

A lizofoszfátidsav szerepe az értónus szabályozásában

Doktori értekezés

Dr. Ruisanchez Éva

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Benyó Zoltán, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Kékesi Violetta, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Tóth Attila, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Bérczi Viktor, DSc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Radovits Tamás, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Mohácsi Attila, Ph.D., főorvos, c. egyetemi docens

Budapest
2017

TARTALOMJEGYZÉK

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	8
2.1. A lizofoszfatisav kémiai szerkezete és előfordulása a szervezetben	10
2.1.1. A lizofoszfatisav kémiája	10
2.1.2. A lizofoszfatisav előfordulása a szervezetben	12
2.2. A lizofoszfatisav metabolizmusa	15
2.2.1. A lizofoszfatisav extracelluláris képződése – az autotaxin	17
2.2.1.1. Az autotaxin felfedezése	17
2.2.1.2. Az autotaxin szerkezete és működési sajátosságai	18
2.2.1.3. Az autotaxin előfordulása a szervezetben és élettani jelentősége	20
2.2.2. A lizofoszfatisav képződésének sejtmembránhoz kötött útvonala	22
2.2.3. A lizofoszfatisav lebontása – lipid foszfát foszfatázok	23
2.3. A lizofoszfatisav receptorai	25
2.3.1. Az edg receptorcsaládba tartozó LPA receptorok	29
2.3.1.1. LPA ₁ receptor	29
2.3.1.2. LPA ₂ receptor	30
2.3.1.3. LPA ₃ receptor	31
2.3.2. A nem-edg családba tartozó receptorok	31
2.3.2.1. LPA ₄ receptor	31
2.3.2.2. LPA ₅ receptor	32
2.3.2.3. LPA ₆ receptor	32
2.3.3. A PPAR γ receptor	33
2.4. A lizofoszfatisav élettani és kórélettani jelentősége az érrendszerben	35
2.4.1. Lizofoszfatisav metabolizmus az érrendszerben, különösen az ateroszklerotikus területeken	35
2.4.2. A lizofoszfatisav hatása a vér és az erek sejtjeire	39
2.4.3. A lizofoszfatisav szerepe az érrendszer fejlődésében	41
2.4.3.1. LPA receptor KO egerek érfejlődési rendellenességei	42
2.4.3.2. A lizofoszfatisav szerepe a vaszkulogenezisben	43
2.4.3.3. A lizofoszfatisav szerepe az angiogenezisben	44

2.4.4. A lizofoszfátid sav szerepe kóros érválaszok kialakulásában	46
2.4.4.1. A lizofoszfátid sav és a neointima képződés	46
2.4.4.2. A lizofoszfátid sav és az érlelmeszesedés	47
2.4.5. A lizofoszfátid sav szerepe az értónus szabályozásában	48
2.4.5.1. A kardiovaszkuláris rendszer szabályzó folyamatainak és az értónus szabályozásának rövid áttekintése	48
2.4.5.2. A nitrogén-monoxid szerepe az értónus szabályozásában	49
2.4.5.3. A lizofoszfátid sav akut hatása a vérnyomásra	51
2.4.5.4. A lizofoszfátid sav hatása az endotélsejtek nitrogén-monoxid termelésére	53
2.4.5.5. A lizofoszfátid sav szerepe az erek mechanotranszdukciós folyamataiban	54
2.4.5.6. A lizofoszfátid sav közvetlen hatása az erek átmérőjére, tónusára	55
3. Célkitűzések	57
4. Módszerek	58
4.1. Kísérleti állatok	58
4.3. Érpriparátumok előkészítése miográfos kísérletekhez	59
4.4. Az értónus vizsgálata miográfos kísérletekben	59
4.5. Endoteliális LPA receptorok és autotaxin expresszió-analízise	61
4.5.1. Egér aorta endotélsejtek izolálása	61
4.5.2. Immuncitokémia	62
4.5.3. Kvantitatív valós-idejű PCR	62
4.6. Kiértékelés, statisztikai elemzés	63
4.7. Reagensek	64
5. Eredmények	65
5.1. A lizofoszfátid sav vazorelaxációt okoz ép endotélű mellkasi aortában	65
5.1.1. Különböző lizofoszfátid sav típusok eltérő mértékű vazorelaxációt okoznak	65
5.1.2. Az oleoil lizofoszfátid sav dózisfüggő relaxációt okoz	68
5.2. A lizofoszfátid sav vazorelaxáns hatásának kialakulásához ép endotéliumra és az eNOS enzimre van szükség	69
5.3. A lizofoszfátid sav-indukálta vazorelaxációt közvetítő receptor(ok) azonosítása	71
5.3.1. Az egér aortából izolált endotél sejtekben expresszálódnak LPA receptorok és autotaxin	71

5.3.2. A lizofoszfátidsav vazorelaxáns hatását az LPA ₁ receptor aktivációja közvetíti	71
5.4. A lizofoszfátidsav indukálta vazorelaxáció kialakulásában érintett intracelluláris jelátviteli utak azonosítása	74
5.4.1. A PI3K-Akt/PKB útvonal nem játszik szerepet a lizofoszfátidsav vazorelaxáns hatásának közvetítésében	74
5.4.2. A foszfolipáz C enzim gátlása megszünteti az LPA vazorelaxáns hatását	76
5.5. A lizofoszfátidsav endotélkárosodás esetén vazokonstriktiót okoz	80
5.5.1. A lizofoszfátidsav vazokonstriktor hatása erősebb hasi aortában	80
5.5.2. A többszörösen telítetlen lizofoszfátidsav típusok erősebb vazokonstriktorok	82
5.5.3. A lizofoszfátidsav vazokonstriktor hatását jelentős részben LPA ₁ receptor közvetíti	83
6. Megbeszélés	85
7. Következtetések	95
8. Összefoglalás	96
9. Summary	97
10. Irodalomjegyzék	98
11. Saját publikációk jegyzéke	122
12. Köszönetnyilvánítás	124

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AA	– hasi aorta (abdominal aorta)
AC	– adenilát-cikláz
ACh	– acetilkolin
aCSF	– mesterséges (arteficiális) cerebrospinális folyadék
AMF	– autokrin motilitási faktor
ANOVA	– varianciaanalízis
ApoB	– apolipoprotein B
ApoE	– apolipoprotein E
ATP	– adenzin-trifoszfát
ATX	– autotaxin
BAEC	– borjú aorta endotélsejt
BSA	– borjú szérum albumin
CaM	– kalmodulin
cAMP	– ciklikus-adenil-monofoszfát
COX	– ciklooxigenáz
cPA	– ciklikus foszfatisav
DAG	– diacilglicerol
DAG-kináz	– diacilglicerol-kináz
DAPI	– 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	– Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	– dimetil-szulfoxid
EDG/edg	– endoteliális differenciációs gén
EDRF	– endotélium eredetű relaxáló faktor
EDTA	– etiléndiamin-tetraacetát

ELISA	– enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	– endoteliális nitrogén-monoxid szintáz
ENPP	– ektonukleotid pirofoszfátáz/foszfodiészteráz
FBS	– borjú szérum (fetal bovine serum)
GAPDH	– gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz
GPAT	– glicerol-3-foszfát-aciltranszferáz
GPR/GPCR	– G-fehérje kapcsolt receptor (G protein coupled receptor)
GWAS	– genome-wide association study
HAEC	– humán aorta endotélsejtek
HCAEC	– humán koronária artéria endotélsejt
HIF1	– hipoxiaindukált faktor 1
HUVEC	– humán köldökzsínórvéna endotélsejt
ICAM-1	– intracelluláris adhéziós molekula-1
IL	– interleukin
IP ₃	– inozitol-trifoszfát
IUPHAR	– International Union of Basic and Clinical Pharmacology
KO	– génkiütött (knock-out)
LCAT	– lecitin-koleszterin-aciltranszferáz
LDL	– alacsony denzitású lipoprotein (low density lipoprotein)
LFABP	– máj zsírsavkötő fehérje (liver fatty acid binding protein)
LIPH	– lipáz H
LIPI	– lipáz I
lizoPLD	– lizofosfolipáz D
LPA	– lizofoszfátidsav (lysophosphatidic acid)
LPA1-6	– lizofoszfátidsav receptor
LPAAT	– lizofoszfátidsav-aciltranszferáz

LPC	– lizofoszfamidil-kolin
LPP	– lipid-foszfát-foszfataz
LpPLA2	– lipoprotein-asszociált foszfolipáz A2
LYPLA-I	– lizofoszfolidipáz A-I
MAG	– monoacilglicerol
MAPK	– mitogén-aktivált protein kináz
MCP-1	– monocita kemoattraktáns protein-1
mmLDL	– minimálisan módosított alacsony denzitású lipoprotein
moxLDL	– enyhén oxidált (mildly oxidized) alacsony denzitású lipoprotein
NO	– nitrogén-monoxid
NUC	– nukleáz
PA	– foszfatsav
PAFR	– trombocita-aktivált receptor (platelet-activating factor receptor)
PAP/PPAP	– foszfatsav-foszfataz
PBS	– foszfát puffer oldat (phosphate-buffered saline)
PDE	– foszfodiészteráz
PE	– fenilefrin
pGSN	– plazma gelsolin
PI3K	– foszfamidil-inozitol-3-kináz
PIP2	– foszfamidil-inozitol 4,5-biszfoszfát
PIP3	– foszfamidil-inozitol 1,4,5-triszfoszfát
PKB	– protein-kináz B
PLA	– foszfolipáz A
PLC	– foszfolipáz C
PLD	– foszfolipáz D
PPAR γ	– peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor γ

PTX	– pertussis toxin
S1P	– szfingozin-1-foszfát
SMB	– szomatomedin B
sn	– sztereospecifikus számozás (stereospecifically numbered)
SNP	– nitroprusszid-nátrium
SPC	– szfingozil-foszforil-kolin
TA	– mellkasi aorta (thoracic aorta)
tr	– transzgén
TRIP6	– thyroid receptor-interacting protein 6
TXA2	– tromboxán A2
VCAM-1	– vaszkuláris sejtadhéziós molekula-1 (vascular cell adhesion molecule-1)
VEGF	– vascularis endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
VZ	– ventrikuláris zóna

2. BEVEZETÉS

A lizofoszfátidsav (LPA) kémiai szerkezetét tekintve a legegyszerűbb foszfolipid. Ez azonban egyáltalán nem jelenti azt, hogy biológiai szempontból egyszerűnek nevezhetnénk. A felfedezése óta eltelt nagyjából 50 évben rendkívüli tudásmennyiség halmozódott fel ezen mediátor molekula igen fontos biológiai szerepeivel kapcsolatban.

Az első publikáció, amely a lizofoszfátidsav biológiai hatásával foglalkozott, 1957-ben született. Vogt ló vékonybeléből izolált egy több komponensű, lipid természetű, általa Darmstoff-nak nevezett anyagot, ami nyúlbél kontrakcióját váltotta ki. A hatásért valamilyen savas foszfolipidet tett felelőssé, ami valószínűleg LPA volt (1). 20 év telt el ezután, míg Akira Tokumura – akit nyugodtan nevezhetünk akár a lizofoszfátidsav kutatás atyjának is – munkatársaival szójabab lecitinből izolált egy poláris savas foszfolipidet, amely átmeneti, szimpatikus aktivációtól független vérnyomásemelkedést váltott ki altatott patkányokban (2). Kémiai természetét alapján beazonosították, hogy ez a lipid a lizofoszfátidsav, legnagyobb arányban linoleoil-LPA (3). Az ezt követő években egyre csak szaporodtak az LPA-val kapcsolatos kutatások, de egy igen fontos kérdés megválaszolására még sokáig várni kellett: az LPA hatása vajon specifikus receptorokon keresztül jön létre, vagy a lipid természetéből adódóan valamilyen detergens-szerű tulajdonsága miatt? Az első közlemény, amelyik arra utalt, hogy sejt felszíni receptor közvetíti az LPA hatásait, Wouter Moolenaar laboratóriumában született a 80-as évek végén (4). Megfigyelték, hogy az LPA sejtszaporodást stimuláló hatása pertussis-toxin függő, tehát valószínűleg sejt felszíni, G-fehérjéhez kapcsolt receptor (GPCR) közvetíti. A következő mérföldkő az első LPA GPCR beazonosítása volt 1996-ban (5). A későbbi évek kutatási eredményei alapján már tudjuk, hogy a lizofoszfátidsav legalább 6 sejt felszíni, G fehérjéhez kapcsolt receptorral rendelkezik, de sejt magi receptort is képes aktiválni. Egyre bővebbek ismereteink az LPA termelődésének és lebontásának folyamatairól, valamint arról, hogy az LPA számtalan élettani és kórélettani folyamatban tölt be szerepet, aminek irodalma mára akkorára bővült, hogy a következő felsorolás minden bizonnyal hiányos. Az LPA-nak ismert szerepe a férfi és női reprodukció szabályozásában, az embrió beágyazódásában, az idegrendszer és az érrendszer megfelelő fejlődésében, az atherosclerosisban, a csontanyagcsere szabályozásában, különféle szervek fibrotikus

átalakulásában, a neuropátiás fájdalom kialakulásában, a haj megfelelő fejlődésében, számos ponton beavatkozik az immunfunkciókba, és vitathatatlan szerepe van többféle tumor terjedésében és progressiójában (6, 7).

Munkacsoportunk a kétezres évek végén kezdett el foglalkozni a lizofosfolipid mediátorok vaszkuláris hatásaival; eleinte a lizofoszfátidsavval rokon szfingozin-1-foszfát értónusra kifejtett hatását vizsgáltuk. Érdekes, hogy bár a lizofoszfátidsav első megismert hatásai épp a simaizom-tónussal és az értónushoz szorosan kapcsolódó vérnyomás-szabályozással kapcsolatban születtek, később az LPA értónus szabályozásban betöltött szerepének vizsgálata során ellentmondó irodalmi adatok születtek (l. 2.4.5 fejezet). Ezen ellentmondások tisztázása érdekében kezdtük meg kutatásainkat 2011-ben. Először azt figyeltük meg, hogy az LPA izolált éren kettős – vazorelaxáns és vazokonstriktor – hatással rendelkezhet. Célunkként tűztük ki az LPA értónusra kifejtett kettős hatásának részletes megismerését, és a hatás létrejötte mögött álló szignáltranszdukciós utak feltárását.

2.1. A lizofoszfátidsav kémiai szerkezete és előfordulása a szervezetben

A szervezetben a lipid típusú vegyületek funkcionálisan három nagy családot alkotnak: a strukturális lipideket, amik a biológiai membránok felépítésében játszanak szerepet, a tápanyagraktárakat alkotó lipideket, és olyan lipideket, amelyeknek jelátvivő folyamatokban van szerepe. Ez utóbbiak általában extracellulárisan kötődnek valamilyen receptorhoz, és jelátviteli folyamatok széles spektrumát indíthatják el. Az eikozanoidok és a szabad zsírsavak mellett a lizofoszfólipidek egy igen fontos csoportja a jelátvivő lipideknek. Ebbe a csoportba tartoznak a lizofoszfátidsav különböző típusai és a szfingozin-1-foszfát, de tágabb értelemben az endokannabinoid típusú vegyületek is (8).

2.1.1. A lizofoszfátidsav kémiája

A lizofoszfátidsav (LPA) az egyik legegyszerűbb glicerofoszfólipid. Valójában nem is egy vegyület, hanem egy egész vegyületcsalád, melynek tagjaiban közös, hogy szerkezetileg három alegységből épülnek fel: glicerinvázból, egy foszfátcsoporthoz (hidrofil fej) és egy zsírsavláncból (hidrofób farok). Az LPA a membránokat felépítő foszfátidsavtól eltérően csak egy hidrofób zsírsavláncot tartalmaz, innen ered nevében a „lizo”- előtag, vagyis olyan foszfátidsav, amiről az egyik oldallánc hidrolízissel eltávolításra került. Az LPA család számos taggal rendelkezik, amik különbözősége három fő tényezőtől ered: milyen zsírsavlánc, melyik pozícióban, milyen kötéssel kapcsolódik a glicerinvázhoz. Néhány, természetben gyakran előforduló LPA szerkezetét és neveit az 1. ábra mutatja.

A kapcsolódó zsírsavlánc két fő tulajdonsága a lánc hosszúsága, és annak telítettsége. A lánchosszúság a természetben előforduló LPA-k esetében többnyire hosszú, 12-22 szénatom között változó, páros számú. Leggyakrabban a 16, 18 és 20 szénatomot tartalmazó zsírsav oldallánccok fordulnak elő (7). Lehet telített, vagy telítetlen, ez utóbbi esetben egyszeresen, illetve többszörösen telítetlen. A telítetlen LPA-kban a kettős kötések cisz-konfigurációval rendelkeznek, mert a természetben transz-zsírsavak ritkán fordulnak elő.

gyakrabban fordulnak elő a természetben. Léteznek ugyanakkor alkil- és alkenil-éter analógok is (10, 11) – más néven alkil- és alkenil-glicerofoszfátok – amik általában gyengébb agonisták az LPA receptorokon. Kivételt képeznek ez alól az LPA₅ és a PPAR γ receptorok, melyek preferálják őket az acil-származékokkal szemben (12, 13).

Az eredetileg nyálkagombákban felfedezett ciklikus foszfátidsav (cPA) szintén egy természetes LPA analóg, amely emlőssejtekben is termelődik. Benne az sn₂ hidroxil-csoport az sn₃ pozíciójú foszfáttal 5 tagú gyűrűt képez. Több LPA GPCR-on is gyenge agonista hatású, míg intracellulárisan képződve a PPAR γ -t gátolja (6).

2.1.2. A lizofoszfátidsav előfordulása a szervezetben

A lizofoszfátidsav az összes eddig vizsgált eukarióta szövetben előfordul (14). Koncentrációját meghatározták már számos szövetben és biológiai folyadékban mind élettani, mind kórélettani körülmények között. A legmagasabb LPA koncentráció az egyes biológiai folyadékok közül a vérszérumban mérhető (15), ahol koncentrációja akár a 10 μ M-os értéket is elérheti (16). Emellett kisebb koncentrációban megtalálható a vérplazmában (alacsony mikromoláris), nyálban, follikuláris folyadékban, hasúri folyadékban, könnyben, cerebrospinális folyadékban, csarnokvízben, valamint az aktivált vérlemezkékben, az agyban és a gerincvelőben (17).

Az LPA plazmakoncentrációja számos módszerrel mérhető, amik közül több (pl. a különféle kromatográfiás/spektrometriás eljárások) alkalmas az egyes LPA specieszek elkülönítésére is (18). Így tudjuk, hogy a plazmában legnagyobb arányban a linoleoil-LPA (18:2 LPA) található, és ebben az egyes szerzők nagyjából egyetértenek (19, 20). A plazmában további, gyakran előforduló LPA specieszek az arachidonoil- (20:4 LPA), palmitoil- (16:0 LPA), dokozaheptaenoil- (22:6 LPA), sztearoil- (18:0 LPA) és oleoil-LPA (18:1 LPA) (19, 20). A szérumban némileg megváltozik az egyes LPA típusok megoszlása, de legnagyobb ez esetben is a linoleoil- és arachidonoil-LPA-k részesedése (20). Úgy tűnik, mind a plazma, mind a szérum esetében elsősorban a telítetlen LPA származékok vannak többségben. Vérlemezkék aktiválása során az általuk termelt LPA típusok elsősorban telítettek – palmitoil- és sztearoil-LPA (21) – így nem valószínű, hogy a szérum képződésekor az LPA az aktivált vérlemezkékből származna. Ennek részleteire még többször visszatérek a dolgozat során.

Az LPA koncentrációja mérhető különféle assay-k segítségével is, amelyek ugyan nem tudják elkülöníteni egymástól az egyes LPA specicszeket, de a fenti módszereknél jóval egyszerűbben kivitelezhetőek. Ez különösen azért fontos, mert számos kórállapotban megfigyelték az LPA plazmakoncentrációjának emelkedését, ami miatt az LPA mint e betegségek biomarkere is szerepet kaphat. Az egyes kolorimetriás, fluorimetriás LPA assay-k, vagy LPA ELISA-k így akár a klinikai gyakorlatban is hasznosak lehetnek (18, 22). Hosogaya és munkatársai egészséges emberek plazmáját vizsgálták. Eredményeik szerint az LPA plazmakoncentrációja valamivel a μM -os tartomány alatt van, nőkben szignifikánsan magasabb (23).

A fenti vizsgálmódszereket használva azt találták, emelkedik a plazma LPA szintje terhességben (24), akut és krónikus májkárosodásban (25, 26), petefészekdaganatban (27), koszorúér betegségben (28), akut miokardiális infarktusból (28-31) és iszkémiás stroke-ban szenvedőkben (32) valamint pitvarfibrilláló betegek tünetmentes agyi infarktusaiban (33). Magasabb az LPA szintje tüdőfibrozisos betegek bronchoalveoláris lavage-folyadékában, mint egészségesekében (34), és igen magas az LPA koncentrációja petefészek- és hasnyálmirigy-tumoros betegek hasúri folyadékában is (35, 36). LPA felhalmozódását figyelték meg érlelmeszedés során elsősorban a plakkok lipidben gazdag magjában (37), ami előrehaladott stádiumban akár 40-szeres is lehet, és elsősorban a hosszú, telítetlen zsírsavláncú formák megjelenésével jár (38).

Hidrofób karakterének köszönhetően a lizofoszfátid sav hajlamos egyéb lipidekkel, vagy fehérjékkel összekapcsolódni mind biológiai folyadékokban, mind a sejteken belül. A vérplazmában az LPA elsősorban albuminhoz kötődik, annak zsírsavkötő helyéhez (39). Az LPA kötődése az albuminhoz limitálhatja az LPA hatását a receptorain. Ez magyarázhatja azt a jelenséget, hogy miért van szükség kb. 1000-szer nagyobb koncentrációjú LPA-ra a vérlemezkék aktiválásához vérplazma jelenlétében, mint anélkül (40). Az albumin mellett az LPA a plazmában egy gelsolin nevű fehérjéhez is kötődhet. A gelsolint eredetileg egy intracelluláris aktin-kötő fehérjeként írták le, de van egy szekretált izoformája is, amit plazma gelsolinnak (pGSN) neveznek. Ez a forma meg tudja kötni a sejtek sérülésekor a vérplazmába kijutó aktint, képes azonban LPA és egyéb bioaktív mediátorok (pl. lipopoliszacharid) kötésére is. Feltételezett szerepe abban áll, hogy lokális szövetsérüléskor a plazmába kerülő aktin leszorítja a gelsolinról

az LPA-t és a többi kötött mediátort, így azok kifejthetik hatásukat a védekezésre (host defense) és a szöveti regenerációra. Jelentős szövetkárosodáskor azonban a gelsolin szintje kritikusan lecsökkenhet, ilyenkor a nem puffereelt mediátorok távoli szervek másodlagos károsodását okozhatják (41).

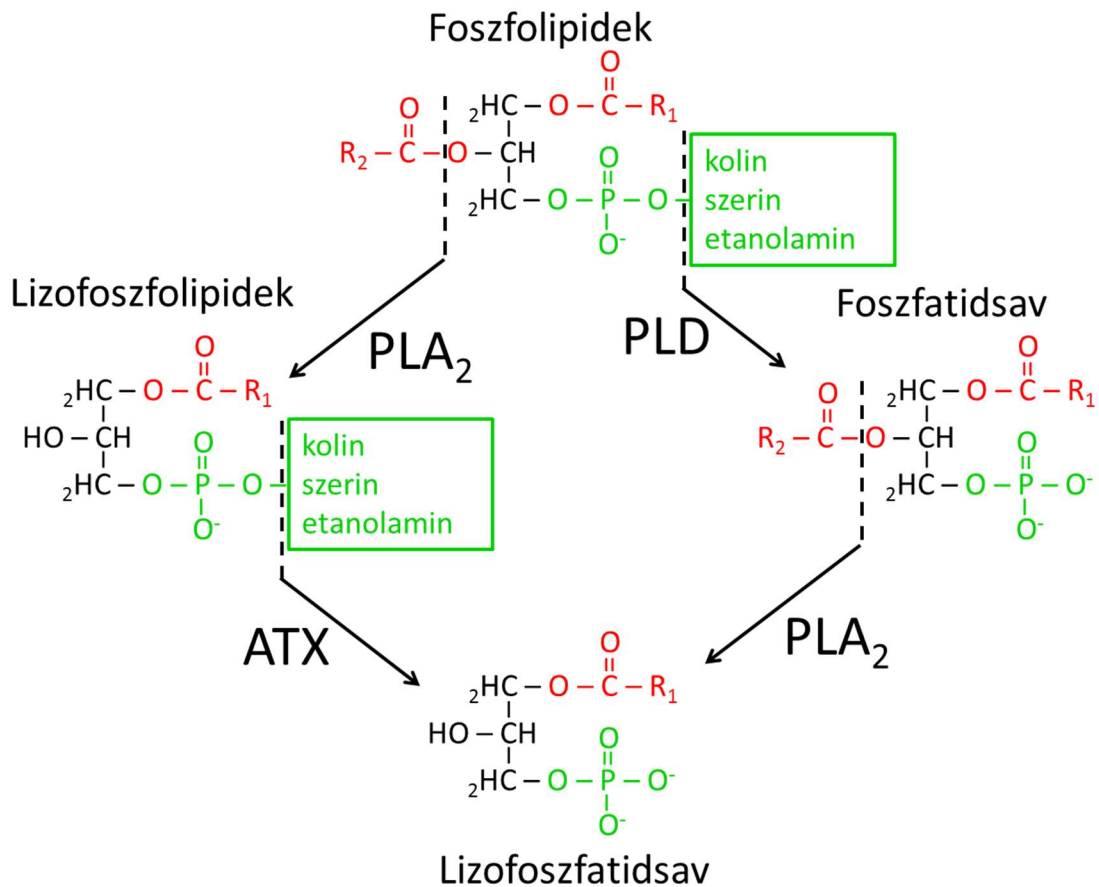
Sejteken belül az LPA megkötésére az ún. máj zsírsavkötő fehérje (LFABP, liver fatty acid binding protein) képes, ami a májon kívül a vékonybélben és a vesében is előfordul. Ennek a fehérjének a szerepe a zsírsavak sejten belüli elosztása, döntően a membránból az oxidációs utak, vagy a tárolás felé, kisebb mértékben a sejtmag receptoraihoz való irányítása (42). A zsírsavakhoz hasonlóan az LPA és a lizofosfolipidek is kötődhetnek hozzá, bár a zsírsavaknál lényegesen gyengébb affinitással (39). Ennek ellenére, mivel az LFABP koncentrációja az említett szövetekben rendkívül magas, szerepe lehet a sejtmembránban foszfolipázok hatására képződő LPA puffereelésében, és esetleg a sejtmagi LPA receptor aktivációjának befolyásolásában (43). Újabban leírták a szív-típusú FABP szerepét humán koronária endotelsejteken, ahol valószínűleg a PPAR γ aktivációt befolyásolja azzal, hogy a kívülről érkező LPA-t a sejtmagba irányítja (44).

2.2. A lizofoszfatisav metabolizmusa

A lizofoszfatisav koncentrációja mind az egyes testfolyadékokban, mind a sejteken belül egy olyan egyensúlyi állapotot mutat, ami a képződésében és lebontásában részt vevő enzimek összehangolt működéséből fakad. Ezek az enzimkészletek különböznek aszerint, hogy az LPA mint extracelluláris hírvivő molekula, esetleg a sejten belüli anyagcserefolyamatok intermedier terméke, vagy másodlagos hírvivő szerepét tölti-e be. Mivel az LPA koncentrációjának megváltozása számos kórállapottal összefüggésbe hozható, a termelésében és lebontásában szereplő tényezők megismerése alapvető jelentőségű.

LPA a szervezetben döntően két fő útvonalon képződik (45). A kiindulási vegyület mindkét esetben valamilyen foszfolipid – foszfatidil-kolin, foszfatidil-szerin vagy foszfatidil-etanolamin – amelyekből a 2. ábra látható módokon, degradációval képződik az LPA. Biológiai folyadékokban mint a szérum, vagy a plazma, és zsírs sejtekben az LPA lizofoszfolipidekből (pl. lizofoszfatidil-kolinból) képződik a 2. ábra bal oldalán bemutatott lépések során. Ebben a reakcióútban első lépésként egy A típusú foszfolipáz (PLA) lehasít a foszfolipid molekuláról egy acil-csoportot; amennyiben ez a PLA₂ enzim, az sn2 pozícióban lévő zsírsavlánc hasad le, sn1 lizofoszfolipidet eredményezve (ez a példa szerepel a 2. ábra), fordított esetben, PLA₁ enzim hatására sn2 lizofoszfolipidek képződnek. Az így képződött lizofoszfolipidről a poláris fejet a lizofoszfolipáz D-nek, vagy autotaxinnak (lizoPLD, ATX) nevezett enzim hasítja le, aminek részleteit ezen enzim kiemelt jelentősége miatt a 2.2.1 fejezetben külön ismertetem. A 2. ábra jobb oldalán látható útvonal leginkább sejtekben/sejtek felszínén játszódik le: a foszfolipidekből a poláris fej eltávolítását a foszfolipáz D (PLD) enzim végzi, majd a zsírsavláncot a már említett PLA₂ enzim hasítja le. Ilyen módon termelődik LPA pl. a vérlemezkékben vagy tumorsejtekben. Emellett a sejten belüli LPA képződésnek legalább két további útvonala is ismert: a glicerol-3-foszfát-aciltranszferáz enzim (GPAT) glicerol-3-foszfátot acilálja acil-CoA-ból származó zsírsavlánccal, illetve a monoacil-glicerol-kináz (MAG-kináz), amely monoacil-glicerol foszforilálásával képez lizofoszfatisavat. E két útvonal során az LPA elsősorban mint a glicerolipid szintézis köztes terméke szerepel (46).

A lizofoszfátidsav lebontásában szintén több enzim vesz részt. Az LPA visszaalakulhat foszfátidsavvá LPA-aciltransferáz (LPAAT) segítségével, defoszforilálhatják különböző lipid-foszfát-foszfátázok (LPP) monoacil-glicerolt eredményezve, vagy lizofoszfolipázok lehasíthatják róla a zsírsavat, így glicerol-3-foszfát képződik (43). Mivel az LPP család egyes típusainak kiemelt szerepe van az extracellulárisan képződő LPA eliminálásában, így ezzel külön foglalkozom a 2.2.3 fejezetben. Az LPA keringésből való eltávolításában nagy szerepe lehet a májnak. Az intravénásan, kívülről bevitt LPA-nak akár a 90 százaléka már az első áthaladás során felvételre kerülhet a májsejtekbe (first pass metabolizmus) (47).



2. ábra A lizofoszfátidsav képződésének két legjelentősebb útvonala. PLA₂ – foszfolipáz A₂, PLD – foszfolipáz D, ATX – autotaxin, lizofoszfolipáz D, R₁ és R₂ – zsírsav oldalláncok sn1 illetve sn2 pozícióban. A példában bemutatott PLA₂ helyett PLA₁ is szerepelhet, ekkor az sn1 pozícióban lévő zsírsav hasítódik le és 2-acil-LPA képződik. Piros színnel a zsírsav oldalláncok (jelen esetben észterek), zöld színnel pedig a foszfát csoport és a hozzá kapcsolódó funkciós csoportok kerültek megjelölésre.

2.2.1. A lizofoszfatisav extracelluláris képződése – az autotaxin

A 2. ábra bal oldalán látható útvonal kiemelt jelentőségű az egyes biológiai folyadékokban megtalálható lizofoszfatisav kialakulása szempontjából. Az autotaxin működéséhez két fő úton kerülhet lizofoszfolid szubsztrát a szérumba: az aktivált vérlemezkék membránjából a szekretoros PLA₂, vagy a foszfatidil-szerin specifikus PLA₁ hatására, vagy a lipoproteinekben található foszfatidil-kolin alakulhat lizofoszfátidil-kolinná (LPC) a lecitin-koleszterin-aciltranszferáz (LCAT) enzim hatására. Az előbbi folyamat vérlemezke aktivációt igényel, így elsősorban sérülés, gyulladás vagy atherosclerosis környezetében játszódik le, míg a második folyamat egészséges körülmények között is szolgáltat szubsztrátot az LPA képződéséhez (48).

2.2.1.1. Az autotaxin felfedezése

Lance Liotta és mtsai. az 1980-as években tumorsejtek médiumából olyan faktorokat izoláltak, amik ugyanezen tumorsejtek invazivitását és motilitását fokozzák és ezen hatás miatt autokrin motilitási faktoroknak nevezték (AMF) el őket (49). Később ugyanez a munkacsoport humán melanómasejtek médiumából izolált és részben szekvenált egy AMF-et, ami pertussis-toxin függő módon fokozta tumoros sejt típusok motilitását (50), és az autotaxin nevet adták neki. 1994-ben aztán szekvenálták az autotaxint, és rájöttek, nagyon hasonlít a PC-1 nevű nukleotid-pirofoszfátáz/foszfodiészteráz enzimre, ami aktivált fehérvérsejtek felszínén található (51). Valóban, az autotaxinnak van ATP-áz és ATP-pirofoszfátáz aktivitása, de ez nem magyarázta meg akkoriban, hogy az extracelluláris nukleotid és nukleozid képződés hogyan is tudná fokozni a sejtek motilitását, hiszen a fent említett anyagoknak nem volt ilyen jellegű ismert hatása.

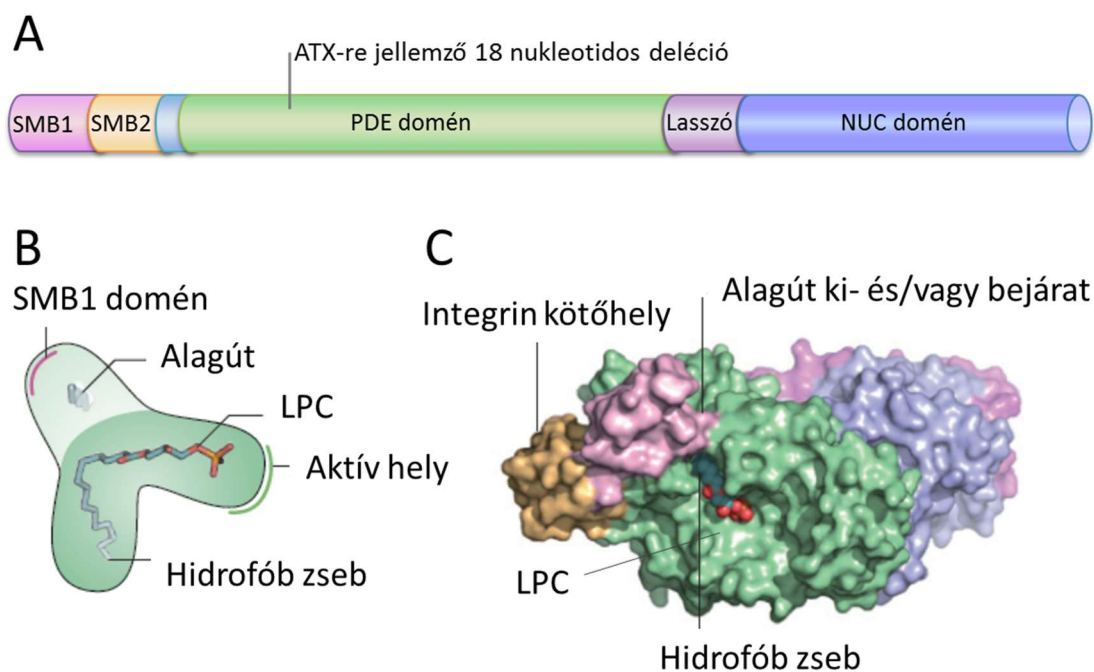
Mindeközben az 1980-as években Tokumura munkacsoportja azt kezdte vizsgálni, hogyan keletkezik az általuk korábban vérnyomásemelő anyagként azonosított lizofoszfatisav (l. 8. oldal). Azt találták, hogy patkány vérplazmát 37 °C-on inkubálva fokozódik annak vérnyomásemelő hatása, és a hatást az LPA okozza (52). A plazmában található foszfolipidek alapos vizsgálata során telítetlen, elsősorban többszörösen telítetlen oleoil-, linoleoil- és arachidonoil-LPA felszaporodását észlelték,

miközben ezzel párhuzamosan a lizofoszfátidil-kolin szintje lecsökkent. A folyamatért felelős enzimet lizofoszfolipáz D-nek nevezték el (lizoPLD). Ezt követően egy másik munkacsoport igazolta, hogy hasonló folyamat játszódik le szérum preparálásakor, mert a plazmához képest a szérum LPA tartalma jelentősen nagyobb, vagyis az a véralvadás folyamata során szabadul fel (53). Ekkor még azt gondolták, az LPA az aktivált vérlemezkékből származik. 2002-ben végül két kutatócsoport is bebizonyította, hogy a lizoPLD megfelel az autotaxinnak (54, 55), és az ATX valójában egy LPA-t termelő enzim, megmagyarázva ezzel az enzim eddig érthetelen motilitásfokozó hatását. Az ATX tehát egy olyan speciális ektonukleotid pirofoszfátáz/foszfodiészteráz típusú enzim (ENPP), ami lizofoszfolipáz D aktivitással rendelkezik. 2011-ben végül ismertté vált az enzim kristályszerkezete is (56), aminek segítségével már egészen jól lehet ismerni működési sajátosságait is.

2.2.1.2. Az autotaxin szerkezete és működési sajátosságai

Az ATX-nak jelenleg 5 izoformáját ismerjük (α - ϵ), amik az ATX mRNS-ének alternatív splicing-ja során képződnek. Az eredetileg plazmában beazonosított izoforma az ATX β volt, szinte minden autotaxinnal kapcsolatos ismeretünk a béta izoformával végzett kutatásokból származik (57).

Az ATX szerkezetileg több részből áll: két szomatomedin B-szerű domént (SMB1 és SMB2) a központi katalitikus foszfodiészteráz domén (PDE) és a nukleáz-szerű domén (NUC) követi, ez utóbbi kettőt egy lasszó hurok választja el egymástól (l 3. ábra A panel). A domének egy meglehetősen merev struktúrába rendeződnek, amit több intramolekuláris kölcsönhatás tart fenn (58).



3. ábra Az autotaxin szerkezete. A panel: az autotaxin (ATX) enzim doménjeinek elrendeződése. B panel: sematikus ábra az aktív hely, a hidrofób zseb és a csatorna feltüntetésével, lizofoszfátidil-kolint kötött állapotban. C panel: az ATX felszínének ábrázolása a lizofoszfátidil-kolin (LPC) gömbmodelljével; ebből a nézetből jól látszik a lapos felszín és az alagút nyílása. Moolenaar és Perrakis ábrájának felhasználásával készült (58).

A katalitikus domén az enzimaktivitás mellett két struktúra kialakításában játszik döntő szerepet. Egyrészt kialakít egy lipidkötő zsebet közvetlenül az aktív hely mellett (l. 3. ábra B és C panelek). A többi ENPP-től eltérően az ATX-ből az evolúció során elveszett egy 18 aminosav hosszúságú részlet, aminek következtében kialakul egy mély hidrofób üreg az enzimen belül. Ide pontosan be tud illeszkedni néhány lizofoszfolid/lizofoszfátidsav zsírsavlánca, de kizárólag lizo- származékoké, mert a két zsírsavláncot tartalmazó diacil foszfolipidek már nem szubsztrátjai az enzimnek. A zseb hossza alapján legkényelmesebben a mirisztoil-LPC/mirisztoil-LPA fér a zsebbe, a hosszabb zsírsavlánc csak akkor, ha egy vagy több kettőskötés mentén a lánc kanyarodik és ezzel rövidül (58, 59). Ez magyarázza az enzim korábbról már ismert preferenciáját a rövid oldalláncú és/vagy telítetlen LPC és a neki megfelelő LPA iránt. Az ATX egyébként a fejcsoportok között nem diszkriminál, sőt nem meglepő módon szfingozin-1-foszfátot (S1P) is tud képezni az LPC-vel nagyon hasonló szerkezetű, de szfingoid vázat tartalmazó szfingozil-foszforil-kolinból (SPC) (60), ez pedig arra utal,

hogy a glicerín váz sem döntő a szubsztrátspecificitás szempontjából. A zseb mellett egy másik fontos sajátossága az ATX-nak egy alagút kialakulása a zseb és az egyik – egészen lapos – felszín között (l. 3. ábra B és C panelek). A katalitikus domén mellett az SMB1 domén is részt vesz ennek kialakításában. Az alagút legvalószínűbb (bár még nem eléggé bizonyított) funkciója az, hogy átalakítás után a képződött LPA a nyíláson keresztül közvetlenül a sejtmembránhoz irányítódik. Erre utal az, hogy a nyílás az enzim lapos oldalára vezet, ugyanis az ehhez hasonló lapos felszín más enzimeknél abban segít, hogy az enzim rásimulhasson a sejtmembránra, és oda másodlagos kötésekkel szorosan kapcsolódjon. Eszerint az elképzelés szerint az ATX egy különleges enzim, ami prezentálja is termékét a megfelelő receptoroknak, így lokalizálva az LPA hatását (58).

