

**Untersuchungen zur Expression und Funktion
von Lysophospholipid-Rezeptoren an
Alveolarmakrophagen der Ratte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

vorgelegt von Ambra Miriam Marx
aus Bonn
2007

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Kurt Racké

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Uwe Jürgens

Tag der Mündlichen Prüfung: 04.04.2007

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor Prof. Dr. med. Alexander Pfeifer

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Druck: AV Copy, Inh. Bahman Tehrani, Münsterstr. 18, 53111 Bonn

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis	6
A. Einleitung.....	9
I. LYSOPHOSPHOLIPID-REZEPTOREN	9
1. Nomenklatur der LPL-Rezeptoren	10
2. Lokalisation der LPL-Rezeptoren	11
II. LPA-REZEPTOREN	12
1. Der LPA ₁ -Rezeptor.....	12
2. Der LPA ₂ -Rezeptor.....	14
3. Der LPA ₃ -Rezeptor.....	15
4. Synthese und Abbau von LPA	15
5. Biologische Funktion von LPA.....	17
III. S1P-REZEPTOREN	18
1. Der S1P ₁ -Rezeptor.....	18
2. Der S1P ₂ -Rezeptor.....	20
3. Der S1P ₃ -Rezeptor.....	21
4. Der S1P ₄ -Rezeptor.....	22
5. Der S1P ₅ -Rezeptor.....	23
6. Synthese und Abbau von S1P und SPC.....	23
6.1 S1P	23
6.2 SPC.....	25
7. Biologische Funktion von S1P und SPC	25
IV. Signaltransduktion durch LPL-Rezeptoren	27
V. ZIELSETZUNG.....	29
B. Material und Methoden	30
I. MATERIAL	30
1. Lösungen und Puffer	30
1.1 Allgemein	30
1.2 Lösungen für Calcium-Mikrofluorimetrie.....	31
1.3 Lösungen für RT-PCR.....	32
1.4 Lösungen für Protein-Präparation	34
1.5 Lösungen für SDS-PAGE und Western-Blot	36
1.6 Lösungen für ³ H-Thymidin-Assay.....	37
2. Chemikalien.....	38
3. Primer für die PCR	41
4. Arbeitsmaterialien & Arbeitsgeräte.....	42
II. METHODEN	43
1. Präparation und Kultur von Ratten-Alveolarmakrophagen	43
1.1 Primärzellen: Alveolarmakrophagen der Ratte (RAM)	43
1.2 Kultur der Zelllinie NR 8383	43
2. Präparation der RNA	44
3. RNA-Konzentrationsbestimmung	45
4. Reverse Transkription (RT-Reaktion)	45
5. PCR-Reaktion und anschließende Gelelektrophorese	46

5.1 Die Polymerasekettenreaktion	46
5.2 Herstellung eines Agarosegels	48
5.3 Gelelektrophorese	48
6. Proteinpräparation	49
7. Proteinbestimmung nach der Lowry-Methode	50
8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
9. Western-Blot	51
9.1 Das Prinzip des Western-Blots	51
9.2 Vorbereitungen	52
9.3 Durchführung des Western-Blots	52
9.4. Proteindetektion durch Antikörper	52
10. Proliferationsversuche (³ H-Thymidin-Inkorporations-Assay)	55
10.1 Vorbereitung des Proliferationsversuchs	55
10.2 Nicht-adhärenente Zellen	56
10.3 Adhärenente Zellen	56
10.4 Gemeinsame Weiterverarbeitung	57
11. Calcium-Mikrofluorimetrie	57
11.1 Das Prinzip der Mikrofluorimetrie	57
11.2 Vorbereitung des Versuchs	58
11.3 Versuchsaufbau	59
11.4 Versuchsdurchführung	59
12. Statistik und Kalkulation	60
C. Ergebnisse	61
I. FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN AN RATTEN-ALVEOLARMAKROPHAGEN	61
1. Messung der intrazellulären Calcium-Ströme mittels Calcium-Mikrofluorimetrie nach Stimulation mit LPA	61
2. Detektion der p44/42-ERK/MAP-Kinase aus LPL-stimulierten Alveolarmakrophagen mittels SDS-PAGE	66
2.1 Inkubation der Zellen mit LPA	66
2.2 Inkubation der Zellen mit LPS	67
2.3 Inkubation der Zellen mit S1P	70
2.4 Inkubation der Zellen mit S1P und PTX	71
2.5 Inkubation der Zellen mit SPC	73
II. UNTERSUCHUNGEN AN ZELLEN DER LINIE NR 8383	74
1. Bestimmung der proliferativen Aktivität der Alveolarmakrophagen nach Stimulation mit LPA und S1P in Versuchsmedien mit unterschiedlichem FKS-Gehalt mit dem ³ H-Thymidin-Inkorporations-Assay	74
1.1 Stimulation mit LPA und 7,5% FKS im Medium	74
1.2 Stimulation mit S1P und 7,5% FKS im Medium	75
1.3 Stimulation mit LPA ohne FKS und mit 15% FKS im Medium	76
2. Expressionsmuster der Lysophospholipid-Rezeptoren in NR 8383-Zellen	78
3. Wirkung von LPS und PMA auf die Expression von LPL-Rezeptoren in NR 8383-Zellen	81
D. Diskussion	86
I. METHODIK	86
II. FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN AN RATTEN-ALVEOLARMAKROPHAGEN	88
1. Auswirkungen von LPA auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration von primären Ratten-Alveolarmakrophagen	88
2. Auswirkungen von LPL und LPS auf die Aktivierung des ERK/MAP-Kinase-Pfades in primären Alveolarmakrophagen der Ratte	89
2.1 Inkubation der Zellen mit LPA	92
2.2 Inkubation der Zellen mit LPS	92
2.3 Inkubation der Zellen mit S1P und PTX	93
2.4 Inkubation der Zellen mit SPC	94
III. UNTERSUCHUNGEN AN ZELLEN DER LINIE NR 8383	95
1. Auswirkungen der LPL auf Proliferation und Überleben von Alveolarmakrophagen	95
1.1 Stimulation mit LPA und 7,5% FKS im Medium	96
1.2 Stimulation mit S1P und 7,5% FKS im Medium	96

1.3. Stimulation mit LPA ohne FKS und mit 15% FKS im Medium.....	97
2. Expressionsmuster der LPL-Rezeptoren in Alveolarmakrophagen der Zelllinie NR 8383	98
3. Wirkung von LPS und PMA auf die Expression von LPL-Rezeptoren in NR 8383-Zellen	100
IV. AUSBLICK	102
E. Zusammenfassung	103
F. Abbildungsverzeichnis	105
G. Literaturverzeichnis	107
H. Danksagungen	116
I. Curriculum Vitae.....	117

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylat Cyclase
ADP	Adenosindiphosphat
Ca ²⁺	Calciumion
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
CPM	Counts per Minute Zählimpulse pro Minute
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxy Ribonucleic Acid Desoxyribonucleinsäure
DPM	Disintegrations per Minute radioaktiver Zerfall pro Minute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor Epidermaler Wachstumsfaktor
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
FKS	Fetales Kälberserum
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GPCR	G protein-coupled receptor G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat

GTPase	Guanosintriphosphatase
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
HRP	Horse Reddish Peroxidase, Meerrettichperoxidase
IP ₃	Inositol 1,4,5 trisphosphat
IUPHAR	International Union of Pharmacology
JNK	Januskinase
l	Liter
kD	Kilodalton
KT	Kontrolle
LDL	Low Density Lipoprotein
LPA	Lysophosphatidic Acid Lysophosphatidsäure
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPL	Lysophospholipid
LPS	Lipopolysaccharid
MAP-Kinase	Mitogen Activated Protein Kinase Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAP-Kinase-Kinase
MAPKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
mCi	Millicurie
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	messenger RNA
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
NGF	Nerve Growth Factor Nervenwachstumsfaktor
NO	Nitric Oxide Stickstoffoxid
PBS	Phosphat Buffered Saline Phosphat gepufferte Salzlösung

PCR	Polymerase Chain Reaction Polymerasekettenreaktion
PhI	Phosphatase-Inhibitor
PI	Protease-Inhibitor
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTX	Pertussis Toxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAM	Primäre Ratten-Alveolarmakrophagen
RNA	Ribonucleic Acid Ribonucleinsäure
RT	Reverse Transkription
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standard Error of the Mean, Standardfehler des Mittelwerts
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SPC	Sphingosylphosphorylcholine
sPLase A2	sekretorische Phospholipase A2
SRE	Serum Response Elements serumresponsive Elemente
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline Tris gepufferte Salzlösung
TBST	Tris Buffered Saline plus Tween 20 Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20

A. Einleitung

I. Lysophospholipid-Rezeptoren

Lysophospholipide (LPL) gewannen als Botenstoffe in den letzten Jahren zunehmend an Aufmerksamkeit im Zusammenhang mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), an welche sie mit hoher Affinität binden. Besonders die beiden prominenten Vertreter Lysophosphatidsäure (LPA) und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) stellen sehr wichtige extrazelluläre Signalmoleküle dar, die in den verschiedensten Organismen pleiotrop wirken.

In höher entwickelten Eukaryoten werden die meisten der durch LPL hervorgerufenen Ereignisse durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt.

Die Komplexität und die evolutive Erhaltung der Signaltransduktionswege in verschiedenen Organismen lassen auf das biologische Alter dieser Mechanismen schließen. Sie sind Teil bedeutender physiologischer Prozesse wie embryonaler Reifung, Immunität, Angiogenese und neuronalem Überleben sowie pathophysiologischer Vorgänge wie Tumorgenese und Atherosklerose.

LPA erlangte 1978 aufgrund der Entdeckung seiner vasokonstriktiven Eigenschaften erstmals wissenschaftliche Beachtung (Tokamura et al., 1978). 1989 entdeckte man zusätzlich die positiven proliferativen Effekte auf Zellkulturen (van Corven et al., 1989). Auch S1P ist seit langem bekannt als Stimulator der Zellproliferation (Zhang et al., 1991).

LPL sind Metabolite aus der Biosynthese von Phospholipiden der Plasmamembranen. Sie haben eine Funktion als Signalmolekül, als welches sie in vielen verschiedenen Zelltypen ähnliche Antworten hervorrufen, und agieren als intrazelluläre Botenstoffe (*second messenger*) (Gerrard und Robinson, 1984, Fukami und Takenawa, 1992; McCrea et al., 1985; Spiegel und Milstien, 1995). LPA bedient sich dabei des biochemischen Mechanismus der Calcium-(Ca²⁺)-Bindung (Simon et al., 1984).

1. Nomenklatur der LPL-Rezeptoren

Die acht Rezeptoren, die nach Bindung eines LPL einen Effekt hervorrufen, wurden gemeinhin *Endothelial Differentiation Gene*, kurz EDG-Rezeptoren genannt. Hla und Maciag hatten diesen Namen 1990 gewählt, um ein Genprodukt der *immediate early response*, der frühesten Zellantwort auf einen externen Stimulus, geklont aus humanem Umbilicalvenenendothel, zu benennen. Der so genannte EDG-1-Rezeptor wurde identifiziert als ein G-Protein-Rezeptor der Rhodopsinfamilie (Hla und Maciag, 1990).

Bald darauf folgten weitere Rezeptoren, die in der Reihenfolge ihrer Entdeckung EDG-2, EDG-3, EDG-4, EDG-6, EDG-7 und EDG-8 genannt wurden. Den Titel EDG-5 erhielt der bis dahin als AGR16 oder H218 bekannt gewesene GPCR.

Seit 2002 werden die EDG-Rezeptoren nach ihren Liganden LPL-Rezeptoren genannt. Die vorliegende Arbeit folgt bezüglich der Nomenklatur den Empfehlungen der International Union Of Pharmacology (IUPHAR) (Chun et. al., 2002). Diese besagen, dass der Name eines Rezeptors gleichlautend mit seinem natürlichen Agonisten mit der höchsten Potenz sein muss, gefolgt von arabischer Durchnummerierung, wobei die Nummerierung die Chronologie der Entdeckung und Veröffentlichung darstellt.

Eine komplette Darstellung der Nomenklatur enthält die nachfolgende Tabelle.

Ligand	IUPHAR Nomenklatur	Rezeptorcode	EDG-Name
LPA	LPA ₁	2.1:LPL:2:LPA1	EDG-2
LPA	LPA ₂	2.1:LPL:4:LPA2	EDG-4
LPA	LPA ₃	2.1:LPL:7:LPA3	EDG-7
S1P / SPC	S1P ₁	2.1:LPL:1:S1P1	EDG-1
S1P / SPC	S1P ₂	2.1:LPL:5:S1P2	EDG-5
S1P / SPC	S1P ₃	2.1:LPL:3:S1P3	EDG-3
S1P / SPC	S1P ₄	2.1:LPL:6:S1P4	EDG-6
S1P / SPC	S1P ₅	2.1:LPL:8:S1P5	EDG-8

Tabelle 1: Übersicht über die IUPHAR-Nomenklatur der LPL-Rezeptoren (vormals EDG-Rezeptoren) aus dem Jahr 2002. Splicing Varianten der Rezeptoren, wie sie für den humanen LPA₃-Rezeptor beschrieben sind (Fitzgerald et al., 2000), erhalten keine eigenständige Bezeichnung, da sie keine pharmakologischen Unterschiede aufweisen.

Sphingosylphosphorylcholin (SPC) und Lysophosphatidylcholin (LPC) sind als weitere Rezeptor-Agonisten in der Diskussion (Xu et al., 2000; Kabarowski et al., 2001).

Verschiedene Forschergruppen bestätigten im Laufe der Jahre, dass das humane Genom mindestens acht verschiedene LPL-Rezeptortypen umfasst (Racké et al., 1999; Fukushima et al., 2001; Lynch und MacDonald, 2002).

Auch im Genom von Nagetieren findet sich eine Gruppe von acht LPL-Rezeptoren, die als ortholog, also zwischen den Spezies homolog, bezeichnet werden kann. Vermutlich gilt dies für alle Säugetiere (Chun et al., 2002). Neben Versuchen mit Knockout-Mäusen spielen Untersuchungen zu den Expressionsmustern der Rezeptoren vor allem in humanen Zellen und Nagetierzellen eine wichtige Rolle.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Expressionsmuster der LPL-Rezeptoren in Ratten-Alveolarmakrophagen der Zelllinie NR 8383 und deren funktioneller Bedeutung.

2. Lokalisation der LPL-Rezeptoren

Das Vorkommen von LPA₁-Rezeptor-mRNA ist in Nagetierorganismen stark beschränkt auf die myelinisierenden Gliazellen (einschließlich Schwannscher Zellen). Pränatal finden sich die Transkripte jedoch reichlich in kortikalen Neuronen (Hecht et al., 1996; Weiner et al., 1998).

Rezeptor	LPA ₁	LPA ₂	LPA ₃	S1P ₁	S1P ₂	S1P ₃	S1P ₄	S1P ₅
Lokalisation	Gliazellen, Herz, Kolon Gehirn, Dünndarm, Prostata	Leukozyten	Niere, Lunge, Herz, Pankreas, Prostata	ubiquitär	Gehirn Herz, Lunge, Darm, Magen, Nebenniere	ubiquitär	lymphatisches Gewebe	Niere, weiße Substanz

Tabelle 2: Übersicht über die Expression der LPL-Rezeptoren in verschiedenen Gewebearten.

Der humane LPA₁-Rezeptor kommt in vielen Gewebearten, so in Herz, Gehirn, Dickdarm, Dünndarm und Prostata, nicht jedoch in Extrakten aus Leber, Lunge, Thymus oder weißen Blutkörperchen vor (An et al., 1998b).

Die Expression des humanen LPA₂-Rezeptors ist am ausgeprägtesten in Leukozyten (Gräler et al., 1998), während die LPA₃-Rezeptor-mRNA in Nieren-, Lungen-, Herz-, Pankreas-, und Prostatazellen gefunden wurde (Bandoh et al., 1999).

Bei Mäusen ließen sich alle drei LPA-Rezeptortypen in Hodenextrakt nachweisen (Contos und Chun, 2001). Die S1P-Rezeptoren S1P₁ und S1P₃ werden ubiquitär exprimiert (Yamaguchi et al., 1996). Den S1P₂-Rezeptor findet man in embryonalen und postnatalen Gehirnzellen, in Herz-, Lungen-, Magen-, Darm- und Nebennierengewebe (Okazaki et al., 1993, MacLennan et al., 1994).

Die Besonderheit des S1P₄-Rezeptors liegt in seinem extraordinären Expressionsort, dem lymphatischen Gewebe (Gräler et al., 1998). Der S1P₅-Rezeptor schließlich wird vor allem in der Niere und in der weißen Substanz von Gehirn und Rückenmark exprimiert (Im et al., 2000).

II. LPA-Rezeptoren

1. Der LPA₁-Rezeptor

Der LPA₁-Rezeptor findet sich in verschiedenen Gewebearten. Zuerst entdeckt wurde er im cerebralen Kortex von Mäusen (Hecht et al., 1996), aus dem er kloniert wurde (Chun und Jaenisch, 1996). Während der embryonalen Entwicklung scheint er eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen zu spielen.

Das LPA₁-Rezeptorprotein besitzt ein Molekulargewicht von 41 kD und besteht aus 364 Aminosäuren, die sieben transmembranäre Domänen ausbilden. Er zeigt 37% Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz mit dem bis dato als EDG-1 bekannten S1P₁-Rezeptor (Fukushima et al., 2001).

Das Gen für den LPA₁-Rezeptor besteht aus mehr als 45 Kilobasen und beinhaltet fünf Exons mit der Besonderheit eines Introns, welches in der Mitte der Domäne VI lokalisiert ist (Chun, 1999). Über den LPA₁-Rezeptor wird eine Hemmung der Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) vermittelt, während er gleichzeitig einen stimulierenden Effekt für Zellwachstum mit Anstieg der Serum-responsiven Elemente (SRE) in diesen Zellen induziert (Hecht et al., 1996; Fukushima et al., 1998).

Überexpression des Rezeptors führte zu serumabhängiger Zellabrundung. LPA stimulierte diesen Effekt, welcher nicht durch Pertussis-Toxin (PTX) gehemmt werden konnte (Eichholtz et al., 1993; Moolenaar, 1995).

PTX katalysiert die Adenosindiphosphat (ADP)-Ribosylierung von G_i/G_o -Subtypen der heterotrimeren G-Proteine, damit verhindert das Toxin die Kopplung an $G_{i/o}$ (Fields und Casey, 1997). Ist ein Effekt PTX-sensitiv, so indiziert dies die Beteiligung eben jener G-Proteine.

Der LPA_1 -Rezeptor agiert mit den PTX-sensitiven $G_{i/o}$ -Proteinen und dient als Mediator in der LPA-vermittelten Stress-Faser-Ausbildung über den Rho-Signalweg (Fukushima et al., 1998). In Schwanzzellen kommt es in Abhängigkeit der kleinen Nukleotid bindenden GTPase Rho zu einem Neuarrangement des Aktins der Zellen (Zellrundung, Stress-Faser-Ausbildung, Neuritenretraktion) und einer weiteren Steigerung der Proliferation (Weiner und Chun, 1999).

In humanen Monozyten und Makrophagen vermittelt der LPA_1 -Rezeptor eine PTX-sensitive Hemmung der Adenylatcyclase (AC), eine transiente, G_i - und Phospholipase C (PLC)-abhängige Ca^{2+} -Mobilisation über den PKC- IP_3 -Weg (Proteinkinase C, Inositoltrisphosphat) und zusätzlich einen anhaltenden Ca^{2+} -Influx, der durch den PLC-Inhibitor U73122 oder PTX zu unterbinden ist (An et al., 1998b; Fueller et al., 2003).

In Neuroblastenzellen wird die PLC aktiviert, dieser Effekt ist auch durch PTX nicht inhibierbar, was wiederum eine Beteiligung von G_q -Proteinen impliziert (Ishii et al., 2000). Vermutlich ist die Verknüpfung mit den verschiedenen G-Proteinen abhängig von der Anzahl der exprimierten Rezeptoren. Dadurch ließen sich die verschiedenen Ergebnisse in unterschiedlichen Zelllinien oder Expressionssystemen erklären (An et al., 1998b; Im et al., 2000).

In situ Hybridisierung von Mausgewebe, sowie Northern-Blots ergaben, dass der LPA_1 -Rezeptor vor allem im cerebralen Kortex und dort besonders in der Region der Ventrikel exprimiert wird (Hecht et al., 1996). Im Laufe der weiteren Entwicklung folgt der Expressionsort der voranschreitenden Neurogenese. Kurz vor der Geburt gibt es eine graduelle Minderung der Expression (Weiner et al., 1998), doch postnatal kommt es erneut zur Ausbildung von LPA_1 -Rezeptoren in den verschiedensten cerebralen

Regionen, vor allem in der weißen Substanz und den Oligodendrozyten, den myelinisierenden Zellen des ZNS. Auch in den peripheren myelinisierenden Zellen, den Schwannzellen, kommt es zu sehr hohen Expressionsraten des Rezeptors innerhalb der ersten Lebenswoche von Mäusen (Weiner und Chun, 1999).

Aber nicht nur im neuronalen System, sondern auch in anderen Gewebetypen kommt der LPA₁-Rezeptor vor, so im Intestinum (z.B. im Magen), in Herz-, Lungen-, Nieren-, Milz-, Thymus-, Hoden- und Muskelgewebe (McCrea et al., 1996).

2. Der LPA₂-Rezeptor

Der LPA₂-Rezeptor ist ein multifunktionaler LPA-Rezeptor, der in seiner Struktur und Funktionalität Ähnlichkeiten zum LPA₁-Rezeptor aufweist: Die Aminosäuresequenz ist zu etwa 60% identisch.

Der LPA₂-Rezeptor ist ein aus 348 Aminosäuren bestehendes Protein mit einer molekularen Masse von 39 kD. Die genetischen Strukturanalysen zeigten drei Exons, wobei wiederum ein Intron in der Region der sechsten transmembranären Domäne liegt, wie schon für den LPA₁-Rezeptor beschrieben wurde. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass möglicherweise ein gemeinsamer genetischer Vorfahr für diese beiden Rezeptoren existiert (Contos und Chun, 2000).

Der LPA₂-Rezeptor aktiviert nach Bindung von LPA die PLC und bewirkt einen intrazellulären Calciumanstieg, sowie eine gesteigerte IP₃-Produktion (An et al., 1998a; Bando et al., 1999; Ishii et al., 2000; Im et al., 2000). Dieser Effekt war nur teilweise durch PTX zu blockieren. Die Hemmung der AC durch den LPA₂-Rezeptor hingegen war vollständig durch PTX inhibierbar (An et al., 1998b). Wahrscheinlich sind also sowohl PTX-sensitive G-Proteine (G_{i/o}) und PTX-insensitive G-Proteine (G_q) an der Signaltransduktion beteiligt (An et al. 1998b).

Die effektiven Konzentrationen von LPA, die Reaktionen hervorrufen, liegen im nanomolaren Bereich.

Seine Hauptfunktion entfaltet der LPA₂-Rezeptor während der prä- und postnatalen Entwicklung des Gehirns, wobei zudem zwei verschiedene Transkripte in humanen lymphoiden Zellreihen entdeckt wurden, sowie in Nieren-, Hoden- und Lungengewebe

bei erwachsenen Mäusen (Contos et al., 2000). Der LPA₂-Rezeptor wird in humanen Alveolarmakrophagen konstitutiv exprimiert (Hornuß et al., 2001).

3. Der LPA₃-Rezeptor

Der LPA₃-Rezeptor ist ein 40kD großes Molekül aus 354 Aminosäuren, das eine ca. 60%ige Übereinstimmung mit dem LPA₁-Rezeptor und dem LPA₂-Rezeptor aufweist und erstmals aus Jurkat-T-Zellen isoliert wurde (Bandoh et al., 1999).

Das Gen besteht aus drei Exons mit einem analog zu den anderen beiden Rezeptoren platzierten Intron in der transmembranären Domäne VI (Contos et al., 2000). Aufgrund der genetisch ähnlichen Struktur kann von einer Verwandtschaft zwischen den drei bisher bekannten LPA-Rezeptoren ausgegangen werden.

Für die Verwandtschaft spricht zudem, dass der LPA₃-Rezeptor wie die anderen LPA-Rezeptoren die PLC in einem PTX-insensitiven System aktiviert (Ishii et al., 2000).

Der Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ war nur mittels PLC-Inhibitor, nicht jedoch mit PTX zu inhibieren (Im et al., 2000). Der LPA₃-Rezeptor ist nach diesen Ergebnissen also mit einem G_q-Protein assoziiert. Die Verknüpfung mit einem G_i-Protein ist weniger gesichert, da diverse Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen; sicher ist jedoch, dass LPA₃-Rezeptoren in Insektenzellen die AC-Kaskade stimuliert (Bandoh et al., 1999), hingegen die AC in Säugetierzellen durch LPA₃ gehemmt wurde.

Man findet den LPA₃-Rezeptor in humanem Hoden-, Prostata- und Herzmuskelgewebe sowie in der frontalen Region des cerebralen Kortex exprimiert. Bei Mäusen kommt er in Lungen-, Nieren-, und Hodengewebe vor. Humane Alveolarmakrophagen exprimierten den Rezeptor nicht (Hornuß et al., 2001), hingegen wurde in der humanen Zelllinie A549, die einem Lungenkarzinom entstammt, mRNA nachgewiesen (Bandoh et al., 1999).

4. Synthese und Abbau von LPA

LPA ist ein Schlüsselprodukt in der Membran-Phospholipidsynthese, obgleich es zu den einfachsten natürlichen Phospholipiden zählt. LPL als Metabolite von Membranlipiden können entweder *de novo* synthetisiert werden oder durch enzymatische Umwandlung

von Vorläufermolekülen aus der Zellmembran (Glycerophospholipide und Sphingolipide) freigesetzt werden.

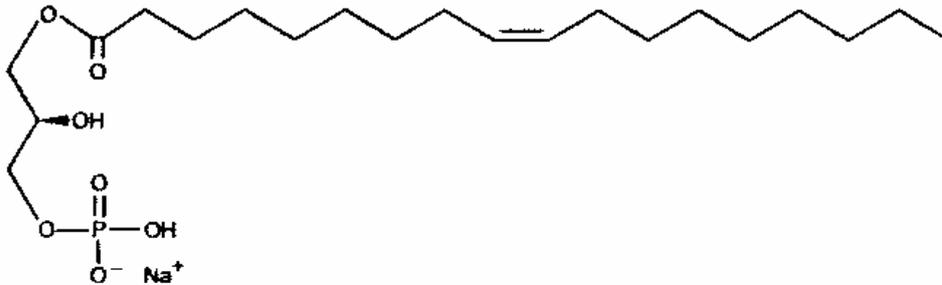


Abbildung 1: 1-Oleoyl-Lysophosphatidsäure (LPA)

Die zelluläre *de-novo*-Synthese von LPA besteht aus der Reaktion von Coenzym A mit Glycerinaldehyd-3-Phosphat, einem Zwischenprodukt der Glykolyse, in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (Spiegel und Merrill, 1996).

Die am häufigsten vorkommende Form von LPA hat jedoch ihren Ursprung in Zellmembranen oder Membranvesikeln aus aktivierten Plättchen und Leukozyten. In diesen Mikrovesikeln ist die transmembranäre Verteilung von Phospholipiden gestört und folglich werden die Zellmembranen dieser aktivierten Zellen unter Beteiligung der Enzyme Diacylglycerinkinase, PLC und Phospholipase D in ihre Membranbestandteile aufgelöst. Dadurch wird Phosphatidsäure freigesetzt, aus welcher durch Deacylierung mittels der sekretorischen Phospholipase A vom Typ II (sPLase A2) LPA generiert wird (Fourcade et al., 1995).

Der Abbau von extrazellulärem LPA findet durch eine oder mehrere Phosphatid-Phosphohydrolasen (Waggoner et al., 1996; Hiroyama und Takenawa, 1998; Jasinska et al., 1999) oder Lysophospholipasen statt (Thompson und Clark, 1994; Wang et al., 1997a/b). LPA kann außerdem von Acyltransferase und anderen verwandten Enzymen zu Phosphatidsäure umgewandelt werden. Durch Hydrolyse von LPA entstehen hauptsächlich Monoacylglycerol und – zu weit kleinerem Anteil – Diacylglycerol (DAG), sowie Phosphatidsäure (van der Bend et al., 1992).

Die größten zellulären Quellen für LPA stellen Thrombozyten und Adipozyten dar. Beide setzen LPA frei, wenn sie von Thrombin bzw. von α -Rezeptor-Agonisten stimuliert werden (Eichholtz et al., 1993; Valet et al., 1998). LPA ist im Serum immer in mikromolaren Konzentrationen präsent und wird an Albumin oder LDL (Low Density Lipoprotein) gebunden, wodurch es vor Abbau durch Phospholipasen geschützt ist. Der normale Serumspiegel von LPA beträgt 2 – 20 μ M (Eichholtz et al., 1993).

5. Biologische Funktion von LPA

Lange war LPA nur als Vorläufer der Phospholipidbiosynthese in eukaryotischen und prokaryotischen Zellen bekannt. Es zeigte sich jedoch, dass LPA ein interzelluläres Signalmolekül ist, das schnell aus aktivierten Zellen, zum Beispiel Thrombozyten, freigesetzt wird und die Zielzellen via Rezeptoren auf der Zelloberfläche beeinflusst (Moolenaar, 1995).

LPA ist ein wichtiger Mediator für die Wundheilung und Regeneration von Gewebe und wirkt als autokriner Stimulator der Thrombozytenaggregation (Gerrard et al., 1979).

Weiterhin stimuliert LPA das *in-vitro*-Wachstum von Fibroblasten (Tigyi et al., 1994), von glatten Muskelzellen der Gefäße (Tokamura et al., 1994), Endothelzellen und Keratinozyten (Piazza et al., 1995). LPA fördert außerdem die Bindung von Fibronectin an die Zelloberfläche (Zhang et al., 1994), was einen bedeutsamen Mechanismus im Rahmen der Wundheilung darstellt.

Ein wichtiger Expressionsort für LPA-Rezeptoren ist das neuronale System. Über Interaktionen mit den GTPasen Rho und Ras, aber auch durch Calcium-Signale und die Aktivierung der PLC üben LPA-Rezeptoren Einfluss auf die zelluläre Motilität aus: In Tumorzellen kommt es zum Neuarrangement des Zytoskeletts, vor allem des Aktinsystems, was abhängig vom Zelltypus zu einer Steigerung oder Minderung der Invasivität von Tumorzellen führen kann (Jin und Strittmaier, 1997; Stam et al., 1998; Imamura et al., 1999).

Obwohl es noch immer unklar ist, auf welche Weise die einzelnen LPA-Rezeptoren in das LPA-abhängige Tumorstadium involviert sind, ist es doch sicher, dass sie eine entscheidende Rolle in der Tumorbio­logie einnehmen.

LPA bewirkt weiterhin eine Ca^{2+} -Mobilisierung in einer Vielzahl von Zellen, darunter Nervenzellen (Jalink et al., 1993), Thrombozyten (Moolenaar, 1994), Jurkat-T-Zellen (Takemura et al., 1996), Fibroblasten und Epithelzellen (von Corven et al., 1989; Jalink et al., 1990). LPA beeinflusst die Kontraktilität von glatter Muskulatur der Atemwege nach Reizung mit Metacholin oder Serotonin (Toews et al., 1997) und bewirkt in vielen Zellen die so genannte *stress fiber formation*, die Reorganisation des Zytoskeletts durch Bildung von Stressfasern nach oxidativem Stress (Hirshman und Emala, 1999). Auf Zellen der glatten Muskulatur wirkt LPA mitogen (Cerutis et al., 1997) und auf Peritonealmakrophagen der Maus wirkt LPA als starker Überlebensfaktor, dessen Effekte vergleichbar sind mit denen von Serum (Koh et al., 1998).

Neueste Forschungsergebnisse erhärten den Verdacht, dass LPA ein wichtiger pathogenetischer Faktor für die Thrombo- und Atherogenese ist: Es erwies sich als mitogen auf Endothelzellen und Makrophagen und bewirkte vaskuläres Remodelling über Neubildung von Intima und atherothrombotischen Plaques (Siess und Tigyi, 2004). Knockout-Mäuse ohne funktionsfähige LPA-Rezeptoren zeigten craniofaziale Defekte, reduziertes Körpergewicht und schwaches Saugverhalten (Contos et al., 2000). Diese Ergebnisse belegen die vielschichtige Funktion von LPA-Rezeptoren.

III. S1P-Rezeptoren

1. Der S1P₁-Rezeptor

Der S1P₁-Rezeptor wurde 1990 von Hla und Maciag isoliert als ein Genprodukt aus humanen, mit Phorbol ester stimulierten Endothelzellen und gab damit der Familie von LPL-Rezeptoren ihren früheren Namen: *Endothelial Differentiation Gene*, EDG. Das EDG-1-Protein wies sieben hydrophobe Domänen auf und zeigte signifikante Ähnlichkeit und Sequenzhomologien zu anderen G-Protein-Rezeptoren (Hla und Maciag, 1990). Weitere Analysen zeigten, dass das Gen für eine Sequenz aus 381 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 43 kD codiert und zwei Exons enthält (Liu et Hla, 1997). Diese genetische Struktur ist charakteristisch für alle Mitglieder der S1P-Rezeptorfamilie.

Der Promoter für den S1P₁-Rezeptor besitzt keine TATA-Sequenzen, dafür aber zahlreiche GC-Elemente. Die Initiation der Transkription geschieht von einem singulären Startpunkt aus. (Liu und Hla, 1997).

S1P bindet als Ligand mit hoher Affinität ($K_d = 8 \text{ nM}$) an den S1P₁-Rezeptor (Zondag et al., 1998; Lee et al., 1998). LPA hingegen erwies sich als ein weniger potenter Agonist und band an den Rezeptor mit einer K_d von $2,3 \mu\text{M}$ (Lee et al., 1998). Auch SPC scheint ein Agonist am S1P₁-Rezeptor zu sein, bindet jedoch mit einer fast 1000fach geringeren Affinität als S1P (Ancellin und Hla, 1999).

S1P₁-Rezeptoren sind vor allem in der Plasmamembran lokalisiert, werden jedoch unter S1P-Einfluß innerhalb von 15 Minuten in perinukleären Vesikeln internalisiert, von wo aus sie nach Beendigung des Stimulus durch S1P mit einer Halbwertszeit von etwa 30 Minuten in die Plasmamembran zurückkehren (Liu et al., 1999).

