrus dentatus (Stratum granulare) sowie Para- und Praesubiculum), in den Septum- und Thalamuskernen, in der Substantia nigra, in der äußeren und inneren Körnerzellschicht des Neocortex (Laminae granularis externa et interna), in der Purkinje-Zellschicht (Stratum ganglionare) und in den Kleinhirnkernen sowie in weiteren Kerngebieten (z. B. Ncl. basalis Meynert, Ncl. Darkschewitsch, Raphekerne) beobachtet. Im Vergleich deutlich schwächere Intensitätssignale der PRG-1-Expression waren in den angegebenen Bereichen des Hypothalamus zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu konnten in dem Gebiet des Griseum centrale (Zentrales Höhlengrau) kaum bzw. in den faserreichen Abschnitten der Fimbria hippocampi, des Corpus callosum (Balcken) und der Decussatio pedunculorum cerebellarium superiorum (Wernekinck) keine PRG-1-Expressionssignale ausgemacht werden.

### 4.1.2 Spezifizierung der neuronalen Lokalisation von PRG-1

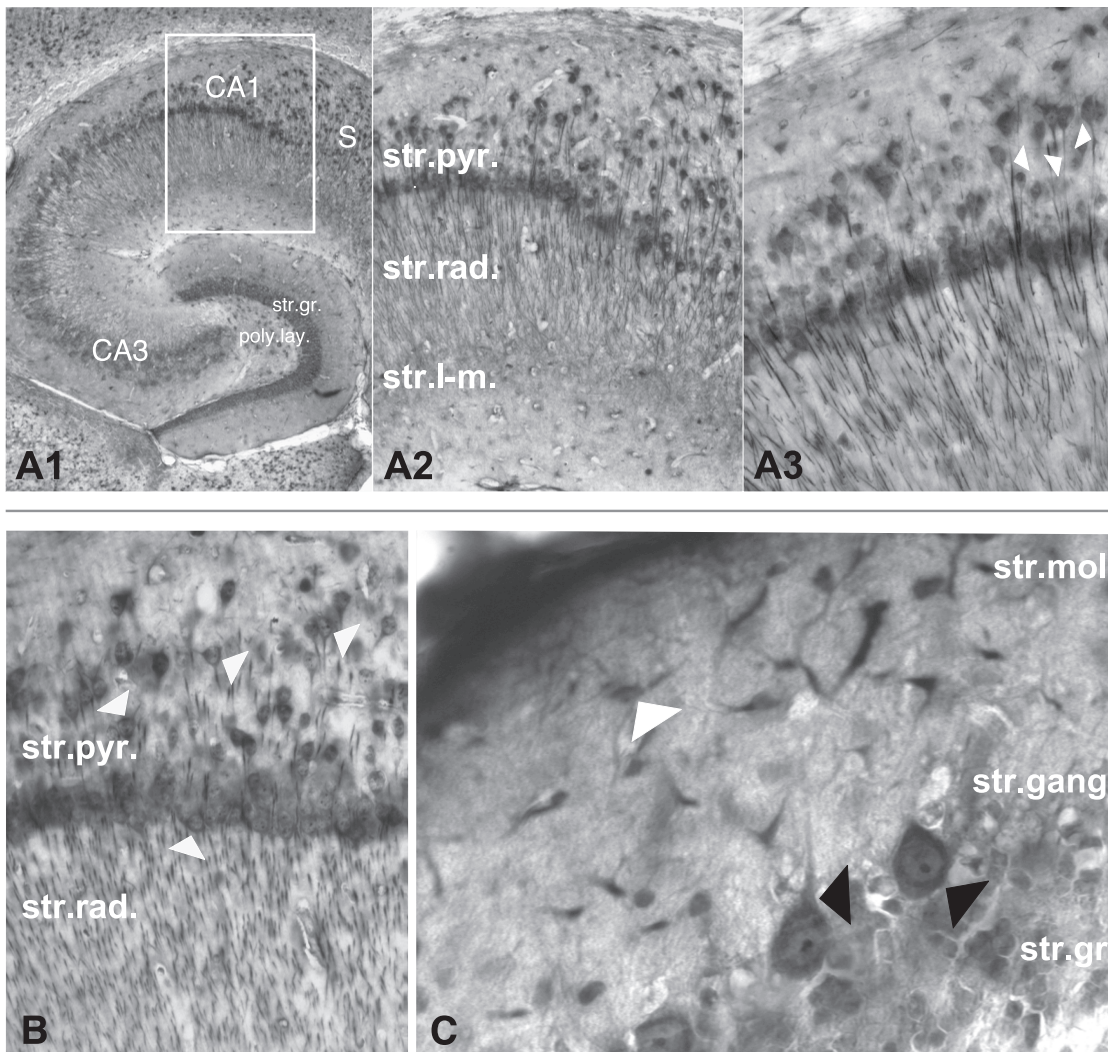
Durch immunhistochemische Untersuchungen im adulten murinen Gehirn, insbesondere im Bereich der Hippocampusformation, konnten zellmorphologisch relevante Aspekte der neuronalen Lokalisation von PRG-1 verifiziert werden. Die Färbungen haben mithin das Stratum pyramidale mit den Pyramidenzellen überwiegend in den Regionen CA1 und CA3, das Stratum granulosum mit den Körnerzellen des Gyrus dentatus, polymorphe Zellen im aufgelockerten Ende des Pyramidenzellbandes im Bereich des Hilus sowie die im Subiculum im Übergang zum entorhinalen Kortex befindlichen Pyramidenzellen zur Darstellung gebracht (Abb. 4.1, A1). Die Ausschnittsvergrößerungen haben zudem PRG-1-positive Signale in vereinzelt Dendriten sowie auch in den dichten Dendritenbäumen einiger dieser Pyramidenzellen gezeigt. So ließen sich die langen Apikaldendriten der CA1-Pyramidenzellen über das Stratum radiatum hinaus mit ihren Endverzweigungen bis hin in das Stratum lacunosum-moleculare verfolgen (Abb. 4.1 A2 und A3).

Schließlich haben die zugrunde liegenden Untersuchungen gezeigt, dass auch die Membranen der Perikarya immunpositiv für PRG-1 sind (Abb. 4.1 B).

Zuletzt sei angemerkt, dass auch im Bereich der Kleinhirnrinde ein vergleichbares morphologisches Expressionsmuster von PRG-1 festgestellt werden konnte. So erwiesen sich die größten und charakteristischsten Zellen des Kleinhirns, die Purkinje-Zellen im Stratum ganglionare, als immunpositiv hinsichtlich PRG-1. Am oberen Pol dieser Zellen ließen sich ein bis zwei in das Stratum moleculare hineinreichende initiale Abschnitte primärer Dendriten erkennen. Auch im Bereich der Somamembran dieser Nervenzellen konnte ein PRG-positives Signal detektiert werden. Darüber hinaus ließen sich im Stratum moleculare kleinere Nervenzellen, und zwar sowohl äußere als auch innere Sternzellen, einschließlich ihrer Dendriten so darstellen (Abb. 4.1 C).



#### 4.1 Expression des Plasticity-related Gene-1 im Gehirn



**Abbildung 4.1: Immunhistochemische Analyse der PRG-1-Expression in Hippocampus und Cerebellum der adulten Maus.** A1 Übersichtsaufnahme (4×) des Hippocampus (Horizontalschnitt). Die Pyramidenzellen insbesondere der Regionen CA1 und CA3 sowie jene im angrenzenden Übergangsgebiet zur entorhinalen Rinde (Subiculum), die Körnerzellen der Fascia dentata und vereinzelte polymorphe Zellen im Bereich des Hilus waren immunpositiv. A2 Ausschnittsvergrößerung (10×). Pyramidenzellen der CA1-Region, deren lange Apikaldendriten mit ihren Endverzweigungen bis in das Stratum lacunosum-moleculare hineinreichen. A3 Ausschnittsvergrößerung (20×). Pyramidenzellen mit langen Apikaldendriten (weiße Dreiecke). B Ausschnittsvergrößerung (20×). CA1-Pyramidenzellen mit immunpositiver Somamembran (weiße Dreiecke). C Ausschnittsvergrößerung (40×) des zerebellären Kortex. Purkinje-Zellen mit Abgang eines Dendriten am oberen Pol und immunpositiver Somamembran (schwarze Dreiecke). Darstellung äußerer und innerer Sternzellen mit ihren Dendriten im Stratum moleculare (weißes Dreieck).

S, Subiculum; str.gang., Stratum ganglionare; str.gr., Stratum granulosum/granulare; str.l-m., Stratum lacunosum-moleculare; str.mol., Stratum moleculare; poly.lay., polymorphic layer; str.pyr., Stratum pyramidale; str.rad., Stratum radiatum.

---

### EXPRESSION UND REGULATION VON AUTOTAXIN IM GEHIRN

#### 4.2.1 Regulation der ATX-mRNA-Expression im Verlauf der Hirnentwicklung

In dieser erstmaligen systematischen Untersuchung zur Genexpression und -regulation von Autotaxin (ATX) während des sich entwickelnden Gehirns der Ratte wurde das Verfahren der radioaktiven In-situ-Hybridisierung angewandt. Dabei wurden zwei verschiedene, synthetische und [ $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ]-markierte Antisense-Oligonukleotidsonden zum Nachweis ATX-spezifischer mRNA zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten eingesetzt. So wurden embryonale, postnatale und adoleszente Stadien vergleichend analysiert (n=3 / Stadium / Sonde) (Abb. 4.2). Schließlich lieferten beide Oligonukleotidsequenzen identische Resultate, während in den Kontrollen ein entsprechendes Hybridisierungssignal nicht nachzuweisen war (Abb. 4.2 C).

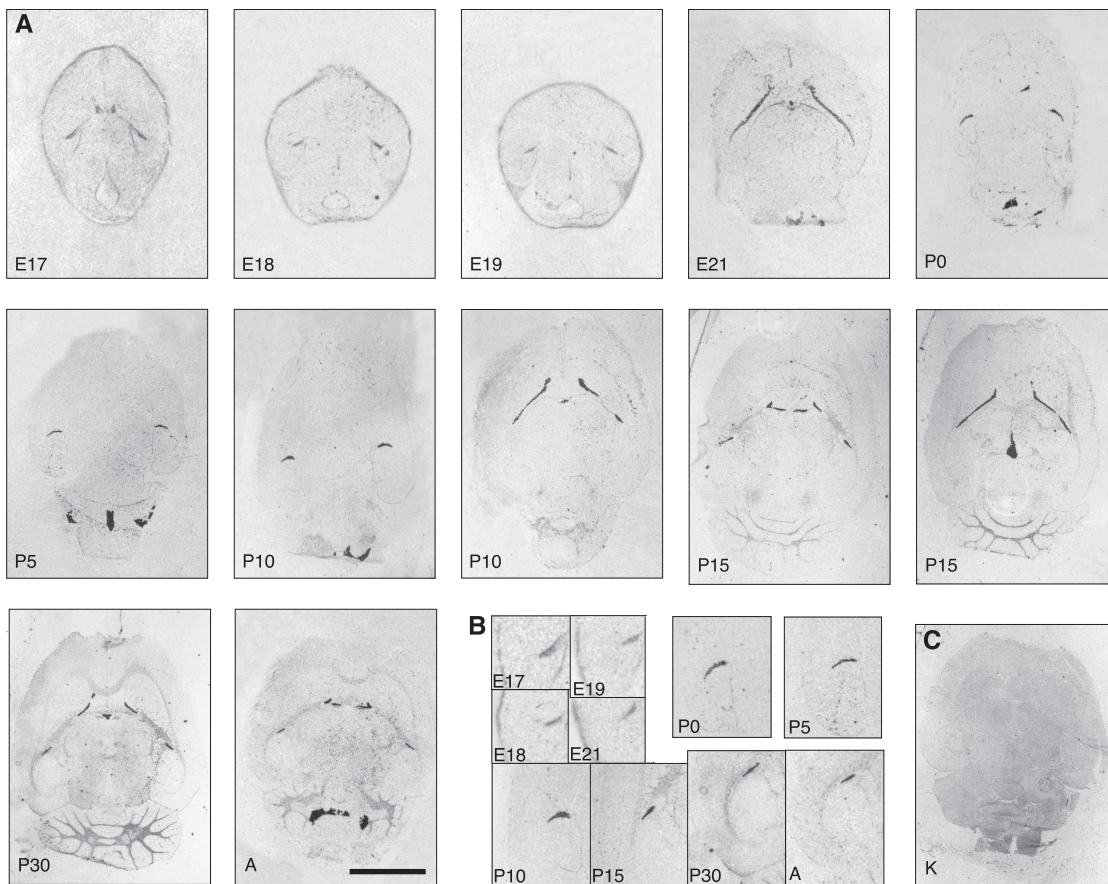
Autotaxin-Transkripte konnten in den Embryonalstadien, beginnend ab dem embryonalen Tag 17 (E17 bis E21) in der subventrikulären Zone (SVZ) aller Ventrikel und im zerebellären Neuroepithelium des IV. Ventrikels nachgewiesen werden (Abb. 4.3). Darüber hinaus ließ sich eine Autotaxin-mRNA-Expression in Strukturen der Substantia alba wie etwa dem Corpus callosum (Balken) erkennen (Abb. 4.3). Im Laufe der postnatalen Entwicklung, von der Geburt beginnend (P0) bis hin zum adulten Stadium (A), zeigten die Hybridisierungssignale im Bereich der subventrikulären Zone eine verhältnismäßige Regression, wohingegen unverändert hohe Intensitätssignale in allen Arealen weißer Substanz ermittelt wurden. Diesen hinzuzurechnen sind neben dem Corpus callosum beispielsweise die Fimbria fornicis, die Commissura anterior, die Capsula interna sowie auch das Marklager des Kleinhirns. Die vergleichsweise stärksten Signalintensitäten sowohl in den embryonalen als auch in den postnatalen Stadien wurden mithin im Plexus choroideus verzeichnet (Abb. 4.2 A und B, Abb. 4.3). Im Gegensatz dazu blieben die Abschnitte des zentralen Nervensystems, welche überwiegend durch Nervenzellkörper gekennzeichnet sind (Substantia grisea) wie zum Beispiel der Kortex von Groß- und Kleinhirn sowie auch das Rindenband des Hippocampus (Cornu ammonis-Regionen [CA1-3]) weitestgehend frei von einem für ATX-mRNA spezifischen Hybridisierungssignal (Abb. 4.2 A und B).

#### 4.2.2 Regulation der ATX-mRNA-Expression nach Neurotrauma

In weiterführenden In-situ-Hybridisierungsuntersuchungen wurde unter Anwendung des Modells der entorhinalen Kortexläsion (ECL) die Autotaxin-spezifische mRNA-Lokalisation nach einem Neurotrauma analysiert. Innerhalb des postoperativen Verlaufes wurden dazu verschiedene Zeitpunkte festgelegt, zu denen die Hybridisierungssignale der vormalig genannten radioaktiv markierten Antisense-Oligonukleotidsonden differenziert zu betrachten waren. Beide Oligonukleotidsequenzen lieferten dabei übereinstimmende Resultate. In den Kontrollen (Abb. 4.2 C) konnte ein entsprechendes Hybridisierungssignal nicht verzeichnet werden. Interessanterweise wurde in jenen Versuchen eine deutliche Zunahme der Signalintensitäten läsionsseitig (ipsilateral)

## 4.2 Expression und Regulation von Autotaxin im Gehirn

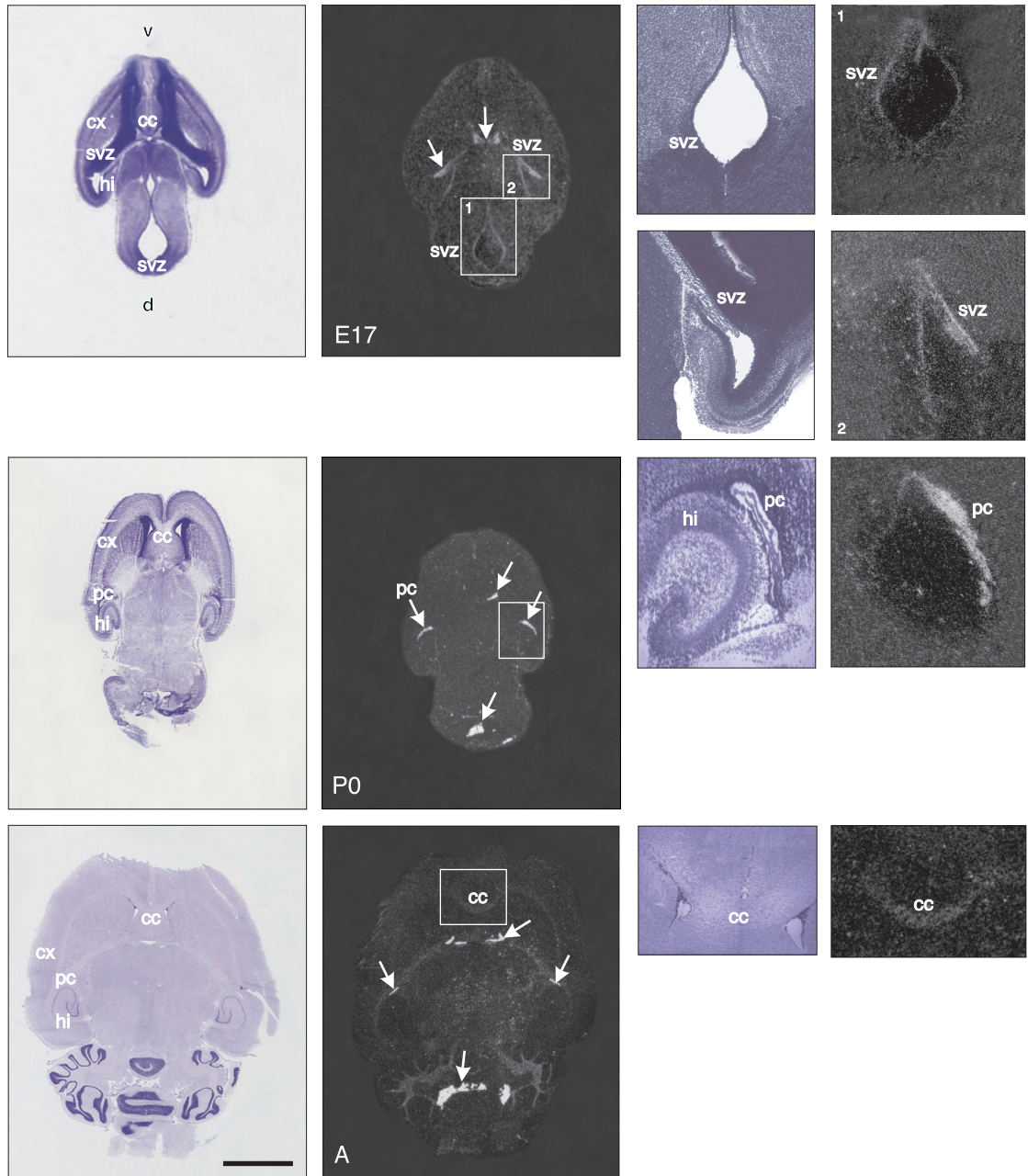
im denervierten sowie im korrespondierenden kontralateralen Abschnitt am ersten Tag (1 dal), ipsilateral zwischen dem zweiten und dritten Tag (3 dal) nach entorhinaler Kortexläsion für Autotaxin darstellbar, wohingegen alle nachfolgend untersuchten Läsionsstadien (5–28 dal) ein mit dem adulten, unbehandelten Stadium vergleichbares Bild lieferten (Abb. 4.4).



**Abbildung 4.2: ATX-mRNA-Expressionsmuster während der Hirnentwicklung.** In-situ-Hybridisierung mit  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-konjugierten Oligonukleotidsequenzen zum Nachweis ATX-spezifischer mRNA der Ratte zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten. Die Bereiche mit hoher Radioaktivität sind schwarz abgebildet. **A** Übersicht der Entwicklungsstadien (Horizontalschnitt). **B** Ausschnittsvergrößerung im Bereich des Hippocampus mit Darlegung der subventrikulären Zone beziehungsweise des Plexus choroideus. **C** Kontrolle. Aus technischen Gründen wurden die Dura mater sowie die Arachnoidea entfernt. Der Maßstabsbalken bemisst 430  $\mu$ m. E, Tag gravidarum; P, Tag *post partum*; A, adult; K, Kontrolle.

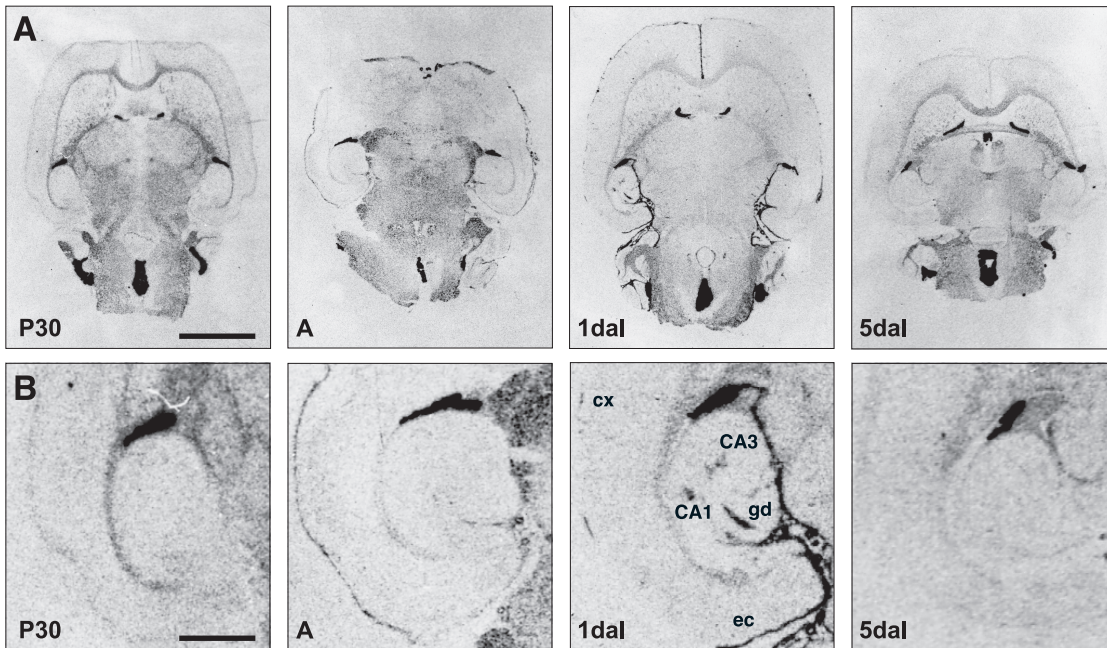


## 4 Resultate



**Abbildung 4.3: ATX-mRNA-Expression anhand ausgewählter Entwicklungsstadien (E17, P0, A).** Vergleichbare In-situ-Hybridisierung wie in Abb. 4.2. Verbildlichung der Radioaktivität hierbei im Negativformat (weiße Signale) und in der Gegenüberstellung die jeweilig zugehörigen Hirnschnittpräparate nach Toluidinblau-Färbung. In den Embryonalstadien (E17-E21) konnte ATX-mRNA in der subventrikulären Zone (weiße Kästchen bei E17), im zerebellären Neuroepithelium des IV. Ventrikels, im Plexus choroideus und im Corpus callosum nachgewiesen werden. Während der postnatalen Entwicklung (P0-P30) bis hin zum adulten Stadium war die ATX-mRNA im Plexus choroideus (weißes Kästchen bei P0) und in der Substantia alba wie beispielsweise der Fimbria fornicis, dem Corpus callosum (weißes Kästchen bei A), der Commissura anterior und dem Marklager des Kleinhirns darstellbar. Die weißen Pfeile markieren jeweils den Plexus choroideus. Der Maßstabsbalken entspricht 430  $\mu\text{m}$ . E, Tag gravidarum; P, Tag *post partum*; A, adult; cc, Corpus callosum; cx, Kortex; hi, Hippocampus; pc, Plexus choroideus; svz, subventrikuläre Zone; v, ventral; d, dorsal.)

