

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

**ÚLOHA KYSELINY LYSOFOSFATIDOVÉ
V BUNĚČNÉ SIGNALIZACI**

Bakalářská práce



Školitel: Doc. RNDr. František Novák CSc.

Praha 2007

Kristýna Kožichová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele doc. RNDr. Františka Nováka, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....3.6.2007.....

.....*Kateřina Křídlová*.....

podpis

Poděkování

Děkuji tímto svému školiteli doc. RNDr. Františku Novákovi CSc. a také doc. RNDr. Olze Novákové CSc. za spoustu cenných rad a připomínek a za trpělivost.

Obsah:

1. Úvod	7
2. Biochemie LPA	8
2.1. Struktura LPA.....	8
2.2. Produkce LPA	9
2.3. Degradace LPA.....	11
2.4. Výskyt LPA	11
3. Interakce LPA s LPA receptory.....	12
3.1. Receptory spojené s G-proteiny	12
3.2. Klasifikace membránových receptorů pro LPA	12
3.2.1. Receptor LPA ₁	12
3.2.2. Receptor LPA ₂	13
3.2.3. Receptor LPA ₃	13
3.2.4. Receptor LPA ₄	14
3.3. LPA receptory buněčného jádra	14
3.3.1. Přenos signálu v jádře.....	14
3.4. Autokrinní a parakrinní působení LPA	15
4. G-proteinové signalizační dráhy.....	17
4.1. Dělení signálních drah	17
4.1.1. Aktivace Ras/mitogen-aktivované proteinové kaskády	18
4.1.2. Aktivace Rho/Rac.....	19
4.1.3. Výlev chloridů zprostředkovaný G α_{13}	20
4.1.4. Aktivace fosfolipas	21
4.1.5. Inhibice a aktivace adenylátcyklasy	21
4.1.6. Aktivace fosfatidylinositol 3-kinasy.....	21
5. Biologické a patofyziologické aktivity LPA	22
5.1. Vliv LPA na apoptózu	22
5.1.1. Antiapoptické působení LPA	22
5.2. Proces hojení	23
5.3. Kardiovaskulární onemocnění	23
5.4. Nádorové bujení	24
5.4.1. Maligní nádory vaječníků.....	24
5.4.2. Maligní nádory tlustého střeva	25
5.4.3. Lysofosfolipasa D a autotaxin	26
5.5. Úloha LPA při neuropatiích	26
5.6. Psychiatrické poruchy.....	26
5.7. Reprodukce.....	27
5.8. Obezita.....	27
5.9. Imunita.....	27
6. Závěr.....	28

Seznam zkratek:

AC	adenylátcyklasa
Akt	proteinkinasa B
ATX	autotaxin
Bad	proapoptický protein
Bax	proapoptický protein
Bak	proapoptický protein
Bcl-2	antiapoptický protein
Bcl-x _L	antiapoptický protein
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
Cdc 42	GTPasa
DAG	1,2-diacylglycerol
EDG	endothelial differentiation gene
EGF	epidermální růstový faktor
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
IL-8	interleukin 8
IP ₃	inositol-1,4,5-trisfosfát
LCAT	lecitin-cholesterolacyltransferasa
LDL	low-density lipoprotein
LPA	kyselina lysofosfatidová
LPA ₁ – LPA ₅	receptory pro LPA
LPAAT	LPAacyltransferasa
LPC	lysofosfatidylcholin
LPP	lipidové fosfohydrolasy (lipid phosphate phosphohydrolases)
lysoPC	lysofosfatidylcholin
lysoPLD	lysofosfolipasa D
MAG	monoacylglycerol
MAG kinase	monoacylglycerolkinasa
MAPK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa
PA	kyselina fosfatidová
PAF	destičky aktivující faktor (platelet activating factor)
PC	fosfatidylcholin
PI 3-kinasa	fosfatidylinositol 3-kinasa
PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PKA	proteinkinasa A
PKC	proteinkinasa C
PLA ₁	fosfolipasa A ₁
PLA ₂	fosfolipasa A ₂
PLC	fosfolipasa C
PLD	fosfolipasa D
PPAR _γ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
PTX	pertussis toxin
Rac	GTPasa
Rac-GTP	GTPasa
Rac 1	GTPasa
Ras	GTPasa