Der S1P₁-Rezeptor kann mit mehreren Unterformen des G_i-Proteins verknüpft sein (Lee et al., 1998; Windh et al., 1999), nicht jedoch mit G_s, G_q, G₁₂ oder G₁₃ (Windh et al., 1999). In diesem Zusammenhang wurde eine Hemmung der Forskolin-stimulierten AC durch S1P beobachtet (van Brocklyn et al., 1998). Dieser Effekt ist durch PTX zu unterbinden.

Die Aktivität des S1P₁-Rezeptors führt zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (Okamoto et al., 1998; Ancellin et al., 1999) und zur Bildung von IP₃. Beide Effekte werden durch die PLC hervorgerufen (Okamoto et al., 1998). Überexpression von S1P₁ führte zu einer Up-Regulation der extrazellulären signalregulierten Kinase (ERK), einer mitogen aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase) (Lee et al., 1996).

Weiterhin ist vom S1P₁-Rezeptor bekannt, dass er die Zellmigration fördert (van Brocklyn et al., 1998; Zondag et al., 1998; Kon et al., 1999). Neben der intrazellulären Ca²⁺-Mobilisation deuten neuere Erkenntnisse darauf hin, dass der S1P₁-Rezeptor die Calcium-assoziierte Signaltransduktion über ein PTX-sensitives G_i-Protein und die PKC auch inhibieren kann (Meyer zu Heringdorf et al., 2003).

S1P₁-mRNA wurde in den verschiedensten Geweben einschließlich Lungengewebe gefunden (Okamoto et al., 1998; Liu und Hla, 1997; Zhang et al., 1999). Neben den Endothelzellen stellen jedoch die cerebellären Purkinje-Zellen und die hippocampalen Körnerzellen die Hauptexpressionsorte dar (Liu und Hla, 1997). In primären Alveolarmakrophagen der Ratte konnte eine Expression nicht nachgewiesen werden, ein schwach detektierbares Transkript zeigte sich jedoch in humanen Alveolarmakrophagen (Hornuß et al., 2001).

2. Der S1P₂-Rezeptor

Das 39 kD Protein aus 352 Aminosäuren wurde von 2 unterschiedlichen Forschergruppen entdeckt und benannt: AGR16 war der ursprüngliche Name für ein aus dem kardiovaskulären System von Ratten isoliertes Transkript (Okazaki et al., 1993); das aus Nervengewebe der gleichen Spezies gewonnene Isolat nannte man H218 (MacLennan et al., 1994). Die Arbeitsgruppe um An entdeckte schließlich im Sequenzvergleich die Homologien zu den übrigen bekannten S1P-Rezeptoren (An et al., 1998b). Funktionale Analysen ergaben, dass der S1P₂-Rezeptor ebenfalls mit hoher Affinität S1P als Liganden bindet ($K_d = 20 - 27$ nM) (van Brocklyn et al., 1999). SPC scheint ebenfalls ein Agonist am S1P₂-Rezeptor zu sein, jedoch in seiner Potenz deutlich schwächer (Gonda et al., 1999; An et al., 1999).

Der S1P₂-Rezeptor weist in der Aminosäuresequenz eine 58%ige Ähnlichkeit zum S1P₁-Rezeptor auf. Auch die genomische Struktur ist homolog zu der der anderen S1P-Rezeptoren (Fukushima et al., 2001).

Die Signaltransduktionswege des S1P₂-Rezeptors scheinen verzweigter und komplexer zu sein, als die des S1P₁-Rezeptors: S1P₂-Rezeptoren sind sowohl an PTX-sensitive G_{i/o}-Proteine als auch an PTX-insensitive G_q- und G₁₃-Proteine gekoppelt (Windh et al., 1999). Der Rezeptor vermittelt die Induktion der PLC und eine intrazelluläre Ca²⁺-Mobilisierung. Der S1P induzierte Ca²⁺-Anstieg ist durch PTX weder komplett noch partiell zu inhibieren (Gonda et al., 1999; Okamoto et al., 1999; An et al., 1999), jedoch durch einen PKC-Antagonisten (An et al., 1999).

Auch der S1P₂-Rezeptor aktiviert den ERK-2/MAP-Kinase-Weg, der ebenfalls nicht durch PTX inhibierbar ist, sowie den ebenfalls PTX-insensitiven JNK/p38-MAP-Kinase-Weg (Gonda et al., 1999; Okamoto et al., 1999). Mehr noch, CHO-Zellen, die S1P₂

exprimierten, wiesen nicht nur eine Aktivierung der verschiedenen MAP-Kinase-Signaltransduktionswege auf, sondern auch Stressfaserformation und Rho-abhängige Leichtkettenphosphorylierung von Myosin (Gonda et al., 1999). Die Auswirkungen auf das Zytoskelett (Neuarrangement der Aktinfilamente) gleichen denen verursacht durch den S1P₁-Rezeptor, jedoch folgt der Stimulation des S1P₂-Rezeptors keine Abnahme des cAMP-Spiegels, sondern im Gegenteil eine Erhöhung des basalen, nicht durch Forskolin oder andere Substanzen veränderten cAMP-Niveaus durch Stimulation der AC (Kon et al., 1999; Gonda et al., 1999).

Die auch für den S1P₃-Rezeptor beschriebene Zellabrundung und Apoptose transfizierter HEK293-Zellen zeigte sich um ein Vielfaches stärker beim S1P₂-Rezeptor (van Brocklyn et al., 1999).

Der S1P₂-Rezeptor wird vorherrschend in der Lunge und im Herzen exprimiert, dafür ist er weniger prominent im Gehirn von adulten Ratten und Mäusen (Okazaki et al., 1993; Zhang et al., 1999). Während der Embryonalentwicklung wird der Rezeptor im zentralen Nervengewebe der Rhodentia gebildet (MacLennan et al., 1994).

Immunhistochemische Studien zeigen, dass der Rezeptor in neuronalen Zellkörpern während der Differenzierung und im Axon zur Zeit des Auswachsens der Neuriten exprimiert wird (MacLennan et al., 1997). Diese Ergebnisse stehen vermutlich in Zusammenhang mit der S1P-induzierten Retraktion von Neuriten, bei welcher der S1P₂-Rezeptor als Mediator fungiert (van Brocklyn et al., 1999).

Auch in primären alveolaren Makrophagen der Ratte wurde der S1P₂-Rezeptor nachgewiesen, nicht jedoch in humanen Alveolarmakrophagen (Hornuß et al., 2001).

3. Der S1P₃-Rezeptor

Der S1P₃-Rezeptor ist synonym mit dem EDG-3-Rezeptor, der bei Menschen auf Chromosom 9, bei Mäusen auf Chromosom 13 codiert wird (Yamaguchi et al., 1996). Der murine Rezeptor besteht aus 378 Aminosäuren mit einer Masse von 42 kD und besitzt fast 60% Übereinstimmung mit dem S1P₁-Rezeptor. Die Bindungsaffinität zu S1P ist mit $K_d = 23 - 26$ nM vergleichbar mit der der anderen Mitglieder der Rezeptorenfamilie (Kon et al., 1999; van Brocklyn et al., 1999).

Die Signaltransduktionswege stimmen mit denen des S1P₂-Rezeptors überein; einzig die Stärke und Wirksamkeit der Stimulation variieren (Windh et al., 1999). SPC bewirkte als zweiter Agonist am S1P₃-Rezeptor ebenfalls einen Anstieg der Ca²⁺-Konzentration, jedoch mit 1000fach niedrigerer Potenz als S1P (An et al., 1998b; Okamoto et al., 1999). Überexpression bewirkte in S1P₃-Rezeptor transfizierten HEK293 Zellen eine rapide Zellabrundung und anschließend gesteigerte Apoptose (van Brocklyn et al., 1999). Suramin erwies sich als selektiver Antagonist des S1P₃-Rezeptors im Sinne einer kompetitiven Interaktion mit S1P (Ancellin und Hla, 1999).

Der humane Rezeptor kommt in Herz- und Nierengewebe, sowie – in niedrigeren Konzentrationen – in der Lunge vor (Yamaguchi et al., 1996). Der Mausrezeptor zeigt hohe Expressionsraten in allen drei Geweben (Zhang et al., 1999). Bei Ratten zeigt sich ein prominentes Expressionsmuster in Schwanzzellen (Weiner und Chun, 1999). Humane Alveolarmakrophagen exprimieren den Rezeptor im Gegensatz zu primären Alveolarmakrophagen der Ratte (Hornuß et al., 2001)

4. Der S1P₄-Rezeptor

Das S1P₄-Gen codiert für ein Protein aus 384 (human), bzw. 386 (murin) Aminosäuren, die Aminosäuresequenz stimmt zu 30 – 34 % mit den LPA-Rezeptoren und zu 40 – 44% mit den anderen S1P-Rezeptoren überein (Gräler et al., 1998). Die pharmakologischen Eigenschaften des S1P₄-Rezeptors sind typisch für S1P-Rezeptoren: eine hohe Affinität zu S1P als Ligand ($K_d = 13 - 63$ nM), S1P-vermittelte Induktion der PLC, Aktivierung des ERK/MAP-Kinase-Weges und intrazelluläre Ca²⁺-Mobilisation mit IP₃-Akkumulation; Effekte, die sich allesamt durch Zugabe von PTX blockieren lassen (van Brocklyn et al., 2000; Yamazaki et al., 2000).

Der S1P₄-Rezeptor wird sehr spezifisch in lymphatischem und hämatopoetischem Gewebe wie Milz, Leukozyten, Lymphknoten, Blinddarm und Thymus exprimiert, zusätzlich jedoch auch in der Lunge. Humane Alveolarmakrophagen zeigten keine Expression des S1P₄-Rezeptors (Hornuß et al., 2001). Durch die besonderen Expressionsorte nimmt der Rezeptor eine gewisse Sonderstellung innerhalb der gesamten Gruppe der LPL-Rezeptoren ein.

5. Der S1P₅-Rezeptor

Das letzte Mitglied der LPL-Rezeptorfamilie, ursprünglich als vermeintlich verwaister GPCR nrg-1 bezeichnet und dann EDG-8 genannt, wurde 1999 bei der Untersuchung von Zellen eines Phäochromocytoms aus Ratten (PC12-Zellen) entdeckt (Glickman et al., 1999). Das Gen für den Rezeptor liegt bei Ratten auf Chromosom 8, nicht weit entfernt von dem für den S1P₂-Rezeptor (Glickman et al., 1999). Der S1P₅-Rezeptor besteht aus 400 Aminosäuren und zeigt eine hohe Affinität zu S1P ($K_d = 2 \text{ nM}$) (Im et al., 2000). Der Rezeptor ist mit G_{i/o}-Signaltransduktionswegen assoziiert.

Bei Ratten findet man den S1P₅-Rezeptor in vielen Zellen des ZNS, vor allem in der weißen Substanz (Glickman et al., 1999).

6. Synthese und Abbau von S1P und SPC

6.1 S1P

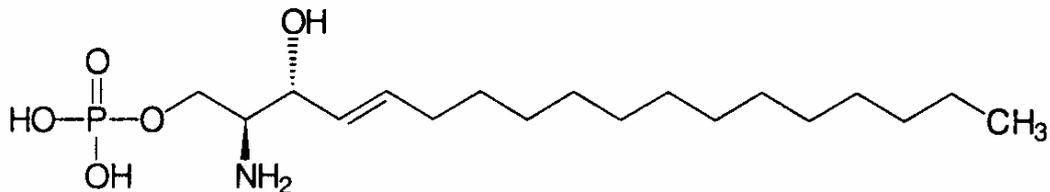


Abbildung 2: D-erythro-Sphingosin-1-Phosphat (S1P)

S1P entsteht aus Ceramid über das Zwischenprodukt Sphingosin. Das benötigte Ceramid kann entweder *de novo* via Fumonisin B1-sensitiver Ceramidsynthase hergestellt werden (Wang und Merrill, 2000) oder durch Abbau von Sphingomyelin aus Zellmembranen mit Hilfe einer der Sphingomyelinasen gewonnen werden (Spiegel und Merrill, 1996; Hla et al., 1999; Chatterjee et al., 1999). Der letztgenannte Mechanismus ist für die Signaltransduktion der Sphingolipide viel bedeutsamer, da er schnell und von verschiedenen Stimuli aktiviert werden kann (Spiegel und Merrill, 1996; Hla et al., 1999). Es sind zahlreiche verschiedene Isoformen der Sphingomyelinasen mit jeweils unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation und verschiedenen pH-Optima bekannt (Mathias et al., 1998).

Der initiale Schritt der *de-novo*-Synthese von Sphingosinbasismolekülen ist eine Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA zu 3-Oxosphinganin. 3-Oxosphinganin wird zu Dihydrosphingosin reduziert und von der Ceramidsynthase zu Dihydroceramid acetyliert. Durch Oxidation entsteht Ceramid mit der charakteristischen Trans-4,5-Doppelbindung.

Darüber hinaus sezernieren auch Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und viele andere Zellen, vermutlich stimuliert durch Zytokine, eine bedeutende Menge an saurer Sphingomyelinase (Schissel et al., 1996; Marathe et al., 1998). Eine saure Umgebung wie man sie in entzündetem Gewebe vorfindet, steigert die Aktivität der sezernierten Sphingomyelinase erheblich. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Sphingomyelinase eine Rolle als autokriner und parakriner Regulator von Entzündungsreaktionen spielt (Zhang et al., 1997).

Den letzten Schritt der S1P-Synthese bildet die Deacetylierung des Ceramids durch die Ceramidase zu Sphingosin, welches im Anschluss von der Sphingosinkinase zu S1P phosphoryliert wird. Von der Sphingosinkinase sind 2 Isoformen beschrieben (Kohama et al., 1998).

Über den Transport von S1P aus der Zelle ist wenig bekannt; man vermutet jedoch, dass ähnlich dem LPA exozytotische Mikrovesikel involviert sind.

Wenn S1P einmal freigesetzt ist, kann es ebenso wie LPA schnell von spezifischen Phosphatasen (Mandala et al., 1998), Lyasen (Saba et al., 1997) oder durch die Phosphatid-Phosphohydrolase (Waggoner et al., 1996) abgebaut werden. Thrombozyten besitzen keine S1P-abbauenden Enzyme. Daher akkumuliert S1P in den Blutplättchen und wird nach deren Aktivierung freigesetzt (Yatomi et al., 1995).

6.2 SPC

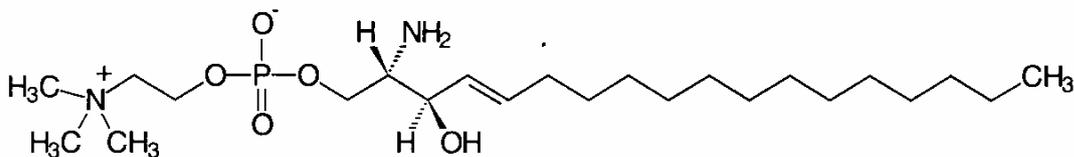


Abbildung 3: Sphingosylphosphorylcholin (SPC).

Ein weiteres bioaktives Sphingolipid stellt das SPC dar, welches durch Abspaltung einer Lipidseitenkette aus Sphingomyelin durch die Sphingolipid-Ceramid-N-Deacylase entstehen kann (Ito et al., 1995). Die verschiedenen Stereoisomere des SPC zeigen differenzierte biologische Wirksamkeit.

7. Biologische Funktion von S1P und SPC

Die Wirkungen von S1P und SPC auf die verschiedenen Gewebe sind mannigfaltig.

Eine der wichtigsten Funktionen von S1P ist der mitogene Effekt für verschiedene Zellpopulationen. In Swiss 3T3 Fibroblasten beispielsweise, die den S1P₁-, den S1P₂- und den S1P₃-Rezeptor exprimieren, ruft S1P einen deutlichen Anstieg der DNA-Synthese und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren hervor (Wu et al., 1995). Andererseits kann S1P Apoptose auslösen, zum Beispiel via S1P₂-Rezeptor in PC12-Zellen (van Brocklyn et al., 1999).

Ceramid und S1P haben in vielen Zelltypen gegensätzliche Wirkungen und können sowohl Apoptose als auch zelluläres Wachstum induzieren. Damit stellt die Metabolisierung von Ceramid zu S1P eine regulatorische Schaltstelle dar, die es Zellen erlaubt, in die eine oder andere Richtung zu reagieren. Im Gegensatz zu Sphingosin und Ceramid, den Vorläufern von S1P, welche den programmierten Zelltod einleiten, kann S1P die Apoptose von Zellen verhindern. Die Balance zwischen diesen Substanzen entscheidet also darüber, ob eine Zelle überlebt oder zugrunde geht (Spiegel und Merrill, 1996).

S1P ist auch an der Angiogenese beteiligt. S1P-Zugabe zu Fibroblastenzellen bewirkt dort eine Neubildung von Blutgefäßen (Liu et al., 2000). Die Behandlung von

Endothelzellen mit Phorbolestern führt zur morphologischen Differenzierung dieser Zellen, einschließlich der Expression von S1P₂-Rezeptoren (Hla und Maciag, 1990). Damit kommt S1P und SPC essentielle Bedeutung in den physiologischen Vorgängen der embryonalen Entwicklung, der Wundheilung und Organregeneration zu.

Darüber hinaus wirkt S1P chemotaktisch und kann beispielsweise die Migration von Epithelzellen stimulieren, wie für HEK 293-Zellen gezeigt wurde (Wang und Merrill, 2000). Chemotaktische Vorgänge sind ebenfalls für die Angiogenese von Bedeutung.

Auch die Wirkungen von S1P und SPC auf das Zytoskelett spielen eine wichtige Rolle: Zellen, die keine S1P₂- oder S1P₃-Rezeptoren exprimieren können, können Teile ihrer Zell-Zell-Verbindungen (*zonula adhaerens*) nicht ausbilden und verlieren ihre ursprüngliche Aktinfaserstruktur im Zytoskelett (Lee et al., 1999b).

S1P (und LPA) induzieren zelluläre Antworten in Kardiomyozyten und sind potente Aktivatoren G_i-Protein-gesteuerter, zelleinwärts gerichteter Kaliumkanäle, was eine Funktion bei der physiologischen Regulation der Herzfrequenz impliziert (Bünemann et al., 1995; van Koppen et al., 1996; Himmel et al., 2000).

Wie LPA hat auch S1P jeweils abhängig vom Zelltypus eine stimulierende oder inhibierende Wirkung auf Tumorzellmigration (Stam et al., 1998). S1P₂- und S1P₃-Rezeptoren werden beispielsweise in Brustkrebszellen ausgebildet und bewirken dort Zellproliferation und eine Aktivierung der SRE (Goetzl et al., 1999).

In humanen Makrophagen führt die Zugabe von S1P zu einer gesteigerten Phagozytose-Aktivität (Duong et al., 2004). S1P bewirkt bei Endothelzellen und glatten Muskelzellen einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (Bornfeldt et al., 1995; Meyer zu Heringdorf et al., 1996).

Eine Gemeinsamkeit aller S1P-Rezeptoren ist ihre Interaktion mit dem Rho-vermittelten Signalweg. *In vivo* wird S1P vor allem aus Thrombin- oder Phorbol ester-aktivierten Blutplättchen ausgeschüttet, aber auch Mastzellen und Monozyten sind zur Sekretion von S1P fähig. Im Blut wird S1P an Albumin und Lipoproteine gebunden. Die Konzentration von S1P im Plasma liegt bei 0,2 µM, die im Serum bei 0,5-1 µM (Yatomi et al., 1995; 1997). Die Plasmaspiegel von S1P werden zum einen von Sphingosinkinasen, zum anderen von S1P-Phosphatasen bestimmt.

IV. Signaltransduktion durch LPL-Rezeptoren

LPL-Rezeptoren werden in nahezu allen Zelltypen exprimiert und meist finden sich in einer Zellart auch mehrere Vertreter dieser Lipidrezeptorfamilie. LPL-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die bekannten Signaltransduktionswege werden über die G-Protein-Subtypen G_i , G_q , $G_{12/13}$, Ras und Rho vermittelt (Racké et al., 1999; Pyne und Pyne, 2000).

Rezeptor	G-Protein	Zelluläre Funktion
LPA₁	$G_{i/o}$ $G_{q/11/14}$ $G_{12/13}$	Aktivierung: DNA-Synthese, PLC, SRE Hemmung: AC Stimulation: Aktinomyosin
LPA₂	$G_{i/o}$ $G_{q/11/14}$ $G_{12/13}$	Aktivierung: MAP-Kinase, PLC, SRE Hemmung: AC Stimulation: Aktinomyosin
LPA₃	$G_{i/o}$ $G_{q/11/14}$	Aktivierung: MAP-Kinase, PLC Stimulation/Hemmung: AC
S1P₁	$G_{i/o}$	Aktivierung: MAP-Kinase, PLC Hemmung: AC
S1P₂	$G_{i/o}$ $G_{q/11/14}$ $G_{12/13}$	Aktivierung: MAP-Kinase, PLC, SRE Stimulation/Hemmung: AC
S1P₃	$G_{i/o}$ $G_{q/11/14}$ $G_{12/13}$	Aktivierung: MAP-Kinase, PLC, SRE Stimulation: AC, Aktinomyosin
S1P₄	$G_{i/o}$	Aktivierung: MAP-Kinase, PLC
S1P₅	$G_{i/o}$	Hemmung: AC

Tabelle 3: Signaltransduktionswege der verschiedenen LPL-Rezeptoren und Kopplung an die diversen heterotrimeren G-Proteine, sowie Beeinflussung intrazellulärer Enzymkaskaden.

Die α -Untereinheit des inhibitorischen G-Proteins G_i hemmt die AC und vermindert konsekutiv einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration.

Die $\beta\gamma$ -Untereinheit von G_i und die α -Untereinheit des G_q -Proteins bilden aus membranständigem Phosphatidyl-Inositol-Diphosphat (PIP₂) via PLC zu gleichen Teilen

IP₃ und DAG. IP₃ bewirkt eine Freisetzung von Ca²⁺ aus den Speichern des endoplasmatischen Retikulums. Ca²⁺ als ubiquitärer Botenstoff in eukaryotischen Zellen vermittelt vielfältige Signale, z.B. durch Bindung an Calmodulin.

DAG hingegen aktiviert die PKC durch Erhöhung deren Affinität zu Ca²⁺. Der gleiche Mechanismus wird auch durch den Phorbolster Phorbolmyristataacetat (PMA) induziert; PMA unterliegt jedoch keinem schnellen Abbau wie DAG. Die PKC phosphoryliert Serin- und Threoninreste verschiedener Zielproteine und aktiviert diese damit. Weiterhin kann DAG selbst mittels DAG-Kinase zu Phosphatidat umgewandelt werden, welches dann wiederum der sekretorischen Phospholipase A2 als Substrat zur Synthese von LPA zur Verfügung steht (Stryer, 1996).

LPL-Rezeptoren können außerdem über die βγ-Untereinheit von G_i das Protein Ras aktivieren und darüber die Stimulation von MAP-Kinasen bewirken. MAP-Kinasen sind die terminalen Enzyme einer drei-Kinasen-Kaskade, in welcher jede Kinase das nachfolgende Enzym phosphoryliert und damit aktiviert (Herskowitz, 1995). Die komplette Kaskade besteht aus einer MAP-Kinase Kinase Kinase (MAPKKK), welche eine MAP-Kinase Kinase (MAPKK) aktiviert, die ihrerseits wieder ein MAP-Kinase-Protein phosphoryliert, z.B. die p44/42-ERK/MAP-Kinase (Okamoto et al., 1998).

Durch Modulation von Transkriptionsfaktoren sind MAP-Kinasen wichtige Stimulatoren für zelluläres Wachstum und Differenzierung. Durch Einwirkung auf Proteine des Zytoskeletts haben sie direkten Einfluß auf die Zellstruktur (Lewin, 1998).

Ein weiterer Signaltransduktionsmechanismus von LPL-Rezeptoren wird durch das G-Protein G_{12/13} vermittelt. Dieses aktiviert die GTPase Rho. Rho gehört zur Familie der kleinen GTPase-Proteine mit einer Größe von 20 bis 35 kD und bewirkt die Aktivierung der Phospholipase D und der SRE-gesteuerten Gentranskription. Rho reguliert die Aktivierung der ERK/MAP-Kinase über Interaktion mit der MAPKK1 und MAPKK2 (Galaria et al., 2004).

Die an LPL-Rezeptoren gekoppelten Ras-Gene gehören zur Gruppe der Wachstumskontrollgene. Säugetierzellen exprimieren drei Ras-Proteine von 21 kD Größe (H-/K-/N-ras), die sowohl in einer GTP- wie in einer GDP-assoziierten Form existieren und je nach Aktivitätszustand GTP (aktiv) oder GDP (inaktiv) binden. Ras

kann durch Überaktivität onkogen wirken und ist von zentraler Bedeutung für die Kontrolle von Zellentwicklung und –differenzierung (Stryer, 1996).

LPL wirken durch die Vielfalt der möglichen Signaltransduktionswege als wichtige multifunktionelle Mediatoren mit elementaren Effekten auf Entwicklung, Wachstum und Überleben der verschiedensten Zelltypen.

V. Zielsetzung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, in Anknüpfung an vorangegangene Untersuchungen zum Expressionsmuster von LPL-Rezeptoren in primären Rattenalveolarmakrophagen (vgl. Hornuß et al., 2001) ausgewählte funktionelle Aspekte der LPL-Rezeptoren und ihrer Liganden zu untersuchen.

Zunächst sollte der Frage der LPA-vermittelten intrazellulären Calcium-Mobilisation und der Aktivierung des ERK/MAP-Kinase-Weges durch LPL und LPS und nachgegangen werden.

Der von anderen Autoren beschriebene Stimulus von LPA (vgl. Koh et al., 1998) und teilweise auch S1P als Überlebensfaktor für Makrophagen sollte mit der proliferativen Wirkung von FKS in unterschiedlichen Konzentrationen verglichen werden und die für das Überleben von Alveolarmakrophagen optimale Konzentration an LPA und S1P im Serum sollte festgestellt werden.

Im letzten Schritt sollte mittels RT-PCR ein Expressionsmuster der LPL-Rezeptoren in Ratten-Alveolarmakrophagen der Zelllinie NR 8383 dargestellt werden, ausgehend von der Annahme, dass die Zellen der Zelllinie als Arbeitsmodell für die primären Zellen dienen könnten.

B. Material und Methoden

I. Material

1. Lösungen und Puffer

1.1 Allgemein

2,5 mg/ml Amphotericin B-Stammlösung

Amphotericin B	50 mg	2,5 mg/ml
bidest. Wasser	20 ml	

Basismedium (Ansatz: 1000 ml)

Dulbecco's Modified Eagles Medium Nutrient Mixture mit F12 HAM Kaighns Modifikation (F12K) mit 2 mM L-Glutamin wird als Pulvermedium eingesetzt

FK12K	1 Portion	
bidest. Wasser	1000 ml	
Natriumhydrogencarbonat	1,5 g/l	

mit 1 N NaOH oder 1 N HCl auf pH 7,4 einstellen

Makrophagenmedium (Ansatz: 200 ml)

Basismedium	187,6 ml	
FKS	10 ml	5% (v/v)
Penicillin/Streptomycin-Lösung	2 ml	100 µg/ml
2,5 mg/ml Amphotericin B-Stammlösung	400 µl	5 µg/ml

10x PBS-Puffer pH 7,4 - 7,5 (Ansatz: 1000 ml)

NaCl	80 g	1,37 M
KCl	2 g	27 mM
Na ₂ HPO ₄	11,5 g	81 mM
KH ₂ PO ₄	2 g	14 mM
mit bidest. Wasser auf	1000 ml	

0,15% (w/v) Trypanblau-Färbelösung (Ansatz: 8 ml)

0,4% Trypan Blue Stain	3 ml	0,15%
1x PBS-Puffer	5 ml	

75%-Ethanol

Ethanol (absolut)	37,5 ml	75% (v/v)
bidest. Wasser	12,5 ml	

1% Ethidiumbromid-Lösung

Ethidiumbromid	0,1 g	1% (v/v)
bidest. Wasser	10 ml	

1.2 Lösungen für Calcium-Mikrofluorimetrie**Krebs-Lösung für Ca²⁺-Imaging**

10x Krebs-Stamm (Natriumhaltig)	100 ml
200 mM HEPES-Puffer pH 7,4	100 ml
D-(+)-Glucose-Monohydrat	1,98 g
mit bidest. Wasser auf	1000 ml

10x Krebs-Stamm, Natriumhaltig (Ansatz: 500 ml)

NaCl	35,07 g
KCl	2,02 g
2 M CaCl ₂ -Stamm	3,125 ml
1 M MgCl ₂ -Stamm	6 ml
mit bidest. Wasser auf	500 ml

2 M Calciumchlorid-Stamm (Ansatz: 100 ml)

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	29,4 g
mit bidest Wasser auf	100 ml

1 M Magnesiumchlorid-Stamm (Ansatz: 100 ml)

MgCl ₂ x 6 H ₂ O	20,33 g
mit bidest Wasser auf	100 ml

200 mM HEPES-Puffer pH 7,4 (Ansatz: 1000 ml)

HEPES	47,66 g
mit bidest. Wasser auf	1000 ml
mit Natronlauge auf pH 7,4 einstellen	

1.3 Lösungen für RT-PCR**1,2% Agarosegel (Ansatz: 150 ml)**

Agarose	1,8 g	1,2% (w/v)
0,5x TBE-Puffer	150 ml	
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	10 µl	0,66 µg/ml

DEPC-Wasser (Ansatz: 100 ml)

DEPC	200 µl
mit bidest. Wasser auf	100 ml

40 mM dNTP-Lösungen

Triphosphate (je 10 mg) werden in den nachfolgenden Mengen DEPC-Wasser gelöst, so dass 40 mM Lösungen entstehen:

Desoxyadenosintriphosphat (dATP)	in 424 µl	40 mM
Desoxycytosintriphosphat (dCTP)	in 489 µl	40 mM
Desoxyguanosintriphosphat (dGTP)	in 454 µl	40 mM
Desoxythymidintriphosphat (dTTP)	in 438 µl	40 mM

10 mM dNTP-Mix (Ansatz: 400 µl)

40 mM dATP	100 µl	10 mM
40 mM dCTP	100 µl	10 mM

40 mM dGTP	100 μ l	10 mM
40 mM dTTP	100 μ l	10 mM

10 μ M Oligo (dt)₁₈-Primer-Lösung

Oligo(dt)₁₈-Primer, die in der von der Firma MWG vorgegebenen Menge DEPC-Wasser zu 100 μ M gelöst werden, werden mit DEPC-Wasser 1:10 auf 10 μ M verdünnt.

RT-Master-Mix (Ansatz: je nach Probenanzahl)

5x RT-Puffer	8 μ l	1x
10 mM dNTP-Mix	5 μ l	je 1,25 mM
40 U/ μ l RNAsin	1 μ l	40 U
DEPC-Wasser	2 μ l	
10 μ M Oligo(dt) ₁₈ -Primer	1 μ l	250 nM
9 U/ μ l AMV Reverse Transkriptase	3 μ l	27 U

PCR-Master-Mix (Ansatz: je nach Probenanzahl)

10x PCR-Puffer	4 μ l	1x
10 mM dNTP-Mix	1 μ l	je 0,2 mM
1 U/ μ l REDTaq Polymerase	1,5 μ l	je 1,5 U

5x TBE-Puffer (Ansatz: 1000 ml)

Tris	54,9 g
Borsäure	27,5 g
EDTA	4,65 g
mit bidest. Wasser auf	1000 ml

Probenpuffer

Ficoll 400	1,5 g	15% (w/v)
1% (w/v) Bromphenolblau-Lsg.	2,5 ml	0,25% (w/v)
5x TBE	1 ml	0,5x
mit bidest. Wasser auf	10 ml	

1.4 Lösungen für Protein-Präparation

NP-40 Puffer (Ansatz: 10 ml)

100 mM Tris-HCl pH 7,5	1 ml	10 mM
100 mM NaCl	1 ml	10 mM
10 mM MgCl ₂	1 ml	1 mM
100% (v/v) Nonidet P-40	50 µl	0,5% (v/v)
bidest. Wasser	6094 µl	
unmittelbar vor Gebrauch zugeben:		
100 mM PMSF	10 µl	1 mM
0,1 M EDTA pH 8	20 µl	2 mM
125 µg/ml Pepstatin A	5,6 µl	1 µM
10 µg/ml Leupeptin	50 µl	1 µM
350 mM NaF	100µl	35 mM
200 mM Na-Orthovanadat	5 µl	1 mM

PBS mit Protease-Inhibitoren & Phosphatase-Inhibitoren

PBS	8,094 ml	
100 mM PMSF	100 µl	1 mM
0,1 M EDTA	200 µl	2 mM
125 µg/ml Pepstatin A	56 µl	1 µM
10 µg/ml Leupeptin	500 µl	1 µM
350 mM NaF	1000 µl	35 mM
200 mM Na-Orthovanadat	50 µl	1 mM

0,1 M EDTA pH 8 (Ansatz: 20 ml)

EDTA	744 mg	0,1 M
mit bidest. Wasser auf	20 ml	
mit 1 M Natronlauge pH 8 einstellen		

10 µg/ml Leupeptin

Stocklösung:

Leupeptin	5 mg	1 mg/ml
bidest. Wasser	5 ml	

Arbeitslösung:

1 mg/ml Leupeptin	100 µl	10 µg/ml
bidest. Wasser	9900 µl	

500 mM Phenylmethylsulfonylfluorid-Stammlösung (PMSF) (Ansatz: 10 ml)

PMSF	871 mg	500 mM
Isopropanol	10 ml	

125 µg/ml Pepstatin A

Stocklösung:

Pepstatin A	5 mg	1,25 mg/ml
Methanol	4 ml	

Zum Erstellen der Arbeitslösung 100 µl Stocklösung mit 900 µl Methanol verdünnen.