Az SMB domének általában arról ismertek, hogy fehérje-fehérje kölcsönhatásokat tudnak kialakítani. Az autotaxin esetében az SMB doméneknek úgy tűnik, két fontos feladata van. Egyrészt az SMB1 számos fehérjén belüli kölcsönhatással szorosan kapcsolódik a PDE alegységhez, és valószínűleg szabályozza a katalitikus aktivitást. Emellett egy másik jelentős funkció, hogy az SMB2-n keresztül az autotaxin integrin receptorokhoz kapcsolódik. Ezáltal ugyanis az ATX vérlemezkék, vagy limfociták felszínéhez tud kötődni, tovább segítve a felszabaduló LPA célba irányítását, vérlemezkék esetében pl. a sebgyógyulás helyére (58, 61). Az ATX kinetikáját tekintve úgy tűnik, lassan köti a szubsztrátot, és lassan engedi el a képződött terméket. Ezt a folyamatot gyorsíthatja az enzim integrinekhez kötődése, ilyenkor ugyanis az SMB domén elmozdul, ami csökkenti az LPA affinitását az enzimhez, vagyis könnyebben válik le az ATX-ről (58).

2.2.1.3. Az autotaxin előfordulása a szervezetben és élettani jelentősége

Az autotaxin pre-pro-enzimként szintetizálódik, majd glikozilációt és proteolitikus érést követően a klasszikus szekretoros úton jut ki a sejtől mint aktív lizofosfolipáz. Bár az ATX döntően lokálisan ható enzim (l. fent), több testfolyadékban és szövetben is kimutatható koncentrációban van jelen. Bőségesen megtalálható többek között a cerebrospinális folyadékban, a vizeletben, nyálban és a vérben (vérplazmában, még inkább a szérumban). A keringő ATX legvalószínűbb forrása a limfoid szövetek magas

endotélú venulái és a zsírszövet, mert ezekben a szövetekben lehetett különösen magas ATX expressziót kimutatni. Ugyanakkor féléletideje rövid, mert a máj igen gyorsan lebontja (57). A szervek közül kimutatható az agyban, a tüdőben, a vesében, a méhlepényben és a petefészekben is (59).

Az autotaxin jelentősége akkor vált nyilvánvalóvá, amikor megpróbálták létrehozni az ATX knock out egértörzset, de nem jártak sikerrel, mert a homozigóta KO egér életképtelennek bizonyult (részletesen l. a 2.4.3.2 fejezetben). A klasszikus KO egerek többszörös fejlődési rendellenessége és életképtelensége (59, 62, 63) hangsúlyozza az ATX nélkülözhetetlen szerepét az egyedfejlődésben. Azt, hogy a fejlődési rendellenességek kialakulásáért az általa termelt LPA hiánya felelős, leginkább az mutatja, hogy már az olyan mutáció is halálos, ami csak a katalitikus aktivitásért felelős régió egyetlen aminosavát érinti (64). Az ATX születés után betöltött élettani szerepét a klasszikus KO hiánya miatt nehezen lehet vizsgálni. Katsifa és munkacsoportja a közelmúltban minden sejtben kialakuló, de csak tamoxifen kezeléssel indukálható ATX deléciót hordozó egeret hozott létre, így meg tudták vizsgálni az ATX hiányának hatását felnőtt egerekben (65). Azt tapasztalták, hogy sem a vérplazma ATX aktivitásának akár 80%-os csökkenése, és az ennek következtében jelentősen lecsökkenő LPA-szint, sem az általuk vizsgált szövetek ATX expressziójának minimálisra csökkenése nem eredményezett jól látható fenotípust felnőtt korú egyedekben. Ez azonban nem jelenti azt, hogy ne lenne szerepe születés után is. Igazolták jelentőségét a sebgyógyulás folyamatában, a szöveti átépülésben, számos szövetféleség érésében (pl. csont, csontvelő, hajhagyma), az oxidatív stresszel szembeni védekezésben, a fehérvérsejtek extravazációjában, terhességben, illetve tumorok invazivitásában és áttétképzésében (59, 66). Az ATX expressziójának, illetve aktivitásának fokozódását számos állapotban kimutatták már, aminek összefoglalását az 1. táblázat tartalmazza. Ugyan további kutatásokat igényel még, de a későbbiekben az ATX hasznos biomarkere lehet a felsoroltak közül több betegségnek is.

1. táblázat Az autotaxin koncentrációjának, illetve expressziójának emelkedése néhány (kór)állapotban. Yukiura és Aoki összefoglaló közleménye alapján (59), kiegészítve.

Állapot/kórállapot	Szövet vagy testfolyadék	Hivatkozás
Terhesség	Szérum	Tokumura és mtsai. 2002 (24)
Epepangás/viszketés	Szérum	Bolier és mtsai. 2016 (67)
Krónikus májgyulladás	Szérum	Watanabe és mtsai. 2007 (26)
Akut májelégtelenség	Plazma	Watanabe és mtsai. 2007 (25)
Meszes aortasztenózis	Plazma	Nsaibia és mtsai. 2016 (68)
2-es típusú diabétesz	Zsírsejtek	Boucher és mtsai. 2005 (69)
Elhízás	Zsírsejtek	Ferry és mtsai. 2003 (70)
Ízületi gyulladás	Ízületi nedv	Nikitopoulou és mtsai. 2012 (71)
Gyulladásos bélbetegség	Bélnyálkahártya	Hozumi és mtsai. 2013 (72)
Vízhólyag	Vízhólyag nedve	Mazereeuw-Hautier és mtsai. 2005 (73)
Számos tumor (pl. emlő, vese, máj, glioblastoma, lymphoma)	Tumorszövet	Összefoglalva: Aoki és mtsai. 2008 (45)
Nőgyógyászati tumorer (pl. petefészekrák, méh mióma)	Hasúri folyadék	Tokumura és mtsai. 2007 (74)

2.2.2. A lizofoszfátidsav képződésének sejtmembránhoz kötött útvonala

A 2. ábra jobb oldalán látható útvonal során LPA foszfatidsavból (PA) képződik specifikus lipázok közreműködésével. A szubsztrátul szolgáló foszfatidsav képződhet az ábrán jelölt módon PLD enzim hatására foszfolipidekből, vagy diacil-glicerolok foszforilálásával, amit a diacilglicerol-kináz enzim (DAG-kináz) végez. A PA képződésének legvalószínűbb helye a sejtmembrán, itt aztán membrán-kötött, PA-ra szelektív PLA₁ enzimek alakítják tovább (az enzimek másik neve LIPH és LIPI) sn2 típusú LPA-vá (45). Ennek az útvonalnak a szerepe lényegesen kevésbé vizsgált, mint az autotaxinhoz kapcsolt útvonalé. A LIPH genetikai defektusát kimutatták a hipotrichozis egyik formájában, ahol az általa termelt LPA valószínűleg LPA₆ receptoron keresztül kifejtett hatása esik ki (75). A LIPH túlprodukciója kimutatható különböző tumorokban, ahol érdekes módon inkább a jobb túléléssel korrelál a szintje

(76, 77). Egy korai elképzelés szerint véralvadáskor az aktivált vérlemezkékben PA képződik, majd a PA-szelektív foszfolipázok hatására LPA kerül a vérbe. Mára azonban az az elfogadott nézet, hogy a szérumban található LPA-nak csak kis része származik a vérlemezkékből. Az aktivált vérlemezkék ugyanakkor lizofoszfolipideket szabadítanak fel, amit a szérumban található lizoPLD, vagyis autotaxin alakít LPA-vá (59, 78).

2.2.3. A lizofoszfátidsav lebontása – lipid foszfát foszfátázok

1991-ben Jamal és munkatársai azonosítottak egy 2-es típusú foszfátidsav-foszfátáz (PAP2) enzimet patkány máj plazmamembránban (79). A foszfátidsav-foszfátázok (PAP) a sejtek lipidháztartásának kulcsszereplői, a foszfátidsavról eltávolítva a foszfátesoportot DAG képződik, ami megnyitja az utat a komplex foszfolipidek és a trigliceridek szintézisének irányába. Mivel a 2-es típusú PAP a sejtmembránban található, már korán feltételezték róla, hogy esetleg valamilyen szignáltranszdukciós folyamat szabályozásában lehet szerepe. A fent említett foszfátázról később valóban kiderült, hogy képes számos jelátvitelben fontos lipid foszfát, többek között a lizofoszfátidsav (MAG képződik belőle), a szfingozin-1-foszfát (szfingozin képződik belőle) és a ceramid-1-foszfát (ceramid képződik belőle) hidrolízisére is, ezért átnevezték lipid foszfát foszfátázra (LPP) (80). A ma ismert 3 féle LPP izoforma mindegyike membránkötött, 6 transzmembrán szakasszal rendelkezik, és mindkét vége a citoplazma felé irányul. A katalitikus aktivitásért felelős rész ugyanakkor – nem meglepő módon – a sejten kívülre néz, lehetővé téve az extracelluláris lizofoszfolipid hidrolízist (66). Szerencsétlen módon az őket kódoló gének a régi nomenklaturát követve PPAP2A, B és C jelölést kaptak. Az LPP enzimek extracelluláris katalitikus aktivitásuknak köszönhetően részt vesznek mind a vérben, mind a sejtek mikrokörnyezetében létrejövő LPA lebontásában, így segítve egy egyensúlyi koncentráció kialakulását. Ezt bizonyítja, hogy LPP1 fokozott expressziója fibroblasztokban megnövelte az LPA, S1P és több más szubsztrát lebontásának mértékét (81), valamint LPP csökkent expressziója LPP1 hipomorf egérben (Ppap2a^{tr/tr}) magasabb plazma LPA koncentrációval jár. Ezekben az egerekben az LPA féléletideje a plazmában a normális 3 percről 12 percre növekedett (82). Bár az LPP-k a lizofoszfátidsavat MAG-ra bontva az LPA szignalizációt megszakítják, van ezalól egy érdekes elméleti kivétel: arachidonoil-LPA hidrolízise során 2-arachidonoil-glicerol

képződik, ami egy endokannabinoid, ami aztán arachidonsavvá is továbbalakulhat, utat nyitva az eikozanoidok képződésének. Jelenleg még teljesen ismeretlen, hogy az LPP-knek van-e valóban hatása az endokannabinoid és prostanoid anyagcserére (83). Egy további aspektusa az extracelluláris foszfátáz aktivitásnak, hogy az így képződő MAG már szabadon bejut a sejtbe, és ott esetleg a MAG-kináz közreműködésével újra LPA képződhet belőle, ami agonistája lehet a PPAR γ receptornak (83).

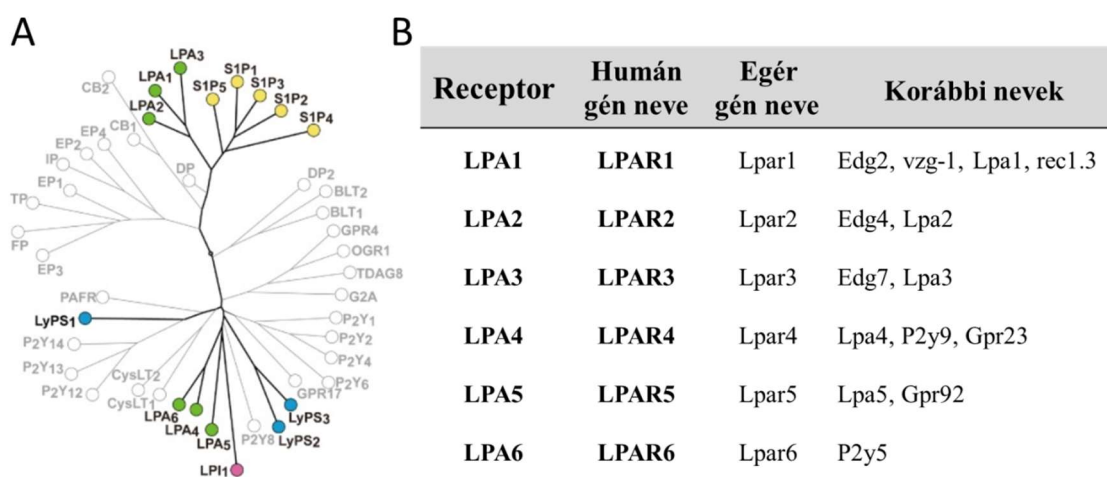
Az LPP enzimekre nézve genetikailag módosított egerek vizsgálata során kiderült, hogy az egyes izoformák más-más jelátviteli folyamatok szervezésében működnek közre. Az LPP1 a vérben lévő LPA turnoverért felelős, az LPP2 hiánya nem jár semmilyen egyértelmű fenotípussal, az LPP3 ellenben nélkülözhetetlen, hiánya méhen belüli elhaláshoz vezet (l. 2.4.3.2 fejezet). Az LPP1 izoforma csökkent kifejeződését számos tumorban megfigyelték, így petefészekrák, veserák, melanóma, tüdőrák, vastagbélrák és leukémia esetében is (84), ami az ATX túlműködéshez hasonlóan (l. 2.2.1.3 fejezet) megbontja az LPA termelése és lebontása közötti érzékeny egyensúlyt a termelés javára.

2.3. A lizofoszfatisav receptorai

A lizofoszfolidideket felismerő receptorok nomenklatúrája zűrzavarosnak tűnhet a velük való első találkozáskor. Ebben a témában kiváló összefoglaló közlemények születtek, amik áttekintik e receptorok felfedezésének történetét, és elmagyarázzák, miért lehet az irodalomban ennyiféle lizofoszfolid receptor névvel találkozni (90, 91).

Évtizedekkel ezelőtt, amikor a lizofoszfatisavat először izolálták szójababból és leírták hatását a vérnyomásra (2, 3, 85), még nagyon messze álltak attól, hogy megértsék, milyen mechanizmussal fejti ki hatásait. Ne felejtjük el, hogy ekkor még jóval az első G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GPCR) klónozása előtt járunk (86)! Az elkövetkező években tehát sorra születtek elméletek az LPA hatásmechanizmusával kapcsolatban (membrán perturbáció, Ca^{2+} -keláció, intracelluláris receptor, másodlagos hírvivő, stb.), főleg abból indulva ki, hogy a klasszikus, akkor már ismert jelátvivő anyagokkal szemben a lipidek szabadon diffundálnak a sejtmembránban. 1989-ben van Corven és munkatársai publikáltak először eredményeket arról, hogy az LPA hatását G-fehérje közvetíti (4). Végül 1996-ban Jerold Chun laboratóriumában klónozták a ma LPA_1 -nek nevezett receptort (5). Deorfanzációját („árvátlanítás”, ismeretlen endogén ligandú GPCR ligandjának beazonosítása, vagyis a GPCR innentől kezdve nem árva) megelőzően ezt a GPCR-t korábban a kódoló génjének expressziós mintázata alapján „ventrikuláris zóna (VZ) gén-1”-nek nevezték. A ventrikuláris zóna – a gerincesek embrionális fejlődése során az agykamrák felszínét határoló szövetréteg – a neurogenesisz színtere, ahonnan az „újszülött” idegsejtek radiális lefutású glia sejteket mintegy létrának használva vándorolnak végső helyük felé, majd alakítják ki az agykérget (87). Az első lizofoszfolid receptor beazonosítását további lehetséges receptorok deorfanzációja követte a szekvenciájuk homológiája alapján. Mielőtt ez megtörtént volna, ezeket az egymással nagyfokú hasonlóságot mutató géneket sokféleképpen nevezték (88), legismertebb az EDG, vagyis endoteliális differenciációs gén család név volt. Az elsőként felfedezett génje ennek a családnak az EDG1 – ma már tudjuk – a szfingozin-1-foszfát 1-es receptorát kódoló génnek felel meg, az akkor még árva receptor pedig az *edg-1* elnevezést kapta. Az EDG nevet még 1990-ben adta neki Hla és Maciag (89), amikor megfigyelték, hogy átírása nagymértékben fokozódik HUVEC sejtekben egy endotél differenciációt indukáló anyagra, így arra

következtettek, hogy e gén szerepet játszhat az endotélsejtek differenciációjában. Ezen kívül arra is rájöttek, hogy a kódolt fehérje valószínűleg egy GPCR. Ezt követően pár év alatt a receptorcsalád új tagokkal bővült, amiket edg és egy szám jelölt (pl. edg2, edg3), bár a sorrend nem feltétlenül következetes, mert nem egyértelműen a beazonosítás sorrendjében növekednek a számok. Ebbe a láncolatba illik időben Chunék 1996-ban tett felfedezése, miszerint az addig vzg-1 és edg2 névvel illetett receptor valójában megegyezik, és a lizofoszfátidsav receptora. Ezt követően hamarosan azonosították, hogy az edg1 és az edg3 viszont szfingozin-1-foszfátot ismer fel (90, 91). Az ezredfordulóra 8 edg-típusú receptort ismertek meg, amik közül öt S1P-t, 3 pedig LPA-t köt. Az LPA és az S1P receptorain belül 50-60%-nyi homológia van, míg a két csoport között kb. 35%. Hogy a nomenklatúrában rendet tegyenek, a kétezres évek elején a receptorok neveit az IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology) ajánlásának megfelelően átalakították, mégpedig úgy, hogy a legnagyobb hatású agonista nevének három betűs rövidítését egy felfedezés sorrendjében növekvő szám követi. Az egyes LPA és S1P receptorok közötti hasonlóságot a 4. ábra A panelje mutatja, az LPA receptorok neveit pedig a B panel tartalmazza.



4. ábra A ma ismert sejtfelszíni lizofoszfolipid receptorok filogenetikai fája és a ma ismert lizofoszfátidsav receptorok nomenklatúrája. Az A panel a lipid GPCR-ok rokonsági fokát ábrázolja, külön kiemelve a lizofoszfolipidek receptorait. Jól látható, hogy az edg- és nem-edg típusú receptorok csak igen távoli rokonságban állnak egymással. Az ábra Kihara és munkatársainak összefoglaló közleményéből származik, módosítás nélkül (92). A B panel a lizofoszfátidsav ma ismert receptorait, az őket kódoló humán illetve egér gének elnevezéseit, és a jelenleg elfogadott nomenklatúra megelőző neveiket tartalmazza.

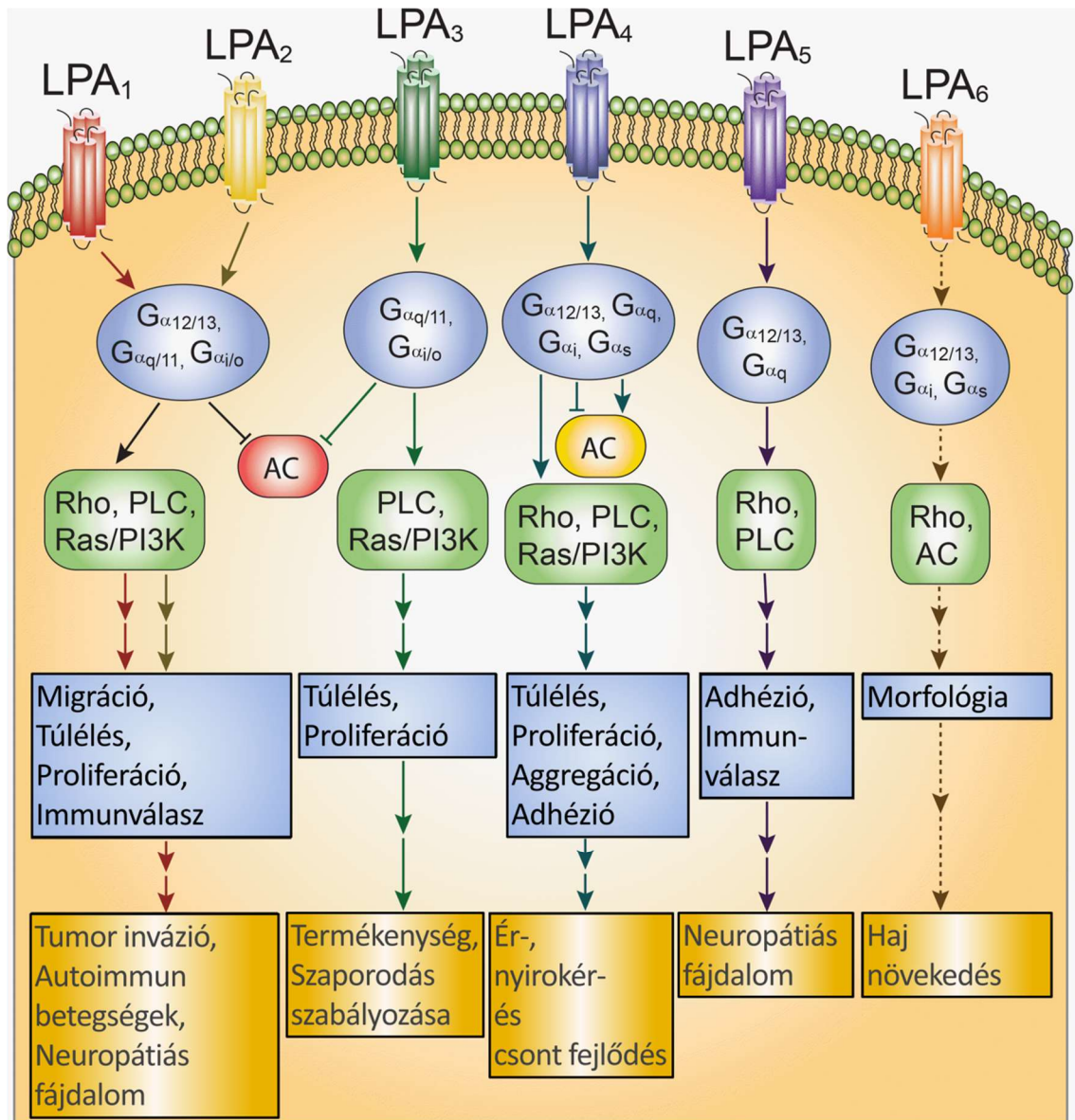
Az edg receptorok azonosítása után voltak arra utaló jelek, hogy léteznek további LPA receptorok is. Amíg az edg családba tartozó LPA receptorok előnyben részesítik az acyl-LPA származékokat, addig pl. a vérlemezkék LPA-függő aggregációja sokkal erőteljesebb, ha ugyanazon LPA típusból az alkil származékot alkalmazzák (93) (l. 41. oldal). Vagy egy másik esetben, amikor LPA hatások voltak megfigyelhetők olyan fibroblastokban, amik egyik edg LPA receptort sem expresszálták (94). Az elmúlt évtizedben ennek megfelelően további három, a P2Y purinerg családba tartozó GPCR-ről derült ki, hogy endogén ligandjuk szintén a lizofoszfátidsav (95-97). A purinerg (vagy nem-edg) típusú LPA receptorok közötti homológia 35-55%-os, míg az edg receptorokhoz mindössze 20-25%-ban hasonlítanak. Nagyon érdekes, hogy bár az edg és a purinerg receptorcsalád között ilyen kicsi a hasonlóság, mégis ugyanazt a ligandot ismerik fel.

Az LPA receptorai négy G fehérje család ($G_{q/11}$, $G_{12/13}$, G_s , $G_{i/o}$) tagjai közül akár többhöz is kapcsolódhatnak, így igen változatos jelátviteli mechanizmusokat indíthatnak el (5. ábra). Az LPA és receptorainak tér- és időbeli eloszlása a szervezetben – vagyis az, hogy az egyes sejttípusok az élet egyes szakaszaiban milyen LPA receptor mintázattal rendelkeznek – képezi az alapját az LPA eddig megismert számtalan élettani és kórélettani hatásának (17).

Vannak további lehetséges receptorai is az LPA-nak, bár IUPHAR konszenzus ezekről még nem született. Ilyen lenne a P2Y5 mint LPA_7 , a P2Y10 mint LPA_8 és a GPR35 mint LPA_9 (6). Ezek a receptorok mind a purinerg családba tartoznak. Amennyiben elegendő független eredmény fogja a jövőben igazolni, hogy e receptorok legfőbb természetes ligandja az LPA, hivatalos IUPHAR jóváhagyást követően újra bővíülhet az LPA receptorok családja.

A lipid GPCR-ok felfedezésének érájában némileg háttérbe szorultak azok a korai kutatási eredmények, amik az LPA hatása mögött intracelluláris folyamatokat sejtettek (6). Pedig LPA több módon is szintetizálódhat a sejten belül (l. 2.2.2 fejezet). A szabad zsírsavat felvenni képes sejtekben a GPAT enzim működése folyamán képződő LPA a zsírsav metabolizmus egyik kulcs intermediere, mind foszfolipidekké, mind a lipidraktárakat feltöltő trigliceridekké képes tovább alakulni. A peroxiszóma proliferátor

aktivált receptor γ – rövidítve $\text{PPAR}\gamma$ – egy sejtmagi receptor, melynek egyebek mellett jelentős szerepe van a zsírsavraktározás és a glükóz anyagcsere szabályozásában. Nem meglepő tehát, hogy az LPA-ról kiderült, képes kötödni hozzá és aktiválni a $\text{PPAR}\gamma$ -t (98).



5. ábra A lizofoszfátidsav sejtfelszíni receptoraihoz kapcsolódó intracelluláris jelátviteli útvonalak. Stoddard és Chun munkájából, magyarra fordítva (99). $G_{q/11}$, $G_{12/13}$, G_s , $G_{i/o}$ – G-fehérje családok; Rho, Ras – kis GTP-ázok; PLC – foszfolipáz C; PI3K – foszfatidil-inozitol-3-kináz; AC – adenil-cikláz.

2.3.1. Az edg receptorcsaládba tartozó LPA receptorok

2.3.1.1. *LPA₁* receptor

Az elsőként felfedezett LPA receptor egyben a legtöbbet tanulmányozott is. Mint az 5. ábra látható, háromféle G-protein, a $G_{q/11}$, $G_{12/13}$ és a $G_{i/o}$ is kapcsolódhat hozzá, így képes beindítani többek között a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK), foszfolipáz C (PLC), Akt és Rho jelátviteli útvonalakat is. Ennek következtében biológiai hatások széles spektrumának kialakítására képes, mint pl. sejt-sejt kapcsolatok, sejtproliferáció és túlélés, sejt migráció, Ca^{2+} mobilizáció vagy adenilcikláz gátlás (17). Az LPA sejt felszíni receptorainak kifejeződését megfelelő antitestek hiányában nehéz vizualizálni, ezért általánosan elfogadott, hogy kimutatásukat a kódoló gének expressziós mintázata alapján végzik. Mind az *Lpar1*, mind az *LPAR1* gének (l. 4. ábra B panel) kiterjedt expressziós mintázattal rendelkeznek felnőtt egérben, illetve emberben, szinte az összes szervrendszerben kimutatták már átíródásukat (pl. agy, tüdő, szív, vese, gyomor, vékonybél, ivarszervek, vázizom, stb.). Az idegrendszer embrionális kifejlődésében betöltött szerepére utaltam már korábban (l. 25. oldal), hiszen eredetileg a ventrikuláris zónában azonosították expresszióját, ami az agykéreg fejlődésének bölcsője (5). Amikor létrehozták az *Lpar1* KO egereket, egyértelmű defektusokat találtak a központi idegrendszer és a koponya fejlődésében. Kb. 50%-uk perinatálisan elpusztul, ami annak tudható be, hogy az agykéreg és/vagy a bulbus olfactorius, valamint az arc és agykoponya fejlődési zavarai miatt (mindkettő érintheti a szaglási funkciót) az újszülöttek nem szopnak megfelelően. Testi fejlődésük így jelentősen elmarad társaikétól, ami súlyosabb esetben elhulláshoz vezet, az életben maradók mérete pedig messze elmarad vad típusú és heterozigóta testvéreikétől (94, 100). Az *LPA₁* receptor szerepét emiatt talán leginkább a központi idegrendszerben térképezték fel. Szerepe van mind a neuronális, mind a glia típusú sejtekben, és ennek következtében érintett számtalan idegrendszeri folyamatban. Emellett olyan neurológiai kórképekben is feltételezik szerepét, mint a hidrokefalusz, a neuropátiás fájdalom, a perifériás neuropátia, vagy különböző neuropszichiátriai betegségek mint a szkizofrénia vagy az Alzheimer kór (101). Az *LPA₁* receptornak azonban nem csak a központi idegrendszerben igazolt a jelentősége, hanem az elhízás kórtanában, tüdő és vese fibrózisban, számos tumor kialakulásában és invazivitásában (pl. petefészek, emlő,

hasnyálmirigy) (17), vagy a kardiovaszkuláris rendszerben az érrendszer kifejlődése során (l. később részletesen a 2.4.3 fejezetben), az érlemeszesedés kialakulásában (l. később a 2.4.4 fejezetben), az érpermeabilitás és az értónus szabályozásában (l. később a 2.4.5 fejezetben). Az LPA₁ receptort a legtöbb természetes LPA típus képes aktiválni, aminek az oldallánc hosszúsága legalább 16 szénatomos (102).

2.3.1.2. LPA₂ receptor

Az LPA₂ receptort kódoló Lpar2/LPAR2 gének expressziós mintázata alapján ez a receptor kevésbé elterjedt a szervezetben, mint az LPA₁. Emberben elsősorban a herében és a fehérvérsejtekben, kisebb mértékben egyéb szervekben (pl. prosztata, lép, hasnyálmirigy) is expresszálódik; egérben az expressziós mintázat alapján e receptor részben más szövetekben fejeződik ki (17). G-fehérje szelektivitása az LPA₁ receptoréhoz hasonló (l. 5. ábra), de meglepő módon néhány tanulmány szerint az LPA₂ receptor G-fehérjétől független intracelluláris jelátviteli utakat is elindíthat. Ilyen a TRIP6 rövidítésű (thyroid receptor-interacting protein 6) fokális adhéziós molekula. Megjegyzendő azonban, hogy az összes ezzel kapcsolatos eredmény egy kutatócsoport munkájához köthető (103, 104). Az LPA₂ hiánya egérben nem jár semmilyen látványos fenotípussal (94). Ugyanakkor az LPA₁ és LPA₂ receptorok együttes kiütése igen fontos adatokat szolgáltatott az LPA érlemeszesedésben betöltött szerepéről (l. 2.4.4 fejezet). Úgy tűnik, ez a két LPA receptor bizonyos folyamatokban hasonlóan funkcionál. Ilyen redundancia látható pl. az idegrendszer, és az érrendszer kialakulása során betöltött szerepükben (l. részletesen a 2.4.3.1 fejezetet). Ugyanakkor más folyamatokban – mint pl. az érederetű simaizomsejtek migrációja, ahol az LPA₁ negatív, míg az LPA₂ pozitív kemotaktikus hatást közvetít – inkább ellentétes hatásokat közvetítenek (105). Az LPA₂ receptor expressziójának növekedését számos tumoros sejttípusban is igazolták, valamint azt, hogy a tumorok inváziójában és áttétképzésében szerepe van (14). Ligandspecificitását tekintve az LPA₂ receptoron úgy tűnik a legtöbb természetes acil-LPA képes hatni akár telített, akár telítetlen oldalláncot tartalmaz, amennyiben a lánc legalább 14 szénatom hosszúságú (102).

2.3.1.3. *LPA₃ receptor*

Az LPA_3 receptort az LPA_2 -höz hasonlóan az LPA_1 receptorral való homológiája alapján sikerült azonosítani az addig árva GPCR-ok közül. Emberben főleg a szívben, herében, prosztatában, kisebb mértékben a tüdőben, agyban és az ovariumban, míg egérben főleg a tüdőben, vesében, méhben, herében, kisebb mértékben pedig a vékonybélben, agyban, szívben expresszálódik (17). Jelátvitelét tekintve a $G_{q/11}$ és a $G_{i/o}$ útvonalakat képes beindítani (l. 5. ábra). Bár heterozigóta tenyésztésből az elvárható frekvenciával születnek LPA_3 KO egerek, a KO nőstények egyértelműen reprodukciós zavarban szenvednek. Ez az embriók hibás beágyazódásában nyilvánul meg, ami végső soron a magzatok elhalását okozza. Azt is megfigyelték, hogy egér uterusban az LPA_3 expressziója a korai terhesség során térben és időben szabályozott folyamat, és szexuálszteroidok befolyása alatt áll (106). Az LPA_3 receptor valószínűleg az a. uterina és az a. arcuata erek megfelelő kifejlődésében játszik szerepet, aminek hiányában a decidua és a placenta bevérzik, immunsejtek infiltrálják, a szövetek végül szétesnek, az embrió pedig felszívódik (107). Az LPA_3 receptor ligand specificitásában is különbözik a másik két edg típusú receptortól: nem a szokványos 1-acil, hanem a kettes pozícióban észterifikált, azon belül is a telítetlen zsírsavláncot tartalmazó LPA-k (2-oleoil-, 2-linoleoil-, 2-linolenoil-, 2-arachidonoil-LPA) iránt a legérzékenyebb. A receptor szubsztrátfelismerésében ezen kívül kritikus a $\Delta 9$ -pozícióban lévő kettőskötés megléte (102).

2.3.2. A nem-edg családba tartozó receptorok

2.3.2.1. *LPA₄ receptor*

Az LPA negyedik receptorára úgy találtak 2003-ban Noguchi és munkatársai (95), hogy feltűnt nekik a P2Y9/GPR23, akkor még árva purinerg receptor hasonlósága a trombocita-aktivált faktor receptorához (PAFR, a 4. ábra A panelének bal oldalán látható), így arra gondoltak, érdemes lehet ellenőrizni, aktiválható-e ez a receptor lipid típusú vegyületekkel. 198 lipidet teszteltek, és azt találták, ezek közül az LPA hasonló affinitással tud kötődni ehhez az új receptorhoz, mint az LPA_1 és LPA_2 receptorokhoz, valamint Ca^{2+} -szignált és cAMP-szint növekedést is ki tud váltani. Már ezekből a

kezdeti eredményekből látszott, hogy ez a receptor tud kapcsolódni mind a $G_{q/11}$, mind a G_s fehérjékkel, de azóta bizonyított, hogy a másik két G fehérjét is képes aktiválni (l. 5. ábra) (108). LPA_4 KO egerek vizsgálata során kiderült, hogy szerepe van az oszteoblasztok differenciációjában (109), az ér- és nyirokér fejlődésben (l. részletesen a 2.4.3.1 fejezetben). Expressziós mintázata alapján megtalálható számos szövetben, köztük a petefészekben (főleg terhesség alatt), a méhben (főleg az embrió beágyazódása területén) és a placentában, az agyban és a vérlemezkékben (l. 41. oldal). Az egyes LPA fajták közül leginkább az oleoil-LPA-ra érzékeny, de kisebb mértékben a telített sztearoil- és palmitoil-LPA is képes aktiválni (6, 95).

2.3.2.2. LPA_5 receptor

2006-os felfedezése óta (96) az LPA_5 receptorról is igen nagy ismeretanyag gyűlt össze. Emberben főleg a lépben, kisebb mértékben a szívben, vékony- és vastagbélben, méhlepényben és a májban, míg egérben elsősorban a vékonybélben, kisebb mértékben pedig számos egyéb szövetben kimutatták. $G_{q/11}$ és $G_{12/13}$ jelátviteli utak beindításával szerepet játszik a sejtek aktin-filamentumait érintő változásokban és az intracelluláris Ca^{2+} -szint változásokkal járó folyamatokban (17). Ligandpreferenciája különleges abban a tekintetben, hogy az éteresített, alkil-glicerfoszfátokra nagyjából 10-szer érzékenyebb, mint a hasonló zsírsavlánccal acilált LPA-kra (6). Felmerült szerepe a központi idegrendszer fejlődésében és a vérlemezke aktivációban is (6, 17) (l. 2.4.2 fejezet), újabb eredmények alapján pedig jelentősége lehet az immunrendszer tumorelles funkcióinak szabályozásában (110). Emellett szerepe van a neuropáthiás fájdalom feldolgozásában és a vastagbélben a víz visszaszívásában (6, 17).

2.3.2.3. LPA_6 receptor

Az eddig igazolt LPA GPCR-ok közül a sorban utolsót Yanagida és munkacsoportja azonosította 2009-ben (97). Ez a receptor preferálja az sn2 pozícióban észteresített LPA származékokat az sn1 származékokhoz képest. Mivel viszonylag újonnan azonosított receptorról van szó, szerepe még nem teljes körűen tisztázott. Az LPA_6 receptor kristályszerkezete a közelmúltban került közlésre (111), ami feltehetően nagy lendületet ad majd a működésének pontosabb megismerésére irányuló

kutatásokhoz. Eddig leginkább egy hajvesztéssel járó ritka genetikai betegség, a familiáris hipotrichózis kapcsán vizsgálták szerepét. mRNS-e kifejeződik a hajhagymában, ahol az itt szintén expresszálandó LIPH enzim által termelt sn2-LPA autokrin/parakrin módon befolyásolhatja e receptoron keresztül a haj növekedését (112). Ezen kívül ismert expressziója endotélsejtekben, ahol az érpermeabilitás szabályozásában és a limfocita migrációban lehet szerepe (113, 114).

2.3.3. A PPAR γ receptor

A peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor család (röviden PPAR) a sejtmagi hormonreceptorok nagy családjába tartozik, annak II-es típusába. Jelenleg három altípusa ismert, az α , a β/δ és a γ , melyek különböznek mind ligandspecifitásukban, mind szöveti eloszlásukban (115). Ezek közül a leginkább tanulmányozott a PPAR γ , ami jelentős szereppel bír a sejtek lipid anyagcseréjének kontrolljában, a glükóz homeosztázisban, a sejt differenciáció és -motilitás szabályozásában. A PPAR γ két izoformája közül az 1-es minden szövetben kifejeződik, és hiánya összeegyeztethetetlen az élettel, míg a 2-es izoforma csak a zsírszövetre jellemző, így hiánya a lipid anyagcserét befolyásolja (115). Mint a többi rokon II-es típusú magi receptor, heterodimer formában (retinoid X receptorral) kötődik a DNS-hez a célgén promoter régiójánál. Ligand hiányában korepresszorok akadályozzák a promoter mögötti génszakasz átírását. Amikor a ligand beköt, konformációváltozás hatására a korepresszorok koaktivátorokra cserélődnek, és lehetővé válik a szabályozott génszakasz átírása. A PPAR γ -nak több fiziológiás agonistája is ismert, amik között található különböző LPA származékok, mint a telítetlen LPA-k és az alkil-glicerofoszfátok (98, 116). Érdekes, hogy a PPAR γ -nak nem csak fiziológiás aktivátorai, hanem gátlói is lehetnek a lizofosfolipidek. A ciklikus foszfátidilsav, ami PLD₂ hatására képződik lizofoszfátidil-kolinból transzfoszfátidilációval, intracelluláris hírvivőként a sejtmagban stabilizálja a PPAR γ -korepresszor komplexet (117), így képes gátolni a PPAR γ által szabályozott folyamatokat. A PPAR γ számos biológiai folyamatban tölt be valamilyen élettani vagy kórélettani szerepet, ezek nagy része valamilyen anyagcsere-folyamat (többnyire lipidraktározás) szabályozásához kötött, más része pedig az immunrendszer funkcióihoz. Szabályozza a fehér és barna zsírszövet lipidanyagcseréjét, a máj, hasnyálmirigy és izomszövet zsír-, glükóz- és inzulinanyagcseréjét (118).

Fokozza az inzulinszekréciót és az inzulinérzékenységet, ami miatt mesterséges agonistáit a diabétesz kezelésében alkalmazzák (pl. rosiglitazon). Ugyanakkor a zsírraktározás fokozása elhízáshoz, zsírmáj kialakulásához vezet, és a PPAR γ teremtheti meg a kapcsolatot az elhízás és olyan betegségek között, mint a diabétesz, vastagbélrák, vagy az ateroszklerózis (115). Az LPA és a cPA a PPAR γ -ra gyakorolt hatásuk miatt kiemelt szerepet játszanak az ateroszklerózis és a neointima képződés folyamatában, így erre dolgozatom során később még visszatérek.

2.4. A lizofoszfátid sav élettani és kórélettani jelentősége az érrendszerben

Az értekezés elején már említésre került, hogy a lizofoszfátid savat éppen az érrendszeri hatásai kapcsán fedezte fel Tokumura és munkacsoportja. Bár akkoriban ez a felfedezés nem váltott ki nagy visszhangot, mára már senki nem vitatja, hogy az LPA a kardiovaszkuláris rendszer egyik igen jelentős lipid mediátora. Az LPA termelődik és degradálódik az érrendszerben, és a legtöbb vér- és érsejtre fejt ki valamilyen hatást. Ezek közül messze legtöbbet tanulmányozott, és óriási klinikai relevanciájú terület az LPA szerepe az ateroszklerózis és a trombózis kialakulásában, de nem elhanyagolható az ATX-LPA tengely szerepe az érrendszer kifejlődése kapcsán, a tumor angiogenezisben, az érpermeabilitás- és az értónus szabályozásában sem.

2.4.1. Lizofoszfátid sav metabolizmus az érrendszerben, különösen az ateroszklerotikus területeken

Az LPA a keringési rendszerbe a sejtek felszínén és a vérplazmában jelenlévő ektoenzim, az autotaxin közreműködésével kerül. Erre több adat is egyértelműen utal: egészséges emberek plazma LPA szintje korrelál a lizofoszfolipáz D (ATX) aktivitással (23), ATX heterozigóta egerekben a plazma LPA szintje fele a kontroll egerekének (63), ATX depletált szérumban jelentősen lecsökken az LPA szintje (63), ATX túltermelődése esetén pedig megemelkedik (61). A vérplazmával keringő LPA szerepe azonban kérdéses. Ugyan több forrás alapján is koncentrációja az alacsony mikromoláris tartományba esik (17), ami messze meghaladja az LPA receptorainak érzékenységét, hatásának kifejlődését ugyanakkor gátolhatja egyrészt az albuminhoz való kötődése, másrészt az állandó agonista expozíció a receptorokat hamar deszenzitizálja. Sokkal valószínűbb, hogy az LPA a keringési rendszerben autokrin/parakrin mediátorként funkcionál, vagyis csak szükség esetén, lokálisan termelődik, lokálisan fejt ki hatását, majd ezt követően gyorsan elbomlik.