RhoA	GTPasa
RhoGEF	Rho-specifický GTP/GDP výměnný faktor
ROCK	Rho-associated kinase
sPLA ₂	sekretovaná fosfolipasa A ₂
SRE	serum response element
SRF	serum response factor
S1P	sfingosin-1-fosfát
S1P ₁ – S1P ₅	receptory pro sfingosin-1-fosfát
Tiam1	Rac-specifický výměnný faktor
VEGH	vaskulární endoteliální růstový faktor

1. Úvod

Kyselina lysofosfatidová (LPA) patří mezi nejjednodušší fosfolipidy. Fosfolipidy jsou základní složkou buněčných membrán, kde tvoří bariéru pro transport látek a způsobují kompartmentaci biochemických dějů. Neméně důležitý je význam fosfolipidů jako prekursorů signálních molekul¹.

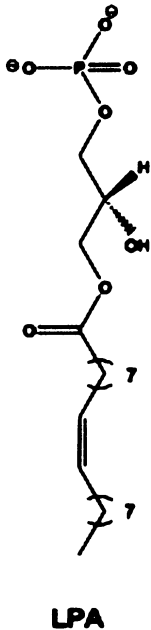
LPA, stejně jako sfingosin-1-fosfát a krevní destičky aktivující faktor, řadíme mezi lipidové signální molekuly. Ty zajišťují přenos signálu přes hydrofobní prostředí membrány a regulují tak specifické buněčné funkce. Mohou se uplatňovat buď v intracelulárním přenosu signálu, nebo mohou působit jako extracelulární ligandy specifických receptorů na povrchu buněk.

První zmínky o LPA jako efektorové molekule sahají do šedesátých let dvacátého století. V následujících desetiletích byla objevena řada odlišných fyziologických funkcí LPA, jako vliv na krevní tlak, aktivaci krevních destiček a kontrakci hladkého svalstva. V osmdesátých letech byla objasněna řada biologických odpovědí na LPA, včetně buněčného růstu, zakulacování buněk, smršťování neuritů a tvorby stresových vláken. Tyto poznatky vedly k teorii o existenci specifických receptorů, které zprostředkovávají funkce LPA. To bylo potvrzeno v roce 1996, kdy byl identifikován první receptor pro LPA. V pozdějších letech byly popsány další receptory specifické pro LPA a s nimi spojené proteiny i příslušné signální dráhy. V dnešní době se výzkum zaměřuje zejména na potenciální využití LPA v diagnostice řady nemocí².

2. Biochemie LPA

2.1. Struktura LPA

Kyselina lysofosfatidová (LPA) je název pro monoacyl-glycerol-3-fosfát (viz. obr. 1).



Obr 1.: Struktura 1-oleoyl-glycerol-3-fosfátu

Zkratky: LPA, kyselina lysofosfatidová.

*Převzato: Ishii, I.; Fukushima, N.; Ye, X.; Chun, J.: **Lysophospholipid Receptors: Signaling and Biology**. Annual Review of Biochemistry. 73, 321 – 354 (2004).*

Zbytek mastné kyseliny může být navázán buď na první, nebo na druhé pozici na glycerolové kostře. Vazba v první pozici je uskutečněna přes alkyl, acyl nebo alkenyl, v druhé pozici pouze přes acyl. Může se jednat o jakýkoli druh mastné kyseliny vyskytující se ve fosfolipidech u savců. Řada studií zabývajících se vztahy mezi strukturou a biologickou účinností jednotlivých druhů LPA nicméně ukázala, že právě druh substituované mastné kyseliny má podstatný vliv na biologickou aktivitu

LPA³. Obecně platí, že čím kratší řetězec, tím menší aktivita. Např. u LPA obsahující lauroyl- či dekanoyl- nepozorujeme prakticky žádnou aktivitu⁴. Naopak nejvíce biologicky aktivní jsou druhy obsahující dlouhé řetězce mastných kyselin, zejména kyselinu palmitovou či olejovou vázanou esterovou vazbou v pozici jedna³. Tyto druhy LPA se zároveň vyskytují nejčastěji⁵. Pro biologickou aktivitu LPA má velký význam také fosfátová skupina, protože monoacylglycerol nemá žádnou aktivitu.