## 4.2 Expression und Regulation von Autotaxin im Gehirn



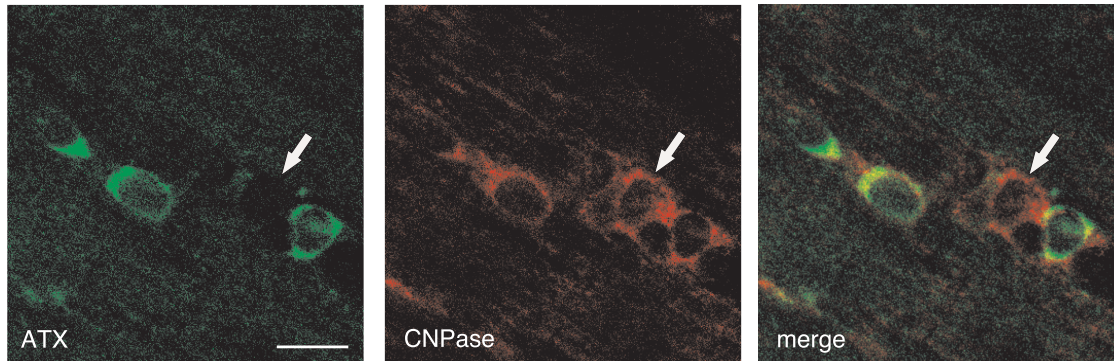
**Abbildung 4.4:** ATX-mRNA-Expression nach entorhinaler Kortexläsion (ECL). In-situ-Hybridisierung mit  $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ -konjugierten Oligonukleotidsequenzen zum Nachweis ATX-spezifischer mRNA der Ratte in den Stadien P30, adult sowie nach entorhinaler Kortexläsion (1 dal, 5 dal). Die Bereiche mit hoher Radioaktivität sind schwarz abgebildet. **A** Übersichtsdarstellung der relevanten Stadien mit deutlicher Intensitätszunahme des Hybridisierungssignals einen Tag nach Läsion (1 dal) sowohl ipsi- (läsionsseitig) als auch kontralateral (Horizontalschnitt). **B** Ausschnittsvergrößerung im Bereich des Hippocampus. P, Tag *post partum*; A, adult; dal, Tag(e) nach Läsion; cx, Kortex; ec, entorhinaler Kortex; gd, Gyrus dentatus; CA, Cornu ammonis-Region. Der Maßstäbsbalken entspricht in A 430  $\mu\text{m}$ , in B 190  $\mu\text{m}$ .

### 4.2.3 Distribution des Proteins ATX im adulten Gehirn

Konsequenterweise bestand der nächste Schritt darin, die Verteilung des den ATX-Transkripten entsprechenden Proteins *in situ* im adulten, fixierten Gehirn der Ratte näher zu untersuchen. Ausgehend von dem bis dato bekannten Expressionsmuster, nach welchem Autotaxin insbesondere im Epithel des Plexus choroideus und in Regionen der Substantia alba lokalisiert ist, war nunmehr das zelluläre Verteilungsmuster von ATX innerhalb des Gewebeverbandes von Interesse. Dementsprechend wurden zur qualitativen Erkennung des Proteins verschiedene immunhistochemische Detektionsmethoden, insbesondere der Einsatz von Fluoreszenz-Antikörpern, in Anwendung gebracht. Insbesondere solche Bereiche des ZNS, die durch das Vorhandensein von vorrangig weißer Substanz (Faserbahnen) gekennzeichnet sind wie etwa das Corpus callosum, die Commissura anterior, die Fimbria fornix, das Marklager des Kleinhirns oder die Capsula interna, gelten gemeinhin als Sitz oligodendroglialer Zellen, bedingt durch deren wesentliche Funktion im Bemerkungsprozess von Axonen. Das Einsetzen Autotaxin-spezifischer monoklonaler Antikörper resultierte in einer positiven Immun-detektion genau jener Zellen, die unter simultaner Verwendung eines gesonderten Oligodendrozyten-Markers, und zwar der Anti-CNPase, in Kolokalisierung verifiziert werden konnten. Diese Ergebnisse bestätigten damit die in der wissenschaftlichen



## 4 Resultate



**Abbildung 4.5: Kolokalisierung von ATX mit dem Oligodendrozyten-Marker Anti-CNPase im Bereich der Substantia alba (Corpus callosum).** Konfokalmikroskopische Aufnahmen horizontaler Hirnschnittpräparate adulter Ratten. ATX-immunpositive Zellen (grün) ließen sich in der indirekten Immunfluoreszenz mit dem oligodendroglialen Marker Anti-CNPase (rot) kolokalisieren. Dabei war nahezu jede ATX-positive Zelle auch CNPase-positiv, wohingegen nicht jede CNPase-positive Zelle ein entsprechendes ATX-Signal aufzeigte (weiße Pfeile). Der Maßstabsbalken bemisst 5  $\mu$ m.

Literatur bisher aufgeführten Daten zur oligodendroglialen Lokalisation von Autotaxin (siehe Abschnitt 1.2.4).

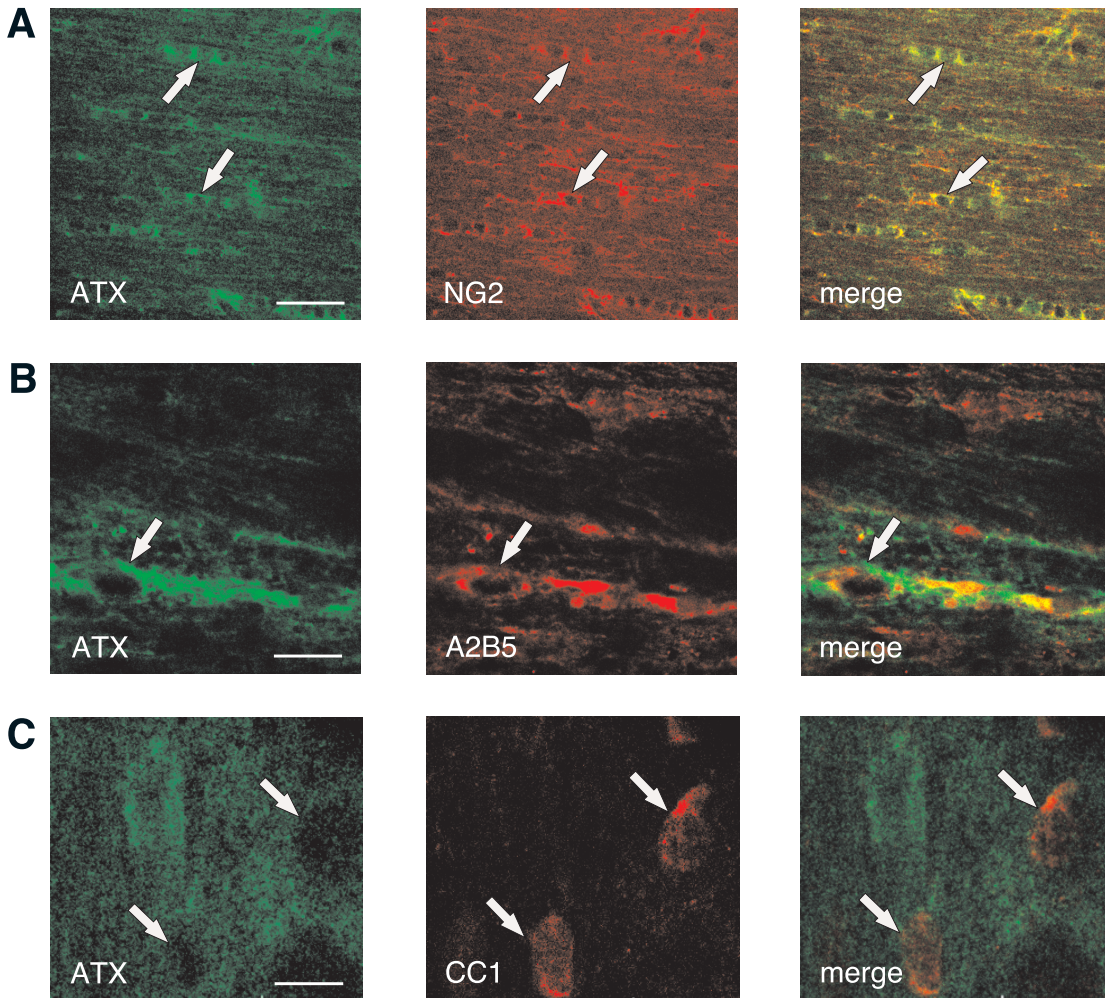
Die fluoreszenz-beziehungswise konfokalmikroskopischen Auswertungen ergaben darüber hinaus eine lediglich partielle Übereinstimmung der Kolokalisation von Autotaxin und CNPase in den von weißer Substanz gekennzeichneten Bereichen. Das heißt, dass zwar fast jede Autotaxin-immunpositive Zelle eine ebenso positive CNPase-Färbung zeigte, wohingegen in umgekehrter Weise nicht jede CNPase-immunpositive Zelle auch durch ein entsprechendes Autotaxin-Signal gekennzeichnet war (Abb. 4.5).

Aufgrund des beobachteten Sachverhaltes, dass es sich bei jenen glialen Zellen mit Autotaxin-positiver Immunreaktion offenbar um eine Subpopulation von Oligodendrozyten handelt, galt es im nächsten Schritt, diese Zellen unter Gebrauch zusätzlicher stadiengerecht differenzierender Oligodendrozyten-Marker zu charakterisieren. Die zu diesem Zwecke in Kolokalisierungsstudien eingesetzten monoklonalen Antikörper umfassten Anti-A2B5 (A2B5) und Anti-NG2-Proteoglykan (NG2) als Marker für gliale Progenitorzellen bzw. frühe Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPCs), Anti-O4 (O4) für späte OPCs (Prä-Oligodendrozyten) und prä-myelinisierende Oligodendrozyten (OLs) sowie Anti-APC (CC-1) für reife myelinisierende OLs. Anhand dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Autotaxin gerade in solchen Zellen prädominiert, in denen simultan die OPC-Marker A2B5 und NG2 (Abb. 4.6) sowie O4 (nicht abgebildet) immundetektiert wurden, gleichwohl eine Kolokalisierung mit dem reife Oligodendrozyten aufzeigenden CC-1-Marker nicht gelang (Abb. 4.6, Tab. 4.2). Indes sei nachträglich bemerkt, dass Autotaxin im Hinblick auf die OPCs nicht in Membran-assoziiierter Weise sondern vielmehr in Form zerstreuter vesikulärer Strukturen vorlag.

### 4.2.4 Zerebrale Distribution des Proteins ATX nach Neurotrauma

In Anbetracht der bereits in der In-situ-Hybridisierung erkennbaren Effekte auf die ATX-mRNA-Expression nach erfolgter entorhinaler Kortexläsion (ECL) galt es nun, je-

## 4.2 Expression und Regulation von Autotaxin im Gehirn



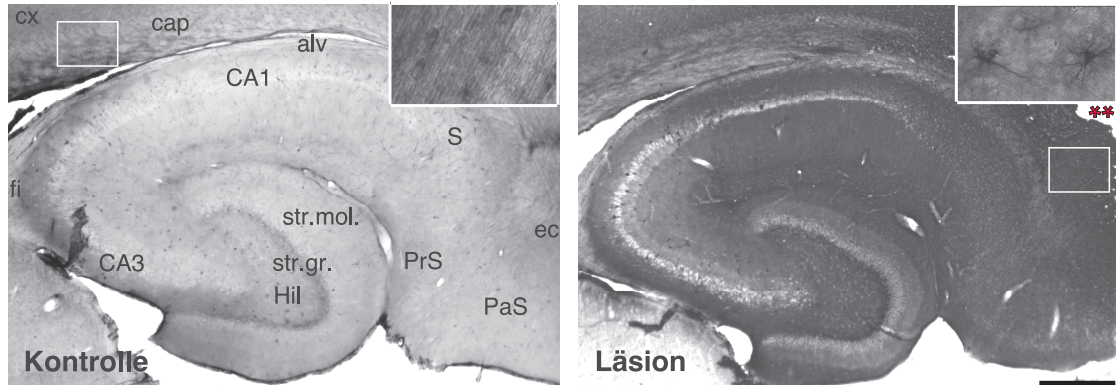
**Abbildung 4.6:** Kolokalisierung von ATX mit den Oligodendrozyten-Markern NG2, A2B5 und CC-1 im Bereich der Substantia alba (Corpus callosum). Konfokalmikroskopische Aufnahmen horizontaler Hirnschnittpräparate adulter Ratten. **A/B** Zellen mit positiver Immundetektion für Autotaxin (grün) ließen sich mit den Markern NG2 und A2B5 (rot), beide spezifisch für frühe Oligodendrozyten-Präkursorzellen, in der indirekten Immunfluoreszenz kolokalisieren. **C** Eine simultane Darstellung ATX-immunpositiver Zellen (grün) und jener vom Marker CC-1 spezifisch aufgezeigt reifer Oligodendrozyten (rot) war nicht gegeben. Der Maßstabsbalken misst in **A** 22  $\mu\text{m}$ , in **B** 8  $\mu\text{m}$  und in **C** 5  $\mu\text{m}$ .

| Marker/mAB  | Differenzierungsstadium der OLs     | ATX-Expression |
|-------------|-------------------------------------|----------------|
| Anti-CNPase | alle Stadien/ stark in reifen OLs   | +/-            |
| Anti-NG2    | frühe und reife OPCs                | +              |
| Anti-A2B5   | gliale Progenitorzellen, frühe OPCs | +              |
| Anti-O4     | reife OPCs, prä-myelinisierende OLs | +              |
| Anti-CC-1   | reife myelinisierende OLs           | -              |

**Tabelle 4.2:** Darstellung der ATX-exprimierenden Entwicklungsstadien der OLs.

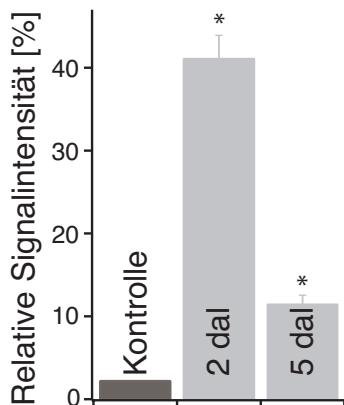


## 4 Resultate



**Abbildung 4.7: Immunhistochemische Analyse von ATX im adulten Gehirn und nach ECL.** Übersichtsaufnahme des Hippocampus der Ratte. In Kontrollen ATX-immunpositive Zellen in markhaltigen Regionen (Alveus, Fimbria hippocampi, Capsula interna). Ausschnittsvergrößerung (weißes Kästchen links): oligodendrogliale Zellen der Capsula interna. 5 Tage nach ECL (5 dal): Auftreten ATX-immunpositiver Zellen vom astroglialen Typ in der Zirkumferenz der Läsion (weißes Kästchen rechts). \* Läsionsort. Der Maßstabsbalken misst 60  $\mu\text{m}$ . alv, Alveus hippocampi; CA, Cornu ammonis; cap, Capsula interna; cx, Kortex; ec, entorhinaler Kortex; fi, Fimbria hippocampi; Hil, Hilus; PaS, Parasubiculum; PrS, Praesubiculum; S, Subiculum; str. gr., Stratum granulosum; str. mol., Stratum moleculare.

ne Ableitungen durch weitere immunhistochemische Verfahren auf Proteinebene zu prüfen und zu präzisieren.



**Abbildung 4.8: Semiquantitative Analyse der ATX-Immunoblots nach ECL.** Gesamtprotein-Lysate ( $n = 3/\text{Stadium}$ ) isolierten Hippocampusgewebes relevanter Läsionsstadien (2 dal, 5 dal) wurden gegen Kontrollen ( $n = 3$ ) dargestellt. \*  $\equiv p < 0.05$  (U-Test).

Die in der Lichtoptik vorerst angewandte, indirekte ABC-/DAB-Methode lieferte, was zunächst die unbehandelten Kontrolltiere betrifft, mit der wissenschaftlichen Literatur übereinstimmende Resultate zur Lokalisation von ATX im Gehirn wie beispielhaft das Epithel des Plexus choroideus sowie die von Substantia alba gekennzeichneten Regionen. Letztere wiesen im Hinblick auf die archikortikale Hippocampusformation ATX-immunpositive Zellen vom oligodendroglialen Typ insbesondere in den Bereichen des Alveus, der Fimbria hippocampi und des Stratum lacunosum-moleculare, hinsichtlich der neokortikalen (isokortikalen) Schichtengliederung dergleiche in der Lamina granularis interna (innere Körnerschicht; Lamina IV) beziehungsweise im äußeren Baillarger-Streifen auf. Hingegen blieb ein korrespondierendes Detektionssignal sowohl in Neuronen als auch in makro- (Astroglia) und mikroglialen Zellformen aus. Im Gefolge der applizierten entorhinalen Kortexläsion (ECL) war eine signifikante Hochregulation des entsprechenden Autotaxin-Signals in ebendiesem denervierten Areal und Läsionsbereich vom zweiten (2 dal) bis fünften Tag (5 dal) nach Läsion zu beobachten, wohingegen in den von der chirurgischen Intervention nicht betroffenen Regionen eine alterierte ATX-Protein-Expression ausblieb. Indes war im Läsionsbereich eine positive Autotaxin-Immundetektion in Zellen vom astroglialen Typ *de novo* erfolgt (Abb. 4.7).



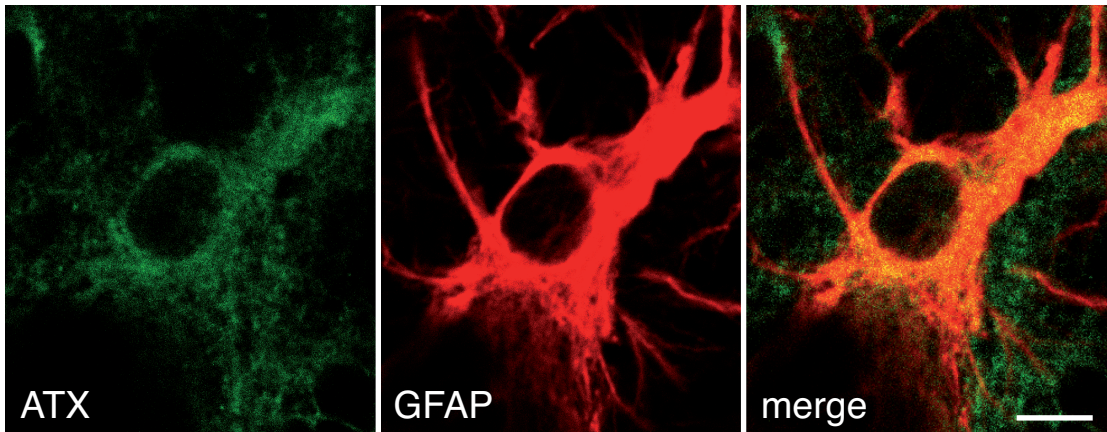
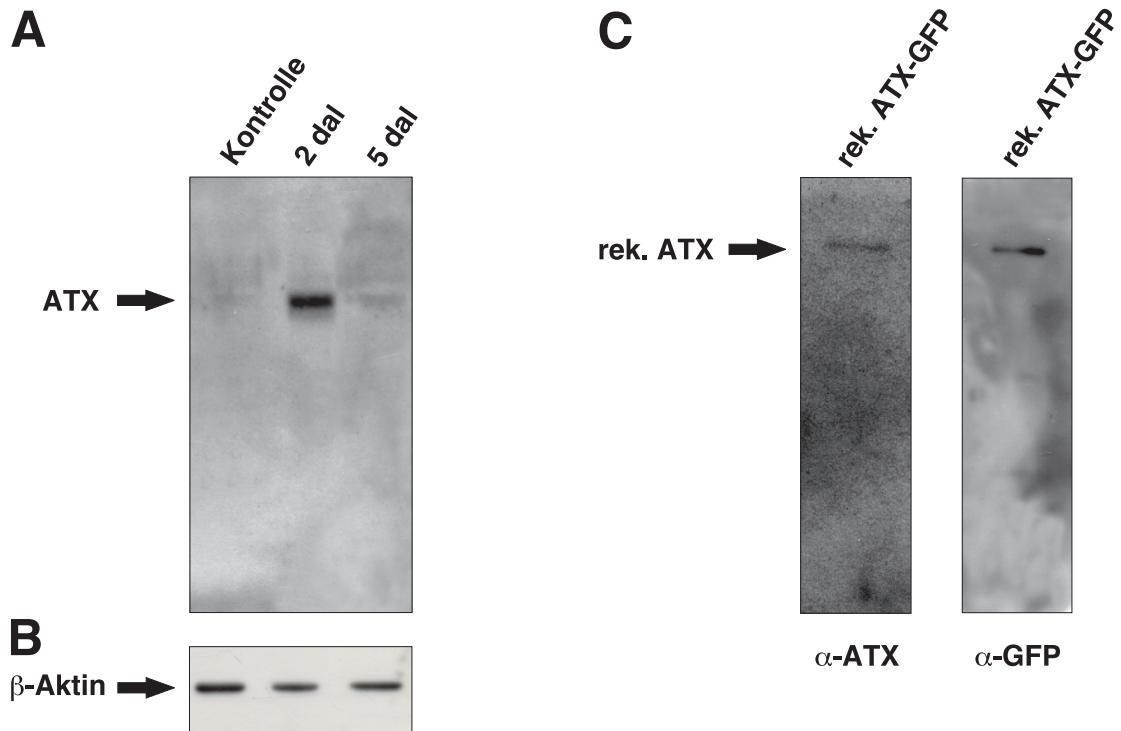


Abbildung 4.9: Kolokalisierung von ATX mit dem Astrozyten-Marker Anti-GFAP in der Zirkumferenz der Läsion (ECL). Kofokalmikroskopische Aufnahmen horizontaler Hirnschnittpräparate adulter Ratten fünf Tage nach entorhinaler Kortexläsion (5 dal). Autotaxin-immunpositive Zellen (grün) konnten mit dem Astrozyten-Marker Anti-GFAP (rot) in der indirekten Immunfluoreszenz kolokalisiert dargestellt werden (*merge*). Der Maßstabsbalken entspricht 1,2  $\mu\text{m}$ .

Zur weiteren Verifizierung jener lichtoptisch identifizierten astroglialen Zellen in der Zirkumferenz der induzierten Läsion wurden diese durch Verwendung geeigneter (indirekter) Immunfluoreszenz-Marker kenntlich gemacht. Das zu diesem Zwecke eingesetzte GFAP, welches als Intermediärfilament spezifisch im astroglialen Zytoplasma lokalisiert ist, lieferte in der Kolokalisierung mit dem ATX-mAB schließlich ein kongruentes Bild, d. h. nach ECL wurden im Läsionsbereich erstmalig auch Autotaxin-immunpositive reaktive Astrozyten detektiert (Abb. 4.9).

#### 4.2.5 Proteinbiochemischer Nachweis von ATX nach Neurotrauma

Gesamtprotein-Extrakte isolierter Hippocampi adulter Ratten wurden zur semiquantitativen Analyse der Autotaxin-Proteinexpression der Methode des ElektrobloTTing mit anschließender Immundetektion (sog. Western-Blotting o. Immunoblotting) unterzogen. Proteinlysate unterschiedlicher Läsionsstadien ( $n = 3$  / Stadium) waren hierin Gegenstand der Untersuchungen, wobei Hippocampi der Läsions- (ipsilateral) und kontralateralen Seite Berücksichtigung fanden. Entsprechende Lysate unbehandelter Tiere ( $n = 3$ ) wurden indes als Kontrollen verwendet. In Übereinstimmung mit den erhobenen Daten aus der vorausgegangenen In-situ-Hybridisierung (Abb. 4.4) sowie DAB-Immunhistochemie (Abb. 4.7) konnte auch auf proteinbiochemischer Ebene der Nachweis einer massiven Hochregulation von Autotaxin seitens der Läsion (ipsilateral) erbracht werden. Der zeitliche Verlauf markierte ein Maximum des Expressionssignals am zweiten Tag *post operationem* (p. o.; 2 dal) und ergab erhöhte Werte der ATX-Proteinexpression bis zum einschließlich fünften Tag nach ECL (5 dal) (Abb. 4.8, Abb. 4.10). Im Vergleich dazu konnte weder in dem korrespondierenden Hippocampus der nicht betroffenen, kontralateralen Seite, ungeachtet des Läsionsstadiums, noch im weiteren postoperativen Verlauf ein signifikant alteriertes Autotaxin-Signal ermittelt werden (nicht abgebildet).