Az egyik LPA-szintézist indukáló esemény az erek sérülése lehet. Többször szóba került már a dolgozat során, hogy vérlemezkék aktivációjakor jelentős LPA felszabadulás figyelhető meg. Ez a folyamat régóta izgatja a kutatókat, és az évek során több elmélet is született a vérlemezkék LPA felszabadító szerepével kapcsolatban.

Eleinte azt gondolták, az LPA az aktivált vérlemezkékben termelődik foszfatisavból, és onnan szabadul fel. Ezzel szemben a ma elfogadott modell Bolen és munkacsoportja publikációja alapján a következő (78):

1. az aktivált vérlemezkék (kísérleteikben ezt thrombinnal váltották ki) egy újonnan azonosított foszfolipázt szecernálnak, a lizofoszfolipáz A-I-et (LYPLA-I);
2. ez az enzim PLA₁ típusú, így a plazmában található foszfolipidekből egy sn2 pozícióban észterezett lizofoszfolipid poolt hoz létre, elsősorban linoleoil- és arachidonoil-lizofoszfolipideket;
3. a termodinamikailag instabil sn2 lizofoszfolipidekben az acilcsoport átvándorol az sn1 pozícióba (ún. acilmigráció);
4. az sn1 telítetlen lizofoszfolipidek szubsztrátjai az autotaxinnak, így képez belőlük döntően linoleoil- és arachidonoil-LPA-t.

Pamuklar és mtsai. eredményei alapján az ATX enzim integrineken keresztül kapcsolódik a vérlemezkék felszínéhez (61), de ehhez az integrinek előzetes aktivációja szükséges. Ez további biztosíték arra, hogy nagy mennyiségű LPA csak akkor jöhessen létre, ha a vérlemezkék aktivációja hatására egyrészt LYPLA-I szekréció történik, ami szubsztrátot szolgáltat az ATX-nak, másrészt az aktivált integrinek „befogják” az ATX-t a vérlemezkék felszínére. A vérlemezkék felszínén lévő LPA receptorok aktiválása pozitív feedback mechanizmussal további LPA felszabaduláshoz vezet (bár ez a lehetőség vitatott (119)). Ez a folyamat az érsérülés következményeként létrejövő fiziológiás reakció, szerepe a vérzéscsillapítás és a sebgyógyulás beindítása. Kóros körülmények között azonban ugyanez a folyamat fontos szerepet játszhat pl. atheroszklerotikus plakk ruptúrája, vagy stentbeültetés során.

Az ATX működéséhez szükséges szubsztrát azonban nem csak vérlemezkék segítségével képződhet. Többen is megfigyelték, hogy hiperlipidémia emelkedett lizofoszfolipid szintekkel jár (119), emberben pedig az LPA plazmaszintje korrelál az alacsony denzitású lipoprotein (LDL) szintjével (28). Az LDL pedig kulcsszereplő az érlemezés szemponyjából, ez mára már a köztudatban is él (laikusok számára „jó” és „rossz” koleszterinként ismert). Érlemezéskor az egyik első lépés az LDL akkumulációja és módosulása (oxidáció, enzimatis konverzió) az érfal szubendoteliális terében, amire válaszul az endotélsejtek fokozottan fejeznek ki adhéziós molekulákat és kemoattraktánsokat. Az erre odavándorló monociták

makrofággá differenciálódnak és a módosult LDL-t bekebelezve habos sejtekké „hízhatnak”, majd elpusztulnak. Az így megjelenő zsíros lerakódás és az elhaló sejtek gyulladáshoz vezetnek. A betegség progressziójakor egyre több immunsejt vándorol a lézióba. Simaizomsejtek proliferálnak, migrálnak a szubendotéliumba, ahol részben maguk is habos sejtekké válnak, részben kialakítanak egy fibrózus tokot, ami elzárja a zsíros, nekrotikus lerakódást az ér lumenétől. Az így képződő stabil plakkban anti-inflammatórikus citokinek visszafogják a sejtek elhalását, csak egy kis nekrotikus, zsíros mag van a vastag tok alatt. A plakk azonban instabillá válhat, ha a kontrollálatlan gyulladás miatt a makrofágok és simaizomsejtek fokozottan pusztulnak, a nekrotikus mag egyre nő, a fibrózus tok pedig elvékonyodik. Az instabil plakk könnyen ruptúrál, és a felszínre kerülő szövettermelék hatására beindul a véralvadási kaszkád (120).

A szklerotikus plakkokban, és ott is elsősorban a lipidgazdag, nekrotikus magban LPA halmozódik fel (37). Ennek pontos mechanizmusa még nem teljesen ismert, valószínűleg több, egymással párhuzamosan lejátszódó folyamat is hozzájárul. Az LDL több módon is képes lizofosfolipid szubsztrátot szolgáltatni az ATX számára. A szekretoros PLA₂, ami egyben egy akut fázis fehérje, képes az LDL egyik legnagyobb arányban előforduló foszfolipid összetevőjéből, a foszfatidilkolinból LPC-t képezni. Ezzel nemcsak szubsztrátot szolgáltat az ATX számára, hanem olyan változásokat is elindít az LDL-ben, amik segítik annak kitapadását az érfalhoz, és fogékonyabbá teszik az oxidáció iránt (121). Az LDL különböző fokú oxidációja – ami már enyhébb esetben is (ún. minimally modified, vagy mildly oxidized LDL, mmLDL és moxLDL) lipid peroxidok és egyéb degradációs lipidek képződéséhez vezet (122) – a natív LDL-hez képest még inkább alkalmassá teszi LPC képződésére. Ugyan Siess és munkatársai eredményei alapján LPA akár közvetlenül, ATX-től független módon is képződhet moxLDL-ből (37), ennél tisztább útja az oxidált LDL és az LPA közötti kapcsolatnak az LpPLA₂ (lipoprotein-asszociált foszfolipáz A₂, vagy PAF-acilhidroláz is nevezett) enzimhez kötődik. Ezt a speciális foszfolipázt gyulladáshoz vezető sejtek, pl. makrofágok és az ateroszklerotikus plakkok habos sejtjei szecernálják. Emberben nagyrészt a keringő LDL-ben található ApoB fehérjéhez kötve (123). Az LDL oxidációja során képződő oxidált foszfolipideket ez az enzim LPC-vé alakítja (124), és kulcsszerepet tulajdonítanak neki a szklerotikus plakkokban történő LPC képződésben (125). Az LDL LPC tartalmának növekedését nem csak az LDL

oxidációval, hanem egyéb módosulásaival kapcsolatban is megfigyelték (126). LPA forrásként szolgálhatnak az elhaló sejtekről leváló mikropartikulumok és mikrovezikulák is. A szekretoros PLA₂ Fourcade és mtsai. kísérletei alapján ezekből LPA-t szabadít fel, míg intakt sejtek membránjából nem (79).

Az erekben lévő autotaxin forrása nem teljesen tisztázott. Az endotélsejtek többnyire képesek autotaxin expresszióra (72, 127-129), és akár az így termelődő ATX-t, akár a keringésben levőt meg tudják kötni integrin receptoraikkal (130). Az érfalban egészséges körülmények között is van ATX, de érsérülés hatására szintje a többszörösére növekedhet (105). Gu és munkatársai explantált szívekből izolált koszorúereket vizsgálva ATX festődést találtak mind ép erekben, mind stabil és instabil plakkokban. Az ATX festődés a plakk instabillá válásával párhuzamosan fokozódott a nekrotikus magban és fibrózus tokban (29). Különösen magas az ATX expresszió a nyirokszervek magas endotélű venuláinak endotél sejtjeiben (131), ahol az így nagy mennyiségben felszabaduló LPA elengedhetetlen a limfociták endotélen keresztüli kivándorlásához (128). Több endotélsejt típusban is kimutatták, hogy az egyik legfontosabb angiogenetikus faktor, a VEGF fokozza az ATX expresszióját, és ennek szerepe lehet pl. tumor angiogenezis során (l. 2.4.3.3 fejezet) (132).

Az erekben képződő LPA hatásának lokalizálásáért és a vérplazmában lévő LPA lebontásáért a lipid foszfát foszfatáz enzimek felelősek (bár ez utóbbi folyamatban *in vivo* körülmények között a májba történő felvétel is jelentős (47)). Mind mRNS, mind fehérje-szinten kimutatható LPP az endotélsejtekben, vaszkuláris simaizomsejtekben, vérlemezkékben és limfocitákban is (133). Az LPP aktivitás növekedése, vagy csökkenése az ATX/LPA/LPA receptor tengelyt kibillentí egyensúlyából, amit az elmúlt években több vaszkuláris kórállapottal is összefüggésbe hoztak. Yukiura és munkatársai eredményei arra utalnak, hogy az endotélsejtek felszínén nem egyenletesen helyezkedik el az LPP3 enzim, hanem a sejt-sejt kapcsolatok területre koncentrálódik. Ez azért fontos, mert az LPA szignalizáció ezeken a területeken egyébként destabilizálná az endotéliumot, fokozná az érpermeabilitást (134). Ezzel egybehangzó az a megfigyelés, hogy az LPP3-at kódoló PPAP2B gén indukálható, endotél-specifikus kiütése esetén gyulladásoos stimulusra jobban fokozódik az érpermeabilitás, mint kontroll egerekben (135). Az LPP aktivitásnak szerepe lehet az LPA

proateroszklerotikus hatásainak kivédésében is (l. 2.4.4.2 fejezet). Wu és mtsai. azt a hipotézist vizsgálták, hogy aterogén hemodinamikai viszonyok között – vagyis turbulens áramlás esetén – megváltozik-e az LPP expresszió. Azt találták, hogy a turbulens áramlás mind *in vivo* (az aortaívben, az a. carotis bifurkációban, illetve az a. carotisban részleges lekötésre), mind *in vitro* körülmények között (HAEC sejtekben) csökkenti az endotélium PPAP2B mRNS expresszióját (136). Carotis lekötés után a neointima simaizom eredetű sejtjeiben az LPP3 expressziója fokozódik, ami csökkenti a simaizomsejtek LPA-ra kialakuló fokozott proliferációját és migrációját, míg az LPP3 simaizomspecifikus kiütése fokozza az intima hiperpláziát és az érsérülésre létrejövő gyulladási választ (137). Reschen és mtsai. makrofágokat vizsgálva azt találták, az oxLDL fokozza humán makrofágok LPP3 expresszióját. A makrofágokból a plakkokban kialakuló habos sejtekben a PPAP2B az egyik leginkább upregulálódó gén, a habos sejtek nagy mennyiségben expresszálják az LPP3-at, és ennek védő szerepe lehet ateroszklerózisban, mert gátolhatja az LPA pro-inflammatórikus hatásait (138).

2.4.2. A lizofoszfátidsav hatása a vér és az erek sejtjeire

Az érrendszer majdnem minden sejtje – legyen az primer izolált sejt, vagy tenyésztett – reagál valamilyen módon a lizofoszfátidsavra. A 2. táblázat összefoglalja, milyen celluláris hatások figyelhetők meg az érfal legfőbb sejtjeiben, és néhány további, vérben előforduló sejtjeiben LPA hatására. Ezek a hatások azonban nagyon sokszor függenek a kísérletek során alkalmazott LPA fajtájától, továbbá attól, hogy a kísérletben használt sejtek milyen fajból származnak, illetve még ezen belül is számíthat, milyen érszakaszból, hiszen pl. az endotéliumsejtek igen markáns regionális különbségekkel rendelkezhetnek (139).

Jó példa a fent említett különbségekre a vérlemezkék reakciója a lizofoszfátidsavra. Az LPA izolált sejteken megfigyelhető hatásai közül az egyik elsőnek megismert a vérlemezke aktiváció, alakváltozás és aggregáció volt (140), azonban ez csak humán és macska vérlemezkékben volt megfigyelhető. Érdekes módon az egér vérlemezkéket gátolja az LPA (61). Pamuklar és szerzőtársai arról számoltak be, hogy egészséges emberekből izolált vérlemezkék az alanyok egy részében nem aktiválódtak LPA adásra, és ezeket az alanyokat LPA „nonreszponzív” nevezték el.

2. táblázat A lizofoszfátidsav (LPA) hatásai az érfal és a vér sejteire. Cui összefoglaló közleménye alapján (141), kiegészítve.

Sejttípus	LPA hatása	Hivatkozás	
Endotél	adhéziós molekula expresszió (E-szelektin, VCAM-1, ICAM-1)	(142-144)	
	gyulladásos citokin szekréció (IL-8, MCP-1, pentraxin-3)	(145, 146)	
	érpermeabilitás	csökkenése fokozódása	(147-149) (150, 151)
	migráció, proliferáció	fokozódása	(152, 153)
	apoptózis	csökkentése fokozása	(154) (155)
	NO-termelés	csökkentése fokozása	(156)
			(157-159)
Simaizom	fenotípus módosulás kontraktilisról szekretorosra	(160)	
	gyulladásos citokin szekréció (MCP-1, IL-6)	(161, 162)	
	migráció, proliferáció fokozódása	(163, 164)	
	szöveti faktor expresszió	(165)	
	integrin aktiváció	(166)	
	kontraktilis funkció fokozása	(167)	
Monocita/ makrofág	migráció	(168)	
	gyulladásos citokin szekréció (IL-1 β)	(169)	
	aktiváció	(170)	
	proteáztermelés fokozása	(29)	
	oxLDL felvétel fokozása, habos sejté alakulás	(171)	
	apoptózis gátlása	(172)	
Aktivált T- limfocita	migráció, proliferáció fokozása	(35)	
	gyulladásos citokin szekréció (IL-2, IL-13)	(173, 174)	
	apoptózis gátlása	(175)	
Vérlemezek	fajtól és vizsgált LPA típustól függ – többnyire aktiváció	(119)	

Alanyaikat 2-3 éven keresztül követve a vérlemezekék válaszkészsége nem változott, tehát amelyik ember vérlemezekéi rezponzívok voltak, azok is maradtak és vice versa. Nagyon érdekes, hogy míg egészséges embereknél ez az arány kb. 20% volt, addig stabil anginával rendelkező betegeknek csak alig másfél százaléka volt nonrezponzív.

Eredményeik alapján a rezponzivitás a vérlemezék LPA receptorainak expressziós profiljától függ, és a nonrezponzív vérlemezéknek magasabb az LPA₄ és PPAR_γ mRNS szintjük (176). Tokumura és munkacsoportja számos LPA speciesz vérlemezke-aggregáló hatását összevetve azt tapasztalta, hogy a legpotensebbek az alkil-származékok, míg az acil-LPA-k kevésbé aktívak, közülük leginkább a hosszú láncú, többszörösen telítetlen LPA-k okoznak vérlemezke-aggregációt (93). Korábban már utaltam rá, hogy az LPA-általi vérlemezke aktivációnak speciális ligandfüggése van, amit a kezdetben megismert edg-típusú receptorok ligandfüggése sehogyszem tudott megmagyarázni. Ma már tudjuk, hogy épp a nem edg-típusú LPA₅ receptorra jellemző, hogy alkil származékokra hasonló aktivációt mutat, így ezt a receptort szokták is vérlemezke típusú LPA receptornak nevezni (113, 177).

A 2. táblázatban összefoglalt celluláris LPA hatások áttanulmányozása során körvonalazódik, milyen fő *in vivo* hatásokat várhatunk az LPA-tól az érrendszerben. Sejthető, hogy szerepe van angiogenetikus folyamatokban, az érpermeabilitás szabályozásában, hogy hatással van olyan kóros érreakciókra, mint a neointima képződése, gyulladásos érválaszok kialakulása, aterotrombotikus folyamatok befolyásolása. Az endotél- és simaizomhatások alapján pedig várható, hogy szerepe lehet az értónus szabályozásában is.

2.4.3. A lizofoszfátidsav szerepe az érrendszer fejlődésében

Az embrionális fejlődés során az érrendszer az egyik legkorábban kialakuló szerv, hiszen a többi szerv növekedéséhez és fejlődéséhez biztosítani kell a megfelelő oxigén- és tápanyagellátást, valamint a keletkező bomlástermékek elszállítását. Az erek fejlődése az egyedfejlődés során három folyamatot ölel fel, ezek a vaszkulogenezis, az angiogenezis és az erek érése. A vaszkulogenezis első lépéseként mezodermális sejtek hemangioblasztokká differenciálódnak. A hemangioblasztok úgynevezett vérszigetekbe tömörülnek, melynek belső sejtjei hemopoetikus őssejteké, majd vérsejteké differenciálódnak, külső sejtjei pedig angioblasztokká, amikből endotélsejtek fejlődnek. Más szóval a vérszigetek kis, zárt endotélzsákocskák, amiket vér tölt ki. Következő lépésben a zsákok összeolvadva hálózatot alakítanak ki. Az így kifejlődött primitív erekből aztán az angiogenezis folyamata során új ágak fejlődnek, ami angiogenetikus

faktorok szabályozása alatt áll. A meglévő érfal meghatározott pontokon megbomlik, az endotélsejtek szaporodnak, és kivándorolva új ágakat képeznek. Végül az újonnan kifejlődött erek fala érik, ami azt jelenti, periciták és érsimaizom sejtek gyűlnek az endotélsejtek köré (ezt a folyamatot recruitmentnek nevezik), hogy beburkolják és stabilizálják az érfalat. A következő fejezetben azt foglalom össze, mit lehet tudni az LPA szerepéről az egyes érfejlődési folyamatokban.

2.4.3.1. LPA receptor KO egerek érfejlődési rendellenességei

Az LPA receptorok érfejlődésben betöltött esetleges szerepéről génkiütött egerek vizsgálatával lehet a legegyszerűbben képet kapni. Mind a hat, eddig felfedezett LPA receptor szerepének vizsgálatához rendelkezésre állnak már megfelelő KO egerek. Az edg családba tartozó LPA receptorokra génkiütött egereket már nem csak egyszeres, hanem kétszeres és háromszoros kombinált KO formában is létrehozták. Sok egyéb, korábban már említett rendellenességük mellett az LPA₁ KO egerek érrendszeri eltérésekkel is rendelkezhetnek: ugyan nem túl gyakran, de megfigyelhetők bennük bevérzések a koponya elülső felében (ún. frontális hematómák), míg ez az eltérés heterozigóta testvéreikben nem alakul ki (100). Bár önmagában sem az LPA₂, sem az LPA₃ receptor hiánya nem okoz fejlődési rendellenességet az érrendszerben, az LPA₁ és LPA₂ receptor kettős génkiütés közepesen, az LPA₁, LPA₂ és LPA₃ receptorok háromszoros kiütése pedig jelentősen fokozza az említett koponya bevérzések előfordulási gyakoriságát (94, 178). Ezek a megfigyelések, együtt azzal a ténnyel, hogy az LPA₂ és LPA₃ receptor kétszeres KO-kban nem fejlődnek ki hematómák (178) arra utalnak, hogy a bevérzések kialakulásáért elsősorban az LPA₁ hiánya felelős, a másik két edg receptor szerepe redundáns.

A nem edg családba tartozó LPA₄ receptor kiütésének vaszkuláris következményei ellentmondásosak az irodalomban. Sumida és mtsai. azt találták, hogy az LPA₄ KO embriók nagyjából 30%-a már méhen belül elhal, és ezekben a károsodott embriókban testszerte bevérzések alakulnak ki. Az érintett embriók erei tágabbak, megváltozott a simaizom és pericita recruitment (179). Ezzel szemben egy másik munkacsoport nem talált méhen belüli elhalásra és érkárosodásra utaló morfológiai jeleket az általuk vizsgált LPA₄ KO egerekben (180). Sumida és mtsai. az előbb említett

munkájukban arra is rávilágítottak, az LPA₄ receptorok szükségesek a nyirokerek megfelelő fejlődéséhez, a KO embriók egy része ugyanis a vérzések mellett ödémás is volt (179). Arról, hogy az LPA₅ és LPA₆ receptor knock out egerekben jelenik-e meg valamilyen érfejlődési rendellenesség, még nincs irodalmi adat.

2.4.3.2. *A lizofoszfátidsav szerepe a vaszkulogenezisben*

A korábbi fejezetekben már ismertettem, hogy az LPA képződése elsősorban az ATX enzim aktivitásához kötött, lebontása pedig elsősorban LPP enzimekhez. Több tanulmány is azt mutatja, hogy ezeknek az enzimeknek az aktivitása – így az LPA szintje – szigorúan szabályozott az egyedfejlődés során, és bármilyen irányba is billen meg az egyensúly az LPA termelés és lebontás között, az az érfejlődésben súlyos következményekhez vezet.

Van Meeteren és mtsai. ATX deficiens egereket szerettek volna létrehozni, de azt tapasztalták, hogy a heterozigóta tenyésztésből nem születik ATX KO egyed (62). Normális esetben az egér embrionális fejlődésének 9. napja körül az extraembrionális endotélsejtek a szikzacskóban érhalózatá fejlődnek, ami szükséges ahhoz, hogy a szikzacskóból a tápanyag az embrióba juthasson. Az ATX deficiens egerek szikzacskójában azonban a vérszigetek ugyan megtalálhatók, de körülöttük az érhalózat nem fejlődik ki, az embriók a 11. napot már nem élik meg (62). Van Meeteren és mtsai. eredményei szerint egészséges egérembriókban ugyanebben az időszakban – tehát az szikzacskó érhalózatának kifejlődésekor – az ATX és az LPA₁ és LPA₂ gének expressziója megnövekszik. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az ATX által termelt LPA és a hozzá kapcsolódó jelátviteli utak megfelelő működése elengedhetetlen a magzatok megfelelő fejlődése szempontjából. Ezzel a munkával egyidőben Tanaka és kollégái hasonló megfigyeléseket tettek szintén ATX KO egerek embrióiban (63). Mivel mind az autotaxin gén, mind az LPA receptorok szerkezete igen konzervált a gerincesekben, az előzőekkel hasonló értékű Yukiura és mtsai. megfigyelése: zebradániókban az ATX szerkezete és működése (termelt LPA specieszek aránya) hasonló az emlős autotaxinéhoz, és a gén lecsendesítése embriókban súlyos érfejlődési defektusokat eredményezett. Az egérembriókban megfigyelttel egybehangozón, az egyes LPA receptor gének lecsendesítése önmagában nem okozott súlyos érfejlődési

rendellenességet a zebraadánió embriókban sem. Ugyanakkor az LPA₁ és LPA₄ gének együttes lecsendesítése már igen hasonló állapotot hozott létre, mint az ATX gén önmagában, az LPA₂ pedig zebraadániókban is redundáns funkciójú az LPA₁ receptorral (181). Nagyon érdekes, hogy az ATX deficiens egérembriók hasonló defektusokba pusztulnak bele, az egyedfejlődés ugyanazon stádiumában, mint a G α ₁₃ KO-k (182). Elképzelhető tehát, hogy az LPA ezen az útvonalon keresztül fejt ki hatását az érhálózat kifejlődésekor.

Eddig azt láthattuk, mi történik, ha hiányzik az embrióból az LPA, de Yukiura és mtsai. egy friss tanulmányban azt is megvizsgálták, mi történik, ha – épp ellenkezőleg – túl sok LPA termelődik. Ehhez olyan egereket hoztak létre, amelyek ATX túltermelő transzgenek, vagy ATX túltermelő kondicionális transzgenek. Az ATX túltermelés ez utóbbi esetben tamoxifennel tetszőleges életkorban indukálható. Az ATX túltermelő transzgen embriókban az ATX gén expressziós szintje nagyjából 15-szöröse lett a kontrollokénak, és az ATX hiányhoz hasonló fejlődési stádiumban, hasonló érfejlődési rendellenességeket mutatva pusztultak el. Ha az ATX túltermelődést születés után indukálták, a vérplazma ATX és LPA szintje napokon belül megsokszorozódott. Ebben az állapotban vizsgálva a retinát, károsodott vaszkulo- és angiogenezist tapasztaltak (183). Mivel számos olyan élettani és kórélettani állapotban írtak le magas ATX szintet, amikben a vaszkulogenezis kiemelt szereppel bír (mint pl. terhesség, cirrhosis, daganatok, l. 1. táblázat), érdekes lenne tudni, hogy vajon ennek milyen klinikai következményei vannak. A magas LPA szint kialakulásának egy másik lehetséges mechanizmusa a túltermelődés mellett, ha a lebontás csökken. Az LPP3 (l. 2.2.3 fejezet) enzim kiütése egérben nem meglepő módon ugyanúgy a szikzacskó ereinek kialakulását gátolta, és intrauterin elhaláshoz vezetett (184), mint az ATX túltermelődése.

2.4.3.3. A lizofoszfátidsav szerepe az angiogenezisben

Irodalmi adatok alapján az LPA-nak mind az endotélsejtek proliferációjában, mind migrációjában szerepe lehet. Több különböző endotél sejtvonalban is leírták, hogy az LPA kemotaktikus hatású. Fokozta többek között borjú embrionális szív eredetű endotélsejtek, borjú aorta endotélsejtek, borjú pulmonális artéria endotélsejtek és humán endotélsejtek migrációját (151, 153, 185, 186). Lee és munkatársai *in vitro* „wound

healing assay” segítségével vizsgálták az LPA hatását endotél monolayerben, és azt találták, hogy az S1P-hez hasonlóan mind az endotél proliferációt, mind a migrációt fokozta, és ez a folyamat pertussis-toxin függő volt (152). Csirke chorio-allantois membrán assayben fokozta az új erek képződését (187), bár más kísérleti eredmények szerint ugyanez a jelenség egér allantoisban nem volt megfigyelhető (63). Ez utóbbi esetben az LPA inkább a már meglévő ereket védte a széteséstől.

Az LPA-nak szerepet tulajdonítanak terhesség során a placentában és az endometriumban játszódó angiogenetikus folyamatokban. Tokomura és kutatócsoportja leírta, hogy terhesség során megemelkedik a szérum lizofosfolipáz D aktivitása, ami előrevetítte az LPA esetleges szerepét ebben az állapotban (24). Humán endometrium sejtek LPA-val kondicionált médiuma fokozni képes humán endometriális kísér eredetű endotélsejtek migrációját, proliferációját. Ez a folyamat LPA₁ receptor, NF-κB és IL-8 függőnek bizonyult (188). Hasonló folyamatok játszódnak le a sárgatest érésekor is, ami szintén egy jellemzően angiogenezissel járó folyamat. A fenti kutatócsoportok leírták, hogy ovuláció előtt a follikuláris folyadékban LPA szaporodik fel (189), és humán granulosa lutein sejtek LPA-val kondicionált médiuma HUVEC sejtek migrációját, proliferációját és csökkenését fokozza, az endometriuméhoz hasonló jelátviteli utakon keresztül (190).

Külön említést érdemel az LPA angiogenetikus szerepe tumoros körülmények között, ugyanis az LPA nem csak a tumoros sejtek szaporodását és invazivitását fokozza, hanem a tumor vaszkularizációját is. Ezt a hatását elsősorban annak tulajdonítják, hogy tumoros mikrokörnyezetben számos sejtben képes fokozni különböző angiogenetikus faktorok (elsősorban VEGF) termelését. Igen kiterjedt irodalma van annak, hogyan fokozza az angiogenezist az LPA nőgyógyászati tumorokban, mint pl. petefészekrák, vagy méhnyakrák esetében. Jól ismert, hogy a petefészekrák sejteji LPA-ban gazdag mikrokörnyezetet alakítanak ki maguk körül (191). Petefészekrák sejtek tenyésztésének médiumát vizsgálva Jeon és munkatársai azt találták, hogy a médium LPA₁ receptor függő módon fokozza humán mesenchymalis őssejtek VEGF termelését, és a folyamatban több jelátviteli út is érintett, mint a Rho, PLC, vagy PI3K útvonalak (192). Song és mtsai. kísérletes munkája alapján az LPA petefészek tumorsejtek VEGF termelését fokozó hatásában szintén a Rho útvonal játszik

fontos szerepet (193). Vitatott, hogy az egyik ismert transzkripciós faktor, a hipoxiaindukált faktor 1 (HIF1) vajon érintett-e az LPA-kiváltotta VEGF termelésben. Egyes kutatási adatok alapján az LPA HIF1 α aktiváción keresztül fokozza a VEGF termelődést ovarium tumorsejtekben (194), míg a fentebb már említett, Song és mtsai. által talált eredmények alapján nem (193). Ptaszynska és munkacsoportja eredményei szerint petefészek tumorsejtekben a VEGF-A fokozza az ATX expressziót és szekréciót, az ATX fokozza az LPA₄ receptor expresszióját, az ATX által termelt LPA pedig LPA₄ receptoron keresztül fokozza a VEGF receptorainak expresszióját. Jól látható, hogy ez egy igen hatékony pozitív visszacsatolási kör, ami nagy mértékben fokozza a tumorsejtek VEGF-re adott válaszkészségét (195). A LPA angiogenetikus hatásáról méhnyakrák esetében igen részletes összefoglaló közlemény született a közelmúltban (196), amiben szintén a korábban már említett angiogenetikus faktorok, mint a VEGF és az IL-8 LPA-által történő fokozott termelését hangsúlyozzák a szerzők.

2.4.4. A lizofoszfátidsav szerepe kóros érválaszok kialakulásában

A 2. táblázat adataiból látszik, hogy az LPA hatással van az érfal sejteinek a proliferációjára, differenciációjára, migrációjára, a gyulladós folyamatokra valamint fokozza a vérlemezke aktivációt. Ezen folyamatok mind fontos lépések az atheroszklerózis/trombózis és a vaszkuláris remodeling kialakulásában, így nem meglepő, hogy az LPA ezen kórállapotok kialakulásában fontos szereppel bír. Mivel e betegségek gyakori előfordulása miatt ez a kérdéskör rendkívül intenzív kutatások tárgya, az irodalmi adatok áttekintése bőven meghaladja e dolgozat kereteit, ezért csak néhány lényeges kutatási eredmény bemutatására szorítkoznánk ebben a témában.

2.4.4.1. A lizofoszfátidsav és a neointima képződés

A neointima képződése fontos lépése az erek sérülésre adott válaszának és olyan állapotok velejárója, mint a stentbeültetés, érsebészeti beavatkozások, vagy a turbulens véráramlás. Az endotélsejtek sérülése gyulladós folyamatokat indít be, melyek több lépésen keresztül ahhoz vezetnek, hogy simaizomsejtek vándorolnak az erek media rétegéből az intimába, ahol proliferálnak. Ez az érfal megvastagodásához vezet, ami súlyos esetben az ér elzáródását is okozhatja. Több tanulmány is foglalkozik az LPA

neointima képződésben betöltött szerepével, bár az eredményeik nagymértékben függenek a neointima képződését kiváltó ingertől, és a vizsgált fajtól. Arteria carotis ligációval kiváltott neointima képződés csökkent LPA₁ és LPA₂ receptor kétszeres KO egerekben, de fokozott volt LPA₁ egyszeres KO egerekben (105). Ateroszklerózisra fokozottan hajlamos ApoE KO egerekben az LPA₁/LPA₃ receptorokat gátló Ki16425 kivédte az a. carotis sérülésre létrejövő neointima képződést (197). Ennek hátterében a szerzők szerint a simaizom progenitor sejtek fokozott érfalba vándorlása áll, amit az LPA₁ és LPA₃ receptorok hatására kialakuló kemokintermelés okoz. A neointima képződés az ateroszklerózis patogenezisének egyik kezdeti lépése is, és nem csak endotél sérülés indíthatja el. Patkány és egér arteria carotis lumenébe lokálisan adott LPA típusok, elsősorban a telítetlen oleoil- és arachidonoil-LPA és az éter-kötést tartalmazó alkil-glicerofoszfát heteken belül neointima képződéshez vezet endotél sérülés hiányában is. Ezt a hatást elsősorban a PPAR γ aktivációja közvetíti (13, 198, 199), bár az arachidonoil-LPA hatására kialakuló neointima képződésben valószínűleg az LPA₁ receptor és a G_i fehérje is érintett (13). A PPAR γ endogén antagonistája, a cPA (l. 2.3.3 fejezet) kivédte az alkil-glicerofoszfát neointima képződést okozó hatását (117).

2.4.4.2. A lizofoszfatidsav és az érelmeszesedés

A 2.4.1 fejezetben részletesen kifejtettem, hogy az ateroszklerotikus mikro környezet az érfalban kedvező feltételeket teremt az LPA termelődéséhez, és ennek megfelelően akkumulálódik a plakkokban mind állatkísérletes eredmények szerint, mind humán mérések alapján (37, 38, 200). Az LPA az endotélsejtek adhéziós molekuláinak kifejeződésén keresztül fokozza a vérben lévő monociták kitapadását és migrációját, fokozza a makrofágok pro-aterogén citokintermelését és lipidfelvételét, hozzájárul a vaszkuláris simaizomsejtek fenotípusának átalakulásához, citokintermeléséhez és szöveti faktor expressziójához (hivatkozásokat l. a 2. táblázatban). Ezen celluláris hatások mind pro-aterogének, és az LPA újabb, *in vivo* adatok alapján is segíti az ateroszklerózis kialakulását, progresszióját (129, 201, 202). A meszes plakkok ruptúrájukor felszínre kerülő LPA-nak szerepet tulajdonítanak a ruptúra talaján kialakuló trombusképződésben (37, 200). Bár az LPA bizonyosan aktiválja a vérlemezkéket, az aktivált vérlemezkék pedig fokozottan termelnek LPA-t (az LPA és a vérlemezkék kapcsolatát részletesen l. a 2.4.1 és 2.4.2 fejezetekben), az vitatott, hogy ez

pozitív visszacsatolási körként szerepet játszhat-e a plakkruptúra talaján kialakuló trombusképződésben (119). Különösen érdekes lehet az LPA szerepe a mortalitási és morbiditási szempontból egyik legjelentősebb betegség, az iszkémiás szívbetegség patogenezisében. Koronária betegekben több kutatás szerint is emelkedett az LPA plazmakoncentrációja (l. 2.1.2 fejezet), és az emelkedett LPA-szintet nem csak a perifériás vérből, hanem közvetlenül az érintett koszorúérből is kimutatták már (203). Leírták, hogy stabil anginával rendelkező betegek vérlemezkéi nagyobb arányban aktiválhatók LPA-val, mint egészséges emberekéi (176). Autotaxin festődés fokozódást figyeltek meg koszorúér plakkokban, mely párhuzamos a plakk instabilitásának növekedésével (29). Néhány éve ún. GWAS vizsgálat során (genome-wide association study) kimutattak 13 olyan új régiót az emberi genomban, amelyek polimorfizmusa a koronária betegség prediktív faktorai. Ezek közül az egyik az LPA hatás lokalizálásáért felelős LPP3 enzimet kódoló PPAP2B gén, és a polimorfizmusok feltehetően az LPP3 csökkent expresszióját okozzák (130), mely az LPA hatásainak fokozódásával jár.

2.4.5. A lizofoszfatisav szerepe az értónus szabályozásában

Többször is említettem már dolgozatomban, hogy a lizofoszfatisav biológiai szerepének megismerése éppen a simaizomra és a keringési rendszerre kifejtett akut hatásának felfedezésével kezdődött közel 50 évvel ezelőtt. Ennek ellenére ez a terület jóval kevésbé került a kutatások homlokterébe, mint pl. az LPA fejlődés- és tumorbiológiai hatása.

2.4.5.1. A kardiovaszkuláris rendszer szabályzó folyamatainak és az értónus szabályozásának rövid áttekintése

A kardiovaszkuláris rendszer szabályzó folyamatainak fő célja a megfelelő szöveti perfúzió biztosítása és a fiziológias vérnyomásszint fenntartása. A befolyásolt kardiovaszkuláris paraméterek mindkét esetben a szív perctérfogata és az erek véráramlással szembeni ellenállása. Az erek ellenállása (leegyszerűsítve) az érátmérő függvénye, amit végső soron az erek falában található simaizomsejtek (és esetleg periciták) tónusa határoz meg, és a simaizmon konvergáló vazokonstriktor és vazodilatátor hatások eredőjétől függ. Az értónust lokális (vagy intrinzik) és szisztémás

(vagy extrinzik) szabályozó mechanizmusok állítják be, ez utóbbiak elsősorban az autonóm idegrendszer működéséhez kapcsolódó neurohumorális faktorok (pl. szimpatikus vazokonstriktor tónus, keringő angiotenzin II). A lokális keringésszabályozó mechanizmusok közé több, egymással párhuzamosan játszódó folyamat tartozik. A miogén szabályozás a simaizomsejtek feszülésre adott kontrakciós válaszához kapcsolódik, célja a változó perfúziós nyomástól függetlenül közel állandó értéken tartani az éren átfolyó vér mennyiségét (keringési autoreguláció). A szövetek működése során olyan mikrokörnyezet alakul ki az erek körül (pl. szöveti oxigéntenzió csökkenése, pH csökkenés, laktát-felszabadulás, stb.), amik egyben vazodilatátor üzenetként szolgálnak az érfalnak, biztosítva a szövetek működéséhez szükséges véráramlást. Ezt a folyamatot metabolikus szabályozásnak nevezzük. Az endotéliumnak sokrétű szerepe van az értónus beállításában, mind vazokonstriktor, mind vazodilatátor üzeneteket közvetíthet. Az áramló vér nyírófeszültséget generál az endotélium membránjában, aminek növekedése a simaizom relaxációjához vezet. Ez az alapja az áramlás indukálta retrográd vazodilatációnak, ami hozzájárul a szervek növekedett vérellátásának biztosításához. Az endotéliumnak számos receptora van, ami a vérben keringő, vagy lokálisan termelődő humorális faktorok hatására vazokonstriktor, vagy vazodilatátor anyagok termelődésére hatva közvetett módon szabályozza a simaizomsejtek tónusát. Természetesen a simaizomsejtek maguk is rengeteg receptorral rendelkeznek, így érzékelik az endotélium és a vér felől érkező humorális tényezőket, mechanikai hatásokat, a rajtuk végződő idegrostokból felszabaduló neurotranszmittereket, és az alatta fekvő szövetek metabolikus aktivitását. Az itt felsorolt tényezők együttesen állítják tehát be az erek tónusát, ami pedig visszahat mind a szöveti perfúzióra, mind a vérnyomásra, így zárva a kardiovaszkuláris szabályzóköört (204).

2.4.5.2. A nitrogén-monoxid szerepe az értónus szabályozásában

1980-ban fedezte fel Furchgott és Zawadski az endotélium-függő relaxációt (205), az acetilkolin (ACh) erekre kifejtett hatását vizsgálva. Azt találták, hogy ha izolált erek preparálásakor különösen vigyáznak arra, hogy az erek belső sejtrétege ép maradjon, akkor az ACh nem a simaizmokon keresztül, már korábbról ismert konstriktor hatását látják, hanem relaxációt. Ezt követően Furchgott és mtsai. azt is felfedezték, hogy ez a

hatás valamilyen szabadgyökszerű, instabil anyagnak köszönhető, amit az endotélisejtek termelnek, és a simaizomsejtek szolubilis guanilát cikláz enzimére hatva okoz relaxációt. Akkor ezt az anyagot endotélium eredetű relaxáló faktornak nevezték el (endothelium derived relaxing factor, EDRF) (206). Néhány éven belül tisztázták, hogy az EDRF nagy valószínűség szerint a nitrogén-monoxid (NO) (207, 208), és ez a tudományos eredmény olyan mértékben járult a kardiovaszkuláris működések megértéséhez, hogy Furchgott, Ignarro és Murad Nobel díjban részesültek érte. Az azóta eltelt 30 évben óriási ismeretanyag halmozódott fel a NO kardiovaszkuláris hatásaival kapcsolatban, amik közül talán a legjelentősebbek, hogy vazodilatációt okoz, gátolja a vérlemezkék aktivációját (209), valamint fenntartja az erek anti-trombogén és anti-aterogén tulajdonságait (210), mindezek következtében pedig hiánya számos kardiovaszkuláris betegség kóroki tényezője.

Az endotélisejtek NO termeléséért elsősorban az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz enzim (eNOS) felelős, mely enzim működése rendkívül precízen, egymástól független módokon szabályozott (211). Az enzim nyugalmi körülmények között az endotélisejtek membránjának betüremkedéseiben, a kaveolákban található, kaveolin fehérjéhez horgonyozva. Ez a kötődés megakadályozza a kalmodulin kapcsolódását az eNOS-hoz, így azt gátolja, ugyanis az eNOS maximális katalitikus aktivitásához kalmodulinra van szükség. Számos agonista, amely G-fehérjéhez kapcsolódva képes elindítani az endotélisejtek Ca^{2+} -mobilizálását, kalmodulin-függő módon aktiválja az eNOS enzimet. Az enzim aktivitását foszforilációs/defoszforilációs rendszerek is képesek modulálni. Több kulcsfontosságú szerin és treonin aminosav is áteshet ilyen poszttranszlációs módosuláson, melyek akár aktiváló, akár gátló hatásúak lehetnek. Az egyik ilyen kulcsfontosságú aminosav a humán eNOS 1177-es számú szerinje, melynek foszforilációja – melyet számos kináz mediálhat, pl. az Akt/protein kináz B, a protein kináz G, vagy a kalcium/kalmodulin dependens protein kináz II – mind a kalmodulin kötés stabilizálásával, mind a katalitikus aktivitás közvetlen fokozásával képes aktiválni az eNOS-t (211).