Na rozdíl od ostatních plně acylovaných fosfolipidů s dlouhými řetězci je LPA poměrně dobře rozpustná ve vodě. Je to dáno přítomností hydroxylové a také fosfátové skupiny⁴.

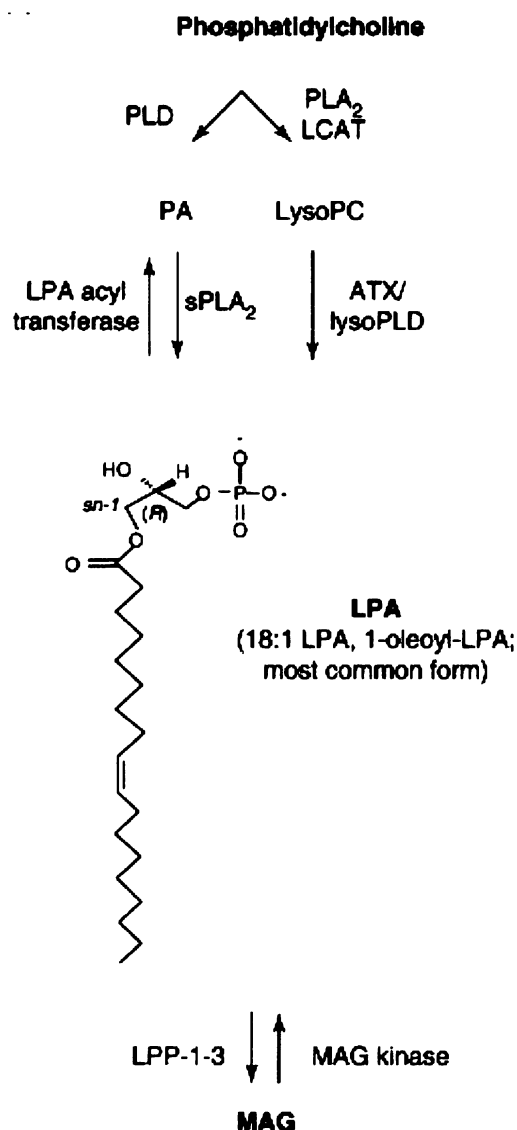
2.2. Produkce LPA

LPA vzniká dvěma způsoby, a to buď působením fosfolipasu na fosfolipidy, nebo při *de novo* syntéze fosfolipidů³ (viz. obr. 2).

Jsou známy tři cesty vzniku LPA:

- 1. cesta – vyžaduje fosfolipasu D (PLD) a následně fosfolipasu A₂ (PLA₂). Savčí PLD preferuje jako substrát fosfatidylcholin (PC), z kterého vzniká kyselina fosfatidová (PA). PA je následně pomocí PLA₂ přeměněna na LPA. PLD je schopná hydrolyzovat acyl i alkyl fosfatidylcholin⁶. LPA může z PA vznikat také působením PA-selektivní fosfolipasy A₁ (PLA₁)⁷.
- 2. cesta – zahrnuje PLA₂ a lysofosfolipasu D (lysoPLD)². PLA₂ produkuje z fosfolipidů lysofosfatidylcholin, který je následně hydrolyzovaný pomocí lysoPLD na LPA⁶.
- 3. cesta – při syntéze fosfolipidů *de novo*. Glycerol-3-fosfát je acylován pomocí acyl-koenzymu A uvnitř membrány endoplazmatického retikula a vzniká LPA, poté následuje druhá acylace acyl-koenzymem A a vznik PA. PA může být pomocí PLA₂ opět přeměněna na LPA⁷.

LPA je produkována také v krevních destičkách aktivovaných trombinem, z nichž je posléze uvolňována². Dochází zde k hydrolyze fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP₂) na inositol-1,4,5-trisfosfát (IP₃) a 1,2-diacylglycerol (DAG). Při následné fosforylaci DAG pomocí DAG kinasy je generována PA. Pomocí PLA₂ dochází k její deacylaci a ke vzniku LPA⁸.