1 M Tris-HCl pH 7,4 (Ansatz: 200 ml)

Tris	24,22 g	1 M
bidest. Wasser	200 ml	

mit Salzsäure auf pH 7,4 einstellen

1% Tris/Triton-Lösung (Ansatz: 500 ml)

1 M Tris-HCl pH 7,4	50 ml	1% (v/v)
TritonX-100	5 ml	1% (v/v)
bidest. Wasser	445 ml	

Lowry Kit

Reagenz S	20 µl
Reagenz A	1 ml

ergibt die Arbeitslösung A', davon je 100 µl vermischen mit 800 µl Reagenz B

BSA-Standards (Ansatz: 2 ml)

BSA-Stock: 8 mg BSA in 2 ml Probenpuffer (Tris-Triton) lösen		4 mg/ml
25 µl BSA-Stock + 1975 µl Probenpuffer		50 µg/ml
50 µl BSA-Stock + 1950 µl Probenpuffer		100 µg/ml
150 µl BSA-Stock + 1850 µl Probenpuffer		300 µg/ml
350 µl BSA-Stock + 1650 µl Probenpuffer		700 µg/ml
550 µl BSA-Stock + 1450 µl Probenpuffer		1100 µg/ml
750 µl BSA-Stock + 1250 µl Probenpuffer		1500 µg/ml

1.5 Lösungen für SDS-PAGE und Western-Blot**5x Elektrodenpuffer (Laufpuffer) pH 8,3 (Ansatz: 600 ml)**

Tris	9 g	125 mM
Glycin	43,2 g	7,2%
SDS	3 g	5%

Western-Blot-Transferpuffer (Ansatz: 1000 ml)

Tris	3,03 g	25 mM
Glycin	14,4 g	192 mM
Methanol	200 ml	20% (v/v)
mit bidest. Wasser auf	1000 ml	

Ponceau S-Lösung (Ansatz: 500 ml)

Ponceau S	1 g	0,2 % (w/v)
Trichloressigsäure	15 g	3% (w/v)
mit bidest. Wasser auf	500 ml	

TBS-Lösung (Tris Buffered Saline) pH 7,5 (Ansatz: 2000 ml)

Tris	12,1 g	50 mM
NaCl	17,52 g	150 mM
mit bidest. Wasser auf	2000 ml	

TBST (TBS + Tween 20) (Ansatz: 1000 ml)

Tween 20	1 ml	0,1% (v/v)
TBS	1000 ml	

1% Blocking Solution

Blocking-Stammlösung	10 ml	1%
TBS	90 ml	

Chemilumineszenzlösung (Ansatz: 3 ml)

Starter-Lösung	30 µl	1% (v/v)
Lumineszenz-Lösung	ad 3 ml	

Fixierer-Lösung (Ansatz 300 ml)

Fixierer-Stammlösung	60 ml	20 % (v/v)
mit bidest. Wasser auf	300 ml	

Entwickler-Lösung (Ansatz 300 ml)

Entwickler-Stammlösung	60 ml	20 % (v/v)
mit bidest. Wasser auf	300 ml	

0,2% (w/v) Natriumhydroxid-Lösung (Ansatz: 500 ml)

NaOH	1 g	0,2% (w/v)
mit bidest. Wasser auf	500 ml	

1.6 Lösungen für ³H-Thymidin-Assay**TCA 10% (Ansatz : 100 ml)**

Trichloressigsäure	10 g	10% (w/v)
mit bidest. Wasser auf	100 ml	

1 M Tris-HCl pH 7,4 (Ansatz: 200 ml)

Tris	24,22 g	1 M
------	---------	-----

mit bidest. Wasser auf 200 ml
mit HCl auf pH 7,4 einstellen

1 M NaOH (Ansatz: 100 ml)

NaOH 4 g 1 M
mit bidest. Wasser auf 100 ml

10x PBS-Puffer pH 7,4 - 7,5 (Ansatz: 1000 ml)

NaCl 80 g 1,37 M
KCl 2 g 27 mM
Na₂HPO₄ 11,5 g 81 mM
KH₂PO₄ 2 g 14 mM
mit bidest. Wasser auf 1000 ml

2. Chemikalien

Agarose	Serva; Roth
Amphotericin B, wasserlöslich	Sigma
Ampicillin, Sodium Salt	Sigma
AMV Reverse Transkriptase (9U/μl) mit	Promega
5x AMV RT-Puffer	Promega
Goat Anti-Rabbit IgG	BioRad
Anti-Phospho-p44/42	N. E. Biolabs
Anti-ERK-2 IgG	Santa-Cruz
Blocking Stammlösung	Boehringer
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Sigma
BSA	BioRad
Calciumchlorid	Merck
Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)	Boehringer M

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
DMEM/F12K (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture)	Sigma
DNA Smart-Ladder	EurogenTech
ECL Detektionskit	Boehringer M
Entwickler-Stammlösung	Sigma
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Etylendiamintetraacetat (EDTA), Disodium Salt	Sigma
EDTA, Tetrasodium Salt	Sigma
Fetales Kälberserum (FKS)	Seromed
Ficoll 400	Sigma
Fixierer-Stammlösung	Sigma
Fura-2, AM (Acetoxymethylester)	MP Europe
Glycin	Pharmacia
HCl	Merck
HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin- N'-2-ethanolsulfonsäure)	Roth
Isopropanol	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kaleidoskop Marker	Sigma
KH₂PO₄	Merck
Leupeptin (Hemisulfate Salt)	Sigma
Lipopolysaccharid von <i>E. coli</i> 0127:B8	Sigma
Lowry Kit	BioRad
L-α-LPA, Oleoyl (18:1, [cis]-9)	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck

Methanol	Merck
Natriumchlorid	Merck
NaF	Merck
NaOH	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Na₂HPO₄	Merck
Natriumorthovanadat	Sigma
Nonidet P-40	Sigma
Nukleotide für die RT-PCR:	
dATP	Boehringer M
dCTP	Boehringer M
dGTP	Boehringer M
dTTP	Boehringer M
Oligonucleotid (dT)18	MWG Biotech
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma
Pepstatin A	Sigma
Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA)	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Ponceau S	Boehringer M
RedTaq Polymerase (1U/ml) mit 10x PCR-Puffer	Sigma
RNAsin (40 U/μl)	Promega
Roti-Load	Roth
SmartLadder	Eurogene
Sphingosylphosphorylcholin (SPC)	Calbiochem
Starterlösung	Boehringer M
Streptomycin	Sigma

Szintillator Lumasafe plus	Lumac
³ H-Thymidin (spez. Aktivität 1 mCi/ml) NET-027A	Perkin Elmer
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Paesel&Lorei
Tris-(hydroxymethyl)-aminochlorid	Pharmacia
Triton X-100	Pharmacia
Trizol Reagent	Gibco BRL
Trypan Blue Stain (0,4%)	Sigma
Tween 20	Sigma

3. Primer für die PCR

rS1P ₁	(s: 5'-CTT CAG CCT CCT TGC TAT CG-3'; as: 5'-GCA GGC AAT GAA GAC ACT CA-3')	MWG Biotech
rS1P ₂	(s: 5'-TTC TGG TGC TAA TCG CAG TG-3'; as: GAG CAG AGA GTT GAG GGT GG-3')	MWG Biotech
rS1P ₃	(s: 5'-TCA GGG AGG GCA GTA TGT TC-3'; as: 5'-CTG ACT CTT GAA GAG GAT GG-3')	MWG Biotech
rS1P ₄	(s: 5'-TAT GGC TGC ATC GGT CTG TG-3'; as: 5'-TTG ATG GCT GAG TTG AGC AC-3')	MWG Biotech
rS1P ₅	(s: 5'-TGT TCC TGC TCC TGG GTA GT-3'; as: 5'-GTT TCG GTT GGT GAA GGT GT-3')	MWG Biotech
rLPA ₁	(s: 5'-ATT TCA CAG CCC CAG TTC AC-3'; as: 5'-ACA ATA AAG GCA CCC AGC AC-3')	MWG Biotech
rLPA ₂	(s: 5'-CAA GGA GCT CAG CCT TCA CT-3'; as: 5'-ACG TGC TCC GCC ATG CGT TC-3')	MWG Biotech
hLPA ₂	(s: 5'-CCA TCT ACT ACC TGC TCG GC-3'; as: 5'-AAG GGT GGA GTC ATC AGT GG-3')	MWG Biotech
rLPA ₃	(s: 5'-AAT GTG CAG CAC GTG AAG CG-3'; as: 5'-AGT GTG CAG CAC GTG AAG CG-3')	MWG Biotech
rβ-Aktin	(s: 5'-TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG GC-3'; as: 5'-AGA CGT CTT TAC GGA TGT CAA CG-3')	MWG Biotech

4. Arbeitsmaterialien & Arbeitsgeräte

Brutschrank	<i>Forma Scientific</i>
Fertiggel für die Proteinelektrophorese	Gradientengel, <i>BioRad</i>
Filmkassette, 18 x 24 cm	<i>Rothaar & Schröder</i>
Gelelektrophoresekammer	Model B2, <i>Owl Scientific Inc.</i>
Küvetten	10x10x45 mm, <i>Sarstedt West</i>
Photometer	DU-64, <i>Beckmann</i>
	<i>Gene Quant</i>
pH-Elektrode	<i>ino-Lab WTW</i>
Power Supply	Power Pac 300, <i>Bio-Rad</i>
	2297 Macrodrive 5, <i>LKB Bromma</i>
PCR-Robocycler	Gradient 96, <i>Stratagene</i>
Rocking Platform	<i>Biometra</i>
Standardkamm	1,5 mm, 12 Zähne, <i>peQLab</i>
Thermocycler	TB1, <i>MWG Biotech</i>
Video Copy Processor	<i>Mitsubishi</i>

II. Methoden

1. Präparation und Kultur von Ratten-Alveolarmakrophagen

1.1 Primärzellen: Alveolarmakrophagen der Ratte (RAM)

2 – 3 Monate alte Sprague-Dawley-Ratten (geboren im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn) wurden per Genickschlag betäubt und durch Durchtrennung des Rückenmarks unterhalb des Foramen magnum getötet.

Trachea und Lunge wurden präpariert und durch eine Bronchiallavage mit kalter PBS-Lösung wurden die Alveolarmakrophagen gewonnen. Pro Lunge wurden je dreimal 20 ml PBS instilliert und die Lavage in sterile Röhrchen transferiert.

Die Suspension aus Alveolarmakrophagen und PBS-Lösung wurde nun 10 Minuten bei 2500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die Sedimente wurden nach Verwerfen des Überstandes in 12 ml steriler PBS-Lösung resuspendiert und zu einer Zellsuspension vereinigt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Sediment in einer definierten Menge Kulturmedium für Alveolarmakrophagen der Ratte aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer unter gleichzeitiger Ermittlung der Zellvitalität durch Trypanblaufärbung bestimmt.

Auf diese Weise wurden zwischen 4 und 10 Millionen Zellen pro Rattenlunge gewonnen.

Die für die Versuche benötigte Anzahl von Zellen wurde in entsprechende Kulturschalen ausgesät und für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Adhäsionsphase fand ein Medienwechsel statt, bei dem störende Erythrozyten und nicht adhärenente Zellen entfernt wurden.

1.2. Kultur der Zelllinie NR 8383

Die Zelllinie NR 8383 ist eine von Alveolarmakrophagen der Ratte abgeleitet (Helmke et al., 1987). Zur kontinuierlichen Züchtung der NR 8383-Zellen wurden diese in Zellkulturflaschen ausgesät und mit dem speziellem Medium für NR 8383 bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dreimal wöchentlich fand ein Medienwechsel statt, wobei mit dem verbrauchten Medium auch ein großer Teil an nicht-adhärenenten Zellen verloren ging, da

NR 8383-Zellen etwa zur Hälfte am Kulturgefäß adhären und zur anderen Hälfte als Suspensionskultur wachsen.

Wurden die Zellen der Kultur für einen Versuchsansatz benötigt, so wurden die Überstände der Zellkulturflaschen in entsprechende Schalen ausgesät.

2. Präparation der RNA

Für die Präparation von Gesamt-RNA der Zellen wurden je 5 Millionen Alveolarmakrophagen auf Zellkulturschalen (\varnothing 35 mm) aufgebracht. Diese wurden 20 Stunden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS oder 0,1 μM PMA in 1 ml Makrophagenmedium bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen mit 1000 μl Trizol-Reagenz lysiert. Das Lysat wurde in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

Zur Weiterverarbeitung wurde nach Zugabe von 300 μl Chloroform das Reaktionsgefäß 15 Sekunden lang geschüttelt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Durch das Chloroform lysierten die Zellmembranen. Im Anschluss daran wurde die Probe 15 Minuten bei 4°C und 11600 g (12000 U/min) zentrifugiert.

Danach wurde die RNA-enhaltende Phase in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 700 μl Isopropanol und 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA präzipitiert. Anschließend wurde das Gemisch 10 Minuten bei 4°C und 11600 g (12000 U/min) zentrifugiert. Die RNA bildete ein gelartiges Sediment am Boden des Reaktionsgefäßes; der Überstand wurde dekantiert.

Der Niederschlag mit 1,5 ml 75% Ethanol gewaschen und erneut 5 Minuten bei 4°C und 8000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde in der Vakuum-Zentrifuge 20 Minuten getrocknet und dann in 25 μl DEPC-Wasser 10 Minuten bei 56°C inkubiert.

3. RNA-Konzentrationsbestimmung

RNA hat ein Absorptionsmaximum bei 320 nm, dieses Absorptionsmaximum kann zur photometrischen Konzentrationsbestimmung mittels UV-Licht genutzt werden. Dabei besteht eine lineare Beziehung zwischen der Anzahl gelöster Stoffe und der Menge absorbierten UV-Lichts. Die Schwächung eines Lichtstrahls durch Absorption (=Extinktion, E) entspricht dem Produkt aus Schichtdicke (d) der Küvette, Extinktionskoeffizient (e) und Konzentration (C) der gelösten Substanz. Diesen Zusammenhang beschreibt das Lambert-Beer-Gesetz:

$$E = d \cdot e \cdot C.$$

Durch einfaches Umstellen der Gleichung kann nun die Konzentration der RNA bestimmt werden.

$$C = E / (d \cdot e)$$

Zur Durchführung der Konzentrationsbestimmung wurden 2 µl der RNA-Probe mit 78 µl Wasser in einem Mischverhältnis von 1:40 verdünnt.

Die RNA-Probe wurde in eine Quarzküvette pipettiert und bei 280 nm und 320 nm im Photometer gemessen.

Es wurden anhand der oben genannten Formel neben der Absorption auch die Konzentration der RNA in der Probe und deren Ratio, also der Quotient aus der Absorption bei 280 nm und der Absorption bei 320 nm ermittelt. Die Ratio ist ein Maß für die Reinheit der Probe und sollte etwa 1,6 betragen.

4. Reverse Transkription (RT-Reaktion)

Bei der reversen Transkription wird RNA mit Hilfe des viralen Enzyms reverse Transkriptase in copy-DNA (cDNA) umgeschrieben. Die reverse Transkriptase ist eine RNA-gesteuerte DNA-Polymerase von Retroviren, die ein RNA-Genom besitzen. In vitro kann mit der reversen Transkriptase cDNA aus beliebiger RNA hergestellt werden. Für die vorliegende Arbeit wurde eine reverse Transkriptase aus dem Myoblastose-Virus AMV (Avian myoblastosis virus) eingesetzt.

Bei jeder RT-Reaktion wurden 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt, das Volumen schwankte also konzentrationsabhängig. War die Konzentration der RNA so hoch, dass weniger als 2 µl der RNA-Suspension pipettiert werden mussten, so wurde diese zuvor mit DEPC-

Wasser im Verhältnis 1:10 (10 µl RNA-Probe auf 90 µl DEPC-Wasser) verdünnt und die verdünnte Probe wie unten beschrieben eingesetzt.

Die Probe wurde mit DEPC-Wasser auf 20 µl aufgefüllt und 10 Minuten auf 65°C erhitzt. Nach dem folgenden Reaktionsansatz wurde ein Mastermix hergestellt, von welchem je 20 µl mit 20 µl denaturierter RNA-Probe vereinigt wurden.

	[µl]	Master-Mix [µl] x (n+1)	Endkonzentration
5 x RT-Puffer	8		1x
je 10 mM dNTPs	5		1,25 mM
40 U/µl RNAsin	1		40 U
DEPC-Wasser	2		
10 µM Oligo(dT) ₁₈ Primer	1		250 nM
9 U/µl AMV (reverse Transkriptase)	3		27 U
Endvolumen	20		

Das Gemisch aus Master-Mix und RNA inkubierte 60 Minuten bei 42°C. Danach wurde der Reaktionsansatz erneut für eine halbe Stunde auf 52°C erhitzt.

Nach einer kurzen Zentrifugation der Probe wurden noch 160 µl DEPC-Wasser hinzugefügt und der neu entstandene cDNA-Pool bei –20°C gelagert.

5. PCR-Reaktion und anschließende Gelelektrophorese

5.1 Die Polymerasekettenreaktion

Die 1986 entwickelte Polymerasekettenreaktion (Mullis et al., 1986) folgt einem einfachen Prinzip:

Sie macht sich die Wirkweise des Enzyms DNA-Polymerase der Zelle zu eigen, die bei der Zellteilung hauptverantwortlich für die semikonservative Replikation der DNA ist, da sie jeweils die komplementären Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) an der in zwei Einzelstränge gespaltenen DNA neu verknüpft.

Die DNA-Polymerase kann jedoch nicht *de novo* die Synthese beginnen. Sie benötigt dazu ein freies 3'-OH-Ende eines Starter-Oligonukleotids (Primer), welches mit dem komplementären DNA-Einzelstrang bereits einen partiellen Doppelstrang ausgebildet

hat. Es müssen daher bei jeder PCR pro zu amplifizierender Sequenz zwei verschiedene Primer mit gegensinniger Orientierung verwendet werden.

Mit diesen Primern kann ein beliebiges Stück DNA mit bekannter Sequenz ausgewählt und vervielfältigt werden.

Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird ein Gemisch aus DNA, dNTPs, zwei sequenzspezifischen Primern und einer DNA-Polymerase in einem Reaktionspuffer auf 95°C erhitzt und eine Auftrennung des DNA-Doppelstrangs in seine Einzelstränge erreicht. Schnelles Abkühlen der Reaktionstemperatur verhindert die Reassoziaton der beiden Einzelstränge.

Im nächsten Schritt, der Anlagerung (*Annealing*), kommt es bei einer Temperatur von 56°C zu einer Anlagerung der Primer an die beiden Einzelstränge, wobei diese so gewählt sind, dass sich der Sense-Primer am 5'-Ende und der Antisense-Primer am 3'-Ende der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz anlagert.

Im letzten Schritt, der Komplementärstrangsynthese (Extension), erfolgt bei einer Temperatur von 72°C mit Hilfe einer DNA-Polymerase die Neusynthese einer Doppelstrang-DNA ausgehend von den zuvor angelagerten Primern, die im nächsten Zyklus wiederum als Matrize für Denaturierung, Annealing und Neusynthese dienen kann.

Es handelt sich bei der PCR also um eine *in-vitro*-Replikation eines bestimmten DNA-Abschnitts, die über sich wiederholende Reaktionszyklen erreicht wird. Da es in jedem Zyklus zu einer Verdopplung der Ausgangsmatrizen kommt, ist theoretisch eine exponentielle Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts möglich. Durch limitierende Faktoren, z.B. Aktivitätsabnahme der Polymerase, fortschreitende Abnahme der Primerkonzentration, wird dies jedoch in der Praxis nicht erreicht.

Normale DNA-Polymerasen würden aufgrund ihrer Proteinbeschaffenheit bei diesem Vorgang hitzebedingt denaturieren, daher verwendet man für die PCR die hitzebeständige Taq-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*, welche die initiale

Denaturierungstemperatur von 95°C übersteht und daher eine Automatisierung der PCR und eine große Anzahl von PCR-Zyklen hintereinander ermöglicht.

Der übliche PCR-Ansatz sah folgendermaßen aus: Je 2 µl (500 nM) des gewünschten Primer-Paares und 4 µl der cDNA wurden mit 6,5 µl des unter I.1.3 beschriebenen Mastermixes vermischt und mit sterilem Wasser auf 40 µl aufgefüllt.

Denaturierung	94°C	3 min	⇒ initial
	94°C	45 s	
Annealing	56°C	30 s	
Extension	72°C	1 min	⇒ 25 bzw. 35 Zyklen
	72°C	10 min	⇒ 1x zum Ende der PCR

Für die Primer rLPA₁, rLPA₂, rLPA₃, rS1P₁, rS1P₂, rS1P₃, rS1P₄, rS1P₅ wurde eine PCR mit 35 Zyklen bei 56° Annealing Temperatur durchgeführt. Als Positivkontrolle diente eine PCR mit dem rβ-Aktin-Primerpaar.

5.2 Herstellung eines Agarosegels

Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 1,8 g Agarose in 150 ml 1x TBE-Puffer eingewogen und aufgekocht. Nach Abkühlen auf ungefähr 50°C wurden 5 µl einer 1%igen Ethidiumbromidlösung zugesetzt.

Ethidiumbromid ist ein fluoreszierender, interkalierender Farbstoff, der sich etwa alle 4-5 Nukleotide zwischen den Strangwindungen doppelsträngiger DNA einlagert. Die DNA kann auf diese Weise unter UV-Licht detektiert werden.

Anschließend wurde das Gel in einen Gelträger gegossen. Mit Gelkämme wurden Taschen im Gel ausgespart, in welche die DNA-Proben aufgetragen wurden.

5.3 Gelelektrophorese

Die Elektrophorese beschreibt den Transport geladener Partikel durch ein elektrisches Feld. Durch den Molekularsiebeffekt der Agarose kommt es zu einer Auftrennung der negativ geladenen Nukleinsäuren entsprechend ihrer Fragmentgröße bei ihrer Wanderung zur Anode.

Zur Durchführung der Elektrophorese wurde das Agarosegel in eine horizontale Pufferkammer eingelegt und vollständig mit Laufpuffer (0,5x TBE-Puffer) bedeckt. 38 µl der PCR-Probe wurden zur Beschwerung mit 5 µl Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert.

Um die Größe der amplifizierten DNA-Stücke zu überprüfen, wurde ein Marker (*SmartLadder*) mit einer definierten Anzahl von Basenpaaren aufgetragen.

Bei konstanter Stromstärke von 70 mA und einer Spannung von 220 Volt wurde die Gelelektrophorese so lange durchgeführt, bis der Farbmarker die Unterkante des Gels erreichte.

Das fertige Gel wurde auf dem Transilluminator unter UV-Licht betrachtet.

Anschließend wurde ein Photo auf Thermopapier erstellt und abgespeichert, welches der densitometrischen Auswertung der Banden diente. Eine semiquantitative Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm RFLPscan 2.01 der Firma MWG Biotech. Hierbei wurden anhand der optischen Dichten der Probenbande und der Kontrollbande mit dem β -Aktin-Primerpaar Quotienten gebildet.

6. Proteinpräparation

Es wurden sämtliche in der Zelle befindlichen Proteine präpariert. Hierzu wurde die NP-40-Methode genutzt. Phosphatase- (PhI) und Proteaseinhibitoren (PI) wurden zugegeben, um eine Degradation der Proteine zu verhindern.

Je 5 Millionen Makrophagen wurden in Zellkulturschalen (\varnothing 35 mm) ausgesät. Dort wurden sie mit unterschiedlichen Substanzen in 1-2 ml Makrophagenmedium für 20 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Medium abgesaugt und die verbliebenen adhärennten Makrophagen mit 2 ml warmer PBS-Lösung gewaschen. Mit 1 ml PBS, die Phosphatase- und Proteaseinhibitoren enthielt, und einem sterilen Zellschaber wurden die Zellen vom Boden der Kulturschale abgelöst, resuspendiert und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Vorgang wurde an derselben Kulturschale mit 500 µl PBS plus PI/PhI wiederholt und die zweite Zellsuspension wurde mit der ersten vereinigt.

Um Proteolyse oder Phospholyse zu vermeiden standen alle Reaktionsgefäße auf Eis. Die jeweils 1,5 ml Zellsuspension wurden für fünf Minuten bei 4°C und 6000 U/min in der Kühlzentrifuge sedimentiert, wobei der entstehende Überstand verworfen wurde. Das Sediment wurde in 50 µl NP-40 Puffer, dem PI und PhI beigesetzt waren, resuspendiert. Der NP-40 Puffer bewirkte eine vollständige Lyse der Zellen, nur die Zellkerne blieben intakt. Um die Nuklei aus dem Lysat zu entfernen, wurde 10 Minuten bei 4°C und 6000 U/min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein neues, steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und der Niederschlag aus Zellkernen verworfen.

7. Proteinbestimmung nach der Lowry-Methode

Zur Proteinbestimmung nach der Lowry-Methode wurde das DC Protein Assay der Firma BioRad nach den Vorgaben des Herstellers eingesetzt. Zunächst wurden 5 µl der Makrophagen-Proteinprobe mit 100 µl des Arbeitsreagenzes A' versetzt, welches zuvor aus den Kit-Komponenten A und S hergestellt worden war (pro ml Lösung A 20 µl Lösung S).

Genauso wurde mit je 50 µl der Standards aus Rinderserumalbumin verfahren, die in den Konzentrationen 50, 100, 300, 700, 1100 und 1500 µg/ml mit 0,1 %igem Tris-Triton hergestellt worden waren. 50 µl 0,1 %iges Tris-Triton wurden als Leerwert eingesetzt. Anschließend wurde allen Proben 800 µl Reagenz B hinzugefügt und sofort gut durchmischt.

Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Proben bei 750 nm am Photometer vermessen. Die Erstellung einer Regressionsgeraden mit den Extinktionswerten der Standards ermöglichte die Auswertung der Proben.

8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei einer eindimensionalen Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) werden die Proteine in Gegenwart von SDS (Sodiumdodecylsulfat) aufgrund ihres Molekulargewichtes in Richtung Anode getrennt. Durch den Zusatz des anionischen Detergenz wird die Eigenladung der Polypeptide überdeckt und alle Proteine erhalten die gleiche negative Ladung, so dass eine Trennung nur aufgrund der Masse des Proteins möglich ist.

Das optimale Probenvolumen betrug 10 bis 15 µl und enthielt 50 µg Protein. Gegebenenfalls wurden die Proben mit PBS-Lösung verdünnt. In ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde ein Drittel des Volumens der eingesetzten Proteinprobe an Roti-Load-Reaktionspuffer vorgelegt. Die Proben wurden mit dem reduzierenden Roti-Load-Reagenz vereinigt, welches an das Protein bindet und dieses somit beschwert. Gleichzeitig bewirken niedermolekulare Thiole im Probenpuffer eine Reduzierung von Disulfidbrücken in den Polypeptidketten. Das spätere Beladen der Geltaschen, die bereits von Elektrodenpuffer umgeben waren, wurde so ermöglicht und die Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen optimiert.

Die Probenlösung wurde 2 min bei 100°C im Wasserbad hitzedenaturiert. Nach einer kurzen Zentrifugation der Proben, um die Suspension möglichst komplett am Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln, konnten diese mit speziellen, kapillären Pipettenspitzen in die Taschen des Gels gefüllt werden.

Als Größenstandard wurden 5 µl des Kaleidoskop-Markers eingesetzt.

Zur Gelelektrophorese wurde ein Polyacrylamidgel der Firma Biorad verwendet. Es handelte sich um Gradientengel mit einer Polyacrylamidkonzentration zwischen 10% und 20%, was verhindert, dass kleinere Proteine das Gel zu schnell durchwandern.

Das Gel wurde in eine Gelkammer eingespannt, beladen und die Elektrophorese unter Verwendung von 1x Elektrodenpuffer als Laufpuffer bei konstanter Stromstärke von 60 mA und einer Spannung von 200 Volt durchgeführt.

9. Western-Blot

9.1 Das Prinzip des Western-Blots

Bei einem Western-Blot werden die Proteinbanden eines Polyacrylamid-Gels unter Einwirkung einer konstanten elektrischen Spannung und Stromstärke auf eine proteinbindende Membran transferiert, um diese schließlich sichtbar zu machen. Die Proteine können nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit einem antigenspezifischen Erstantikörper markiert und nach Bindung eines Zweitantikörpers visualisiert werden. Mit Hilfe eines Enzymkonjugats erfolgt hierbei die Bildung von

Chemilumineszenz, deren Lichtintensität auf einen Röntgenfilm übertragen wird, wonach die Proteinbanden in Dichte, Größe und Laufhöhe mit dem Marker verglichen werden können.

9.2 Vorbereitungen

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel aus der Klammerapparatur herausgelöst und die Anordnung der Proben auf dem Gels markiert.

Dann wurde das Gel 5 min in Transferpuffer geschwenkt, um anhaftende Salz-Komponenten und Detergenzien des Elektrophoresepuffers zu entfernen.

Eine auf Gelgröße zurechtgeschnittene Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran wurde zunächst 3 Sekunden mit Methanol angefeuchtet, dann 2 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und schließlich 20 Minuten lang in Transferpuffer equilibriert.

Ebenfalls auf Gelgröße zurechtgeschnitten waren zwei Filterpapiere und zwei Schwämme, die vorbereitend in Transferpuffer getränkt wurden.

Damit der Transferpuffer während des Versuchs eine Temperatur von 4°C hatte, wurde eine Kühleinheit eingesetzt.

9.3 Durchführung des Western-Blots

Der Proteintransfer wurde elektronisch im Wet- oder Transblot-Verfahren nach Towbin et al. (1979) durchgeführt.

Die Kühleinheit, die Blot-Elektrode und die Gelhalterungskassette wurden in den Tank eingehängt, der als Pufferkammer diente. Die Pufferkammer wurde bis zum oberen Rand der Gelhalterungskassette mit Transferpuffer gefüllt, und für eine Stunde wurde eine konstante Spannung von 100 Volt und eine Stromstärke von 250 mA angelegt.

9.4. Proteindetektion durch Antikörper

Nach Vollendung des Blotvorgangs befanden sich auf der PVDF-Membran spiegelbildlich angeordnet die Proteinbanden, die zunächst im Gel aufgetrennt worden waren, wodurch sie für die Antikörperdetektion zugänglich waren. Zu diesem Zweck

wurde die Membran nacheinander mit einem primären und einem sekundären Antikörper behandelt.

Der spezifische primäre Antikörper bindet an Proteine, die auf der polymeren Matrix der PVDF-Membran gebunden liegen. Der sekundäre Antikörper *Goat Anti Rabbit* (Ziege gegen Kaninchen) ist ein spezifisch gegen das Fc-Fragment des Kaninchenantikörpers gerichtetes Immunglobulin der Klasse G aus der Ziege. Dieses Immunglobulin ist mit dem Enzym HRP (horse reddish peroxidase, Meerrettichperoxidase) konjugiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei primäre Antikörper in zwei verschiedenen Schritten eingesetzt. Zunächst wurde das Kaninchen-Immunglobulin Phospho-p-44/42, das spezifisch gegen ein Antigen der phosphorylierten p44/42-ERK/MAP-Kinase gerichtet ist, auf die Membran gegeben.

Nach Behandlung der Membran mit primärem und sekundärem Antikörper hatte sich an den Stellen, wo phosphorylierte ERK-1/2 an die Matrix gebunden worden waren, ein Komplex aus Antigen, Antikörper und Zweitantikörper gebildet. Durch die Enzymmarkierung des Sekundärantikörpers konnte das geblottete Protein indirekt sichtbar gemacht werden, da nach Zugabe eines entsprechenden Substrats mittels HRP ein lichtemittierendes Produkt (Chemilumineszenz) gebildet wurde, welches am Ort seiner Entstehung Licht ausstrahlte. Diese Lichtemission war proportional zur Menge des gebundenen Antikörpers und konnte durch Exposition eines Röntgenfilms dokumentiert werden.

Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Membran im Anschluss an den Western-Blot mit der dem Gel zugewandten Seite nach oben in einer Petrischale mit Ponceau-S-Färbelösung inkubiert. Die Proteinbanden färbten sich stark rot an.

Nach einer Waschung mit destilliertem Wasser wurden die einzelnen Bahnen und Proteinbanden markiert. Danach wurde die Membran in TBS-Lösung entfärbt.

In einem weiteren Schritt wurde 1%ige Blocking Solution auf die Membran gegeben und diese über eine Stunde unter leichtem Schwenken inkubiert. Dieses „Blocken“ diente dazu, überschüssige Proteinbindestellen der Membran zu saturieren und eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu verhindern. Im Anschluss an diese

Behandlung wurde die Membran mit dem in 0,5%iger Blocking Solution in einem Verhältnis von 1:1000 gelösten primären Antikörper inkubiert.

Während einer Stunde auf dem Taumler bei Raumtemperatur band der Antikörper spezifisch an Phosphat-Gruppen der p44/42-ERK. Die nicht gebundenen Antikörperanteile wurden anschließend zweimal je 10 Minuten in TBST-Lösung unter Schwenken ausgewaschen.

Zur Vorbereitung auf den sekundären Antikörper wurde die Membran zweimal je 10 Minuten in 0,5%iger Blocking Solution vorbehandelt. Mit 0,5%iger Blocking Solution wurde der zweite Antikörper auf ein Verhältnis von 1:2667 verdünnt und auf die Membran gebracht. 30 Minuten wurde die Membran in der Antikörper-Suspension geschwenkt. Danach wurden die nicht gebundenen Anteile des Sekundärantikörpers in TBST-Lösung viermal je 15 Minuten herausgewaschen.

Die Membran wurde 60 Sekunden in Dunkelheit mit der Chemilumineszenzlösung benetzt. Diese Zeit reichte aus, um den Substratumsatz der Peroxidase zu gewährleisten. Unmittelbar im Anschluss daran wurde die Membran aus der Lösung herausgenommen und in Plastikfolie eingeschlagen, in eine Filmkassette eingelegt und einem entsprechend zugeschnittenen Stück Röntgenfilmpapier exponiert.

Die Filmkassette wurde für eine definierte Zeit, meist 10 Minuten und anschließend weitere 2 Stunden geschlossen, wobei der Röntgenfilm durch die Lichtemission überall dort geschwärzt wurde, wo chemilumineszierendes Produkt gebildet worden war.

Die Schwärzung wurde sichtbar durch dreiminütiges Einlegen des belichteten Films in Entwicklerlösung. Nach Abwaschen der Lösung mit H₂O wurde das Bild durch ein 3 bis 5 Minuten währendes Bad in Fixierlösung auf dem Film fixiert. Danach war der Film nicht mehr lichtempfindlich.

Auf dem Röntgenfilm konnten nun Proteinbanden identifiziert werden und anhand ihrer Lokalisation mit dem Kaleidoskop-Marker verglichen werden. Somit konnte die Größe der detektierten Proteine qualitativ bestimmt werden. Die Dichte der Schwärzung des Films war ein quantitatives Maß für das Vorhandensein von phosphorylierter ERK/MAP-Kinase.

Nach dieser ersten Detektion der aktivierten ERK-Proteine wurde die Membran in destilliertem Wasser gewaschen und zum Lösen der Antigen-Antikörper-Bindungen 5 Minuten in 0,2% NaOH-Lösung gelegt. Die Membran wurde noch einmal 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und schließlich über Nacht bei 4° Celsius in 1% Blocking Lösung gelegt.