2.4.5.3. A lizofoszfátidsav akut hatása a vérnyomásra

1970-es évek végén Tokumura munkacsoportja egy kísérletsorozatban arra kereste a választ, hogy a szójabab lecitin – amely számos foszfolipid keverékéből áll – melyik komponense lehet felelős annak vérnyomásemelő hatásáért (3). Izoláltak a szójabab lecitinből egy poláris, savas foszfolipid frakciót, amely altatott patkányok vérnyomását dóziszfüggő módon emelte. A vérnyomásnövekedés jelentős, de átmeneti volt, és nem szűnt meg sem az adrenerg receptorok gátlására, sem a gerincvelői szimpatikus idegek átvágásának hatására (spinális állat). További kísérleteikben azonosították, hogy a presszor hatású savas foszfolipid a lizofoszfátidsav, pontosabban mintegy 50%-ban linoleoil-LPA, kisebb mértékben palmitoil-, oleoil-, sztearoil- és linolenoil-LPA (2). Ezt követően enzimatis úton előállították, majd tisztítottak különböző lánchosszú és telítetlenségi fokú LPA-kat, és azt találták, a legerősebb vérnyomásemelő hatás a többszörösen telítetlen LPA-khoz kapcsolódik. Azt is megfigyelték, hogy az LPA nem egyformán hat az egyes állatfajokban: míg patkányban és tengerimalacban növeli a vérnyomást, addig macskában és nyúlban csökkenti azt (85). Tokumura munkacsoportjának fent felsorolt kísérletei nem adnak választ arra, hogy az LPA milyen kardiális vagy vaszkuláris sejt típus(ok)on keresztül fejt ki hatását a vérnyomásra, bár leginkább direkt érsimaizom-hatásnak gondolták. Schumacher és munkatársainak ezzel egyidőben zajló kutatása az LPA vérlemezkékre gyakorolt hatását vizsgálva (melyet korábban már kifejtettem a 2.4.2 fejezetben) arra a következtetésre jutott, hogy macskákban az LPA vérnyomáscsökkentő hatása nem az LPA vazoaktív hatásából fakad, hanem a fokozott vérlemezke aggregációból. A tüdő ereiben létrejövő embólusok megnövelik a kisvérköri érellenállást, ami a perctérfogat csökkenését okozza – minél nagyobb a kísérleti állat vérlemezkeszáma LPA adás előtt, annál súlyosabb, akár halálos keringési elégtelenség alakul ki benne (140). Ebből kiindulva Tokumura laboratóriumában tovább elemezték a macskákban LPA adására létrejövő vérnyomás-választ. Azt vették észre, hogy a vérnyomásválasz bifázisos, egy kezdeti gyorsan kialakuló átmeneti csökkenésből és egy ezt követő, szintén átmeneti növekedésből áll. Az egyes komponensek kialakulása ugyanakkor a vizsgált LPA típusától függ, mind az oldalláncok hosszától, mind telítetlenségük fokától, mind kapcsolódási módjuktól. Patkányokhoz hasonlóan, a többszörösen telítetlen LPA-k vérnyomásemelő hatása macskákban is erősebb, és a szerzők ezt direkt érsimaizom hatásnak tartják (212). A

vérnyomáscsökkenés ugyanakkor valószínűleg vérlemezkék működéséhez kötött: ugyanolyan oldalláncú, de alkil-LPA sokkal hatékonyabban csökkentette a vérnyomást, ami – bár ezt akkor még nem tudhatták – a vérlemezkék LPA érzékenységéhez (93) és az LPA₅ receptor ligandszelektivitásához (12) hasonlít.

Hogy az LPA pontosan milyen sejtekre hatva, milyen receptorok és jelátviteli utak érintésével fejt ki hatását/hatásait a vérnyomásra, kutatásaink kezdetekor nem volt teljesen ismert, ahogyan az sem, van-e szerepe az LPA-nak a vérnyomás szabályozásában élettani vagy kórélettani körülmények között. Panchatcharam és mtsai. megvizsgálták, hogy az LPA 1-es és 2-es receptorának hiánya – külön-külön, és együtt is – fehér egerekben okoz-e eltérést a nyugalmi vérnyomásukban, és az LPA intravénás adására kialakuló vérnyomásválaszban. Eredményeik szerint az LPA – a patkányokhoz és tengerimalacokhoz hasonlóan – egerekben is okoz átmeneti vérnyomás emelkedést, azonban az említett receptorok sem ennek a közvetítésében, sem a nyugalmi vérnyomás kialakításában nem játszanak szerepet (105). Heise és munkacsoportja, amikor az akkoriban ismert edg-típusú LPA receptorok vizsgálatához tervezett különböző agonista és antagonistá hatású ligandokat (ún. VPC származékok), ezen anyagok hatását leellenőrizte a Tokumura által is használt patkány-modellben. Azt találták, hogy az LPA₁₋₃ szelektív agonista VPC31143 kis mértékben bár, de utánozza az LPA vérnyomásemelő hatását (213). Okusa és munkacsoportja sem az LPA₃ receptor szelektív agonistájának, sem az LPA₁/LPA₃ receptorok gátlószerének hatására sem tapasztalta a nyugalmi vérnyomás megváltozását éber, szabadon mozgó C57Bl/6 egerekben (214). Saga és mtsai. uretánnal altatott patkányok vérnyomását mérte duodenumba adagolt autotaxin inhibitor adását követően. A plazma autotaxin aktivitását már 3 mg/kg dózisban is majdnem 100%-ban lecsökkentő ONO-8430506 a plazma LPA koncentrációjának drasztikus csökkenését váltja ki, de a vérnyomásra nincsen hatása. Ugyan a dózist 10 mg/kg-ra növelve a vérnyomást szignifikánsan csökkenti – és ez egybevágna azzal, hogy kívülről adott LPA patkányban emeli a vérnyomást (l. Tokumura eredményei) – de mivel ez már nem jár további autotaxin-aktivitás csökkenéssel, így ez a hatás valószínűleg nem az LPA plazmából való eltűnésével kapcsolatos (215). Az LPP3 enzim endotél-specifikus, indukálható kiütése egérben ugyan nem jár a plazma LPA szintjének megváltozásával, de több adat is arra utal, hogy az endotélsejtekben lokálisan több LPA-mediálta folyamatban is szerepe van. Érdekes

módon, ezeknek az egereknek a szisztolés vérnyomása elmarad kontroll társaikétól, ami utalhat arra, hogy az endotélsejtek környezetében felszaporodó LPA-nak vazodilatátor hatása lehet (135). Kórélettani körülmények között, spontán hipertenzív patkányokban az LPA intravénás adására jelentősebb vérnyomás emelkedés alakult ki, mint kontroll egyedekben (216). Ebben a publikációban két érdekes, de nem részletezett megállapításra jutottak a szerzők: az LPA vérnyomásemelő hatásában a különbség kizárólag éber patkányokban volt megfigyelhető, altatottakban nem, illetve a vérnyomásemelő hatás kismértékben csökkent tromboxán-szintézist gátló szer adására.

2.4.5.4. A lizofoszfátidsav hatása az endotélsejtek nitrogén-monoxid termelésére

Korábban már részletesen – bár a dolgozat különböző pontjain – összefoglaltam, hogy az endotélsejtek felszínén mind az autotaxin enzim, mind lipid foszfát foszfatázok, mind pedig az eddig megismert LPA receptorok megtalálhatóak. A 2. táblázat adataiból jól látszik, hogy a lizofoszfátidsavnak sokrétű szerepe van az endotélsejtek működésének szabályozásában, amiből az egyik az endotélsejtek NO-felszabadulásának befolyásolása. Az erre vonatkozó irodalmi adatok némileg ellentmondásosak, ugyanis mind az NO-termelés csökkenését, mind annak fokozódását kiválthatja az LPA.

Chen és munkatársai arra keresték a választ, hogy az ateroszklerotikus folyamatokban szerepet játszó LPA okozhat-e endotéldiszfunkciót, ezzel is hozzájárulva a betegség patogeneziséhez. Sertés koszorúér preparátumaikat hosszú távon (24 órán keresztül) inkubálták LPA-val, hogy utánozzák az ateroszklerotikus környezetben megnövekedett LPA szintet. Az inkubáció dózis-függő módon gátolta a bradikinin vazodilatátor hatását a sertés koszorúérben, aminek magyarázatát abban találták, hogy LPA hatására szabadgyökök képződnek, és az eNOS expressziója lecsökken. E két utóbbi jelenséget tenyésztett humán koronária artéria endotélsejtekben (HCAEC) is igazolták (156). Érdekes, hogy ugyanez a munkacsoport már évekkkel a fenti publikáció előtt megfigyelte, hogy a lizofoszfátidil-kolin (LPC) – ami az LPA előanyaga (l. 2.2 fejezet) – pontosan ugyanazekkel a hatásokkal bír sertés koronáriában (217), Rao és mtsai. pedig hasonló jelenséget figyeltek meg egér aortában (218). Előfordulhat, hogy az LPC ezen hatásának hátterében LPA képződés és következményes LPA receptor aktiváció áll.

Az LPA különböző tenyésztett endotélsejtekben fokozza az eNOS aktivitását (157-159), bár ennek mechanizmusa az irodalmi adatok alapján ellentmondásos. Kou és mtsai. eredményei alapján borjú aorta endotélsejtekben (BAEC) az eNOS aktivációja foszforilációhoz kötött, amit a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) enzim közvetít (158), míg szintén BAEC sejtekben Montagnani és mtsai. szerint ugyanez az útvonal nem játszik szerepet az LPA NO termelést fokozó hatásában (159). Ezeket az ellentmondásokat magyarázhatja, hogy sejt kultúrában nagyon megváltozhatnak az endotélsejtek tulajdonságai: pl. tenyésztett BAEC sejtek génexpressziós mintázata jelentősen megváltozik frissen izolált BAEC sejtekhez képest (219), humán köldökzsínór véna endotélsejtek (HUVEC) pedig kultúrában elveszítik felszíni glikokalix rétegüket (220). Kutatásaink kezdetekor nem volt ismert, hogy az LPA *in situ*, vagy *in vivo* képes-e a vaszkuláris endotélsejtek NO-termelését befolyásolni.

2.4.5.5. A lizofoszfátidsav szerepe az erek mechanotranszdukciós folyamataiban

Az értónus szabályozásában fontos szerepe van az ereket kitöltő vér által generált fizikai erőknek. Ilyen erők az áramló vér által keltett nyíróerő, mely az ereket bélelő endotélsejtek felszínén hat, és a vérnyomás által generált cirkumferenciális feszülés, amit mind az endotélsejtek, mind a simaizomsejtek érzékelnek. Ezek az erők szignáltranszdukciós folyamatokat indítanak el, amik számos élet- és kóreltani folyamatot szabályoznak az erekben, többek között az értónust. A nyíróerő növekedésének akut hatása az erek relaxációja, mely döntően NO- és prosztaciklin felszabaduláson keresztül történik, az érfal feszülésének növekedése pedig vazokonstrikciónak vezet – miogén válasz – ami a keringési autoreguláció alapja (221). Irodalmi adatok alapján a lizofoszfátidsav mindkét folyamatban érintett.

Ohata és munkacsoportja éveken keresztül vizsgálta, hogyan hat az LPA olyan sejtekre, melyek mechanoszenzitív kationcsatornákkal rendelkeznek. Kezdeti eredményeik szerint az LPA érzékenyít több sejtfeleséget is a mechanikus ingerlésre, vagyis az általuk alkalmazott enyhe mechanikus hatás (fiziológiás mértékű nyomó-nyíró erő) önmagában nem, de LPA jelenlétében lokális kalcium-jeleket vált ki (222). Ezt a hatást az LPA BAEC sejtekben úgy váltotta ki, hogy mechanoszenzitív kationcsatornán keresztüli Ca^{2+} -beáramlást erősített fel (223). 10 év telt el, mire megfigyelésüket *in situ*,

egérből izolált aorta szeleteken is igazolták (224). Az aorta szeleteket nyíróerőnek kitéve (és csak akkor) az LPA kontrakciót váltott ki, és ez endotélium-, COX- és TXA₂-függő volt (225). Hogy megtudják, a fenti jelenségnek van-e szerepe az erek kontrakciós és relaxációs válaszaiban, kis mesenterialis artériákat vizsgáltak nyomás miográf segítségével. Eredményeik szerint míg az LPA-nak önmagában (3 µM) nem volt hatása az érátmérőre, addig dózis-függő módon fokozta a PE-nel indukált kontrakciós készséget és gátolta az eNOS-függő vazodilatációt. Mindkét hatásért COX aktiváció és következményes TXA₂ felszabadulás volt felelős, és csak az endotélium épsége esetén volt megfigyelhető (226). Egy másik munkacsoport cremaster arteriolák miogén válaszát vizsgálta LPA jelenlétében, és azt találták, hogy az LPA LPA_{1/3} receptor mediálta szabadgyök-képződésen keresztül erősíti fel a miogén vazokonstriktiót (166).

2.4.5.6. A lizofoszfátidsav közvetlen hatása az erek átmérőjére, tónusára

Nagyon kevés ismerettel rendelkezünk arra vonatkozóan, hogy állhat-e az LPA intravénás adására létrejövő vérnyomásnövekedés háttérében valamilyen közvetlen, erek simaizmára kifejtett hatás, illetve, hogy az LPA nitrogén-monoxid felszabadító képessége van-e hatással az értónusra. Az első kérdést már Tokumura munkacsoportja is próbálta vizsgálni 1995-ben megjelent munkájukban (216). Saját kutatásaik addigra már igazolták, hogy különböző szervekből preparált simaizomban az LPA képes kontrakciót kiváltani (pl. méh (227) és vékonybél (228) esetében), illetve LPA az intracelluláris Ca²⁺-koncentrációt megemeli patkány aorta simaizom sejtekben (163). Ezért megvizsgálták patkány aorta gyűrűk kontrakciós válaszát LPA hatására. Érdekes módon kontrakciós választ nem tapasztaltak, csak enyhe tónuscsökkenést, azt sem minden vizsgálati körülmény esetében (216).

Tigyi Gábor és munkacsoportja ugyanebben az évben publikálta, hogy a lizofoszfátidsav dózisfüggő vazokonstriktiót okoz piális erekben (229). Vizsgálataikat újszülött malacba épített zárt koponyaablak mellett végezték, az LPA-t lokálisan adták a koponyaablakot kitöltő mesterséges cerebrospinális folyadékba (aCSF). Az LPA direkt konstriktor hatása mellett jelentősen csökkentette az izoproterenolra és a hiperkapniára adott piális vazodilatációt. Az LPA ezen hatásait a G_i-gátló pertussis-toxin (PTX)

előkezelés teljes mértékben kivédte. Emellett LPA hatására az aCSF cAMP tartalma dózis-függő módon lecsökkent, amit szintén kivédett a PTX előkezelés. Bár ekkor még az LPA receptorokat nem azonosították, ezek a megfigyelések egyértelműen a G_i -cAMP jelátviteli út érintettségére utaltak. Caner és munkatársai szintén tapasztaltak vazokonstriktiót, amikor az LPA-t lokálisan alkalmazták éber nyulak arteria basilarisán (230).

3. CÉLKITŰZÉSEK

Annak ellenére, hogy a lizofoszfátidsav szerteágazó szerepet tölt be a kardiovaszkuláris rendszer működésének szabályozásában mind élettani, mind kórélettani körülmények között, az értónusra gyakorolt hatásával kapcsolatos ismereteink többnyire közvetettek és hiányosak. Az előző fejezetben összefoglalt kutatási eredmények arra utalnak, hogy az LPA az erek összehúzódását és elernyedését egyaránt képes lehet kiváltani, illetve befolyásolni tudja az erek biomechanikai stimulusokra és farmakonokra adott válaszkészségét. Míg az LPA direkt vazokonstriktor hatása részben már ismert volt, esetleges vazorelaxáns hatásáról kutatásaink kezdetekor semmilyen irodalmi adat nem állt rendelkezésre.

Kísérleteink során ezért a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Van-e a lizofoszfátidsavnak endotél-függő vazoaktív hatása, elsősorban
- képes-e a lizofoszfátidsav NO felszabaduláson keresztül befolyásolni az értónust, és ha igen, akkor az
- milyen receptor(ok) közvetítésével, milyen jelátviteli útvonal(ak)on keresztül valósul meg?
- Kifejeződnek-e a lizofoszfátidsav receptorai és az autotaxin az endotélsejtekben?

4. MÓDSZEREK

4.1. Kísérleti állatok

Munkacsoportunk számos genetikailag módosított egértörzzsel rendelkezik. Az egerek jelentős részét saját állatházunkban tenyésztjük, vagy kutatási együttműködés keretei között jutunk hozzájuk. A jelen tanulmányban felhasználásra kerülő egerek genetikai háttere C57Bl/6J, kontrollként ilyen egereket használtunk fel és a későbbiekben vad típusként (WT, wild type) hivatkozom rájuk. A genetikailag módosított egerek típusát és származási helyét a 3. táblázat tartalmazza, a genotípust minden esetben kísérlet előtt és után is ellenőriztük. A kísérleteket felnőtt, hím (életkor: 90-120 nap) egereken végeztük. Az egereket 12 órás világos/sötét ciklus mellett tartottuk, és korlátlanul jutottak ivóvízhez és standard táplálékhoz. Az állatkísérletes munka a Semmelweis Egyetem Klinikai Kísérleti Kutató Intézetben készült, kivéve az LPA receptor KO állatokon végzett kísérleteket, amiket Tigyi Gábor és Kafait U. Malik professzorok jóvoltából a University of Tennessee Health Science Center Élettani és Farmakológiai Intézeteiben végeztem. Minden beavatkozás a Semmelweis Egyetem és a University of Tennessee Health Science Center állatvédelmi szabályzatainak megfelelően történt.

3. táblázat Jelen dolgozathoz felhasznált genetikailag módosított egértörzsek

Genotípus	Háttér	Származás
eNOS KO	C57Bl/6J	Charles River Laboratories (Isaszeg, Magyarország)
COX1 KO	C57Bl/6J	Ingvar Bjarnason (Department of Medicine, Guy's, King's College, St. Thomas' School of Medicine, London, UK)
PLC ϵ KO	C57Bl/6J	Alan V. Smrcka (University of Rochester School of Medicine, Rochester, NY, USA) (231)
LPA ₁ KO	C57Bl/6J	Jerold Chun (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) (100)
LPA ₂ KO	C57Bl/6J	Jerold Chun (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) (94)

4.3. Érpreparátumok előkészítése miográfós kísérletekhez

A kísérletekhez felhasználásra kerülő aortaszakaszok preparálása a munkacsoportunk által korábban leírt metodikával történt (232). Éterrel vagy izofluránnal mélyen altatott egereket transzkardiálisan 10 ml heparinizált (10 IU/ml) Krebs oldattal perfundáltunk. A mellkasi aortát (thoracic aorta, TA) illetve a hasi aortát (abdominal aorta, AA) mikroszkóp alatt (M3Z, Wild Heerbrugg AG, Gais, Svájc) megtisztítottuk a zsírtól és kötőszövetből. Ezután a következő összetevőket tartalmazó, karbogén gázzal átbuborékolgatott (95% O₂, 5% CO₂) szobahőmérsékletű Krebs oldatba helyeztük: 119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 2,5 mM CaCl₂·H₂O, 1,2 mM MgSO₄·7H₂O, 20 mM NaHCO₃, 0,03 mM EDTA és 10 mM glükóz, pH=7,4. Az erekből kb. 3 mm hosszúságú gyűrűket preparáltunk és konvencionális miográf rendszer (610M Multiwire Myograph System; Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Dánia) rozsdamentes acél értartó tüüre (d=200 µm) helyeztük. Az endotélium épségére különösen vigyáztunk a preparálás során. Ez alól kivételt jelentettek azok a vizsgálatok, amikor az endotéliumot szándékosan roncsoltuk. A roncsoláshoz sebészi fonalat húztunk át többször óvatosan az ér lumenében (Supramid pszeudo-monofil poliamid varróanyag, 3/0 méret, B. Braun Medical Kft., Budapest). Kísérleteink során az endotélium eltávolításának sikerességét az acetilkolin-okozta relaxáció hiánya jelezte.

4.4. Az értónus vizsgálata miográfós kísérletekben

A miográfok szervfürdőit 6 ml Krebs oldattal töltöttük fel és karbogénnal buborékolattuk át. Az ereket 30 percig pihentettük az értartókon, miközben a Krebs-oldat hőmérsékletét 37 °C-ra emeltük és beállítottuk az erek nyugalmi feszülését. A nyugalmi tónus értéke TA-k esetében 15 mN, AA-k esetében pedig 10 mN; munkacsoportunk korábbi tanulmánya alapján ezek mellett az „optimális” passzív tónusok mellett kaphatóak maximális érválaszok (232).

A 30 perc elteltével lecseréltük a Krebs-oldatot hasonló, de 124 mM K⁺-t tartalmazó oldatra (K⁺-Krebs) 1 percen keresztül, majd néhány kimosás és az alaptónus visszatérte után 10 µM fenilefrinnel (PE) prekontraháltuk és 0,1 µM acetilkolinnal (ACh) relaxáltuk őket. Ez a teszt szolgált a simaizom és az endotélium ellenőrzésére, a nem reagáló ereket – vagy endotél-irtott erek és eNOS KO-k esetében éppen az ACh-ra jól

reagálókat (nem elégséges endotél-irtás, vagy valószínűsíthetően nem KO egér) – már ekkor kizártuk a további kísérletekből.

Többszöri kimosás és a nyugalmi tónus visszatérte után ismételt, de ez esetben 3 percig tartó K^+ -Krebs expozíció következett. Az így kialakuló érválaszt tekintettük a későbbiekben referencia-kontrakciónak, és használtuk a vazokonstriktor anyagok hatásának normalizálására. Kimosás és a nyugalmi tónus visszaállta után PE (10 nM – 10 μ M) és ACh (1 nM – 10 μ M) kumulatív dózis-hatás összefüggését vizsgáltuk meg az érsimaizom és az endotélium válaszkészségének pontos tesztelése érdekében.

Kimosást, majd 30 perc nyugalmi periódust követően a TA-k egy részében valamint a deendotelizált aortagyűrűkön megvizsgáltuk, hogy az egyes LPA típusok okoznak-e értónus fokozódást. A többi éren a korábbi dózishatás-összefüggést tanulmányozva olyan PE koncentrációt alkalmaztunk, amellyel a referencia-kontrakció 70-90 százalékának megfelelő előfeszítést hoztunk létre. Ennek stabilizálódását követően megvizsgáltuk, hogy az LPA típusok képesek-e vazorelaxációt kiváltani. A további kísérleteket a legnagyobb relaxációt kiváltó oleoil-LPA-val végeztük. (A külön nem specifikált, csak LPA-ként hivatkozott LPA fajta mindig az oleoil LPA-t jelöli a későbbiekben.) Az LPA hatás dóziszfüggését a gyorsan kialakuló deszenzitizáció miatt nem kumulatív módon, hanem egyedi kísérletekben vizsgáltuk.

Az LPA okozta relaxáció jelátvitelének vizsgálatához a különböző enzim inhibitorokat és receptor gátlószereket kétféle módon alkalmaztuk. Wortmannin, MK-2206, Ki16425 és AM095 esetében az LPA expozíció előtt 30 perccel kezdtük el inkubálni az ereket, és a gátlószer az LPA kezelés alatt is az oldatban volt. Ezen a protokollon azonban változtatni kellett, amikor a PLC enzim esetleges szerepét szeretnénk volna megvizsgálni. A PLC gátlószerei – az U73122 valamint az edelfosine – ugyanis az érkádakban használva érhető módon nem csak az endotéliumban, hanem a simaizomsejtekben is gátolják az enzimet. Így azonban az ereken az ugyanezt az útvonalat aktiváló PE-nel nem lehet prekontrakciót létrehozni és az LPA relaxáns hatását vizsgálni. A PLC endotélium-szelektív gátlására a következő módszert alkalmaztuk: a perfúziós oldatban hoztuk létre a szükséges gátlószerkoncentrációt, és a szokásosnál több, 20 ml gátlószeres Krebs oldattal nagyon lassan perfundáltuk az

állatokat, hogy az ér lumenében áramló gátlószerrel hosszú ideig érintkezessenek az endotélsejtek. A kontrollkísérleteket is hasonlóan végeztük: az U73122 inaktív analógját az U73343-at, vehikulumukat a DMSO-t, valamint az edelfosine vehikulumát, az etanolt is minden esetben a perfúziós oldathoz adtuk. Hogy ne teljen el sok idő a gátlószer beadása és az LPA tesztelése között, kihagytuk az érreaktivitás kezdeti ellenőrzését. Hogy sikerült-e gátolnunk szelektíven az endoteliális PLC-t, úgy tudtuk igazolni, hogy ép PE dózis-hatást követően az ismert PLC-függő ACh nem relaxálta a kezelésem átesett ereket. Ugyanezen kísérletekben annak igazolására, hogy a gátlószer a jelátviteli utat gátolta, és nem a simaizom NO-érzékenységét, az NO-donor nitroprusszid-nátrium (sodium nitroprussid, SNP) hatását is megvizsgáltuk.

4.5. Endoteliális LPA receptorok és autotaxin expresszió-analízise

4.5.1. Egér aorta endotélsejtek izolálása

Az endotélsejteket egy korábban leírt módszer kisebb módosításaival izoláltuk (233). Az egereket éterrel elaltattuk, majd 10 ml 10 U/ml heparint tartalmazó Krebs-oldattal perfundáltuk, hasonlóan, mint a miográfus kísérleteket megelőzően. Az aorta lumenét DMEM oldattal (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Lonza, Verviers, Belgium) átmostuk, és feltöltöttük 2 mg/ml II-es típusú kollagenázt (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA) tartalmazó DMEM oldattal. Az aortát mindkét végén fonállal lekötöttük, kivágtuk az állatból, DMEM oldatba helyeztük és 45 percen keresztül 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a lument 3 ml DMEM oldattal átmostuk, hogy kinyerjük belőle az endotélsejteket. Az így kapott sejtszuspenziót két centrifugacsőbe szétmértük, és 1200 fordulat/perc sebességgel 5 percen keresztül centrifugáltuk. Az első csőben lévő üledéket 300 µl RNAlater oldatban (Ambion, Austin, TX, USA) vettük fel, majd az RNS izolálásig hűtőszekrényben tároltuk. A másik csőben lévő mintát immuncitokémiai vizsgálathoz készítettük elő: az üledéket reszuszpendáltuk 20% FBS, 100 U/ml penicillin és 100 µg/ml streptomycin tartalmú DMEM-ben, fedőlemezre pipettáztuk és egy éjszakán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, hogy a sejtek kitapadhassanak. Az immuncitokémiai vizsgálat célja az endotélsejtek relatív arányának meghatározása volt, vagyis azt vizsgáltuk, mennyire sikerült „tisztá” endotél-populációt nyernünk.

4.5.2. Immuncitokémia

A mintában lévő összes sejt megszámlálására DAPI festést, az endotélsejtek kimutatására pedig klaudin-5-immuncitokémiai festést alkalmaztunk. A fedőlemezeket 4-szer átmostuk PBS oldattal, a kitapadt sejteket pedig szobahőmérsékleten, 20 percig formalinnal fixáltuk. Ezután a lemezt 100 mM glicin tartalmú PBS oldatban 10 percig szobahőn átmostuk, majd 0,1%-os Triton X-100 oldattal 20 percen keresztül permeabilizáltuk és 1 órán keresztül 3% BSA tartalmú PBS oldattal blokkoltuk a sejteket. Ezt 1% BSA tartalmú PBS-ben oldott monoklonális klaudin-5 antitesttel (egérben termelt egér ellenes, 1:200 hígítás, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) történő inkubáció követte 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten. Miután az elsődleges antitestet PBS-sel lemostuk, újabb 1 órás inkubáció következett szobahőn Alexa 568 konjugált egér ellenes IgG antitesttel (1:500 hígítás, Invitrogen). A magfestéshez Alexa 488 konjugált DAPI festéket használtunk (1:1000 hígítás, Invitrogen), mellyel 10 percen keresztül, szintén szobahőmérsékleten inkubáltunk. Végezetül fluoreszcens mikroszkóppal (Eclipse Ti, Nikon, Tokió, Japán) megszámloltuk az endotél sejtek arányát az összes sejtszámhoz viszonyítva.

4.5.3. Kvantitatív valós-idejű PCR

Az expresszióanalízist csak abban az esetben végeztük el, ha az endotélsejtek aránya a mintában meghaladta a 98%-ot. Az RNS izolálást RNeasy micro kit-tel (Qiagen, Valencia, MA, USA) végeztük, az RNS koncentrációját és minőségét Nanodrop-pal (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) határoztuk meg. Az RNS alacsony koncentrációja miatt a reverz transzkripciót az Ovation PicoSL WTA System V2-el (NuGEN Technologies, San Carlos, CA, USA) végeztük a gyártó előírása szerint. A módszer lehetővé tette, hogy az átírt cDNS-t felszaporítsuk. Az amplifikált cDNS-t QIAquick oszloppal (Qiagen) tisztítottuk, majd mennyiségét Nanodrop-al mértük meg. A kvantitatív valós idejű PCR-hez 4 ng amplifikált cDNS-t használtunk. A PCR reakciók triplikátumban történtek, RT2 SYBR Green/ROX PCR master mix felhasználásával (Qiagen) 25 µl végtérfogatban, Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR rendszerben (Life Technologies, Grand Island, NY, USA); a primer szekvenciákat a 4. táblázat tartalmazza. Ciklusparaméterek: 1 inkubációs lépés 50 °C-on 2 percig, 1

denaturációs lépés 95 °C-on 10 percig, és 40 ciklus denaturáció 95 °C-on 10 másodpercig, primer kapcsolódás és elongáció 60 °C-on. A vizsgált gének relatív expresszióját dCt módszerrel határoztuk meg, normalizáló génként GAPDH-t használtunk.

4. táblázat Kvantitatív valós-idejű PCR során használt primer szekvenciák

Gén	Primer szekvencia (5'- 3')	Reverz primer szekvencia (5'- 3')
GAPDH	CTGCACCACCAACTGCTTAG	GGGCCATCCACAGTCTTCT
LPA₁	CACCATGATGAGCCTTCTGA	GCAGCACACATCCAGCAATA
LPA₂	CCAGCCTGCTTGTCTTCCTA	GTGTCCAGCACACCACAAAT
LPA₃	AGGGCTCCCATGAAGCTAAT	TGCACGTTACACTGCTTGC
LPA₄	ACAGTGCCTCCCTGTTTGTC	AAATCAGAGAGGGCCAGGTT
LPA₅	TCATCATCTTCCTGCTGTGC	ATCGCGGTCCTGAATACTGT
ATX	ATTACAGCCACCAAGCAAGG	AGGGAAAGCCACTGAAGGAT

4.6. Kiértékelés, statisztikai elemzés

Az értónus változásainak rögzítéséhez és a kapott eredmények kiértékeléséhez Biopac MP100 rendszert és AcqKnowledge 3.7.3 szoftvert használtunk (Biopac System Inc., Goleta, CA, USA). A konstriktor érválaszokat a K⁺-Krebs által kiváltott kontrakció 3 perces értékére, a relaxáns válaszokat pedig a PE-nel kiváltott prekontrakció értékére normalizáltuk. Minden adat átlag±standard hiba formájában jelenik meg szövegben és az ábrákon, *n* pedig a tesztelt érszakaszok számát jelöli. A statisztikai elemzéshez GraphPad Prism szoftvert használtunk (v.6.07; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). A dózis-hatás összefüggések kiértékelésekor nemlineáris regressziót alkalmaztunk a maximális hatás (E_{max}) és a félmaximális hatást kiváltó koncentráció (EC_{50}) meghatározásához. Két csoport összehasonlításakor Student-féle páratlan *t*-tesztet, több csoport összehasonlításakor pedig varianciaanalízist használtunk az elrendezésnek megfelelő post hoc teszttel. A különbséget akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a *p* értéke 5% alatt volt.

4.7. Reagensek

A kísérletekhez használt palmitoil-, heptadekanoil-, sztearoil-, és oleoil-LPA-t az Avanti Polar Lipidstől (Alabaster, AL, USA), míg a linoleoil- és linolenoil-LPA-kat az Echelon Biosciences Inc.-től (Salt Lake City, UT, USA) szereztük be. A telítetlen LPA-kat közvetlenül a kísérlet előtt oldottuk fel fiziológias sóoldatban, a kádákban létrehozott végkoncentrációhoz képest százszoros töménységben. A telített LPA-kat szintén közvetlenül a kísérlet előtt oldottuk metanolban, a kádákban létrehozott végkoncentrációhoz képest ezerszeres töménységben. Az AM095 szintetizálása egy korábban leírt módszer alapján történt (234). A Ki16425-t, az edelfosine-t valamint az U73122-t a Cayman Chemical Co.- től (Ann Arbor, MI, USA) vásároltuk, az inzulint, az U73343-at és a wortmannint a Tocris Bioscience-től (Bristol, UK), az MK-2206-ot pedig a Selleckchem-től (München, Németország). Minden egyéb, jelen munkához felhasznált anyagot a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) szereztünk be. Amennyiben egy vegyületet szerves oldószerben oldottunk (U73122, U73343, Ki16425, wortmannin és MK-2206 esetében DMSO-ban, AM095 és edelfosine esetében etanolban), az oldószer végkoncentrációja a szervfürdőben legfeljebb 1 ezrelék volt, perfúzió esetén pedig 1 százalék. Ezekben a kísérletekben a kontroll erek oldószert kaptak. Az ábrákon és a szövegben minden alkalmazott anyag szervfürdőben létrehozott végkoncentrációja szerepel.

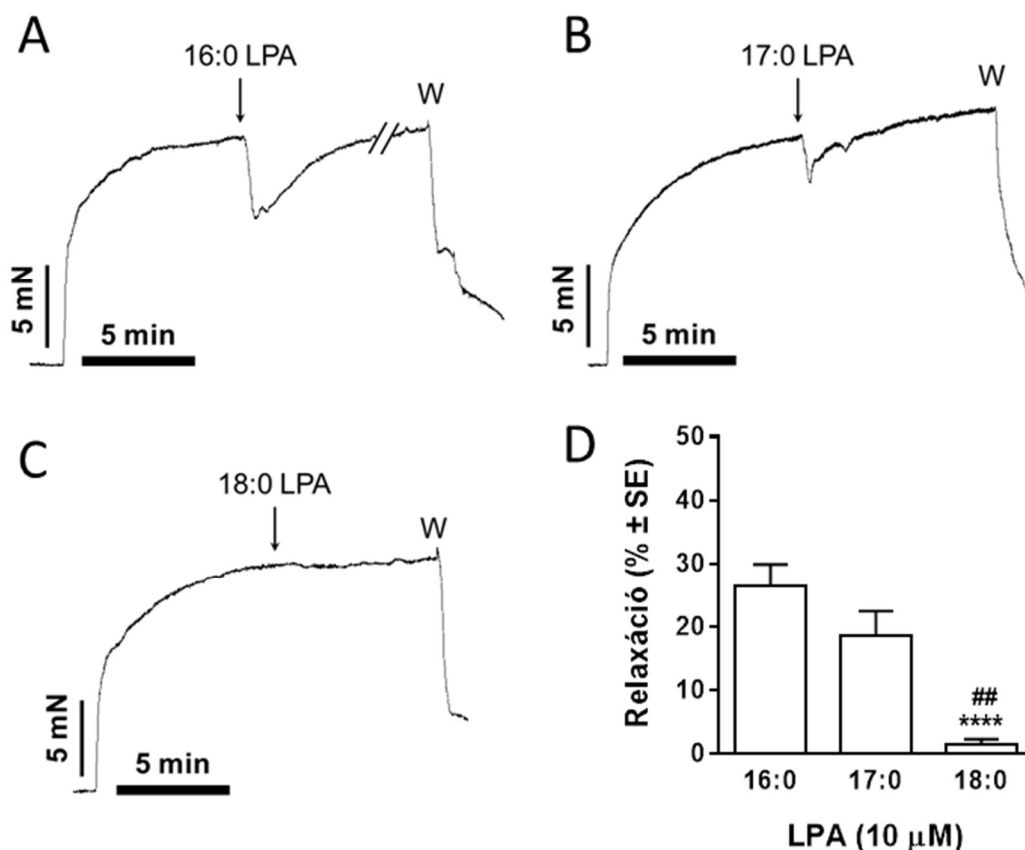
5. EREDMÉNYEK

5.1. A lizofoszfátidsav vazorelaxációt okoz ép endotélú mellkasi aortában

Mivel kérdésselvetésünk elsődlegesen arra irányult, okozhat-e a lizofoszfátidsav vazorelaxációt izolált artériában, ezért első lépésben az LPA hatását előzetesen prekontrahált erekben vizsgáltuk meg, különösen ügyelve arra, hogy azok ép endotéllel rendelkezzenek.

5.1.1. Különböző lizofoszfátidsav típusok eltérő mértékű vazorelaxációt okoznak

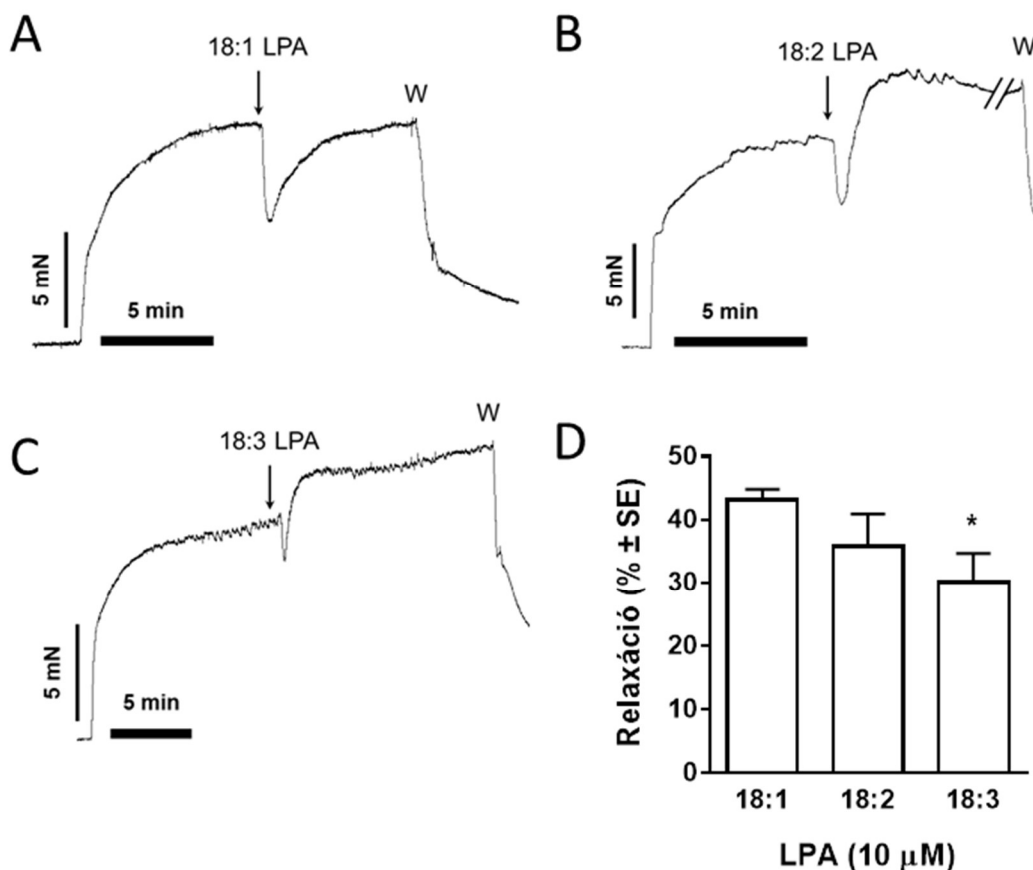
Annak eldöntésére, hogy képes-e valamely lizofoszfátidsav vazorelaxáció kiváltására, ép endotéllel rendelkező mellkasi aortagyűrűket PE-nel prekontraháltunk, majd a prekontrakció stabilizálódása után különböző, eltérő oldallánc-hosszúságú, illetve eltérő mértékben telítetlen oldalláncot tartalmazó LPA típust alkalmaztunk 10 μM -os koncentrációban. A 6. ábra eredeti regisztrátumain látható, hogy az általunk vizsgált palmitoil- és heptadekanoil LPA gyorsan létrejövő, tranziens relaxációt okoz (A és B panelek), míg a sztearoil LPA alig vált ki relaxációt (C panel). A maximális relaxáns hatások kiértékelése során (D panel) a relaxáció mértéke az oldallánc hosszúságának növelésével csökkenő tendenciát mutat ($26,3 \pm 3,6\%$, $18,6 \pm 3,8\%$ valamint $1,4 \pm 0,8\%$).



6. ábra Telített, változó oldallánc-hosszúságú LPA-k vazodilatátor hatásának vizsgálata. 10 μM palmitoil- (A panel), heptadekanoil- (B panel) és sztearoil-LPA (C panel) fenilefrinnel (PE) előfeszített, vad típusú, ép endothellel rendelkező mellkasi aortagyűrűk relaxációját okozza (reprezentatív eredeti miográf regisztrátumok). A horizontális és vertikális jelölők 5 percet, illetve 5 mN-t jelölnek. W=a kád átmosása friss Krebs oldattal. A relaxáns hatás maximuma (D panel) a telített oldallánc hosszának növelésével csökkenő tendenciát mutat, 18 szénatom hosszúságnál már alig figyelhető meg. Az értékek átlag±standard hiba formában vannak feltüntetve, a PE által kiváltott prekontrakció százalékában. ## $p < 0,01$ vs. 17:0 LPA, **** $p < 0,0001$ vs. 16:0 LPA, $n=16, 10, 10$; egyváltozós ANOVA, Tukey-féle post-hoc teszttel.