Obr 2.: *Produkce LPA*

Zkratky: *ATX/lysoPLD*, *autotaxin/lysofosfolipasa D*; *LCAT*, *lecitin-cholesterolacyltransferasa*; *LPP*, *lipidové fosfohydrolasy*; *lysoPC*, *lysofosfatidylcholin*; *MAG*, *monoacylglycerol*; *PA*, *kyselina fosfatidová*; *PC*, *fosfatidylcholin*; *PLA₁*, *fosfolipasa A₁*; *PLA₂*, *fosfolipasa A₂*; *PLD*, *fosfolipasa D*; *sPLA₂*, *sekretorická fosfolipasa A₂*.

Převzato: Gardell, S. E.; Dubin, A. E.; Chun, J.: ***Emerging medical roles for lysophospholipid signaling***. *Trends in Molecular Medicine*. 12:2, 65 – 75 (2006).

Stále není známo, jakou z těchto cest je generována LPA v nestimulovaných buňkách. Předpokládá se, že produkce lipidových mediátorů, ať autokrinních

či parakrinních, je regulována signálními drahami. U nižších organismů je LPA produkována jako odpověď na hyperosmotický stres. V savčích buňkách byla agonisty regulovaná produkce LPA popsána u řady buněčných typů, např. u žírných buněk, maligních ovariálních buněk, u krevních destiček, adipocytů, neutrofilů, fibroblastů či u maligních buněk prostaty^{2,3}.

2.3. Degradace LPA

Většina lipidových přenašečů je obvykle inaktivována metabolickou degradací. Stejně tak je tomu i u LPA. Savčí buňky odbourávají extracelulární LPA odštěpením fosfátové skupiny. Tak vznikne monoacylglycerol (MAG), který je biologicky neaktivní⁴.

V posledních letech byla objevena skupina lipidových fosfohydrolas (LPP). Jedná se o integrální membránové ekto-enzymy se šesti transmembránovými doménami, které pravděpodobně zprostředkovávají defosforylaci LPA a inhibují tak signalizaci. Problémem této teorie je však malá specifita lipidových fosfohydrolas, která omezuje jejich schopnost regulovat hladiny konkrétních fosfolipidů. Proto se zdá, že LPP slouží spíše k zamezení nadměrného hromadění fosfolipidů na vnější straně plazmatické membrány, než ke kontrole signalizace.

Primárním mechanismem negativní regulace signalizace je patrně desenzitizace receptorů pro LPA⁷.

2.4. Výskyt LPA

LPA se vyskytuje v řadě tělesných tekutin. V krevním séru se s velkou afinitou váže na albumin, gelsolin a jiné dosud neidentifikované proteiny⁷. Na albumin se LPA váže v molárním poměru okolo 3:1, a to na stejná místa jako mastné kyseliny s dlouhými řetězci^{4,5}. LPA se také nachází ve slinách, folikulární tekutině, spermatu, mírně okysličeném LDL, ascitické tekutině pacientů s rakovinou či v cerebrospinální tekutině při cerebrospinálním krvácení^{5,7}. Koncentrace LPA v plazmě se pohybuje v rozmezí 1 – 5 μM^2 .

3. Interakce LPA s LPA receptory

Signalizace LPA se uskutečňuje prostřednictvím receptorů spojených s G-proteiny.

3.1. Receptory spojené s G-proteiny

Jedná se o skupinu receptorů, které jsou tvořeny jediným polypeptidovým řetězcem, který sedmkrát prostupuje lipidovou dvojvrstvou. Když se signální molekula naváže na receptor, podstupuje receptorový protein konformační změnu, která ovlivní intracelulární část receptoru a umožní mu interagovat s G-proteinem na cytosolové straně plazmatické membrány. G-proteiny jsou intracelulární heterotrimerní regulační proteiny, skládající se z podjednotek – α , β a γ . V klidovém stavu je na podjednotku α navázán guanosindifosfát (GDP). Naváže-li se však na receptor nějaký extracelulární ligand, váže se receptor na G-protein a aktivuje ho tím, že přiměje α podjednotku uvolnit svůj navázaný GDP a nahradit ho guanosintrifosfátem (GTP). Dojde k rozdělení G-proteinu na podjednotku α s navázaným GTP a samostatný komplex $\beta\gamma$. Alfa podjednotka, ale i komplex $\beta\gamma$ mohou přímo interagovat s cíli v plazmatické membráně, které mohou předávat signál k dalším místům určení. Doba existence disociované α a $\beta\gamma$ podjednotky je omezena chováním α podjednotky, která má vnitřní GTPasovou aktivitu a po určité době hydrolyzuje navázaný GTP na GDP. Podjednotka α se poté znovu spojí s komplexem $\beta\gamma$ a signál je ukončen¹.