Dann wurden alle Arbeitsschritte wie unter 9.4 beschrieben erneut durchgeführt, doch anstelle des p44/42-Antikörpers wurde als primärer Antikörper Anti-ERK-2 in der Verdünnung 1:500 eingesetzt. Anti-ERK-2 bindet unspezifisch an die ERK-1 und ERK-2 unabhängig davon, ob sie phosphoryliert sind oder nicht. Mit dem ersten Antikörper wurden also alle phosphorylierten (d.h. aktivierten ERK) detektiert, mit dem zweiten hingegen die Gesamtheit der in der Zelle befindlichen ERK unabhängig von ihrem Aktivierungsgrad. Analog dazu galt die Schwärzung des Films nach Zugabe des zweiten Antikörpers als quantitatives Maß für das Vorhandensein von ERK/MAP-Kinase in den Zellen. Die zweite Detektion war somit die Positivkontrolle der Versuche. Zur statistischen Auswertung wurde stets ein Quotient aus der optischen Dichte der Bande der ersten Detektion und der optischen Dichte der Bande der zweiten Detektion gebildet. Die semiquantitative densitometrische Auswertung der Proteinbanden durch deren Umrechnung in Integrale der optischen Dichte erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms RFLPscan 2.01 der Firma MWG Biotech.

10. Proliferationsversuche (³H-Thymidin-Inkorporations-Assay)

10.1 Vorbereitung des Proliferationsversuchs

Wenn lebende Zellen proliferieren, so findet während der Zellteilung die semikonservative Replikation der DNA statt, das heißt, es wird eine große Anzahl von Nukleotiden fest in die neu entstehende Doppelhelix eingebaut. Die Menge der eingebauten Nukleotide ist also ein indirektes Maß für das Ausmaß der Zellteilungen.

Um diese Menge zu bestimmen, wurde das mit Tritium radioaktiv markierte Nukleotid ³H-Thymidin eingesetzt, welches zu Versuchsende photometrisch erfasst wurde. ³H-Thymidin wies eine Aktivität von 1 mCi pro ml (37 MBq/ml) auf.

Je 0,5 Millionen Zellen vom Typ NR 8383 wurden aus verschiedenen Zellkulturflaschen passagiert, zu einem großen Zellpool vereinigt und in 12er Zellkulturplatten ausgesät. LPA und S1P wurden in den Konzentrationen 0,1 μM , 1 μM , 10 μM und 50 μM getestet. Die Testsubstanzen wurden 24 Stunden lang bei 37°C mit 5% CO_2 inkubiert. Es diente jeweils ein Versuchsansatz, der nur frisches Medium enthielt, als Kontrolle der Versuchsreihe. Da der Zusatz für das normale Nährmedium, FKS (fetales Kälberserum), selbst LPL-haltig ist, wurden die Versuche jeweils ohne FKS, mit Zusatz von 15% FKS, welches die Standardkonzentration darstellt, und mit 7,5% FKS durchgeführt. Nach 24 h wurde in jede Kulturschale 1 μl radioaktiver ^3H -Thymidinlösung pipettiert. Erneut wurden die Zellen 24 h bei 37°C und 5% CO_2 bebrütet. Dann wurde das Medium, welches die nicht adhärenen Zellen enthielt, in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Am Boden der Kulturschälchen verblieb die adhärenente Zellschicht.

10.2 Nicht-adhärenente Zellen

Die Zellsuspension wurde 5 Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert, der Überstand wurde dekantiert. Das Sediment wurde in 1 ml PBS-Lösung resuspendiert und gut vermischt. Die Suspension wurde erneut 5 Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu den Zellen wurde 1 ml 10%iger TCA-Lösung dazugegeben, um die Proteine zu präzipitieren. Dazu wurde die Zellsuspension 10 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Danach wurde die Suspension 5 Minuten bei 10000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Sediment wurde mit 1 ml PBS gewaschen und mit 500 μl 0,1 M NaOH vermischt.

Die Zellsuspension wurde zur alkalischen Lyse eine Stunde bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und dabei alle 20 Minuten auf dem elektrischen Vortexer vermengt.

10.3 Adhärenente Zellen

Die adhärenenten Zellen wurden mit 1 ml PBS gewaschen. Mit 1 ml 10%iger TCA, die 5 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 einwirkte, wurden die Proteine ausgefällt.

Nach 5 Minuten wurde die TCA-Lösung abpipettiert und die Zellen ein weiteres Mal mit 1 ml PBS gewaschen. Dann wurden 500 μl 1 M NaOH in die Zellkulturschalen

hinzugefügt, die anschließend im Brutschrank mit den nicht-adhären Zellen 1 bis 2 Stunden lysiert wurden.

10.4 Gemeinsame Weiterverarbeitung

Durch die Zugabe von NaOH lösten sich die Zellen von den Kulturschalen ab. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Suspensionen der nicht-adhären Zellen mit den dazugehörigen adhären Zellen wiedervereinigt und weiterverarbeitet.

200 µl Tris-HCl neutralisierten die Lauge. 50 µl der Reaktionssuspension wurden für eine Proteinmengenbestimmung nach Lowry mit dem DC Protein-Assay eingesetzt.

300 µl wurden mit 3 ml Szintillationslösung versetzt und konnten im Zähler für Radioaktivität vermessen werden.

Die Szintillationslösung besteht aus einem organischen Detergenz, das Fluor enthält. Tritium ist ein schwacher Betaemitter. Wenn jetzt ein Tritiumatom zerfällt, so emittiert es Elektronen, die in der Szintillationslösung auf Fluoratome treffen. Die Fluoratome strahlen die Energie der Elektronen als Photonen aus, die im Detektor ermittelt werden. Die Menge der Lichtimpulse hängt mit der Energie des Betaemitters zusammen und wird vom Detektor als Zählimpulse pro Minute angegeben (CPM = Counts per Minute). Die Rate des tatsächlichen radioaktiven Zerfalls pro Minute (DPM = Disintegrations per minute) ist jedoch durch Dämpfung der emittierten Lichtimpulse („Quenching“) stets höher als die ermittelten CPM. Die die Zähleffizienz des Counters wurde hier durch externe Standardisierung bestimmt, so dass die DPM errechnet werden konnten.

11. Calcium-Mikrofluorimetrie

11.1 Das Prinzip der Mikrofluorimetrie

In den achtziger Jahren wurde ein Verfahren zur Messung der intrazellulären Calciumströme entwickelt (Grynkiewicz et al., 1985): Mikrofluorimetrie (Calcium-Imaging).

Ein Fluoreszenzfarbstoff wird in eine Zelle eingebracht und ändert dort seine optischen Eigenschaften in quantitativer Abhängigkeit von der umgebenden Calcium-Konzentration. Damit ist es möglich, Calcium direkt und in hoher zeitlicher Auflösung zu messen. Bei dem hier verwendeten Farbstoff handelte es sich um den Phorbol ester

Fura-2, ein polycyclischer Chelatbildner, welcher sehr gut die Plasmamembran penetrieren kann und nach Einbringen in die Zelle eine Esterspaltung erfährt, die es dem Spaltprodukt unmöglich macht, die Zelle wieder zu verlassen. Fura-2 bindet sehr spezifisch und sehr sensitiv (ab einer Konzentration von 30 nM) an Ca^{2+} .

Fura-2 hat nur einen Emissionspunkt bei 510 nm, zeigt jedoch zwei von der Calcium-Konzentration abhängige Absorptionsmaxima bei 340 nm und 380 nm. Die Absorption bei 340 nm steigt proportional zur Konzentration des ionisierten Ca^{2+} an, während die Absorption bei 380 nm gleichzeitig absinkt. Wenn eine mit Fura-2 gefüllte Zelle mit Anregungslicht der Wellenlänge 340 nm beleuchtet wird, fluoresziert der Farbstoff mit der Intensität F_{340} , analog passiert dies bei 380 nm. Der Quotient (Ratio) F_{340}/F_{380} ist nur von der intrazellulären Calcium-Konzentration abhängig, nicht jedoch von der Farbstoffkonzentration oder der Zellwanddicke.

Die Messung der Lichtemission erfolgte daher nach jeweils 5 ms dauernder alternierender Anregung der Zellen bei 340 bzw. 380 nm Wellenlänge. Dazu wurde ein in den Strahlengang des Mikroskops eingebauter Monochromator benutzt.

Zu Versuchsende wurde für jede markierte Zelle ein Diagramm erstellt, in welchem die Veränderung der Calcium-Ionen-Konzentration gegen die Zeit aufgetragen wurde.

11.2 Vorbereitung des Versuchs

Für die Durchführung des Versuches war es notwendig, dass die Zellen auf einem dünnen Glasplättchen anhaftend wuchsen, welches in die Objekthalterung eines Mikroskops eingespannt wurde. Vorbereitend wurden sie in Zellkulturschalen ausgesät, auf deren Boden sich ein solches Glasplättchen befand. Als Versuchsmedium wurde FKS-freies Zellkulturmedium verwendet, da FKS LPL enthält, deren Wirkung auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration untersucht werden sollte.

Nach 20 Stunden Ruhephase wurden die Zellen mit Fura-2 inkubiert, welches von den Zellen über eine Dauer von 30 Minuten in absoluter Dunkelheit bei Raumtemperatur aufgenommen wurde. Danach wurde das Glasplättchen mit einer Pinzette aus der Zellkulturschale entnommen und in die Halterung des Objektträgers eingespannt.

11.3 Versuchsaufbau

Die schalenförmige Halterung für den Objektträger mit kreisrunder Grundfläche enthielt zwei Stützen, eine Zufluss- und eine Abflussöffnung, an welchen Zulauf- und Ablaufschlauch am Objektträger befestigt wurden. Die Schläuche wurden an einer elektrischen Pumpe befestigt, deren Endstücke in ein Becherglas mit frischem Versuchsmedium und ein leeres Becherglas für verbrauchte Lösung mündeten.

Die Pumpe sorgte dafür, dass der Objektträger stets von Versuchslösung umspült war und dass die Lösung auf der anderen Seite wieder abgepumpt wurde, damit die Halterung nicht überlief.

Das Okular des Lichtmikroskops vergrößerte den Versuch 40 x 100fach mit Hilfe der Öl-Immersionstechnik. Über dem Okular des Mikroskops befand sich eine Kamera, die an einen Computer angeschlossen war. Mit Hilfe dieser Kamera konnte ein farbkodiertes mikroskopisches Bild der Versuchsanordnung auf den Bildschirm projiziert werden. Die lokale Konzentration des freien Calcium (indirekt gemessen durch die Absorption des Fluoreszenzfarbstoffes) zeigte sich nach Versuchsende im Zeitraffer durch Farbänderungen von blau (wenig Calcium) zu rot (viel Calcium).

11.4 Versuchsdurchführung

Mittels der elektrischen Pumpe wurden die Zellen nun mit Krebs-Hepes-Puffer 40 Minuten gespült, wodurch das ungebundene Fura-2 entfernt wurde. Unter dem Mikroskop wurde ein Ausschnitt mit einer geeigneten Zellpopulation ausgewählt und in der Mitte des Sichtfeldes zentriert. Auf dem Bildschirm zeigte sich ein Transmissionsbild (Durchlichtbild).

Dann wurde das Messprogramm am Computer gestartet, ein Fluoreszenzfilter in den Strahlengang des Mikroskops zwischengeschaltet und dem Versuch kontinuierlich Versuchslösung, welche die Testsubstanz LPA in der Konzentration 1 μM oder 10 μM enthielt, zugeführt. Die Kamera schoss eine definierte Anzahl von Bildern in einer festgelegten Zeit: 1500 Bilder mit einer Frequenz von 1 Hertz. Nach 1500 Messzyklen war der Versuch beendet. Während der Versuchsdurchführung waren die induzierten Veränderungen auf dem Computerbildschirm zu sehen.

Zur Auswertung der Messergebnisse mussten die einzelnen Zellen auf dem Bildausschnitt – etwa 15 bis 25 Zellen pro Versuch – als Regions of Interest (ROI)

markiert und ihre spezielle Calcium-Index-Änderung graphisch ausgedrückt werden. Die Aufnahme der mikroskopischen Bilder der Calcium-Versuche, deren farbkodierte Darstellung im Zeitraffer, die Ergebnispräsentation als Kurvendiagramm und die mathematische Darstellung in Gestalt eines Calcium-Index erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms TILLvisIONS der Firma Till Photonics, Deutschland.

Die Rohdaten der Messung wurden in Excel-Dokumente überführt und dort weiter ausgewertet.

12. Statistik und Kalkulation

Die Daten der Versuchsergebnisse wurden jeweils als arithmetischer Mittelwert (MW) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM), bzw. als Prozent der Kontrolle wiedergegeben. Mit Hilfe des Programms Graph Pad InStat wurden signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten berechnet. Es wurden stets Absolutwerte und Prozentwerte miteinander verglichen. Der Vergleich zweier Messreihen erfolgte durch den gepaarten, zweiseitigen *t*-Test nach Student. Statistische Unterschiede mit einer Wahrscheinlichkeit $p < 0,05$ galten als signifikant.

Das Computerprogramm GraphPad Prism 4.0 wurde verwendet, um die Versuchsergebnisse graphisch darzustellen.

Sämtliche Tabellen und Eichgeraden wurden mit Hilfe von Microsoft Excel XP erstellt.

C. Ergebnisse

I. Funktionelle Untersuchungen an Ratten-Alveolarmakrophagen

1. Messung der intrazellulären Calcium-Ströme mittels Calcium-Mikrofluorimetrie nach Stimulation mit LPA

Es wurde eine Calcium-Mikrofluorimetrie gemäß der Beschreibungen in Teil B.II.11 durchgeführt. LPA wurde als Testsubstanz in den Konzentrationen 0,1 μM und 1 μM eingesetzt. Als Testzellen wurden primäre Alveolarmakrophagen untersucht, die wie unter B.II.1 beschrieben gewonnen worden waren.

Die Inkubation der Alveolarmakrophagen mit LPA führte sowohl in der Konzentration 0,1 μM LPA (n=75) als auch in der Konzentration 1 μM LPA (n=66) innerhalb weniger Minuten zu einer charakteristischen Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in etwas mehr als der Hälfte der untersuchten Zellen. Die Reaktionen verliefen nach dem Alles-oder-nichts-Prinzip: Zellen, die auf Stimulation durch LPA mit Ca^{2+} -Influx in das Zytosol reagierten, zeigten ein untereinander sehr ähnliches Reaktionsbild. Unabhängig von der Konzentration des eingesetzten LPA kam es zu spitzen Oszillationen um die Basislinie herum. In allen untersuchten Zellen kam es über die Zeit zu einem kontinuierlichen, unspezifischen Anstieg des Calcium-Gehalts.

Abbildung Nr. 4 zeigt beispielhaft diese charakteristische Aktivierung der Zellen bei einer LPA-Konzentration von 0,1 μM . In Abbildung Nr. 5 ist ein Kurvendiagramm zur Reaktion einer Zelle nach Stimulation mit 1 μM LPA zu sehen. Abbildung Nr. 6 zeigt eine Zelle, die trotz Inkubation mit LPA ihre intrazelluläre Calcium-Konzentration nicht auf diese charakteristische Weise verändert.

Der auf der Y-Achse der Abbildungen skalierte Ca^{2+} -Index ist ein einheitsloses Maß für die intrazelluläre Calcium-Konzentration. Er errechnet sich aus der Absorption bei 340 nm und bei 380 nm Wellenlänge; der Quotient F_{340}/F_{380} bildet den Ca^{2+} -Index. Je höher der Index, desto höher die Ca^{2+} -Konzentration.

Die weitere Auswertung der Versuche erfolgte nach Anzahl der reagierenden Zellen eines Versuches, der durchschnittlichen Anzahl von Oszillationen, der mittleren Amplitude dieser Oszillation und dem Zeitfenster, in welchem die gesamte Reaktion abließ. Tabelle 4 verschafft einen Überblick über die Ergebnisse.

Substanz	Zellen	n	Antworten	%	d_i	Ausschläge	t_{\min} [min]	t_{\max} [min]
0,1 μM LPA	RAM	25	9	36	108	3,4	0,29	6,31
0,1 μM LPA	RAM	25	13	52	325	4,6	2,29	7,14
0,1 μM LPA	RAM	25	16	64	131	5	1,82	6,91
Gesamt:			38					
Mittelwert:			12,7	50,7	188	4,3	1,5	6,8
SEM:			2,0	8,1	68,8	0,5	0,6	0,3
1 μM LPA	RAM	26	14	54	98	6,4	0,84	7,26
1 μM LPA	RAM	15	10	67	83	4,2	2,19	4,62
1 μM LPA	RAM	25	10	40	99	4,4	1,96	6,07
Gesamt:		66	34					
Mittelwert:			11,3	53,5	93,3	5,0	1,7	6,0
SEM:			1,3	7,7	5,2	0,7	0,4	0,8

Tabelle 4: Wirkung von LPA auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von RAM.

Die Calcium-Mikrofluorimetrie zeigte nach Stimulation der RAM mit 0,1 μM LPA und 1 μM LPA eine oszillierende Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration in über 50% der Fälle. Hier abgebildet sind die Anzahl der reagierenden Zellen (absolut und prozentual), die durchschnittliche Amplitude der Konzentrationsänderung ausgedrückt als Calcium-Index, die durchschnittliche Anzahl der Ausschläge, sowie Beginn und Ende der Reaktion.

Legende: n (Anzahl der untersuchten Zellen pro Versuch), d_i (mittlere Höhe der Amplituden des Ausschlages), Ausschläge (Anzahl der scharfen Oszillationen), t_{\min} (minimale Dauer bis zum Beginn der Reaktion in Minuten), t_{\max} (maximale Dauer der Reaktion in Minuten).

Bei einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ LPA reagierten durchschnittlich $50,7 \pm 8,1\%$ der Zellen. Die oszillierende Schwankung der Calcium-Ströme vollzog sich in einem Zeitraum von $1,5 \pm 0,6$ Minuten bis $6,8 \pm 0,3$ Minuten nach Zugabe von LPA. Die Graphen, welche diese Veränderung darstellen, zeigten durchschnittlich $4,3 \pm 0,5$ Ausschläge mit einer mittleren Amplitude von $188 \pm 68,8$ Einheiten. Es wurden 75 Zellen untersucht (s. Abb. 4).

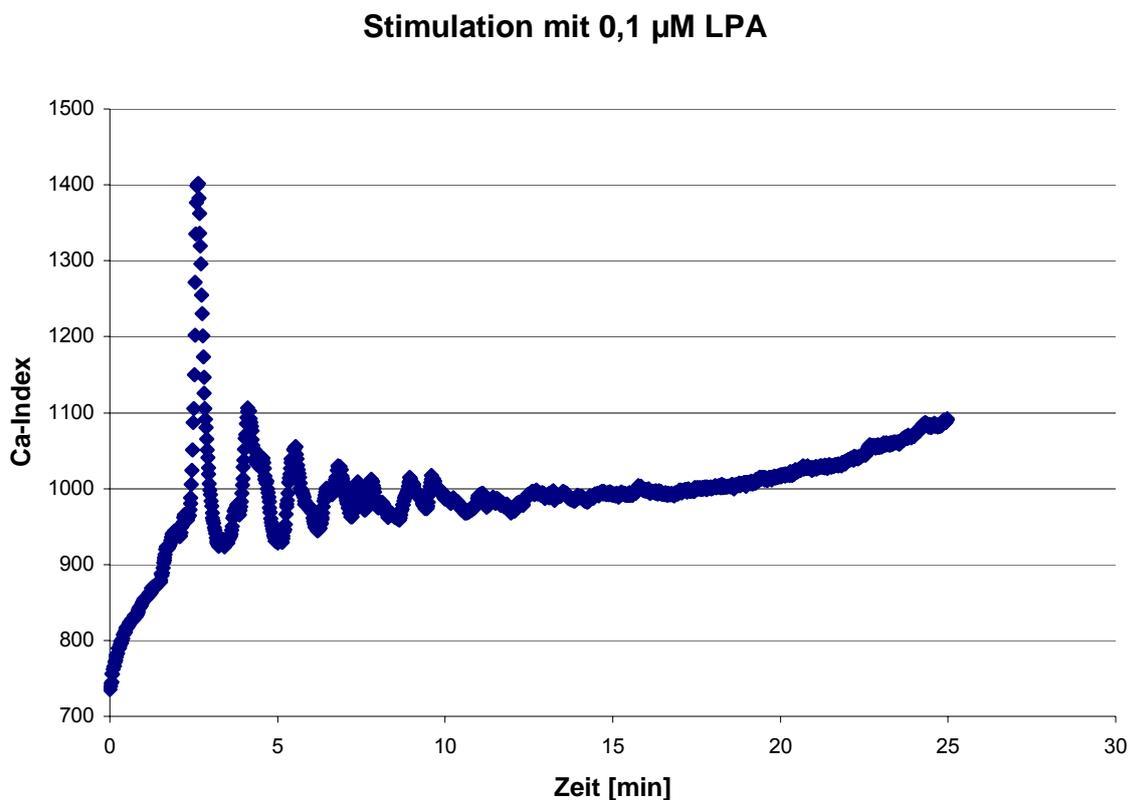


Abbildung 4: Wirkung von $0,1 \mu\text{M}$ LPA auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von RAM.

RAM wurden aus getöteten Versuchstieren isoliert. Nach der Adhäsionsphase wurden die Zellen 24 h zu normalen Bedingungen kultiviert und wuchsen an einem Glasplättchen fest, welches in die Versuchsanordnung eingebaut wurde. Nach Beladen mit Fura-2 wurden die RAM mit $0,1 \mu\text{M}$ LPA inkubiert und die Änderung der Ca^{2+} -Konzentration mit Fluoreszenztechnik gemessen.

Wenige Minuten nach Gabe von LPA zeigte sich eine oszillierende Kurve als Ausdruck der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ -Änderung. Der erste Ausschlag des Ca^{2+} -Index war stets der Größte, die Amplitude der nachfolgenden Calciumströme nahm mit der Zeit ab. Über die Zeit kam es in allen Zellen zu einem kontinuierlichen Anstieg der Basislinie des intrazellulären Calciumgehalts. Dargestellt ist hier exemplarisch der Calcium-Influx in eine einzelne Zelle.

War 1 μM LPA eingesetzt, änderte sich in $53,5 \pm 7,7\%$ der Zellen die Calcium-Konzentration im Zytosol in einem Zeitraum von $1,7 \pm 0,4$ Minuten bis $6,0 \pm 0,8$ Minuten nach Applikation der Substanz. Im Mittel zeigten sich $5,0 \pm 0,7$ spitze Oszillationen mit einer Amplitude von $93,2 \pm 5,2$ Einheiten. Es wurden 66 Zellen untersucht (s. Abb. 5).

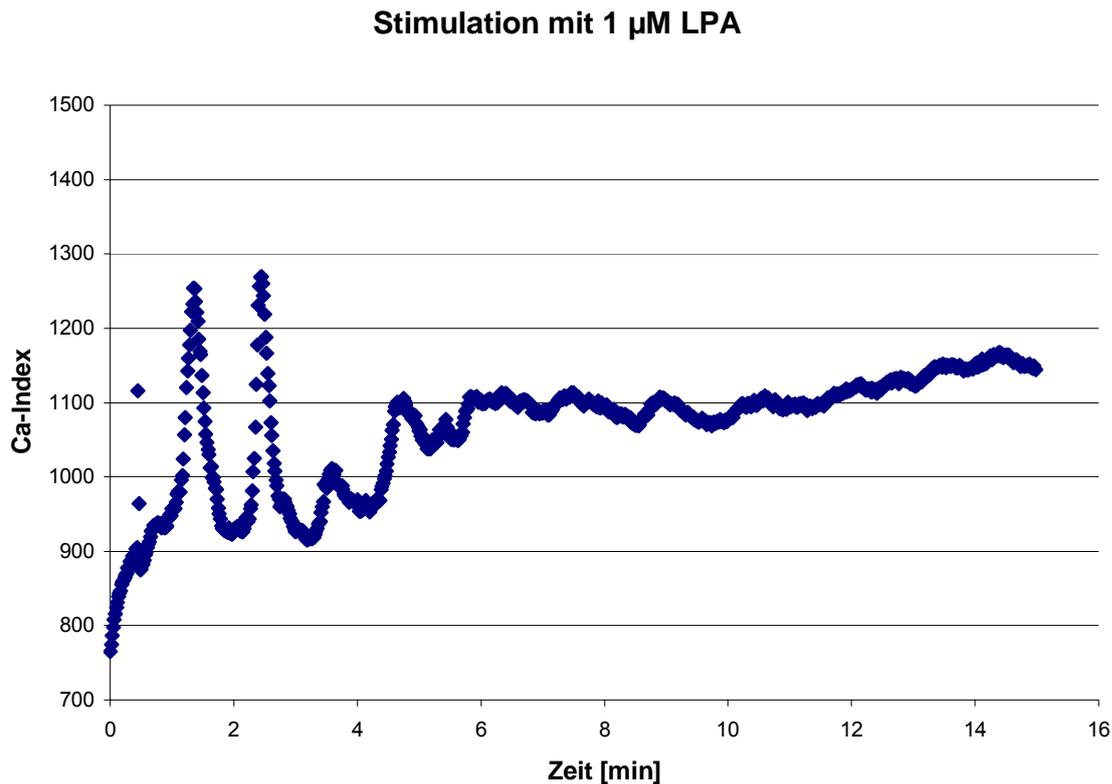


Abbildung 5: Wirkung von 1 μM LPA auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von RAM.

RAM wurden aus getöteten Versuchstieren isoliert. Nach der Adhäsionsphase wurden die Zellen 24 h zu normalen Bedingungen kultiviert und wuchsen an einem Glasplättchen fest, welches in die Versuchsanordnung eingebaut wurde. Nach Beladen mit Fura-2 wurden die RAM mit 1 μM LPA inkubiert und die Änderung der Ca^{2+} -Konzentration mit Fluoreszenztechnik gemessen.

Bereits wenige Minuten nach Gabe von LPA zeigte sich eine oszillierende Kurve als Ausdruck der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ -Änderung. Der erste Ausschlag des Ca^{2+} -Index war stets der Größte, die Amplitude der nachfolgenden Calciumströme nahm mit der Zeit ab. Über die Zeit kam es in allen Zellen zu einem kontinuierlichen Anstieg der Basislinie des intrazellulären Calciumgehalts. Dargestellt ist hier exemplarisch der Calcium-Influx in eine einzelne Zelle.

Die Anzahl der reagierenden Zellen, Reaktionszeitraum und die Anzahl der schnellen Schwankungen der intrazellulären Calcium-Konzentration waren unabhängig von der LPA-Konzentration weitgehend gleich. Der einzig augenfällige Unterschied zwischen den Konzentrationen fand sich nur in der Amplitude der Veränderungen: Bei 0,1 μM LPA war die Größe des Ausschlages der Kurve doppelt so hoch als bei Zugabe der zehnfachen Konzentration von 1 μM LPA, jedoch weist diese Beobachtung keine statistische Signifikanz auf ($p = 0,3$).

Stimulation mit 1 μM LPA

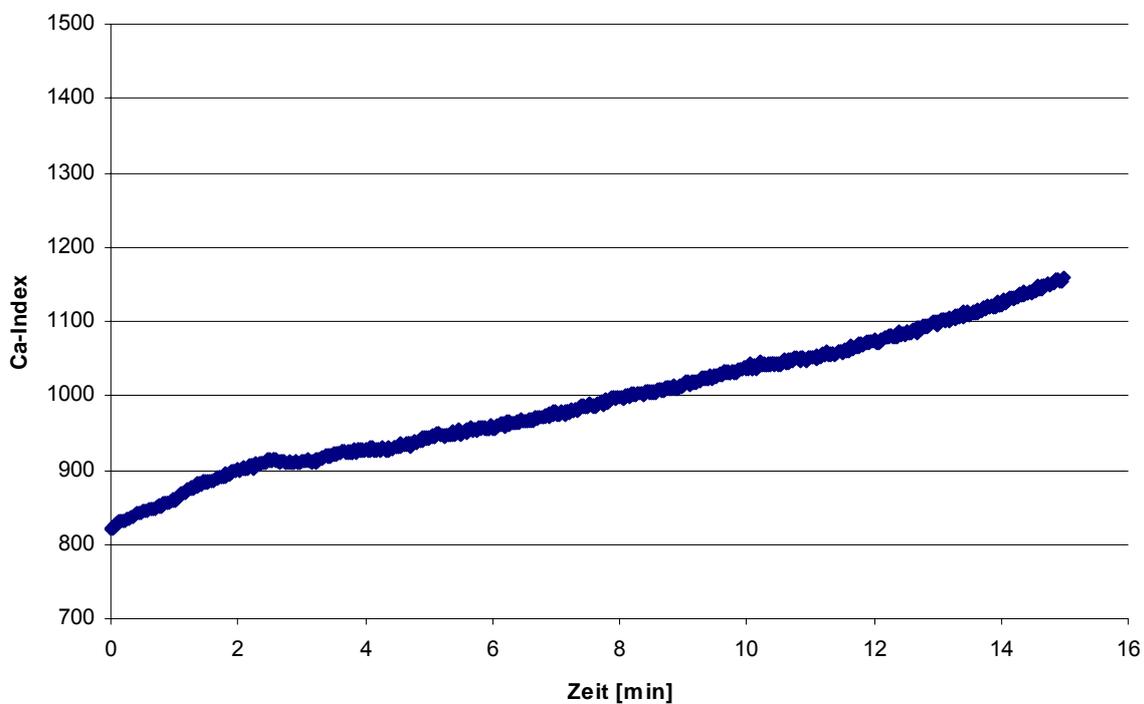


Abbildung 6: Wirkung von 1 μM LPA auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von RAM.

RAM wurden aus getöteten Versuchstieren isoliert. Nach der Adhäsionsphase wurden die Zellen 24 h zu normalen Bedingungen kultiviert und wuchsen an einem Glasplättchen fest, welches in die Versuchsanordnung eingebaut wurde. Nach Beladen mit Fura-2 wurden die RAM mit 1 μM LPA inkubiert und die Änderung der Ca^{2+} -Konzentration mit Fluoreszenztechnik gemessen.

Diese Zelle zeigte keine oszillierende Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration. Über die Zeit stieg der Calcium-Gehalt in der Zelle jedoch kontinuierlich an. Dargestellt ist hier exemplarisch der Calcium-Influx in eine einzelne Zelle.

2. Detektion der p44/42-ERK/MAP-Kinase aus LPL-stimulierten Alveolarmakrophagen mittels SDS-PAGE

Mit primären Alveolarmakrophagen der Ratte wurden Western-Blots wie unter B.II.9 beschrieben durchgeführt. Die Vorbehandlung der Zellen vor der Proteinpräparation erfolgte je nach Testsubstanz mit unterschiedlichen Zeitprotokollen, die im jeweiligen Abschnitt erläutert sind. Als primärer Antikörper wurde im ersten Schritt Anti-Phospho-p44/42 eingesetzt, ein Antikörper der spezifisch die aktivierte p44/42-ERK-MAPK bindet. Im zweiten Schritt wurde mit Anti-ERK-2 die Gesamtheit der in der Zelle befindlichen ERK-1 und ERK-2 detektiert. Aus den optischen Dichten der detektierten Banden wurden Quotienten gebildet.

2.1 Inkubation der Zellen mit LPA

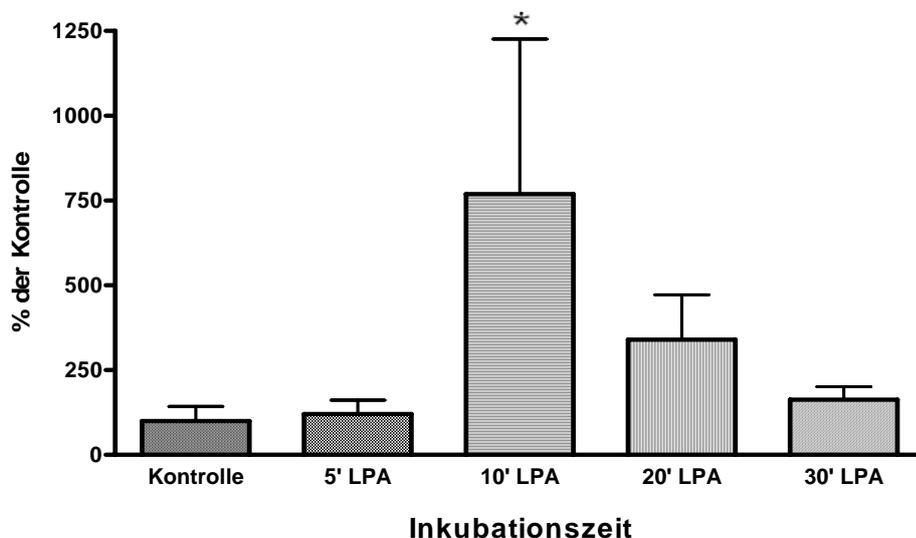


Abbildung 7: Wirkung von LPA auf die Aktivierung der MAP-Kinase ERK-2. 1 Mio. RAM nach Inkubation mit 10 μ M LPA für 5', 10', 20' und 30' in Zellkulturmedium. 50 μ g Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Proteinbanden der MAPK wurden mittels HRP-gekoppelter Antikörperreaktion detektiert (erst Anti-Phospho-p44/42, dann Anti-ERK-2), densitometrisch berechnet und ein Quotient aus der IntOD von Anti-Phospho-p44/42 und Anti-ERK-2 gebildet. Nach 10minütiger Inkubation mit LPA zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg der phosphorylierten p44/42 MAP-Kinase im Zytoplasma der Makrophagen.

* = statistisch signifikant mit einem Wahrscheinlichkeitskoeffizienten $p < 0,05$

Die Inkubation der Zellen mit 10 μM LPA für 5 Minuten führte zu einem nicht-signifikanten Anstieg der phosphorylierten ERK/MAP-Kinase auf $121 \pm 41\%$ der Kontrolle. Doch die Inkubation über 10 Minuten zeigte schließlich einen signifikanten Anstieg der aktivierten MAP-Kinase auf $769 \pm 457\%$ des Ausgangsniveaus. Der Anstieg war transient, es kam zu einem schnellen Abfall der Konzentration der MAP-Kinase nach 20 und nach 30 Minuten Inkubation mit LPA (vgl. Abb. 7).

2.2 Inkubation der Zellen mit LPS

Die Induktion der ERK-2 durch 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS wurde deutlich später als durch LPA erzielt: Nach 30 Minuten zeigte sich ein signifikanter Anstieg der MAP-Kinase auf $917 \pm 301\%$ des Ausgangsniveaus (vgl. auch Tab. 5, Abb. 8 und 9), der auch nach 60 und 90 Minuten anhielt. 120 Minuten nach Versuchsbeginn erreichte die aktivierte Kinase $1417 \pm 251\%$ des Ausgangsniveaus.