Mivel a 18 szénatom hosszúságú oldalláncot tartalmazó LPA-k közül mind a telített, mind különböző telítetlen formák előfordulnak az emberi szervezetben (l. 2.1.2 fejezet), ezért következő lépésben megvizsgáltuk az oleoil-, linoleoil- és linolenoil LPA-k vazorelaxáns hatását. A 7. ábra eredeti miográfos regisztrátumain az látható, hogy mind az egyszeresen telítetlen oldalláncú oleoil- (A panel), mind a kétszeresen telítetlen oldalláncú linoleoil- (B panel) és a háromszorosan telítetlen oldalláncú linolenoil-LPA (C panel) gyorsan kifejlődő, tranziens relaxációt okoz. A relaxációk maximumának kiértékelése alapján (D panel) a relaxáns hatás a telítetlenség fokának növelésével

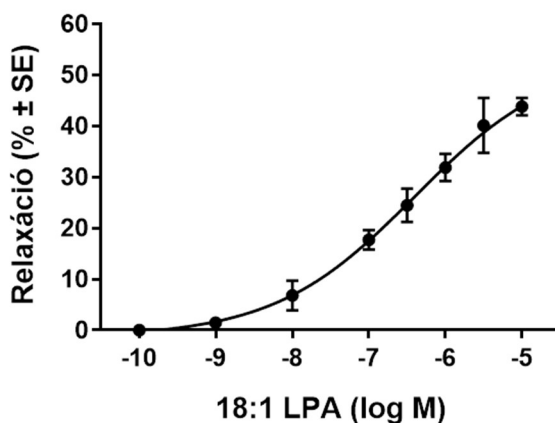
csökkenő tendenciát mutat ($43,1 \pm 1,6\%$, $37 \pm 6,7\%$ és $30,2 \pm 6,4\%$). Érdekes, hogy amíg az oleoil-LPA relaxáns hatásának lecsengése után az értónus az előzőleg beállított prekontrakció értékére tér vissza, addig a többszörösen telítetlen LPA-k a relaxáció lecsengése után jól láthatóan a prekontrakció szintje fölé növelik az értónust.



7. ábra 18 szénatom hosszú, eltérő mértékben telítetlen oldalláncú LPA-k vazodilatátor hatásának vizsgálata. 10 μM oleoil- (A panel), linoleoil- (B panel) és linolenoil-LPA (C panel) fenilefrinnel (PE) előkészített, vad típusú, ép endothellel rendelkező mellkasi aortagyűrűk relaxációját okozza (reprezentatív eredeti miográf regisztrátumok). A horizontális és vertikális jelölők 5 perctet, illetve 5 mN-t jelölnek. W=a kád átmosása friss Krebs oldattal. A relaxáns hatás maximuma (D panel) a telítetlenség fokának növelésével csökkenő tendenciát mutat. Az értékek átlag±standard hiba formában vannak feltüntetve, a PE által kiváltott prekontrakció százalékában. * $p < 0,05$ vs. 18:1 LPA, $n=59, 10, 11$; egyváltozós ANOVA, Tukey-féle post-hoc teszttel.

5.1.2. Az oleoil lizofoszfátidsav dóziszfüggő relaxációt okoz

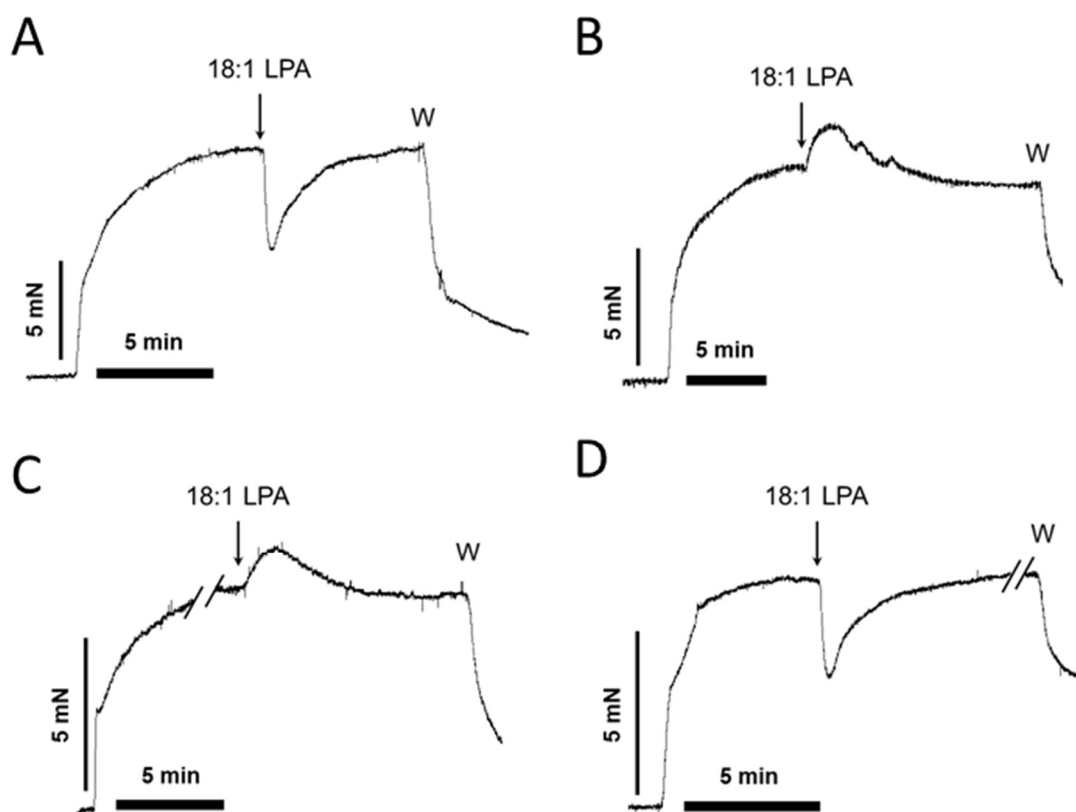
Fenti eredményeink alapján a szervezetben egyik gyakran előforduló oleoil-LPA bizonyult (l. 2.1.2 fejezet) a leghatékonyabb vazorelaxáns LPA fajtának, így a relaxáció további vizsgálatához ezt az anyagot választottuk (az egyszerűség kedvéért a későbbiekben csak LPA névvel jelölöm). Az LPA okozta relaxáció dóziszfüggő, ahogyan ez a 8. ábra látszik. Az LPA által kiváltott vazorelaxáció maximuma (E_{max}) 53,9%, a félmáximális hatáshoz tartozó koncentráció (EC_{50}) pedig 400 nM. Ez az EC_{50} érték a kísérleti állatokban és emberekben mért plazma és szérum LPA koncentráció tartományában van (l. 2.1.2 fejezet).



8. ábra Az oleoil-LPA okozta vazorelaxáció dózis-hatás összefüggésének vizsgálata mellkasi aortában. Az egyes dózisokat külön érgyűrűkön kellett vizsgálni a gyorsan kialakuló deszenzitizáció miatt, így az esetszámok az egyes dózisoknál eltérőek, $n=3-59$. Az értékek átlag±standard hiba formában vannak feltüntetve, a PE által kiváltott prekontrakció százalékában. A görbe illesztése nonlineáris regresszióval történt.

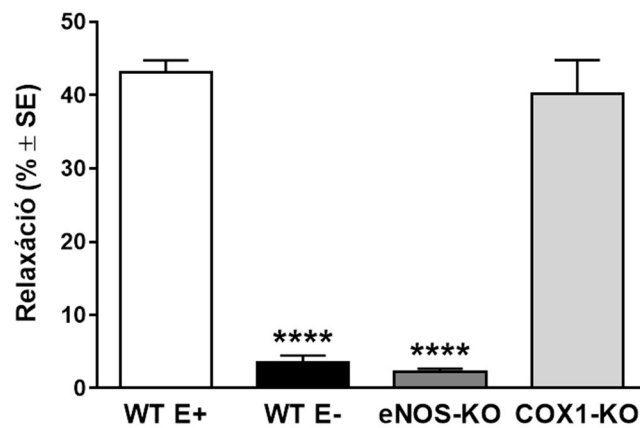
5.2. A lizofoszfátidsav vazorelaxáns hatásának kialakulásához ép endothéliumra és az eNOS enzimre van szükség

Az ezt követő kísérletekben azt vizsgáltuk meg, hogy milyen mediátor(ok) közvetítik az LPA vazorelaxáns hatását. Azt feltételeztük, hogy a relaxációban endothélium-függő vasoaktív anyagok, elsősorban NO és prosztanoidok játszhatnak szerepet. Ezt a feltételezést kétféleképpen ellenőriztük: az LPA-t vad típusú állatokban endothélium-eltávolítást követően, illetve eNOS-deficiens és COX1-KO egerekből preparált erekben alkalmaztuk. Az endothélium eltávolítása teljesen megszüntette az LPA-okozta vazorelaxációt, sőt, endothélium hiányában az LPA növelte az értónust (9. ábra B panel). Ez arra utal, hogy az LPA hatása komplex, az eredő hatásban nem csak endothél-függő relaxáció, hanem endothélium-független kontrakciós hatás is szerepel.



9. ábra Az LPA okozta relaxáció endothélium függésének vizsgálata. Az eredeti miográf regisztrátumok vad típusú, ép endothélú mellkasi aortában (A panel), vad típusú endothél-irtott aortában (B panel), eNOS-KO egérből preparált aortában (C panel) illetve COX1-KO egérből preparált aortában (D panel) készültek, PE prekontrakciót követően. A horizontális és vertikális jelölők 5 percet, illetve 5 mN-t jelölnek. W=a kád atmoszája friss Krebs oldattal.

Annak érdekében, hogy az LPA-okozta relaxációban az endotheliális eredetű NO vagy proszتانoid felszabadulás szerepét genetikai úton is bizonyítsuk, eNOS-KO és COX1-KO egerekből is preparáltunk aortagyűrűket. Az LPA-okozta vazorelaxáció teljesen hiányzott az eNOS deficiens erekben, helyette gyenge konstriktor hatást figyelhettünk meg (9. ábra C panel). Ezzel szemben a COX1 enzim hiányában az LPA érhatása változatlan maradt (9. ábra D panel). A 10. ábra ezen relaxáns hatások grafikus ábrázolása és statisztikai elemzése látható. Ezek a kísérleti eredmények megerősítik, hogy az eNOS enzimnek szerepe van az LPA-indukálta vazorelaxációban intakt erek esetében, továbbá azt, hogy az LPA eNOS hiányában viszont vazokonstriktiót okoz.

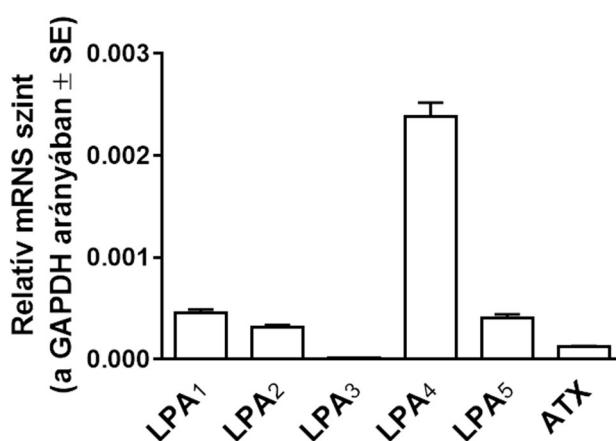


10. ábra Az LPA okozta relaxáció endothélium függésének statisztikai elemzése. A relaxáció maximális értéke vad típusú ép endothélium (WT E+), vad típusú endothélium-irtott (WT E-), endothéliális nitrogén-monoxid szintáz deficiens (eNOS-KO) és ciklooxygenáz 1 deficiens (COX1-KO) egerekből preparált mellkasi aortán. Az értékek átlag±standard hiba formában vannak feltüntetve, a PE által kiváltott prekontrakció százalékában. **** $p < 0,0001$ vs. „WT E+”, $n = 59, 21, 27, 8$; egyváltozós ANOVA, Dunnett-féle post-hoc teszttel.

5.3. A lizofoszfátidsav-indukálta vazorelaxációt közvetítő receptor(ok) azonosítása

5.3.1. Az egér aortából izolált endotél sejtekben expresszálódnak LPA receptorok és autotaxin

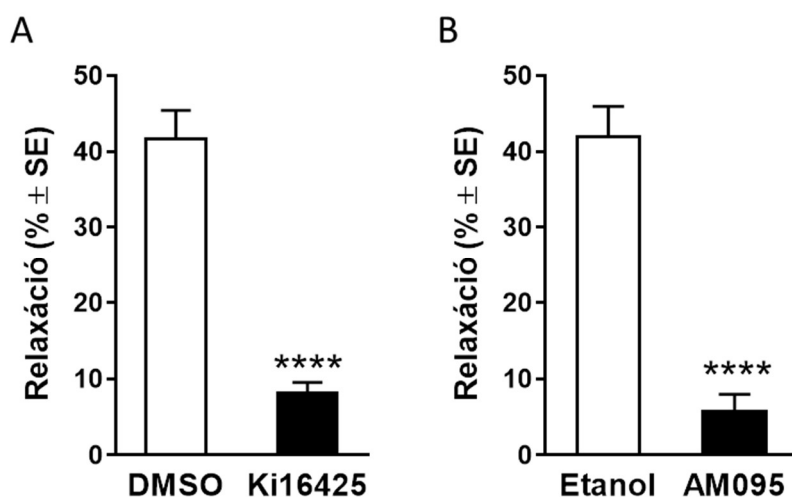
Mivel eredményeink alapján az endotélium játszik szerepet az LPA vazorelaxáns hatásának kialakításában, elsőként arra kerestünk választ, hogy az egér aorta endotélium sejtjeiben expresszálódnak-e LPA receptorok és autotaxin. Mivel nem állnak rendelkezésre megfelelő LPA receptor ellenes antitestek, az általunk izolált egér aorta endotél sejteket kvantitatív valós idejű PCR technikával vizsgáltuk meg. Azt találtuk, hogy az edg típusú receptorok közül az LPA₁ és LPA₂ receptorok átíródnak, míg az LPA₃ nem. A nem edg típusú receptorok közül az LPA₄ és LPA₅ receptorok átíródnak, hasonlóan az autotaxin enzim génjéhez (11. ábra).



11. ábra LPA receptorok és ATX expressziós mintázata kvantitatív valós idejű PCR technikával frissen izolált egér aorta endotél sejtekben. A relatív mRNS szintek a GAPDH százalékában, átlag±standard hiba formában kerültek feltüntetésre. n=3. GAPDH – gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz; ATX – autotaxin

5.3.2. A lizofoszfátidsav vazorelaxáns hatását az LPA₁ receptor aktivációja közvetíti

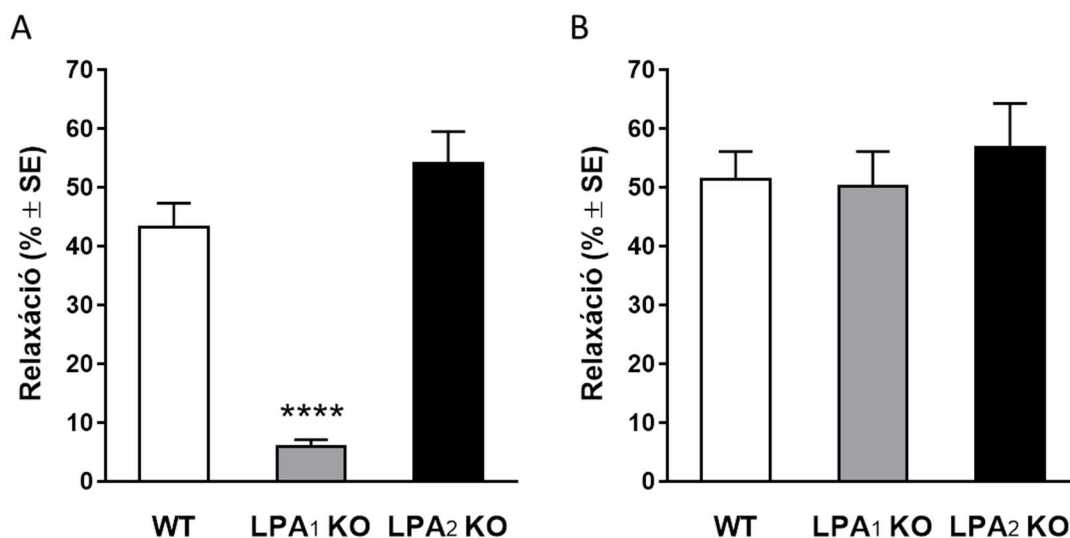
A következő lépésben azt vizsgáltuk, melyik LPA receptor altípus(ok) közvetíti(k) az eNOS-függő vazorelaxációt, amihez farmakológiai és genetikai módszereket egyaránt felhasználtunk. Kísérleteinkben az LPA_{1/3} receptorokat Ki16425-tel gátolva szignifikánsan lecsökkent az LPA-indukálta vazorelaxáció (12. ábra, A panel).



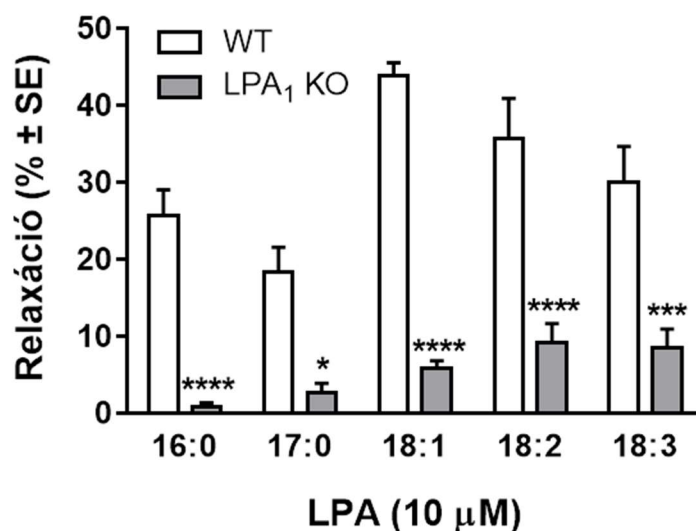
12. ábra Az LPA okozta relaxáció LPA receptor gátlószer jelenlétében. Mind az LPA₁ és LPA₃ receptorokat gátló Ki16425 (A panel), mind az LPA₁ receptorra szelektív AM095 (B panel) 10 μM koncentrációban, 30 perccel az LPA adása előtt került alkalmazásra. A kontroll erek (fehér oszlopok) az adott gátlószer oldószerével voltak kezelve (Ki16425 esetében DMSO, AM095 esetében pedig etanol). Az értékek a fenilefrin indukálta prekontrakció százalékos arányában, átlag±standard hiba formátumban kerültek ábrázolásra, $n=7, 18$ (A panel); $7, 8$ (B panel). **** $p<0,0001$ vs. oldószerrel kezelt erek, Student-féle párosítatlan t-próba.

Az AM095 nevű szelektív LPA₁-receptor gátlószer (234) 10 μM koncentrációban az LPA-okozta relaxáció jelentős, 90%-os csökkenését okozta (12. ábra, B panel). Egyik receptor gátlószer sem változtatta meg az acetilkolin-okozta eNOS-függő relaxációt (ábra nélkül). Ezután LPA₁ és LPA₂ KO egerekből izolált aortákon is megvizsgáltuk az LPA hatását. LPA₁ KO egerek erei nem mutattak relaxációt LPA hozzáadására (13. ábra, A panel), miközben az acetilkolinra adott válaszkészségük normális volt (13. ábra, B panel). LPA₂ KO egerek aortái sem az LPA, sem az acetilkolin hatásokban nem különböztek a kontroll egerektől (13. ábra).

A fenti eredmények ismeretében megvizsgáltuk a többi LPA típus (l. 5.1.1 fejezet) relaxáns hatását is LPA₁ KO egerekből preparált aortákban. A 14. ábra mutatja, hogy a vad típusban megfigyelhető relaxáció hogyan változik LPA₁ KO egerekből preparált aortákban. Mivel a sztearoil-LPA nem váltott ki érdemleges vazorelaxációt, így ezt az LPA-t nem vizsgáltuk KO erekben. A többi általunk vizsgált LPA fajta vazorelaxáns hatását nagyrészt LPA₁ receptorok közvetítik.



13. ábra Az LPA okozta relaxáció LPA receptor KO egerekből preparált aortában. 10 μM LPA (A panel) és 1 μM acetilkolin (B panel) hatása WT (fehér oszlopok), LPA₁ KO (szürke oszlopok) és LPA₂ KO (fekete oszlopok) egerekből származó ereken. Az értékek a fenilefrin indukálta prekontrakció százalékos arányában, átlag±standard hiba formátumban vannak feltüntetve, $n=19, 15, 4$ (mindkét panelen). **** $p<0,0001$ vs. „WT”, egyváltozós ANOVA, Dunnett-féle post hoc teszttel.



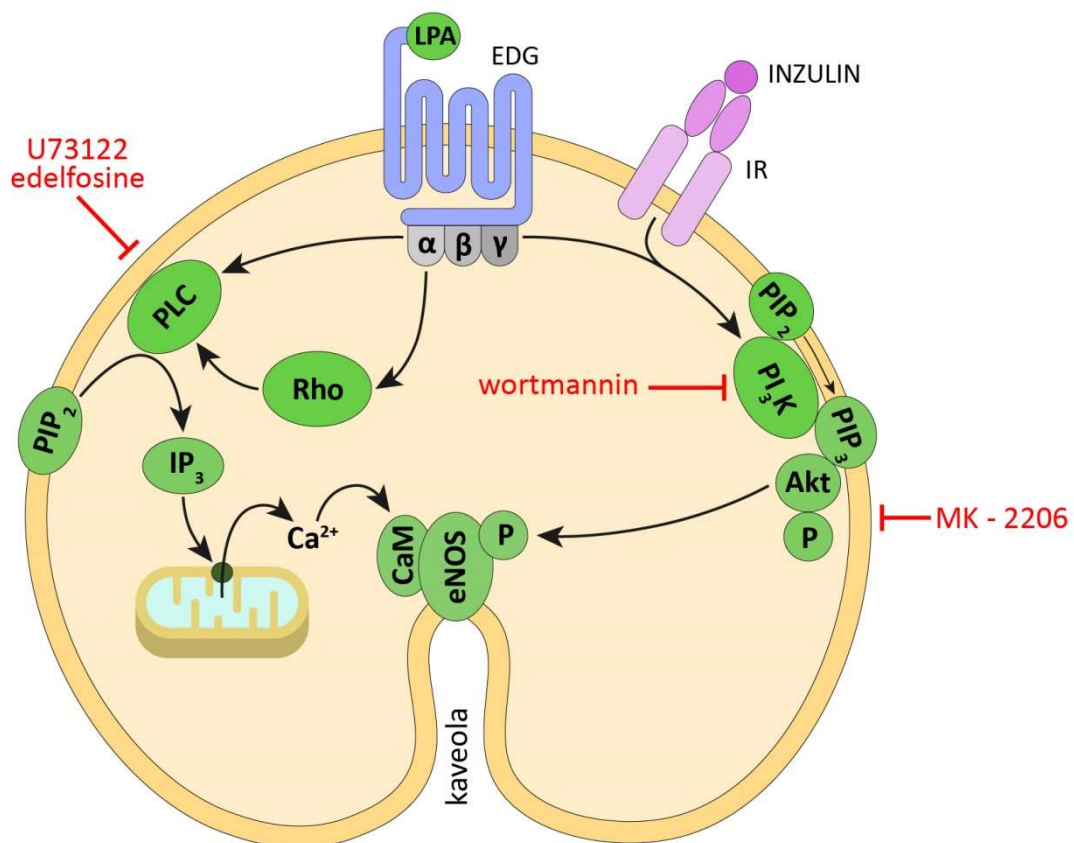
14. ábra Változó oldallánc-hosszúságú és változó oldallánc-telítetlenségű LPA-k által kiváltott relaxáció LPA₁ KO egerekből preparált aortában. Az értékek a PE indukálta prekontrakció százalékos arányában, átlag±standard hiba formátumban vannak feltüntetve. $n=19, 13, 52, 10, 11$ a WT és $n=6, 6, 20, 7, 9$ az LPA₁ KO esetében. * $p<0,05$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ vs. „WT”, kétváltozós ANOVA, Sidak-féle post hoc teszttel.

5.4. A lizofoszfátidsav indukálta vazorelaxáció kialakulásában érintett intracelluláris jelátviteli utak azonosítása

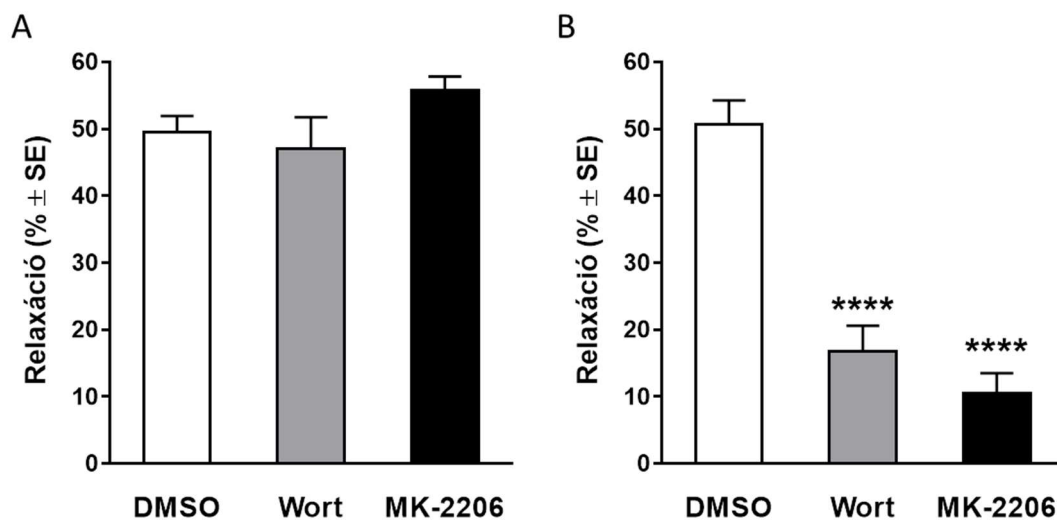
Mi teremti meg a kapcsolatot az LPA₁ receptor és az eNOS enzim aktivációja között? Hogy erre a kérdésre választ kapjunk, mindenképp le kellett ellenőriznünk a két leggyakoribb, eNOS aktivációhoz vezető jelátviteli útvonal – a Ca²⁺-kalmodulin-függő valamint az eNOS foszforilációjától függő útvonalak – érintettségét.

5.4.1. A PI3K-Akt/PKB útvonal nem játszik szerepet a lizofoszfátidsav vazorelaxáns hatásának közvetítésében

Elsőként megvizsgáltuk a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) – Akt/protein kináz B (PKB) jelátviteli út esetleges szerepét (15. ábra jobb oldala). Egy korábbi, BAEC sejteken végzett tanulmány eredményei alapján ugyanis az LPA ezen útvonal aktiválásán keresztül okozta az eNOS enzim foszforilációját a Ser¹¹⁷⁹ pozícióban, így az enzim következményes aktiválódását (158). Eredményeink alapján sem a PI3K gátlószere, a wortmannin (100 nM), sem az Akt/PKB gátló MK-2206 (5 μM) nem változtattak az LPA-indukálta vazorelaxáció amplitúdóján (16. ábra A panel). Annak ellenőrzése céljából, hogy a fent említett anyagok valóban gátolták a PI3K-Akt/PKB útvonalat, az inzulin okozta vazorelaxációt vizsgáltuk meg. Az ismert PI3K-Akt/PKB útvonalon ható inzulin (157, 235) vazorelaxáns hatása szignifikánsan csökkent a wortmannin és MK-2206 kezeléstől (16. ábra B panel). Így állíthatjuk, hogy az LPA₁ és eNOS által közvetített vazorelaxáció nem a PI3K-Akt/PKB jelátviteli útvonalon keresztül alakul ki.



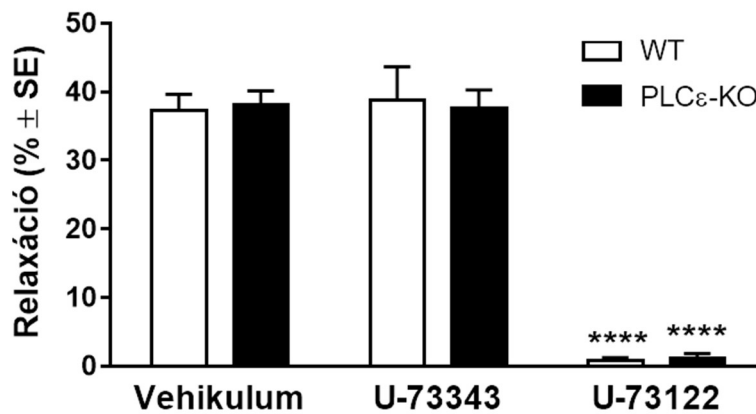
15. ábra Az endotheliális nitrogén monoxid szintáz (eNOS) aktiválásának leegyszerűsített útvonalai, és a kísérleteinkben használt gátlószerek támadáspontja. Az ábra bal oldalán az eNOS Ca^{2+} -függő aktivációjának útvonala látható, mely során a G-fehérjéhez kapcsolt receptor ligandkötése aktiválja a G-fehérje (jelen esetben akár $\text{G}_{q/11}$ vagy $\text{G}_{12/13}$) alfa alegységét, ami következményes foszfolipáz C (PLC) aktivációhoz vezet. A PLC enzim ezután a membránban található foszfatidilinozitol 4,5-biszfoszfátból (PIP_2) inozitol-triszfoszfátot (IP_3) szabadít fel, ez pedig Ca^{2+} -felszabaduláshoz vezet a belső raktárakból, majd a Ca^{2+} kalmodulinon keresztül aktiválja az eNOS enzimet. Ezt az útvonalat egyrészt PLC-gátlószerekkel blokkoltuk, másrészt a PLC egyik izoformájának, a $\text{PLC}\epsilon$ enzimnek a genetikai kiütésével. A $\text{PLC}\epsilon$ akkor lép működésbe, ha a receptor $\text{G}_{12/13}$ -n keresztül a RhoA kis G fehérjét aktiválja. Mivel az acetilkolin (ACh) is PLC-függő módon aktiválja az NO termelést, az útvonalba való beavatkozás sikeressége az ACh-okozta relaxáció megváltozásával tesztelhető. Az ábra jobb oldalán az eNOS foszforiláció klasszikus útvonala látható, mely során a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) a membránban található PIP_2 -t PIP_3 -má foszforilálja, így az további enzimatis lépések során (az egyszerűség kedvéért az ábrán nem látszik) aktiválja az Akt enzimet. Az aktivált Akt foszforiláción keresztül fokozza az eNOS NO termelését. Ezt az útvonalat mind G-fehérjéhez kapcsolt receptor, mind pl. az inzulin receptor aktiválódása beindíthatja. Kísérleteinkben mind a PI3K enzimet, mind az Akt-ot gátoltuk, a gátlószerek hatékonyságának tesztelésére pedig az ezen az útvonalon keresztül ható inzulin hatásosságát vizsgáltuk.



16. ábra A PI3K-Akt/PKB útvonal gátlásának hatása az LPA okozta relaxációra. 10 μM LPA (A panel) és 3 μM inzulin hatása (B panel) oldószerrel (DMSO, fehér oszlopok), 100 nM wortmanninnal (Wort, szürke oszlopok) és 5 μM MK-2206-tal (fekete oszlopok) való 30 perces előkezelés után. Az értékek a PE indukálta prekontrakció százalékos arányában, átlag±standard hiba formátumban kerültek ábrázolásra, $n=27, 16, 17$ (mindkét panelen). **** $p<0,0001$ vs. “DMSO”, egyváltozós ANOVA, Dunnett-féle post hoc teszttel.

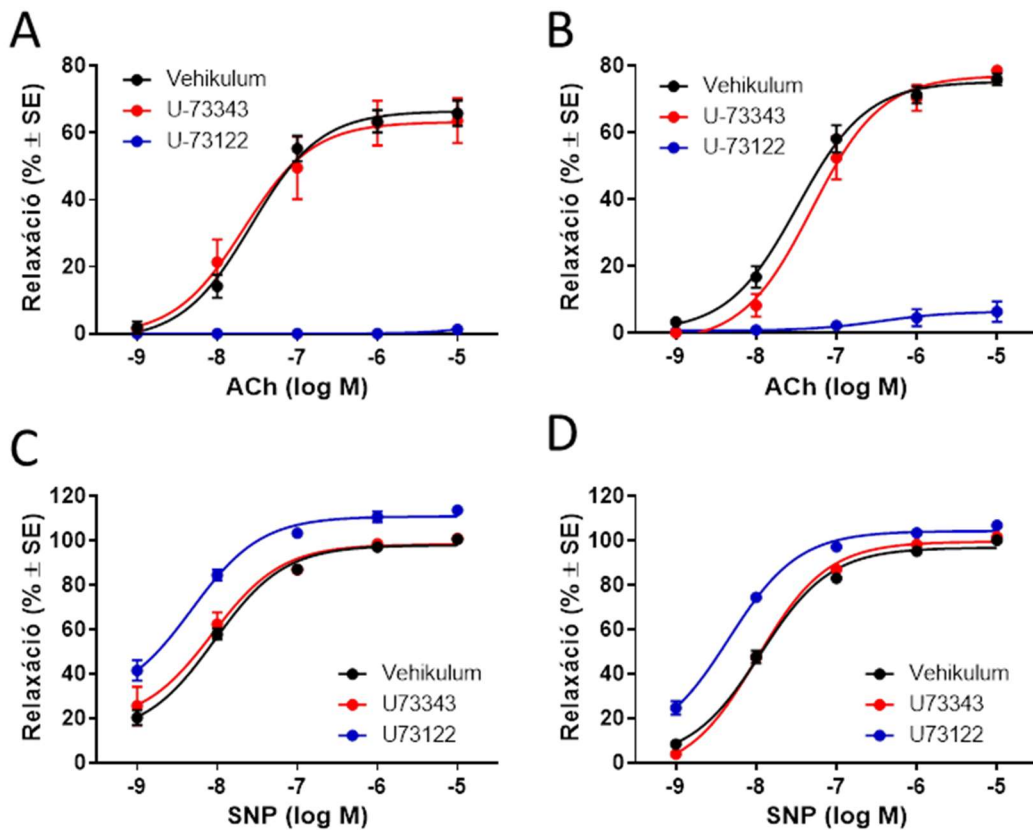
5.4.2. A foszfolipáz C enzim gátlása megszünteti az LPA vazorelaxáns hatását

Ismert, hogy az LPA₁ receptor képes fokozni az inozitol-triszfoszfát (IP₃) termelődését, és az ezt követő intracelluláris Ca²⁺ koncentráció emelkedés aktiválhatja az eNOS-t (236). Azért, hogy tisztázzuk az eNOS aktiváció mechanizmusát, ezután a foszfolipáz C (PLC) enzimre fókuszáltunk, ami a fent említett IP₃-Ca²⁺ útvonalon keresztül aktiválhatja az NO termelődést (15. ábra bal oldala). Mivel az LPA néhány hatását az irodalmi adatok alapján PLCε (237, 238) közvetíti, elsőként ennek az izoenzimnek az érintettségét vizsgáltuk meg. PLCε-KO egerekből preparált aortákban azonban az LPA vazorelaxáns hatása nem volt különböző a vad típusú kontroll erekben mérhetőtől (17. ábra), így kizárhatjuk ennek az izoenzimnek a szerepét a jelátvitelben.



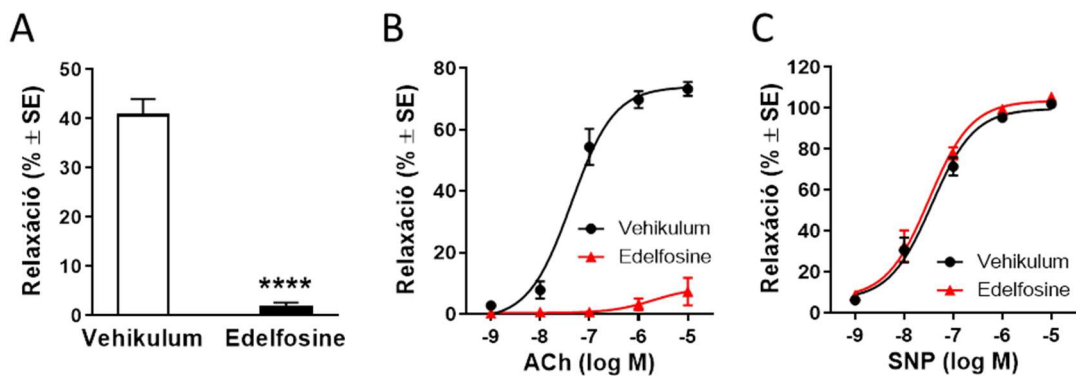
17. ábra Az LPA okozta relaxáció PLC enzim függésének vizsgálata. 10 μ M LPA hatása vehikulummal, U73122-vel, valamint annak inaktív analógiával az U73343-mal való kezelés után vad típusú (fehér oszlopok) és PLC ϵ -KO (fekete oszlopok) egerek erein. Az értékek a PE indukálta prekontrakció százalékos arányában, átlag \pm standard hiba formátumban vannak feltüntetve, $n=18, 7, 18$ (WT); $20, 11, 20$ (PLC ϵ -KO). **** $p<0,0001$ vs. "Vehikulum", kétváltozós ANOVA Tukey-féle post hoc teszttel.

Ezután a többi PLC enzimre fókuszáltunk. Annak érdekében, hogy a PLC enzimet gátolni tudjuk az endotéliumban anélkül, hogy a PE által kiváltott prekontrakció csökkenne, az ereket a lumen felől kezeltük 10 μ M U73122-vel (a 4.4. fejezetben részletesen ismertetett módon). Az LPA vazorelaxáns hatása szinte megszűnt mind vad típusú, mind PLC ϵ -KO egerek aortáiban U73122 kezelést követően, míg a kontrollként használt inaktív analóg U73343 hatástalan volt (17. ábra). A 4.4 fejezetben már ismertetett módon ellenőriztük, hogy a gátlószeres kezelés egyébként valóban hatékonyan csökkentette a PLC függő vazorelaxációt (18. ábra, A és B panelek), de nem befolyásolta a simaizom exogén NO-ra adott válaszkészségét (18. ábra, C és D panelek).



18. ábra A foszfolipáz C (PLC) enzim gátlásának hatékonysága és szelektivitása U73122 kezelés során. Vad típusú (A és C panelek) és PLC ϵ KO (B és D panelek) egerekből preparált aorták acetilkolin (ACh, A és B panelek) és nátrium-nitroprusszid (SNP, C és D panelek) által kiváltott vazorelaxációja a PE indukálta prekontrakció százalékos arányában, átlag \pm standard hiba formátumban. $n=18, 7, 18$ (WT); $20, 11, 20$ (PLC ϵ KO). A hibásávok az alkalmazott szimbólumok miatt nem mindenhol látszanak. A görbék illesztése nonlinearis regresszióval történt.

Kísérleteinket egy kémiai és hatásmechanizmusban eltérő másik PLC gátlószerral, a szintetikus lizofoszfátidilkolin edelfosine-nal is elvégeztük, és hasonló eredményre jutottunk: az edelfosine is megszüntette az LPA-ra kialakuló vazorelaxációt (19. ábra, A panel), amellet, hogy hatékonyan gátolta a PLC enzimet (19. ábra, B panel), de nem csökkentette a simaizom NO érzékenységét (19. ábra, C panel). Összefoglalva tehát megállapítottuk, hogy a PLC enzim(ek)nek – de nem a PLC ϵ izoformának – döntő szerepe van az LPA vazorelaxáns hatásának közvetítésében.



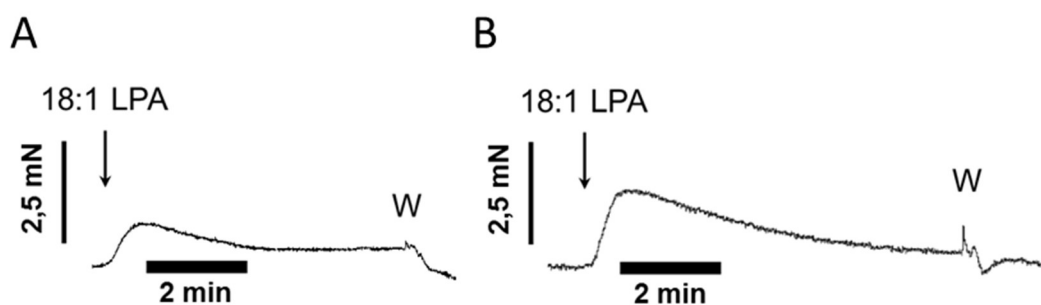
19. ábra Az LPA okozta relaxáció PLC enzim függésének vizsgálata. 10 μ M LPA (A panel), 1 nM-10 μ M ACh (B panel) és 1 nM – 10 μ M SNP (C panel) hatása vehikulummal, valamint edelfosine-nal való kezelés után vad típusú egerek erein. Az értékek a PE indukálta prekontrakció százalékos arányában, átlag \pm standard hiba formátumban vannak feltüntetve, $n=10, 11$. **** $p<0,0001$ vs. “Vehikulum”, Student-féle párosítatlan t -próba. A görbék illesztése nonlineáris regresszióval történt. A hibásávok néhol az alkalmazott szimbólumok takarásában vannak.