3.2. Klasifikace membránových receptorů pro LPA

U savců byly zatím identifikovány čtyři druhy receptorů pro LPA ($LPA_1 - LPA_4$), ale jejich skutečný počet bude s největší pravděpodobností větší. Většina savčích buněk má nejméně dva druhy receptorů pro LPA³.

3.2.1. Receptor LPA_1

LPA_1 , dříve nazývaný endothelial differentiation gene-2 (EDG-2), byl prvním identifikovaným receptorem s vysokou afinitou pro LPA. U lidí se skládá z 364 aminokyselin v sedmi transmembránových doménách. Molekulová hmotnost se pohybuje kolem 41 kDa. LPA_1 je spřažen se třemi typy G-proteinů: $G_{i/o}$, G_q a $G_{12/13}$.

LPA po navázání na receptor LPA₁ aktivuje prostřednictvím těchto G-proteinů celou řadu buněčných odpovědí, jako např. buněčnou proliferaci, aktivaci serum-response element (SRE), aktivaci mitogenem-aktivované proteinkinasy (MAPK), inhibici adenylátcyklasy (AC), aktivaci fosfolipasy C (PLC), mobilizaci Ca²⁺, aktivaci proteinkinasy Akt a aktivaci GTPasy Rho.

Vysoká exprese receptoru LPA₁ je pozorována u dospělých myší, ale i u lidí, kde můžeme LPA₁ identifikovat v mozku, srdci, placentě, tlustém střevě, tenkém střevě, prostatě, varlatech, vaječnicích, slezině, slinivce břišní, ledvinách, kosterním svalu či brzlíku. Hlavním místem exprese receptorů LPA₁ je však nervový systém. LPA₁ exprimují např. oligodendrocyty nebo Schwannovy buňky^{2,9}.

3.2.2. Receptor LPA₂

LPA₂ je často zaměňovaný s mutantním receptorem EDG-4, který však není přítomný ve výchozím genomu. Skládá se z 351 aminokyselin (u lidí) a jeho molekulová hmotnost je zhruba 39 kDa. LPA₂ je spojen se třemi druhy G-proteinů, a to s proteiny G_{i/o}, G_q a G_{12/13}. Receptor LPA₂ je exprimován ve varlatech, brzlíku, slinivce břišní, prostatě, slezině a periferních leukocytech^{2,9}.

3.2.3. Receptor LPA₃

LPA₃, dříve nazývaný EDG-7, obsahuje 353 aminokyselin a jeho předpokládaná molekulová hmotnost je 40 kDa. LPA₃ se odlišuje od LPA₁ a LPA₂ svou vazebnou schopností k proteinům G_{i/o}, G_q, ale nikoliv k G_{12/13} a mnohem menší afinitou k těm druhům LPA, které obsahují nasycené acylové řetězce. LPA₃ zprostředkovává aktivaci PLC, mobilizaci Ca²⁺, inhibici/aktivaci AC a aktivaci MAPK. Zvýšený počet receptorů LPA₃ v neuroblastomových buňkách vede k elongaci neuritů, zatímco nadměrná exprese LPA₁ a LPA₂ vede při stimulaci LPA k retrakci neuritů a zakulacování buněk. LPA₃ je u lidí exprimován v srdci, slinivce břišní, prostatě, varlatech, plicích, vaječnicích a mozku^{2,9}.