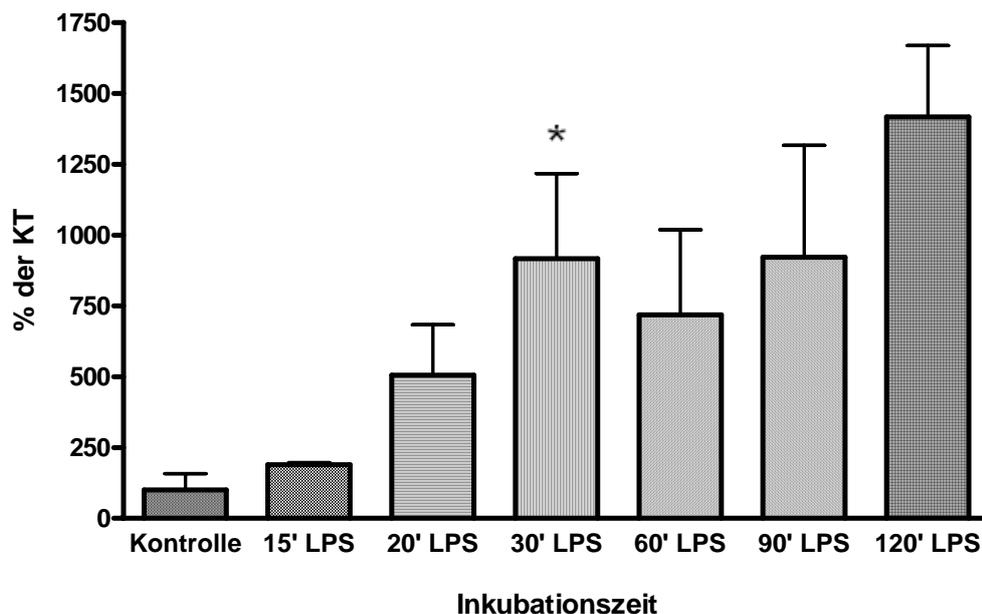


Abbildung 8: Wirkung von LPS auf die Aktivierung der MAP-Kinase ERK-2. 1 Mio. RAM nach Inkubation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS für 15', 30', 60', 90' und 120' in Zellkulturmedium. 50 μg Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Proteinbanden der MAPK wurden mittels HRP-gekoppelter Antikörperreaktion detektiert (erst Anti-Phospho-p44/42, dann Anti-ERK-2), densitometrisch berechnet und ein Quotient aus der IntOD von Anti-Phospho-p44/42 und Anti-ERK-2 gebildet. Nach 30 Minuten Inkubationszeit kam es zu einem signifikanten Anstieg der Menge aktivierter ERK-2 MAP-Kinase, der auch nach 60, 90 und 120 Minuten anhielt.

* = statistisch signifikant mit einem Wahrscheinlichkeitskoeffizienten $p < 0,05$

	IntOD	SEM	n	% der KT	SEM	T-Test
KT	0,298	0,13	8	100	44	
LPA 5'	0,315	0,12	6	121	41	0,64
LPA 10'	0,801	0,21	8	769	457	0,03*
LPA 20'	0,592	0,14	6	340	132	0,25
LPA 30'	0,585	0,34	5	163	38	0,35
KT	1,594	0,92	9	100	58	
LPS 15'	1,132	1,06	2	189	7	0,48
LPS 20'	0,137	0,004	2	505	178	0,08
LPS 30'	2,640	1,25	7	917	301	0,03*
LPS 60'	1,914	0,84	7	718	300	0,53
LPS 90'	1,703	1,35	6	922	395	0,29
LPS 120'	0,409	0,06	2	1417	251	0,09
KT	0,313	0,14	10	100	44	
S1P 5'	0,327	0,15	9	120	31	0,89
S1P 10'	0,294	0,15	7	518	300	0,99
S1P 15'	0,042	0,02	4	26	16	0,02*
S1P 20'	0,367	0,19	7	346	164	0,76
S1P 30'	0,228	0,13	4	45	8	0,25
KT	0,577	0,15	7	100	26	
SPC 5'	0,48	0,25	3	78	18	0,57
SPC 10'	1,104	0,42	3	190	34	0,18
SPC 20'	0,382	0,07	3	84	24	0,29
SPC 40'	0,259	0,02	3	67	32	0,25

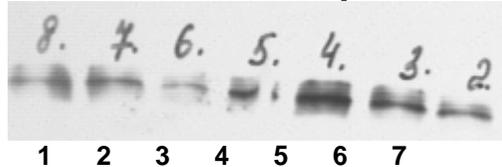
Tabelle 5: Wirkungen von LPA, LPS, S1P und SPC auf die MAP-Kinase ERK-2. 1 Mio. RAM wurden unterschiedlich lang mit 10 μ M LPA, 1 μ g/ml LPS, 10 μ M S1P oder 10 μ M SPC in Zellkulturmedium inkubiert. 50 μ g Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Proteinbanden der MAPK wurden mittels HRP-gekoppelter Antikörperreaktion detektiert (erst Anti-Phospho-p44/42, dann Anti-ERK-2), densitometrisch berechnet und ein Quotient aus der IntOD von Anti-Phospho-p44/42 und Anti-ERK-2 gebildet.

Mittelwerte der nach verschiedenen Zeitpunkten gemessenen Integrale der optischen Dichte (IntOD) mit geschätztem Standardfehler (SEM), Anzahl der Versuche (n), prozentualer Veränderung im Vergleich zum Kontrollversuch (% der KT) \pm SEM und Wahrscheinlichkeitskoeffizienten nach gepaartem T-Test nach Student.

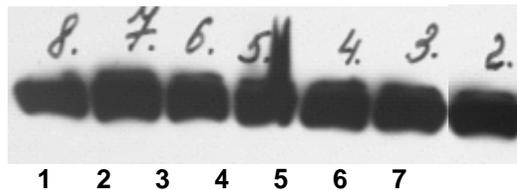
Western Blot: Alveolarmakrophagen (RAM)

LPS

Detektion mit Anti-p44/42



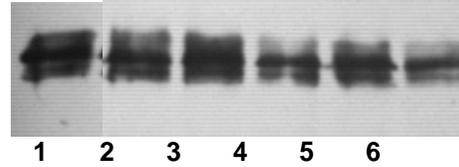
Detektion mit p-ERK



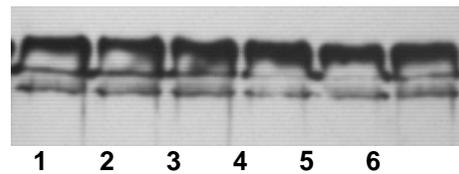
1 = 90 min. LPS 4 = 120 min. LPS
2 = 30 min. LPS 5 = 60 min. LPS
3 = KT 6 = 30 min. LPS
7 = 20 min. LPS

LPA

Detektion mit Anti-p44/42



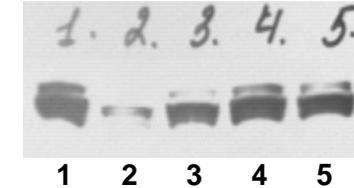
Detektion mit p-ERK



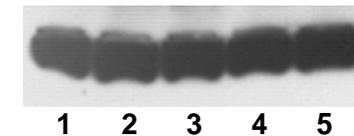
1 = KT 4 = 20 min. LPA
2 = 5 min. LPA 5 = 30 min. LPA
3 = 10 min. LPA 6 = 60 min. LPA

SPC

Detektion mit Anti-p44/42



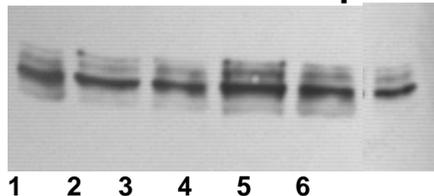
Detektion mit p-ERK



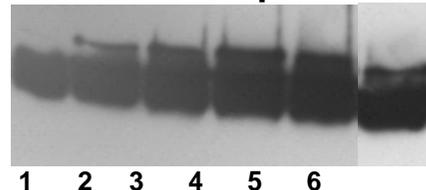
1 = KT 3 = 10 min. SPC
2 = 5 min. SPC 4 = 20 min. SPC
5 = 40 min. SPC

S1P

Detektion mit Anti-p44/42



Detektion mit p-ERK



1 = 30 min. S1P
2 = 20 min. S1P
3 = 15 min. S1P
4 = 10 min. S1P
5 = 05 min. S1P
6 = K

Abbildung 9: Auswirkungen von LPL und LPS auf die Aktivierung der MAP-Kinase ERK-2. 1 Mio. RAM nach Inkubation mit 10 μ M der Lysophospholipide LPA, SPC und S1P, bzw. mit LPS für verschiedene Zeitprotokolle. Je 50 μ g Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Proteinbande der MAPK ERK-2 wurde mittels HRP-gekoppelter Antikörperreaktion detektiert. Hier dargestellt sind exemplarische Banden für jede eingesetzte Substanz nach der Detektion auf dem Röntgenfilm. (1. Detektion mit Anti-Phospho p42/44, 2. Detektion mit Anti-ERK-2.)

2.3 Inkubation der Zellen mit S1P

Initial wurden 10 μ M S1P als Testsubstanz eingesetzt. Nach 5 Minuten Inkubation mit S1P konnte keine signifikante Änderung in der Konzentration von ERK-2 nachgewiesen werden. Auch der 10 Minuten nach Versuchsbeginn gemessene Anstieg auf $518 \pm 300\%$ des Ausgangswertes sowie die optischen Dichten der Proteinbanden nach 20 Minuten und 30 Minuten erwiesen sich statistisch nicht als signifikant. Die nach 15 Minuten auftretende Absenkung der MAP-Kinase-Aktivierung hingegen auf durchschnittlich $26 \pm 16\%$ der Kontrolle war im gepaarten T-Test mit $p=0,02$ signifikant (vgl. Tab. 5, Abb. 9 und 10).

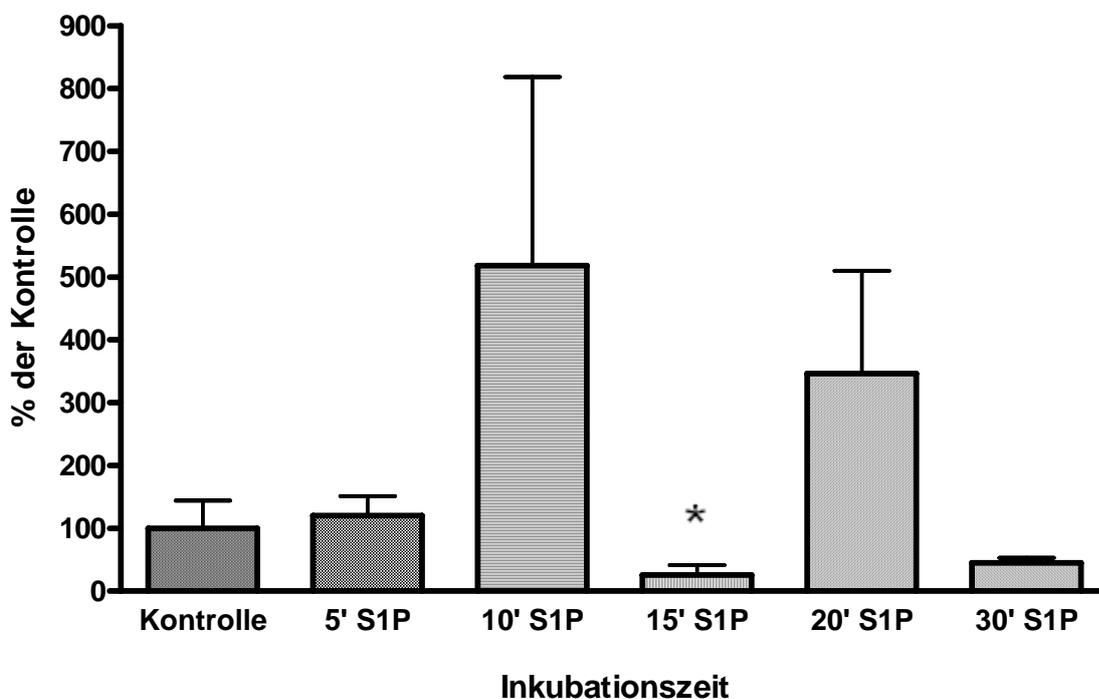


Abbildung 10: Wirkung von S1P auf die Aktivierung der MAP-Kinase ERK-2. 1 Mio. RAM nach Inkubation mit 10 μ M S1P für 5', 10', 15', 20' und 30' in Zellkulturmedium. 50 μ g Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Proteinbanden der MAPK wurden mittels HRP-gekoppelter Antikörperreaktion detektiert (erst Anti-Phospho-p44/42, dann Anti-ERK-2), densitometrisch berechnet und ein Quotient aus der IntOD von Anti-Phospho-p44/42 und Anti-ERK-2 gebildet. Die absinkene Aktivität der MAP-Kinase nach 15 Minuten Inkubation mit S1P erwies sich im gepaarten T-Test als signifikant mit einem Wahrscheinlichkeitskoeffizienten p von 0,02.

* = statistisch signifikant mit einem Wahrscheinlichkeitskoeffizienten $p < 0,05$

2.4 Inkubation der Zellen mit S1P und PTX

Danach wurde S1P in der Konzentration 1 μM eingesetzt und zwei, bzw. 5 Minuten lang inkubiert. Gleichzeitig wurde neben dem normalen Kontrollversuch ein Versuchsansatz mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Pertussistoxin und ein Versuchsansatz mit 1 μM S1P + PTX angesetzt. Es zeigte sich nach 2 Minuten Inkubation mit S1P eine deutliche Steigerung der Konzentration an aktivierter ERK-2 auf 1127 ± 535 . Nach Vorbehandlung mit PTX blieb die stimulierende Wirkung von S1P erhalten: es kam zu einer Erhöhung der MAP-Kinase auf $1156 \pm 582\%$ (vgl. Abb. 11 und Tab. 6).

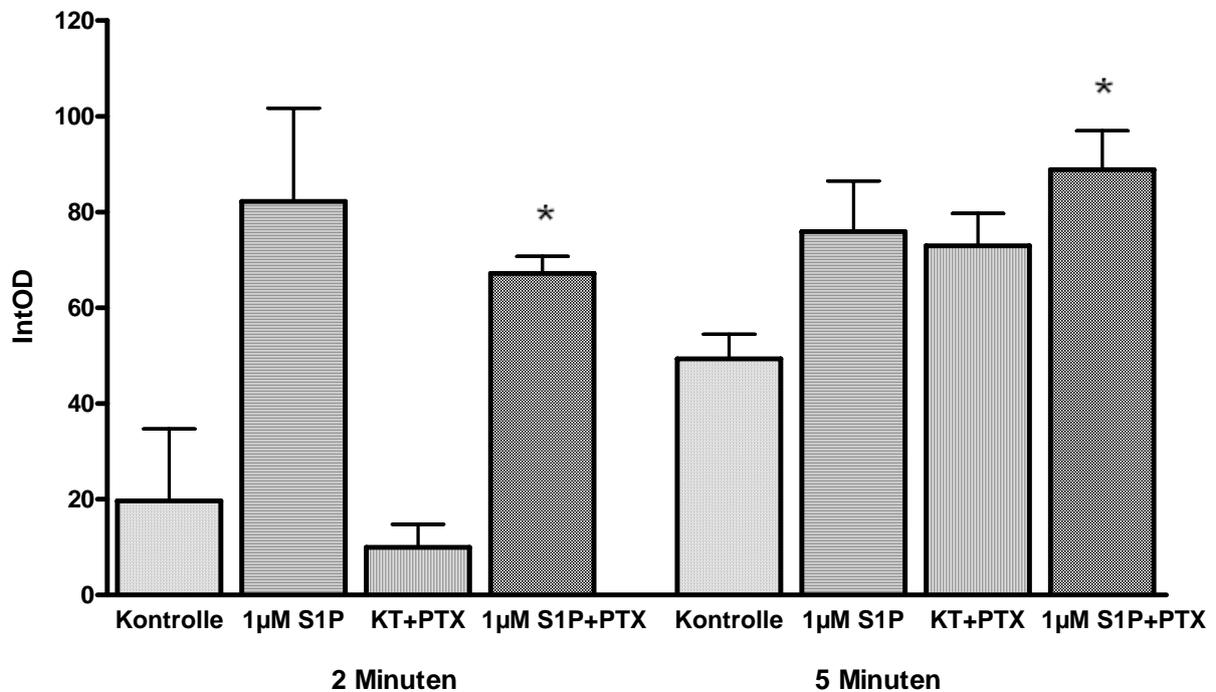


Abbildung 11: Wirkung von S1P und PTX auf die Aktivierung der MAP-Kinase ERK-2. 1 Mio. RAM nach Inkubation mit Wasser (Kontrolle), 1 μM S1P, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Pertussistoxin (KT+PTX) und 1 μM S1P + PTX für 2', bzw. 5'. 50 μg Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Proteinbanden der MAPK wurden mittels HRP-gekoppelter Antikörperreaktion detektiert (erst Anti-Phospho-p44/42, dann Anti-ERK-2), densitometrisch berechnet und ein Quotient aus der IntOD von Anti-Phospho-p44/42 und Anti-ERK-2 gebildet. Nach Inkubation mit 1 μM S1P und PTX kam es nach 2 und 5 Minuten zu einer signifikanten Erhöhung der ERK-2 mit $p=0,007$ und $p=0,01$.

* = statistisch signifikant mit einem Wahrscheinlichkeitskoeffizienten $p < 0,05$

Nach 5 Minuten Inkubation kam es zu deutlich niedrigeren Werten mit einer durchschnittlichen Erhöhung der Menge an phosphorylierter ERK auf $162 \pm 42\%$ durch Inkubation mit S1P und auf $121,83 \pm 1,15\%$ nach Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ S1P und Vorbehandlung mit PTX.

	Kontrolle 2 Min	1μM S1P 2 Min	Kontrolle+PTX 2 Min	1μM S1P+PTX 2 Min
IntOD	3,87760	45,2285	19,273145	63,41842
%	100	1166,4	100	329
IntOD	5,47521	111,308	3,2544140	74,24608
%	100	2032,1	100	2281
IntOD	49,7199	90,1198	7,437544	63,8642
%	100	181,27	100	859
MW	19,69	82,22	9,99	67,18
SEM	15,02	19,48	4,80	3,54
n	3	3	3	3
T-Test		0,06		0,007*
	Kontrolle 5 Min	1μM S1P 5 Min	Kontrolle+PTX 5 Min	1μM S1P+PTX 5 Min
IntOD	56,68491	67,22402	78,34569	93,68906
%	100	118,6	100	119,6
IntOD	39,42397	96,90750	59,56621	72,98124
%	100	245,8	100	122,5
IntOD	51,82869	63,57570	80,96539	99,88654
%	100	122,7	100	123,4
MW	49,31	75,90	72,96	88,85
SEM	5,14	10,56	6,74	8,13
n	3	3	3	3
T-Test		0,08		0,01*

Tabelle 6: Wirkung von $1 \mu\text{M}$ S1P und PTX auf die MAP-Kinase ERK-2. 1 Mio. RAM wurden je 2 und 5 Minuten lang mit $1 \mu\text{M}$ S1P, $1 \mu\text{g/ml}$ PTX oder $1 \mu\text{M}$ S1P + PTX in Zellkulturmedium inkubiert. $50 \mu\text{g}$ Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Proteinbanden der MAPK wurden mittels HRP-gekoppelter Antikörperreaktion detektiert (erst Anti-Phospho-p44/42, dann Anti-ERK-2), densitometrisch berechnet und ein Quotient aus der IntOD von Anti-Phospho-p44/42 und Anti-ERK-2 gebildet.

Mittelwerte der Integrale der optischen Dichte (IntOD) mit geschätztem Standardfehler (SEM), Anzahl der Versuche (n), prozentualer Veränderung im Vergleich zum Kontrollversuch (%) und Wahrscheinlichkeitskoeffizienten p nach gepaartem T-Test nach Student.

2.5 Inkubation der Zellen mit SPC

Die Inkubation der Zellen mit SPC ergab einen variablen Anstieg und Abfall der Konzentration der MAP-Kinase; es konnte kein klarer Effekt von SPC nachgewiesen werden. Nach 5 Minuten Inkubation mit 10 μM SPC kam es zu einer nicht signifikanten Absenkung der Aktivität der ERK-2 auf $78 \pm 18\%$ des Kontrollniveaus. Nach 10 Minuten kam es zu einer Erhöhung des Gehalts an phosphorylierter ERK-2 auf $190 \pm 34\%$ des Ausgangswertes. Nach 20 Minuten war ein Gehalt von $84 \pm 24\%$ der Kontrolle zu messen; nach 40 Minuten $67 \pm 32\%$. Keine dieser Veränderungen zeigte statistische Signifikanz (vgl. Tab. 5, Abb. 9 und 12).

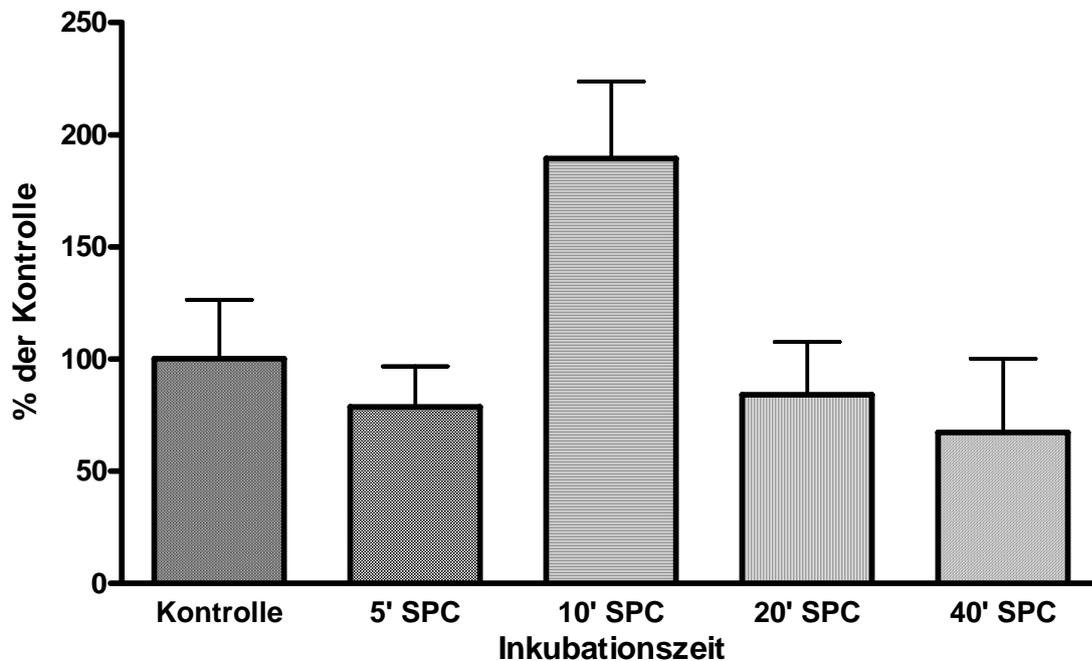


Abbildung 12: Wirkung von SPC auf die Aktivierung der MAP-Kinase ERK-2. 1 Mio. RAM nach Inkubation mit 10 μM SPC für 5', 10', 20' und 40' in Zellkulturmedium. 50 μg Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Proteinbanden der MAPK wurden mittels HRP-gekoppelter Antikörperreaktion detektiert (erst Anti-Phospho-p44/42, dann Anti-ERK-2), densitometrisch berechnet und ein Quotient aus der IntOD von Anti-Phospho-p44/42 und Anti-ERK-2 gebildet.

Keine der dargestellten Veränderungen erwies sich statistisch als signifikant.

II. Untersuchungen an Zellen der Linie NR 8383

1. Bestimmung der proliferativen Aktivität der Alveolarmakrophagen nach Stimulation mit LPA und S1P in Versuchsmedien mit unterschiedlichem FKS-Gehalt mit dem ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assay

Die proliferative Aktivität der Alveolarmakrophagen wurde mit dem ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assay überprüft (vgl. B.II.10). Als Testzellen wurden Zellen der Linie NR 8383 eingesetzt.

Die Versuchsreihe wurde unter verschiedenen Fragestellungen durchgeführt. Zunächst sollte der mögliche proliferative Effekt der LPL LPA und S1P an Alveolarmakrophagen überprüft werden. In einem weiteren Schritt sollte die FKS-Abhängigkeit der möglicherweise gesteigerten Proliferation dargestellt werden.

1.1 Stimulation mit LPA und 7,5% FKS im Medium

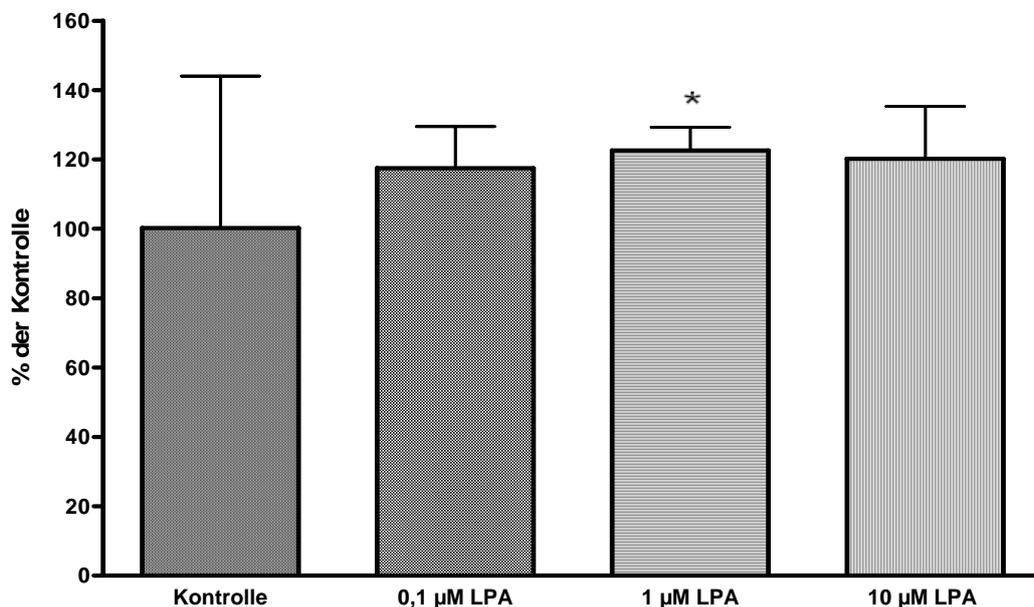


Abbildung 13: Wirkung von LPA auf die Proliferation von NR 8383-Zellen mit 7,5% FKS-Zusatz im Medium. Inkubation der Zellen (NR 8383) mit 7,5% FKS im Medium und unterschiedlichen Konzentrationen von LPA. Nach 24 h wurde ein ^3H -Thymidin-Inkorporationsassay durchgeführt. Dargestellt ist die zelluläre Radioaktivität als Maß für die Proliferation in 24 h (hier ausgedrückt als % der Kontrolle, Mittelwerte \pm SEM). Die Proliferation wurde durch Zugabe von 1 μM LPA signifikant stimuliert ($p=0,04$). * = statistisch signifikant mit einem Wahrscheinlichkeitskoeffizienten $p < 0,05$

LPA bewirkte in Zellen, die mit einer FKS-Konzentration von 7,5% kultiviert wurden, einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Proliferationsrate, der bereits nicht-signifikant bei einer Konzentration von 0,1 μM LPA begann. Bei einer LPA-Konzentration von 1 μM zeigte sich ein signifikanter Anstieg auf $123 \pm 7\%$ mit einer Wahrscheinlichkeit von $p=0,04$. Der Anstieg hielt auch bei Inkubation mit 10 μM LPA an.

1.2 Stimulation mit S1P und 7,5% FKS im Medium

Auch die Inkubation der Zellen mit S1P führte bei einer Medium-FKS-Konzentration von 7,5% zu einem Anstieg der Proliferation, der sich jedoch als statistisch nicht evident erwies (vgl. Tab. 7 und Abb. 14)

Bei einer Konzentration von 0,1 μM S1P steigerten die Zellen ihre proliferative Tätigkeit auf $128 \pm 20\%$. Nach Inkubation mit der höheren Konzentration von 1 μM S1P kam es zu einem weiteren nicht-signifikanten Anstieg auf $169 \pm 67\%$ bei 10 μM auf $100 \pm 38\%$.

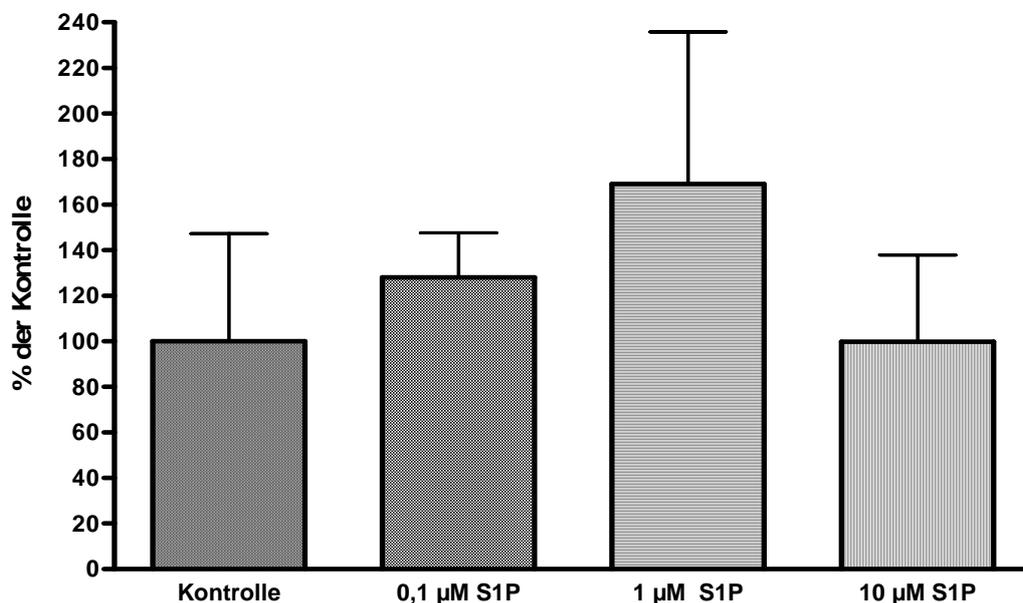


Abbildung 14: Wirkung von S1P auf die Proliferation von NR 8383-Zellen mit 7,5% FKS-Zusatz im Medium. Inkubation der Zellen (NR 8383) mit 7,5% FKS im Medium und unterschiedlichen Konzentrationen von S1P. Nach 24 h wurde ein ^3H -Thymidin-Inkorporationsassay durchgeführt. Dargestellt ist die zelluläre Radioaktivität als Maß für die Proliferation in 24 h (hier ausgedrückt als % der Kontrolle, Mittelwerte \pm SEM). Die Proliferation wurde durch Zugabe von S1P nicht beeinflusst.

Medium	Substanz	DPM/Probe (MW)	SEM	n	% der KT	SEM	T-Test
7,5 % FKS	KT	52500	225	5	100	44	
	0,1 µM LPA	53187	221	4	117	12	0,79
	1 µM LPA	62957	226	5	123	7	0,04*
	10 µM LPA	56647	188	5	120	15	0,57
	KT	52088	216	4	100	47	
	0,1 µM S1P	62210	254	3	128	20	0,15
	1 µM S1P	62696	197	4	169	67	0,06
	10 µM S1P	53611	176	4	100	38	0,86
Ohne FKS	KT	12645	10262	3	100	81	
	1 µM LPA	14388	12422	2	93	12	0,51
	10µM LPA	6917	4717	3	76	18	0,41
15% FKS	KT	119540	6708	3	100	6	
	1 µM LPA	99015	2591	2	87	9	0,38
	10µM LPA	115655	4734	3	97	5	0,56

Tabelle 7: Übersicht über die Ergebnisse des ³H-Thymidin-Inkorporationsassay

Zellen der Linie NR 8383 wurden ohne FKS, mit 7,5% oder mit 15% FKS sowie LPA bzw. S1P in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Nach 24 h wurde ein ³H-Thymidin-Inkorporationsassay durchgeführt. Die zelluläre Radioaktivität galt als Maß für die Proliferation in 24 h.

Legende: DPM/Probe (Desintegrations per minute, jeweils der Mittelwert der Versuchsreihe), SEM (Standardfehler des Mittelwerts), n (Anzahl der Versuche), % der KT (Prozent der Kontrollle), T-Test (statistische Analyse nach Student)

1.3 Stimulation mit LPA ohne FKS und mit 15% FKS im Medium

Die nächste Versuchsreihe betraf die FKS-Abhängigkeit der Auswirkungen von LPA auf die Proliferation von NR 8383-Zellen. Die Behandlung der Zellen erfolgte wiederum wie unter B.II.10 beschrieben, die Hälfte der Versuchsansätze ohne FKS und die andere Hälfte zum Vergleich mit 15% FKS im Medium.

Bei Zellen, deren Medium kein FKS enthielt, führte LPA weder bei einer Konzentration von 1 µM, noch bei 10 µM zu einer Steigerung, sondern eher zu einer (nicht-signifikanten) Minderung der Proliferation. Auch mit 15% FKS im Medium kam es bei

0,1 μM LPA und 10 μM LPA eher zu einem Absinken der Proliferationsrate (vgl. Tab. 7 und Abb. 15).