**Abbildung 4.10: Proteinbiochemischer Nachweis von ATX nach ECL im Western-Blotting.** **A** Gesamtprotein-Transfer isolierten Hippocampusgewebes repräsentativer Läsionsstadien (hier nur ipsilateral) mit nachfolgender ATX-Immundefektion. Die Hippocampi unbehandelter Tiere galten als Kontrolle. Am zweiten Tag p. o. (2 dal) wurde eine konsiderable Proteinbande entsprechend einem Molekulargewicht von etwa 60 kDa erkenntlich, welche an Intensität deutlich abnehmend jedoch bis zum fünften Tag p. o. (5 dal) darstellbar war. **B** Zur Standardisierung und Ladungskontrolle wurde das Referenzprotein  $\beta$ -Aktin auf selbigen Immunoblots verwendet. **C** Rekombinantes ATX-EGFP diente der Spezifizierung des ATX-mAB. Das Fusionsprotein wurde von beiden Antikörpern (ATX-mAB, Anti-GFP) erkannt.

Die im Anschluss durchgeführten Intensitätsmessungen der Proteinbanden (Abb. 4.10) erfolgten nach Digitalisierung und unter Verwendung eines computergestützten Video-Densitometrie-Systems (Metamorph, Universal Imaging Systems, USA). Der statistischen Auswertung wurde schließlich der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (U-Test) zugrunde gelegt. Demnach ergab sich zum Zeitpunkt der maximalen Expression von Autotaxin, i. e. am zweiten Tag p. o. (2 dal), ein in der Annäherung 20-fach höheres Signal im Vergleich zu den Kontrollen. Am fünften Tag p. o. (5 dal) konnte sogar noch ein um etwa das 5-fache erhöhtes Intensitätssignal ermittelt werden (Abb. 4.8).

---

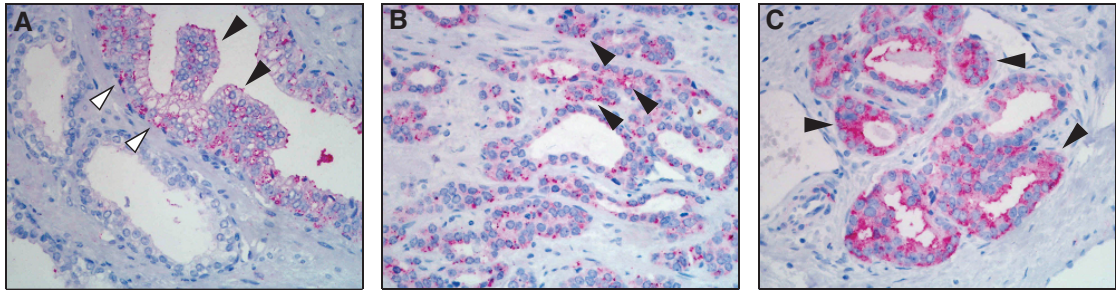
## EXPRESSION VON PRG-1 IM RAHMEN DER KARZINOGENESE

### 4.3.1 PRG-1-Expression am Beispiel des humanen Prostataadenokarzinoms

Ausgehend von einer Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin und mit Genehmigung der zuständigen Ethikkommission wurden von einem Patientenkollektiv (n = 112) mit diagnostisch gesichertem Adenokarzinom der Prostata (PCa) beziehungsweise prostaticher intraepithelialer Neoplasie (PIN) mit kurativer oder palliativer Prostatektomie Paraffinschnitte der entnommenen Organgewebe für immunhistochemische Zwecke angefertigt. Diese wurden mit einem PRG-1-Antikörper inkubiert, der unter Verwendung des Fast-Red-Substratsystems in Gegenwart von alkalischer Phosphatase detektierbar war. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Entsprechende Kontrollen umfassten sowohl gesundes Prostatagewebe als auch derartige Paraffinschnitte, die anstelle des Primärantikörpers mit TBS versehen wurden. Die Begutachtung der PRG-1-Immunhistochemie im Nachhinein erfolgte in Zusammenarbeit mit zwei Fachärzten für Pathologie, von denen für Korrespondenz Prof. Dr. Glen Kristiansen (derzeitig im Institut für Klinische Pathologie, UniversitätsSpital Zürich, Schweiz) hier zu nennen ist. Im Zuge dieser Untersuchungen konnte erstmalig gezeigt werden, dass das *Plasticity-related Gene-1*, welches unter physiologischen Bedingungen nahezu hirnspezifisch exprimiert ist, im humanen Prostataadenokarzinom sowie in dem Präkursor-Stadium der prostatichen intraepithelialen Neoplasie auf Proteinebene *de novo* darstellbar war. Im Hinblick auf die Patientenpopulation konnte PRG-1, ausgehend von den insgesamt 112 Gewebeproben unterschiedlicher TNM-Stadien (TNM-Klassifikation, 6. Auflage), in 75 Tumorexizidaten (67 %) nachgewiesen werden, wobei Karzinome mit PRG-1-Überexpression im relativ frühen TNM-Stadium pT2 mit einem signifikant kürzeren krankheitsfreien Intervall korrelierten (unveröffentlichte Daten). Aus pathologisch-anatomischer Sicht prädominierte die PRG-1-Immundetektion in dem sekretorischen Anteil der tubuloalveolären Drüsen – den sekretorischen, durch hohe Enzymaktivitäten gekennzeichneten Hauptzellen – derweil deren Vorläufer, die Basalzellen, kaum eine entsprechende PRG-1-Färbung erkennen ließen. Im dichten Drüsenstroma konnte PRG-1 hingegen nicht dargestellt werden. Der positive Immunnachweis von PRG-1 in den Hauptzellen der Drüsen war auf subzellulärer Ebene durch ein disperses, diskret granuliertes und auf das Zytoplasma beschränktes Verteilungsmuster charakterisiert (Abb. 4.11).

Allerdings erwiesen sich die Immunfärbungen jedoch als sehr variabel, da die Intensität der detektierten PRG-1-Signale unabhängig vom jeweiligen TNM-Stadium resp. Gleason-Score mitunter graduell zwischen gering und stark variierte. In einigen Fällen konnte PRG-1 immunhistochemisch nicht dargestellt werden und/oder es handelte sich um Gewebeproben, deren Färbungen gar geringer ausfielen als die der Kontrollen.

## 4 Resultate



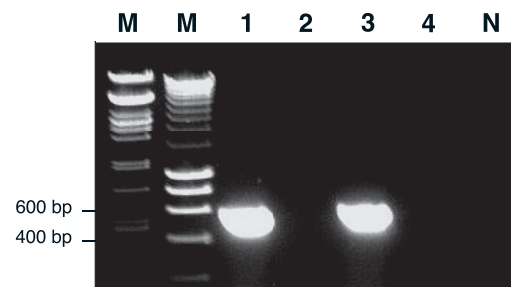
**Abbildung 4.11: Immunhistochemischer Nachweis von PRG-1 im humanen Prostataadenokarzinom bzw. in der prostatistischen intraepithelialen Neoplasie (PIN).** Das Detektionsverfahren beruhte auf Verwendung des Fast-Red-Substratsystems unter Zusatz alkalischer Phosphatase. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. **A** PIN mit PRG-1-immunpositiven Hauptzellen (schwarze Pfeile) sowie Basalzellen (weiße Pfeile). Angrenzend originäres Drüsenparenchym (N) und Drüsenstroma (S) [10×]. **B/C** Invasives Prostataadenokarzinom mit positiver PRG-1-Immundetektion [20×/40×]. In Kooperation mit dem Institut für Pathologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin.

### 4.3.2 PRG-1-Nachweis in der humanen Prostatakarzinomzelllinie DU-145

#### Verifizierung der cDNA-Synthese nach Gesamt-RNA-Isolation

Der immunhistochemische Nachweis von PRG-1 in Exzidaten des humanen Prostataadenokarzinoms gab den Anstoß, die vorgestellten Beobachtungen anhand einer repräsentativen Prostatakarzinomzelllinie weitergehend zu untersuchen. Die einer Hirnmetastase entstammende, hormoninsensitive Zelllinie DU-145 wurde zu diesem Zwecke ausgewählt und etabliert. Sie weist ein moderates Metastasierungspotential auf und stellt ein in der Wissenschaft weit verbreitetes Modell dar, welches sich zudem durch eine relativ unkomplizierte Handhabung auszeichnet.

Elementare molekularbiologische Prozeduren umfassten zunächst die Total-RNA-Isolation nach der TRIZOL<sup>®</sup>-Methode mit folgender cDNA-Synthese (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit). Zur Verifizierung der aus DU-145-Zellen generierten cDNA und zum Ausschluss einer Kontamination mit genomischer DNA wurde eine PCR mit dem ubiquitär exprimierten Referenzgen  $\beta$ -Aktin durchgeführt. Die Evaluierung der PCR-Produkte erfolgte gelelektrophoretisch (1% Agarose) und wurde digitalisiert dokumentiert. Die Abb. 4.12 veranschaulicht eine solche AGE-Auftrennung nach  $\beta$ -Aktin-Amplifikation zur Wertung der cDNA-Synthese nach Total-RNA-Isolation aus DU-145-Zellen *per exemplum*.



**Abbildung 4.12: Exemplarische Gelelektrophorese nach  $\beta$ -Aktin-Amplifikation.** M, Marker ( $\lambda$ -Marker, links, HyperLadder<sup>™</sup> I, rechts); 1/3 cDNA (verschieden) von DU-145-Zellen; 2/4 Kontrollen; N, Leerwertkontrolle der PCR. Amplifikatlänge ca. 500 bp.

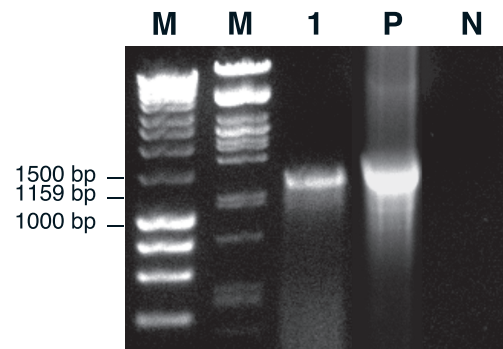
### 4.3 Expression von PRG-1 im Rahmen der Karzinogenese

#### PCR-Nachweis von PRG-1 in der Zelllinie DU-145

Die aus DU-145-Zellen generierte cDNA wurde unter Verwendung korrespondierender PRG-1-Primer ( $\Delta N$  HA-hPRG-1 (*forward*), 3.1R-hPRG-1 (*reverse*)) in der PCR eingesetzt. Das zugrunde liegende PCR-Protokoll musste zu diesem Zwecke wie nachstehend genannt modifiziert werden (Tab. 4.3). Fernerhin wurde die Herculase<sup>®</sup> Hotstart mit dem zugehörigen Herculase Reaction Buffer (10 $\times$ ) verwendet. Die Identifizierung der PCR-Produkte anhand ihrer Größe erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Agarose, 1 %) im UV-Spektrum. Der Gellauf wurde entsprechend dokumentiert (Abb. 4.13).

| No. | Temperatur             | Dauer    | Zyklenzahl |
|-----|------------------------|----------|------------|
| 1   | 95°C                   | 2 min    | 1          |
| 2   | 94°C                   | 30 sec   |            |
| 3   | 58°– 68°C <sup>3</sup> | 30 sec   | 10         |
| 4   | 72°C                   | 1.5 min  |            |
| 5   | 94°C                   | 30 sec   |            |
| 6   | 68°C                   | 30 sec   | 30         |
| 7   | 72°C                   | 2.5 min  |            |
| 8   | 72°C                   | 5 min    | 1          |
| 9   | 12°C                   | $\infty$ |            |

**Tabelle 4.3:** Modifiziertes Programm für die PRG-1-Amplifikation.



**Abbildung 4.13:** Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte nach PRG-1-Amplifikation. M, Marker (HyperLadder<sup>™</sup>I, links;  $\lambda$ -Marker, rechts); 1, cDNA aus DU-145-Zellen (0,2  $\mu$ g); P, Positivkontrolle (Plasmid-DNA: HA-PRG-1 (0,2  $\mu$ g)); N, PCR-Leerwertkontrolle. Amplifikatlänge ca. 1200 bp.

#### Quantitative Genexpressionsanalyse der PRGs und des ATX in DU-145-Zellen

Im Vorfeld der quantitativen Analyse zur Genexpression der PRGs im Allgemeinen und des PRG-1 im Speziellen sowie des ATX in der humanen Prostatakarzinomzelllinie DU-145 war eine Effizienzbestimmung der kommerziell erworbenen TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays unerlässlich, da diese Effizienzwerte (angegeben in %) sowohl für Ziel- als auch für Referenzgene annähernd identisch sein müssen, um eine valide relative Quantifizierung (Komparative  $C_T$ -Methode) in der *Real-Time*-PCR letztlich gewährleisten zu können.

<sup>3</sup>Nach jedem Zyklus wurde die *Annealing*-Temperatur um 1°C erhöht.

## 4 Resultate

**Tabelle 4.4:** PCR-Amplifikationseffizienz der verwendeten humanen TaqMan<sup>®</sup>-Proben (PRGs, ATX).

| TaqMan <sup>®</sup> -<br>Probe | Anstieg <sup>4</sup><br>( <i>slope</i> ) | Bestimmtheitsmaß <sup>5</sup><br>$R^2$ | Effizienz E [%] |
|--------------------------------|--|--|-----------------|
| PRG-1                          | -3,44                                    | 0,9875                                 | 95,2            |
| PRG-2                          | -3,47                                    | 0,9994                                 | 94,2            |
| PRG-3 <sup>6</sup>             | —  | —                                      | —               |
| PRG-4                          | -3,09                                    | 0,9994                                 | 110,7           |
| PRG-5                          | -3,33                                    | 0,9947                                 | 99,83           |
| ATX                            | -3,41                                    | 0,9899                                 | 96,6            |
| GAPDH                          | -3,59                                    | 0,9983                                 | 89,9            |
| HPRT                           | -3,28                                    | 0,9984                                 | 101,8           |

Die jeweilig resultierenden Werte für das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  ergaben uneingeschränkt in der Annäherung 1, so dass ein zugrunde liegender linearer Zusammenhang der ermittelten Daten anzunehmen war. Zudem lag die für jedwede Probe berechnete PCR-Amplifikationseffizienz im vorgegebenen Rahmen, wodurch eine praktische Dopplung der Amplifikat-Menge je Zyklus erzielt und der Einsatz der Proben in den sich anschließenden qRT-PCR-Versuchen verifiziert wurde.

Die entsprechenden mRNAs der Gene PRG-1–5 und ATX zeigten in der folgenden *Real-Time* quantitativen PCR ein distinktes Expressionsmuster in der androgenunabhängigen Prostatakarzinomzelllinie DU-145. Während für PRG-1, PRG-2 und PRG-4 eine entsprechende Genexpression (PRG-4 > PRG-2 > PRG-1) festgestellt werden konnte, blieb der analoge Nachweis einer mRNA für PRG-3 und PRG-5 aus. Gleichzeitig wurde eine verhältnismäßig geringe Expression des Gens ATX ermittelt (Abb. 4.14).

### Proteinbiochemische Analyse von PRG-1 in DU-145-Zellen

Weiterführende Untersuchungen dienten daraufhin dem proteinbiochemischen Nachweis von PRG-1 in der Prostatakarzinomzelllinie DU-145. Die zu diesem Zwecke angefertigten Gesamtprotein-Lysate dieser Zellen wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel und dem Elektrotransfer auf entsprechende Trägermembranen auf ihren Antigengehalt hin mit Hilfe korrespondierender PRG-1-

<sup>4</sup>Anstieg der Standardkurve in Form einer Regressionsgeraden (Zykluszahl [ $C_T$ -Wert] vs. eingesetzte cDNA-Menge [ $\log_{Input}$  cDNA]). Über den Anstieg der jeweiligen Standardkurve konnte die Effizienz (E) dann nach folgender Gleichung ermittelt werden:  $E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100$ .

<sup>5</sup>Bestimmtheitsmaß  $R^2$  (syn. Determinationskoeffizient): prozentualer Anteil der Variabilität einer abhängigen Variablen  $x$ , der sich durch ein lineares Regressionsmodell ableiten lässt;  $R^2 = 0(0\%)$  kein linearer Zusammenhang,  $R^2 = 1(100\%)$  idealer linearer Zusammenhang.

<sup>6</sup>Amplifikationseffizienz konnte nicht ermittelt werden.



### 4.3 Expression von PRG-1 im Rahmen der Karzinogenese

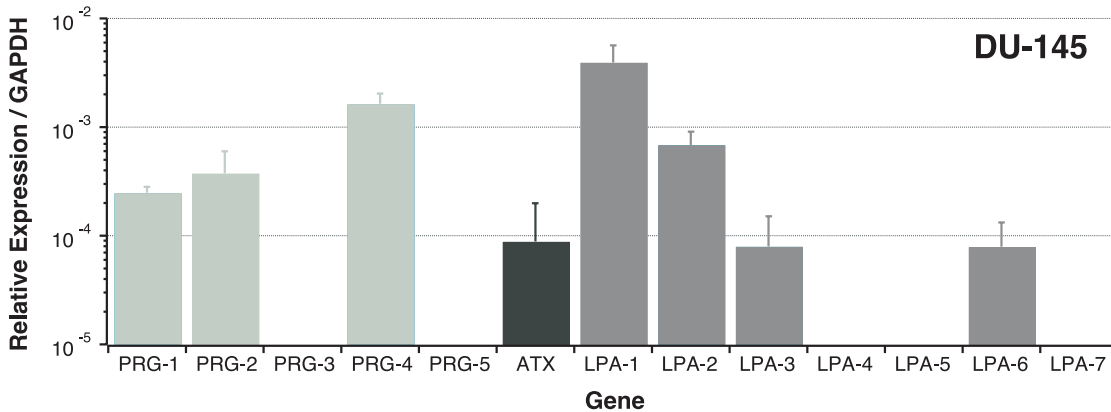


Abbildung 4.14: Distinktes Expressionsprofil der Gene PRG-1–5, ATX und LPA<sub>1–7</sub> in DU-145-Zellen. Bestimmung der mRNA-Level mittels *Real-Time* quantitativer PCR (qRT-PCR). Angabe der Werte relativ zur mRNA-Expression des Referenzgens GAPDH. Daten aus vier Experimenten mit jeweiligem Ansatz in Triplikaten je Gen (T-Balken = KI-95 %).

Antikörper analysiert. Dabei lieferten sowohl das polyklonale Antiserum als auch der aufgereinigte PRG-1-Antikörper mehrere in der Intensität variierende Einzelbanden, von denen zwei Banden prädominierten.

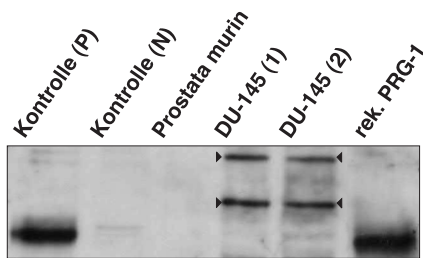


Abbildung 4.15: Western-Blot-Analyse von PRG-1 in DU-145-Zellen. Positivkontrolle (P) (Membranprotein aus Mausgehirn (P5), 20 µg); Negativkontrolle (N) (Gesamtprotein aus PRG-1-Knockout-Maus, 20 µg); murine Prostata (40 µg); DU-145 (1), (2), Gesamtprotein (verschieden) aus DU-145-Zellen (80 µg); rek. PRG-1 (rekombinantes HA-hPRG-1).

dezimiert wird (Gen-Knockdown), blieb eine Variation des Bandenmusters teilweise aus (nicht abgebildet).

Im Vergleich zu den ebenfalls immundetektieren Positivkontrollen auf der Trägermembran, die neben Membranprotein-Lysaten aus Mausgehirn auch rekombinantes HA-hPRG-1 umfassten und der Spezifizierung des PRG-1-Antikörpers dienten, waren die Proteinbanden aus DU-145-Zelllysaten nicht auf identischer Höhe darstellbar. Die beiden signalintensiveren Banden sind über der Referenzbande (etwa 90 kDa) der Positivkontrollen bei etwa 110 kDa bzw. 140 kDa lokalisiert (Abb. 4.15). Auch unter Verwendung einer spezifischen siRNA (pSuper-siRNA-PRG-1-848) in der Transfektion, durch die die PRG-1-Genexpression infolge RNA-Interferenz (RNAi)

#### Immunhistochemische Analyse der PRG-1-Lokalisation in DU-145-Zellen

Bezugnehmend auf den Synergismus von Autotaxin und LPA in Karzinomen der Prostata – hohe ATX-Expressionslevel, erhöhte LPA-Spiegel, aberrante LPA-Rezeptorexpressionsmuster – einerseits und die für PRG-1 im zentralen Nervensystem postulierte Funktion als Neuritenwachstums-assoziiertes und die Signalwege der Phospholipide modulierendes Protein andererseits stellte sich mehr und mehr die Frage nach der Rolle von PRG-1 in dem zugrunde liegenden pathophysiologischen Zusammenspiel.

## 4 Resultate

Durch transgene Überexpression von PRG-1 in der Prostatakarzinomzelllinie DU-145 galt es daher, einen etwaigen Einfluss von PRG-1 auf die Morphologie jener Zellen zu eruieren, um gegebenenfalls Rückschlüsse auf deren Proliferations- und Migrationsverhalten ziehen zu können. Verschiedene zur PRG-1-Überexpression eingesetzte Konstrukte ergaben hierbei ein kongruentes Erscheinungsbild, welches durch perinukleäre und diffus zytosolisch lokalisierte PRG-1-immunpositive Vesikel gekennzeichnet war (Abb. 4.16 B und D). Eine gravierende Änderung in der Gesamtzellzahl sowie in der histomorphologischen Erscheinung (Größe und Form der Zellen, Anzahl der Zellfortsätze, zytoskelettales Arrangement, etc.) konnte in einem Vergleich mit den pEGFP-transfizierten Kontrollen bei insgesamt geringer Transfektionsrate (ca. 30 % bei EGFP, ca. 15 % bei PRG-1) nicht gezeigt werden. Es sei dennoch anzumerken, dass im Gefolge einer transgenen PRG-1-Überexpression vermehrt kleinere, abgerundete Zellen mit Lamellipodia-artigen Plasmaausstülpungen beobachtet werden konnten (Abb. 4.16 B). Funktionelle Analysen erfolgten im Anschluss an die Transfektion mit PRG-1-Konstrukten unter Zugabe von Lysophosphatidsäure als externen Stimulus (10  $\mu$ M LPA, 1 h). Infolgedessen war eine dynamische Umgestaltung und Konzentration PRG-1-immunpositiver Vesikel im Bereich des Leitsaumes (*leading edge*) und sondierender Zellfortsätze (Filopodien) darstellbar (Abb. 4.16 C). Fernerhin wurde das insgesamt ruhig wirkende Zytoskelett weder durch die PRG-1-Überexpression noch durch die zusätzliche LPA-Behandlung wesentlich beeinflusst (Abb. 4.16 A-C), so dass den Prostatakarzinomzellen DU-145 eine enorme Toleranz gegenüber dem bioaktiven Lipid LPA zugesprochen werden kann.

### 4.3.3 LPA-Rezeptoren und LPA-Wirkungen

#### Quantitative Genexpressionsanalyse der LPA-Rezeptoren in DU-145-Zellen

Analog zu den PRGs umfassten die vorbereitenden Maßnahmen einer quantitativen Analyse der Genexpression der LPA-Rezeptoren (LPA-R) in der humanen Prostatakarzinomzelllinie DU-145 notwendige Bestimmungen der PCR-Amplifikationseffizienz der bezogenen TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays (Tab. 4.5). Die korrespondierenden mRNAs der Gene LPA<sub>1-7</sub> ergaben in der *Real-Time* quantitativen PCR ein distinktes Expressionsmuster in der androgenunabhängigen Prostatakarzinomzelllinie DU-145. Während für den LPA<sub>1</sub> und LPA<sub>2</sub> eine verhältnismäßig starke Genexpression (LPA<sub>1</sub> > LPA<sub>2</sub>) ermittelt werden konnte, zeigten der LPA<sub>3</sub> sowie LPA<sub>6</sub> nur eine minimale und die Rezeptoren LPA<sub>4</sub>, LPA<sub>5</sub> und LPA<sub>7</sub> hingegen keine entsprechende Expression des jeweiligen Gens (Abb. 4.14).