3.2.4. Receptor LPA₄

LPA₄ patří do odlišné evoluční větve receptorů pro LPA. Váže se obdobně jako LPA₃ k G_{i/o} a G_q a pravděpodobně – za účelem aktivace AC – i k proteinu G_s. LPA₄ obsahuje 370 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 42 kDa. Ve srovnání s LPA₁, LPA₂ a LPA₃ má odlišnou sekvenci, která ho řadí spíše k receptorům pro destičky aktivující faktor (PAF). LPA₄ zprostředkovává mobilizaci Ca²⁺ a akumulaci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). LPA₄ je exprimován ve vysokých hladinách ve vaječnících, v mnohem menším rozsahu v pankreatu, brzlíku, ledvinách a v kosterním svalstvu. Jeho fyziologická role je zatím neznámá^{2,9}.

LPA₁, LPA₂, LPA₃ a LPA₄ tedy zprostředkovávají přenos signálu po vazbě LPA. Vzhledem k tomu, že většina savčích buněk exprimuje alespoň jeden z těchto receptorů, se zdá, že většina buněk je schopná reagovat na exogenní LPA³.

3.3. LPA receptory buněčného jádra

Receptory specifické pro LPA se patrně nenacházejí jen na buněčném povrchu. Stále narůstající počet důkazů potvrzuje i existenci intrakrinních receptorů pro LPA, resp. potvrzena byla zatím pouze intranukleární lokalizace receptoru LPA₁. Tyto receptory jsou lokalizovány v nukleárním nebo (i) v perinukleárním prostoru. Hlavní funkční odlišností intrakrinních receptorů a receptorů na buněčné membráně je skutečnost, že membránové receptory zprostředkovávají krátkodobé efekty, zatímco intracelulární receptory zprostředkovávají dlouhodobé odpovědi¹⁰.

3.3.1. Přenos signálu v jádře

Jaderná membrána a nukleoplazma obsahuje řadu signalizačních ligandů, které jsou patrně zapojené do signálních drah přes LPA₁ receptory. Bylo potvrzeno, že v jádře jsou např. G-proteiny G_{i/o} a G_{sq}, fosfolipasy A₂, fosfolipasy D a fosfolipasy C, adenylátcyklasa, MAPK, proteinkinasa C aj. Aktivace LPA₁ receptorů patrně může vést ke změnám hladiny vápníku v jádře či ke změně genové exprese.

Lokalizace receptorů pro LPA na jádře chrání LPA proti degradačním enzymům, které ji mohou inaktivovat. LPA totiž vzniká přímo na jádře a její dráha k jaderným receptorům je mnohem kratší než k membránovým receptorům. Snižuje se tedy pravděpodobnost, že bude degradována pomocí enzymů dříve, než dorazí ke svému receptoru¹⁰.