5.5. A lizofoszfátidsav endotélkárosodás esetén vazokonstriktiót okoz

Az eddig bemutatott regisztrátumokat tanulmányozva észrevehető, hogy az LPA adását követően több esetben értónus-növekedés is létrejött. Jól látszik ez a 7. ábra B és C regisztrátumain, linoleoil- és linoleoil-LPA alkalmazása esetén, illetve a 9. ábra B és C regisztrátumain endotélirtást követően valamint eNOS KO egerekből preparált aortákon. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az általunk látott érhatás több komponensű lehet, de a vazokonstriktor komponenst az esetek többségében felülírja az endotélium-függő vazorelaxáció. Tovább bonyolítja a helyzetet, hogy ezekben a kísérletekben PE-nel prekontrahált ereken alkalmaztuk az LPA-t, így a konstriktor hatás lehet a megelőző prekontrakció felerősödése is (potencírozódás). Mindkét felvetést alátámaszthatja az a megfigyelésünk, hogy ha az oleoil-LPA-t ép endotélú, de előzőleg nem prekontrahált ereken alkalmaztuk, elhanyagolható változás jött létre az értónusban.

5.5.1. A lizofoszfátidsav vazokonstriktor hatása erősebb hasi aortában

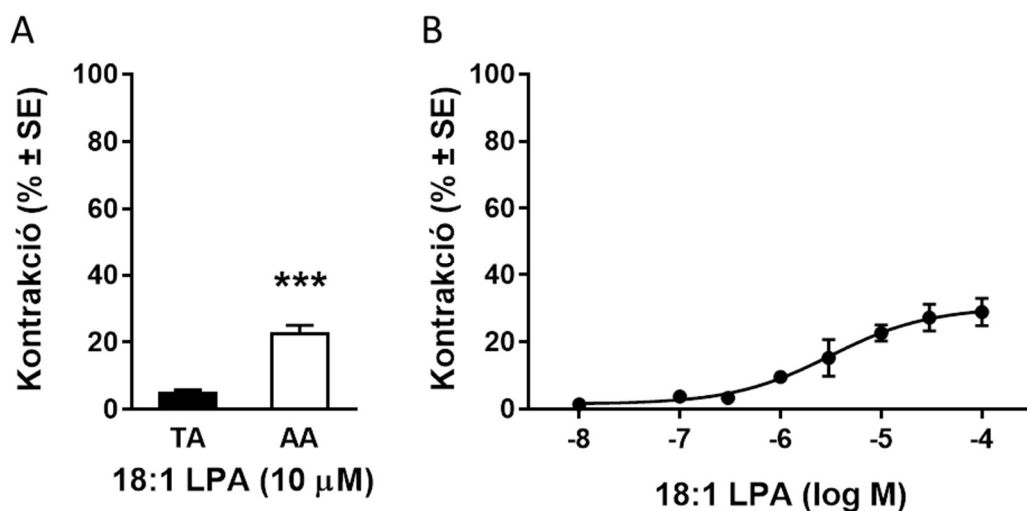
Hogy kiiktassuk az endotélból felszabaduló NO vazokonstriktiót ellensúlyozó hatását, további kísérleteinkben az endotéliumot eltávolítottuk, az LPA-t pedig a nyugalmi értónusra adtuk.



20. ábra A lizofoszfátidsav vazokonstriktor hatásának vizsgálata endotél irtott egér aortában. 10 μ M oleoil-LPA vad típusú, endotél irtott mellkasi (A panel) és hasi (B panel) aortagyűrűk kontrakcióját okozza (reprezentatív eredeti miográf regisztrátumok). A horizontális és vertikális jelölők 2 percet, illetve 2,5 mN-t jelölnek. W=a kád atmoszája friss Krebs oldattal.

A 20. ábra eredeti miográfus regisztrátumain látható, hogy az ép endotélű erekben legmarkánsabb relaxációt kiváltó oleoil-LPA endotél irtott, előfeszítetlen erekben kicsi, tranzienst okoz. A kontrakciós hatás kiértékelésekor a következő megfigyeléseket tettük:

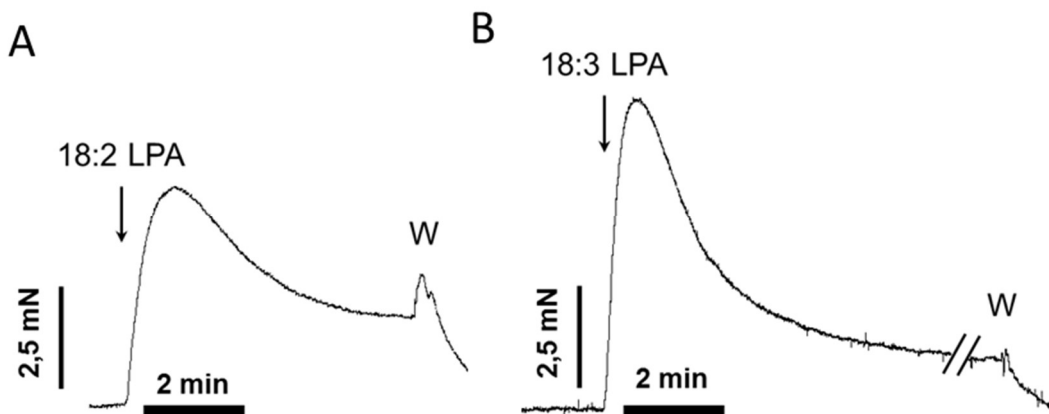
- a kontrakció amplitúdója nagyobb endotél irtás esetén, mint ép endotéllel rendelkező erekben ($1,2 \pm 0,3\%$, $n=17$ vs. $4,8 \pm 1,0\%$, $n=14$, a 124 mM K^+ által létrehozott referencia-kontrakcióhoz viszonyítva, $p < 0,001$, ábra nélkül),
- a kontrakció amplitúdója nagyobb hasi aortában, mint mellkasi aortában (21. ábra, A panel), és
- hasi aortában továbbvizsgálva a kontrakciót, az dózisfüggőnek bizonyult, maximális értéke (E_{\max}) a referencia kontrakció 30,3 %-a, a félmáximális hatáshoz tartozó koncentráció (EC_{50}) pedig $3,15 \mu\text{M}$ (21. ábra, B panel).



21. ábra A lizofoszfátidsav vazokonstriktor hatásának vizsgálata. $10 \mu\text{M}$ oleoil-LPA vazokonstriktor hatása endotél irtott mellkasi (TA, fekete oszlop) és hasi (AA, fehér oszlop) aortában (A panel). Oleoil-LPA kontrakciós dózis-hatás összefüggés vizsgálata endotél-irtott hasi aortában (B panel). A kontrakciók a 124 mM K^+ -Krebs oldat által kiváltott referencia kontrakció százalékában, átlag±standard hiba formátumban kerültek feltüntetésre. $n=14, 42$. *** $p < 0,001$ vs. “TA”, Student-féle párosítatlan t -próba. A dózis-hatás összefüggés esetében az egyes dózisokat külön érgyűrűkön kellett vizsgálni a gyorsan kialakuló deszenzitizáció miatt, így az esetszámok az egyes dózisoknál eltérőek, $n=4-42$. A görbe illesztése nonlineáris regresszióval történt.

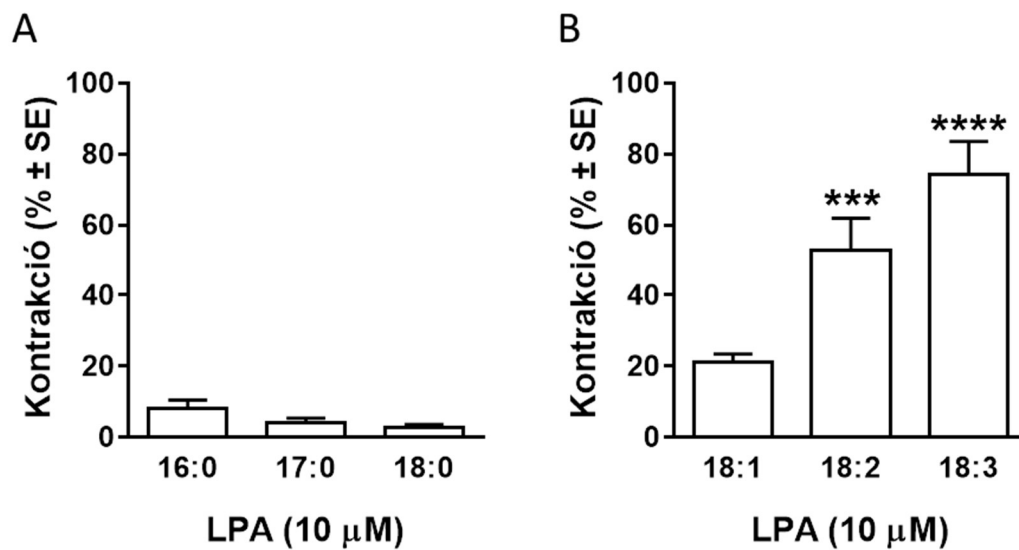
5.5.2. A többszörösen telítetlen lizofoszfátidsav típusok erősebb vazokonstriktorok

Az oleoil-LPA vazokonstriktor hatása így gyengének mondható, főleg annak tükrében, hogy az LPA receptorok közül az edg receptorokon agonista VPC31143 (213, 239) saját eredményeink szerint ennél lényegesen erősebben képes kontrahálni az endotél irtott hasi aortát (240). Ezért megvizsgáltuk a többi, korábban már említett LPA típus vazokonstriktor potenciálját is.



22. ábra 18 szénatom hosszú, többszörösen telítetlen oldalláncú LPA-k vazokonstriktor hatásának vizsgálata. 10 μ M linoleoil- (A panel) és linolenoil-LPA (B panel), vad típusú, endotél irtott hasi aortagyűrűk kontrakcióját okozza (representatív eredeti miográf regisztrátumok). A horizontális és vertikális jelölők 2 percet, illetve 2,5 mN-t jelölnek. W=a kád atmoszája friss Krebs oldattal.

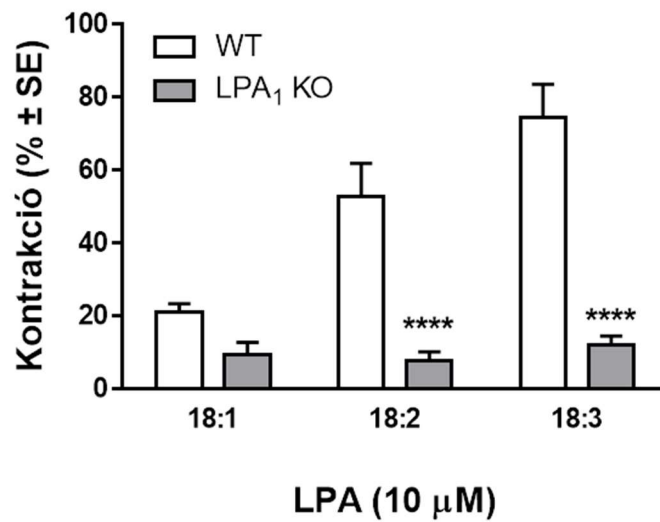
A 22. ábra és a 20. ábra összevetéséből látható, hogy a többszörösen telítetlen linoleoil- és linolenoil-LPA az oleoil-LPA-nál lényegesen erősebb vazokonstriktót okoznak (23. ábra). Ezek a típusok szintén tranziens, de a VPC31143 hatásával összemérhető érösszehúzódást váltottak ki. Ugyanakkor az általunk vizsgált telített LPA-k egyáltalán nem, vagy alig okozták az endotél irtott hasi aorta konstriktóját (23. ábra).



23. ábra Változó oldallánc-hosszúságú (A panel) és változó oldallánc-telítettségű (B panel) LPA-k vazokonstriktor hatása. Az értékek átlag \pm standard hiba formában vannak feltüntetve, a 124 mM K⁺-által kiváltott referencia-kontrakció százalékában. *** p <0,001 vs. 18:1 LPA; n =9, 9, 6 (A panel), 48, 12, 13 (B panel); egyváltozós ANOVA, Tukey-féle post-hoc teszttel.

5.5.3. A lizofoszfátidsav vazokonstriktor hatását jelentős részben LPA₁ receptor közvetíti

A 24. ábraán látható, hogy azon LPA típusok, amelyek konstriktor aktivitással bírnak, alig váltanak ki érösszehúzódást LPA₁ receptor deficiens egerekből preparált, endotél irtott hasi aortában. Mivel az oldallánc telítetlenségi fokának növelésével csökkenő vazorelaxációt tapasztaltunk, ezért meglepő, hogy ugyanezen LPA típusok növekvő vazokonstriktor aktivitását is a vazorelaxációt mediáló LPA₁ receptor aktivációja közvetíti.



24. ábra 18 szénatomos, változó oldallánc-telítettségű LPA-k kiváltotta kontrakció LPA₁ KO egerekből preparált, endotél irtott hasi aortában. Az értékek átlag±standard hiba formában vannak feltüntetve, a 124 mM K⁺ által kiváltott referencia-kontrakció százalékában. *****p*<0,001 vs. „WT”; n=48, 12, 13 (WT), 6, 11, 11 (LPA₁ KO); kétváltozós ANOVA, Sidak-féle post-hoc teszttel.

6. MEGBESZÉLÉS

Kutatásunk eredményei nagymértékben hozzájárultak a lizofoszfatidsav kardiovaszkuláris hatásainak megismeréséhez: az LPA közvetlenül tágítja az ereket, aminek a közvetítésében LPA_1 receptorok, foszfolipáz C és endoteliális nitrogén monoxid szintáz hatására (eNOS) képződő NO játszik szerepet. Ha azonban az LPA hatását károsodott endotélium, vagy eNOS hiányos körülmények között vizsgáljuk, vazokonstriktiót tapasztalunk, aminek közvetítésében szintén az LPA_1 receptor játszik szerepet. Tigyi Gábor és Caner munkacsoportjainak megfigyelései agyi erekben (229, 230) azt vetítették előre, hogy a simaizmokon lévő LPA receptorok közvetlen érösszehúzó hatást közvetíthetnek, amit a mi jelenlegi megfigyeléseink is alátámasztanak. Az LPA plazmakoncentrációja nyugalmi körülmények között az alacsony-közepes nanomoláris tartományban van, ami vérlemezke aktivációval járó állapotokban akár néhány 10 mikromólos koncentrációra emelkedhet. Az általunk megfigyelt érhathások is ebben a koncentráció tartományban játszódhatnak le, tehát az ilyenkor felszabaduló LPA fontos szereplő lehet az érellenállás és a véráramlás szabályozásában. Az LPA hatás irányát – vagyis, hogy a felszabaduló LPA az ereket relaxálni, vagy kontrahálni fogja – elsődlegesen az endotélium funkcionális integritása határozza meg, de jelentősen befolyásolhatja, hogy milyen a felszabaduló LPA összetétele.

Az LPA_1 receptor sajátosságairól részletesen írtam a bevezetés 2.3.1.1 fejezetében. Testszerte számos szervben, sejttípusban leírták már jelentőségét, és egészen bizonyos, hogy szerepe van az LPA kardiovaszkuláris hatásainak közvetítésében is. Igazolt szerepe az erek embrionális fejlődésében és angiogenetikus folyamatokban. LPA_1 -KO egerekben leírtak agyvérzést a frontális régiókban, de kialakulásának mechanizmusát nem tisztázták (l. részletesen a 2.4.3.1 fejezetben). Az LPA_1 receptor aktivációja több ponton érintett az ateroszklerotikus folyamatok kialakulásában (l. 2.4.4 fejezet). Az LPA LPA_1 receptoron keresztül is hozzájárul a vérlemezkek aktivációjához (200), és bár ez vitatott, de szerepe lehet az LPA vérnyomásemelő hatásának közvetítésében is (l. részletesen a 2.4.5.3 fejezetben). Eredményeink alapján most már az is elmondható, hogy LPA_1 receptorok szerepet játszanak az értónus szabályozásában, mert aktivációjuk

mind endotélium-függő relaxációt, mind endotéliumtól független vazokonstriktációt közvetíthet.

Eredményeink azt mutatják, hogy az LPA₁ receptoron kívül még legalább három további LPA receptor altípus (LPA₂, LPA₄ és LPA₅ receptor) expresszálódik az egér mellkasi aortából frissen izolált endotélium sejtekben. Ha figyelembe vesszük a receptorexpresszió eltéréseit fajonként és érterületenként, illetve a korábban már említett génexpressziós változásokat a tenyésztett sejtekben, nem meglepő, hogy az általunk megfigyelt mintázat részben különbözik a korábban leírtaktól. Lee és mtsai. borjú és egér aorta endotélsejt kultúrában (BAEC és RAEC), valamint borjú köldökzsínór véna- és szaruhártya endotélsejtekben az edg-típusú LPA₁₋₃ receptorok általános kifejeződését írták le (241). Érdekes módon egér hasnyálmirigy endotélsejtek (MS1) szintén expresszáltak edg-típusú LPA receptorokat, míg humán aorta és köldökzsínórvéna endotélsejtek (HAEC és HUVEC) csak LPA₁ és LPA₃ receptort (241). Más vizsgálatokban megerősítették az LPA₁ receptor expresszióját HUVEC és BAEC sejtek esetében, míg az LPA₂ és LPA₃ receptorok expressziójáról ellentmondásosak az adatok (152, 242).

Kevesebb információval rendelkezünk a nem edg-típusú LPA receptorok endoteliális előfordulását illetően. Leírták LPA₄₋₆ receptorok mRNS-ének expresszióját HUVEC sejtekben (20). Mi szintén megfigyeltük az LPA₄ és LPA₅ receptorok kifejeződését frissen izolált egér aorta endotélsejtekben, ami arra utal, hogy a jövőben érdemes lehet ezen receptorok endotéliumban betöltött élettani és kórélettani szerepét részletesen megvizsgálni. Vizsgálataink idején még nem volt általános az LPA₆ receptor expressziójának mérése, így nem rendelkezünk saját adattal erre vonatkozólag. Ugyanakkor friss irodalmi adatok alapján (114) expresszálódik nyirokcsomók magas endotélű venuláiban, ahol az LPA₄ receptorral együtt a limfociták extravazációját szabályozza. Az a megfigyelésünk, miszerint az autotaxin mRNS az LPA receptorokkal együtt fejeződik ki az endotélsejtekben, felveti annak lehetőségét, hogy az LPA autokrin/parakrin mediátorként működik az érrendszerben, mint ahogy ezt már feltételezték az előbb említett magas endotélű venulákban (128, 243).

Frissen izolált egér aorta simaizomsejtekben részben hasonló expressziós mintázatot írtunk le (240). Ezekben a sejtekben legnagyobb mértékben az LPA₆ receptor expresszióját figyeltük meg, amit az LPA₄, majd az LPA₁ és LPA₂ receptorok követték. A vazokonstriktós hatást közvetítő LPA₁ receptor expresszióját több munkacsoport is megerősítette egér és patkány eredetű vaszkuláris simaizomsejtekben (13, 105, 244-246), azonban élettani/kórélettani szerepét az értónus szabályozásában nem vizsgálták.

A bevezetésben már szó esett róla, hogy az LPA eNOS-ra kifejtett hatásának irodalma ellentmondásos (l. 2.4.5.4 fejezet), de kísérleti eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy az egér aortában létrejövő vazorelaxáció háttérében NO felszabadulás áll (l. 9. ábra és 10. ábra). Az LPA₁ receptorok és az eNOS közötti jelátviteli út tisztázásához elsőként a PI3K-Akt útvonalat vizsgáltuk meg. Korábbi tanulmányok szerint a PI3K és Akt LPA-általi aktivációja számtalan sejtélettani folyamatban szerepet játszik, mint pl. a sejtek túlélése és apoptózisa közötti egyensúly kialakulása, a sejt differenciáció és migráció szabályozása (247-249). BAEC sejteken kimutatták, hogy az LPA Akt foszforilációt okoz, amit az eNOS Ser¹¹⁷⁹ foszforilációja követ, ennek következtében pedig több, mint kétszeresére nő az eNOS enzim aktivitása. Ezeket a hatásokat kivédi G_i fehérje pertussis toxinnal, vagy a PI3K wortmaninnal történő gátlása (158). Kísérleteink során azonban nyilvánvalóvá vált, hogy az LPA vazorelaxáns hatása független a PI3K-Akt útvonaltól. Az eltérés magyarázatául szolgálhat, ha különböző receptorok közvetítik a hatást, bár a BAEC sejtek expresszálják az LPA₁ receptort (152), ami a mi kísérleteinkben felelős volt a vazorelaxációért. Az is előfordulhat, hogy az LPA₁ receptor egyidejűleg több G-fehérjén keresztül is indít el jelátviteli utat endotélsejtekben, és ezek közül más-más a jelentősebb a különböző fajokban, illetve sejttenyészetekben. Mivel kimutatták, hogy a pertussis toxin csak részben gátolja az LPA hatására kialakuló intracelluláris Ca²⁺-növekedést (152), ezért valószínűleg annak van G_{i/o}-független komponense is. Lehet, hogy éppen ez az a jelátviteli út, ami a mi esetünkben a vazorelaxációhoz vezetett. Ha ezeket figyelembe vesszük, akkor magyarázatot kaphatunk a saját eredményeink és a korábbi megfigyelések közötti további különbségre is: míg BAEC sejtekben az eNOS aktiválásához vezető Akt foszforiláció csak 1-2 perccel az LPA adása után alakult ki (158), addig kísérleteink során a vazorelaxáció jellemzően pár másodperccel azután létrejött, hogy az LPA az érkádakba került. Az LPA tehát gyorsan képes változtatni az értónust.

Mivel a PI3K-Akt útvonal szerepét az LPA-okozta vazorelaxációban ki tudtuk zárni, a PLC enzimek érintettségét kezdtük vizsgálni. Közelmúltban megjelent közlemények a PLC ϵ enzimet az LPA receptorokhoz kapcsolódó másodlagos hírvivőként írják le (237, 238). COS-7 sejteket PLC ϵ -nal transzfektálva azt találták, hogy LPA hozzáadásakor szignifikánsan megnövekszik az inozitol-foszfátok termelődése, és ezt a hatást G₁₂ és G_i proteinek közvetítik (250). Továbbá, ha az LPA₁ receptort PLC ϵ -nal együtt expresszáltatják, jelentősen megnő az LPA hatására kialakuló inozitol-foszfát termelődés, ez a folyamat pedig Rho-függő (251). Rat-1 fibroblasztokban az LPA-okozta PLC aktiváció izoenzim specifikus időbeli lefutást mutatott: az inozitol-foszfát termelés akut fázisáért a PLC β 3, míg fennartott fázisáért a PLC ϵ volt felelős (252). Egér asztrocita primer tenyészetben az LPA G_i fehérjén és PLC ϵ -on keresztül fokozta a foszfinozitol hidrolízist (253). PLC ϵ -deficiens asztrocitákból eltűnt az LPA hatására létrejövő protein kináz D és COX-2 aktiváció (254), ami felveti ennek az útvonalnak a szerepét az idegrendszer gyulladási folyamatainak kialakulásában. Mindezen korábbi megfigyelések ellenére a mi kísérleteinkben a PLC ϵ -KO egerek erei változatlanul reagáltak LPA-ra, míg az U73122 és az edelfosine megszüntették a vazorelaxációt. Ez arra utal, hogy a PLC enzim valamelyik izoformája, de nem a PLC ϵ közvetíti az LPA eNOS-aktiváló hatását. Mindezeket egybevetve az LPA₁ receptorok tehát valószínűleg G_{q/11} fehérjéket aktiválnak, és ez egyben megmagyarázza a vazorelaxáció gyors kialakulását.

Eredményeink szerint az LPA vazodilatátor és vazokonstriktor hatásának mértéke egyaránt függ a vizsgált LPA oldalláncától. Az általunk vizsgált LPA fajták közül legerősebb vazodilatátor hatással az egyszeresen telítetlen oleoil-LPA bír, míg a telítetlen kötések számának növekedésével a relaxáns hatás kis mértékben veszít ereőségéből. Ezzel párhuzamosan megjelenik egy tónusnövekedés a relaxációt követően, ami jól látszik a 7. ábra eredeti regisztrátumain. Az alacsonyabb relaxációs képesség így adódhat a kisebb NO-felszabadító potenciálból, de egy olyan erősebb konstriktor hatásból is, ami képes a relaxációt felülmúlni. A telített palmitoil-LPA az oleoilhoz képest kisebb relaxációs képességgel bír, ami az oldallánc hosszának növekedésével tovább csökken, 18 szénatom esetén teljesen eltűnik. Igen szembeötlő

így, hogy az ugyanolyan lánchosszúságú, de telített illetve telítetlen sztearoil és oleoil-LPA vazorelaxációs képessége között mekkora a különbség.

A különböző LPA-k vazokonstriktor hatása ettől eltérő képet mutat, ami különösen érdekes annak tükrében, hogy eredményeink szerint mindkét hatás kialakulását az LPA₁ receptor közvetíti. A telített oldalláncú LPA-k egyáltalán nem rendelkeznek konstriktor hatással, és az egyszeresen telítetlen oleoil-LPA érösszehúzó hatása is nagyon gyenge. A telítetlenség fokának növekedésével azonban jelentős vazokonstriktor hatás jelenik meg, aminek döntő részét LPA₁ receptor közvetíti. Az LPA vazoaktív hatásainak vizsgálatok számos kísérletet végeztünk a VPC31143 nevű LPA receptor agonista hatású vegyülettel (213), hogy az edg-típusú LPA receptorok szerepét az értónusváltozásban pontosabban tisztázzuk. Eredményeink szerint a VPC31143 szintén LPA₁ receptor függő módon okoz értónusváltozást (240). Az LPA-hoz hasonlóan ép endotélium esetén VPC31143 adására dilatátor hatás figyelhető meg, míg endotélisérülés, vagy az eNOS hiánya esetén vazokonstriktáció. Az oleoil-LPA-val összehasonlítva ugyanakkor a VPC31143 vazodilatátor potenciálja kis mértékben (127), míg vazokonstriktor potenciálja jelentősen nagyobb (240). Ennek magyarázata lehet, hogy sejtes rendszerben vizsgálva a VPC31143 potensebb az LPA₁ receptoron, mint maga az oleoil-LPA (213). A VPC31143 ezen tulajdonságát kihasználva sikerült feltérképeznünk az LPA₁ receptor aktiváció vazokonstriktációt közvetítő hatásának jelátviteli útvonalaait (240), miszerint endotélium károsodás esetén a simaizmokon lévő LPA₁ receptor tromboxán A₂ felszabadulását okozza, ami a TP receptorokat ingerelve vezet érösszehúzódáshoz. Ez egyben magyarázatot szolgáltat arra megfigyelésünkre is, hogy az LPA konstriktor hatása erőteljesebb hasi, mint mellkasi aortában, ugyanis a hasi aorta a TP receptor agonista U46619 adására is erőteljesebb kontrakciót mutat (nem közölt megfigyelés). Ugyanakkor e munkánk legjelentősebb limitáló tényezője, hogy a VPC31143 nem egy természetben előforduló LPA származék. Saját kísérleteink során több megfigyelés is utalt arra, hogy a legnagyobb relaxáns hatással rendelkező oleoil-LPA nem a leghatásosabb vazokonstriktor hatású LPA is egyben. Egyrészt, a VPC31143 vazokonstriktor aktivitása, bár szintén LPA₁ receptor közvetíti, az oleoil-LPA-hoz képest jóval erősebb. Másrészt a természetben is előforduló linoleoil- és linolenoil-LPA-nak már ép endotélium esetén is jelent meg vazokonstriktor hatása, szemben az oleoil-LPA-val. A 2.3 fejezetben ismertettem, hogy az egyes LPA receptorok

érzékenysége a természetben előforduló LPA származékokkal szemben nem egyforma: a különböző oldalláncú LPA-k hatásai jelentősen különbözhetnek. Az LPA struktúra – receptor aktivitás összefüggését több munkacsoport is vizsgálta. Bandoh és mtsai. eredményei szerint – akik edg-típusú LPA receptorokat expresszáltattak rovarsejtekben, majd megvizsgálták az egyes receptorok ligand-specificitását – nem találtak számottevő különbséget a különböző telítetlenségi fokú LPA-k LPA₁ receptort aktiváló képességében. Ugyanakkor Fujiwara és mtsai. – emlős RH7777 sejteket tranziensen és stabilan transzfektálva az egyes LPA receptorokkal – azt találták, hogy a tranziensen LPA₁ receptort expresszáló sejtek nagyobb aktivációt mutatnak a többszörösen telítetlen linoleoil- és linolenoil-LPA hatására, mint oleoil-LPA-ra, a legkisebb aktivációt pedig a telített típusok váltják ki (255). Előfordulhat tehát, hogy a többszörösen telítetlen LPA-k erősebb endogén agonistái az LPA₁ receptornak, mint az oleoil-LPA. Meg kell azonban jegyezni, hogy az ilyen módon vizsgált receptor-expressziós rendszerek nem modellezik teljes mértékben az *in vivo* körülményeket.

Tokumura munkacsoportja számos esetben vizsgálta az egyes LPA típusokra adott *in vivo* biológiai válaszokat. Az egyik legkorábbi ilyen munkájukban – melyben patkány és macska vérnyomásválaszát vizsgálták intravénásan adott LPA hatására (l. 51. oldal) – azt tapasztalták, hogy a patkányban létrejövő vérnyomásemelkedés kiváltásában az egyes LPA specieszek hatásossága a következő: linolenoil LPA > arachidonoil-LPA > linoleoil-LPA = oleoil-LPA > palmitoil-LPA >> sztearoil-LPA (85). Macskákban a vérnyomáscsökkentő hatás hasonló érzékenységet mutatott, azzal a különbséggel, hogy az arachidonoil-LPA a többi speciessel összevetve jóval kevésbé hatásosan csökkentette a vérnyomást, mint ahogyan patkányban növelte. Jól látható, hogy a többszörösen telítetlen formák potensebb vérnyomásemelők, és bár Tokumuráék részletes dózis-hatás összefüggést vizsgáltak, mi pedig kísérleteinkben csak egy (biológiai szempontból közel maximális) koncentrációban alkalmaztuk a különböző LPA-kat, mégis szembeötlő a hasonlóság a kapott eredmények között. Az arachidonoil-LPA előzetes eredményeink szerint kb. a linoleoil-LPA-hoz hasonló kontrakciót okozott, míg relaxáns hatása nem volt izolált egér aortában (ábra nélkül), ami szintén nagyon egybehangzó a vérnyomást befolyásoló hatásával. Meg kell azonban említeni, hogy a különböző LPA-k intravénás beadását követően az LPA számos sejttel kapcsolatba kerül, és a kialakuló vérnyomáshatás nem feltétlenül direkt érhatáson

alapul. Ami különösen bonyolíthatja a helyzetet (és erre már korábban is utaltam a 52. oldalon), hogy az LPA igen gyorsan aktiválja a vérlemezkéket, ami a véralvadás beindulása mellett további LPA felszabaduláshoz vezet. Így az érsejtekkel már nem csak a beadott LPA, hanem az így felszabaduló, akár teljesen más összetételű LPA is reakcióba léphet. A kiterjedt trombembolizációnak pedig önmagában is hatása van a vérnyomásra.

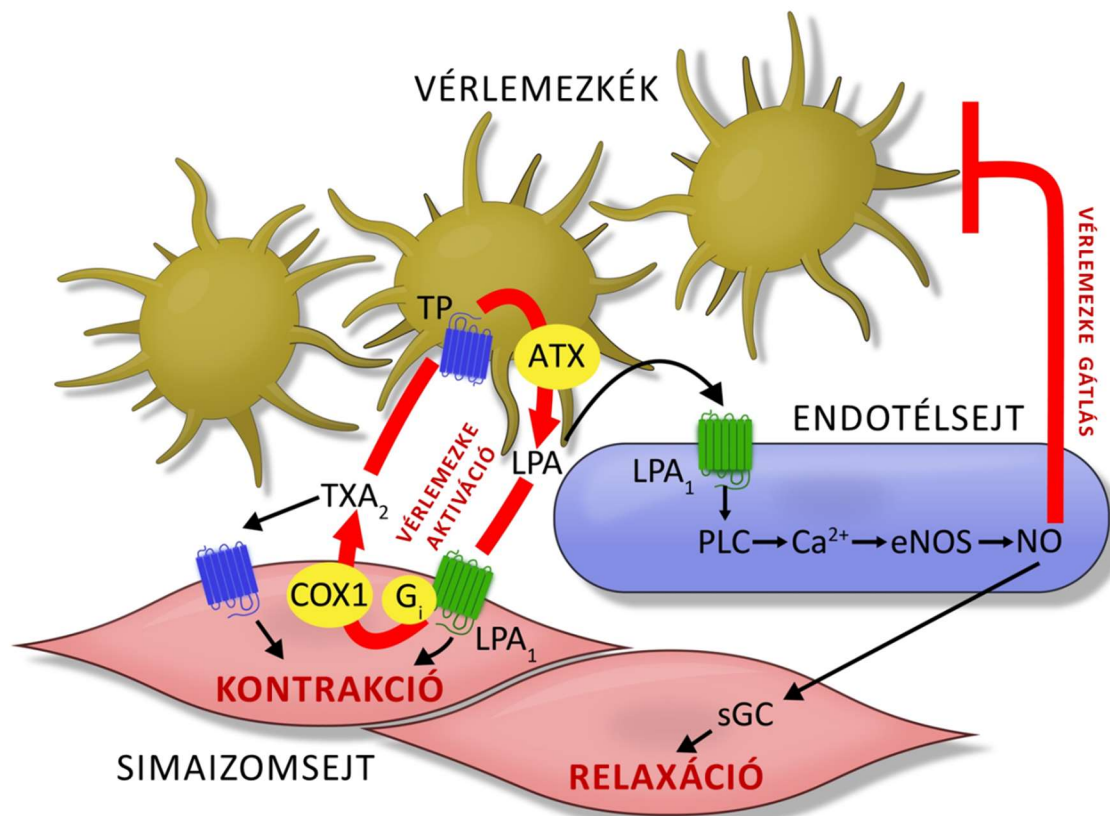
Tokumura és mtsai. azt is megfigyelték, hogy izolált patkány vastagbélben (256) és izolált tengerimalac ileumban (228) a különböző LPA specieszek kontrakciót okoznak, legerősebb hatással pedig a linolenoil-LPA rendelkező mindkét preparátumban; bár a hatás jelátvitelében voltak ellentmondásos eredményeik (az egyik esetben szerepet játszottak arachidonsav metabolitok, a másokban pedig nem). Tokumurák próbálkoztak izolált patkány aorta LPA hatására kialakuló tónusváltozásának vizsgálatával is, hogy igazolják, a vérnyomásnövekedés az LPA közvetlen, simaizomkontrakciót kiváltó hatásának következtében jön létre, de nem tapasztaltak hatást (216). Ez a közlemény nagyjából azzal párhuzamosan jelent meg, hogy Tigyi Gábor és munkacsoportja igazolta az LPA közvetlen konstriktor hatását agyi erekben *in situ* (l. 55. oldal). Több magyarázata is lehet, hogy izolált erekben Tokumura munkacsoportja nem tapasztalt izomkontrakciót, ahogyan azt tapasztalták bélpreparátumaikon. Az egyik, hogy nem ismert, mennyire volt ép az endotélium kísérleteik során, ugyanis nem számolnak be publikációjuk során sem arról, hogy letesztelték volna az épségét, sem arról, hogy direkt vigyáztak volna rá, vagy szándékosan roncsolták volna. Ép endotélium mellett pedig – mint az vizsgálatainkból kiderült – az LPA NO-függő vazodilatációt (is) okoz, ami ellensúlyozhatja a vazokonstriktort. Másrészt kísérleteiket oleoil-LPA-val, kumulatív dózis-hatás összefüggést vizsgálva végezték, norepinefrinnel előfeszített patkány aortában. Saját kísérleti eredményeink és tapasztalataink alapján az oleoil-LPA inkább relaxációt okoz, de csak ép endotélium esetén, míg kontrakciót csak kis mértékben vált ki, azt is csak endotélium után. Ezen kívül a gyors deszenzitizáció miatt kumulatív módon szinte lehetetlen az LPA dózis-függő érhatását kimutatni. Nem tudjuk annak az okát sem, hogy miért éppen oleoil-LPA-val próbálták direkt érhatást vizsgálni évekkal azután, hogy ők maguk leírták az összefüggést a különböző LPA-k zsírsavláncának telítetlenségi foka és a vérnyomásnövelő/csökkentő hatás erőssége között.

Érdekes kérdés, hogy mi lehet az LPA-okozta vazodilatáció és vazokonstrikció szerepe élettani/kórélettani folyamatokban, és milyen szerepe lehet ezen belül annak, hogy az egyes LPA formák mennyire potensek az egyik- vagy másik hatás kiváltásában. Előfordulhat, hogy az előző bekezdésben részletezett vérnyomáshatás háttérében az általunk tapasztalt érválaszok állnak, bár ez a 2.4.5.3 fejezetben részletezett ellentmondások miatt sok kérdést vet fel. Az egyes fajok közötti különbözőség az LPA vérnyomásra kifejtett hatásában lehet, hogy éppen annak a függvénye, hogy a vizsgált fajokban eltérő a vazodilatátor és vazokonstriktor hatások aránya. Különösen felerősödhet ez a különbség akkor, ha valamilyen kórállapotban tovább erősödik a vazokonstrikció egy általános endotél-diszfunkció miatt – ez magyarázhatja például, hogy miért tapasztaltak nagyobb vérnyomásnövekedést LPA adására spontán hipertenzív patkányokban (216). Több további tényező is szól amellett, hogy az általunk leírt érhatások közvetíthetik a vérnyomásra kifejtett hatásokat. Egyrészt meglepő egyezés van az LPA szerkezet – vérnyomáshatás, valamint LPA szerkezet – érhatás összefüggésben, az LPA₁ receptor agonista VPC31143 részben utánozta a vérnyomásnövelő hatást (213), valamint volt arra utaló jel Tokumura kísérleteiben, hogy a vérnyomásemelő hatást tromboxán közvetíti (216). Ugyanakkor ellene szól, hogy LPA₁ receptor KO egerekben is létrejött az LPA vérnyomásemelő hatása (105).

A bevezetésben szintén kitértem arra, hogy Ohata munkacsoportjának megfigyelései szerint, az LPA részt vesz az erek mechanotranszdukciós folyamatainak szabályozásában (l. 2.4.5.5 fejezet). Borjú aorta- és egér endotélsejtekben is kimutatták, hogy az LPA érzékenyíti a nyíróerő hatására létrejövő intracelluláris Ca²⁺ felszabadulást (223, 224), ez pedig befolyásolhatja az áramlás indukálta vazodilatációt. Ugyanez a kutatócsoport nemrégiben azt találta, hogy nyíróerő jelenlétében az LPA fokozza az endotélsejtek tromboxán termelését, és így változtatja az érreaktivitást (225, 226). Bár a szignalizációs folyamatok hasonlóak, ezekben a kísérletekben az LPA érhatása az endotéliumon létrejövő nyíróerők jelenlétéhez kötött. A mi kísérleteink alapján azonban az LPA nyíróerőtől függetlenül, közvetlen módon változtatja meg az értónust, ez a hatás pedig az endotélium épségétől függően lehet vazodilatáció és vazokonstrikció is.

Eredményeinket összegezve tehát az LPA az értónus szabályozása szempontjából egy „Janus arcú” mediátor, és hatásának kifejlődése, legalábbis izolált érben az

endotélium épségétől függ, de befolyásolja az is, hogy milyen típusú LPA kerül kapcsolatba az erekkel. Ha figyelembe vesszük, hogy az LPA a legtöbb rendelkezésre álló irodalmi adat alapján egy autokrin/parakrin mediátor, akkor leginkább olyan esetekben feltételezhető szerepe, amikor az érrendszeren belül nagy mennyiségű LPA szabadul fel. Legjobb példa erre pedig az endotélisérülés, amit akár egyszerű mechanikus érsérülés, akár olyan kórállapot is okozhat, mint pl. egy meszes plakk ruptúrája, vagy egy éren belül végzett intervenciós beavatkozás. Tokumura és csoportja korábban már említett munkájában (l. 41. oldal) megfigyelte, hogy a vérnyomás hatás mellett a vérlemezkék aktivációja is függ a vizsgált LPA típusától, és az acil-származékok közül a legpotensebbek a hosszú szénláncú, többszörösen telítetlen LPA-k (93). Az aktivált vérlemezkék pedig a bevezetésben már részletezett módon (l. 36. oldal) járulnak hozzá a további LPA felszabaduláshoz, ami döntő módon szintén többszörösen telítetlen LPA specieszek felszaporodásához vezet (78). Bot és munkacsoportja leírták, hogy a meszes plakkokban felszaporodnak a többszörösen telítetlen LPA típusok (38), Kurano és mtsai. pedig többszörösen telítetlen LPA-k mennyiségének növekedését találták szívinfarktusban szenvedő betegek vérplazmájában (31). A plakkok ruptúrája során felszínre kerülő zsíros mag LPA_{1/3} receptorok közvetítésével aktiválja a vérlemezkéket (200). A mi eredményeink szerint a többszörösen telítetlen LPA-k endotélisérülés esetén az értónus jelentős növekedését okozzák. Elképzelhető tehát, hogy pl. szklerotikus plakkok ruptúrájakor a vérrel kontaktusba kerülő többszörösen telítetlen LPA származékok – amellet, hogy további vérlemezke aktivációt okozva a ruptúrált plakk területén a trombusképződést fokozzák – erős vazokonstriktor hatásukkal hozzájárulhatnak egy spasztikus állapot kialakulásához azokon a területeken, ahol az endotélium sérült. A növekvő alvadék, és a felszabaduló LPA-k azonban az ép endotéliummal rendelkező érszakaszhoz érve már nem a simaizomsejtekkel kerülnek kapcsolatba, hanem az endotélsejtekkel, amik fokozott nitrogén-monoxid szintézisükkel gátolhatják a további vérlemezke aktivációt, és ellensúlyozzák a vazokonstriktiót (l. 25. ábra). Hogy ez valóban így van-e, természetesen további *in vivo* vizsgálatokat igényel.