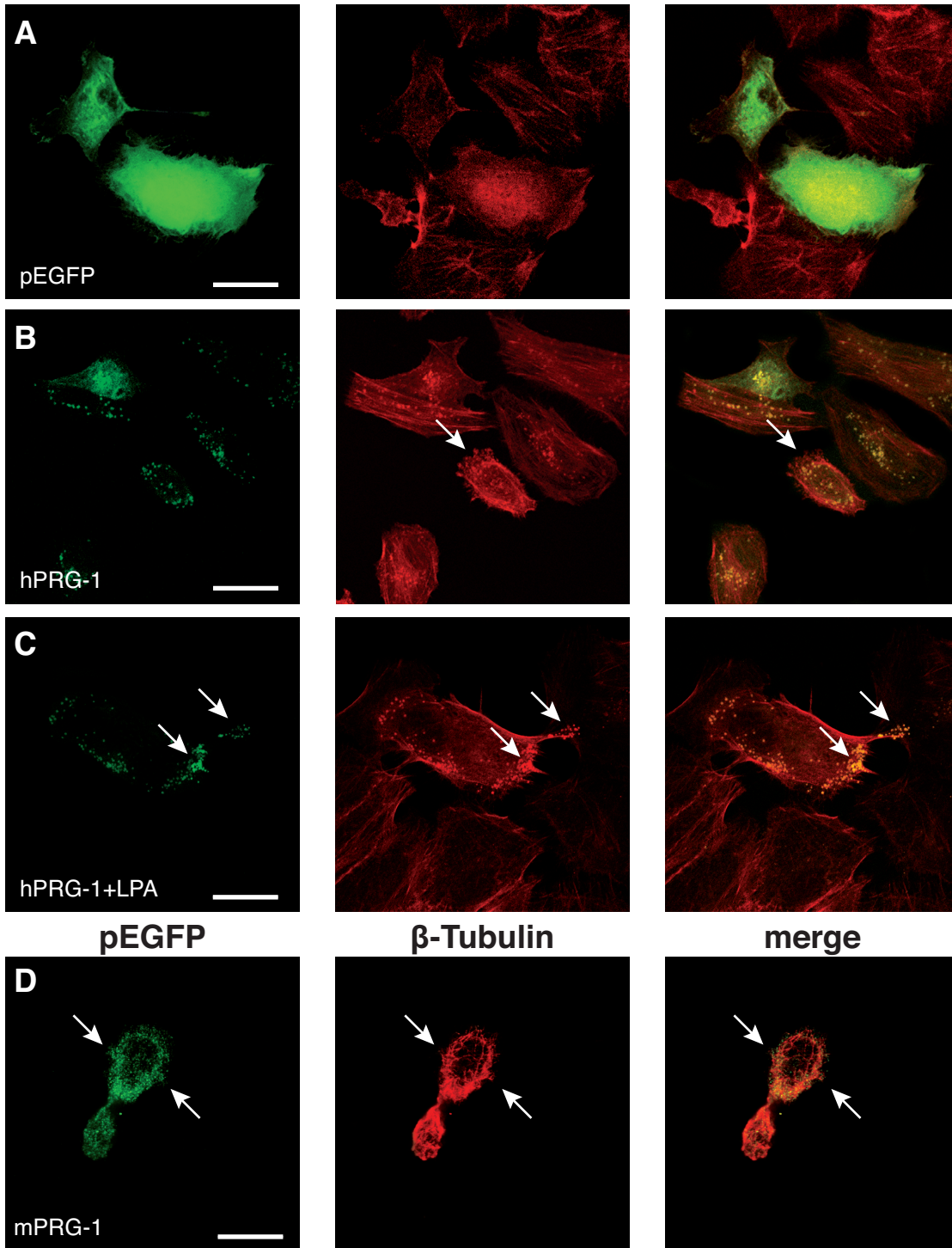
<sup>7</sup>Anstieg der Standardkurve in Form einer Regressionsgeraden (Zykluszahl [ $C_T$ -Wert] vs. eingesetzte cDNA-Menge [ $\log_{10}$  Input cDNA]). Über den Anstieg der jeweiligen Standardkurve konnte die Effizienz (E) dann nach folgender Gleichung ermittelt werden:  $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ .

<sup>8</sup>Bestimmtheitsmaß  $R^2$

<sup>9</sup>Amplifikationseffizienz konnte nicht ermittelt werden.



### 4.3 Expression von PRG-1 im Rahmen der Karzinogenese



**Abbildung 4.16: Immunfluoreszenz-Darstellung von PRG-1 mit Proteinfilament-Markern des Zytoskeletts in DU-145-Zellen.** Kofokalmikroskopische Aufnahmen fixierter Zellen nach Transfektion mit pEGFP als Kontrolle (A, grün), pEGFP-C1-hPRG-1 (B und C, grün) und p3XFLAG-mPRG-1 (D, grün). **B/D** Vesikuläre perinukleäre und diffus zytosolische Lokalisation von PRG-1. Lamellipodia-ähnliche Plasmaausstülpungen in kleineren, abgerundeten Zellen nach transgener Überexpression von PRG-1 (weiße Pfeile). **C** LPA-Behandlung ( $10\ \mu\text{M}$  LPA, 1 h) nach Transfektion mit pEGFP-C1-hPRG-1. Dynamische Umgestaltung PRG-1-immunpositiver Vesikel in Richtung Leitstrahl (*leading edge*) und sondierender Zellfortsätze (weiße Pfeile). Zytoskelettale Proteinfilamente umfassten Aktin (Phalloidin-Färbung, rot) und  $\beta$ -Tubulin (rot). Der Maßstabsbalken bemisst in (A)  $8\ \mu\text{m}$ , in (B)  $10\ \mu\text{m}$ , in (C)  $8\ \mu\text{m}$  und in (D)  $5\ \mu\text{m}$ .

## 4 Resultate

**Tabelle 4.5:** PCR-Amplifikationseffizienz der verwendeten humanen TaqMan<sup>®</sup>-Proben (LPA-R).

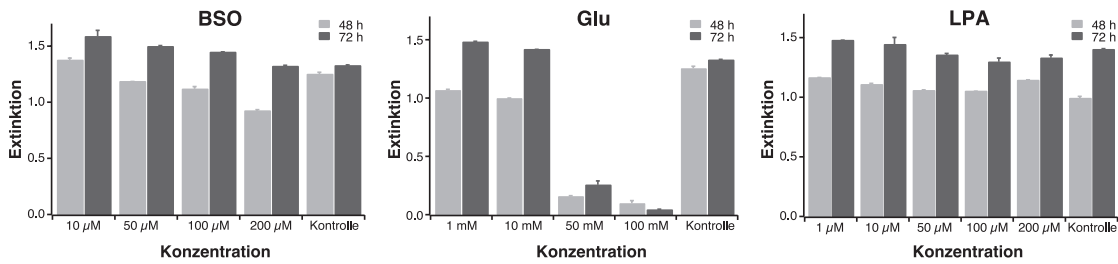
| TaqMan <sup>®</sup> -Probe                 | Anstieg <sup>7</sup><br>( <i>slope</i> ) | Bestimmtheitsmaß <sup>8</sup><br>$R^2$ | Effizienz E [%] |
|--|--|--|-----------------|
| LPA <sub>1</sub> (EDG-2/VZG-1)             | -3,40                                    | 0,9956                                 | 96,8            |
| LPA <sub>2</sub> (EDG-4)                   | -3,32                                    | 0,9989                                 | 100,1           |
| LPA <sub>3</sub> (EDG-7)                   | -3,39                                    | 0,9726                                 | 97,2            |
| LPA <sub>4</sub> (P2Y9/GPR23) <sup>9</sup> | —  | —                                      | —               |
| LPA <sub>5</sub> (GPR92) <sup>9</sup>      | —  | —                                      | —               |
| LPA <sub>6</sub> (GPR87)                   | -3,29                                    | 0,9576                                 | 101,3           |
| LPA <sub>7</sub> (P2Y5) <sup>9</sup>       | —  | —                                      | —               |

### Untersuchungen zur biologischen Viabilität von DU-145-Zellen

Der CellTiter-Blue<sup>®</sup> Cell Viability Assay diente der Verifizierung der Zellviabilität, d. h. des "Gesundheitszustandes" von DU-145-Zellen unter Zellkulturbedingungen nach Zusatz von Lysophosphatidsäure (LPA) sowie der potentiell zytotoxischen Substanzen BSO (Buthioninsulfoximin) und Glutamat (Glutaminsäure) in jeweils aufsteigenden Konzentrationsreihen. Die mehrfach beschriebenen Wirkungen der LPA wie etwa die Stimulation von Proliferation, Migration und Überleben, Invasion und Metastasierung sowie aberrante LPA-Rezeptorexpressionsmuster in verschiedenen Karzinomzelllinien zeigen deren wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Tumorentstehung und -progression [30, 31, 84]. BSO, ein spezifischer Inhibitor der  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein-Synthetase ( $\gamma$ -GCS), blockiert die De-novo-Glutathionbiosynthese und bewirkt sekundär eine Glutathionverarmung der Zellen mit anschließendem Zelltod [18]. Glutamat (Glu), eine nicht essentielle proteinogene  $\alpha$ -Aminosäure, hingegen spielt eine wesentliche Rolle bei Des- und Transaminierungsreaktionen und kann in Abhängigkeit von der Konzentration oxidativ-toxische Wirkungen auf Zellen haben. Jene umfassen beispielsweise die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die Lipidperoxidation und die Beeinflussung des zellulären Redoxstatus [59].

Zur Analyse der Assays nach Zugabe der verschiedenen Testsubstanzen und einer Inkubationsdauer von 48 h beziehungsweise 72 h wurden die Absorptionsmaxima der jeweilig gebildeten Farbkomplexe bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 573$  nm (Resorufin) und bei  $\lambda = 605$  nm (Resazurin) spektralphotometrisch ermittelt. Die Berechnung von arithmetischem Mittel und Standardabweichung wurde mit dem Programm IGOR Pro durchgeführt. Viable, metabolisch aktive Zellen waren *per definitionem* in der Lage, das Reagenz Resazurin (blau) zu reduzieren (Resorufin, pink). Das Maß ( $x$ ) der Viabilität je Konzentration wurde hernach aus der Differenz der gemittelten Extinktionen wie folgt berechnet:  $x = A_{573} - A_{605}$ . Die Resultate wurden schließlich mit den unbehandelten Kontrollen verglichen und graphisch dargestellt (Abb. 4.17). Die Testsubstanzen in

### 4.3 Expression von PRG-1 im Rahmen der Karzinogenese



**Abbildung 4.17: Einfluss von Buthioninsulfoximin, Glutamat und LPA auf die Viabilität von DU-145-Zellen.** Auswertung repräsentativer Versuchsreihen (n=3) im Rahmen der CellTiter-Blue® Cell Viability Assays mit den Agenzien Buthioninsulfoximin (BSO), Glutamat (Glu) und Lysophosphatidsäure (LPA) in aufsteigender Konzentration. Als Kontrollen dienten DU-145-Zellen in entsprechendem Kulturmedium. Für BSO war nach beiden Inkubationsintervallen (48 h, 72 h) eine graduelle Abnahme, für Glutamat eine deutlichere Reduktion (ab 50 mM) der Viabilität der Zellen charakteristisch. Die Diskrepanz von viablen Zellen zwischen der BSO- sowie der Glutamat-Behandlung und den Kontrollen bei der 72 h-Intervallmessung lässt auf eine ursprünglich aberrante Zellzahl beim Ausplattieren schließen. Für das bioaktive Lipid LPA war jedoch nach beiden Inkubationsintervallen eine nicht signifikant veränderte Viabilität der Zellen zu beobachten, obwohl diese einer 200-fach höheren Konzentration im Vergleich zu physiologischen Bedingungen ausgesetzt waren. (T-Balken = KI-95 % mit Ausnahme von 10 µM BSO / 72 h und 10 µM LPA / 72 h.)

den in Frage kommenden Konzentrationen sowie die korrespondierenden Kontrollen wurden in Quadruplikaten je 96-Lochplatte bestimmt, die Versuchsreihen insgesamt viermal durchgeführt.

Die Untersuchungen zur Viabilität von DU-145-Zellen anhand des CellTiter-Blue® Cell Viability Assays ergaben für die Exposition gegenüber den potentiell zytotoxischen Agenzien BSO und Glutamat in der Zusammenschau eine Reduktion der Zellviabilität mit zunehmender Konzentration der verwendeten Testsubstanzen, obgleich das Ausmaß der Reduktion hierbei variierte. Demnach waren die Auswirkungen von Glutamat, insbesondere ab einer Konzentration von 50 mM, deutlich prägnanter im Vergleich zu den durch BSO beobachteten Effekten. Im Gegensatz dazu blieb die Viabilität der DU-145-Zellen unter dem Einfluss aufsteigender LPA-Konzentrationen, die mithin das Zweihundertfache des als physiologisch geltenden Bereichs repräsentierten, über einen Zeitraum von 48 h beziehungsweise 72 h nahezu unverändert. Letzteres veranschaulicht die konsiderable Toleranz der Prostatakarzinomzelllinie DU-145 gegenüber hohen extrazellulären LPA-Spiegeln (Abb. 4.17).

#### Untersuchungen zur Signaltransduktion nach Stimulation von DU-145-Zellen mit LPA

Ausgehend von der Beobachtung, dass DU-145-Zellen extrem hohen externen LPA-Konzentrationen standhalten, galt es nunmehr, erste einführende Methoden zur Untersuchung des *Signaling* nach extrazellulärer LPA-Stimulation zu etablieren. Demnach wurde den Prostatakarzinomzellen zu identischen Zeitpunkten nach der Passage und bei einer vergleichbaren erreichten Konfluenz (etwa 70-80 %) Lysophosphatidsäure (LPA) in einer Endkonzentration von 10 µM dem Medium zugegeben. Die Zellen wurden darauf unverändert unter standardisierten Kulturbedingungen für festgelegte Zeitintervalle (5, 10, 20, 40 min; 1, 3, 5 h) gehalten. Die im Anschluss gefertigten Gesamtprotein-Lysate Lysophosphatidsäure-behandelter als auch unbehandelter DU-145-Zellen (siehe Abschnitt 3.2.1) wurden folglich im Immunoblot unter Verwendung nach-

#### 4 Resultate

stehend genannter Antikörper vergleichend (phosphoryliert versus unphosphoryliert) analysiert: MEK1/2 und p44/42 MAPK (Erk1/2), welche bei Aktivierung und Phosphorylierung Proteinkinase (MAPK)-Kaskaden in Richtung Wachstum und Differenzierung initiieren, wohingegen p38 MAPK bei Aktivierung u. a. zur Apoptose führende Transkriptionsfaktoren phosphoryliert. Unabhängige Versuchsreihen (n=3) hierzu lieferten bislang jedoch keine eindeutigen Resultate hinsichtlich einer etwaigen Phosphorylierung jener Proteinkinasen unter externem LPA-Stimulus (nicht abgebildet).

## 5 Diskussion

---

### PRG-1 - EIN GEHIRNSPEZIFISCHER MODULATOR IM PHOSPHOLIPID-METABOLISMUS?

Bioaktive Lysophospholipide (LPLs), zu denen die wohl am umfassendsten untersuchte Lysophosphatidsäure (LPA) gezählt wird, gelten als essentielle Faktoren für die während der Entwicklung des zentralen (und peripheren) Nervensystems stattfindenden Prozesse, indem eine Vielzahl von Zelltypen (Neurone, Stammzellen, astrogliale und oligodendrogliale Zellen, Mikroglia und Endothelzellen) durch diese maßgeblich beeinflusst werden beziehungsweise selbst zur LPA-Synthese befähigt sind (u. a. postmitotische Neurone, Oligodendrozyten) [39, 71, 72, 105]. Zu den LPA-vermittelten zellulären Reaktionen im Rahmen der Neurogenese zählen die Stimulation der Proliferation, Differenzierung und Migration von Neuroblasten, neuralen Vorläuferzellen sowie frühen kortikalen Neuronen (LPA < 1  $\mu$ M) [39, 71, 72]. Die damit einhergehenden morphologischen Veränderungen umfassen u. a. die Zellabrundung, Membran- und Neuritenretraktionen, das Drehen der Wachstumskegel, Clusterbildung und zytoskelettale Rearrangements [40, 54, 71]. Bemerkenswert ist zudem die Tatsache, dass LPA infolge der Modulation von Ionenleitfähigkeiten Änderungen im Membranpotential (Depolarisation) von embryonalen Neuroblasten hervorruft und konsekutiv die synaptische Neurotransmitterfreisetzung an GABA- resp. Glutamat-Rezeptoren beeinflusst [28]. Im Hinblick auf die bisher bekannten LPA-assoziierten Effekte ergibt sich jedoch ein scheinbar widersprüchliches Bild, denn die LPA führt in vergleichsweise höheren Konzentrationen (1-10  $\mu$ M), wie sie im Rahmen neurotraumatischer beziehungsweise neuropathologischer Befunde im Liquor cerebrospinalis nachgewiesen und für das ZNS bislang angenommen werden, u. a. zur Inhibition der neuronalen Differenzierung, zur Demyelinisierung und neuropathischen Schmerzinitiation oder gar zu Apoptose und Nekrose von Nervenzellen [26, 38, 58, 64]. In Anbetracht dieser Beobachtungen wird deutlich, in welcher divergenter Weise sich das Schicksal neuronaler Zellen bei bereits geringfügigen Änderungen der extrazellulären LPA-Konzentrationen manifestiert und dass die Existenz sensibler Kontrollmechanismen hierbei grundlegend ist. Neben den im Vorfeld (siehe 1.2.2, 1.3.3, 1.3.4) aufgeführten, bereits identifizierten potentiellen Kandidaten, deren strukturell-funktionelle Voraussetzungen eine Partizipation an der Regulation extrazellulärer LPA nahe legen, rückte auch PRG-1 in diesem Zusammenhang zunehmend in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Die mit der Identifizierung der *Plasticity-related Genes (PRGs)* einhergehende Charakterisierung von PRG-1 lieferte entsprechende Hinweise, dass das LPP-verwandte Molekül die LPA-induzierten Signaltransduktionswege zu beeinflussen, zu modifizieren vermag [15, 80, 118, 154].

Die im anfänglichen Teil dieser Arbeit vorgestellten Daten, die einen einfachen systematischen Vergleich zweier muriner Entwicklungsstadien (P5 vs. Adoleszenz) hinsichtlich ihrer PRG-1-immunpositiven, panenzephalen Lokalisationen wiedergeben, sollten hierbei erste Einblicke in möglicherweise weitere Interaktionsbereiche geben. Anhand der zugrunde liegenden Untersuchungen konnten mithin Gebiete des zentralen Nervensystems eruiert werden, die einerseits eine offenbar regulierte PRG-1-Expression im Verlauf der Entwicklung *post partum* aufweisen, wie es exemplarisch Abschnitte des Diencephalon mit den überwiegend spezifischen, rindenabhängigen Kerngruppen des Thalamus dorsalis (Palliothalamus) und Subthalamus sowie Territorien des Hypothalamus oder des Truncus cerebri mit dem medianen Raphekern, dem Nucleus ruber und dem Nucleus nervi trochlearis zeigten. Dabei sei angemerkt, dass einige dieser PRG-1-positiven Areale (z. B. Thalamus dorsalis, Hypothalamus, Stria terminalis, Ncll. raphes) über neuronale Verschaltungen mit der ebenfalls in der postnatalen Adaptation regulierten hippocampalen Formation in Verbindung stehen. Inwieweit jedoch jene Entwicklungen einander bedingen, bleibt zu verifizieren. Andererseits konnten ebensolche Bereiche des ZNS ermittelt werden, deren Expressionsstärken sich während der postpartalen Entwicklung als relativ konstant darstellten, wie für einige neo-, paleo- und archikortikale sowie zerebellare Regionen beziehungsweise Schichten gezeigt (s. Tabelle 4.1). Dies lässt vermuten, dass zu Zeiten des schichtenspezifischen Migrierens von kortikalen Neuronen und Purkinje-Zellen eminent wichtige und teilweise repulsiv wirkende Phospholipide wie beispielsweise die LPA dauerhaft zugegen sind, auf die PRG-1 modulierend Einfluss nimmt [87, 130]. Dafür sprechen auch die Stärken der in eben jenen Rindenabschnitten detektierten PRG-1-Expressionssignale, die mitunter zu den höchsten zählten. In Übereinstimmung mit den bisherigen Kenntnissen zur morphogenetischen Lokalisation von PRG-1 konnte auch im Rahmen der hier dargelegten Untersuchungen eine ausschließlich auf Neurone beschränkte Zuordnung demonstriert werden, wohingegen faserreiche Gebiete (z. B. Fimbria hippocampi, Corpus callosum (Balken), Decussatio pedunculorum cerebellarium superiorum (Wernekinnck)) von einem Fehlen korrespondierender PRG-1-Expressionssignale gekennzeichnet waren. In den Bereichen des Hippocampus und Kleinhirns gelang es überdies, die neuronale Lokalisation von PRG-1 weiterhin zu konkretisieren, indem vereinzelte Dendriten oder auch Dendritenbäume einiger dieser Zellen (z. B. die langen Apikaldendriten der CA1-Pyramidenzellen, die initialen Abschnitte primärer Dendriten bei Purkinje-Zellen) und auch die Membranen der Perikarya (z. B. CA1-Pyramidenzellen, Purkinje-Zellen) immunpositiv dargestellt werden konnten (Tabelle 4.1, Abb. 4.1). Interessanterweise erwiesen sich nicht nur rindenspezifische Neurone wie die Pyramidenzellen der hippocampalen Regionen CA1-3 (Stratum pyramidale), die Körnerzellen des Gyrus dentatus (Stratum granulare) und des Neocortex (Laminae granularis externa et interna) sowie die Purkinje-Zellen des Cerebellum (Stratum ganglionare) als PRG-1-positiv, sondern auch multipolare Nervenzellen eigenständiger und isolierter Kerngruppen, die da unter anderem sind die Ncll. cerebellares, septales et raphes, der Ncl. basalis Meynert, der Ncl. Darkschewitsch und der Bed Nucleus der Stria terminalis. Dadurch dass derartige Kerngebiete, die Ncll. dentatus, fastigii, globosus et emboliformis des Kleinhirns seien beispielhaft genannt, als selbständige Schaltzentren in übergeordneten Re-

## 5.1 PRG-1 - ein gehirnspezifischer Modulator im Phospholipid-Metabolismus?

gelkreisen fungieren (können), begründet sich ferner die Annahme, dass PRG-1 hier (möglicherweise auch über glutamaterge Synapsen) an der Phospholipid-vermittelten Signaltransduktion partizipiert. Dafür spricht im Bereich des Cerebellum, dass (i) in den zugrunde liegenden, fein abgestimmten Neuronenverbindungen zwischen zerebellärem Kortex und den Kleinhirnkernen insbesondere jene Zellen über ein starkes PRG-1-Expressionssignal verfügen, die die an die Kleinhirnkernkerne weitergeleiteten Erregungen beziehungsweise Hemmungen allein kontrollieren: die Purkinje-Zellen (Tab. 4.1). (ii) Zudem stellten sich gerade die Dendritenbäume der Purkinje-Zellen als PRG-1-immunpositiv heraus (Abb. 4.1), die von überwiegend exzitatorischen Synapsen mit Kletterfasern und zwischengeschalteten Körnerzellen (via Moosfasern) gekennzeichnet sind. (iii) Schließlich konnte von Teigler *et al.* anhand funktioneller Untersuchungen gezeigt werden, dass für die über Kletter- und Moosfasern stattfindende Innervation der Purkinje-Zellen rezeptoraktive Phospholipide wie die LPA ausschlaggebend sind und ein Mangel derer zu schwersten Störungen des hiesigen neuronalen Netzwerkes führt [130].