3.4. Autokrinní a parakrinní působení LPA

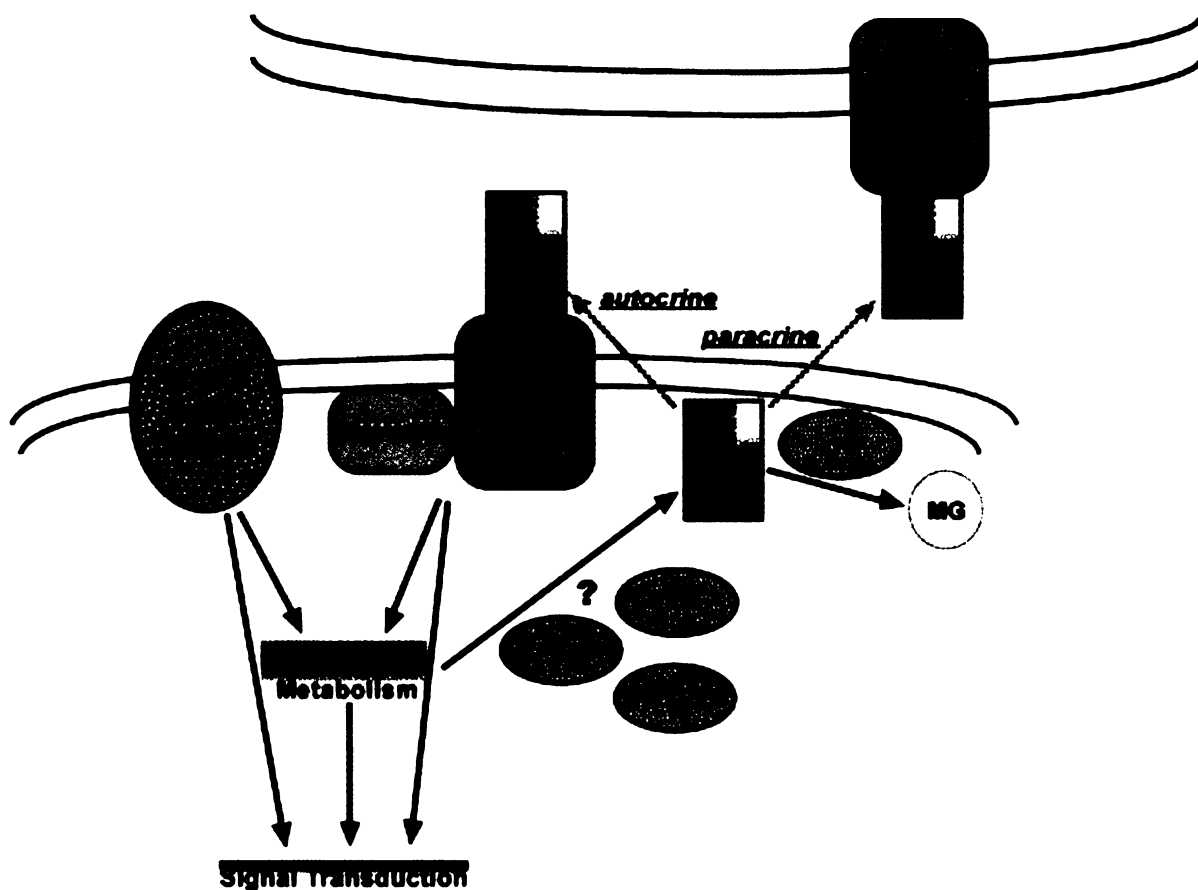
LPA působí v celé řadě buněčných tkání a za různých fyziologických i patofyziologických situací, buď jako autokrinní či parakrinní mediátor (viz. obr. 3).

Autokrinním mediátorem rozumíme ligand, který je produkován buňkou a následně interaguje s receptory té samé buňky za účelem vzniku odpovědi. Parakrinní mediátor je uvolňován jednou buňkou a následně interaguje s receptory buňky sousední.

Autokrinní a parakrinní působení LPA bylo podrobněji zkoumáno především u rakovinných buněk vaječníků, v adipocytech a v rakovinných buňkách prostaty. U všech těchto systémů bylo prokázáno, že tyto buňky (popř. buňky sousední):

1. produkují LPA
2. zvyšují produkci LPA jako odpověď na určitý podnět
3. exprimují receptory pro LPA
4. jsou schopné odpovědi na LPA.

V adipocytech se uvažuje o parakrinní a v rakovinných buňkách vaječníků o autokrinní roli LPA. V rakovinných buňkách prostaty jde patrně o autokrinní i parakrinní působení LPA³.



Obr 3.: LPA jako parakrinní a autokrinní mediátor

Zkratky: MG, monoacylglycerol; LPA, kyselina lysofosfatidová; LPP, lipidové fosfohydrolasy; lyso-PLD, lysofosfolipasa D; PLA₂, fosfolipasa A₂.

Převzato: Xie, Y.; Gibbs, T. C.; Meier, K. E.: *Lysophosphatidic acid as an autocrine and paracrine mediator*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1582, 270 - 281 (2002).