25. ábra A lizofoszfátidsav (LPA) feltételezett szerepe az értónus szabályozásában. Endotélium hiányában – ami kialakulhat pl. mechanikus sérülés, vagy meszes plakkok ruptúrája során – a vérlemezék aktivációja jelentős LPA felszabadulással jár. Az így felszabaduló (nagy részt többszörösen telítetlen) LPA közvetlenül a simaizomsejtek LPA₁ receptorának ingerlésével vazokonstriktiót vált ki, melynek háttérében ciklooxygenáz 1 (COX1) aktiváció és következményes tromboxán A₂ (TXA₂) termelés áll. A TXA₂ további vérlemezke aktivációhoz, és LPA felszabaduláshoz vezet. Ez a pozitív visszacsatolási mechanizmus jelentős vazokonstriktiót válthat ki, ami érsérülés esetén segíthet a vérzéscsillapításban, de kóros esetben mikrocirkulációs zavarhoz vezethet. E folyamat megoldása lehet, hogy amikor a növekvő alvadék eléri az ép endotéliummal rendelkező érszakaszokat, az LPA az endotélsejtek nitrogén monoxid (NO) termelését fokozza az LPA₁ receptor – foszfolipáz-C (PLC) – endoteliális nitrogén monoxid szintáz (eNOS) útvonalon keresztül. A felszabaduló NO vazorelaxációt vált ki és megakadályozza a vérlemezék további aktivációját, negatív visszacsatolással ellensúlyozva a vazokonstriktiót és a trombus további növekedését.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink során arra kerestünk választ, hogyan befolyásolja a lizofoszfatidsav (LPA) az erek tónusát, és ennek háttérében milyen szignáltranszdukciós folyamatok állhatnak. Eredményeinkkel igazoltuk, hogy

- Az LPA dózisfüggő vazodilatációt okoz, melynek kialakulása az endotélium épségéhez kötött. A vazodilatáció erőssége függ az LPA-ban található zsírsavlánctól: telített zsírsavlánccú LPA-k esetében a lánchossz, míg a 18 szénatomszámú LPA-k esetében a kettős kötések számának növelése csökkenti a relaxáns hatást.
- Endotélium hiányában az LPA dózisfüggő vazokonstriktiót okoz, mely kifejezettebb a hasi aortában, mint a mellkasi aortában, és erőssége fokozódik az LPA zsírsav oldalláncának telítetlenségével.
- Az endotélsejtekben kifejeződnek az LPA₁, LPA₂, LPA₄ és LPA₅ receptorok, valamint az LPA szintéziséért felelős autotaxin enzim. A vazorelaxáció közvetítéséért az LPA₁ receptor felelős.
- Az LPA okozta vazorelaxációt az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) közvetíti, ciklooxygenáz metabolitoktól független.
- Az eNOS aktiválása a foszfolipáz-C (PLC) – de nem a PLC ϵ – közreműködésével történik, és független az eNOS foszforilációhoz vezető foszfatidil-inozitol-3-kináz – Akt/PKB útvonaltól.
- Az LPA endotélkárosodás esetén megfigyelhető vazokonstriktor hatásának közvetítésében szintén szerepet játszanak az LPA₁ receptorok.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A lizofoszfátidsav (LPA) egy bioaktív lipid mediátor vegyületcsalád, melyben a glicerín vázhoz egy foszfátcsoporthoz és valamilyen zsírsav kapcsolódik. Több tagja is széles körben előfordul az élővilágban, hatásait elsősorban az LPA₁₋₆ nevű G-fehérjéhez kapcsolt receptorok közvetítik. Az LPA számos élettani és kórélettani folyamatban szerepet játszik, mint pl. az idegrendszer fejlődése, gyulladásos folyamatok szabályozása, vagy a tumorok terjedése. Az érrendszerben viszonylag jól ismert vaszkulo- és angiogenetikus hatása, valamint az érrelmeszesedésben és annak talaján kialakuló vérrögképződésben betöltött szerepe. Az értónusra kifejtett hatásairól azonban ellentmondásosak az irodalmi adatok, ezért kísérleteinkben arra kerestünk választ, miként hatnak a különböző LPA-típusok az értónusra, és ezek mögött milyen jelátviteli folyamatok állnak. Megfigyeltük, hogy az LPA az értónust az endotélium épségétől függően befolyásolja: ép endotélium esetén relaxációt, míg károsodott endotélium, vagy az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz hiánya (eNOS) esetén vazokonstriktiót okoz. Mindkét hatás függ az LPA-ban található zsírsavlánc hosszától és telítetlenségi fokától, ez utóbbi növelésével a kontrakciós készség fokozódik, a relaxációs készség pedig csökken. Izolált endotélisejtekből kimutattuk az LPA több receptorának, köztük az LPA₁-nek, és az LPA termelésében kiemelkedő jelentőségű autotaxin enzimnek az expresszióját. Eredményeink szerint az LPA LPA₁ receptoron keresztül aktiválja az eNOS enzimet, mely hatás a foszfolipáz-C – de nem a PLC ϵ altípus – közvetítésével valósul meg, míg az eNOS foszforilációhoz vezető jelátviteli utak nem játszanak benne szerepet. Meglepő módon az LPA vazokonstriktor hatásában szintén szerepet játszik az LPA₁ receptor. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy atheroszklerotikus léziókban LPA halmozódik fel, valamint vérlemezke-aktiváció során is nagy mennyiségben szabadul fel LPA – mindkét esetben döntően többszörösen telítetlen típusok. Így plakkruptúra, vagy más érsérülés nagy mennyiségű LPA felszabadulásával jár, ami az általunk leírt módon jelentősen befolyásolhatja az erek tónusát a sérülés környezetében, és hozzájárulhat a vérlemezke aktiváció szabályozásához.

9. SUMMARY

Lysophosphatidic acid (LPA) is a family of simple lipid mediators composed of a glycerol backbone, a phosphate headgroup and a fatty acid with various chain length and saturation. LPA is ubiquitously present in living organisms, and its effects are mainly mediated by G-protein-coupled receptors called LPA₁₋₆. LPA plays an important role in many physiological and pathophysiological processes including neural development, inflammation and tumor progression. Its role is well known in the vascular system for its vasculo-, angio-, athero- and thrombogenic effects, however its involvement in the regulation of vascular tone is obscure. First, we aimed to analyze the vasoactive effects of different LPA species. We observed that LPA has a ‘Janus faced’ effect on the vascular tone: if the endothelium is intact, LPA mediates vasorelaxation, whereas in case of endothelial damage or genetic deletion of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) it evokes vasoconstriction. Both effects depend on the length and saturation of the fatty acyl moiety of the LPA. Highest vasorelaxant effect is mediated by the mono-unsaturated oleoil-LPA, whereas increase in the number of double bonds results in decreased vasorelaxing and increased vasoconstricting activity. Regarding the signal transduction processes of LPA-induced vasoactive effects, expression profile of LPA₁, LPA₂, LPA₄, LPA₅ receptors as well as the main LPA producing enzyme autotaxin were demonstrated by qPCR in isolated endothelial cells. According to our results, LPA₁ receptor mediates the vasorelaxing effect through the phospholipase C (but not the PLC ϵ subtype) – eNOS pathway. Phosphorylation of eNOS is probably not involved in the vasorelaxing effect of LPA. Interestingly, LPA₁ receptors also appear to be involved in LPA-induced vasoconstriction. Literature data indicate the accumulation of LPA in atherosclerotic lesions, as well as its vast production by activated platelets – with a dominance of poly-unsaturated LPA species. We propose that during vascular injury or rupture of the atherosclerotic plaques, increased levels of LPA can play significant roles in the regulation of the vascular tone and thrombus formation in the vicinity of the damaged vessel wall.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Vogt, W. (1957) The chemical nature of Darmstoff. *J Physiol* 137: 154-167
2. Tokumura, A., Akamatsu, Y., Yamada, S., and Tsukatani, H. (1978) Chemical and pharmacological properties of vasopressor phospholipid in crude soybean lecithin. *Agric. Biol. Chem.* 42: 515–521
3. Tokumura, A., Fukuzawa, K., Akamatsu, Y., Yamada, S., Suzuki, T., and Tsukatani, H. (1978) Identification of vasopressor phospholipid in crude soybean lecithin. *Lipids* 13: 468–472
4. van Corven, E. J., Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T., Moolenaar, W. H. (1989) Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell* 59: 45-54
5. Hecht, J. H., Weiner, J. A., Post, S. R., Chun, J. (1996) Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J Cell Biol* 135: 1071-1083
6. Tigyi, G. (2010) Aiming drug discovery at lysophosphatidic acid targets. *Br J Pharmacol* 161: 241-270
7. Aikawa, S., Hashimoto, T., Kano, K., Aoki, J. (2015) Lysophosphatidic acid as a lipid mediator with multiple biological actions. *J Biochem* 157: 81-89
8. Murakami, M. (2011) Lipid mediators in life science. *Exp Anim* 60: 7-20
9. Nomenclature, I.-I. C. o. B. (1978) The nomenclature of lipids (Recommendations 1976) *Biochem J* 171: 21-35
10. Liliom, K., Fischer, D. J., Virag, T., Sun, G., Miller, D. D., Tseng, J. L., Desiderio, D. M., Seidel, M. C., Erickson, J. R., Tigyi, G. (1998) Identification of a novel growth factor-like lipid, 1-O-cis-alk-1'-enyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphate (alkenyl-GP) that is present in commercial sphingolipid preparations. *J Biol Chem* 273: 13461-13468
11. Sugiura, T., Nakane, S., Kishimoto, S., Waku, K., Yoshioka, Y., Tokumura, A., Hanahan, D. J. (1999) Occurrence of lysophosphatidic acid and its alkyl ether-linked analog in rat brain and comparison of their biological activities toward cultured neural cells. *Biochim Biophys Acta* 1440: 194-204
12. Williams, J. R., Khandoga, A. L., Goyal, P., Fells, J. I., Perygin, D. H., Siess, W., Parrill, A. L., Tigyi, G., Fujiwara, Y. (2009) Unique Ligand Selectivity of the GPR92/LPA(5) Lysophosphatidate Receptor Indicates Role in Human Platelet Activation. *J Biol Chem* 284: 17304-17319
13. Zhang, C., Baker, D. L., Yasuda, S., Makarova, N., Balazs, L., Johnson, L. R., Marathe, G. K., McIntyre, T. M., Xu, Y., Prestwich, G. D., Byun, H. S.,

- Bittman, R., Tigyi, G. (2004) Lysophosphatidic acid induces neointima formation through PPARgamma activation. *J Exp Med* 199: 763-774
14. Mirendil, H., Lin, M-E, Chun, J. Lysophosphatidic Acid (LPA) Receptor Signaling. In: Chun, J., Hla, T., Moolenaar, W., Spiegel, S. (szerk.) *Lysophospholipid receptors: signaling and biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2013: 1-39
 15. Baker, D. L., Desiderio, D. M., Miller, D. D., Tolley, B., Tigyi, G. J. (2001) Direct quantitative analysis of lysophosphatidic acid molecular species by stable isotope dilution electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 292: 287-295
 16. Kishimoto, T., Soda, Y., Matsuyama, Y., Mizuno, K. (2002) An enzymatic assay for lysophosphatidylcholine concentration in human serum and plasma. *Clinical Biochemistry* 35: 411-416
 17. Yung, Y. C., Stoddard, N. C., Chun, J. (2014) LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J Lipid Res* 55: 1192-1214
 18. Jesionowska, A., Cecerska, E., Dolegowska, B. (2014) Methods for quantifying lysophosphatidic acid in body fluids: a review. *Anal Biochem* 453: 38-43
 19. Shan, L., Jaffe, K., Li, S., Davis, L. (2008) Quantitative determination of lysophosphatidic acid by LC/ESI/MS/MS employing a reversed phase HPLC column. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 864: 22-28
 20. Sano, T., Baker, D., Virag, T., Wada, A., Yatomi, Y., Kobayashi, T., Igarashi, Y., Tigyi, G. (2002) Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *J Biol Chem* 277: 21197-21206
 21. Gerrard, J. M., Robinson, P. (1989) Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin. *Biochim Biophys Acta* 1001: 282-285
 22. Yatomi, J., Igarashi, K., Nakamura, K., Ohkawa, R., Masuda, A., Suzuki, A., Kishimoto, T., Ikeda, H., Aoki, J. Clinical introduction of lysophosphatidic acid (LPA) and autotaxin assays. In: Chun, J., Hla, T., Moolenaar, W., Spiegel, S. (szerk.) *Lysophospholipid receptors: signaling and biochemistry*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2013: 709-735
 23. Hosogaya, S., Yatomi, Y., Nakamura, K., Ohkawa, R., Okubo, S., Yokota, H., Ohta, M., Yamazaki, H., Koike, T., Ozaki, Y. (2008) Measurement of plasma lysophosphatidic acid concentration in healthy subjects: strong correlation with lysophospholipase D activity. *Ann Clin Biochem* 45: 364-368

24. Tokumura, A., Kanaya, Y., Miyake, M., Yamano, S., Irahara, M., Fukuzawa, K. (2002) Increased production of bioactive lysophosphatidic acid by serum lysophospholipase D in human pregnancy. *Biol Reprod* 67: 1386-1392
25. Watanabe, N., Ikeda, H., Nakamura, K., Ohkawa, R., Kume, Y., Tomiya, T., Tejima, K., Nishikawa, T., Arai, M., Yanase, M., Aoki, J., Arai, H., Omata, M., Fujiwara, K., Yatomi, Y. (2007) Plasma lysophosphatidic acid level and serum autotaxin activity are increased in liver injury in rats in relation to its severity. *Life Sci* 81: 1009-1015
26. Watanabe, N., Ikeda, H., Nakamura, K., Ohkawa, R., Kume, Y., Aoki, J., Hama, K., Okudaira, S., Tanaka, M., Tomiya, T., Yanase, M., Tejima, K., Nishikawa, T., Arai, M., Arai, H., Omata, M., Fujiwara, K., Yatomi, Y. (2007) Both plasma lysophosphatidic acid and serum autotaxin levels are increased in chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol* 41: 616-623
27. Zhang, Y. J., Cao, L. Y., Fu, Z. Z., Wang, Y. J., Wang, G. X., Gu, T. (2015) Clinical significance of plasma lysophosphatidic acid levels in the differential diagnosis of ovarian cancer. *J Cancer Res Ther* 11: 375-380
28. Dohi, T., Miyauchi, K., Ohkawa, R., Nakamura, K., Kishimoto, T., Miyazaki, T., Nishino, A., Nakajima, N., Yaginuma, K., Tamura, H., Kojima, T., Yokoyama, K., Kurata, T., Shimada, K., Yatomi, Y., Daida, H. (2012) Increased circulating plasma lysophosphatidic acid in patients with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta* 413: 207-212
29. Gu, C., Wang, F., Zhao, Z., Wang, H., Cong, X., Chen, X. (2017) Lysophosphatidic Acid Is Associated with Atherosclerotic Plaque Instability by Regulating NF- κ B Dependent Matrix Metalloproteinase-9 Expression via LPA2 in Macrophages. *Frontiers in Physiology* 8: 266
30. Kurano, M., Kano, K., Dohi, T., Matsumoto, H., Igarashi, K., Nishikawa, M., Ohkawa, R., Ikeda, H., Miyauchi, K., Daida, H., Aoki, J., Yatomi, Y. (2017) Different origins of lysophospholipid mediators between coronary and peripheral arteries in acute coronary syndrome. *J Lipid Res* 58: 433-442
31. Kurano, M., Suzuki, A., Inoue, A., Tokuhara, Y., Kano, K., Matsumoto, H., Igarashi, K., Ohkawa, R., Nakamura, K., Dohi, T., Miyauchi, K., Daida, H., Tsukamoto, K., Ikeda, H., Aoki, J., Yatomi, Y. (2015) Possible involvement of minor lysophospholipids in the increase in plasma lysophosphatidic acid in acute coronary syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35: 463-470
32. Li, Z.-G., Yu, Z.-C., Wang, D.-Z., Ju, W.-P., Zhan, X., Wu, Q.-Z., Wu, X.-J., Cong, H.-M., Man, H.-H. (2008) Influence of acetylsalicylate on plasma lysophosphatidic acid level in patients with ischemic cerebral vascular diseases. *Neurological Research* 30: 366-369
33. Li, Z. G., Yu, Z. C., Yu, Y. P., Ju, W. P., Wang, D. Z., Zhan, X., Wu, X. J., Zhou, L. (2010) Lysophosphatidic Acid Level and the Incidence of Silent Brain

Infarction in Patients with Nonvalvular Atrial Fibrillation. *Int J Mol Sci* 11: 3988-3998

34. Tager, A. M., LaCamera, P., Shea, B. S., Campanella, G. S., Selman, M., Zhao, Z., Polosukhin, V., Wain, J., Karimi-Shah, B. A., Kim, N. D., Hart, W. K., Pardo, A., Blackwell, T. S., Xu, Y., Chun, J., Luster, A. D. (2008) The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med* 14: 45-54
35. Xu, Y., Gaudette, D. C., Boynton, J. D., Frankel, A., Fang, X. J., Sharma, A., Hurteau, J., Casey, G., Goodbody, A., Mellors, A., et al. (1995) Characterization of an ovarian cancer activating factor in ascites from ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 1: 1223-1232
36. Yamada, T., Sato, K., Komachi, M., Malchinkhuu, E., Tobo, M., Kimura, T., Kuwabara, A., Yanagita, Y., Ikeya, T., Tanahashi, Y., Ogawa, T., Ohwada, S., Morishita, Y., Ohta, H., Im, D. S., Tamoto, K., Tomura, H., Okajima, F. (2004) Lysophosphatidic acid (LPA) in malignant ascites stimulates motility of human pancreatic cancer cells through LPA1. *J Biol Chem* 279: 6595-6605
37. Siess, W., Zangl, K. J., Essler, M., Bauer, M., Brandl, R., Corrinth, C., Bittman, R., Tigyi, G., Aepfelbacher, M. (1999) Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6931-6936
38. Bot, M., Bot, I., Lopez-Vales, R., van de Lest, C. H., Saulnier-Blache, J. S., Helms, J. B., David, S., van Berkel, T. J., Biessen, E. A. (2010) Atherosclerotic lesion progression changes lysophosphatidic acid homeostasis to favor its accumulation. *Am J Pathol* 176: 3073-3084
39. Thumser, A. E., Voysey, J. E., Wilton, D. C. (1994) The binding of lysophospholipids to rat liver fatty acid-binding protein and albumin. *Biochem J* 301 (Pt 3): 801-806
40. Haseruck, N., Erl, W., Pandey, D., Tigyi, G., Ohlmann, P., Ravanat, C., Gachet, C., Siess, W. (2004) The plaque lipid lysophosphatidic acid stimulates platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation in whole blood: involvement of P2Y(1) and P2Y(12) receptors. *Blood* 103: 2585-2592
41. Osborn, T. M., Dahlgren, C., Hartwig, J. H., Stossel, T. P. (2007) Modifications of cellular responses to lysophosphatidic acid and platelet-activating factor by plasma gelsolin. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1323-1330
42. Atshaves, B. P., Martin, G. G., Hostetler, H. A., McIntosh, A. L., Kier, A. B., Schroeder, F. (2010) Liver fatty acid-binding protein and obesity. *J Nutr Biochem* 21: 1015-1032

43. Tigyi, G., Parrill, A. L. (2003) Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action. *Progress in Lipid Research* 42: 498-526
44. Tsukahara, R., Haniu, H., Matsuda, Y., Tsukahara, T. (2014) Heart-type fatty-acid-binding protein (FABP3) is a lysophosphatidic acid-binding protein in human coronary artery endothelial cells. *FEBS Open Bio* 4: 947-951
45. Aoki, J., Inoue, A., Okudaira, S. (2008) Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim Biophys Acta* 1781: 513-518
46. Pages, C., Simon, M. F., Valet, P., Saulnier-Blache, J. S. (2001) Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 64: 1-10
47. Salous, A. K., Panchatcharam, M., Sunkara, M., Mueller, P., Dong, A., Wang, Y., Graf, G. A., Smyth, S. S., Morris, A. J. (2013) Mechanism of rapid elimination of lysophosphatidic acid and related lipids from the circulation of mice. *J Lipid Res* 54: 2775-2784
48. Aoki, J., Taira, A., Takanezawa, Y., Kishi, Y., Hama, K., Kishimoto, T., Mizuno, K., Saku, K., Taguchi, R., Arai, H. (2002) Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem* 277: 48737-48744
49. Liotta, L. A., Mandler, R., Murano, G., Katz, D. A., Gordon, R. K., Chiang, P. K., Schiffmann, E. (1986) Tumor cell autocrine motility factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 3302-3306
50. Stracke, M. L., Krutzsch, H. C., Unsworth, E. J., Arestad, A., Cioce, V., Schiffmann, E., Liotta, L. A. (1992) Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem* 267: 2524-2529
51. Murata, J., Lee, H. Y., Clair, T., Krutzsch, H. C., Arestad, A. A., Sobel, M. E., Liotta, L. A., Stracke, M. L. (1994) cDNA cloning of the human tumor motility-stimulating protein, autotaxin, reveals a homology with phosphodiesterases. *J Biol Chem* 269: 30479-30484
52. Tokumura, A., Harada, K., Fukuzawa, K., Tsukatani, H. (1986) Involvement of lysophospholipase D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma. *Biochim Biophys Acta* 875: 31-38
53. Eichholtz, T., Jalink, K., Fahrenfort, I., Moolenaar, W. H. (1993) The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J* 291 (Pt 3): 677-680
54. Umezu-Goto, M., Kishi, Y., Taira, A., Hama, K., Dohmae, N., Takio, K., Yamori, T., Mills, G. B., Inoue, K., Aoki, J., Arai, H. (2002) Autotaxin has

- lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol* 158: 227-233
55. Tokumura, A., Majima, E., Kariya, Y., Tominaga, K., Kogure, K., Yasuda, K., Fukuzawa, K. (2002) Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem* 277: 39436-39442
 56. Nishimasu, H., Okudaira, S., Hama, K., Mihara, E., Dohmae, N., Inoue, A., Ishitani, R., Takagi, J., Aoki, J., Nureki, O. (2011) Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. *Nat Struct Mol Biol* 18: 205-212
 57. Perrakis, A., Moolenaar, W. H. (2014) Autotaxin: structure-function and signaling. *J Lipid Res* 55: 1010-1018
 58. Moolenaar, W. H., Perrakis, A. (2011) Insights into autotaxin: how to produce and present a lipid mediator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 674-679
 59. Yukiura, H., Aoki J. Autotaxin: a unique ecto-type pyrophosphodiesterase with diverse functions. In: Chun, J., Hla, T., Moolenaar, W., Spiegel, S. (szerk.) *Lysophospholipid receptors: signaling and biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2013: 103-119
 60. Clair, T., Aoki, J., Koh, E., Bandle, R. W., Nam, S. W., Ptaszynska, M. M., Mills, G. B., Schiffmann, E., Liotta, L. A., Stracke, M. L. (2003) Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate. *Cancer Res* 63: 5446-5453
 61. Pamuklar, Z., Federico, L., Liu, S., Umezu-Goto, M., Dong, A., Panchatcharam, M., Fulkerson, Z., Berdyshev, E., Natarajan, V., Fang, X., van Meeteren, L. A., Moolenaar, W. H., Mills, G. B., Morris, A. J., Smyth, S. S. (2009) Autotaxin/lysopholipase D and lysophosphatidic acid regulate murine hemostasis and thrombosis. *J Biol Chem* 284: 7385-7394
 62. van Meeteren, L. A., Ruurs, P., Stortelers, C., Bouwman, P., van Rooijen, M. A., Pradere, J. P., Pettit, T. R., Wakelam, M. J., Saulnier-Blache, J. S., Mummery, C. L., Moolenaar, W. H., Jonkers, J. (2006) Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol* 26: 5015-5022
 63. Tanaka, M., Okudaira, S., Kishi, Y., Ohkawa, R., Iseki, S., Ota, M., Noji, S., Yatomi, Y., Aoki, J., Arai, H. (2006) Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 281: 25822-25830
 64. Ferry, G., Giganti, A., Coge, F., Bertaux, F., Thiam, K., Boutin, J. A. (2007) Functional invalidation of the autotaxin gene by a single amino acid mutation in mouse is lethal. *FEBS Lett* 581: 3572-3578

65. Katsifa, A., Kaffe, E., Nikolaidou-Katsaridou, N., Economides, A. N., Newbigging, S., McKerlie, C., Aidinis, V. (2015) The Bulk of Autotaxin Activity Is Dispensable for Adult Mouse Life. *PLOS ONE* 10: e0143083
66. Benesch, M. G., Tang, X., Venkatraman, G., Bekele, R. T., Brindley, D. N. (2016) Recent advances in targeting the autotaxin-lysophosphatidate-lipid phosphate phosphatase axis in vivo. *J Biomed Res* 30: 272-284
67. Bolier, R., Tolenaars, D., Kremer, A. E., Saris, J., Pares, A., Verheij, J., Bosma, P. J., Beuers, U., Oude Elferink, R. P. (2016) Enteroendocrine cells are a potential source of serum autotaxin in men. *Biochim Biophys Acta* 1862: 696-704
68. Nsaibia, M. J., Mahmut, A., Boulanger, M. C., Arsenault, B. J., Bouchareb, R., Simard, S., Witztum, J. L., Clavel, M. A., Pibarot, P., Bossé, Y., Tsimikas, S., Mathieu, P. (2016) Autotaxin interacts with lipoprotein(a) and oxidized phospholipids in predicting the risk of calcific aortic valve stenosis in patients with coronary artery disease. *J Intern Med* 280: 509-517
69. Boucher, J., Quilliot, D., Praderes, J. P., Simon, M. F., Gres, S., Guigne, C., Prevot, D., Ferry, G., Boutin, J. A., Carpene, C., Valet, P., Saulnier-Blache, J. S. (2005) Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression. *Diabetologia* 48: 569-577
70. Ferry, G., Tellier, E., Try, A., Gres, S., Naime, I., Simon, M. F., Rodriguez, M., Boucher, J., Tack, I., Gesta, S., Chomarot, P., Dieu, M., Raes, M., Galizzi, J. P., Valet, P., Boutin, J. A., Saulnier-Blache, J. S. (2003) Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem* 278: 18162-18169
71. Nikitopoulou, I., Oikonomou, N., Karouzakis, E., Sevastou, I., Nikolaidou-Katsaridou, N., Zhao, Z., Mersinias, V., Armaka, M., Xu, Y., Masu, M., Mills, G. B., Gay, S., Kollias, G., Aidinis, V. (2012) Autotaxin expression from synovial fibroblasts is essential for the pathogenesis of modeled arthritis. *J Exp Med* 209: 925-933
72. Hozumi, H., Hokari, R., Kurihara, C., Narimatsu, K., Sato, H., Sato, S., Ueda, T., Higashiyama, M., Okada, Y., Watanabe, C., Komoto, S., Tomita, K., Kawaguchi, A., Nagao, S., Miura, S. (2013) Involvement of autotaxin/lysophospholipase D expression in intestinal vessels in aggravation of intestinal damage through lymphocyte migration. *Lab Invest* 93: 508-519
73. Mazereeuw-Hautier, J., Gres, S., Fanguin, M., Cariven, C., Fauvel, J., Perret, B., Chap, H., Salles, J. P., Saulnier-Blache, J. S. (2005) Production of lysophosphatidic acid in blister fluid: involvement of a lysophospholipase D activity. *J Invest Dermatol* 125: 421-427

74. Tokumura, A., Kume, T., Fukuzawa, K., Tahara, M., Tasaka, K., Aoki, J., Arai, H., Yasuda, K., Kanzaki, H. (2007) Peritoneal fluids from patients with certain gynecologic tumor contain elevated levels of bioactive lysophospholipase D activity. *Life Sci* 80: 1641-1649
75. Ali, G., Chishti, M. S., Raza, S. I., John, P., Ahmad, W. (2007) A mutation in the lipase H (LIPH) gene underlie autosomal recessive hypotrichosis. *Hum Genet* 121: 319-325
76. Ishimine, H., Zhou, R., Sumitomo, K., Ito, Y., Seki, Y., Yoshida, Y., Kurisaki, A. (2016) Lipase member H frequently overexpressed in human esophageal adenocarcinomas. *Tumour Biol* 37: 2075-2081
77. Seki, Y., Yoshida, Y., Ishimine, H., Shinozaki-Ushiku, A., Ito, Y., Sumitomo, K., Nakajima, J., Fukayama, M., Michiue, T., Asashima, M., Kurisaki, A. (2014) Lipase member H is a novel secreted protein selectively upregulated in human lung adenocarcinomas and bronchioloalveolar carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 443: 1141-1147
78. Bolen, A. L., Naren, A. P., Yarlagadda, S., Beranova-Giorgianni, S., Chen, L., Norman, D., Baker, D. L., Rowland, M. M., Best, M. D., Sano, T., Tsukahara, T., Liliom, K., Igarashi, Y., Tigyi, G. (2011) The phospholipase A1 activity of lysophospholipase A-I links platelet activation to LPA production during blood coagulation. *J Lipid Res* 52: 958-970
79. Fourcade, O., Simon, M. F., Viode, C., Rugani, N., Leballe, F., Ragab, A., Fournie, B., Sarda, L., Chap, H. (1995) Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* 80: 919-927
80. Waggoner, D. W., Gomez-Munoz, A., Dewald, J., Brindley, D. N. (1996) Phosphatidate phosphohydrolase catalyzes the hydrolysis of ceramide 1-phosphate, lysophosphatidate, and sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem* 271: 16506-16509
81. Jasinska, R., Zhang, Q. X., Pilquil, C., Singh, I., Xu, J., Dewald, J., Dillon, D. A., Berthiaume, L. G., Carman, G. M., Waggoner, D. W., Brindley, D. N. (1999) Lipid phosphate phosphohydrolase-1 degrades exogenous glycerolipid and sphingolipid phosphate esters. *Biochem J* 340 (Pt 3): 677-686
82. Tomsig, J. L., Snyder, A. H., Berdyshev, E. V., Skobeleva, A., Mataya, C., Natarajan, V., Brindley, D. N., Lynch, K. R. (2009) Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo. *Biochem J* 419: 611-618
83. Venkatraman, G., Brindley, DN. Lipid phosphate phosphatases and signaling by lysophospholipid receptors. In: Chun, J., Hla, T., Moolenaar, W., Spiegel, S. (szerk.) *Lysophospholipid receptor: signaling and biochemistry*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2013: 201-227

84. Tang, X., Benesch, M. G. K., Dewald, J., Zhao, Y. Y., Patwardhan, N., Santos, W. L., Curtis, J. M., McMullen, T. P. W., Brindley, D. N. (2014) Lipid phosphate phosphatase-1 expression in cancer cells attenuates tumor growth and metastasis in mice. *J Lipid Res* 55: 2389-2400
85. Tokumura, A., Fukuzawa, K., and Tsukatani, H. (1978) Effects of synthetic and natural lysophosphatidic acids on the arterial blood pressure of different animal species. *Lipids* 13: 572–574
86. Dixon, R. A., Kobilka, B. K., Strader, D. J., Benovic, J. L., Dohlman, H. G., Frielle, T., Bolanowski, M. A., Bennett, C. D., Rands, E., Diehl, R. E., Mumford, R. A., Slater, E. E., Sigal, I. S., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., Strader, C. D. (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321: 75-79
87. Rakic, P. (2009) Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci* 10: 724-735
88. Fukushima, N., Ishii, I., Contos, J. J., Weiner, J. A., Chun, J. (2001) Lysophospholipid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 507-534
89. Hla, T., Maciag, T. (1990) An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 265: 9308-9313
90. An, S., Bleu, T., Huang, W., Hallmark, O. G., Coughlin, S. R., Goetzl, E. J. (1997) Identification of cDNAs encoding two G protein-coupled receptors for lysosphingolipids. *FEBS Lett* 417: 279-282
91. Lee, M. J., Van Brocklyn, J. R., Thangada, S., Liu, C. H., Hand, A. R., Menzeleev, R., Spiegel, S., Hla, T. (1998) Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* 279: 1552-1555
92. Kihara, Y., Maceyka, M., Spiegel, S., Chun, J. (2014) Lysophospholipid receptor nomenclature review: IUPHAR Review 8. *Br J Pharmacol* 171: 3575-3594
93. Tokumura, A., Sinomiya, J., Kishimoto, S., Tanaka, T., Kogure, K., Sugiura, T., Satouchi, K., Waku, K., Fukuzawa, K. (2002) Human platelets respond differentially to lysophosphatidic acids having a highly unsaturated fatty acyl group and alkyl ether-linked lysophosphatidic acids. *Biochem J* 365: 617-628
94. Contos, J. J. A., Ishii, I., Fukushima, N., Kingsbury, M. A., Ye, X., Kawamura, S., Brown, J. H., Chun, J. (2002) Characterization of lpa2 (Edg4) and lpa1/lpa2 (Edg2/Edg4) Lysophosphatidic Acid Receptor Knockout Mice: Signaling Deficits without Obvious Phenotypic Abnormality Attributable to lpa2. *Mol Cell Biol* 22: 6921-6929

95. Noguchi, K., Ishii, S., Shimizu, T. (2003) Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J Biol Chem* 278: 25600-25606
96. Lee, C. W., Rivera, R., Gardell, S., Dubin, A. E., Chun, J. (2006) GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. *J Biol Chem* 281: 23589-23597
97. Yanagida, K., Masago, K., Nakanishi, H., Kihara, Y., Hamano, F., Tajima, Y., Taguchi, R., Shimizu, T., Ishii, S. (2009) Identification and Characterization of a Novel Lysophosphatidic Acid Receptor, p2y5/LPA6*. *J Biol Chem* 284: 17731-17741
98. McIntyre, T. M., Pontsler, A. V., Silva, A. R., St Hilaire, A., Xu, Y., Hinshaw, J. C., Zimmerman, G. A., Hama, K., Aoki, J., Arai, H., Prestwich, G. D. (2003) Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 131-136
99. Stoddard, N. C., Chun, J. (2015) Promising Pharmacological Directions in the World of Lysophosphatidic Acid Signaling. *Biomol Ther (Seoul)* 23: 1-11
100. Contos, J. J., Fukushima, N., Weiner, J. A., Kaushal, D., Chun, J. (2000) Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13384-13389
101. Yung, Y. C., Stoddard, N. C., Mirendil, H., Chun, J. (2015) Lysophosphatidic Acid signaling in the nervous system. *Neuron* 85: 669-682
102. Bandoh, K., Aoki, J., Taira, A., Tsujimoto, M., Arai, H., Inoue, K. (2000) Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species - Structure-activity relationship of cloned LPA receptors. *Febs Letters* 478: 159-165
103. Lai, Y. J., Chen, C. S., Lin, W. C., Lin, F. T. (2005) c-Src-mediated phosphorylation of TRIP6 regulates its function in lysophosphatidic acid-induced cell migration. *Mol Cell Biol* 25: 5859-5868
104. Lai, Y. J., Lin, W. C., Lin, F. T. (2007) PTPL1/FAP-1 negatively regulates TRIP6 function in lysophosphatidic acid-induced cell migration. *J Biol Chem* 282: 24381-24387
105. Panchatcharam, M., Miriyala, S., Yang, F., Rojas, M., End, C., Vallant, C., Dong, A., Lynch, K., Chun, J., Morris, A. J., Smyth, S. S. (2008) Lysophosphatidic acid receptors 1 and 2 play roles in regulation of vascular injury responses but not blood pressure. *Circ Res* 103: 662-670
106. Hama, K., Aoki, J. (2010) LPA3, a unique G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *Prog Lipid Res* 49: 335-342

107. Sordelli, M. S., Beltrame, J. S., Zotta, E., Gomez, N., Dmytrenko, G., Sales, M. E., Blois, S. M., Davio, C., Martinez, S. P., Franchi, A. M., Ribeiro, M. L. (2017) Endogenous lysophosphatidic acid participates in vascularisation and decidualisation at the maternal/fetal interface in the rat. *Reprod Fertil Dev*
108. Yanagida, K., Kurikawa, Y., Shimizu, T., Ishii, S. (2013) Current progress in non-Edg family LPA receptor research. *Biochim Biophys Acta* 1831: 33-41
109. Liu, Y. B., Kharode, Y., Bodine, P. V., Yaworsky, P. J., Robinson, J. A., Billiard, J. (2010) LPA induces osteoblast differentiation through interplay of two receptors: LPA1 and LPA4. *J Cell Biochem* 109: 794-800
110. Lee, S. C., Fujiwara, Y., Tigyi, G. J. (2015) Uncovering unique roles of LPA receptors in the tumor microenvironment. *Receptors Clin Investig* 2
111. Taniguchi, R., Inoue, A., Sayama, M., Uwamizu, A., Yamashita, K., Hirata, K., Yoshida, M., Tanaka, Y., Kato, H. E., Nakada-Nakura, Y., Otani, Y., Nishizawa, T., Doi, T., Ohwada, T., Ishitani, R., Aoki, J., Nureki, O. (2017) Structural insights into ligand recognition by the lysophosphatidic acid receptor LPA6. *Nature* 548: 356-360
112. Inoue, A., Arima, N., Ishiguro, J., Prestwich, G. D., Arai, H., Aoki, J. (2011) LPA-producing enzyme PA-PLA(1)alpha regulates hair follicle development by modulating EGFR signalling. *EMBO J* 30: 4248-4260
113. Yanagida, K., Ishii, S. (2011) Non-Edg family LPA receptors: the cutting edge of LPA research. *J Biochem* 150: 223-232
114. Hata, E., Sasaki, N., Takeda, A., Tohya, K., Umemoto, E., Akahoshi, N., Ishii, S., Bando, K., Abe, T., Kano, K., Aoki, J., Hayasaka, H., Miyasaka, M. (2016) Lysophosphatidic acid receptors LPA(4) and LPA(6) differentially promote lymphocyte transmigration across high endothelial venules in lymph nodes. *Int Immunol* 28: 283-292
115. Tsukahara, T. (2013) PPAR γ ; Networks in Cell Signaling: Update and Impact of Cyclic Phosphatidic Acid. *Journal of Lipids* 2013: 246597
116. Tsukahara, T., Tsukahara, R., Yasuda, S., Makarova, N., Valentine, W. J., Allison, P., Yuan, H., Baker, D. L., Li, Z., Bittman, R., Parrill, A., Tigyi, G. (2006) Different residues mediate recognition of 1-O-oleyllysophosphatidic acid and rosiglitazone in the ligand binding domain of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 281: 3398-3407
117. Tsukahara, T., Tsukahara, R., Fujiwara, Y., Yue, J., Cheng, Y., Guo, H., Bolen, A., Zhang, C., Balazs, L., Re, F., Du, G., Frohman, M. A., Baker, D. L., Parrill, A. L., Uchiyama, A., Kobayashi, T., Murakami-Murofushi, K., Tigyi, G. (2010) Phospholipase D2-dependent inhibition of the nuclear hormone receptor PPARgamma by cyclic phosphatidic acid. *Mol Cell* 39: 421-432

118. Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M., Evans, R. M. (2013) PPAR[gamma] signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* 99: 557-566
119. Schober, A., Siess, W. (2012) Lysophosphatidic acid in atherosclerotic diseases. *Br J Pharmacol* 167: 465-482
120. Linton, M. F., Yancey, P. G., Davies, S. S., Jerome, W. G. J., Linton, E. F., Vickers, K. C. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis [Updated 2015 Dec 24]. In: De Groot, L. J., Chrousos, G., Dungan, K., Feingold, K. R., Grossman, A., Hershman, J. M., Koch, C., Korbonits, M., McLachlan, R., New, M., Purnell, J., Rebar, R., Singer, F., and Vinik, A. (szerk.) *Endotext* [Internet], MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA), 2000-:
121. Sonoki, K., Iwase, M., Sasaki, N., Ohdo, S., Higuchi, S., Takata, Y., Iida, M. (2008) Secretory PLA(2) inhibitor indoxam suppresses LDL modification and associated inflammatory responses in TNF α -stimulated human endothelial cells. *Br J Pharmacol* 153: 1399-1408
122. Parthasarathy, S., Raghavamenon, A., Garelnabi, M. O., Santanam, N. (2010) Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Methods Mol Biol* 610: 403-417
123. McIntyre, T. M., Prescott, S. M., Stafforini, D. M. (2009) The emerging roles of PAF acetylhydrolase. *J Lipid Res* 50: S255-259
124. Steinbrecher, U. P., Parthasarathy, S., Leake, D. S., Witztum, J. L., Steinberg, D. (1984) Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 3883-3887
125. Goncalves, I., Edsfeldt, A., Ko, N. Y., Grufman, H., Berg, K., Bjorkbacka, H., Nitulescu, M., Persson, A., Nilsson, M., Prehn, C., Adamski, J., Nilsson, J. (2012) Evidence supporting a key role of Lp-PLA2-generated lysophosphatidylcholine in human atherosclerotic plaque inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 1505-1512
126. Zakiev, E. R., Sukhorukov, V. N., Melnichenko, A. A., Sobenin, I. A., Ivanova, E. A., Orekhov, A. N. (2016) Lipid composition of circulating multiple-modified low density lipoprotein. *Lipids Health Dis* 15: 134
127. Ruisanchez, É., Dancs, P., Kerék, M., Németh, T., Faragó, B., Balogh, A., Patil, R., Jennings, B. L., Liliom, K., Malik, K. U., Smrcka, A. V., Tigyi, G., Benyó, Z. (2014) Lysophosphatidic acid induces vasodilation mediated by LPA1 receptors, phospholipase C, and endothelial nitric oxide synthase. *FASEB J* 28: 880-890
128. Bai, Z., Cai, L., Umemoto, E., Takeda, A., Tohya, K., Komai, Y., Veeraveedu, P. T., Hata, E., Sugiura, Y., Kubo, A., Suematsu, M., Hayasaka, H., Okudaira, S., Aoki, J., Tanaka, T., Albers, H. M., Ovaa, H., Miyasaka, M. (2013)

Constitutive lymphocyte transmigration across the basal lamina of high endothelial venules is regulated by the autotaxin/lysophosphatidic acid axis. *J Immunol* 190: 2036-2048

129. Zhou, Z., Subramanian, P., Sevilimis, G., Globke, B., Soehnlein, O., Karshovska, E., Megens, R., Heyll, K., Chun, J., Saulnier-Blache, J. S., Reinholz, M., van Zandvoort, M., Weber, C., Schober, A. (2011) Lipoprotein-derived lysophosphatidic acid promotes atherosclerosis by releasing CXCL1 from the endothelium. *Cell Metab* 13: 592-600
130. Smyth, S. S., Mueller, P., Yang, F., Brandon, J. A., Morris, A. J. (2014) Arguing the case for the autotaxin-lysophosphatidic acid-lipid phosphate phosphatase 3-signaling nexus in the development and complications of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34: 479-486
131. Kanda, H., Newton, R., Klein, R., Morita, Y., Gunn, M. D., Rosen, S. D. (2008) Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs. *Nat Immunol* 9: 415-423
132. Ptaszynska, M. M., Pendrak, M. L., Stracke, M. L., Roberts, D. D. (2010) Autotaxin signaling via lysophosphatidic acid receptors contributes to vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration. *Mol Cancer Res* 8: 309-321
133. Smyth, S. S., Cheng, H. Y., Miriyala, S., Panchatcharam, M., Morris, A. J. (2008) Roles of lysophosphatidic acid in cardiovascular physiology and disease. *Biochim Biophys Acta* 1781: 563-570
134. Yukiura, H., Kano, K., Kise, R., Inoue, A., Aoki, J. (2015) LPP3 localizes LPA6 signalling to non-contact sites in endothelial cells. *J Cell Sci* 128: 3871-3877
135. Panchatcharam, M., Salous, A. K., Brandon, J., Miriyala, S., Wheeler, J., Patil, P., Sunkara, M., Morris, A. J., Escalante-Alcalde, D., Smyth, S. S. (2014) Mice With Targeted Inactivation of Ppap2b in Endothelial and Hematopoietic Cells Display Enhanced Vascular Inflammation and Permeability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34: 837-845
136. Wu, C., Huang, R. T., Kuo, C. H., Kumar, S., Kim, C. W., Lin, Y. C., Chen, Y. J., Birukova, A., Birukov, K. G., Dulin, N. O., Civelek, M., Lusic, A. J., Loyer, X., Tedgui, A., Dai, G., Jo, H., Fang, Y. (2015) Mechano-Sensitive PPAP2B Regulates Endothelial Responses to Athero-Relevant Hemodynamic Forces. *Circ Res* 117: e41-53
137. Panchatcharam, M., Miriyala, S., Salous, A., Wheeler, J., Dong, A., Mueller, P., Sunkara, M., Escalante-Alcalde, D., Morris, A. J., Smyth, S. S. (2013) Lipid phosphate phosphatase 3 negatively regulates smooth muscle cell phenotypic modulation to limit intimal hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 52-59

138. Reschen, M. E., Gaulton, K. J., Lin, D., Soilleux, E. J., Morris, A. J., Smyth, S. S., O'Callaghan, C. A. (2015) Lipid-Induced Epigenomic Changes in Human Macrophages Identify a Coronary Artery Disease-Associated Variant that Regulates PPAP2B Expression through Altered C/EBP-Beta Binding. *PLoS Genet* 11
139. Bouïs, D., Hospers, G. A. P., Meijer, C., Molema, G., Mulder, N. H. (2001) Endothelium in vitro: A review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* 4: 91-102
140. Schumacher, K. A., Classen, H. G., Spath, M. (1979) Platelet aggregation evoked in vitro and in vivo by phosphatidic acids and lysoderivatives: identity with substances in aged serum (DAS). *Thromb Haemost* 42: 631-640
141. Cui, M. Z. (2011) Lysophosphatidic acid effects on atherosclerosis and thrombosis. *Clin Lipidol* 6: 413-426
142. Rizza, C., Leitinger, N., Yue, J., Fischer, D. J., Wang, D. A., Shih, P. T., Lee, H., Tigyi, G., Berliner, J. A. (1999) Lysophosphatidic acid as a regulator of endothelial/leukocyte interaction. *Lab Invest* 79: 1227-1235
143. Palmetshofer, A., Robson, S. C., Nehls, V. (1999) Lysophosphatidic acid activates nuclear factor kappa B and induces proinflammatory gene expression in endothelial cells. *Thromb Haemost* 82: 1532-1537
144. Lee, H., Lin, C. I., Liao, J. J., Lee, Y. W., Yang, H. Y., Lee, C. Y., Hsu, H. Y., Wu, H. L. (2004) Lysophospholipids increase ICAM-1 expression in HUVEC through a Gi- and NF-kappaB-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C1657-1666
145. Lin, C. I., Chen, C. N., Chen, J. H., Lee, H. (2006) Lysophospholipids increase IL-8 and MCP-1 expressions in human umbilical cord vein endothelial cells through an IL-1-dependent mechanism. *J Cell Biochem* 99: 1216-1232
146. Gustin, C., Delaive, E., Dieu, M., Calay, D., Raes, M. (2008) Upregulation of pentraxin-3 in human endothelial cells after lysophosphatidic acid exposure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 491-497
147. van Nieuw Amerongen, G. P., Vermeer, M. A., van Hinsbergh, V. W. (2000) Role of RhoA and Rho kinase in lysophosphatidic acid-induced endothelial barrier dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: E127-133
148. Schulze, C., Smales, C., Rubin, L. L., Staddon, J. M. (1997) Lysophosphatidic acid increases tight junction permeability in cultured brain endothelial cells. *J Neurochem* 68: 991-1000
149. Sarker, M. H., Hu, D. E., Fraser, P. A. (2010) Regulation of cerebromicrovascular permeability by lysophosphatidic acid. *Microcirculation* 17: 39-46

150. Alexander, J. S., Patton, W. F., Christman, B. W., Cuiper, L. L., Haselton, F. R. (1998) Platelet-derived lysophosphatidic acid decreases endothelial permeability in vitro. *Am J Physiol* 274: H115-122
151. English, D., Kovala, A. T., Welch, Z., Harvey, K. A., Siddiqui, R. A., Brindley, D. N., Garcia, J. G. (1999) Induction of endothelial cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate and stabilization of endothelial monolayer barrier function by lysophosphatidic acid, potential mediators of hematopoietic angiogenesis. *J Hematother Stem Cell Res* 8: 627-634
152. Lee, H., Goetzl, E. J., An, S. (2000) Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C612-618
153. Panetti, T. S., Nowlen, J., Mosher, D. F. (2000) Sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid stimulate endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1013-1019
154. Garrido, J. M., Esteban, M., Roda, O., Alaminos, M., Sanchez-Montesinos, I. (2012) Lysophosphatidic acid pretreatment prevents micromolar atorvastatin-induced endothelial cell death and ensures the beneficial effects of high-concentration statin therapy on endothelial gene expression. *Ann Vasc Surg* 26: 549-558
155. Brault, S., Gobeil, F., Jr., Fortier, A., Honore, J. C., Joyal, J. S., Sapienza, P. S., Kooli, A., Martin, E., Hardy, P., Ribeiro-da-Silva, A., Peri, K., Lachapelle, P., Varma, D., Chemtob, S. (2007) Lysophosphatidic acid induces endothelial cell death by modulating the redox environment. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1174-1183
156. Chen, C., Ochoa, L. N., Kagan, A., Chai, H., Liang, Z., Lin, P. H., Yao, Q. (2012) Lysophosphatidic acid causes endothelial dysfunction in porcine coronary arteries and human coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis* 222: 74-83
157. Montagnani, M., Chen, H., Barr, V. A., Quon, M. J. (2001) Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem* 276: 30392-30398
158. Kou, R., Igarashi, J., Michel, T. (2002) Lysophosphatidic acid and receptor-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase. *Biochemistry* 41: 4982-4988
159. Chen, H., Montagnani, M., Funahashi, T., Shimomura, I., Quon, M. J. (2003) Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 278: 45021-45026
160. Hayashi, K., Takahashi, M., Nishida, W., Yoshida, K., Ohkawa, Y., Kitabatake, A., Aoki, J., Arai, H., Sobue, K. (2001) Phenotypic modulation of vascular

- smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids. *Circ Res* 89: 251-258
161. Kaneyuki, U., Ueda, S., Yamagishi, S. I., Kato, S., Fujimura, T., Shibata, R., Hayashida, A., Yoshimura, J., Kojiro, M., Oshima, K., Okuda, S. (2007) Pitavastatin inhibits lysophosphatidic acid-induced proliferation and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic smooth muscle cells by suppressing Rac-1-mediated reactive oxygen species generation. *Vascul Pharmacol* 46: 286-292
 162. Hao, F., Tan, M. Q., Wu, D. D., Xu, X. M., Cui, M. Z. (2010) LPA induces IL-6 secretion from aortic smooth muscle cells via an LPA(1)-regulated, PKC-dependent, and p38 alpha-mediated pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H974-H983
 163. Tokumura, A., Iimori, M., Nishioka, Y., Kitahara, M., Sakashita, M., Tanaka, S. (1994) Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta. *Am J Physiol* 267: C204-210
 164. Damirin, A., Tomura, H., Komachi, M., Liu, J. P., Mogi, C., Tobo, M., Wang, J. Q., Kimura, T., Kuwabara, A., Yamazaki, Y., Ohta, H., Im, D. S., Sato, K., Okajima, F. (2007) Role of lipoprotein-associated lysophospholipids in migratory activity of coronary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2513-2522
 165. Cui, M. Z., Zhao, G., Winokur, A. L., Laag, E., Bydash, J. R., Penn, M. S., Chisolm, G. M., Xu, X. (2003) Lysophosphatidic acid induction of tissue factor expression in aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 224-230
 166. Staiculescu, M. C., Ramirez-Perez, F. I., Castorena-Gonzalez, J. A., Hong, Z., Sun, Z., Meininger, G. A., Martinez-Lemus, L. A. (2014) Lysophosphatidic acid induces integrin activation in vascular smooth muscle and alters arteriolar myogenic vasoconstriction. *Front Physiol* 5: 413
 167. Ainslie, K., Shi, Z. D., Garanich, J. S., Tarbell, J. M. (2004) Rat aortic smooth muscle cells contract in response to serum and its components in a calcium independent manner. *Ann Biomed Eng* 32: 1667-1675
 168. Gustin, C., Van Steenbrugge, M., Raes, M. (2008) LPA modulates monocyte migration directly and via LPA-stimulated endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C905-C914
 169. Chang, C. L., Lin, M. E., Hsu, H. Y., Yao, C. L., Hwang, S. M., Pan, C. Y., Hsu, C. Y., Lee, H. (2008) Lysophosphatidic acid-induced interleukin-1 beta expression is mediated through Gi/Rho and the generation of reactive oxygen species in macrophages. *J Biomed Sci* 15: 357-363

170. Fueller, M., Wang, D. A., Tigyi, G., Siess, W. (2003) Activation of human monocytic cells by lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Cell Signal* 15: 367-375
171. Chang, C. L., Hsu, H. Y., Lin, H. Y., Chiang, W., Lee, H. (2008) Lysophosphatidic acid-induced oxidized low-density lipoprotein uptake is class A scavenger receptor-dependent in macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 87: 20-25
172. Koh, J. S., Lieberthal, W., Heydrick, S., Levine, J. S. (1998) Lysophosphatidic acid is a major serum noncytokine survival factor for murine macrophages which acts via the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *J Clin Invest* 102: 716-727
173. Xu, Y., Casey, G., Mills, G. B. (1995) Effect of lysophospholipids on signaling in the human Jurkat T cell line. *J Cell Physiol* 163: 441-450
174. Rubinfeld, J., Guo, J., Sookrung, N., Chen, R., Chaicumpa, W., Casolaro, V., Zhao, Y., Natarajan, V., Georas, S. (2006) Lysophosphatidic acid enhances interleukin-13 gene expression and promoter activity in T cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L66-74
175. Goetzl, E. J., Kong, Y., Mei, B. (1999) Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate protection of T cells from apoptosis in association with suppression of Bax. *J Immunol* 162: 2049-2056
176. Pamuklar, Z., Lee, J. S., Cheng, H. Y., Panchatcharam, M., Steinhubl, S., Morris, A. J., Charnigo, R., Smyth, S. S. (2008) Individual heterogeneity in platelet response to lysophosphatidic acid: evidence for a novel inhibitory pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 555-561
177. Khandoga, A. L., Fujiwara, Y., Goyal, P., Pandey, D., Tsukahara, R., Bolen, A., Guo, H., Wilke, N., Liu, J., Valentine, W. J., Durgam, G. G., Miller, D. D., Jiang, G., Prestwich, G. D., Tigyi, G., Siess, W. (2008) Lysophosphatidic acid-induced platelet shape change revealed through LPA(1-5) receptor-selective probes and albumin. *Platelets* 19: 415-427
178. Ye, X., Skinner, M. K., Kennedy, G., Chun, J. (2008) Age-dependent loss of sperm production in mice via impaired lysophosphatidic acid signaling. *Biol Reprod* 79: 328-336
179. Sumida, H., Noguchi, K., Kihara, Y., Abe, M., Yanagida, K., Hamano, F., Sato, S., Tamaki, K., Morishita, Y., Kano, M. R., Iwata, C., Miyazono, K., Sakimura, K., Shimizu, T., Ishii, S. (2010) LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood* 116: 5060-5070
180. Lee, Z., Cheng, C. T., Zhang, H., Subler, M. A., Wu, J., Mukherjee, A., Windle, J. J., Chen, C. K., Fang, X. (2008) Role of LPA4/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility. *Mol Biol Cell* 19: 5435-5445

181. Yukiura, H., Hama, K., Nakanaga, K., Tanaka, M., Asaoka, Y., Okudaira, S., Arima, N., Inoue, A., Hashimoto, T., Arai, H., Kawahara, A., Nishina, H., Aoki, J. (2011) Autotaxin regulates vascular development via multiple lysophosphatidic acid (LPA) receptors in zebrafish. *J Biol Chem* 286: 43972-43983
182. Offermanns, S., Mancino, V., Revel, J. P., Simon, M. I. (1997) Vascular system defects and impaired cell chemokinesis as a result of Galpha13 deficiency. *Science* 275: 533-536
183. Yukiura, H., Kano, K., Kise, R., Inoue, A., Aoki, J. (2015) Autotaxin overexpression causes embryonic lethality and vascular defects. *PLoS One* 10: e0126734
184. Escalante-Alcalde, D., Hernandez, L., Le Stunff, H., Maeda, R., Lee, H. S., Jr Gang, C., Sciorra, V. A., Daar, I., Spiegel, S., Morris, A. J., Stewart, C. L. (2003) The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development* 130: 4623-4637
185. Avraamides, C., Bromberg, M. E., Gaughan, J. P., Thomas, S. M., Tsygankov, A. Y., Panetti, T. S. (2007) Hic-5 promotes endothelial cell migration to lysophosphatidic acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H193-203
186. Wu, W. T., Chen, C. N., Lin, C. I., Chen, J. H., Lee, H. (2005) Lysophospholipids enhance matrix metalloproteinase-2 expression in human endothelial cells. *Endocrinology* 146: 3387-3400
187. Rivera-Lopez, C. M., Tucker, A. L., Lynch, K. R. (2008) Lysophosphatidic acid (LPA) and angiogenesis. *Angiogenesis* 11: 301-310
188. Chen, S. U., Lee, H., Chang, D. Y., Chou, C. H., Chang, C. Y., Chao, K. H., Lin, C. W., Yang, Y. S. (2008) Lysophosphatidic acid mediates interleukin-8 expression in human endometrial stromal cells through its receptor and nuclear factor-kappaB-dependent pathway: a possible role in angiogenesis of endometrium and placenta. *Endocrinology* 149: 5888-5896
189. Tokumura, A., Miyake, M., Nishioka, Y., Yamano, S., Aono, T., Fukuzawa, K. (1999) Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of In vitro fertilization patients. *Biol Reprod* 61: 195-199
190. Chen, S. U., Chou, C. H., Lee, H., Ho, C. H., Lin, C. W., Yang, Y. S. (2008) Lysophosphatidic acid up-regulates expression of interleukin-8 and -6 in granulosa-lutein cells through its receptors and nuclear factor-kappaB dependent pathways: implications for angiogenesis of corpus luteum and ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 935-943
191. Fang, X., Schummer, M., Mao, M., Yu, S., Tabassam, F. H., Swaby, R., Hasegawa, Y., Tanyi, J. L., LaPushin, R., Eder, A., Jaffe, R., Erickson, J., Mills,

- G. B. (2002) Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer. *Biochim Biophys Acta* 1582: 257-264
192. Jeon, E. S., Heo, S. C., Lee, I. H., Choi, Y. J., Park, J. H., Choi, K. U., Park, D. Y., Suh, D. S., Yoon, M. S., Kim, J. H. (2010) Ovarian cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates secretion of VEGF and stromal cell-derived factor-1 alpha from human mesenchymal stem cells. *Exp Mol Med* 42: 280-293
193. Song, Y., Wu, J., Oyesanya, R. A., Lee, Z., Mukherjee, A., Fang, X. (2009) Sp-1 and c-Myc mediate lysophosphatidic acid-induced expression of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer cells via a hypoxia-inducible factor-1-independent mechanism. *Clin Cancer Res* 15: 492-501
194. Park, S. Y., Jeong, K. J., Lee, J., Yoon, D. S., Choi, W. S., Kim, Y. K., Han, J. W., Kim, Y. M., Kim, B. K., Lee, H. Y. (2007) Hypoxia enhances LPA-induced HIF-1alpha and VEGF expression: their inhibition by resveratrol. *Cancer Lett* 258: 63-69
195. Ptaszynska, M. M., Pendrak, M. L., Bandle, R. W., Stracke, M. L., Roberts, D. D. (2008) Positive feedback between vascular endothelial growth factor-A and autotaxin in ovarian cancer cells. *Mol Cancer Res* 6: 352-363
196. Chen, R.-J., Chou, C.-H., Chen, S.-U., Lee, H. (2015) Angiogenic effect of lysophosphatidic acid receptors on cervical cancer cells. *Translational Cancer Research* 4: 500-526
197. Subramanian, P., Karshovska, E., Reinhard, P., Megens, R. T. A., Zhou, Z., Akhtar, S., Schumann, U., Li, X. F., van Zandvoort, M., Ludin, C., Weber, C., Schober, A. (2010) Lysophosphatidic Acid Receptors LPA1 and LPA3 Promote CXCL12-Mediated Smooth Muscle Progenitor Cell Recruitment in Neointima Formation. *Circ Res* 107: 96-U197
198. Yoshida, K., Nishida, W., Hayashi, K., Ohkawa, Y., Ogawa, A., Aoki, J., Arai, H., Sobue, K. (2003) Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acid in vivo. *Circulation* 108: 1746-1752
199. Cheng, Y., Makarova, N., Tsukahara, R., Guo, H., Shuyu, E., Farrar, P., Balazs, L., Zhang, C., Tigyi, G. (2009) Lysophosphatidic acid-induced arterial wall remodeling: requirement of PPARgamma but not LPA1 or LPA2 GPCR. *Cell Signal* 21: 1874-1884
200. Rother, E., Brandl, R., Baker, D. L., Goyal, P., Gebhard, H., Tigyi, G., Siess, W. (2003) Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation* 108: 741-747
201. Bot, M., de Jager, S. C. A., MacAleese, L., Lagraauw, H. M., van Berkel, T. J. C., Quax, P. H. A., Kuiper, J., Heeren, R. M. A., Biessen, E. A. L., Bot, I. (2013)

- Lysophosphatidic acid triggers mast cell-driven atherosclerotic plaque destabilization by increasing vascular inflammation. *J Lipid Res* 54: 1265-1274
202. Kritikou, E., van Puijvelde, G. H. M., van der Heijden, T., van Santbrink, P. J., Swart, M., Schaftenaar, F. H., Kröner, M. J., Kuiper, J., Bot, I. (2016) Inhibition of lysophosphatidic acid receptors 1 and 3 attenuates atherosclerosis development in LDL-receptor deficient mice. *Sci Rep* 6: 37585
 203. Dohi, T., Miyauchi, K., Ohkawa, R., Nakamura, K., Kurano, M., Kishimoto, T., Yanagisawa, N., Ogita, M., Miyazaki, T., Nishino, A., Yaginuma, K., Tamura, H., Kojima, T., Yokoyama, K., Kurata, T., Shimada, K., Daida, H., Yatomi, Y. (2013) Increased lysophosphatidic acid levels in culprit coronary arteries of patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis* 229: 192-197
 204. Secomb, T. W. (2008) Theoretical models for regulation of blood flow. *Microcirculation* 15: 765-775
 205. Furchgott, R. F., Zawadzki, J. V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376
 206. Furchgott, R. F., Cherry, P. D., Zawadzki, J. V., Jothianandan, D. (1984) Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 6 Suppl 2: S336-343
 207. Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Wood, K. S. Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical. In: Vanhoutte, P. M. (szerk.) *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves, and Endothelium.*, Raven Press, New York, NY, 1988: 427-436
 208. Palmer, R. M., Ferrige, A. G., Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526
 209. Mellion, B. T., Ignarro, L. J., Ohlstein, E. H., Pontecorvo, E. G., Hyman, A. L., Kadowitz, P. J. (1981) Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* 57: 946-955
 210. McIntyre, M., Dominiczak, A. F. (1997) Nitric oxide and cardiovascular disease. *Postgrad Med J* 73: 630-634
 211. Dudzinski, D., Michel, T. (2007) Life History of eNOS: Partners and Pathways. *Cardiovasc Res* 75: 247-260
 212. Tokumura, A., Maruyama, T., Fukuzawa, K., Tsukatani, H. (1985) Effects of lysophosphatidic acids and their structural analogs on arterial blood pressure of cats. *Arzneimittelforschung* 35: 287-292

213. Heise, C. E., Santos, W. L., Schreihofner, A. M., Heasley, B. H., Mukhin, Y. V., Macdonald, T. L., Lynch, K. R. (2001) Activity of 2-substituted lysophosphatidic acid (LPA) analogs at LPA receptors: discovery of a LPA1/LPA3 receptor antagonist. *Mol Pharmacol* 60: 1173-1180
214. Okusa, M. D., Ye, H., Huang, L., Sigismund, L., Macdonald, T., Lynch, K. R. (2003) Selective blockade of lysophosphatidic acid LPA3 receptors reduces murine renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F565-574
215. Saga, H., Ohhata, A., Hayashi, A., Katoh, M., Maeda, T., Mizuno, H., Takada, Y., Komichi, Y., Ota, H., Matsumura, N., Shibaya, M., Sugiyama, T., Nakade, S., Kishikawa, K. (2014) A Novel Highly Potent Autotaxin/ENPP2 Inhibitor Produces Prolonged Decreases in Plasma Lysophosphatidic Acid Formation In Vivo and Regulates Urethral Tension. *PLOS ONE* 9: e93230
216. Tokumura, A., Yotsumoto, T., Masuda, Y., Tanaka, S. (1995) Vasopressor effect of lysophosphatidic acid on spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 90: 96-102
217. Safaya, R., Chai, H., Kougiyas, P., Lin, P., Lumsden, A., Yao, Q., Chen, C. (2005) Effect of lysophosphatidylcholine on vasomotor functions of porcine coronary arteries. *J Surg Res* 126: 182-188
218. Rao, S. P., Riederer, M., Lechleitner, M., Hermansson, M., Desoye, G., Hallstrom, S., Graier, W. F., Frank, S. (2013) Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on endothelium-dependent vasorelaxation. *PLoS One* 8: e65155
219. Liaw, L., Schwartz, S. M. (1993) Comparison of gene expression in bovine aortic endothelium in vivo versus in vitro. Differences in growth regulatory molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 13: 985-993
220. Chappell, D., Jacob, M., Paul, O., Rehm, M., Welsch, U., Stoeckelhuber, M., Conzen, P., Becker, B. F. (2009) The glycocalyx of the human umbilical vein endothelial cell: an impressive structure ex vivo but not in culture. *Circ Res* 104: 1313-1317
221. Hahn, C., Schwartz, M. A. (2009) Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 53-62
222. Ohata, H., Tanaka, K. I., Maeyama, N., Ikeuchi, T., Kamada, A., Yamamoto, M., Momose, K. (2001) Physiological and pharmacological role of lysophosphatidic acid as modulator in mechanotransduction. *Jpn J Pharmacol* 87: 171-176
223. Ohata, H., Ikeuchi, T., Kamada, A., Yamamoto, M., Momose, K. (2001) Lysophosphatidic Acid Positively Regulates the Fluid Flow-Induced Local Ca²⁺ Influx in Bovine Aortic Endothelial Cells. *Circ Res* 88: 925-932

224. Ohata, H., Yamada, H., Momose, K. (2011) Lysophosphatidic acid induces shear stress-dependent Ca²⁺ influx in mouse aortic endothelial cells in situ. *Exp Physiol* 96: 468-475
225. Niioka, T., Ohata, H., Momose, K., Honda, K. (2013) Lysophosphatidic acid induces shear stress-dependent contraction in mouse aortic strip in situ. *J Cardiovasc Pharmacol* 62: 530-538
226. Shibata, K., Miyazaki, T., Ohata, H., Honda, K. (2011) Shear Stress-dependent Effects of Lysophosphatidic Acid on Agonist-induced Vasomotor Responses in Rat Mesenteric Artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 57: 604-610
227. Tokumura, A., Fukuzawa, K., Yamada, S., Tsukatani, H. (1980) Stimulatory effect of lysophosphatidic acids on uterine smooth muscles of non-pregnant rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 245: 74-83
228. Tokumura, A., Fukuzawa, K., Tsukatani, H. (1982) Contractile actions of lysophosphatidic acids with a chemically-defined fatty acyl group on longitudinal muscle from guinea-pig ileum. *J Pharm Pharmacol* 34: 514-516
229. Tigyi, G., Hong, L., Yakubu, M., Parfenova, H., Shibata, M., Leffler, C. W. (1995) Lysophosphatidic acid alters cerebrovascular reactivity in piglets. *Am J Physiol* 268: H2048-2055
230. Caner, H., Kwan, A. L., Bavbek, M., Kilinc, K., Durieux, M., Lee, K., Kassell, N. F. (2000) Systemic administration of mexiletine for attenuation of cerebral vasospasm following experimental subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)* 142: 455-461
231. Wang, H., Oestreich, E. A., Maekawa, N., Bullard, T. A., Vikstrom, K. L., Dirksen, R. T., Kelley, G. G., Blaxall, B. C., Smrcka, A. V. (2005) Phospholipase C epsilon modulates beta-adrenergic receptor-dependent cardiac contraction and inhibits cardiac hypertrophy. *Circ Res* 97: 1305-1313
232. Horvath, B., Orsy, P., Benyo, Z. (2005) Endothelial NOS-mediated relaxations of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse: a methodological study. *J Cardiovasc Pharmacol* 45: 225-231
233. Shimizu, H., Mori, O., Ohaki, Y., Kamoi, S., Kobayashi, S., Okada, S., Maeda, S., Naito, Z. (2005) Cytological interface of diffusely infiltrating astrocytoma and its marginal tissue. *Brain Tumor Pathol* 22: 59-74
234. Swaney, J. S., Chapman, C., Correa, L. D., Stebbins, K. J., Broadhead, A. R., Bain, G., Santini, A. M., Darlington, J., King, C. D., Baccei, C. S., Lee, C., Parr, T. A., Roppe, J. R., Seiders, T. J., Ziff, J., Prasit, P., Hutchinson, J. H., Evans, J. F., Lorrain, D. S. (2011) Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of an oral lysophosphatidic acid type 1 receptor-selective antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 336: 693-700

235. Muniyappa, R., Montagnani, M., Koh, K. K., Quon, M. J. (2007) Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev* 28: 463-491
236. Michel, T., Vanhoutte, P. M. (2010) Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch* 459: 807-816
237. Smrcka, A. V., Brown, J. H., Holz, G. G. (2012) Role of phospholipase Cepsilon in physiological phosphoinositide signaling networks. *Cell Signal* 24: 1333-1343
238. Xiang, S. Y., Dusaban, S. S., Brown, J. H. (2013) Lysophospholipid receptor activation of RhoA and lipid signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1831: 213-222
239. Santos, W. L., Heasley, B. H., Jarosz, R., Carter, K. M., Lynch, K. R., Macdonald, T. L. (2004) Synthesis and biological evaluation of phosphonic and thiophosphoric acid derivatives of lysophosphatidic acid. *Bioorg Med Chem Lett* 14: 3473-3476
240. Dancs, P. T., Ruisanchez, E., Balogh, A., Panta, C. R., Miklos, Z., Nusing, R. M., Aoki, J., Chun, J., Offermanns, S., Tigyi, G., Benyo, Z. (2017) LPA1 receptor-mediated thromboxane A2 release is responsible for lysophosphatidic acid-induced vascular smooth muscle contraction. *FASEB J* 31: 1547-1555
241. Lee, L., Kuo, Huang, Chen, Lee. (2006) The expression profiles of lysophospholipid receptors (LPLRs) in different endothelial cells. *Taiwania* 51(1): 11-24
242. Gupte, R., Patil, R., Liu, J., Wang, Y., Lee, S. C., Fujiwara, Y., Fells, J., Bolen, A. L., Emmons-Thompson, K., Yates, C. R., Siddam, A., Panupinthu, N., Pham, T. C., Baker, D. L., Parrill, A. L., Mills, G. B., Tigyi, G., Miller, D. D. (2011) Benzyl and naphthalene methylphosphonic acid inhibitors of autotaxin with anti-invasive and anti-metastatic activity. *ChemMedChem* 6: 922-935
243. Zhang, Y., Chen, Y. C., Krummel, M. F., Rosen, S. D. (2012) Autotaxin through lysophosphatidic acid stimulates polarization, motility, and transendothelial migration of naive T cells. *J Immunol* 189: 3914-3924
244. Kim, J., Keys, J. R., Eckhart, A. D. (2006) Vascular smooth muscle migration and proliferation in response to lysophosphatidic acid (LPA) is mediated by LPA receptors coupling to Gq. *Cell Signal* 18: 1695-1701
245. Zhou, Z. B., Niu, J. P., Zhang, Z. J. (2009) Receptor-mediated vascular smooth muscle migration induced by LPA involves p38 mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Int J Mol Sci* 10: 3194-3208
246. Rai, V., Touré, F., Chitayat, S., Pei, R., Song, F., Li, Q., Zhang, J., Rosario, R., Ramasamy, R., Chazin, W. J., Schmidt, A. M. (2012) Lysophosphatidic acid targets vascular and oncogenic pathways via RAGE signaling. *J Exp Med* 209: 2339-2350

247. Radeff-Huang, J., Seasholtz, T. M., Matteo, R. G., Brown, J. H. (2004) G protein mediated signaling pathways in lysophospholipid induced cell proliferation and survival. *J Cell Biochem* 92: 949-966
248. Choi, J. W., Chun, J. (2013) Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1831: 20-32
249. Kim, E. K., Yun, S. J., Do, K. H., Kim, M. S., Cho, M., Suh, D. S., Kim, C. D., Kim, J. H., Birnbaum, M. J., Bae, S. S. (2008) Lysophosphatidic acid induces cell migration through the selective activation of Akt1. *Exp Mol Med* 40: 445-452
250. Kelley, G. G., Reks, S. E., Smrcka, A. V. (2004) Hormonal regulation of phospholipase Cepsilon through distinct and overlapping pathways involving G12 and Ras family G-proteins. *Biochem J* 378: 129-139
251. Hains, M. D., Wing, M. R., Maddileti, S., Siderovski, D. P., Harden, T. K. (2006) G α 12/13- and rho-dependent activation of phospholipase C-epsilon by lysophosphatidic acid and thrombin receptors. *Mol Pharmacol* 69: 2068-2075
252. Kelley, G. G., Kaproth-Joslin, K. A., Reks, S. E., Smrcka, A. V., Wojcikiewicz, R. J. (2006) G-protein-coupled receptor agonists activate endogenous phospholipase Cepsilon and phospholipase Cbeta3 in a temporally distinct manner. *J Biol Chem* 281: 2639-2648
253. Citro, S., Malik, S., Oestreich, E. A., Radeff-Huang, J., Kelley, G. G., Smrcka, A. V., Brown, J. H. (2007) Phospholipase C epsilon is a nexus for Rho and Rap-mediated G protein-coupled receptor-induced astrocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15543-15548
254. Dusaban, S. S., Purcell, N. H., Rockenstein, E., Masliah, E., Cho, M. K., Smrcka, A. V., Brown, J. H. (2013) Phospholipase C epsilon links G protein-coupled receptor activation to inflammatory astrocytic responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 3609-3614
255. Fujiwara, Y., Sardar, V., Tokumura, A., Baker, D., Murakami-Murofushi, K., Parrill, A., Tigyi, G. (2005) Identification of residues responsible for ligand recognition and regioisomeric selectivity of lysophosphatidic acid receptors expressed in mammalian cells. *J Biol Chem* 280: 35038-35050
256. Tokumura, A., Yube, N., Fujimoto, H., Tsukatani, H. (1991) Lysophosphatidic acids induce contraction of rat isolated colon by two different mechanisms. *J Pharm Pharmacol* 43: 774-778

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények listája

Ruisanchez, E., Dancs, P., Kerek, M., Nemeth, T., Farago, B., Balogh, A., Patil, R., Jennings, B. L., Liliom, K., Malik, K. U., Smrcka, A. V., Tigyi, G., and Benyo, Z. (2014) Lysophosphatidic acid induces vasodilation mediated by LPA1 receptors, phospholipase C, and endothelial nitric oxide synthase. *FASEB J* 28: 880-890

Dancs, P. T., **Ruisanchez, E.**, Balogh, A., Panta, C. R., Miklos, Z., Nusing, R. M., Aoki, J., Chun, J., Offermanns, S., Tigyi, G., and Benyo, Z. (2017) LPA1 receptor-mediated thromboxane A2 release is responsible for lysophosphatidic acid-induced vascular smooth muscle contraction. *FASEB J* 31: 1547-1555

A disszertációtól független közlemények listája

Donko, A., **Ruisanchez, E.**, Orient, A., Enyedi, B., Kapui, R., Peterfi, Z., de Deken, X., Benyo, Z., and Geiszt, M. (2010) Urothelial cells produce hydrogen peroxide through the activation of Duox1. *Free Radic Biol Med* 49: 2040-2048

Ruisanchez, E., Cselenyak, A., Papp, R. S., Nemeth, T., Kaldi, K., Sandor, P., and Benyo, Z. (2012) Perivascular expression and potent vasoconstrictor effect of dynorphin A in cerebral arteries. *PLoS One* 7: e37798

Iring, A.*, **Ruisanchez, E.***, Leszl-Ishiguro, M.*, Horvath, B., Benko, R., Lacza, Z., Jarai, Z., Sandor, P., Di Marzo, V., Pacher, P., and Benyo, Z. (2013) Role of endocannabinoids and cannabinoid-1 receptors in cerebrocortical blood flow regulation. *PLoS One* 8: e53390

Masszi, G., Novak, A., Tarszabo, R., Horvath, E. M., Buday, A., **Ruisanchez, E.**, Tokes, A. M., Sara, L., Benko, R., Nadasy, G. L., Revesz, C., Hamar, P., Benyo, Z., and Varbiro, S. (2013) Effects of vitamin D3 derivative--calcitriol on pharmacological reactivity of aortic rings in a rodent PCOS model. *Pharmacol Rep* 65: 476-483

Szekeres, M., Nadasy, G. L., Turu, G., Soltesz-Katona, E., Benyo, Z., Offermanns, S., **Ruisanchez, E.**, Szabo, E., Takats, Z., Batkai, S., Toth, Z. E., and Hunyady, L. (2015) Endocannabinoid-mediated modulation of Gq/11 protein-coupled receptor signaling-induced vasoconstriction and hypertension. *Mol Cell Endocrinol* 403: 46-56

Benyo, Z., **Ruisanchez, E.**, Leszl-Ishiguro, M., Sandor, P., and Pacher, P. (2016) Endocannabinoids in cerebrovascular regulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 310: H785-801

Polycarpou, A., Hricisak, L., Iring, A., Safar, D., **Ruisanchez, E.**, Horvath, B., Sandor, P., and Benyo, Z. (2016) Adaptation of the cerebrocortical circulation to carotid artery occlusion involves blood flow redistribution between cortical regions and is independent of eNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 311: H972-H980

* megosztott első szerzős közlemény

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, dr. Benyó Zoltán Professzor Úrnak. Kb. 12 éve, véletlenül lettem a TDK hallgatója, de lelkesedése és támogatása meggyőzött arról, hogy érdemes a laborjában maradnom. Köszönöm, hogy minden, az évek során szembejövő akadály ellenére mindig volt ideje rám, türelme és humora segített átvészelni a legnehezebb időszakokat is. Köszönöm, hogy nem csak szakmailag, hanem emberileg is mindig számíthattam rá. Köszönöm első TDK témavezetőmnek, dr. Sándor Péter Professzor Úrnak, hogy kiváló élettan előadásaival megszerettette velem a keringési rendszer működését. Köszönöm dr. Tigyi Gábor Professzor Úrnak, hogy meghívott intézetébe elvégezni néhány igen fontos kísérletet, és hogy ezalatt befogadott otthonába, és minden elképzelhető módon segítette a kint tartózkodásomat. Ez utóbbiakért külön hálás vagyok feleségének, dr. Balázs Lujzának is. Köszönöm, hogy Tigyi Professzor Úr – aki a lizofoszfátidsav biológiájának egyik legkiemelkedőbb kutatója – megismertette munkacsoportunkat a szakterület legelismertebb kutatóival, és jótanácsaival segítette a munkánkat.

Köszönöm volt, és jelenlegi munkatársaimnak az együttműködését, hiszen a munkájuk nélkül biztosan nem jöhettek volna létre e dolgozat alapjául szolgáló közlemények. Kerék Margit kísérleti munkában nyújtott segítségével, precizitásáért, óriási teherbírásáért külön köszönettel tartozom. Köszönöm az LPA-s témában dolgozó egykori, és jelenlegi TDK hallgatóinknak, dr. Dancs Péternek, dr. Tölgyesi Judit Eszternek, dr. Szabó Gergely Balázsnak és Panta Ritának, hogy egyetemi szabad óráikat, napjaikat a kutatómunkának szentelték és a diákköri konferenciákon elért kiváló eredményeiknek témavezetőként is örülhettem. Köszönöm egykori kollégáimnak, dr. Németh Tamásnak és dr. Faragó Bernadettnek a segítségét a kísérleti munkában és a publikációírásban. Köszönöm Körmöci Józsefné Éva néninek az asszisztensi munkáját, Hricisák Lászlónak, Fülöp Ágnesnek és Sue Chin Leenek az egerekkel kapcsolatos munkáját, Balogh Andreának a molekuláris biológiai módszerekben, Kucsá Andrásnak pedig az illusztrációk elkészítésében való segítséget. Köszönöm Brett Jenningsnek és K. U. Malik Professzornak, hogy dolgozhattam a laborjukban. Köszönöm minden szerzőtársamnak a publikálásban való hozzájárulását.

Végül pedig köszönöm a családom bizalmát és támogatását. Köszönöm szüleimnek és nagyszüleimnek, hogy sosem kérdőjelezték meg a döntéseimet, és anyagilag is mindig segítettek tanulmányaimat. Köszönöm a férjemnek, dr. Szabó Gergelynek – akit egy élettani konferencián ismertem meg – hogy miután végzett a saját PhD tanulmányaival, türelmes volt az enyémmel is. Köszönöm neki, és a szüleinek, hogy a disszertáció írása alatt óriási részt vállaltak a gyermekeink neveléséből.