In Bezug auf die positive Immundetektion von PRG-1 in den vornehmlich spezifischen Thalamuskernen (Palliothalamus) (Tabelle 4.1), die, eingebunden in thalamokortikale und kortikothalamische Regelkreise, selektiv Projektionsfelder der Hirnrinde aktivieren (Filterfunktion) und konsekutiv zum Bewusstwerden von Informationen führen, ergibt sich ein weiteres, vielschichtiges und hoch komplexes System, welches eine Beteiligung von PRG-1 vermuten lässt: die morphologischen und physiologischen Mechanismen synaptischer Plastizität. Dies impliziert Veränderungen der synaptischen Transmission in Abhängigkeit des Aktivitätszustandes der jeweiligen Synapsen, wobei entsprechend der gegebenen Dauer von einer Kurzzeit- (Millisekunden bis Minuten) oder Langzeitplastizität (Minuten bis lebenslang) gesprochen wird. Ursächlich für synaptische Plastizität sind dabei präsynaptische und postsynaptische Prozesse gleichermaßen. (i) Das Vorhandensein bioaktiver LPA im synaptischen Spalt stellt einen solchen Modulator dar, der die synaptische Transmission beispielsweise an GABA- und Glutamat-Rezeptoren über Membranpotentialänderungen zu beeinflussen, zu verstärken vermag [28]. (ii) Unabhängige Untersuchungen der Vergangenheit haben fernerhin zeigen können, dass Glutamat der bedeutendste (exzitatorische) Neurotransmitter thalamokortikaler und thalamozingulärer Projektionssysteme ist [34, 44, 47, 117]. (iii) Die Tatsache, dass PRG-1 in der postsynaptischen Endigung glutamaterger interneuronaler Kontaktstellen (im Hippocampus) nachgewiesen werden konnte und über das Potential verfügt, auf die im synaptischen Spalt vorkommende rezeptoraktive LPA regulierend Einfluss zu nehmen, lässt mutmaßen, dass PRG-1 vergleichbare Effekte in den thalamokortikalen und thalamozingulären Neuronenschaltungen hervorruft und somit möglicherweise in der Potenzierung und / oder Depression synaptischer Transmissionen involviert ist [136]. (iv) Bedeutung erlangt diese Annahme vor dem Hintergrund der Schmerzentstehung und -prozessierung. Bekannt ist bislang, dass alle Ebenen der Schmerzverarbeitung im zentralen Nervensystem über Mechanismen der Kurzzeitplastizität (*STPs, short-term plasticities*) erfolgen und dass diese zeitweiligen Änderungen der synaptischen Übertragungsstärke, insbesondere thalamozingulärer Projektionen, als Vorstufen akuter und chronischer Schmerzzustände angesehen wer-

den [117]. Darüber hinaus zeigten umfassende Studien, dass auch die von der LPA induzierten Signaltransduktionswege maßgeblich an der Initiation von (neuropathischen) Schmerzen, vermutlich über die vermittelte Freisetzung von Zytokinen und Entzündungsmediatoren, beteiligt sind [64]. Ob und inwieweit PRG-1 eine potentielle Rolle in der bewussten Schmerzwahrnehmung, in der Schmerzfortleitung beziehungsweise in der Entstehung eines Schmerzgedächtnisses (via limbisches System) spielen könnte, bleibt vorerst unklar.

Gleichwohl bedarf es zukünftig weiterer ausführlicher Untersuchungen in den hier erstmals aufgezeigten PRG-1-immunpositiven Bereichen des zentralen Nervensystems, um ein umfassendes Verständnis über die jeweils zugrunde liegenden molekularen und funktionellen Mechanismen zu erlangen, an denen das LPA-modifizierende Protein PRG-1 in jenen Regionen beteiligt ist.

---

### ATX/LYSOPLD - ZEREBRALE DISTRIBUTION UND REGULATION

Wie bereits zu Beginn dieser Arbeit angeführt (siehe 1.3.3, 1.3.4), stellt die räumliche und zeitliche Regulation des bioaktiven Signalmoleküls LPA einen überaus sensiblen und komplizierten Prozess dar. Dies hat zur Folge, dass sich Veränderungen der physiologischen LPA-Homöostase gravierend auf zellulärer Ebene auswirken [54, 108, 120, 133]. In der Annahme, dass es einerseits nach einem Neurotrauma, und hierbei speziell der entorhinalen Kortexläsion (ECL), zu einem signifikanten Anstieg extrazellulärer Lysophosphatidsäure kommt [41, 126, 139], und den derzeit limitierten beziehungsweise in der Etablierung befindlichen technischen Möglichkeiten einer lokalen LPA-Messung im Gewebe andererseits, lag der Impetus für eine eingehende Lokalisierungsstudie des primären LPA-generierenden Proteins und Enzyms Autotaxin (ATX). Erstmals in humanen Melanomzellen als autokriner, die Motilität von Tumorzellen stimulierender Faktor entdeckt, erwies sich Autotaxin in der Folgezeit als ein entscheidender Promotor in der Initiation und Progression maligner Tumoren (siehe Tab. 1.1) [8, 73, 86, 95, 96, 99, 125, 126, 148]. Verhältnismäßig wenig ist dagegen zu den Lokalisationen und Funktionen von Autotaxin im zentralen Nervensystem bekannt. Als ATX-exprimierende Zellen im adulten ZNS galten bislang die sekretorischen Epithelzellen des Plexus choroideus, der Iris, des Ziliarkörpers und der Retina sowie oligodendrogliale, leptomeningeale und an der Vaskularisation beteiligte Zellen [41, 56, 110]. Aufgrund des zeitlich regulierten Verlaufes und der auffällig starken ATX-Expression insbesondere in den von Substantia alba gekennzeichneten Bereichen wurde angenommen, dass Autotaxin an der späten oligodendroglialen Differenzierung und / oder an den von Oligodendrozyten vermittelten aktiven Myelinisierungsprozessen beteiligt ist [41].

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Resultate, die eine erste systematische In-vivo-Analyse der Genexpression und zellulären Distribution von Autotaxin in dem sich entwickelnden Gehirn der Ratte wiedergeben, basierten zunächst auf dem Verfahren der radioaktiven In-situ-Hybridisierung. Unter Verwendung entsprechender Sonden gelang es, in den Embryonalstadien E17 bis E21 eine ATX-mRNA-Expression in



## 5.2 ATX/LysoPLD - zerebrale Distribution und Regulation

der subventrikulären Zone (SVZ) der inneren Liquorräume, im zerebellären Neuroepithelium des IV. Ventrikels sowie in Abschnitten der Substantia alba wie beispielsweise dem Corpus callosum nachzuweisen (Abb. 4.2, Abb. 4.3). *Post partum* bis hinein in das Stadium der Adoleszenz waren die Hybridisierungssignale im Bereich der SVZ rückläufig verglichen mit den pränatalen Stadien. Konstant starke Signalintensitäten konnten hingegen in den Gebieten weißer Substanz, die da u. a. sind das Corpus callosum, die Fimbria fornicis, die Commissura anterior, die Capsula interna und das Marklager des Cerebellum, ermittelt werden (Abb. 4.2, Abb. 4.3). Mit dem Nachweis von Autotaxin in eben jenen Abschnitten der Substantia alba, die mitunter durch das reiche Vorkommen von Myelin-bildender Oligodendroglia charakterisiert sind, werden eine Reihe weiterer, unabhängig erhobener Befunde hinsichtlich der Lokalisation bestätigt und ergänzt [35, 41]. Entgegen der Annahme von Fuss *et al.* jedoch, dass das zeitliche Aufkommen von Autotaxin mit dem Beginn aktiver Myelinisierungsprozesse koinzidiert, zeigen die hier vorgestellten Daten ein früheres Erscheinen der ATX-mRNA auf [41]. Hiernach wäre dem Autotaxin eine Rolle in den die Oligodendrozytendifferenzierung betreffenden beziehungsweise den der Myelinisation vorangehenden Phasen zuzusprechen, wie es auch immunhistochemische Analysen unter Verwendung differenzierender Oligodendrozyten-Marker unterstrichen. Dabei konnten ATX-immunpositive Zellen mit den Markern (i) A2B5, (ii) NG2 und (iii) O4, welche spezifisch gliale Progenitorzellen (i), frühe (ii) und späte (iii) Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPCs) sowie prä-myelinisierende Oligodendrozyten (OLs) (iii) aufzeigen, kolokalisierend dargestellt werden (Abb. 4.5, Abb. 4.6 A und B, Tab. 4.2). Der simultane Nachweis von ATX und dem reife, myelinisierende OLs markierenden CC-1 war hingegen nicht gegeben (Abb. 4.6 C) [113]. Diese Ergebnisse werden fernerhin durch zahlreiche Untersuchungen zur Rezeptor-vermittelten LPA-Signaltransduktion im Rahmen des Myelinisationsgeschehen bekräftigt. So wurde für den im ZNS prädominierenden, mit zellulärer Proliferation und Motilität assoziierten LPA<sub>1</sub>-Rezeptor (syn. VZG-1, EDG-2, mrec1.3) eine der ATX-Expression vergleichbare Regulation im Verlaufe der Hirnentwicklung postuliert und eine Beteiligung an Prozessen aktiver Myelinisierung wird als wahrscheinlich erachtet. Während LPA<sub>1</sub> in den Embryonalstadien weitestgehend auf die neokortikale neurogene Region, die ventrikuläre Zone, beschränkt blieb, zeichnete sich in den peri- und postnatalen Stadien eine zunehmende Expression in Regionen weißer Substanz ab [143]. Zudem konnte für Vertebraten gezeigt werden, dass auch OPCs/OLs den LPA<sub>1</sub> (und LPA<sub>2</sub>; LPA<sub>1</sub> > LPA<sub>2</sub>) in starker Ausprägung synthetisieren [20, 57, 65, 143]. Dennoch bleibt bislang unklar, ob es sich bei den von Oligodendrozyten gesteuerten Myelinisationsabläufen um eine genuine ATX-LPA-Achse handelt oder ob das multifunktionale, multimodale Protein Autotaxin über einen LPA-unabhängigen, noch unbekanntem Mechanismus, möglicherweise über die C-terminal gelegene MORFO (*Modulator of Oligodendrocyte Remodeling and Focal adhesion Organization*)-EF-Domäne vermittelt, an den genannten Prozessen partizipiert [24, 151]. Neben den identifizierten, die Substantia alba betreffenden Regionen zeichnete sich weiterhin sowohl in der embryonalen als auch in der postnatalen Entwicklung das Epithel des Plexus choroideus durch eine entsprechende ATX-mRNA-Expression (Abb. 4.2, Abb. 4.3) sowie eine positive Immundetektion aus, wobei auch dieses Ergebnis im Ein-

klang mit anderen wissenschaftlichen Arbeiten steht und eine funktionelle Beteiligung von Autotaxin an der Blut-Liquor-Schranke vermuten lässt [7, 41, 113].

Mit Rückblick auf die initiale Fragestellung ist zunächst festzuhalten, dass trotz zahlreicher Untersuchungen, die die Brisanz der durch LPA vermittelten neuralen (siehe 5.1) und glialen Wirkungen nahe legen, insgesamt nur wenig über die Rolle der Lyso-phosphatidsäure im zentralen Nervensystem bekannt ist. Dabei scheinen das Ausmaß einer Schädigung beziehungsweise die Fähigkeit zur Regeneration wesentlich von der LPA beeinflusst. So gehen unabhängige Untersuchungen davon aus, dass nach einem Neurotrauma, verbunden mit Störungen der Blut-Hirn-Schranke, ein signifikanter Anstieg der LPA-Konzentrationen (bis zu  $10 \mu\text{M}$ ) im ZNS zu erwarten und dieser ursächlich für die ausgelösten Demyelinisierungsprozesse sowie die Entstehung neuropathischer Schmerzen ist [1, 29, 38, 39, 64, 105]. Interessanterweise konnte in funktionellen Studien, in denen LPA unmittelbar in Mauskortizes appliziert wurde, ein weiteres LPA-vermitteltes Phänomen beobachtet werden: die Astrozytenreaktivität [105, 115]. Demnach stimuliert die LPA in höheren Konzentrationen die astrogliale Genese und Proliferation, die u. a. mit der Entstehung einer Glianarbe (im Sinne der *Waller-Degeneration*) und der Attraktion von Zellen des Immunsystems sowie neuralen Stamm- resp. Progenitorzellen einhergehen, während endogene, neurale Differenzierungs- und Regenerationsmechanismen inhibiert werden [26, 144]. Nichtsdestominder sprechen die im Verlaufe dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse für einen Synergismus zwischen ATX und der LPA unter eben jenen pathophysiologischen Bedingungen wie dem Neurotrauma, denn auch für Autotaxin konnte hierbei in einem etablierten, tierexperimentellen Modell, der stereotaktischen entorhinalen Kortexläsion (ECL), eine signifikante Hochregulation der mRNA- und Proteinexpression im Läsionsbereich festgestellt werden (Abb. 4.4, Abb. 4.7, Abb. 4.8, Abb. 4.10). Zudem konnte anhand immunhisto- und proteinbiochemischer Verfahren in der Zirkumferenz der Verletzung ein weiterer Zelltyp identifiziert werden, der spezifisch und in hohem Maße *de novo* Autotaxin exprimiert: die reaktiven Astrozyten (Abb. 4.7, Abb. 4.9) [113]. Dabei gelten diese teils hypertrophen, teils hyperplastischen astroglialen Zellen als sehr frühe und sensible Erkennungsmarker neuropathologischer Zustände. Nennenswert sei an dieser Stelle, dass im Rahmen von Untersuchungen zum hochmalignen, invasiven Glioblastoma multiforme (GBM), welches u. a. durch Nervenzellnekrosen, Hypoxiezustände und eine stattfindende Neoangiogenese gekennzeichnet ist, neben erhöhten LPA-Konzentrationen, aberranten LPA-Rezeptorexpressionen beispielsweise auch reaktive, ATX-immunpositive Astrozyten nachgewiesen werden konnten [56, 57]. Während Astrozyten unter physiologischen Bedingungen zwar den  $\text{LPA}_1$  und  $\text{LPA}_2$  ( $\text{LPA}_1 > \text{LPA}_2$ ), nicht jedoch ATX exprimieren, sind reaktive Astrozyten eigens zur LPA-Synthese befähigt, woraus erhöhte LPA-Spiegel im umliegenden Gewebe zu erklären wären. Inwieweit reaktive Astrozyten ein dabei verändertes LPA-Rezeptorprofil aufweisen, ist derzeit ungeklärt. Zu beachten ist fernerhin, dass ATX-exprimierende reaktive Astrozyten infolge ihrer intrinsischen katalytischen Aktivität durch die generierte LPA selbst wiederum, d. h. im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus, über LPA-Rezeptoren aktiviert werden könnten. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang außerdem der von Hoelzinger *et al.* beschriebene Befund, dass auch mikrogliale Zellen unter physiologischen Be-

dingungen sowohl durch eine mit den OPCs vergleichbare ATX-mRNA-Synthese als auch durch die Expression der LPA<sub>1</sub> und LPA<sub>2</sub> (LPA<sub>2</sub> > LPA<sub>1</sub>) gekennzeichnet sind [57]. Die Tatsache, dass unter neuropathologischen Umständen (beispielsweise Blut-Hirn-Schrankenstörung, Neurotrauma, MS, GBM) auch reaktive Mikrogliazellen zu beobachten sind, die im Zuge einer aktiven Immunabwehr u. a. gesonderte, die Proliferation von Astrozyten fördernde Zytokine (wie Interleukin-1, Interferon- $\gamma$ , Tumornekrose-Faktor- $\alpha$ ) in den EZR abgeben, legt nahe, dass mikrogliale Zellen über eine ATX/LPA/LPA-Rezeptor-Interaktion reaktive Astrozyten zusätzlich in ihrer Reaktion auf ein neuropathologisches Ereignis zu beeinflussen vermögen. Ob und inwiefern auch Mikrogliazellen zur LPA-Synthese befähigt sind und durch diese möglicherweise in einem autoregulativen Mechanismus zu einer Reaktivierung gelangen, bleibt gegenwärtig zu eruieren.

Schließlich erhalten die hier vorgestellten Resultate Fürspruch durch parallele Forschungsanstrengungen zum Sphingosin-1-phosphat (S1P), einem neben der Lysophosphatidsäure weiteren Konvertierungsprodukt der LysoPLD. Diese ergaben für S1P analog eine signifikante Hochregulation im Anschluss an neurogene Verletzungen des Gehirns (unter Einbezug der Blut-Hirn-Schranke) und des Rückenmarks. Im Gegensatz zur LPA jedoch, welche in höherer Konzentration inhibierend auf neurale Proliferations- und Differenzierungsprozesse wirkt, trägt S1P nach einem Neurotrauma in entscheidendem Maße der Chemoattraktion und Migration neuraler Stamm- resp. Progenitorzellen hin zum Schädigungsort bei [70, 69, 105].

Die erhebliche Divergenz induzierter Effekte rechtfertigt mithin das Fazit, dass ATX neben den entwicklungsbiologischen Funktionen im ZNS als ein relevanter Modulator regenerativer Prozesse anzusehen ist. Die simultane Induktion scheinbar konträrer Wirkungsweisen (Astrogliose versus neuronale Regeneration) dient somit möglicherweise der Aufrechterhaltung eines grundlegenden Gleichgewichtes. Letztlich bedarf es weiterer intensiver Forschungsanstrengungen, um die Rolle(n) von Autotaxin im zentralen Nervensystem konkretisieren und potentiell neue Angriffstellen für die frühzeitige Diagnose und Therapie von Erkrankungen wie der MS oder dem GBM identifizieren zu können.

---

### PRG-1 & LPA/LPA-R IM HUMANEN PROSTATAKARZINOM - EIN PARADIGMA

Während das wissenschaftliche Interesse um das bioaktive Lipid und Signalmolekül LPA in den letzten Jahren stetig anwuchs und zunehmend mehr biologische Funktionen seither aufgezeigt wurden, so begründen doch zahlreiche Untersuchungen den Verdacht, dass die Lysophosphatidsäure ein potentieller Aktivator von Tumorzellen und an Prozessen wie der Initiation sowie Progression maligner Tumoren beteiligt ist (siehe Tab.1.2) [86]. So ist bekannt, dass die LPA eine Vielzahl von Tumorzelllinien und Tumorzellen verschiedenster Entitäten (z. B. Ovarial-Ca, Mamma-Ca, Prostata-Ca, Glioblastom) in ihrem Migrationsverhalten vergleichsweise negativ beeinflusst und infolgedessen zur Tumorzellinvasion beziehungsweise Metastasierung *in vivo* beiträgt [11, 31, 62, 68, 73, 85, 86]. Ursächlich hierfür werden u. a. aberrante Expressionen der

LPA-Rezeptoren angenommen, wie es insbesondere für die LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub> und LPA<sub>3</sub> mehrfach gezeigt wurde [12, 42, 50, 79, 147, 150, 153]. Der wohl fundamentalste Beleg für einen Kausalzusammenhang zwischen der LPA und Neoplasien besteht jedoch in der Identifizierung von Autotaxin, dem LPA-generierenden Enzym, als pro-metastatischen Faktor [8, 57, 79, 82, 95, 96, 99, 125, 139]. Dementsprechend wurde eine ATX-Überexpression in zahlreichen Tumorzellen und -zelllinien vorgefunden, welche zeitgleich durch ein invasives, aggressives Wachstumsverhalten und eine Tendenz zur Neoangiogenese gekennzeichnet waren [56, 57, 73, 79, 95, 96, 148, 153]. Zukunftsweisende Untersuchungen hinsichtlich einer zugrunde liegenden ATX/LPA/LPA-Rezeptor-Achse betreffen eigens die von weiblichen und männlichen Geschlechtsorganen anzeustralen Tumoren und Tumorzelllinien. Die Tatsache, dass beim Ovarialkarzinom und anderen gynäkologischen Tumoren signifikant erhöhte extrazelluläre LPA-Level nachzuweisen sind, führte dazu, die Lysophosphatidsäure hier bereits als potentiellen Biomarker zu diskutieren [30, 85, 94, 146]. Auch für Prostata-assoziierte Tumorzellen wurden mehrfach eine Hochregulation und veränderte Expression der LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub> und LPA<sub>3</sub>, erhöhte LPA-Konzentrationen im Seminalplasma sowie eine Hochregulation der LPA-synthetisierenden Enzyme (ATX/LysoPLD, Acylglycerin-Kinase/AGK, mPA-PLA<sub>1</sub>) berichtet, während die Prostata-spezifische saure Phosphatase (PAP), ein wesentliches LPA-degradierendes Enzym, in reduziertem Maße exprimiert wird [42, 49, 78, 99, 153]. Die hieraus resultierende Imbalance der LPA-Synthese und im LPA-Metabolismus innerhalb des lokalen Mikromilieus könnte so zu einer Störung der LPA-Regulationsmechanismen beitragen, welche in der Folge die Entstehung von Neoplasien in der Prostata fördern.

Im Hinblick auf die LPA-degradierenden Enzyme war neben der PAP bislang nur eine weitere Proteinklasse bekannt, welche den LPA-vermittelten extrazellulären Wirkungen u. a. auch in der Prostata entgegen stehen: die Lipidphosphatphosphatasen (LPPs) [17, 128]. Zur Gruppe der Letztgenannten fügten sich in jüngster Vergangenheit die PRGs, eine ZNS-spezifische Klasse integraler Membranproteine, die LPA-induzierte Signaltransduktionswege modulieren und zudem starke Homologien zu den bisher bekannten LPPs aufweisen [15, 136]. Bemerkenswert waren daher Untersuchungen im Vorfeld (in Kooperation mit dem Institut für Pathologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) zur Gen- und Proteinexpression von PRG-1 in unterschiedlichen Primärtumoren, anhand derer PRG-1 in 13 von 68 getesteten Tumorentitäten *de novo* nachgewiesen werden konnte (unveröffentlichte Daten). Fernerhin wurde in 75 von 112 Exzidaten gesicherter Prostataadenokarzinome eine signifikante PRG-1-Expression immunhistochemisch ermittelt (Abb. 4.11), wobei Tumoren mit PRG-1-Überexpression im verhältnismäßig frühen TNM-Stadium pT2 mit einem signifikant kürzeren krankheitsfreien Intervall korrelierten (unveröffentlichte Daten). Die positive PRG-1-Immundetektion war hierbei auf den sekretorischen Anteil der tubuloalveolären Drüsen der Prostata beschränkt, während das Stroma durch das Ausbleiben eines entsprechenden Signals gekennzeichnet war. Vergleichbare Analysen haben gezeigt, dass auch LPA-relationale Moleküle wie die LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub> und LPA<sub>3</sub>, ATX und die AGK sowie die PAP hinsichtlich der epithelialen und Stromaverteilung ein divergentes Expressionsprofil aufweisen. Demnach waren die LPA<sub>2</sub> und LPA<sub>3</sub> (LPA<sub>3</sub> > LPA<sub>2</sub>) ebenso wie die LPA-generierenden

### 5.3 PRG-1 & LPA/LPA-R im humanen Prostatakarzinom - ein Paradigma

respektive -degradierenden Enzyme AGK und PAP überwiegend im Drüsenepithel, der LPA<sub>1</sub> und ATX dagegen vornehmlich im fibromuskulären Stroma lokalisierbar [153]. Möglicherweise ist die differentielle Distribution der LPA-Rezeptorsubtypen zwischen Epithel und Stroma ein elementarer Faktor für den Rezeptor-«Cross-Talk» bei der Tumorentstehung und das Tumorwachstum in der Prostata, wie es tierexperimentelle Modelle nahelegen [119, 137, 152]. Untersuchungen auf RNA- und Proteinebene haben ferner ergeben, dass insbesondere der LPA<sub>3</sub>, welcher auch unter physiologischen Bedingungen am stärksten in der Prostata exprimiert wird, im Drüsenepithel der Karzinome signifikant erhöht ist und – ebenso wie PRG-1 – weitestgehend in den sekretorischen Hauptzellen vorzufinden ist [63, 153]. Die Lokalisation von LPA<sub>3</sub> in der apikalen und dem Seminalplasma zugewandten Membran dieser Zellen gilt dabei als essentiell für eine physiologische, hormonell gesteuerte Organentwicklung [51]. Aufgrund der massiven Hochregulation jenes Rezeptors insbesondere in den präkanzerösen und frühen Stadien der Tumorgenese wird für den LPA<sub>3</sub> infolge Stimulation der Viabilität eine potentielle Rolle in der Initiation dieser Prozesse angenommen [107, 153]. Welche Funktion(en) PRG-1 im sekretorischen Epithel der normalen beziehungsweise tumorveränderten Prostata zuzusprechen wäre(n), ist bislang ungeklärt. Es ist aber zu vermuten, dass PRG-1 in Abhängigkeit der hormonellen Regulation durch Testosteron und dem damit verbundenen Aktivierungszustand dieser Zellen agiert, da die Hauptzellen nicht einheitlich für PRG-1 immunpositiv waren und für das strukturverwandte Protein LPP-1 bereits eine Androgenabhängigkeit nachgewiesen werden konnte [138]. Zudem war die PRG-1-Überexpression insbesondere in dem frühen, hormonsensitiven Stadium pT2 (TNM-Klassifikation, 6. Auflage) mit einem höheren Rezidivrisiko verbunden, was ebenfalls für eine Beteiligung an Androgen-abhängigen zellulären Veränderungen spricht (unveröffentlichte Daten). Inwieweit die Überexpression von PRG-1 möglicherweise einen in Karzinomen der Prostata (und der Ovarien) beobachteten und mit der Reduktion der LPA-degradierenden Enzyme (PAP, LPP-1) verbundenen Funktionsverlust zu kompensieren vermag oder, entgegen dem, einem aggressiveren Verhalten der Tumorzellen beisteuert, bleibt weiter zu untersuchen [30, 78, 85, 129, 146, 153].