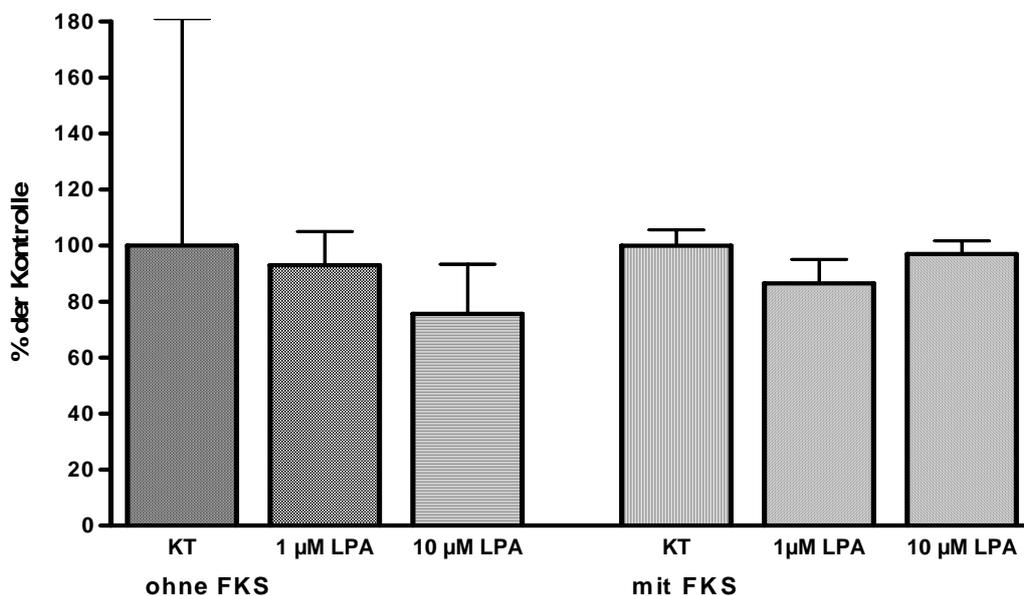


Abbildung 15: Wirkung von LPA auf die Proliferation von NR 8383-Zellen ohne FKS und mit 15% FKS-Zusatz im Medium. Kultivierung der Zellen der Linie NR 8383 ohne FKS, bzw. mit 15% FKS und LPA. Nach 24 h wurde ein ^3H -Thymidin-Inkorporationsassay durchgeführt. Dargestellt ist die zelluläre Radioaktivität als Maß für die Proliferation in 24 h (hier ausgedrückt als % der Kontrolle, Mittelwerte \pm SEM). Zellen, die ohne FKS kultiviert wurden, waren in ihrem Wachstum deutlich eingeschränkt gegenüber den Zellen, deren Medium 15% FKS enthielt. Die Zugabe von LPA als alleinigem Wachstumsfaktor wirkte sich nicht auf die Proliferation aus. Die leicht abgeschwächte Zellteilung bei 15% FKS und 1 μM LPA erwies sich statistisch als nicht signifikant ($p=0,38$). Zur Anzahl der Versuche siehe Tabelle 6

Zellen, deren Medium kein FKS enthielt, wiesen im Gegensatz zu Zellen, deren Medium 15% FKS zugesetzt war, erwartungsgemäß eine um den Faktor 10 bis 15 reduzierte proliferative Aktivität auf. Durchschnittlich proliferierten die mit FKS supplementierten Zellen um $1246 \pm 278\%$ ($n=8$, $p=0,05$) Prozent mehr, als die Gruppe ohne FKS.

Zusammenfassend ergibt sich, dass LPA deutlicher als S1P die Proliferation von Alveolarmakrophagen konzentrationsabhängig stimulieren kann. Dieser Effekt zeigte

sich am prominentesten in Anwesenheit von 7,5% FKS, nicht jedoch in Versuchsansätzen mit 15% FKS oder ohne FKS-Zusatz zum Medium.

2. Expressionsmuster der Lysophospholipid-Rezeptoren in NR 8383-Zellen

Das Expressionsmuster der LPL-Rezeptoren in Alveolarmakrophagen der Zelllinie NR 8383 wurde mittels RT-PCR überprüft.

Die S1P-Rezeptoren S1P₁, S1P₂, S1P₃ und S1P₅ wurden konstitutiv in NR 8383-Zellen exprimiert. Von den LPA-Rezeptoren fand sich LPA₂ (vgl. Tabelle 8)

Das PCR-Produkt des rS1P₁-Primers ist ein 428 bp großes Fragment. Die Gelelektrophorese für diesen Rezeptor zeigte regelmäßig dichte Banden (s. Abb. 16). Das PCR-Produkt für den S1P₂-Rezeptor hatte eine Größe von 712 Basenpaaren (s. Abb. 17). Die PCR mit dem Primerpaar rS1P₃ ergab ein Amplifikationsprodukt in der erwarteten Größe von 503 bp (s. Abb. 16). Der S1P₅-Rezeptor wurde über ein PCR-Amplifikat von 727 Basenpaaren nachgewiesen (s. Abb. 16).

Die PCR mit dem Primerpaar rS1P₄ führte zur Ausbildung einer 702 bp großen Bande. Die Expression dieses Rezeptors konnte jedoch nicht in allen Versuchen reproduziert werden.

Der LPA-Rezeptor LPA₂ zeigte regelhaft ausgeprägte PCR-Produkte der Größe von 900 Basenpaaren auf dem Agarosegel (s. Abb. 16).

Die Expression der LPA-Rezeptoren LPA₁ und LPA₃ konnte in den Alveolarmakrophagen der Zelllinie NR 8383 nicht nachgewiesen werden.

Somit ergibt sich für die LPL-Rezeptoren der Ratte in Alveolarmakrophagen folgendes Expressionsmuster: Die S1P-Rezeptoren werden alle exprimiert, die Expression des S1P₄-Rezeptors bleibt jedoch fraglich, da nur sporadisch Amplifikationsprodukte

nachgewiesen worden. Von den LPA-Rezeptoren konnte lediglich der LPA₂-Rezeptor nachgewiesen werden.

Die Rattenalveolarmakrophagen der Linie NR 8383 verfügen also über einen Rezeptor für Lysophosphatidsäure und über mehrere Rezeptoren, an denen Sphingosin-1-Phosphat und Sphingosylphosphorylcholin als Liganden agieren.

Tabelle Nr. 8 zeigt eine Übersicht über die β -Aktin-Quotienten der genannten Rezeptoren.

Abbildung Nr. 16 zeigt exemplarisch eine photographische Übersicht über die Bandenverteilung im Agarosegel nach erfolgreicher PCR.

RT-PCR: Alveolarmakrophagen der Linie NR 8383

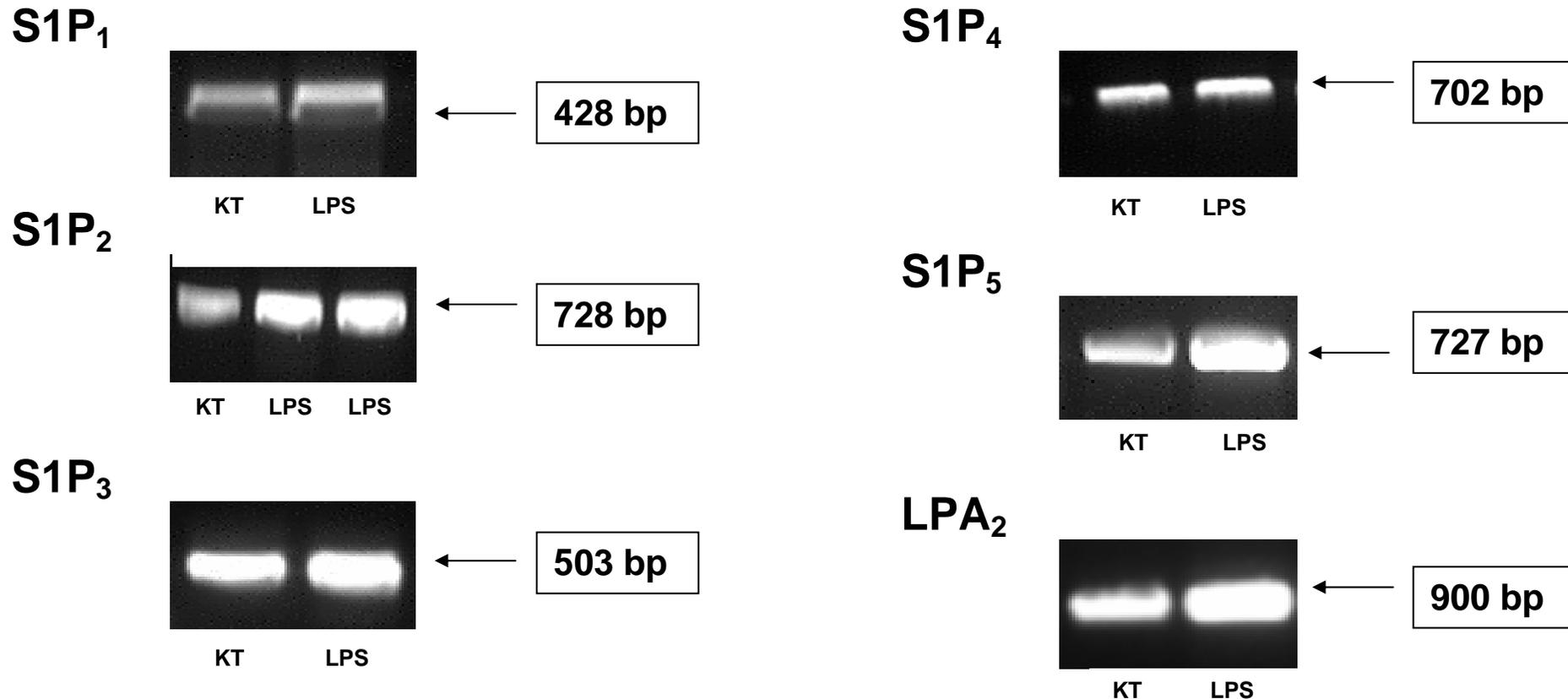


Abbildung 16: Auswirkungen von LPS auf die Expression des S1P₁-, S1P₂-, S1P₃-, S1P₄-, S1P₅- und LPA₂-Rezeptors in Alveolarmakrophagen der Linie NR 8383. Die Zellen wurden mit Medium (KT=Kontrolle) oder 1µg/ml LPS kultiviert und nach Isolierung der Gesamt-RNA eine RT-PCR mit 35 Zyklen bei 56°C Anlagerungstemperatur mit den entsprechenden Primerpaaren durchgeführt. Dargestellt sind die Aufnahmen repräsentativer Agarose-Gele (1,2%) aus mehreren Versuchen.

3. Wirkung von LPS und PMA auf die Expression von LPL-Rezeptoren in NR 8383-Zellen

Um eine mögliche Modulation der Expression durch exogene Mediatoren zu prüfen, wurden die Makrophagen wie unter B.II.2 beschrieben behandelt. Bei den eingesetzten Test-Stimuli handelte es sich in erster Linie um 1 µg/ml LPS und in einigen Versuchen auch 0,1 µM PMA.

Es zeigte sich, dass die LPL-Rezeptoren S1P₁ und S1P₅ konstitutiv und unabhängig von Stimulation oder Hemmung durch LPS oder PMA exprimiert wurden (s. auch Abb. 16, 17 und 20).

Der S1P₂-Rezeptor zeigte eine statistisch signifikante Steigerung der Expression nach Inkubation mit 1 µg/ml LPS auf durchschnittlich 145 ± 17% der Kontrolle (n=8; p=0,01), nicht jedoch nach Inkubation mit PMA (vgl. Tab. 8 und Abb. 18).

Die Expression des S1P₃-Rezeptors ließ sich durch PMA, nicht aber durch LPS induzieren (s. Abb. 16, 19 und Tab. 8). Die Zugabe von 0,1 µM PMA führte hier zu einer durchschnittlichen Steigerung des PCR-Produkts auf 292 ± 161% der Kontrolle (n=3; p=0,03).

Beim LPA-Rezeptor LPA₂ führte LPS nicht zu einer gesteigerten Expression des Rezeptors (s. Abb. 16 und 21).

LPS wirkt also stimulierend auf die Expression des S1P₂-Rezeptors in NR 8383-Zellen. PMA steigert die Expression des S1P₃-Rezeptors. Die anderen Rezeptoren bleiben unbeeinflusst.

Rezeptor	Substanz	MW	N	SEM	T-Test
LPA ₂	Kontrolle	0,40	3	0,11	
	LPS	0,82	3	0,32	0,19
S1P ₁	Kontrolle	0,15	2	0,02	
	LPS	0,14	2	0,11	0,95
S1P ₂	Kontrolle	1,17	8	0,24	
	LPS	1,60	8	0,33	0,01*
	PMA	1,56	6	0,29	0,48
S1P ₃	Kontrolle	0,58	5	0,20	
	LPS	0,64	5	0,24	0,76
	PMA	0,78	3	0,31	0,03*
S1P ₄	Kontrolle	1,06	1		
	LPS	0,85	1		
S1P ₅	Kontrolle	0,73	1		
	LPS	0,55	2	0,29	

Tabelle 8: Auswirkungen von LPS und PMA auf die Expression von LPL-Rezeptoren in NR 8383-Zellen. Die RT-PCR mit cDNA aus Zellen der Linie NR 8383 für die Primerpaare rLPA₂, rS1P₁, rS1P₂, rS1P₃, rS1P₄ und rS1P₅ ergab regelhafte Banden in der erwarteten Größe. Das r β -Aktin-Primerpaar diente als Positivkontrolle und zur Bildung von β -Aktin-Quotienten nach densitometrischer Auswertung der Banden. Hier abgebildet sind die absoluten Mittelwerte der β -Aktin-Quotienten der exprimierten LPL-Rezeptoren. Der verpaarte T-Test nach Student zeigte eine statistisch signifikante Änderung der Expression des S1P₂-Rezeptors nach Stimulation mit LPS ($p = 0,01$) und des S1P₃-Rezeptors nach Stimulation mit PMA ($p = 0,03$).

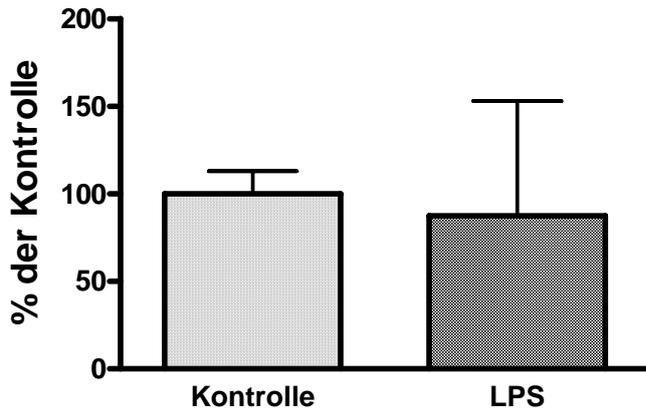


Abbildung 17: Wirkung von LPS auf die Expression des S1P₁-Rezeptors in NR 8383-Zellen. Die RT-PCR mit cDNA aus Zellen der Linie NR 8383 nach 20 h Inkubation mit 1 µg/ml LPS für das Primerpaar rS1P₁ mit 35 Zyklen ergab regelhafte Banden in der erwarteten Größe. Die Höhe der Säule entspricht der densitometrisch erfassten Dichte der Amplifikationsprodukte im Verhältnis zu β-Aktin ausgedrückt als Prozent der Kontrolle ± SEM. Zwischen der Kontrolle und LPS als Testsubstanz zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression des Rezeptors.

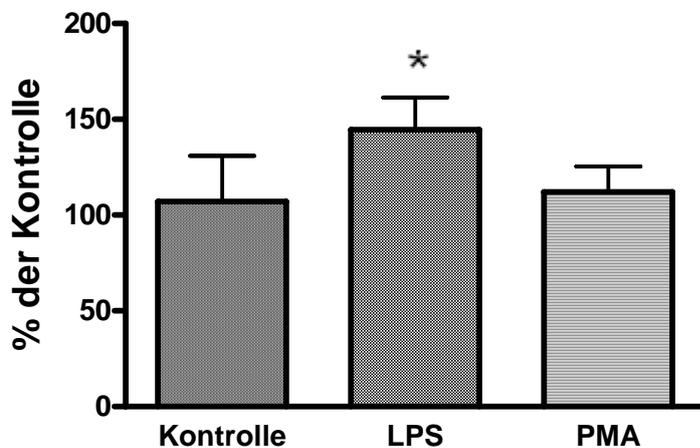


Abbildung 18: Wirkung von LPS und PMA auf die Expression des S1P₂-Rezeptors in NR 8383-Zellen. Die RT-PCR mit cDNA aus Zellen der Linie NR 8383 nach 20 h Inkubation mit 1 µg/ml LPS, bzw. 0,1 µM PMA für das Primerpaar rS1P₂ mit 35 Zyklen ergab regelhafte Banden in der erwarteten Größe. Die Höhe der Säule entspricht der densitometrisch erfassten Dichte der Amplifikationsprodukte im Verhältnis zu β-Aktin ausgedrückt als Prozent der Kontrolle ± SEM. Die Zugabe von LPS bewirkte einen signifikanten Anstieg der Expression auf 145 ± 17% (* = p = 0,01). Zwischen der Kontrolle und PMA als Testsubstanz zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

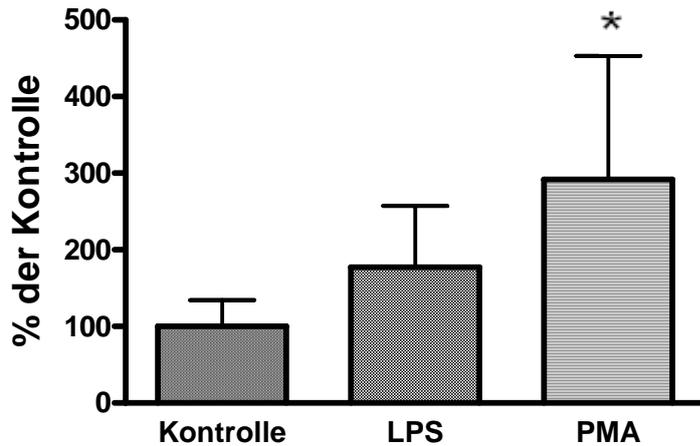


Abbildung 19: Wirkung von LPS und PMA auf die Expression des S1P₃-Rezeptors in NR 8383-Zellen. Die RT-PCR mit cDNA aus Zellen der Linie NR 8383 nach 20 h Inkubation mit 1 µg/ml LPS, bzw. 0,1 µM PMA für das Primerpaar rS1P₃ mit 35 Zyklen ergab regelhafte Banden in der erwarteten Größe. Die Höhe der Säule entspricht der densitometrisch erfassten Dichte der Amplifikationsprodukte im Verhältnis zu β-Aktin ausgedrückt als Prozent der Kontrolle ± SEM. Die Zugabe von PMA bewirkte einen signifikanten Anstieg der Expression auf 292 ± 161% (* = p = 0,03). Zwischen der Kontrolle und LPS zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression des Rezeptors.

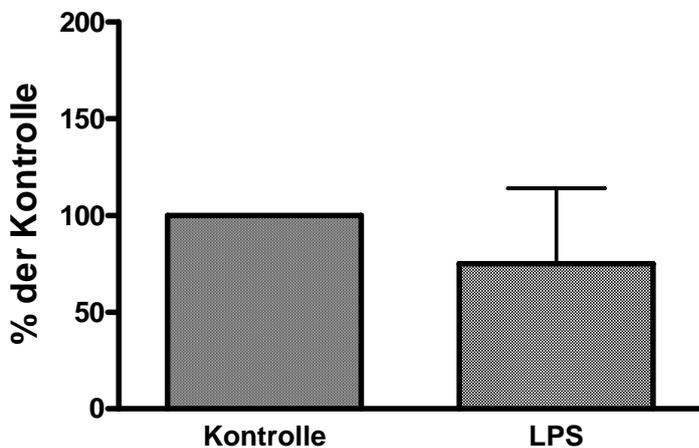


Abbildung 20: Wirkung von LPS auf die Expression des S1P₅-Rezeptors in NR 8383-Zellen. Die RT-PCR mit cDNA aus Zellen der Linie NR 8383 nach 20 h Inkubation mit 1 µg/ml LPS für das Primerpaar rS1P₅ mit 35 Zyklen ergab regelhafte Banden in der erwarteten Größe. Die Höhe der Säule entspricht der densitometrisch erfassten Dichte der Amplifikationsprodukte im Verhältnis zu β-Aktin ausgedrückt als Prozent der Kontrolle ± SEM. Zwischen der Kontrolle und LPS zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression des Rezeptors.

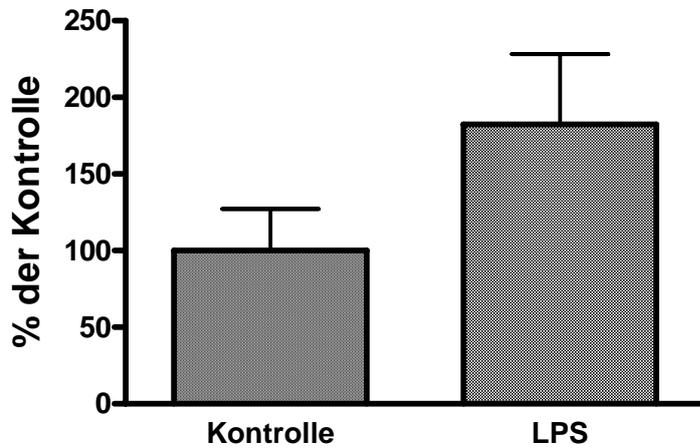


Abbildung 21: Wirkung von LPS auf die Expression des LPA₂-Rezeptors in NR 8383-Zellen. Die RT-PCR mit cDNA aus Zellen der Linie NR 8383 nach 20 h Inkubation mit 1 µg/ml LPS für das Primerpaar rLPA₂ mit 35 Zyklen ergab regelhafte Banden in der erwarteten Größe. Die Höhe der Säule entspricht der densitometrisch erfassten Dichte der Amplifikationsprodukte im Verhältnis zu β-Aktin ausgedrückt als Prozent der Kontrolle ± SEM. Zwischen der Kontrolle und LPS als Testsubstanz zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression des Rezeptors.

D. Diskussion

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, in Anknüpfung an vorangegangene Untersuchungen zum Expressionsmuster von LPL-Rezeptoren in primären Rattenalveolarmakrophagen (Hornuß et al., 2001) ausgewählte funktionelle Aspekte der LPL-Rezeptoren und ihrer Liganden zu untersuchen und das Expressionsmuster von LPL-Rezeptoren in Rattenalveolarmakrophagen der Zelllinie NR 8383 darzustellen.

I. Methodik

Die Versuche zur funktionellen Bedeutung der Rezeptoren in primären Alveolarmakrophagen der Ratte stützten sich auf Ergebnisse, die an anderen Zellarten bereits gewonnen worden waren. Fast alle LPL-Rezeptoren führen über verschiedene intrazelluläre Mechanismen zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und der Produktion von IP_3 (z.B. Okamoto et al., 1998; An et al., 1998a/b; Ancellin et al., 1999; An et al., 1999; Ancellin und Hla, 1999; Bando et al., 1999; Gonda et al., 1999; Okamoto et al., 1999; Sato et al., 1999; Yamazaki et al., 2000). Die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit dem polyzyklischen Chelatbildner Fura-2 im zeitlichen Verlauf schien eine adäquate Methode, die Veränderung der Konzentration des Ions nach Zugabe von LPA zu überprüfen.

Die Aktivierung des ERK-2/MAP-Kinase-Pfades war für die S1P-Rezeptoren S1P₁ (Lee et al., 1996; Zondag et al., 1998), S1P₂ (Gonda et al., 1999), S1P₃ (Okamoto et al., 1999) und S1P₄ (Gräler et al., 1998; van Brocklyn et al., 2000), sowie für den LPA₂-Rezeptor beschrieben worden. Es stellte sich die Frage, ob auch in den primären Rattenalveolarmakrophagen die Signaltransduktionswege der ERK-2/MAP-Kinase existierten. Die Proteinkinase ERK-2 sollte direkt in ihrer aktivierten Form mittels Western-Blot und spezifischem Antikörper nachgewiesen werden. Der Einfluss der LPL auf die Aktivierung der ERK wurde durch Inkubation der Zellen mit LPL nach verschiedenen Zeitprotokollen untersucht. Auch die Wirkung der als starker immunmodulatorischer Stimulus bekannten Lipopolysaccharide (LPS) wurde getestet.

Um die möglichen proliferativen Effekte von LPA und S1P zu überprüfen, wurde ein ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assay mit den Zellen des NR 8383-Typus durchgeführt, da diese Zellen im Gegensatz zu primären Alveolarmakrophagen Zellteilung betreiben. Auch die Auswirkungen von LPL als Überlebensfaktoren für Zellen, die serumfrei kultiviert wurden, wie es für Peritonealmakrophagen der Maus beschrieben war (Koh et al., 1998), sollten überprüft werden. Daneben wurde die Frage nach der FKS-Abhängigkeit der LPL-induzierten Proliferation gestellt.

Der Frage nach dem Expressionsmuster der LPL-Rezeptoren wurde mittels RT-PCR nachgegangen. LPL-Rezeptoren kommen in multiplen Geweben verschiedenster Spezies vor, des Weiteren liegen dezidierte Erkenntnisse über das Vorkommen von LPL-Rezeptoren in humanen Alveolarmakrophagen und primären Alveolarmakrophagen der Ratte vor (Hornuß et al., 2001; Duong et al., 2004). Es war also davon auszugehen, dass auch in Zellen der Zelllinie NR 8383 einige LPL-Rezeptoren exprimiert werden. Um einen möglichen Einfluss exogener inflammatorischer Stimuli auf die Expression der Rezeptoren abzuschätzen, wurden die Zellen vor der Präparation der mRNA mit PMA und LPS inkubiert. Diese Substanzen sind bekannt für ihre Aktivierung der intrazellulären Superoxid-Produktion in Makrophagen (Turner et al., 1993).

NR 8383-Zellen sind normalerweise ein weithin akzeptiertes Äquivalent zu primären, frisch präparierten Zellen. Da es sich um eine homogene Population handelt, bieten sie sogar reproduzierbarere Versuchsbedingungen als die Wildvariante, da sie nicht den individuellen phänotypischen Variationen zwischen den einzelnen Versuchstieren und auch nicht der Kontamination mit fremdem Zellmaterial, z.B. Erythrozyten, unterliegen (Helmke et al., 1987; Helmke et al., 1989). Vom ethischen Standpunkt aus ist es von Vorteil, dass bei der Arbeit mit einer Zelllinie nicht die Notwendigkeit des Tötens von Tieren besteht, um Zellen für Versuche zu gewinnen. Weiterhin ist es für primäre, bereits differenzierte Makrophagen nicht möglich, Daten zur Proliferation zu erheben, da diese sich nicht mehr teilen. Die PCR und die Proliferationsversuche wurden also mit Zellen der Zelllinie durchgeführt.

II. Funktionelle Untersuchungen an Ratten-Alveolarmakrophagen

1. Auswirkungen von LPA auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration von primären Ratten-Alveolarmakrophagen

Diese Versuchsreihe wurde mit primären Alveolarmakrophagen durchgeführt, für die Hornuß et al. (2001) bereits das Vorliegen mehrerer LPL-Rezeptoren, darunter auch des LPA₁-Rezeptors, nachgewiesen hatten.

LPA führte sowohl in der Konzentration von 0,1 µM als auch von 1 µM bei etwas mehr als der Hälfte der Zellen zu einer deutlichen Veränderung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration innerhalb weniger Minuten. Die Reaktionen verliefen nach dem Alles-oder-nichts-Prinzip: entweder kam es zu einer charakteristischen oszillierenden Veränderung des intrazellulären Ca²⁺-Gehalts mit dem jeweils größten Ausschlag zu Beginn der Reaktion und kontinuierlich kleiner werdender Amplitude, oder die Zelle zeigte keine spezifische Reaktion auf die Zugabe von LPA. Die ganze Reaktion begann innerhalb der ersten zwei Minuten nach Zugabe von LPA und dauerte im Durchschnitt maximal sieben Minuten an. Es handelt sich also um eine eher schnelle Antwort auf die Anwesenheit von extrazellulärem LPA.

Alveolarmakrophagen spielen eine entscheidende Rolle im pulmonalen Abwehrgeschehen: Sie betreiben Phagozytose, präsentieren Antigene, und sezernieren diverse Botenstoffe wie Interferon, Komplement, Prostaglandine und inflammatorische Zytokine. Die Immunantwort von Makrophagen ist oftmals abhängig vom Zusammenspiel der Rezeptoren auf der Makrophagenoberfläche und den Polysaccharidketten auf der Zelloberfläche von Bakterien und Pilzen, z.B. LPS. Im Rahmen dieser Antwort kommt es zu einer Mobilisation von Ca²⁺ im Zytosol der Makrophagen.

Einer der wichtigsten Schritte in der pulmonalen Immunantwort ist die Generierung von Superoxidanionen, dem so genannten *respiratory burst*, als dessen Initiator Ca²⁺ fungiert (Hoyal et al., 1996). Es spielt in Alveolarmakrophagen eine doppelte Rolle einerseits als Mediator für die Produktion und andererseits für die Freisetzung von Superoxid (Holian et al., 1982; Foldes-Filep et al., 1992). Calcium induziert in Makrophagen zudem die Freisetzung von Arachidonsäure (Bates et al., 1995).

Das im Zytoplasma vorhandene Calcium kann durch ligandengesteuerte oder spannungsabhängige Kanäle vom Extrazellularraum in die Zelle gelangen oder aber durch intrazelluläre Rezeptoren an Ca^{2+} -Depots sehr schnell verfügbar sein. Im Gegensatz zu z.B. Muskelzellen ist der Ca^{2+} -Influx in Alveolarmakrophagen vom Typ NR 8383 nicht spannungsabhängig: eine Depolarisation der Makrophagenmembran führt nicht zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Zhang et al., 1997).

Von allen bisher bekannten LPL-Rezeptoren weiß man, dass sie eine Calcium-Mobilisation und Akkumulation von IP_3 im Zytosol der untersuchten Zellen bewirken (z.B. An et al., 1998a/b; Okamoto et al., 1998; Ancellin et al., 1999; Okamoto et al., 1999; Sato et al., 1999; Yamazaki et al., 2000). Dieser Effekt ist teilweise durch PTX zu inhibieren, wie zum Beispiel beim LPA-Rezeptor LPA_1 (An et al. 1998a), was eine Beteiligung der PTX-sensitiven $G_{i/o}$ -Proteine bei der Ca^{2+} -Mobilisation suggeriert. Beim LPA_2 -Rezeptor und bei einigen S1P-Rezeptoren war der LPA-induzierte Ca^{2+} -Influx via PLC/ IP_3 -Pfad nur teilweise durch PTX zu unterdrücken, wohl aber durch einen PLC-Inhibitor. Hier sind wahrscheinlich sowohl $G_{i/o}$ -Proteine als auch PTX-insensitive G_q -Proteine an der Signaltransduktion beteiligt (An et al., 1998a).

In primären Alveolarmakrophagen der Ratte wird der LPA_1 -Rezeptor exprimiert; zu LPA_2 und LPA_3 sind keine Untersuchungen durchgeführt worden (Hornuß et al., 2001). Damit verfügen diese Makrophagen über mindestens einen LPA-Rezeptor, der einen PLC/ IP_3 -vermittelten Ca^{2+} -Einstrom vermitteln könnte. In humanen Jurkat T-Zellen vermittelte LPA_1 eine PTX-abhängige Hemmung der AC und eine transiente Ca^{2+} -Mobilisation über den PLC/ IP_3 -Pfad (An et al., 1998a).

Es spricht daher einiges dafür, dass die Erhöhung des Calciumspiegels in primären Ratten-Alveolarmakrophagen nach Zugabe von 0,1 μM und 1 μM LPA von einem LPA-Rezeptor, zum Beispiel LPA_1 , vermittelt ist.

2. Auswirkungen von LPL und LPS auf die Aktivierung des ERK/MAP-Kinase-Pfades in primären Alveolarmakrophagen der Ratte

Die MAP-Kinase-Kaskade ist eine bedeutende Komponente in der Koordination der Vielzahl der an einer Zelle ankommenden Signale, die durch die verschiedensten

extrazellulären Mediatoren hervorgerufen werden. Die Aktivierung der MAP-Kinasen trägt das Signal weiter bis in den Zellkern. Die konsekutive Phosphorylierung vieler Zielproteine und Transkriptionsfaktoren mit substantieller regulatorischer Funktion beeinflusst damit wichtige Elemente der Zellfunktion: Die MAP-Kinase-Signalkaskade ist ein multifunktionelles Signalnetzwerk, welches Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose und zelluläre Antworten auf Stress beeinflusst. Kritische Elemente in der Kontrolle der Signalkaskade sind Kinasen und Phosphatasen, die MAP-Kinasen aktivieren und deaktivieren (Zhou et al., 2004) Die Vielfalt der Signalmöglichkeiten macht deutlich, dass der Signaltransduktionsweg via MAP-Kinase nicht an spezifische hormonelle oder zytokine Systeme gebunden ist. Die MAP-Kinase-Kaskade wird von vielfältigen Rezeptorsystemen ausgelöst (Cobb und Schäfer, 1996).

Es gibt sehr viele verschiedene MAP-Kinasen, die sich oftmals nur in der zentralen Aminosäure der katalytischen Domäne voneinander unterscheiden; so enthält ERK-1/2 Glutamat an einer Stelle, an der sich in der Peptidkette der Januskinase (JNK) Prolin befindet (Robinson et al., 1996)

ERK-1, eine 44 kD große MAP-Kinase, und ERK-2, deren Molekulargewicht 42 kD beträgt, waren die ersten Mitglieder der MAP-Kinase-Familie, deren genetischer Code sequenziert wurde (Boulton et al., 1991). Die Signalkaskaden, die zu ihrer Aktivierung dienen, sind die am besten charakterisierten. Von Rezeptor-Tyrosinkinase ist eine potente Aktivierung der p44/42-ERK/MAP-Kinasen bekannt (Hunter, 1995).

Die Anwesenheit von aktivierter MAP-Kinase ist die Voraussetzung für regelrechte Differenzierung von PC12-Zellen (Sontag et al., 1993). Die p44/42-ERK erwies sich als spezifischer, regionaler Mediator für die Insulinwirkung im sympathischen Nervensystem (Rahmouni et al., 2004).

Versuche mit mutierter ERK-2, welcher die entscheidende Aminosäure in der katalytischen Domäne fehlte, bewirkten eine komplette Blockierung der EGF (epidermal growth factor)-induzierten Zellproliferation (Sontag et al., 1993).

In ruhenden Zellen befinden sich die ERK im Zytoplasma, wo sie vor allem mit Mikrotubuli assoziiert vorliegt. Werden die Zellen mitogen aktiviert, so wandert ein Teil der aktivierten MAP-Kinasen in den Nukleus (Lenormand et al., 1993).

Die bedeutende Rolle von MAP-Kinasen für die Progression des Zellzyklus zeigte sich zum Beispiel in chinesischen Hamster-Fibroblasten, wo eine Mutation mit funktioneller Änderung der Kinasefunktion der p44/42-ERK zum Stillstand des Zellwachstums führte (van Corven et al., 1993). In humanen Brustkrebszellen wurde die Zellproliferation vor allem via p44/42-ERK induziert (Skildum et al., 2005). Die Expression des hochspezifischen MAP-Kinase-Inhibitors MKP1 führt zur Blockade der Ras-induzierten DNA-Synthese, während die Aktivierung der MAP-Kinase ein ausreichender Stimulus für das Zellwachstum von NIH 3T3-Zellen ist (Mansour et al., 1994).

Signaltransduktion durch LPL-Rezeptoren findet auf vielfältige Weise statt. Die bekannten Signalübertragungswege erfolgen über die G-Proteine G_i , G_q , $G_{12/13}$, Ras und Rho (Racké et al., 1999; Pyne und Pyne, 2000). Neben der Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration besteht ein wichtiger Mechanismus der Signaltransduktion durch LPL-Rezeptoren in der Aktivierung des Ras-Proteins mittels der $\beta\gamma$ -Untereinheit des G_i -Rezeptors und der daraus resultierenden Phosphorylierung von MAP-Kinase. Über das $G_{12/13}$ -Protein wird zudem die kleine GTPase Rho aktiviert, welche die Phosphorylierung von p44/42-ERK durch Interaktion mit der MAPKK1 und der MAPKK2 reguliert (Galaria et al., 2004).