Die Existenz verschiedener LPA-Rezeptorsubtypen und deren variierende Verteilungen in Zellen beziehungsweise Geweben sowie die Vielfalt LPA-vermittelter zellulärer Wirkungen lassen erkennen, dass jeder LPA-Rezeptorsubtyp offenbar spezifische zellbiologische Funktionen erfüllt. Bezogen auf die modellhafte Prostatakarzinomzelllinie DU-145, die ein spätes, invasives Stadium des humanen Prostataadenokarzinoms repräsentiert und die bekanntlich die Rezeptoren LPA<sub>1</sub> und LPA<sub>2</sub>, nicht hingegen den LPA<sub>3</sub> exprimiert, bedeutet dies eine LPA<sub>1</sub>-vermittelte Induktion mitogener Signalkaskaden, wobei der Wechsel von dem in früheren Tumorstadien prädominierenden LPA<sub>3</sub> (bzw. epithelialen Phänotyp) zum hier vorherrschenden LPA<sub>1</sub> (und LPA<sub>2</sub>) (bzw. mesenchymalen Phänotyp) mit der Desensibilisierung gegenüber Androgenen und dem Fortschreiten der Tumorerkrankung assoziiert wird [49, 48, 153]. Auch die hier vorgestellten Resultate weisen jene Verteilung der LPA-Rezeptorsubtypen LPA<sub>1-3</sub> in DU-145-Zellen auf und bestätigen somit frühere Arbeiten (Abb. 4.14) [49, 63, 153]. Zudem wurden die Genexpressionsprofile der weiteren, bisher bekannten LPA-Rezeptorsubtypen LPA<sub>4-7</sub> untersucht, wobei die Rezeptoren LPA<sub>4</sub>, LPA<sub>5</sub> und LPA<sub>7</sub> in DU-145-Zellen nicht expri-

miert werden, was in einer vergleichbaren Zelllinie (PC-3) partielle Bestätigung findet und eine untergeordnete Rolle in der Tumorprogression bei der Prostata vermuten lässt (Abb. 4.14) [140]. Hingegen konnte für den LPA<sub>6</sub>, welcher auch unter physiologischen Bedingungen u. a. in der Prostata darstellbar ist, eine, wenngleich geringe, Genexpression nachgewiesen werden (Abb. 4.14) [127]. Aufgrund des weiteren Vorkommens in Organen beziehungsweise Geweben wie dem Ovar oder der Plazenta wird auch für den LPA<sub>6</sub>, neben anderen LPA-Rezeptorsubtypen, eine potentielle Rolle in der biologischen Organentwicklung sowie in der Progression von Ovarial-Karzinomen angenommen [127]. Welche Funktionen der LPA<sub>6</sub> in der normalen und pathologisch veränderten Prostata wahrnimmt, ist noch unklar.

In dieser Arbeit wurde die Prostatakarzinomzelllinie DU-145 ferner auf eine etwaige Genexpression der PRGs (PRG-1-5) und des ATX hin analysiert. Im Ergebnis konnte für PRG-1, PRG-2 und PRG-4 eine korrespondierende mRNA ermittelt werden, wohingegen für PRG-3 und PRG-5 der Nachweis einer entsprechenden Genexpression ausblieb (Abb. 4.14). Obgleich die biologischen Funktionen von PRG-2 und PRG-4 bislang ungeklärt sind, so ist zu erwägen, dass auch jene beiden Mitglieder der PRG-Familie, neben PRG-1, in der Onkogenese Einfluss nehmen könnten. Schließlich wurde auch für Autotaxin eine mit Vorarbeiten übereinstimmende Genexpression in der Karzinomzelllinie DU-145 festgestellt (Abb. 4.14) [99, 153]. Immunhistochemische Untersuchungen ergaben darüber hinaus ein vesikuläres, auf den Intrazellularraum beschränktes Verteilungsmuster dieses autokrinen Motilitätsfaktors (nicht abgebildet). Die Tatsache, dass DU-145-Zellen in Gegenwart von LPA die zelluläre LPA-Produktion steigern, lässt hierbei auf das Vorliegen eines positiven Feedback-Mechanismus (LPA → ATX → LPA) schließen [42]. Wie bereits zu Beginn erwähnt, sind hohe extrazelluläre LPA-Konzentrationen unter physiologischen Bedingungen für eine Vielzahl von Zellen mit gravierenden Folgen verbunden (z. B. Nekrose, Apoptose). Einige Untersuchungen der Vergangenheit haben jedoch gezeigt, dass Karzinome unterschiedlichster Entitäten mit erhöhten LPA-Spiegeln im EZR einhergehen und in Gegenwart der mitogenen LPA proliferieren, was annehmen lässt, dass diese Tumorzellen über gesonderte Adaptationsmechanismen verfügen. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Zytotoxizitätsassays ergaben für die DU-145-Zellen eine bemerkenswerte Toleranz gegenüber der Lysophosphatidsäure. Selbst nach 72-stündiger Inkubation einer 200-fach über dem physiologischen Niveau liegenden (extrazellulären) LPA-Konzentration war eine mit den Kontrollen vergleichbare vitale Zellzahl zu beobachten. Die Exposition gegenüber den potentiell zytotoxisch wirkenden Agenzien BSO und Glutamat führte dagegen zu einer signifikanten Zellzahlreduktion (Abb. 4.17).

Die transgene Überexpression von PRG-1 in DU-145-Zellen zeigte ein vesikuläres, perinukleär und diffus zytoplasmisch betontes Verteilungsmuster (Abb. 4.16 B und D). Gleichwohl diese Transfektion keine gravierenden Auswirkungen auf die Morphologie jener Zellen hatte, so ließen sich doch, im Gegensatz zu den Kontrollen, häufiger auch kleinere, abgerundete Zellen mit Lamellipodia-artigen Plasmaausstülpungen darstellen (Abb. 4.16 B). Interessanterweise wurden die PRG-1-positiven Vesikel nach externer Stimulation mit LPA in den Bereich des Leitsaumes (*leading edge*) und sondierender Zellfortsätze (Filopodien) transloziert (Abb. 4.16 C). DU-145-Zellen proliferieren und

migrieren in Gegenwart von LPA und bilden indes gegebenenfalls, wie für die vergleichbare Zelllinie PC-3 konstatiert, Lamellipodia aus [53, 62]. Es wäre daher denkbar, dass PRG-1 – analog zu den Funktionen im zentralen Nervensystem – an der Formation und dem Auswachsen dieser Lamelli- und Filopodien beteiligt ist und damit der Motilität beziehungsweise dem aggressiven Wachstumsverhalten der Prostatakarzinomzellen DU-145 beisteuert, indem es jene für Migration und Invasion notwendigen Prozesse unterstützt.

Um anhand der in dieser Arbeit gezogenen Schlussfolgerungen zukünftig einen therapeutischen Nutzen ableiten zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen sowohl zur Lysophosphatidsäure und zu den LPA-Rezeptoren als auch zum Autotaxin, zu den PRGs und PRG-1 im Besonderen. Dessen ungeachtet stellen die Mechanismen der LPA-Generierung und -Degradierung sowie der Aktivierung / Inhibierung der korrespondierenden LPA-Rezeptoren potentiell neue Angriffsstellen für die frühzeitige Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen dar, worauf neben den vorgestellten Daten weitere erfolgversprechende Untersuchungen hinweisen [8, 91, 93].





# Appendix

## LÖSUNGEN UND PUFFER

Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer. Auf ebensolche, die ausschließlich mit dH<sub>2</sub>O resp. ddH<sub>2</sub>O hergestellt wurden, sei hier verzichtet.

| Bezeichnung                   | Inhalt   |
|-------------------------------|--|
| Ammoniumchlorid, 50 mM        | 2,6745 g NH <sub>4</sub> Cl ad 1 l 0,1 M PB  |
| BPB, 10×                      | 0,25 g BPB, 50 g Sucrose ad 100 ml 1x TBE-Puffer   |
| Complete <sup>®</sup> -Lösung | 1 Tbl. Complete <sup>®</sup> Proteasen-Inhibitoren-Cocktail ad 5 ml dH <sub>2</sub> O  |
| Denhardt-Lösung, 250×         | 50 g Ficoll, 50 g Polyvinylpyrrolidon, 50 g BSA ad 100 ml dH <sub>2</sub> O  |
| DNA-Laufpuffer, 10×           | 50 g Sucrose, 0,25 g BPB ad 100 ml 1x TBE-Puffer   |
| DTT, 1 M                      | 3,085 g DTT ad 20 ml 10 mM Natriumacetat (pH 5,2)  |
| DYT-Medium                    | 16 g Select Peptone, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl ad 100 ml dH <sub>2</sub> O  |
| EDTA, 0,5 M, pH 8,0           | 186,12 g EDTA ad 100 ml dH <sub>2</sub> O, 20 g NaOH-Plättchen   |
| EGTA, 0,5 M, pH 8,0           | 9,51 g EGTA ad 50 ml dH <sub>2</sub> O, NaOH-Plättchen   |
| Einfriermedium, 2×            | 80 % FCS, 20 % DMSO  |
| HBS-Puffer                    | 150 mM NaCl, 20 mM HEPES ad ddH <sub>2</sub> O (pH 7,3)  |
| Hybridisierungsmix (H-Mix)    | 10 ml Formamid (100 %), 200 $\mu$ l 1 M Tris-Cl (pH 8,0), 2 ml 0,1 M PB (pH 7,2), 2 ml 20×SSC, 200 $\mu$ l 0,5 M EDTA (pH 8,0), 2 g Dextransulfat, 2 ml 50× Denhardt Lösung, 400 $\mu$ l 500 mM DTT, 6 $\mu$ l 14,3 M $\beta$ -ME, 400 $\mu$ l tRNA (10 mg/ml)   |
| Ketamin-Cocktail              | 10 ml Ketamin HCl (50 mg/ml), 1,2 ml Rompun <sup>®</sup> (Xylazin, 20 mg/ml), 0,5 ml Vetranquil <sup>®</sup> (Acepromazin, 10 mg/ml) ad 20,1 ml dH <sub>2</sub> O  |
| $\lambda$ /Pst I-DNA-Marker   | 500 $\mu$ l ( $\equiv$ 250 $\mu$ g) $\lambda$ -DNA, 250 $\mu$ l 10×NEBuffer 2, 1,74 ml ddH <sub>2</sub> O, 10 $\mu$ l Pst I, 250 $\mu$ l BPB   |
| Luria-Bertani-(LB)-Medium     | 10 g Peptone, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 500 ml Glycerin, ad 1 l dH <sub>2</sub> O  |
| Lysis Buffer I                | 1,25 $\mu$ l 1 M Tris-HCl (pH 7,4), 750 $\mu$ l 5 M NaCl, 250 $\mu$ l Triton X-100 (100 %), 250 $\mu$ l SDS (10 %), 250 $\mu$ l 0,5 M EDTA, ad 25 ml dH <sub>2</sub> O; vor Extraktion: 1 Tbl. Complete <sup>®</sup> Proteasen-Inhibitoren-Cocktail, 250 $\mu$ l 100 mM PMSF   |
| Lysis Buffer II               | 2 ml 1 M Tris (pH 7,5), 25 ml 1 M Sucrose, 200 $\mu$ l 0,5 M EGTA, 1 ml 0,5 M EDTA, 69,65 ml dH <sub>2</sub> O; vor Extraktion: 35 $\mu$ l 14,3 M $\beta$ -ME, 50 $\mu$ l Leupeptin (5 mg/ml), 10 $\mu$ l DNase I (10 U/ $\mu$ l), 10 $\mu$ l RNase A (10 U/ $\mu$ l), 10 $\mu$ l Lysozym (50 mg/ml), 100 $\mu$ l 100 mM PMSF ad 10 ml Stammlösung |
| Paraformaldehyd, 4 %          | 10 g PFA, 200 ml PBS, 1 ml 1 M NaOH, ad 250 ml PBS, 1 M HCl (pH 7,5)   |
| Phosphatpuffer, 0,1 M, pH 7,4 | 2,62 g [NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O], 14,42 g [NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2] ad 1 l dH <sub>2</sub> O  |
| PBS, 10×, pH 7,4              | 80 g NaCl, 2 g KCl, 26,8 g [Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O], 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1 l dH <sub>2</sub> O  |
| Permeabilisierungslösung, 10× | 0,2 % Triton-X-100, 0,1 % Natriumcitrat ad 100 ml PBS  |
| Ponceau-Lösung, 10×           | 0,2 g Ponceau S, 3 g Trichloressigsäure ad 100 ml dH <sub>2</sub> O  |
| Probenpuffer, 3×              | 0,76 g Tris, 10 g Saccharose ad 50 ml Millipore II H <sub>2</sub> O.; 20 ml SDS-Lösung (10 %); 2 Tbl. Complete <sup>®</sup> Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (Roche) ad 10 ml dH <sub>2</sub> O; 50 mg BPB   |

## Appendix

fortgesetzt

| Bezeichnung   | Inhalt   |
|---|--|
| RPMI-1640-Medium  | (10 % FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin  |
| Sammelgelpuffer (TRIS I), pH 6,8                                | 30,3 g Tris, 2 g SDS ad 500 ml dH <sub>2</sub> O., ~27 ml HCl  |
| SDS-Lösung, 10 %, pH 7,2  | 100 g SDS ad 1 l dH <sub>2</sub> O, ~50 µl HCl   |
| SDS-PAGE-Laufpuffer, 10×  | 30,28 g Tris, 144,12 g Glycin, 10 g SDS ad 1 l dH <sub>2</sub> O   |
| Semi-dry-Transferpuffer   | 14,42 g Glycin, 3,03 g Tris, 200 ml Methanol ad 1 l dH <sub>2</sub> O  |
| SSC, 20×, pH 7,0  | 175,3 g NaCl, 88,2 g [Natriumcitrat ×2H <sub>2</sub> O] ad 1 l dH <sub>2</sub> O, (HCl)                                  |
| TAE-Puffer, 50×   | 242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0   |
| TBE-Puffer, 10×   | 108 g Tris, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1 l dH <sub>2</sub> O  |
| TNES-Puffer, pH 8,0   | 1 ml 1 M Tris (pH 8,0), 2,3 ml 3 M NaCl, 0,5 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), 0,5 ml SDS-Lösung (10 %) ad 50 ml dH <sub>2</sub> O |
| Trenngelpuffer (TRIS II), pH 8,8                                | 90,8 g Tris, 2 g SDS ad 500 ml dH <sub>2</sub> O, ~18 ml HCl   |
| Tris-Cl (Tris(hydroxymethyl)amino-methan), 1 M; pH 8,0 / pH 7,5 | 121,14 g Tris ad 1 l dH <sub>2</sub> O; ~42 ml HCl (pH 8,0) / ~65 ml HCl (pH 7,5)  |

## VERBRAUCH

Glossar der verwendeten Substanzen, deren Herkunft und methodischer Gebrauch.

| Substanzbezeichnung   | Herkunft            | Anwendung            | Produkt-Nr.  |
|---|---------------------|----------------------|--------------|
| Diethylether  | Roth                | Anästhesie           | 3942.4       |
| Ketamin HCl 500 mg Injektionslösung                         | CuraMed Pharma      | Anästhesie           |              |
| Rompun <sup>®</sup> vet. (2 %) (Xylazin)                    | Bayer               | Anästhesie           | 2921         |
| Vetranquil <sup>®</sup> (1 %) (Acepromazin)                 | Sanofi-Ceva         | Anästhesie           | 0382355      |
| Glutaraldehyd (25 %)  | Serva               | Perfusion            | 23114        |
| PFA   | Sigma               | Perfusion, ICC       | P-6148-1KG   |
| Ammoniumchlorid   | Merck               | IHC                  | 1.01145.1000 |
| Ammoniumnickelsulfat  | Fluka               | IHC                  | 09885        |
| L-Buthionine-sulfoximine                                    | Sigma               | ICC                  | B-2515       |
| DAB   | Sigma               | IHC                  | D-5637-5G    |
| Entellan  | Merck               | IHC                  | 1.07961.0100 |
| FCS   | Biochrom            | IHC, ICC             | S0115        |
| L-Glutamic acid monosodium salt hydrate                     | Sigma               | ICC                  | G5889        |
| Histoacryl <sup>®</sup> Gewebekleber                        | Braun               | IHC                  | 9381104      |
| HOECHST 33258   | Sigma               | IHC, ICC             | B-2883       |
| Immu-Mount  | Thermo Shandon      | IHC, ICC             | 9990402      |
| Kobaltchlorid CoCl <sub>2</sub>                             | Sigma               | IHC                  | C-2644       |
| Saponin   | Sigma               | IHC                  | S-4521       |
| SeaKem LE Agarose   | Biozym              | IHC                  | 840004       |
| Thimerosal (Natriumethylmercurithiosalicylat)               | Roth                | IHC, ICC, IB         | 6389.2       |
| Tri-Natriumcitrat-Dihydrat                                  | Roth                | ICC                  | 3580.1       |
| Xylol   | Roth                | IHC                  | 9713.3       |
| Complete <sup>®</sup> Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (Tbl.) | Roche               | Proteinanalytik      | 1697498      |
| DNase I (10 U/μl)   | Roche               | Proteinanalytik      | 776785       |
| EGTA  | Sigma               | Proteinanalytik      | E-4378-25G   |
| HEPES   | Sigma               | Proteinanalytik      | H-4034       |
| Leupeptin (5 mg/ml)   | Sigma               | Proteinanalytik      | L-2884       |
| Lysozym (50 mg/ml)  | Roth                | Proteinanalytik      | 8259.1       |
| β-Mercaptoethanol, 14,3 M                                   | Sigma               | Proteinanalytik      | M-3148       |
| N-Glycosidase F   | Roche               | Proteinanalytik      | 11365185001  |
| PMSF, 100mM   | Sigma               | Proteinanalytik      | P-7626       |
| RNAse A   | Roche               | Proteinanalytik      | 109169       |
| Triton X-100  | Sigma               | Proteinanalytik, ICC | T-8787       |
| 30 % Acrylamidlösung  | Roth                | SDS-PAGE             | 3037.1       |
| APS   | Sigma               | SDS-PAGE             | A-3678       |
| 2 % Bisacrylamidlösung                                      | Roth                | SDS-PAGE             | 3039.1       |
| Brillant Blau R 250   | Roth                | SDS-PAGE             | 3862.2       |
| BPB   | Sigma               | SDS-PAGE             | B-5525       |
| Isopropanol (2-Propanol)                                    | Roth                | SDS-PAGE             | 9866.5       |
| ColorPlus Prestained Protein Marker                         | New England Biolabs | SDS-PAGE             | P7709S       |
| PageRuler <sup>™</sup> Plus Prestained Protein Ladder       | Fermentas           | SDS-PAGE             | SM1811       |
| Precision Plus Protein Dual Color Standards                 | Bio-Rad             | SDS-PAGE             | 161-0374     |

## Appendix

fortgesetzt

| Substanzbezeichnung                                     | Herkunft            | Anwendung       | Produkt-Nr.    |
|---|---------------------|-----------------|----------------|
| Prestained Protein Marker                               | New England Biolabs | SDS-PAGE        | P7708S         |
| SDS   | Serva               | SDS-PAGE        | 20760.03       |
| TEMED   | Serva               | SDS-PAGE        | 35925          |
| TRIS  | Roth                | SDS-PAGE        | 4855.3         |
| ECL Western Blotting Detection Reagents                 | GE Healthcare       | IB              | RPN 2106       |
| Glycin  | Serva               | IB              | 23390          |
| Hyperfilm ECL - High Performance Chemiluminescence Film | GE Healthcare       | IB              | RPN2103K       |
| Kodak X-Omat AR-S (35 ×43 cm)                           | GE Healthcare       | IB              | V1651512       |
| Ponceau S   | Roth                | IB              | 5938.1         |
| Protran xi size - Extra Thick Blot Paper 14.2 ×16.2     | Bio-Rad             | IB              | 170-3968       |
| Protran BA 85 Cellulosenitrate 0,45 µm                  | Whatman®            | IB              | 10401197       |
| Tween 20  | Roth                | IB              | 9127.1         |
| DMEM  | Invitrogen          | Zellkultur      | 41965-039      |
| Effectene® Transfection Reagent                         | Qiagen              | Zellkultur      | 301427         |
| FuGENE® 6   | Roche               | Zellkultur      | 11 815 091 001 |
| L-Glutamin  | Sigma               | Zellkultur      | G-5763         |
| Lipofectamine™ Reagent                                  | Invitrogen          | Zellkultur      | 18324-012      |
| 1-Oleoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phosphate (18:1 LPA)    | Avanti Polar Lipids | Zellkultur      | 857130         |
| OptiMEM®I-Medium  | Invitrogen          | Zellkultur      | 11058-021      |
| Penicillin-Streptomycin 10×                             | Invitrogen          | Zellkultur      | 15140-122      |
| Plus™ Reagent   | Invitrogen          | Zellkultur      | 11514-015      |
| Propidiumiodid  | Sigma               | Zellkultur      | P-4170         |
| RPMI 1640-Medium  | Invitrogen          | Zellkultur      | 21875-034      |
| Glycerin  | Merck               | Maxi/Mini       | 1.04093.1000   |
| Kanamycin   | Sigma               | Maxi/Mini       | K-4000         |
| Pepton  | Roth                | Maxi/Mini       | 8986.2         |
| Yeast Extract (Select)                                  | Invitrogen          | Maxi/Mini       | 30393-029      |
| Restriktionsenzyme                                      | Biolabs             | Kontrollverdau  |                |
| TRIzol® Reagent   | Invitrogen          | RNA-Präparation | 15596-018      |
| 2-Propanol  |                     | RNA-Präparation |                |
| RNase AWAY™   | Roth                | RNA-Präparation | A998.2         |
| Trichlormethan/Chloroform                               | Roth                | RNA-Präparation | 6340.4         |
| dNTP Mix  | Bioline             | PCR             |                |
| GoTaq® DNA Polymerase                                   | Promega             | PCR             | M830B          |
| 5×Green GoTaq™ Reaction Buffer                          | Promega             | PCR             | M791A          |
| 10×Herculase Reaction Buffer                            | Stratagene®         | PCR             | 600260-54      |
| Herculase® Hotstart                                     | Stratagene®         | PCR             | 600312-51      |
| peqGOLD Universal Agarose                               | Peqlab              | AGE             | 35-1020        |
| 10×NEBuffer 2 (blue)                                    | New England Biolabs | AGE             | B70025         |
| Borsäure  | Roth                | AGE             | 6943.1         |
| Ethidiumbromid  | Roth                | AGE             | 7870.1         |
| Lambda DNA  | Promega             | AGE             | D1501          |
| Sucrose   | Sigma               | AGE, ICC        | S-0389         |
| MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate           | Applied Biosystems  | qRT-PCR         | 4346906        |

fortgesetzt

| Substanzbezeichnung                             | Herkunft           | Anwendung | Produkt-Nr.  |
|---|--------------------|-----------|--------------|
| TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2×)      | Applied Biosystems | qRT-PCR   | 4352042      |
| [ $\alpha$ - <sup>35</sup> S] dATP, 37 TBq/mmol | Hartmann Analytic  | ISH       | KS 203/09.25 |
| Bio Spin 6 Chromatography Columns               | Bio-Rad            | ISH       | 732-6002     |
| Dextransulfat                                   | Sigma              | ISH       | D-6001       |
| DTT (1,4-Dithio-DL-threitol)                    | Promega            | ISH       | V3151        |
| EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)             | Sigma              | ISH       | E-5134-1KG   |
| Ethanol, unvergällt                             | Promega            | ISH       | 1411U        |
| Ficoll  | Sigma              | ISH       | F-4375       |
| Formamid  | Merck              | ISH       | 1.12027.1000 |
| Kobaltchlorid (CoCl <sub>2</sub> ), 25 mM       | Roche              | ISH       | 87905320     |
| Kodak X-OMAT AR Filme                           | Kodak              | ISH       | 1651512      |
| 2-Methylbutan                                   | Roth               | ISH       | 3927.1       |
| Natriumacetat                                   | Sigma              | ISH       | S-7670       |
| (Tri-)Natriumcitrat-Dihydrat                    | Roth               | ISH       | 3580.2       |
| Polyvinylpyrrolidon                             | Sigma              | ISH       | P-5288       |
| Szintillationslösung OptiPhase 'HiSafe' 3       | PerkinElmer        | ISH       | 1200-437     |
| TdT Reaction Buffer, 5×                         | Roche              | ISH       | 1243276      |
| Terminal Transferase, rec.                      | Roche              | ISH       | 3333574      |
| Toluidinblau O                                  | Roth               | ISH       | 0300.2       |
| tRNA  | Roche              | ISH       | 109.509      |