Die Anwesenheit von aktivierter p44/42-ERK lässt darum indirekte Rückschlüsse über das Vorhandensein von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wie den LPL-Rezeptoren zu und erlaubt Aussagen über die Funktionalität dieser Rezeptoren.

Von den hier untersuchten LPL ist bereits eine p44/42-ERK-Aktivierung in anderen Zellarten bekannt. So stimulierte S1P in Swiss 3T3-Zellen PTX-abhängig einen rapiden Anstieg der p44/42-ERK-Aktivität (Wu et al., 1995). Die Phosphorylierung der MAP-Kinase war dabei konzentrations- und zeitabhängig: 5 μ M S1P bewirkten einen maximalen Anstieg der ERK-Aktivität nach 2,5 min (Wu et al., 1995). Die Blockierbarkeit durch PTX indiziert, dass in die S1P-vermittelte p44/42-ERK-Aktivierung ein oder mehrere Mitglieder der PTX-sensitiven G-Proteine der G_i/G_o -Familie involviert sind. Weiterhin stimulierte S1P in Swiss 3T3-Zellen die Bildung von Aktivator Protein 1, eines bedeutsamen Transkriptionsfaktors für das Zellwachstum (Wu et al., 1995). Die von S1P

in primären Osteoblasten hervorgerufenen mitogenen Effekte ließen sich durch spezifische p44/42-ERK-Inhibitoren teilweise unterdrücken (Grey et al., 2004).

LPA aktivierte die p44/42-ERK in Rattenzellen via G_i -Rezeptor. Dieser Effekt war ebenfalls durch PTX zu blockieren (van Corven et al., 1993). Auch die von SPC induzierte Kontraktion der intestinalen Muskulatur von Katzen erwies sich als G_i -Protein-vermittelt und involvierte die p44/42-ERK (Lee et al., 2002). In humanen Melanozyten bewirkte die SPC-stimulierte ERK-1/2 die Neubildung von Melanin (Higuchi et al., 2003). Die von LPS in Alveolarmakrophagen aktivierten MAP-Kinasen – ERK, JNK und p38-MAP-Kinase - spielen eine entscheidende Rolle für die Produktion proinflammatorischer Zytokine (Shepherd et al., 2004).

Multiple Effekte der LPL und von LPS sind also G-Protein/MAP-Kinase-vermittelt.

2.1 Inkubation der Zellen mit LPA

RAM wurden 5, 10, 20 und 30 Minuten mit LPA inkubiert. Der Western-Blot zeigte einen nicht-signifikanten Anstieg der phosphorylierten MAP-Kinase nach 5 Minuten und einen eindeutigen Anstieg der aktivierten MAP-Kinase nach 10 Minuten. Auch die 20minütige und die 30minütige Inkubation zeigten ein höheres Niveau als der Kontrollversuch.

Es scheint, dass LPA in primären Alveolarmakrophagen der Ratte ein Stimulator der p44/42-ERK ist. Die Aktivierung des Proteins scheint im Gegensatz zu der bei Swiss 3T3-Zellen durch S1P beschriebenen Aktivierung (Wu et al., 1995) jedoch einen eher langsamen Transduktionsweg zu nehmen, der sich aber 5 Minuten nach Versuchsbeginn bereits abzeichnet. Die maximale Konzentration der aktivierten ERK ergab sich nach 10 Minuten, jedoch hält auch 30 Minuten nach Zugabe von LPA die Aktivierung auf einem höheren Niveau als im Kontrollversuch an. Vermutlich ist die komplette Dauer der Aktivierung mit dem untersuchten Zeitprotokoll nicht erfasst worden.

2.2 Inkubation der Zellen mit LPS

RAM wurden 20, 30, 60, 90 und 120 Minuten mit LPS inkubiert. Die Wirkungen von LPS zeigten sich deutlich später als die von LPA. Erst nach 30 Minuten stieg die Menge der aktivierten ERK/MAP-Kinasen auf ein signifikant erhöhtes Niveau.

Es kam jedoch bereits nach 15 und nach 20 Minuten zu einem allmählichen nicht-signifikanten Anstieg an phosphorylierter ERK. Der Anstieg blieb auch nach 60, 90 und 120 Minuten noch bestehen, allerdings ohne statistische Signifikanz.

Die Effekte von LPS auf die Aktivierung der ERK scheinen also erst nach 30 Minuten zu signifikant zu werden. Der Anstieg der ERK deutet sich jedoch auch hier bereits 15 bis 20 Minuten nach Versuchsbeginn an, ist damit aber immer noch deutlich verzögert gegenüber der Aktivierung durch LPA. Eventuell bedeutet dieser Unterschied im Zeitprotokoll, dass die Wirkungen der aktivierten ERK unterschiedlich sind. Die Bedeutung der Kinetik der ERK-Aktivierung für die Wirkungsweise derselben ist in anderen Zellmodellen beschrieben worden: Die schnelle Aktivierung der ERK zum Beispiel durch EGF in PC12-Zellen führt nicht zu einem Auswandern der MAP-Kinase in den Zellkern (Lenormand et al., 1993), während eine prolongierte Phosphorylierung derselben Proteine in NGF (nerve growth factor)-stimulierten PC12-Zellen zu einer ausgeprägten Akkumulation von ERK/MAP-Kinase im Zellkern führte (Traverse et al., 1992). Dieser Effekt wird für die Diversität der ERK-Antworten mitverantwortlich gemacht. Möglich also, dass LPS und LPA die gleiche MAP-Kinase aktivieren, jedoch eine völlig andere zelluläre Antwort induzieren.

2.3 Inkubation der Zellen mit S1P und PTX

RAM wurden jeweils 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten mit 10 μ M S1P inkubiert. Es zeigten sich variable Befunde: Nach 10 Minuten und nach 20 Minuten Inkubation mit S1P konnte eine nicht-signifikante Steigerung des Gehalts an aktivierter ERK nachgewiesen werden. Nach 30 Minuten kam es zu einer nicht-signifikanten Absenkung der phosphorylierten ERK. Bemerkenswert war die nach 15 Minuten auftretende rechnerisch signifikante Absenkung der Menge phosphorylierter ERK auf $26 \pm 16\%$ der Kontrolle.

Da sich in der hohen Konzentration keine klaren Effekte zeigten, wurden ähnliche Versuche mit einer niedrigeren Konzentration von S1P (1 μ M) und kürzerer Expositionszeit (2 und 5 Minuten) durchgeführt. Hier zeigte sich ein deutlicher Anstieg der MAP-Kinase, welcher nicht durch Vorbehandlung mit PTX zu blockieren war. Das Ergebnis impliziert, dass PTX-insensitive G-Proteine in die Signaltransduktion involviert sind. Da sich bei den Versuchsansätzen mit PTX durchgängig ein geringerer Standardfehler des Mittelwerts (SEM) zeigte, kann sogar davon ausgegangen werden,

dass möglicherweise zwei divergierende Wege der Signalübermittlung als zelluläre Antwort ablaufen, die unter Umständen gegenläufig sind und von denen der eine PTX-sensitiv und der andere PTX-insensitiv ist.

Der Anstieg der Menge an phosphorylierter ERK war für S1P+PTX sowohl nach 2 Minuten, als auch nach 5 Minuten deutlich signifikant. Der Anstieg nach 2 Minuten war jedoch um den Faktor 10 höher als nach 5 Minuten, wie für Swiss 3T3-Zellen vorbeschrieben (Wu et al., 1995). Dort hatte die Zugabe von 5 μM S1P zu einem maximalen Anstieg der MAP-Kinase nach 2,5 Minuten geführt, danach war es zu einem kontinuierlichen Absinken der Konzentration an phosphorylierter ERK gekommen bis auf etwa 30% nach 15 Minuten.

In der vorliegenden Arbeit wurden initial 10 μM S1P eingesetzt und es kam zu keinem klaren Effekt. Das deutliche Absinken der Menge an phosphorylierter ERK nach 15 Minuten Inkubation mit 10 μM S1P könnte Ausdruck einer vorangegangenen Aktivierung im Sinne einer transienten Desensibilisierung sein. Möglicherweise wurden auch von aktiven Reaktionskomponenten gewisse Schwellenwerte erreicht, die zu einer negativen Rückkopplung der Reaktion führten. 2 Minuten nach Inkubation mit 1 μM S1P zeigte sich die maximale zelluläre Antwort, möglicherweise vermittelt durch den S1P₂-Rezeptor, der in RAM exprimiert wird (Hornuß et al., 2000). Vom S1P₂-Rezeptor ist bekannt, dass er sowohl an PTX-sensitive G_{i/o}-Proteine als auch an PTX-insensitive G_q- und G₁₃-Proteine gekoppelt ist (Windh et al., 1999) und den ERK-2/MAP-Kinase-Weg auf eine PTX-insensitive Weise aktiviert (Gonda et al., 1999).

2.4 Inkubation der Zellen mit SPC

RAM wurden jeweils 5, 10, 20 und 40 Minuten mit SPC inkubiert. Nach 5 Minuten war keine signifikante Steigerung oder Absenkung der Menge an aktivierter ERK festzustellen, aber nach 10 Minuten kam es zu einer nicht-signifikanten Erhöhung des Gehalts der phosphorylierten ERK auf 195% des Ausgangswertes. Nach 20 Minuten war nur noch ein Gehalt von 68% des Anfangsniveaus zu messen, nach 40 Minuten sogar nur noch 46% der Kontrolle. Auch diese Veränderungen zeigten im verpaarten T-Test nach Student keine statistische Signifikanz. Trotz der statistischen Uneindeutigkeit ergibt sich in der graphischen Auswertung der Versuche eine glockenförmige Kurve mit einem Scheitelpunkt bei 10 Minuten Inkubationszeit mit SPC.

Ein Anstieg der Menge an phosphorylierter ERK/MAP-Kinase in Alveolarmakrophagen der Ratte nach Stimulation mit SPC scheint also potentiell möglich, aber erfolgt nicht mit gleicher Stringenz und Eindeutigkeit wie durch die potenteren Stimulatoren LPA und LPS.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in primären Alveolarmakrophagen der Ratte LPA und LPS geeignet sind, den p44/42-ERK-Pfad zu aktivieren. LPA wirkt dabei möglicherweise über den LPA₁-Rezeptor. S1P führte in niedrigeren Konzentrationen zu einem nicht durch PTX inhibierbaren frühen Anstieg der MAP-Kinase, möglicherweise vermittelt durch den S1P₂-Rezeptor.

Falls SPC eine Rolle in der Aktivierung dieser Enzymkaskade spielt, dann nicht über die S1P-Rezeptoren, sondern möglicherweise ebenfalls über einen LPA-Rezeptor. In der Literatur wird beschrieben, dass LPL-Rezeptoren zwar nach dem Liganden benannt sind, welcher mit größter Affinität an sie bindet, dass jedoch die anderen LPL-Botenstoffe ebenfalls – wenn auch mit geringerer Affinität und geringerem Effekt – binden und wirken können (Fukushima et al., 2001). Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass SPC über einen völlig anderen Rezeptortyp wirkt.

III. Untersuchungen an Zellen der Linie NR 8383

1. Auswirkungen der LPL auf Proliferation und Überleben von Alveolarmakrophagen

LPL haben *in vivo* über die Aktivierung der cAMP-Kaskade und nachfolgender NO-Bildung Einfluss auf Zellvitalität und Zellfunktion. Übermäßig gesteigerte Superoxidkonzentrationen in der Zelle führen zur Apoptose. Auf der anderen Seite ist von LPL in verschiedenen Modellen eine proliferative Wirkung bekannt (z.B. Koh et al., 1998).

Verschiedene Fragestellungen gingen also dieser Versuchsreihe voraus: Um den in der Literatur auf diverse Zellarten beschriebenen proliferativen Effekt von LPL zu überprüfen, wurde eine Versuchsreihe mit Tritium-markiertem Thymidin wie unter B.II.11 beschrieben durchgeführt. Die Radioaktivität des inkorporierten ³H-Thymidins galt dabei als äquivalentes Maß für die Proliferationsrate der Zellen. Je mehr radioaktiv markierte

Nukleotide in die DNA der Zellen eingebaut würden, desto höher wäre die gemessene Radioaktivität. Weiterhin sollte die Abhängigkeit der möglichen proliferativen Effekte von verschiedenen FKS-Konzentrationen im Nährmedium überprüft werden.

Es wurden Zellen der Zelllinie NR8383 eingesetzt, da primäre Alveolarmakrophagen keine Zellteilung mehr betreiben.

1.1 Stimulation mit LPA und 7,5% FKS im Medium

Die Inkubation der Zellen mit LPA bewirkte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Proliferationsrate: der Anstieg beginnt nicht-signifikant bei 0,1 μM LPA, setzt sich signifikant bei 1 μM LPA fort und besteht auch bei einer Konzentration von 10 μM LPA weiter. Die graphische Darstellung zeigt einen parabolischen Kurvenverlauf mit einem Scheitelpunkt bei 1 μM LPA. 1 μM LPA stellt also für NR 8383-Zellen bezüglich ihrer mitotischen Aktivität die optimale LPA-Konzentration dar, wenn das Medium 7,5% FKS-Zusatz enthält. Das Ausmaß des proliferativen Effekts ist jedoch vor allem in Hinblick auf die Effekte, die durch FKS erzielt wurden, als gering zu bewerten.

1.2 Stimulation mit S1P und 7,5% FKS im Medium

Es zeigte sich, dass es unter S1P-Einfluss zu einem nicht-signifikanten Anstieg der Proliferation kam.

Die Ergebnisse (für LPA und für S1P) korrelieren mit den Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen, dass LPL proliferative Effekte zeigen. So steigerte LPA die Zellproliferation in immortalisierten B-Lymphoblasten (Roskopf et al., 1998), wirkte als potenter mitogener Stimulus für ruhende Fibroblasten (Tigyi et al., 1994) und vermittelte gesteigerte DNA-Synthese und Zellproliferation in glatten Muskelzellen (Seewald et al., 1997; Gennero et al., 1999; Chin und Chueh, 1998). Auch auf Zellen der glatten Muskulatur der Atemwege übte LPA einen durch PTX blockierbaren mitogenen Effekt aus (Cerutis et al., 1997).

In humanen Endothelzellen stimulierten LPA und S1P Migration und Proliferation, zwei Hauptkomponenten von Wundheilung und Angiogenese (English et al., 1999; Lee et al., 1999b/c; Lee et al., 2000, Panetti et al., 2000). Beide LPL können als Promotoren für Tumorwachstum auf menschliche kleinzellige Lungentumoren wirken, wobei S1P potenter zu wirken scheint als LPA (Yoshioka et al., 1998; Goetzl et al., 1999). Es gibt

Hinweise, dass auch S1P und SPC das Wachstum von Fibroblasten steigern können (Kiss und Mukherjee, 1997).

Diese Arbeit zeigt, dass zumindest LPA auch für Ratten-Alveolarmakrophagen der Zelllinie NR 8383 ein Stimulus für Proliferation und Überleben darstellt, wenn auch von deutlich geringerer Bedeutung als beispielsweise FKS.

1.3. Stimulation mit LPA ohne FKS und mit 15% FKS im Medium

Die in den vorangegangenen Versuchen gewonnenen Ergebnisse über Wirkungen der LPL auf die Proliferation von NR 8383-Zellen sollten in dieser Versuchsreihe auf ihre Abhängigkeit von verschiedenen FKS-Konzentrationen im Nährmedium überprüft werden.

FKS erwies sich erwartungsgemäß als klarer Stimulus der Proliferation von Alveolarmakrophagen, der durch die bloße Substitution von LPA nicht ausgeglichen werden konnte, wie es in der Literatur beschrieben worden war: LPA hatte sich für Peritonealmakrophagen der Maus, die serumfrei kultiviert worden waren, als Überlebensfaktor erwiesen, indem es die Phosphoinositid-3-Kinase der Zellen aktivierte (Koh et al., 1998). Diese Beobachtung trifft jedoch auf die Alveolarmakrophagen der Zelllinie NR 8383 nicht zu: Bei Zellen, deren Medium kein FKS enthielt, führte LPA alleine nicht zu einer Steigerung der Proliferation.

Auf der anderen Seite scheint die Versorgung der Zellen mit sämtlichen dem FKS enthaltenen stimulierenden Faktoren (wie z.B. Wachstumsfaktoren, Hormone und Anheftungsfaktoren, aber auch Aminosäuren, Salze und Spurenelemente) durch Zugabe einer relativ hohen Konzentration von 15% FKS in das Zellkulturmedium das Wachstum der Zellen auf einer Art Plateauphase bzw. Sättigung zu halten, da in diesem Fall sowohl S1P als auch LPA keine signifikante Steigerung der Zellteilungsrate mehr induzieren konnten. Bei halber Konzentration (7,5% FKS) bewirkte hier zumindest die Zugabe von 1 μ M LPA statistisch signifikante Veränderungen im Proliferationsverhalten der Zellen.

Der Zusatz von 15% FKS zum Medium ermöglichte den Zellen eine deutlich umfangreichere Wachstumsaktivität, als es bei nativem Medium der Fall war. Die

Proliferationsraten der FKS-stimulierten Zellen übertrafen die Vergleichsgruppe um bis zu 1400% des Ausgangswertes.

2. Expressionsmuster der LPL-Rezeptoren in Alveolarmakrophagen der Zelllinie NR 8383

Wird ein Gen für einen Rezeptor transkribiert, so findet sich im Zytosol der betreffenden Zelle die entsprechende mRNA. Somit stellt die Gesamtheit der mRNA einer Zelle die Gesamtheit der Gene dar, die zum Zeitpunkt der mRNA-Präparation in der Zelle exprimiert wurden. Anders als die genomische DNA erlaubt die mRNA den Schluss auf das Expressionsprofil von Proteinen einer Zelle, wie z.B. LPL-Rezeptoren.

Die RT-PCR mit den Primern der bekannten, in Rattenzellen vorkommenden LPL-Rezeptoren ergab als Expressionsmuster, dass die S1P-Rezeptoren S1P₁, S1P₂, S1P₃ und S1P₅ und der LPA-Rezeptor LPA₂ in NR 8383-Zellen exprimiert wurden.

Als Positivkontrolle für den regelrechten Ablauf der RT-PCR diente die Amplifikation der cDNA für β -Aktin. β -Aktin als wichtiges Element des Zytoskeletts wird ubiquitär und konstitutiv in eukaryotischen Zellen exprimiert. Ergaben sich nach der PCR keine Banden für das untersuchte Rezeptortranskript, wohl aber für β -Aktin, so war davon auszugehen, dass die Qualität der eingesetzten cDNA einen Nachweis erlaubte und das Fehlen der Bande einer fehlenden Expression des Rezeptors in der Zelle entsprach. Andererseits diente die Quotientenbildung mit der optischen Dichte der β -Aktin-Bande einer objektivierbaren Quantifizierung der Expression, ausgehend von der Annahme, dass die Expression des in der Zelle stets vorhandenen β -Aktin nicht durch externe Stimuli alteriert wird, während die Transkription anderer Gene induzierbar ist. Die Expression anderer Gene kann daher auf dieses Haushaltsgen bezogen werden.

Die untersuchten Primerpaare bezogen sich auf spezifische Abschnitte der bereits sequenzierten Gene für LPL-Rezeptoren in Ratten.

Die Länge der PCR-Produkte wurde mit einem DNA-Standard ermittelt, der die Anzahl der Basenpaare äquivalent der Lauflänge in dem Agarosegel abbildet. Alle entstandenen Banden für LPL-Rezeptortranskripte und β -Aktin entsprachen der erwarteten Größe.

Die nachgewiesenen Rezeptoren zeigten distinkte, deutliche Banden. Lediglich die Expression des S1P₄-Rezeptors ließ sich nicht in jedem Fall reproduzieren. Möglicherweise ist die Expression dieses Rezeptors von unbekanntem Faktoren abhängig, die während der Experimente nicht immer konstant gehalten wurden.

Es zeigt sich jedoch ein definiertes Expressionsmuster von LPL-Rezeptoren in Alveolarmakrophagen der Zelllinie NR 8383, das sich sowohl von dem Muster der humanen Alveolarmakrophagen, als auch von primären Makrophagen der Spezies Ratte deutlich unterscheidet: Nachgewiesen wurden in den NR 8383-Zellen im Einzelnen der LPA₂-Rezeptor aus der Familie der LPA-Rezeptoren und mit dem S1P₁-, S1P₂-, S1P₃-, S1P₄-, sowie dem S1P₅-Rezeptor alle Vertreter der S1P-Rezeptorfamilie. Die Anwesenheit des S1P₄-Rezeptors bleibt fraglich, aber möglich.

Hornuß et al. hatten 2001 ein Expressionsmuster für LPL-Rezeptoren in primären Alveolarmakrophagen der Ratte vorgelegt, das andere Ergebnisse zeigte: Es wurde von den Rezeptoren der S1P-Familie lediglich der S1P₂-Rezeptor exprimiert, wobei für den S1P₄-Rezeptor zu diesem Zeitpunkt noch keine adäquaten Primer vorlagen. Der S1P₅-Rezeptor war noch nicht bekannt. Aus der Familie der LPA-Rezeptoren wurde nur der LPA₁-Rezeptor nachgewiesen; für die anderen LPA-Rezeptoren lagen nur humane Primersequenzen vor (Hornuß et al., 2001). Die Makrophagen der Zelllinie hingegen exprimieren den LPA₁-Rezeptor nicht, dafür aber den LPA₂-Rezeptor.

In primären humanen Alveolarmakrophagen sieht das Bild noch anders aus: Die humanen Makrophagen exprimieren LPL-Rezeptoren mit einem Schwerpunkt auf der LPA-Familie (alle 3 Rezeptoren kommen vor) und nur einen S1P-Rezeptortyp, nämlich S1P₁ (Hornuß et al., 2001). Eine andere Studie an menschlichen Makrophagen (nicht explizit Alveolarmakrophagen) belegt das Vorkommen des LPA₁- und LPA₂-, sowie des S1P₁-, S1P₂- und S1P₄-Rezeptors in humanen Makrophagen. Die Rezeptoren S1P₅ und LPA₃ konnten nicht nachgewiesen werden (Duong et al., 2004). Der LPA₁-Rezeptor unterlag in differenzierten humanen Makrophagen einer Down-Regulation (Duong et al., 2004).

Im Vergleich zwischen den Spezies liegt also seitens der humanen Makrophagen eine Gewichtung auf die LPA-Familie vor, hingegen die S1P-Gruppe deutlich stärker in Ratten-Alveolarmakrophagen der Zelllinie vertreten ist. Der direkte Vergleich zwischen

primären Zellen der Ratte und kultivierten Alveolarmakrophagen zeigt auch in Hinblick auf die Rezeptoren LPA₂ und LPA₃ eine mögliche Kongruenz: Zum Zeitpunkt der Untersuchungen an primären Alveolarmakrophagen waren die genomischen Sequenzen für die beiden Rezeptoren noch nicht bekannt. Gut möglich, dass zumindest einer der beiden Rezeptoren auch in primären Makrophagen exprimiert wird, da die NR 8383-Zellen den LPA₂-Rezeptor konstitutiv exprimieren.

Der S1P₅-Rezeptor, der in NR 8383-Zellen ebenfalls exprimiert wird, war zum Zeitpunkt der Versuche mit primären Alveolarmakrophagen noch nicht beschrieben worden. Erst im Jahr 2000 wurde der S1P₅-Rezeptor von Im et al. sequenziert. Auch hier ist ein Vorkommen in primären Alveolarmakrophagen der Ratte möglich. Der Nachweis des S1P₂-Rezeptors ist zwischen Zelllinie und primären Zellen übereinstimmend.

Die Verschiedenheiten überwiegen jedoch: NR 8383-Zellen exprimieren nicht wie die Primärzellen den LPA₁-Rezeptor, hingegen der S1P₁- und der S1P₃-Rezeptor in primären Ratten-Alveolarmakrophagen nicht vorzukommen scheinen.

In beiden Versuchsreihen, der vorliegenden und der von Hornuß et al. (2000), wurden dieselben Primer und dasselbe Protokoll zur Durchführung von mRNA-Präparation und RT-PCR verwendet. Möglicherweise existieren also tatsächlich deutliche funktionell-morphologische Unterschiede zwischen primären und kultivierten Alveolarmakrophagen der Ratte.

Zusammenfassend lässt sich jedoch feststellen, dass Alveolarmakrophagen der Ratte unabhängig ihrer Herkunft mindestens einen LPL-Rezeptor für LPA und mindestens einen für S1P enthalten. Es sind also für beide Zellarten LPL-Rezeptor-vermittelte Effekte zu erwarten.

3. Wirkung von LPS und PMA auf die Expression von LPL-Rezeptoren in NR 8383-Zellen

Der Vorgang der Transkription ist häufig abhängig von endogenen und exogenen Einflüssen auf die Zelle. Auf ihre Wirkung als mögliche exogene Stimuli auf die Expression von LPL-Rezeptoren wurden LPS und PMA überprüft. LPS sind Antigene der Zellwand gramnegativer Bakterien. Der Phorbolster PMA, eine dem DAG ähnliche Substanz, aktiviert dauerhaft die PKC.

Nach 20stündiger Inkubation mit den Substanzen wurde die gesamte mRNA der Alveolarmakrophagen extrahiert und eine RT-PCR durchgeführt.

LPS, nicht jedoch PMA bewirkte eine Hochregulation der Expression des S1P₂-Rezeptors in Makrophagen der Zelllinie NR 8383.

Über die LPL S1P, SPC und LPA ist bekannt, dass sie in Alveolarmakrophagen der Ratte einen *respiratory burst*, also eine gesteigerte Produktion freier Superoxid-Radikale, auslösen können (Hornuß et al., 2001). Es gibt viele Hinweise, dass LPL bei Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle spielen. Für LPS – als Bakterienantigen Stimulus für eine entzündliche Reaktion - konnte schon in einigen Modellen ein Anstieg der intrazellulären Superoxid-Produktion nachgewiesen werden (z.B. Turner et al., 1993; Lee et al., 1999a; Girón-Calle et Forman, 2000).

Wenn LPS nun die Expression des S1P₂-Rezeptors steigert und sowohl S1P als auch LPS einen *respiratory burst* in Alveolarmakrophagen der Ratte induzieren können, so ist es möglich, dass die LPS-induzierte Steigerung der Superoxid-Produktion zumindest teilweise durch S1P-Rezeptoren im allgemeinen (und den S1P₂-Rezeptor im Besonderen) vermittelt wird. Ein synergistischer Effekt beider Mechanismen ist jedenfalls annehmbar.

Andererseits bewirkt die Stimulation des S1P₂-Rezeptors eine Erhöhung des basalen, Forskolin-unabhängigen cAMP-Niveaus durch Stimulation der AC (Kon et al., 1999; Gonda et al., 1999). Erhöhte cAMP-Spiegel führten in Peritonealmakrophagen des Meerschweinchens zu einer verminderten Produktion von Superoxid-Radikalen (Turner et al., 1993), so dass der LPS-induzierte *respiratory burst* auch durch S1P-unabhängige Mechanismen vermittelt werden könnte.

Der S1P₃-Rezeptor zeigte unter dem Einfluss von PMA, nicht jedoch LPS eine gesteigerte Expression.

Vom S1P₃-Rezeptor ist eine Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels über den PLC/IP₃-Pfad bekannt (z. b. An et al., 1998a/b; Sato et al., 1999), wobei DAG entsteht, welches die PKC aktiviert durch Erhöhung deren Affinität zu Ca²⁺. Derselbe Mechanismus wird auch vom Phorbolster PMA genutzt; PMA unterliegt jedoch nicht dem schnellen Abbau wie DAG (Stryer, 1995). Wenn nun PMA die Expression des

S1P₃-Rezeptors signifikant steigert, so besteht möglicherweise eine positive Rückkopplung zwischen der Rezeptorwirkung als G-Protein über die Phosphoinositidkaskade und der Expression des Rezeptors.

Auch von PMA ist eine starke Erhöhung der Konzentration von Superoxidradikalen in Alveolarmakrophagen im Sinne eines *respiratory burst* bekannt (Hornuß et al., 2001).

Die Expression der anderen LPL-Rezeptoren war unabhängig von der Aktivität der PKC oder der Stimulation mit dem Bakterienantigen LPS.

IV. Ausblick

Diese Arbeit zeigt, dass LPL-Rezeptoren von Alveolarmakrophagen der Zelllinie NR 8383 exprimiert werden, wie es zuvor schon für primäre Alveolarmakrophagen der Ratte beschrieben war (Hornuß et al., 2001). Die Expression mehrerer LPL-Rezeptortypen sowohl aus der LPA-Rezeptorfamilie als auch aus der S1P-Rezeptorfamilie legt nahe, dass LPL-Rezeptoren mit ihren physiologischen Liganden eine Rolle in der Regulation der Funktionen von Makrophagen spielen.

Die Beobachtung, dass LPA in RAM zu einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration führen kann in Zusammenschau mit der Kenntnis, dass LPA in RAM einen *respiratory burst* vergleichbar dem von LPS auslösen kann (Hornuß et al., 2001), verdichten die Vermutung, dass LPL eine Rolle als physiologische Aktivator von RAM zukommen könnte. Auch die Induktion der aktivierten ERK-2 durch LPA (und LPS) sowie die Hemmung der aktivierten ERK durch S1P deuten darauf hin, dass LPL eine wichtige Funktion für die Signaltransduktionsmechanismen von RAM einnehmen.

Weitere Experimente müssen zeigen, welches Ausmaß die Regulation der beschriebenen Mechanismen durch LPL wirklich hat und inwiefern die immunologische Aktivität der Makrophagen mittels LPL-Rezeptoren moduliert wird.

E. Zusammenfassung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, ausgewählte funktionelle Aspekte der LPL-Rezeptoren und ihrer Liganden zu untersuchen und das Expressionsmuster von LPL-Rezeptoren in Rattenalveolarmakrophagen der Zelllinie NR 8383 darzustellen.

Vorarbeiten hatten ein Expressionsmuster von LPL-Rezeptoren in primären Ratten-Alveolarmakrophagen (RAM) ergeben, in welchem LPA- und S1P-Rezeptoren exprimiert wurden, so dass für RAM funktionelle Effekte durch LPL zu erwarten waren..

NR 8383-Zellen exprimierten die S1P-Rezeptoren S1P₁, S1P₂, S1P₃ und S1P₅, sowie den LPA-Rezeptor LPA₂. Die Anwesenheit von S1P₄ bleibt fraglich, aber möglich. Die Expression der meisten Rezeptoren ist konstitutiv, während die Bildung von S1P₂ durch LPS und von S1P₃ durch PMA hochreguliert werden kann. Damit verfügen NR 8383-Zellen sowohl über verschiedene Rezeptorsubtypen für LPA, als auch über Rezeptoren für die Liganden S1P und SPC, so dass Untersuchungen zur Funktionalität der Signaltransduktion auch in der Zell-Linie sinnvoll schienen.

In der Fura-2-gestützten Calcium-Mirkofluorimetrie zeigte sich, dass LPA in den Konzentrationen 0,1 µM und 1 µM in primären Ratten-Alveolarmakrophagen in mehr als der Hälfte der untersuchten Zellen eine signifikante Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration bewirken konnte. Die intrazelluläre Calcium-Mobilisation ist ein wichtiger Schritt in der Signaltransduktion, der für alle LPL-Rezeptoren bekannt ist. Möglicherweise ist der in dieser Arbeit beobachtete Effekt über LPA-Rezeptor vermittelte Calciumströme zu erklären, wie es in der Literatur für andere Zellarten bereits vorbeschrieben ist.

Auch für die Untersuchungen zur Aktivierung des ERK/MAP-Kinase-Weges durch LPL und LPS mittels Western-Blot wurden RAM eingesetzt. Es zeigte sich, dass LPA ein Induktor der p44/42-MAP-Kinase mit einem Wirkungsmaximum nach 10 Minuten Inkubationszeit ist. Möglicherweise findet die Signaltransduktion via LPA₁-Rezeptor statt. Bei Stimulation mit LPS stieg die Menge an aktivierter ERK nach 30 Minuten auf 917 ±

301% des Ausgangsniveaus; die Antwort auf den Stimulus findet also später als durch LPA statt. Nach Inkubation mit S1P kam es in niedrigeren Konzentrationen zu einem frühen Anstieg der MAP-Kinase, möglicherweise vermittelt durch den S1P₂-Rezeptor. Der Effekt war durch PTX nicht zu inhibieren, was eine Beteiligung PTX-insensitiver G-Proteine impliziert. In höherer Konzentration von 10 µM zeigte sich nach 15 Minuten ein deutlich signifikantes Absinken der Menge an phosphorylierter ERK im Sinne einer transienten Desensibilisierung.

SPC führt zu keiner signifikanten Veränderung des ERK/MAP-Kinase-Niveaus in Ratten-Alveolarmakrophagen.

Die ³H-Thymidin-Inkorporation zeigte, dass die Proliferation von Alveolarmakrophagen der Zelllinie NR 8383 stark von FKS abhängig ist. Makrophagen, deren Medium kein FKS enthielt, wiesen im Gegensatz zu Zellen, deren Medium 15% FKS zugesetzt war, eine um den Faktor 10 bis 15 reduzierte proliferative Aktivität auf.

Die Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von LPA bewirkte zwar einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Proliferationsrate, konnte den fehlenden mitogenen Stimulus durch FKS nicht ersetzen oder ausgleichen. Der proliferative Effekt von LPA war im Gegensatz zu dem von FKS gering.

F. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** 1-Oleoyl-Lysophosphatidsäure (LPA)
- Abbildung 2:** D-erythro-Sphingosin-1-Phosphat (S1P)
- Abbildung 3:** Sphingosylphosphorylcholin (SPC)
- Abbildung 4:** Wirkung von 0,1 μM LPA auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von RAM.
- Abbildung 5:** Wirkung von 1,0 μM LPA auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von RAM.
- Abbildung 6:** Wirkung von 1,0 μM LPA auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von RAM.
- Abbildung 7:** Wirkung von LPA auf die Aktivierung der MAP-Kinase ERK-2.
- Abbildung 8:** Wirkung von LPS auf die Aktivierung der MAP-Kinase ERK-2.
- Abbildung 9:** Auswirkungen von LPL und LPS auf die Aktivierung der ERK-2.
- Abbildung 10:** Wirkung von S1P auf die Aktivierung der MAP-Kinase ERK-2
- Abbildung 11:** Wirkung von S1P und PTX auf die Aktivierung der MAP-Kinase ERK-2
- Abbildung 12:** Wirkung von SPC auf die Aktivierung der MAP-Kinase ERK-2
- Abbildung 13:** Wirkung von LPA auf die Proliferation von NR 8383-Zellen mit 7,5% FKS-Zusatz im Medium.
- Abbildung 14:** Wirkung von S1P auf die Proliferation von NR 8383-Zellen mit 7,5% FKS-Zusatz im Medium.
- Abbildung 15:** Wirkung von LPA auf die Proliferation von NR 8383-Zellen ohne FKS und mit 15% FKS-Zusatz im Medium.
- Abbildung 16:** Auswirkungen von LPS auf die Expression des S1P_1 -, S1P_2 -, S1P_3 -, S1P_4 -, S1P_5 - und des LPA_2 -Rezeptors in Alveolarmakrophagen der Linie NR 8383.
- Abbildung 17:** Wirkung von LPS auf die Expression des S1P_1 -Rezeptors in NR 8383-Zellen.
- Abbildung 18:** Wirkung von LPS und PMA auf die Expression des S1P_2 -Rezeptors in NR 8383-Zellen.

- Abbildung 19:** Wirkung von LPS und PMA auf die Expression des S1P₃-Rezeptors in NR 8383-Zellen.
- Abbildung 20:** Wirkung von LPS auf die Expression des S1P₅-Rezeptors in NR 8383-Zellen.
- Abbildung 21:** Wirkung von LPS auf die Expression des LPA₂-Rezeptors in NR 8383-Zellen.
-
- Tabelle 1:** Übersicht über die IUPHAR-Nomenklatur der LPL-Rezeptoren (vormals EDG-Rezeptoren) aus dem Jahr 2002.
- Tabelle 2:** Übersicht über die Expression der LPL-Rezeptoren in verschiedenen Gewebearten.
- Tabelle 3:** Signaltransduktionswege der verschiedenen LPL-Rezeptoren.
- Tabelle 4:** Wirkung von LPA auf die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration von RAM.
- Tabelle 5:** Wirkungen von LPA, LPS, S1P und SPC auf die MAP-Kinase ERK-2.
- Tabelle 6:** Wirkung von 1 µM S1P und PTX auf die MAP-Kinase ERK-2
- Tabelle 7:** Übersicht über die Ergebnisse des ³H-Thymidin-Inkorporationsassay.
- Tabelle 8:** Auswirkungen von LPS und PMA auf die Expression von LPL-Rezeptoren in NR 8383-Zellen.

G. Literaturverzeichnis

- An S, Bleu T, Zheng Y, Goetzl EJ. Recombinant human G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors mediate intracellular calcium mobilization. *Mol Pharmacol* 1998a; 54: 881-888.
- An S, Goetzl EJ, Lee H. Signaling mechanisms and molecular characteristics of G protein-coupled receptors for lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *J Cell Biochem* 1998b; Suppl 30-31: 147-157.
- An S, Bleu T, Zheng Y. Transduction of intracellular calcium signals through G protein-mediated activation of PLC by recombinant sphingosine 1-phosphate receptors. *Mol Pharmacol* 1999; 55: 787-794.
- Ancellin N, Hla T. Differential pharmacological properties and signal transduction of the sphingosine 1-phosphate receptors EDG-1, EDG-3, and EDG-5. *J Biol Chem* 1999; 274: 18997-19002.
- Bandoh K, Aoki J, Hosono H, Kobayashi S, Kobayashi T, Murakami-Murofushi K, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 1999; 274: 27776-27785.
- Bates PJ, Ralston NV, Vuk, Pavlovic Z, Rohrbach MS. Calcium influx is required for tannin-mediated arachidonic acid release from alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1995; 268: L33-L40.
- Van der Bend RL, Brunner J, Jalink K, van Corven EJ, Moolenaar WH, van Blitterswijk WJ. Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid. *EMBO J* 1992; 11: 2495-2501.
- Bornfeldt KE, Graves LM, Raines EW, Igarashi Y, Wayman G, et al. Sphingosine-1-phosphate inhibits PDGF-induced chemotaxis of human arterial smooth muscle cells: spatial and temporal modulation of PDGF chemotactic signal transduction. *J Cell Biol* 1995; 130: 193-206.
- Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, De Phino RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 1991; 65: 663-675.
- Van Brocklyn JR, Lee MJ, Menzeleev R, Olivera A, Edsall L, et al. Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor EDG-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J Cell Biol* 1998; 142: 229-240.
- Van Brocklyn JR, Tu Z, Edsall LC, Schmidt RR, Spiegel S. Sphingosine 1-phosphate-induced cell rounding and neurite retraction are mediated by the G protein-coupled receptor H218. *J Biol Chem* 1999; 274: 4626-4632.
- Van Brocklyn JR, Gräler MH, Bernhardt G, Hobson JP, Lipp M, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG6. *Blood* 2000; 95: 2624-2629.
- Bünemann M, Brandts B, Meyer zu Heringdorf D, van Koppen CJ, Jakobs KH, et al. Activation of muscarinic K⁺ current in guinea-pig atrial myocytes by sphingosine-1-phosphate. *J Physiol* 1995; 489: 701-777.
- Ceruti DR, Nogami M, Anderson JL, Churchill JD, Romberger DJ, Rennard SI, Toews ML. Lysophosphatidic acid and EGF stimulate mitogenesis in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1997; 273: L10-L15.
- Chatterjee S, Han H, Rollins S, Cleveland T. Molecular cloning, characterization, and expression of a novel human neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem* 1999; 274: 37407-37412.
- Chin TY, Chueh SH. Sphingosylphosphorylcholine stimulates mitogen-activated protein kinase via a Ca²⁺-dependent pathway.

- Am J Physiol 1998; 275: C1255-C1263.
- Chun, J. LPL receptors: implications for neural signalling. *Crit Rev Neurobiol* 1999; 13: 151-168.
- Chun J, Jaenisch R. Clonal cell lines produced by infection of neocortical neuroblasts using multiple oncogenes transduced by retroviruses. *Mol Cell Neurosci* 1996; 7: 304-321.
- Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, Pyne S, Tigyi G. International Union of Pharmacology. XXXIV. LPL Receptor Nomenclature. *Pharmacol Reviews* 2002; 54: 265-269.
- Cobb MH, Schaefer EM. MAP Kinase Signaling Pathways. *Promega Notes Magazine* 1996; 59: 37-41.
- Contos JJA, Chun J. Genomic characterisation of the lysophosphatidic acid receptor gene, lpA2/EDG-4, and identification of a frameshift mutation in a previously characterised cDNA. *Genomics* 2000; 64: 155-159.
- Contos JJA, Chun J. The mouse lpA3/jEDG-7 lysophosphatidic acid receptor gene: genomic structure, chromosomal localization and expression pattern. *Gene (Amsterdam)* 2001; 267: 243-253.
- Contos JJA, Ishii I, Chun J. Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 1188-1196.
- Van Corven EJ, Groenink A, Jalink K, Eichholtz T, Moolenaar WH. Lysophosphatide-induced cell proliferation: identification and dissection of signalling pathways mediated by G-Proteins. *Cell* 1989; 59: 45-54.
- Van Corven WJ, Hordijk PL, Medema RH, Bos JL, Moolenaar W. Pertussis Toxin-sensitive activation of p21ras by G-protein-coupled receptor agonists in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1257-1261.
- Duong CQ, Bared SM, Abu-Khader A, Buechler C, Schmitz A, Schmitz G. Expression of the LPL receptor family and investigation of LPL-mediated responses in human macrophages. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1682: 112-119.
- Eichholtz T, Jalink K, Fahrenfort I, Moolenaar WH. The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J* 1993; 291: 677-680.
- English D, Kovala AT, Welch Z, Harvey KA, Siddiqui RA, Brindley DN, Garcia JG. 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 Hematol Stem Cell Res* 1999; 8: 627-634.
- Fields TA, Casey PJ. Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J* 1997; 321: 561-571.
- Fitzgerald LR, Dytko GM, Sarau HM, Mannan IJ, Ellis C, Lane PA, Tan KB, Murdoch PR, Wilson S, Bergsma DJ, et al. Identification of an EDG-7 variant, HOFNH30, a G protein-coupled receptor for LPA. *Biochem Biophys Res Comm* 2000; 273: 805-810.
- Foldes-Filep E, Filep JG, Sirois P. C-reactive protein inhibits intracellular calcium mobilization and superoxide production by guinea pig alveolar macrophages. *J Leukoc Biol* 1992; 51: 13-18.
- Fourcade O, Simon MF, Viode C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, Fournie B, Sarda L, Chap H. Secretor phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* 1995; 80:919-927.
- Fueller M, Wang A, Tigyi G, Siess W. Activation of human monocytic cells by lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Cell Signal* 2003; 15: 367-375.
- Fukami K, Takenawa T. Phosphatidic acid accumulates in platelet-derived growth factor-stimulated Balb/c 3T3 cells is a potential mitogenic signal. *J Biol Chem* 1992; 267: 10988-10993.
- Fukushima N, Kimura Y, Chun J. A single receptor encoded by vzg-1/lpA1/edg-2 couples to G-proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid.

- Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 6151-6156.
- Fukushima N, Ishii I, Contos JJA, Weiner JA, Chun J. LPL receptors.
Ann Rev Pharm Tox 2001; 41: 507-534.
- Galaria II, Fegley AJ, Nicholl SM, Roztocil E, Davies MG. Differential regulation of ERK1/2 and p38 (MAPK) by components of the Rho signaling pathway during sphingosine-1-phosphate-induced smooth muscle cell migration.
J Surg Res 2004; 122: 173-179.
- Gennero I, Xuereb JM, Simon MF, Girolami JP, Bascands JL, Chap H, Boneu B, Sie P. Effects of lysophosphatidic acid on proliferation and Zytosolic Ca^{2+} of human adult vascular smooth muscle cells in culture.
Thromb Res 1999; 94: 317-326.
- Gerrard JM, Robinson P. Lysophosphatidic acid can activate platelets without increasing ^{32}P -labelling of phosphatidic acid.
Biochim Biophys Acta 1984; 795: 487-492.
- Gerrard JM, Kindom SE, Peterson DA, Peller J, Krantz KE, White JG. Lysophosphatidic acids. Influence on platelet aggregation and intracellular calcium flux.
Am J Pathol 1979; 96: 423-438.
- Girón-Calle J, Forman HJ. Phospholipase D and priming of the respiratory burst by H_2O_2 in NR8383 alveolar macrophages.
Am J Respir Cell Mol Biol 2000; 23:748-754.
- Glickman M, Malek RL, Kwitek-Black AE, Jacob HE, Lee NH. Molecular cloning, tissue-specific expression and chromosomal localisation of a novel nerve growth factor-regulated G-protein-coupled receptor, nrg-1.
Mol Cell Neurosci 1999; 14: 141-152.
- Goetzl EJ, Dolezalova H, Kong Y, Zeng L. Dual mechanisms for LPL induction of proliferation of human breast carcinoma cells.
Cancer Res 1999; 59: 4732-4737.
- Gonda K, Okamoto H, Takuwa N, Yatomi Y, Okazaki H, Sakurai T, Kimura S, Sillard R, Harii K, Takuwa Y. The novel sphingosine 1-phosphate receptor AGR16 is coupled via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins to multiple signalling pathways.
Biochem J 1999; 337: 67-75.
- Gräler MH, Bernhardt G, Lipp M. EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue.
Genomics 1998; 53: 164-169.
- Grey A, Xu X, Hill B, Watson M, Callon K, Reid IR, Cornish J. Osteoblastic cells express phospholipid receptors and phosphatases and proliferate in response to sphingosine-1-phosphate.
Calcif Tissue Int 2004; 74: 542-550.
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties.
J Biol Chem 1985; 260: 3440-3450.
- Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun J. Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex.
J Cell Biol 1996; 135: 1071-1083.
- Helmke RJ, Boyd RL, German VF, Mangos JA. From growth factor dependence to growth factor responsiveness: The genesis of an alveolar macrophage cell line.
In Vitro Cell Dev Biol 1987; 23: 567-574.
- Helmke RJ, German VF, Mangos JA. A continuous alveolar macrophage cell line: Comparison with freshly derived alveolar macrophages.
In Vitro Cell Dev Biol 1989; 25: 44-48.
- Herskowitz I. MAP kinase pathways in yeast: forming and more.
Cell 1995; 80: 187-197.
- Higuchi K, Kawashima M, Ichikawa Y, Imokawa G. Sphingosylphosphorylcholine is a melanogenic stimulator for human melanocytes.
Pigment Cell Res 2003; 16: 670-678.
- Himmel HM, Meyer zu Heringdorf D, Graf E, Dobrey D, et al. Evidence for EDG-3 receptor-mediated activation of I(K.Ach) by sphingosine-1-phosphate in human atrial cardiomyocytes.
Mol Pharmacol 2000; 58: 449-454.

- Hiroshima M, Takenawa T. Purification and characterization of a lysophosphatidic acid-specific phosphatase.
Biochem J 1998; 336: 483-489.
- Hirshman CA, Emala CW. Aktin reorganization in airway smooth muscle cells involves Gq and Gi-2 activation of Rho.
Am J Physiol 1999; 277: L653-L661.
- Hla T, Maciag T. An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein coupled receptors.
J Biol Chem 1990; 265: 9308-9313.
- Hla T, Lee MJ, Ancellin N, Liu CH, Thangada S, Thompson BD, Kluk M. Sphingosine-1-phosphate: extracellular mediator or intracellular second messenger?
Biochem Pharmacol 1999; 58: 201-207.
- Holian A, Daniele R. The role of calcium in the initiation of superoxide release from alveolar macrophages.
J Cell Physiol 1982; 113: 87-93.
- Hornuß C, Hammermann R, Fuhrmann M, Juergens UR, Racké K. Human and rat alveolar macrophages express multiple EDG receptors.
Eur J Pharmacol 2001; 429: 303-308.
- Hoyal CR, Gozal E, Zhou H, Foldenauer K, Forman HJ. Modulation of the rat alveolar macrophage respiratory burst by hydroperoxides is calcium dependent.
Arch Biochem Biophys 1996; 326: 166-171.
- Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling.
Cell 1995; 80: 225-236.
- Im DS, Heise CE, Ancellin N, O'Dowd B, Shei G, Heavens R, Rigby MR, Hla T, Mandala S, McAllister G, George SR, Lynch K. Characterization of a Novel Sphingosine-1-Phosphate Receptor, Edg-8.
J Biol Chem 2000; 275: 14281-14286.
- Imamura F, Mukai M, Ayaki M, Takemura K, Horai T, et al. Involvement of small GTPases Rho and Rac in the invasion of rat ascites hepatoma cells.
Clin Exp Metastasis 1999; 17: 141-148.
- Ishii I, Contos JJA, Fukushima N, Chun J. Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors. LPA1/VZG-1/EDG-2, LPA2/EDG-4 and LPA3/EDG-7 in neuronal cell lines using a retrovirus expression system.
Mol Pharmacol 2000; 58: 895-902.
- Ito M, Kurita T, Kita K. A novel enzyme that cleaves the N-acyl linkage of ceramides in various glycosphingolipids as well as sphingomyelin to produce their lyso forms.
J Biol Chem 1995; 270: 24370-24374.
- Jalink K, van Corven EJ, Moolenaar WH. Lysophosphatidic acid, but not phosphatidic acid, is a potent Ca^{2+} -mobilizing stimulus for fibroblasts.
J Biol Chem 1990; 265: 12232-12239.
- Jalink K, Eichholtz T, Postma FR, van Corven EJ, Moolenaar WH. Lysophosphatidic acid induces neuronal shape changes via a novel, receptor mediated signalling pathway: similarity to thrombin activation.
Cell Growth Differ 1993; 4: 247-255.
- Jasinska R, Zhang QX, Pilquill C, Singh I, Xu J, Dewald J, Dillon DA, Berthiaume LG, Carman GM, Waggoner DW, Brindley DN. Lipid phosphate phosphohydrolase-1 degrades exogenous glycerolipid and sphingolipid phosphate esters.
Biochem J 1999; 340: 677-686.
- Jin Z, Strittmaier SM. Rac 1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse.
J Neurosci 1997; 17: 73-76.
- Kabarowski JH, Zhu K, Lee LQ, Witte ON, Xu Y. Lysophosphatidylcholine as a ligand for the immunoregulatory receptor G2A.
Science 2001; 293: 702-705.
- Kiss Z, Mukherjee JJ. Phosphocholine and sphingosine-1-phosphate synergistically stimulate DNA synthesis by a MAP kinase-dependent mechanism.
FEBS Lett 1997; 412: 197-200.
- Koh JS, Lieberthal W, Heydrick S, Levine JS. Lysophosphatidic acid is a major serum noncytokine survival factor for murine macrophages which acts via the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway.

- J Clin Invest 1998; 102: 716-727.
- Kohama T, Olivera A, Edsall L, Nagiec MM, Dickson R, Spiegel S. Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase.
J Biol Chem 1998; 273: 23722-23728.
- Kon J, Sato K, Watanabe T, Tomura H, Kuwabara A, et al. Comparisons of intrinsic activities of the putative sphingosine-1-phosphate receptor subtypes to regulate several signalling pathways in their cDNA-transfected Chinese hamster ovarian cells.
J Biol Chem 1999; 274: 23940-23947.
- Van Koppen CJ, Meyer zu Heringdorf D, Zhang C, Laser KT, Jakobs KH. A distinct G_i-protein-coupled receptor for Sphingosylphosphorylcholine in human leukemia HL-60 cells and human neutrophils.
Mol Pharmacol 1996; 49: 956-961.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4.
Nature 1970. 227: 680-685.
- Lee MJ, Evans M, Hla T. The inducible G protein-coupled receptor edg-1 signals via the G(i)/mitogen-activated protein kinase pathway.
J Biol Chem 1996; 271: 11272-11279.
- Lee MJ, van Brocklyn JR, Thaganada S, Liu CH, Hand AR, Menzeleev R, Spiegel S, Hla T. Sphingosine-1-Phosphate as a ligand for the G-protein-coupled receptor EDG-1.
Science 1998; 279: 1552-1555.
- Lee CS, Jang YY, Han ES. Depressant effects of ambroxol on Lipopolysaccharide- or fMLP-stimulated free radical production and granule enzyme release by alveolar macrophages.
Pulm Pharmacol Ther 1999a; 12:275-284.
- Lee MJ, Thanagada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphat.
Cell 1999b; 99: 301-312.
- Lee OH, Kim YM, Lee YM, Moon EJ, Lee DJ, Kim JH, Kim KW, Kwon YG. Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells.
Biochem Biophys Res Commun 1999c; 264: 743-750.
- Lee H, Goetzl EJ, An S. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing.
Am J Physiol Cell Physiol 2000; 278: C612-C618.
- Lee T, Kim J, Sohn U. Sphingosylphosphorylcholine-induced contact of feline ileal smooth muscle cells is mediated by Gα_{i3}-protein and MAPK.
Cell Signal 2002; 14: 989-997.
- Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A, Pouyssegur J. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts.
J Cell Biol 1993; 122: 1079-1088.
- Lewin, B. Molekularbiologie der Gene.
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. Berlin. Oxford. (1998)
- Liu CH, Hla T. The mouse gene for the inducible G-Protein-coupled receptor EDG-1.
Genomics 1997; 43: 15-24.
- Liu CH, Thangada S, Lee MJ, Van Brocklyn JR, Spiegel S, Hla T. Ligand induced trafficking of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1.
Mol Biol Cell 1999; 10: 1179-1190.
- Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng C, Hobson JP, Rosenfeldt HM, Nava V, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S, Proia RL. EDG-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation.
J Clin Invest 2000; 106: 951-961.
- Lynch KR, MacDonald TL. Structure activity relationships of LPL mediators.
Prostaglandins and other Lipid Mediators 2001; 64: 33-45.
- MacLennan AJ, Browe CS, Gaskin AA, Lado DC, Shaw G. Cloning and characterisation of a putative G-protein-coupled receptor potentially involved in development.
Mol Cell Neurosci 1994; 5: 201-209.
- MacLennan AJ, Marks L, Gaskin AA, Lee N. Embryonic expression pattern of H218, a G-protein-coupled

- receptor homolog, suggests roles in early mammalian nervous system development. *Neuroscience* 1997; 79: 217-224.
- Mandala SM, Thornton R, Tu Z, Kurtz MB, Nickels J, Broach J, Menzeleev R, Spiegel S. Sphingoid base 1-phosphate phosphatase: a key regulator of sphingolipid metabolism and stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 150-155.
- Mansour SJ, Matten TW, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, van de Voude GF, Ahn NG. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* 1994; 265: 966-970.
- Marathe S, Schissel SL, Yellin MJ, Beatini N, Mintzer R, Williams KJ, Tabas I. Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling. *J Biol Chem* 1998; 273: 4081-4088.
- Mathias S, Pena LA, Kolesnick RN. Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J* 1998; 335: 465-480.
- McCrea JM, Robinson P, Gerrard JM. Mepacrine (quinacrine) inhibition of thrombin-induced platelet responses can be overcome by lysophosphatidic acid. *Biochim Biophys Acta* 1985; 842: 189-194.
- McCrea AD, Premont RT, Jaber M, Peterson AS, Lefkowitz RJ. Cloning, characterisation and chromosomal localisation of rec.1.3, a member of the G-protein-coupled receptor family highly expressed in brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; 42: 245-254.
- Meyer zu Heringdorf D, van Koppen CJ, Windorfer B, Himmel HM, Jakobs KH. Calcium signalling by G-Protein-coupled sphingolipid receptors in bovine aortic endothelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1996; 354: 397-403.
- Meyer zu Heringdorf D, Vincent ME, Lipinski M, Danneberg K, Stropp U, Wang DA, Tigyi G, Jakobs KH. Inhibition of Ca²⁺ signalling by the sphingosine 1-phosphate receptor S1P1. *Cell Signal* 2003; 15 (7): 677-687.
- Moolenaar WH. LPA: A novel lipid mediator with diverse biological actions. *Trends Cell Biol* 1994; 4: 213-219.
- Moolenaar WH. Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J Biol Chem* 1995; 270: 12949-12952.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Ehrlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986; 51 Pt 1: 263-273.
- Okamoto H, Takuwa N, Gonda K, Okazaki H, Chang K, Yatomi Y, Shigematsu H, Takuwa Y. EDG1 is a functional sphingosine-1-phosphate receptor that is linked via a Gi/o to multiple signaling pathways, including PLC activation, Ca²⁺ mobilization, Ras-mitogen-activated protein kinase activation, and adenylate cyclase inhibition. *J Biol Chem* 1998; 273: 27104-27110.
- Okamoto H, Takuwa N, Yatomi Y, Gonda K, Shigematsu H, Takuwa Y. EDG3 is a functional receptor specific for sphingosine 1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine with signaling characteristics distinct from EDG1 and AGR16. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260: 203-208.
- Okazaki H, Ishizaka N, Sakurai, T, Kurokawa K, Goto K, et al. Molecular cloning of a novel putative G-protein-coupled receptor expressed in the cardiovascular system. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 190: 1104-1109.
- Panetti TS, Nowlen J, Mosher DF. Sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid stimulate endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1013-1019.
- Piazza GA, Ritter JL, Baracka CA. Lysophosphatidic acid induction of transforming growth factors alpha and beta: modulation of proliferation and differentiation in cultured human keratinocytes and mouse skin. *Exp Cell Res* 1995; 216: 51-64.
- Pyne S, Pyne N. Sphingosine 1-phosphate signalling via the endothelial differentiation gene family of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 2000; 88: 115-131.
- Racké K, Hammermann R, Juergens UR. Potential roles of EDG receptors and lysophospholipids as

- their endogenous ligands in the respiratory tract.
Pulm Pharmacol Ther 1999; 13: 99-114.
- Rahmouni K, Morgan DA, Morgan GM, Liu X, Sigmund CD, Mark AL, Haynes WG. Hypothalamic PI3K and MAPK differentially mediate regional sympathetic activation to insulin.
J Clin Invest 2004; 114: 652-658.
- Robinson MJ, Cheng M, Khokhlatchev A, Ebert D, Ahn N, Guan KL, Stein B, Goldsmith E, Cobb MH. Contributions of the mitogen-activated protein (MAP) kinase backbone and phosphorylation loop to MEK specificity.
J Biol Chem 1996; 271: 29734-29739.
- Roskopf D, Daelman W, Busch S, Schurks M, Hartung K, Kribben A, Michel MC, Siffert W. Growth factor-like action of lysophosphatidic acid on human B lymphoblasts.
Am J Physiol 1998; 274: C1573-C1582.
- Saba JD, Nara F, Bielawska A, Garrett S, Hannun YA. The BST1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is the sphingosine-1-phosphate lyase.
J Biol Chem 1997; 272: 26087-26090.
- Sato K, Kon J, Tomura H, Osada M, Murata N, Kuwabara A, Watanabe T, Ohta H, Ui M, Okajima F. Activation of PLC-Ca²⁺ system by sphingosine 1-phosphate in CHO cells transfected with Edg-3, a putative lipid receptor.
FEBS Lett 1999; 443: 25-30.
- Schissel SL, Schuchman EH, Williams KJ, Tabas I. Zn²⁺-stimulated sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene.
J Biol Chem 1996; 271: 18431-18436.
- Seewald S, Sachinidis A, Düsing R, Ko Y, Seul C, Epping P, Vetter H. Lysophosphatidic acid and intracellular signalling in vascular smooth muscle cells.
Atherosclerosis 1997; 130: 121-131.
- Sheperd EG, Zhao Q, Welty SE, Hansen TN, Smith CV, Liu Y. The function of mitogen activated protein kinase phosphatase-1 in peptidoglycan-stimulated macrophages.
J Biol Chem 2004; 279: 54023-54031.
- Siess W, Tigyi G. Thrombogenic and atherogenic activities of lysophosphatidic acid.
J Cell Biochem 2004; 92: 1086-1094.
- Simon MF, Chap H, Douste-Blazy L. Platelet aggregating activity of lysophosphatidic acids is not related to calcium ionophore properties.
FEBS letters 1984; 166: 115-119.
- Skildum A, Faivre E, Lange CA. Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen activated protein kinases.
Mol Endocrinol 2005; 19: 327-339.
- Sontag E, Fedorov S, Kamibayashi C, Robbins D, Cobb M, Mumby M. The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation.
Cell 1993; 75: 887-897.
- Spiegel S, Merrill AH Jr. Sphingolipid metabolism and cell growth regulation.
FASEB J 1996; 10: 1388-1397.
- Spiegel S, Milstien S. Sphingolipid metabolites: members of a new class of lipid second messengers.
J Membr Biol 1995; 146: 225-237.
- Stam JC, Michiels F, van der Kammen RA, Moolenaar WH, Collard JG. Invasion of T-lymphoma-cells: cooperation between Rho family GTPases and LPL receptor signalling.
EMBO Journal 1998; 17: 4066-4074.
- Stryer L. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. Berlin. Oxford., 1. korrigierter Nachdruck der 4. Auflage von 1996.
- Takemura H, Imoto K, Sakano S, Kaneko M, Ohshika H. Lysophosphatidic acid-sensitive intracellular Ca²⁺ store does not regulate Ca²⁺ entry at plasma membrane in Jurkat human T cells.
Biochem J 1996; 319: 393-397.
- Thompson FJ, Clark MA. Purification of a lysophosphatidic acid-hydrolysing lysophospholipase from rat brain.
Biochem J 1994; 300: 457-461.
- Tigyi G, Dyer DL, Miledi R. Lysophosphatidic acid possesses dual action in cell proliferation.

- Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91: 1908-1912.
- Toews ML, Ustinova EE, Schultz HD. Lysophosphatidic acid enhances contractility of isolated airway smooth muscle.
J Appl Physiol 1997; 83: 1216-1222.
- Tokamura A, Fukuzawa K, Akamutsu Y, Yamada S, Suzuki T, Tsukatani H. Identification of vasopressor phospholipid in crude soybean lecithin.
Lipids 1978; 13: 468-472.
- Tokamura A, Limori M, Nishioka Y, Kitahara M, Sakashita M, Tanaka S. Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta.
Am J Physiol 1994; 267: C204-C210.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from Polyacrylamide gels with nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76: 4350-4354.
- Traverse S, Gomez N, Paterson H, Marshall C, Cohen P. Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor.
Biochem J 1992; 288: 351-355.
- Turner NC, Wood LJ, Burns FM, Gueremy T, Souness JE. The effect of cyclic AMP and cyclic GMP phosphodiesterase inhibitors on the superoxide burst of guinea-pig peritoneal macrophages.
Br J Pharmacol 1993; 108:87-883.
- Valet P, Pages C, Jeanneton O, Daviaud D, Barbe P, et al. Alpha-2-adrenergic receptor-mediated release of lysophosphatidic acid by adipocytes : a paracrine signal for preadipocyte growth.
J Clin Invest 1998; 101: 1431-1438.
- Waggoner DW, Gomez-Munoz A, Dewald J, Brindley DN. Phosphatidate phosphohydrolase catalyzes the hydrolysis of ceramide 1-phosphate, lysophosphatidate, and sphingosine 1-phosphate.
J Biol Chem 1996; 271: 16506-16509.
- Wang E, Merrill AH Jr. Ceramide synthase.
Methods Enzymol 2000; 311: 15-21.
- Wang A, Deems RA, Dennis EA. Cloning, expression, and catalytic mechanism of murine lysophospholipase I.
J Biol Chem 1997a; 272: 12723-12729.
- Wang A, Loo R, Chen Z, Dennis EA. Regiospecificity and catalytic triad of lysophospholipase I.
J Biol Chem 1997b; 272: 22030-22036.
- Weiner JA, Chun J. Schwann cell survival mediated by the signalling phospholipid lysophosphatidic acid.
Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 5233-5238.
- Weiner JA, Hecht JH, Chun J. Lysophosphatidic acid receptor gene vzg-1/lpA1/EDG-2 is expressed by mature oligodendrocytes during myelination in the postnatal murine brain.
J Comp Neurol 1998; 398: 587-598.
- Windh RT, Lee MJ, Hla T, An S, Barr AJ, Manning DR. Differential coupling of the sphingosine 1-phosphate receptors Edg-1, Edg-3, and H218/Edg-5 to the G(i), G(q), and G(12) families of heterotrimeric G proteins.
J Biol Chem 1999; 274: 27351-27358.
- Wu J, Spiegel S, Sturgill TW. Sphingosine-1-phosphate rapidly activates the mitogen-activated protein kinase pathway by a G protein-dependent mechanism.
J Biol Chem 1995; 270: 11484-11488.
- Xu Y, Zhu K, Hong G, Wu W, Baudhuin LM, Xiao YJ, Damron DS. Sphingosylphosphorylcholine is a ligand for ovarian cancer G protein-coupled receptor.
Nat Cell Biol 2000; 2: 261-267.
- Yamaguchi F, Tokuda M, Hatase O, Brenner S. Molecular cloning of the novel human G protein-coupled receptor (GPCR) gene mapped on chromosome 9.
Biochem Biophys Res Commun 1996; 227: 608-614.
- Yamazaki Y, Kon J, Sato K, Tomura H, Sato M, Yoneya T, Okazaki H, Okajima F, Ohta H. Edg-6 as a putative sphingosine 1-phosphate receptor coupling to Ca⁽²⁺⁾ signaling pathway.
Biochem Biophys Res Commun 2000; 268: 583-589.
- Yatomi Y, Ruan F, Hakomori S, Igarashi Y. Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets.
Blood 1995; 86: 193-202.

- Yatomi Y, Igarahi Y, Yang L, Hisano N, Qi R, et al. Sphingosine-1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J Biochem* 1997; 121: 969-973.
- Yoshioka K, Matsumura F, Akedo H, Itoh K. Small GTP-binding protein Rho stimulates the actomyosin system, leading to invasion of tumor cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 5146-5154.
- Zhang GH, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G, Spiegel S. Sphingosine-1-Phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol* 1991; 114: 155-167.
- Zhang Q, Checovich WJ, Peters DM, Albrecht RM, Masher DF. Modulation of cell surface fibronectin assembly sites by lysophosphatidic acid. *J Cell Biol* 1994; 127: 1447-1459.
- Zhang GH, Helmke R, Mörk AC, Martinez JR. Regulation of Zytosolic free Ca^{2+} in cultured rat alveolar macrophages (NR 8383). *J Leukoc Biol* 1997; 62: 341-348.
- Zhang GH, Contos JJA, Weiner JA, Fukushima N, Chun J. Comparative analysis of three murine G-protein-coupled receptors activated by sphingosine-1-phosphate. *Gene* 1999; 227: 89-99.
- Zhou G, Golden T, Aragon IV, Honkanen RE. Ser/Thr protein phosphatase 5 inactivates hypoxia-induced activation of an apoptosis signal-regulating kinase 1/MAPKK-4/JNK signaling cascade. *J Biol Chem* 2004; 279: 46595-46605.
- Zondag GC, Postma FR, Etten IV, Verlaan I, Moolenaar WH. Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1. *Biochem J* 1998; 330: 605-609.

H. Danksagungen

Vielen Menschen, die mich auf die eine oder andere Art unterstützten, gilt es Dank zu sagen. Die wichtigsten folgen nun.

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei den technischen Assistentinnen meiner Arbeitsgruppe, Rita Fuhrmann und Christina Stichnote, bedanken. Ohne ihre zuverlässige Hilfe in praktischen und seelischen Fragen wäre die Vollendung dieser Arbeit schon ganz zu Beginn gescheitert.

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Racké, danke ich dafür, in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen und für seine Geduld und Nachsicht in der Zeit der mühsamen Niederschrift der praktischen Ergebnisse. Rainer Hammermann sei gedankt für seine Hilfe bei der Einführung in die praktische Laborarbeit. Auch an Sonja Matthiesen geht ein herzlicher Dank für alle Hilfe, die nicht selbstverständlich war.

Meine Arbeitsgruppe ist natürlich die beste, die man sich nur vorstellen kann. Wir hatten eine schöne Zeit miteinander.

Bei Herrn Professor Göthert bedanke ich mich für die Möglichkeit der Promotion im Institut für Pharmakologie und Toxikologie.

Auch den anderen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, von denen viele stets eine helfende Hand oder einen guten Rat für mich hatten, danke ich sehr. Hervorheben möchte ich Herrn Professor von Kügelen, der mir die Benutzung der Anlage für das Calcium-Imaging gestattete, und Melanie Kulick, die mich geduldig in eben jene Anlage einwies.

Ein herzlicher Dank geht auch an Freunde und Familie, weil sie mir – wie in allen anderen Dingen auch – mit ihrer Liebe zur Seite standen.