# Abkürzungen, Akronyme und Symbole

| Abkürzung                 | Erklärung   |
|---------------------------|---|
| A                         | Absorption (Extinktion)   |
| A                         | adult   |
| aa                        | Aminosäure ( <i>amino acid</i> )  |
| AB                        | Antikörper ( <i>antibody</i> )  |
| Abb.                      | Abbildung   |
| ABC                       | Avidin-Biotin-Komplex   |
| AGE                       | Agarosegelelektrophorese  |
| AGK                       | Acylglycerolkinase  |
| ATX                       | Autotaxin   |
| BCA                       | Bicinchoninsäure-Assay  |
| bp                        | Basenpaar(e) ( <i>base pair(s)</i> )  |
| BPB                       | Bromphenolblau  |
| BS                        | Blocking Solution   |
| BSO                       | L-Buthionine-sulfoximine  |
| <i>c, c<sub>end</sub></i> | Konzentration, Endkonzentration   |
| Ca                        | Karzinom  |
| CA                        | Cornu ammonis (Ammonshorn)  |
| cDNA                      | komplementäre DNA   |
| cpm                       | <i>counts per minute</i>  |
| CNPase                    | <i>2', 3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase</i>                                  |
| Ct                        | Schwellenwert-Zyklus ( <i>threshold cycle</i> )                                       |
| <i>d</i>                  | Durchmesser   |
| d                         | Tag   |
| DAB                       | 3', 3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid  |
| dal                       | Tage nach Läsion ( <i>days after lesion</i> )   |
| DNase                     | Desoxyribonuklease  |
| dsDNA                     | Doppelstrang-DNA  |
| DTT                       | Dithiothreitol  |
| E                         | embryonal/Tag <i>gravidarum</i>   |
| ECL                       | entorhinale Kortexläsion ( <i>entorhinal cortex lesion</i> )                          |
| EDG                       | <i>endothelial differentiation gene</i>   |
| EGFP                      | verstärkt grün-fluoreszierendes Protein ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> ) |
| EDTA                      | Ethylendiamintetraacetat  |

| Abkürzung | Erklärung  |
|-----------|--|
| ENPP2     | Ectonukleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 2 (syn. ATX)                                     |
| EZR       | Extrazellularraum  |
| FAM       | 6-Carboxy-Fluorescein  |
| FCS       | fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )  |
| FITC      | Fluorescein-5-isothiocyanat  |
| FS        | Fettsäure(n)   |
| g         | Erdbeschleunigung (9.80665 m/s <sup>2</sup> )  |
| GPCR      | G-Protein-gekoppelter Rezeptor   |
| HEPES     | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure  |
| HRP       | Merrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )   |
| IB        | Immunoblot   |
| ICC       | Immunzytochemie  |
| Ig        | Immunglobulin  |
| IHC       | Immunhistochemie   |
| (I)IF     | (indirekte) Immunfluoreszenz   |
| ISH       | In-situ-Hybridisierung   |
| IZR       | Intrazellularraum  |
| kDa       | Kilodalton   |
| KG        | Körpergewicht  |
| KI        | Konfidenzintervall   |
| LCAT      | Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase   |
| LPA       | Lysophosphatidsäure ( <i>lysophosphatidic acid</i> )   |
| LPA-R     | LPA-Rezeptor(en)   |
| LPC       | Lysophosphatidylcholin   |
| LPLs      | Lysophospholipide  |
| LPP       | Lipidphosphatphosphatase ( <i>lipid phosphate phosphatase/lipid phosphate phosphohydrolase</i> ) |
| LPR       | <i>lipid phosphatase-related protein</i>   |
| LPT       | Lipidphosphatase/-phosphotransferase   |
| LysoPLD   | Lysophospholipase D (syn. ATX)   |
| m         | murin (von der Maus)   |
| M         | Molarität (mol/l)  |
| mAB       | monoklonaler Antikörper  |
| MAG       | Monoacylglycerol   |
| MAPK      | <i>mitogen-activated protein kinase</i>  |
| β-ME      | β-Mercaptoethanol  |
| mPA-PLA1  | membrangebundene Phosphatidsäure-selektive Phospholipase A1                                      |
| Ncl.      | Nucleus  |
| NFQ       | <i>nonfluorescent quencher</i>   |
| OD        | optische Dichte  |



fortgesetzt

| Abkürzung     | Erklärung   |
|---------------|---|
| OL            | Oligodendrozyten  |
| OPCs          | Oligodendrozyten-Vorläuferzellen ( <i>oligodendrocyte precursor cells</i> ) |
| OT            | Objekträger   |
| P             | postnatal/Tag <i>post partum</i>  |
| <i>p</i>      | statistische Signifikanz  |
| PA            | Phosphatidsäure ( <i>phosphatidic acid</i> )                                |
| PAGE          | Polyacrylamidgelelektrophorese  |
| PAP           | Prostata-spezifische saure Phosphatase                                      |
| PB            | Phosphatpuffer ( <i>phosphate buffer</i> )                                  |
| PBS           | phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )      |
| PBS-T         | phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Zusatz von Tween                      |
| PC            | Phosphatidylcholin  |
| PcA           | Prostatakarzinom  |
| PCR           | Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )               |
| PDE           | Phosphodiesterase   |
| PD-I $\alpha$ | Phosphodiesterase-I $\alpha$ (syn. ATX)                                     |
| PFA           | Paraformaldehyd   |
| PIN           | prostatistische intraepitheliale Neoplasie                                  |
| PLA           | Phospholipase A   |
| p. o.         | <i>post operationem</i>   |
| PRG           | <i>Plasticity-related Gene</i>  |
| qRT-PCR       | <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>                     |
| $R^2$         | Bestimmtheitsmaß (Determinationskoeffizient)                                |
| rpm           | Rotationen pro Minute   |
| RT            | Raumtemperatur  |
| S1P           | Sphingosin-1-phosphat   |
| SDS           | Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )                      |
| siRNA         | <i>small interfering RNA</i>  |
| SPC           | Sphingosylphosphorylcholin  |
| SVZ           | subventrikuläre Zone  |
| Tab.          | Tabelle   |
| TAMRA         | N',N',N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamin                                   |
| TBS           | <i>Tris-Buffered Saline</i>   |
| TEMED         | Tetramethylethylendiamin  |
| TRIS          | Trishydroxymethylaminomethan  |
| TRITC         | Tetramethylrhodaminisothiocyanat  |
| <i>U</i>      | <i>Unit</i> [Einheit der Enzymaktivität]                                    |
| $V_{end}$     | Endvolumen  |
| ZNS           | zentrales Nervensystem  |



## Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Robert Nitsch für die Vision, PD Dr. Nicolai E. Savaskan für die Inspiration, J.-Prof. Dr. Anja U. Bräuer für die Motivation und das Begleiten, Prof. Dr. Thomas G. Ohm für den Impuls, PD Dr. Rudolf A. Deisz für den Beginn, Prof. Dr. Glen Kristiansen für die Kooperation, Prof. Dr.-Ing. Dr. med. h. c. Hansjürgen Frhr. von Villiez für seine Menschlichkeit, meiner Mutter für die Verbundenheit, meinem Vater für das Interesse, und all jenen, die mir über die geraume Zeit ihre bedingungslose Unterstützung haben zuteil werden lassen, Dipl.-Ing. Ingo Przesdzing für seine Zuneigung, Dipl.-Ing. Justus Goyrn für seine Uneigennützigkeit, Anna Soriguera i Farres für ihre Herzengüte, Pierluca Coiro einfach nur so, Beate Geist für ihre Geradheit, Dr. Olga Kieselmann für ihre Gewandtheit, Dr. Tanja Velmans für die Hilfsbereitschaft, Anne Bennert für ihre Redlichkeit, Rike Dannenberg für ihre Stetigkeit, Bettina Brokowski für ihren Wissensschatz, Jan Csupor für die Handreichung, Manuel Lutzenberger für seinen Wohlwollen, Denis Lajkó für das Vertrauen, Nora Ebermann für ihre Lebhaftigkeit, Tobias Thiele für die Geduld, Miriam Petzold für ihren Elan, Sabine Lewandowski für ihre Bereitwilligkeit, Dore Wachenschwanz für die Sorgfalt, Jutta Schüler für ihren Enthusiasmus, Dr. Karl Roth für die Nachsicht, Dr. Olaf Ninnemann für die Anregungen, Marni Pollrich für ihre Aufgeschlossenheit, Kimberly Rosegger für ihre Akribie, James Mateo Ari Liebkowsky für die Konzilianz, Dieter Lange für die Seelengüte, André Gronau für seine Loyalität, Andra Zimmermann für ihre Treue, Dr. Anja Heinemann für ihre Beharrlichkeit, Dr. Tim Baedermann für seine Beständigkeit, Rainer Korf für die Wahrhaftigkeit, Michael Rückmann für die Gelassenheit, Julia Eckert für ihre Besonnenheit, Agnieszka Gieralka für ihre Offenherzigkeit, Roberta Becker für ihr Feingefühl, Katrin Wuttig für den Gleichsinn, Charlotte Fenner für den Glauben; Dr. Nino Rocha für die unverbrüchliche Unterstützung; meiner Tochter Ella Charlotte für das klaglose Hinnehmen meines zeitraubenden Engagements, die Kraft und den Frieden.

Die vorliegende Arbeit wurde freundlicherweise unterstützt von der Studentischen Forschungsförderung der Charité – Universitätsmedizin Berlin, der Wissenschaftlichen Nachwuchskommission des Landes Berlin sowie von der Sonnenfeld-Stiftung.



# CURRICULUM VITAE

MARIA LINDA ROCHA

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Berlin, 26. Mai 2010



## Literaturverzeichnis

- [1] AHN, D. K. ; LEE, S. Y. ; HAN, S. R. ; ET AL.: Intratrigeminal ganglionic injection of LPA causes neuropathic pain-like behavior and demyelination in rats. In: *Pain* 146 (2009), Nr. 1-2, S. 114–20
- [2] ALTMAN, J. ; DAS, G. D.: Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. In: *J Comp Neurol* 124 (1965), Nr. 3, S. 319–35
- [3] AMARAL, D. G. ; WITTER, M. P.: The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. In: *Neuroscience* 31 (1989), Nr. 3, S. 571–91
- [4] AN, S. ; BLEU, T. ; HALLMARK, O. G. ; GOETZL, E. J.: Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Nr. 14, S. 7906–10
- [5] AOKI, J. : Mechanisms of lysophosphatidic acid production. In: *Semin Cell Dev Biol* 15 (2004), Nr. 5, S. 477–89
- [6] AOKI, J. ; INOUE, A. ; OKUDAIRA, S. : Two pathways for lysophosphatidic acid production. In: *Biochim Biophys Acta* 1781 (2008), Nr. 9, S. 513–8
- [7] BACHNER, D. ; AHRENS, M. ; BETAT, N. ; SCHRODER, D. ; GROSS, G. : Developmental expression analysis of murine autotaxin (ATX). In: *Mech Develop* 84 (1999), Nr. 1-2, S. 121–5
- [8] BAKER, D. L. ; FUJIWARA, Y. ; PIGG, K. R. ; ET AL.: Carba analogs of cyclic phosphatidic acid are selective inhibitors of autotaxin and cancer cell invasion and metastasis. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Nr. 32, S. 22786–93
- [9] BALU, D. T. ; LUCKI, I. : Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. In: *Neurosci Biobehav R* 33 (2009), Nr. 3, S. 232–52
- [10] BANDO, K. ; AOKI, J. ; HOSONO, H. ; ET AL.: Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Nr. 39, S. 27776–85
- [11] BEKTAS, M. ; PAYNE, S. G. ; LIU, H. ; GOPARAJU, S. ; MILSTIEN, S. ; SPIEGEL, S. : A novel acylglycerol kinase that produces lysophosphatidic acid modulates cross talk with EGFR in prostate cancer cells. In: *J Cell Biol* 169 (2005), Nr. 5, S. 801–11

- [12] BOUCHARABA, A. ; SERRE, C.-M. ; GRES, S. ; ET AL.: Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. In: *J Clin Invest* 114 (2004), Nr. 12, S. 1714–1725
- [13] BRAAK, H. ; BRAAK, E. : Entorhinal-hippocampal interaction in mnestic disorders. In: *Hippocampus* 3 Spec No (1993), S. 239–46
- [14] BRÄUER, A. U. ; NITSCH, R. : Plasticity-related genes (PRGs/LRPs): a brain-specific class of lysophospholipid-modifying proteins. In: *Biochim Biophys Acta* 1781 (2008), Nr. 9, S. 595–600
- [15] BRÄUER, A. U. ; SAVASKAN, N. E. ; KUHN, H. ; PREHN, S. ; NINNEMANN, O.; NITSCH, R. : A new phospholipid phosphatase, PRG-1, is involved in axon growth and regenerative sprouting. In: *Nature Neuroscience* 6 (2003), Nr. 6, S. 572–8
- [16] BRÄUER, A. U. ; SAVASKAN, N. E. ; PLASCHKE, M. ; NINNEMANN, O. ; NITSCH, R. : Perforant path lesion induces up-regulation of stathmin messenger RNA, but not SCG10 messenger RNA, in the adult rat hippocampus. In: *Neuroscience* 102 (2001), Nr. 3, S. 515–26
- [17] BRINDLEY, D. N.: Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. In: *J Cell Biochem* 92 (2004), Nr. 5, S. 900–12
- [18] BRUSSEL, J. P. ; OOMEN, M. A. ; VOSSEBELD, P. J. ; WIEMER, E. A. ; SONNEVELD, P.; MICKISCH, G. H.: Identification of multidrug resistance-associated protein 1 and glutathione as multidrug resistance mechanisms in human prostate cancer cells: chemosensitization with leukotriene D4 antagonists and buthionine sulfoximine. In: *BJU Int* 93 (2004), Nr. 9, S. 1333–8
- [19] CAJAL, S. R. y.: *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. 2. Maloine, 1911
- [20] CERVERA, P. ; TIRARD, M. ; BARRON, S. ; ET AL.: Immunohistological localization of the myelinating cell-specific receptor LP(A1). In: *Glia* 38 (2002), Nr. 2, S. 126–36
- [21] CLAIR, T. ; AOKI, J. ; KOH, E. ; ET AL.: Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate. In: *Cancer Res* 63 (2003), Nr. 17, S. 5446–53
- [22] CROSET, M. ; BROSSARD, N. ; POLETTE, A. ; LAGARDE, M. : Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat. In: *Biochem J* 345 Pt 1 (2000), S. 61–7
- [23] DELLER, T. ; HAAS, C. A. ; FROTSCHER, M. : Sprouting in the hippocampus after entorhinal cortex lesion is layer- specific but not translaminar: which molecules may be involved? In: *Restor Neurol Neuros* 19 (2001), Nr. 3-4, S. 159–67



- [24] DENNIS, J. ; WHITE, M. A. ; FORREST, A. D. ; ET AL.: Phosphodiesterase-1alpha/autotaxin's MORFO domain regulates oligodendroglial process network formation and focal adhesion organization. In: *Mol Cell Neurosci* 37 (2008), Nr. 2, S. 412–24
- [25] DIRCKS, L. ; SUL, H. S.: Acyltransferases of de novo glycerophospholipid biosynthesis. In: *Prog Lipid Res* 38 (1999), Nr. 5-6, S. 461–79
- [26] DOTTORI, M. ; LEUNG, J. ; TURNLEY, A. M. ; PEBAY, A. : Lysophosphatidic acid inhibits neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells derived from human embryonic stem cells. In: *Stem cells* 26 (2008), Nr. 5, S. 1146–54
- [27] DU, F. ; EID, T. ; LOTHMAN, E. W. ; KOHLER, C. ; SCHWARCZ, R. : Preferential neuronal loss in layer III of the medial entorhinal cortex in rat models of temporal lobe epilepsy. In: *J Neurosci* 15 (1995), Nr. 10, S. 6301–13
- [28] DUBIN, A. E. ; BAHNSON, T. ; WEINER, J. A. ; FUKUSHIMA, N. ; CHUN, J. : Lysophosphatidic acid stimulates neurotransmitter-like conductance changes that precede GABA and L-glutamate in early, presumptive cortical neuroblasts. In: *J Neurosci* 19 (1999), Nr. 4, S. 1371–81
- [29] EICHHOLTZ, T. ; JALINK, K. ; FAHRENFORT, I. ; MOOLENAAR, W. H.: The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. In: *Biochem J* 291 (Pt 3) (1993), S. 677–80
- [30] ERICKSON, J. R. ; HASEGAWA, Y. ; FANG, X. ; ET AL.: Lysophosphatidic acid and ovarian cancer: a paradigm for tumorigenesis and patient management. In: *Prostag Oth Lipid M* 64 (2001), Nr. 1–4, S. 63–81
- [31] FANG, X. ; SCHUMMER, M. ; MAO, M. ; ET AL.: Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer. In: *Biochim Biophys Acta* 1582 (2002), Nr. 1–3, S. 257–64
- [32] FERRY, G. ; TELLIER, E. ; TRY, A. ; ET AL.: Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Nr. 20, S. 18162–9
- [33] FOURCADE, O. ; SIMON, M. F. ; VIODE, C. ; ET AL.: Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. In: *Cell* 80 (1995), Nr. 6, S. 919–27
- [34] FOX, K. ; SCHLAGGAR, B. L. ; GLAZEWSKI, S. ; O'LEARY, D. D.: Glutamate receptor blockade at cortical synapses disrupts development of thalamocortical and columnar organization in somatosensory cortex. In: *P Natl Acad Sci USA* 93 (1996), Nr. 11, S. 5584–9

- [35] FOX, M. A. ; COLELLO, R. J. ; MACKLIN, W. B. ; FUSS, B. : Phosphodiesterase- $\alpha$ /autotaxin: a counteradhesive protein expressed by oligodendrocytes during onset of myelination. In: *Mol Cell Neurosci* 23 (2003), Nr. 3, S. 507–19
- [36] FROTSCHER, M. ; HEIMRICH, B. ; DELLER, T. : Sprouting in the hippocampus is layer-specific. In: *Trends Neurosci* 20 (1997), Nr. 5, S. 218–23
- [37] FROTSCHER, M. ; ZHAO, S. ; FORSTER, E. : Development of cell and fiber layers in the dentate gyrus. In: *Prog Brain Res* 163 (2007), S. 133–42
- [38] FUJITA, R. ; KIGUCHI, N. ; UEDA, H. : LPA-mediated demyelination in ex vivo culture of dorsal root. In: *Neurochem Int* 50 (2007), Nr. 2, S. 351–5
- [39] FUKUSHIMA, N. ; SHANO, S. ; MORIYAMA, R. ; CHUN, J. : Lysophosphatidic acid stimulates neuronal differentiation of cortical neuroblasts through the LPA1-G(i/o) pathway. In: *Neurochem Int* 50 (2007), Nr. 2, S. 302–7
- [40] FUKUSHIMA, N. ; WEINER, J. A. ; CHUN, J. : Lysophosphatidic acid (LPA) is a novel extracellular regulator of cortical neuroblast morphology. In: *Dev Biol* 228 (2000), Nr. 1, S. 6–18
- [41] FUSS, B. ; BABA, H. ; PHAN, T. ; TUOHY, V. K. ; MACKLIN, W. B.: Phosphodiesterase I, a novel adhesion molecule and/or cytokine involved in oligodendrocyte function. In: *J Neurosci* 17 (1997), Nr. 23, S. 9095–103
- [42] GIBBS, T. C. ; RUBIO, M. V. ; ZHANG, Z. ; XIE, Y. ; KIPP, K. R. ; MEIER, K. E.: Signal transduction responses to lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate in human prostate cancer cells. In: *Prostate* 69 (2009), Nr. 14, S. 1493–506
- [43] GIGANTI, A. ; RODRIGUEZ, M. ; FOULD, B. ; ET AL.: Murine and human autotaxin  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  isoforms: gene organization, tissue distribution, and biochemical characterization. In: *J Biol Chem* 283 (2008), Nr. 12, S. 7776–89
- [44] GIGG, J. ; TAN, A. M. ; FINCH, D. M.: Glutamatergic excitatory responses of anterior cingulate neurons to stimulation of the mediodorsal thalamus and their regulation by GABA: an in vivo iontophoretic study. In: *Cerebral cortex* 2 (1992), Nr. 6, S. 477–84
- [45] GODING, J. W. ; GROBBEN, B. ; SLEGGERS, H. : Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. In: *Biochim Biophys Acta* 1638 (2003), Nr. 1, S. 1–19
- [46] GOETZL, E. J. ; LEE, H. ; AZUMA, T. ; STOSSEL, T. P. ; TURCK, C. W. ; KARLINER, J. S.: Gelsolin binding and cellular presentation of lysophosphatidic acid. In: *J Biol Chem* 275 (2000), S. 14573–14578

- [47] GRAZIANO, A. ; LIU, X. B. ; MURRAY, K. D. ; JONES, E. G.: Vesicular glutamate transporters define two sets of glutamatergic afferents to the somatosensory thalamus and two thalamocortical projections in the mouse. In: *J Comp Neurol* 507 (2008), Nr. 2, S. 1258–76
- [48] GUO, C. ; LUTTRELL, L. M. ; PRICE, D. T.: Mitogenic signaling in androgen sensitive and insensitive prostate cancer cell lines. In: *J Urol* 163 (2000), Nr. 3, S. 1027–32
- [49] GUO, R. ; KASBOHM, E. A. ; ARORA, P. ; ET AL.: Expression and function of lysophosphatidic acid LPA1 receptor in prostate cancer cells. In: *Endocrinology* 147 (2006), Nr. 10, S. 4883–92
- [50] HAMA, K. ; AOKI, J. ; FUKAYA, M. ; ET AL.: Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1. In: *J Biol Chem* 279 (2004), Nr. 17, S. 17634–9
- [51] HAMA, K. ; BANDO, K. ; KAKEHI, Y. ; AOKI, J. ; ARAI, H. : Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors. In: *FEBS Lett* 523 (2002), Nr. 1-3, S. 187–92
- [52] HAMMACK, B. N. ; FUNG, K. Y. ; HUNSUCKER, S. W. ; ET AL.: Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid. In: *Multiple Sclerosis* 10 (2004), Nr. 3, S. 245–60
- [53] HASEGAWA, Y. ; MURPHY, M. ; YU, S. ; TIGYI, G. ; MILLS, G. B.: Lysophosphatidic acid (LPA)-induced vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates lamellipodia formation to initiate motility in PC-3 prostate cancer cells. In: *Mol Oncol* 2 (2008), Nr. 1, S. 54–69
- [54] HECHT, J. H. ; WEINER, J. A. ; POST, S. R. ; CHUN, J. : Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. In: *J Cell Biol* 135 (1996), Nr. 4, S. 1071–83
- [55] HIRAMATSU, T. ; SONODA, H. ; TAKANEZAWA, Y. ; ET AL.: Biochemical and molecular characterization of two phosphatidic acid-selective phospholipase A1s, mPA-PLA1alpha and mPA-PLA1beta. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Nr. 49, S. 49438–47
- [56] HOELZINGER, D. B. ; MARIANI, L. ; WEIS, J. ; ET AL.: Gene expression profile of glioblastoma multiforme invasive phenotype points to new therapeutic targets. In: *Neoplasia* 7 (2005), Nr. 1, S. 7–16
- [57] HOELZINGER, D. B. ; NAKADA, M. ; DEMUTH, T. ; ROSENSTEEL, T. ; REAVIE, L.B.; BERENS, M.E.: Autotaxin: a secreted autocrine/paracrine factor that promotes glioma invasion. In: *J Neuro-Oncol* 86 (2008), Nr. 3, S. 297–309

- [58] HOLTSBERG, F. W. ; STEINER, M. R. ; KELLER, J. N. ; MARK, R. J. ; MATTSON, M. P. ; STEINER, S. M.: Lysophosphatidic acid induces necrosis and apoptosis in hippocampal neurons. In: *J Neurochem* 70 (1998), Nr. 1, S. 66–76
- [59] HONG, H. ; LIU, G. Q.: Scutellarin attenuates oxidative glutamate toxicity in PC12 cells. In: *Planta medica* 70 (2004), Nr. 5, S. 427–31
- [60] HOU, S. T. ; JIANG, S. X. ; SMITH, R. A.: Permissive and repulsive cues and signaling pathways of axonal outgrowth and regeneration. In: *Int Rev Cell Mol Biol* 267 (2008), S. 125–81
- [61] HUITEMA, K. ; DIKKENBERG, J. van d. ; BROUWERS, J. F. ; HOLTHUIS, J. C.: Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. In: *EMBO J* 23 (2004), Nr. 1, S. 33–44
- [62] HWANG, Y. S. ; HODGE, J. C. ; SIVAPURAPU, N. ; LINDHOLM, P. F.: Lysophosphatidic acid stimulates PC-3 prostate cancer cell Matrigel invasion through activation of RhoA and NF-kappaB activity. In: *Mol Carc* 45 (2006), Nr. 7, S. 518–29
- [63] IM, D. S. ; HEISE, C. E. ; HARDING, M. A. ; ET AL.: Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate. In: *Mol Pharm* 57 (2000), Nr. 4, S. 753–9
- [64] INOUE, M. ; RASHID, M. H. ; FUJITA, R. ; CONTOS, J. J. ; CHUN, J. ; UEDA, H. : Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. In: *Nature Medicine* 10 (2004), Nr. 7, S. 712–8
- [65] ISHII, I. ; FUKUSHIMA, N. ; YE, X. ; CHUN, J. : Lysophospholipid receptors: signaling and biology. In: *Ann Rev Biochem* 73 (2004), S. 321–54
- [66] JAKOB, H. ; BECKMANN, H. : Circumscribed malformation and nerve cell alterations in the entorhinal cortex of schizophrenics. Pathogenetic and clinical aspects. In: *J Neural Trans* 98 (1994), Nr. 2, S. 83–106
- [67] JANSEN, S. ; STEFAN, C. ; CREEMERS, J. W. ; ET AL.: Proteolytic maturation and activation of autotaxin (NPP2), a secreted metastasis-enhancing lysophospholipase D. In: *J Cell Sci* 118 (2005), Nr. Pt 14, S. 3081–9
- [68] KIM, K.-S. ; SENGUPTA, S. ; BERK, M. ; ET AL.: Hypoxia enhances lysophosphatidic acid responsiveness in ovarian cancer cells and lysophosphatidic acid induces ovarian tumor metastasis in vivo. In: *Cancer Res* 66 (2006), Nr. 16, S. 7983–7990
- [69] KIMURA, A. ; OHMORI, T. ; KASHIWAKURA, Y. ; ET AL.: Antagonism of sphingosine 1-phosphate receptor-2 enhances migration of neural progenitor cells toward an area of brain. In: *Stroke* 39 (2008), Nr. 12, S. 3411–3417
- [70] KIMURA, A. ; OHMORI, T. ; OHKAWA, R. ; ET AL.: Essential roles of sphingosine 1-phosphate/S1P1 receptor axis in the migration of neural stem cells toward a site of spinal cord injury. In: *Stem Cells* 25 (2007), Nr. 1, S. 115–124

- [71] KINGSBURY, M. A. ; REHEN, S. K. ; CONTOS, J. J. ; HIGGINS, C. M. ; CHUN, J. : Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding. In: *Nature Neurosci* 6 (2003), Nr. 12, S. 1292–9
- [72] KINGSBURY, M. A. ; REHEN, S. K. ; YE, X. ; CHUN, J. : Genetics and cell biology of lysophosphatidic acid receptor-mediated signaling during cortical neurogenesis. In: *J Cell Biochem* 92 (2004), Nr. 5, S. 1004–12
- [73] KISHI, Y. ; OKUDAIRA, S. ; TANAKA, M. ; ET AL.: Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Nr. 25, S. 17492–500
- [74] KOIKE, S. ; KEINO-MASU, K. ; OHTO, T. ; MASU, M. : The N-terminal hydrophobic sequence of autotaxin (ENPP2) functions as a signal peptide. In: *Genes Cells* 11 (2006), Nr. 2, S. 133–42
- [75] KOVELMAN, J. A. ; SCHEIBEL, A. B.: A neurohistological correlate of schizophrenia. In: *Biol Psych* 19 (1984), Nr. 12, S. 1601–21
- [76] KRANENBURG, O. ; MOOLENAAR, W. H.: Ras-MAP kinase signaling by lysophosphatidic acid and other G protein-coupled receptor agonists. In: *Oncogene* 20 (2001), Nr. 13, S. 1540–6
- [77] LEE, C. W. ; RIVERA, R. ; GARDELL, S. ; DUBIN, A. E. ; CHUN, J. : GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Nr. 33, S. 23589–97
- [78] LIN, M. F. ; LEE, M. S. ; ZHOU, X. W. ; ET AL.: Decreased expression of cellular prostatic acid phosphatase increases tumorigenicity of human prostate cancer cells. In: *J Urol* 166 (2001), Nr. 5, S. 1943–50
- [79] LIU, S. ; UMEZU-GOTO, M. ; MURPH, M. ; ET AL.: Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. In: *Cancer Cell* 15 (2009), Nr. 6, S. 539–50
- [80] MCDERMOTT, M. I. ; SIGAL, Y. J. ; SCIORRA, V. A. ; MORRIS, A. J.: Is PRG-1 a new lipid phosphatase? In: *Nature Neuroscience* 7 (2004), Nr. 8, S. 789; author reply 789–90
- [81] MCINTYRE, T. M. ; PONTSLE, A. V. ; SILVA, A. R. ; ET AL.: Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. In: *P Natl Acad Sci USA* 100 (2003), Nr. 1, S. 131–6
- [82] MEETEREN, L. A. ; MOOLENAAR, W. H.: Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis. In: *Prog Lipid Res* 46 (2007), Nr. 2, S. 145–60

- [83] MEETEREN, L. A. ; RUURS, P. ; CHRISTODOULOU, E. ; ET AL.: Inhibition of auto-taxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. In: *J Biol Chem* 280 (2005), Nr. 22, S. 21155–61
- [84] MILLS, G. B. ; EDER, A. ; FANG, X. ; ET AL.: Critical role of lysophospholipids in the pathophysiology, diagnosis, and management of ovarian cancer. In: *Cancer Treat Res* 107 (2002), S. 259–83
- [85] MILLS, G. B. ; MAY, C. ; HILL, M. ; CAMPBELL, S. ; SHAW, P. ; MARKS, A. : Ascitic fluid from human ovarian cancer patients contains growth factors necessary for intraperitoneal growth of human ovarian adenocarcinoma cells. In: *J Clin Invest* 86 (1990), Nr. 3, S. 851–5
- [86] MILLS, G. B. ; MOOLENAAR, W. H.: The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. In: *Nature Rev* 3 (2003), Nr. 8, S. 582–91
- [87] MOERS, A. ; NURNBERG, A. ; GOEBBELS, S. ; WETTSCHURECK, N. ; OFFERMANN, S. : Galpha12/Galpha13 deficiency causes localized overmigration of neurons in the developing cerebral and cerebellar cortices. In: *Mol Cell Biol* 28 (2008), Nr. 5, S. 1480–8
- [88] MONGEAU, R. ; BLIER, P. ; MONTIGNY, C. de: The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. In: *Brain Res* 23 (1997), Nr. 3, S. 145–95
- [89] MOOLENAAR, W. H. ; KRANENBURG, O. ; POSTMA, F. R. ; ZONDAG, G. C.: Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. In: *Cur Op Cell Biol* 9 (1997), Nr. 2, S. 168–73
- [90] MOOLENAAR, W. H. ; MEETEREN, L. A. ; GIEPMANS, B. N.: The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. In: *BioEssays* 26 (2004), Nr. 8, S. 870–81
- [91] MUKAI, M. ; IMAMURA, F. ; AYAKI, M. ; ET AL.: Inhibition of tumor invasion and metastasis by a novel lysophosphatidic acid (cyclic LPA). In: *Int J Cancer* 81 (1999), Nr. 6, S. 918–22
- [92] MURAKAMI, M. ; SHIRAISHI, A. ; TABATA, K. ; FUJITA, N. : Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. In: *Biochem Biophys Res Com* 371 (2008), Nr. 4, S. 707–12
- [93] MURAKAMI-MUROFUSHI, K. ; MUKAI, M. ; KOBAYASHI, S. ; KOBAYASHI, T. ; TIGYI, G. ; MUROFUSHI, H. : A novel lipid mediator, cyclic phosphatidic acid (cPA), and its biological functions. In: *Ann NY Acad Sci* 905 (2000), S. 319–21
- [94] MURPH, M. ; TANAKA, T. ; LIU, S. ; MILLS, G. B.: Of spiders and crabs: the emergence of lysophospholipids and their metabolic pathways as targets for therapy in cancer. In: *Clin Cancer Res* 12 (2006), Nr. 22, S. 6598–602

- [95] NAM, S. W. ; CLAIR, T. ; CAMPO, C. K. ; LEE, H. Y. ; LIOTTA, L. A. ; STRACKE, M. L.: Autotaxin (ATX), a potent tumor motogen, augments invasive and metastatic potential of ras-transformed cells. In: *Oncogene* 19 (2000), Nr. 2, S. 241–7
- [96] NAM, S. W. ; CLAIR, T. ; KIM, Y. S. ; ET AL.: Autotaxin (NPP-2), a metastasis-enhancing motogen, is an angiogenic factor. In: *Cancer Res* 61 (2001), Nr. 18, S. 6938–44
- [97] NITSCH, R. : Transneuronal changes in the lesioned entorhinal-hippocampal system. In: *Hippocampus* 3 Spec No (1993), S. 247–56
- [98] NOGUCHI, K. ; ISHII, S. ; SHIMIZU, T. : Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Nr. 28, S. 25600–6
- [99] NOUH, M. A. ; WU, X. X. ; OKAZOE, H. ; ET AL.: Expression of autotaxin and acylglycerol kinase in prostate cancer: association with cancer development and progression. In: *Cancer Sci* 100 (2009), Nr. 9, S. 1631–8
- [100] OHUCHI, H. ; HAYASHIBARA, Y. ; MATSUDA, H. ; ET AL.: Diversified expression patterns of autotaxin, a gene for phospholipid-generating enzyme during mouse and chicken development. In: *Develop Dyn* 236 (2007), Nr. 4, S. 1134–43
- [101] PARNAVELAS, J. G. ; LYNCH, G. ; BRECHA, N. ; COTMAN, C. W. ; GLOBUS, A. : Spine loss and regrowth in hippocampus following deafferentation. In: *Nature* 248 (1974), Nr. 443, S. 71–3
- [102] PASTERNAK, S. M. ; KUGELGEN, I. von ; ABOUD, K. A. ; ET AL.: G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. In: *Nature Genetics* 40 (2008), Nr. 3, S. 329–34
- [103] PAXINOS, G. ; WATSON, C. : *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5th ed. Amsterdam : Elsevier Academic Press, 2005. – ISBN 0120884720
- [104] PEEVA, G. P. ; ANGELOVA, S. K. ; GUNTINAS-LICHIUS, O. ; ET AL.: Improved outcome of facial nerve repair in rats is associated with enhanced regenerative response of motoneurons and augmented neocortical plasticity. In: *Eur J Neurosci* 24 (2006), Nr. 8, S. 2152–62
- [105] PITSON, S. M. ; PEBAY, A. : Regulation of stem cell pluripotency and neural differentiation by lysophospholipids. In: *Neuro-Signals* 17 (2009), Nr. 4, S. 242–54
- [106] PTASZYNSKA, M. M. ; PENDRAK, M. L. ; BANDLE, R. W. ; STRACKE, M. L. ; ROBERTS, D. D.: Positive feedback between vascular endothelial growth factor-A and autotaxin in ovarian cancer cells. In: *Mol Cancer Res* 6 (2008), Nr. 3, S. 352–63
- [107] RAJ, G. V. ; SEKULA, J. A. ; GUO, R. ; MADDEN, J. F. ; DAAKA, Y. : Lysophosphatidic acid promotes survival of androgen-insensitive prostate cancer PC3 cells via activation of NF-kappaB. In: *Prostate* 61 (2004), Nr. 2, S. 105–13

- [108] RIDLEY, A. J. ; HALL, A. : The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. In: *Cell* 70 (1992), Nr. 3, S. 389–99
- [109] SANO, T. ; BAKER, D. ; VIRAG, T. ; ET AL.: Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Nr. 24, S. 21197–206
- [110] SATO, K. ; MALCHINKHUU, E. ; MURAKI, T. ; ET AL.: Identification of autotaxin as a neurite retraction-inducing factor of PC12 cells in cerebrospinal fluid and its possible sources. In: *J Neurochem* 92 (2005), Nr. 4, S. 904–14
- [111] SAVASKAN, N. E. ; BRÄUER, A. U. ; NITSCH, R. : Molecular cloning and expression regulation of PRG-3, a new member of the plasticity-related gene family. In: *Eur J Neurosci* 19 (2004), Nr. 1, S. 212–20
- [112] SAVASKAN, N. E. ; NITSCH, R. : Molecules involved in reactive sprouting in the hippocampus. In: *Rev Neurosci* 12 (2001), Nr. 3, S. 195–215
- [113] SAVASKAN, N. E. ; ROCHA, L. ; KOTTER, M. R. ; ET AL.: Autotaxin (NPP-2) in the brain: cell type-specific expression and regulation during development and after neurotrauma. In: *Cell Mol Life Sci* 64 (2007), Nr. 2, S. 230–43
- [114] SCIORRA, V. A. ; MORRIS, A. J.: Roles for lipid phosphate phosphatases in regulation of cellular signaling. In: *Biochim Biophys Acta* 1582 (2002), Nr. 1-3, S. 45–51
- [115] SHANO, S. ; MORIYAMA, R. ; CHUN, J. ; FUKUSHIMA, N. : Lysophosphatidic acid stimulates astrocyte proliferation through LPA1. In: *Neurochem Int* 52 (2008), Nr. 1–2, S. 216–20
- [116] SHIMOMURA, Y. ; WAJID, M. ; ISHII, Y. ; ET AL.: Disruption of P2RY5, an orphan G protein-coupled receptor, underlies autosomal recessive woolly hair. In: *Nature Genetics* 40 (2008), Nr. 3, S. 335–9
- [117] SHYU, B. C. ; VOGT, B. A.: Short-term synaptic plasticity in the nociceptive thalamic-anterior cingulate pathway. In: *Molecular Pain* 5 (2009), S. 51
- [118] SIGAL, Y. J. ; MCDERMOTT, M. I. ; MORRIS, A. J.: Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. In: *Biochem J* 387 (2005), Nr. Pt 2, S. 281–93
- [119] SIVASHANMUGAM, P. ; TANG, L. ; DAAKA, Y. : Interleukin 6 mediates the lysophosphatidic acid-regulated cross-talk between stromal and epithelial prostate cancer cells. In: *J Biol Chem* 279 (2004), Nr. 20, S. 21154–9
- [120] SMYTH, S. S. ; HILLERY, C. A. ; PARISE, L. V.: Fibrinogen binding to purified platelet glycoprotein IIb-IIIa (integrin alpha IIb beta 3) is modulated by lipids. In: *J Biol Chem* 267 (1992), Nr. 22, S. 15568–77



- [121] SONODA, H. ; AOKI, J. ; HIRAMATSU, T. ; ET AL.: A novel phosphatidic acid-selective phospholipase A1 that produces lysophosphatidic acid. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Nr. 37, S. 34254–63
- [122] STEFAN, C. ; JANSEN, S. ; BOLLEN, M. : NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. In: *Trends Biochem Sci* 30 (2005), Nr. 10, S. 542–50
- [123] STRACKE, M. ; LIOTTA, L. A. ; SCHIFFMANN, E. : The role of autotaxin and other motility stimulating factors in the regulation of tumor cell motility. In: *Sym Soc Exp Biol* 47 (1993), S. 197–214
- [124] STRACKE, M. L. ; ARESTAD, A. ; LEVINE, M. ; KRUTZSCH, H. C. ; LIOTTA, L. A.: Autotaxin is an N-linked glycoprotein but the sugar moieties are not needed for its stimulation of cellular motility. In: *Melanoma Res* 5 (1995), Nr. 4, S. 203–9
- [125] STRACKE, M. L. ; CLAIR, T. ; LIOTTA, L. A.: Autotaxin, tumor motility-stimulating exophosphodiesterase. In: *Adv Enzyme Regul* 37 (1997), S. 135–44
- [126] STRACKE, M. L. ; KRUTZSCH, H. C. ; UNSWORTH, E. J. ; ET AL.: Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. In: *J Biol Chem* 267 (1992), Nr. 4, S. 2524–9
- [127] TABATA, K. ; BABA, K. ; SHIRAISHI, A. ; ITO, M. ; FUJITA, N. : The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. In: *Biochem Biophys Res Com* 363 (2007), Nr. 3, S. 861–6
- [128] TANAKA, M. ; KISHI, Y. ; TAKANEZAWA, Y. ; KAKEHI, Y. ; AOKI, J. ; ARAI, H.: Prostatic acid phosphatase degrades lysophosphatidic acid in seminal plasma. In: *FEBS Let* 571 (2004), Nr. 1-3, S. 197–204
- [129] TANYI, J. L. ; HASEGAWA, Y. ; LAPUSHIN, R. ; ET AL.: Role of decreased levels of lipid phosphate phosphatase-1 in accumulation of lysophosphatidic acid in ovarian cancer. In: *Clin Cancer Res* 9 (2003), Nr. 10 Pt 1, S. 3534–45
- [130] TEIGLER, A. ; KOMLJENOVIC, D. ; DRAGUHN, A. ; GORGAS, K. ; JUST, W. W.: Defects in myelination, paranode organization and Purkinje cell innervation in the ether lipid-deficient mouse cerebellum. In: *Human Mol Gen* 18 (2009), Nr. 11, S. 1897–908
- [131] THUMSER, A. E. ; VOYSEY, J. E. ; WILTON, D. C.: The binding of lysophospholipids to rat liver fatty acid-binding protein and albumin. In: *Biochem J* 301 ( Pt 3) (1994)
- [132] TICE, D. A. ; SZETO, W. ; SOLOVIEV, I. ; ET AL.: Synergistic induction of tumor antigens by Wnt-1 signaling and retinoic acid revealed by gene expression profiling. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Nr. 16, S. 14329–35

- [133] TIGYI, G. ; MILEDI, R. : Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in Xenopus oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. In: *J Biol Chem* 267 (1992), Nr. 30, S. 21360–7
- [134] TOKUMURA, A. : Physiological and pathophysiological roles of lysophosphatidic acids produced by secretory lysophospholipase D in body fluids. In: *Biochim Biophys Acta* 1582 (2002), Nr. 1–3, S. 18–25
- [135] TOKUMURA, A. ; HARADA, K. ; FUKUZAWA, K. ; TSUKATANI, H. : Involvement of lysophospholipase D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma. In: *Biochim Biophys Acta* 875 (1986), Nr. 1, S. 31–8
- [136] TRIMBUCH, T. ; BEED, P. ; VOGT, J. ; ET AL.: Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling. In: *Cell* 138 (2009), Nr. 6, S. 1222–35
- [137] TUXHORN, J. A. ; AYALA, G. E. ; ROWLEY, D. R.: Reactive stroma in prostate cancer progression. In: *J Urol* 166 (2001), Nr. 6, S. 2472–83
- [138] ULRIX, W. ; SWINNEN, J. V. ; HEYNS, W. ; VERHOEVEN, G. : Identification of the phosphatidic acid phosphatase type 2a isozyme as an androgen-regulated gene in the human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Nr. 8, S. 4660–5
- [139] UMEZU-GOTO, M. ; KISHI, Y. ; TAIRA, A. ; ET AL.: Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. In: *J Cell Biol* 158 (2002), Nr. 2, S. 227–33
- [140] VALENTINE, W. J. ; FUJIWARA, Y. ; TSUKAHARA, R. ; TIGYI, G. : Lysophospholipid signaling: beyond the EDGs. In: *Biochim Biophys Acta* 1780 (2008), Nr. 3, S. 597–605
- [141] VAN HOESEN, G. W. ; HYMAN, B. T. ; DAMASIO, A. R.: Entorhinal cortex pathology in Alzheimer's disease. In: *Hippocampus* 1 (1991), Nr. 1, S. 1–8
- [142] WAGGONER, D. W. ; XU, J. ; SINGH, I. ; JASINSKA, R. ; ZHANG, Q. X. ; BRINDLEY, D. N.: Structural organization of mammalian lipid phosphate phosphatases: implications for signal transduction. In: *Biochim Biophys Acta* 1439 (1999), Nr. 2, S. 299–316
- [143] WEINER, J. A. ; HECHT, J. H. ; CHUN, J. : Lysophosphatidic acid receptor gene *vzg-1/lpA1/edg-2* is expressed by mature oligodendrocytes during myelination in the postnatal murine brain. In: *J Comp Neurol* 398 (1998), Nr. 4, S. 587–98
- [144] WILHELMSSON, U. ; LI, L. ; PEKNA, M. ; ET AL.: Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. In: *J Neurosci* 24 (2004), Nr. 21, S. 5016–21

- [145] XU, J. ; LOVE, L. M. ; SINGH, I. ; ET AL.: Lipid phosphate phosphatase-1 and Ca<sup>2+</sup> control lysophosphatidate signaling through EDG-2 receptors. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 36, S. 27520–30
- [146] XU, Y. ; SHEN, Z. ; WIPER, D. W. ; ET AL.: Lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic cancers. In: *JAMA* 280 (1998), Nr. 8, S. 719–23
- [147] YAMASHITA, H. ; KITAYAMA, J. ; SHIDA, D. ; ET AL.: Differential expression of lysophosphatidic acid receptor-2 in intestinal and diffuse type gastric cancer. In: *J Surg Onc* 93 (2006), Nr. 1, S. 30–5
- [148] YANG, S. Y. ; LEE, J. ; PARK, C. G. ; ET AL.: Expression of autotaxin (NPP-2) is closely linked to invasiveness of breast cancer cells. In: *Clin Expl Metastasis* 19 (2002), Nr. 7, S. 603–8
- [149] YE, X. ; ISHII, I. ; KINGSBURY, M. A. ; CHUN, J. : Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic factor. In: *Biochim Biophys Acta* 1585 (2002), Nr. 2–3, S. 108–13
- [150] YU, S. ; MURPH, M. M. ; LU, Y. ; ET AL.: Lysophosphatidic acid receptors determine tumorigenicity and aggressiveness of ovarian cancer cells. In: *J Natl Canc Inst* 100 (2008), Nr. 22, S. 1630–42
- [151] YUELLING, L. M. ; FUSS, B. : Autotaxin (ATX): a multi-functional and multi-modular protein possessing enzymatic lysoPLD activity and extracellular properties. In: *Biochim Biophys Acta* 1781 (2008), Nr. 9, S. 525–30
- [152] ZASLAVSKY, A. ; SINGH, L. S. ; TAN, H. ; DING, H. ; LIANG, Z. ; XU, Y. : Homo- and hetero-dimerization of LPA/S1P receptors, OGR1 and GPR4. In: *Biochim Biophys Acta* 1761 (2006), Nr. 10, S. 1200–12
- [153] ZENG, Y. ; KAKEHI, Y. ; NOUH, M. A. A. M. ; TSUNEMORI, H. ; SUGIMOTO, M. ; WU, X.-X. : Gene expression profiles of lysophosphatidic acid-related molecules in the prostate: relevance to prostate cancer and benign hyperplasia. In: *Prostate* 69 (2009), Nr. 3, S. 283–292
- [154] ZHANG, Q. X. ; PILQUIL, C. S. ; DEWALD, J. ; BERTHIAUME, L. G. ; BRINDLEY, D. N.: Identification of structurally important domains of lipid phosphate phosphatase-1: implications for its sites of action. In: *Biochem J* 345 Pt 2 (2000), S. 181–4



## Deklaration

Ich, Maria Linda Rocha, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationschrift mit dem Thema: *Regulationsmechanismen bioaktiver Lipide bei Entwicklungs- und Regenerationsprozessen des ZNS und bei der Karzinogenese* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 26. Mai 2010

---

Maria Linda Rocha