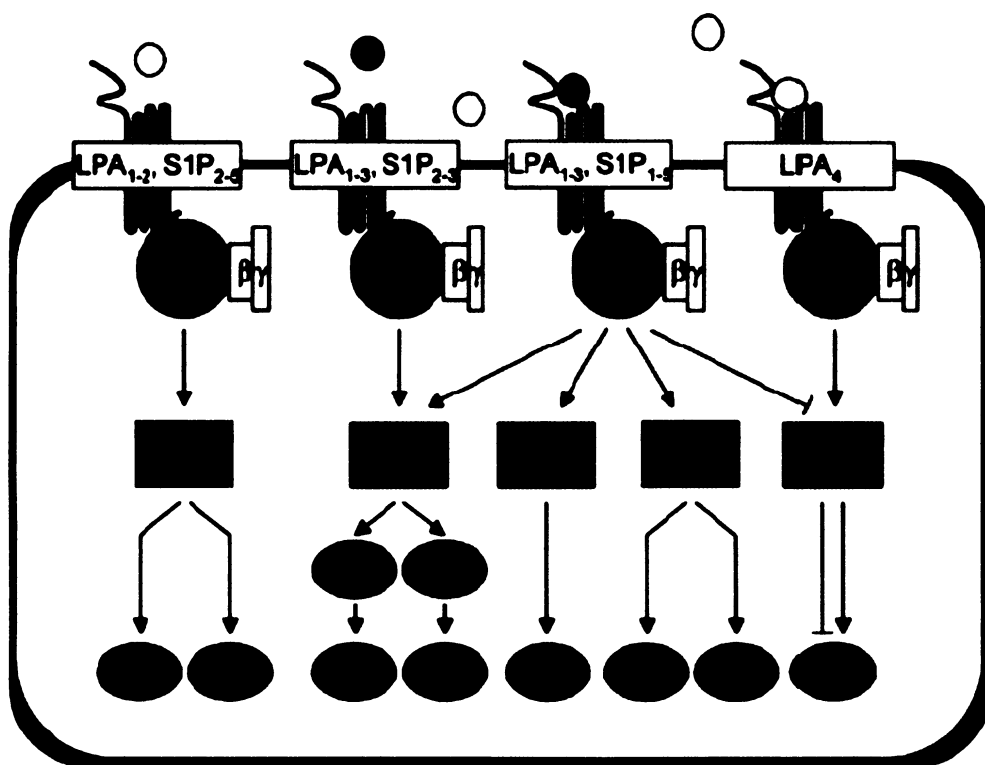
4. G-proteinové signalizační dráhy

Odpovědi na LPA jsou zprostředkovány řadou signálních drah obr. 3. Právě díky jejich rozmanitosti může mít strukturně jednoduchá molekula LPA takové množství fyziologických a patofyziologických funkcí. Receptory pro LPA jsou spojeny s nejméně čtyřmi G-proteiny – $G_{q/11}$, $G_{i/0}$, $G_{12/13}$ a G_s ⁷.

4.1. Dělení signálních drah

Hlavními signálními drahami jsou (viz. obr. 4):

1. aktivace fosfolipasy C (PLC) přes G_q protein (nebo G_i protein) s následnou hydrolýzou fosfatidylinositol-(4,5)-bisfosfátu^{2,7}
2. inhibice adenylátcyklasy zprostředkovaná G_i proteinem a následný pokles koncentrace cAMP^{2,7}
3. aktivace Ras/MAPK kaskády přes G_i protein⁷
4. aktivace malé GTPasy RhoA zprostředkovaná $G_{12/13}$, která reguluje cytoskeletární kontrakce spojené s membránovou depolarizací zprostředkovanou chloridovými ionty⁷
5. aktivace fosfatidylinositol 3-kinasy (PI 3-kinasy) přes G_i protein, která vede k aktivaci Rac a k aktivaci proteinkinasy B/Akt⁷
6. aktivace adenylátcyklasy (AC) zprostředkovaná G_s proteinem¹¹



Obr 4.: Signalizační dráhy zprostředkované LPA

Jsou známy 4 druhy receptorů pro LPA ($LPA_1 - LPA_4$). Tyto receptory jsou spojeny s různými druhy heterotrimerních G-proteinů ($G_{12/13}$, G_q , G_i a G_s). Každý receptor aktivuje pomocí daného G-proteinu různé signální dráhy. Sekvence signálních drah pro LPA je často shodná se signálními drahami pro sfingosin-1-fosfát (S1P).

Zkratky: PI3K, fosfatidylinositol 3-kinasa; DAG, diacylglycerol; IP₃, inositol 1,4,5-trisfosfát; MAPK, mitogenem-aktivovaná proteinkinasa; PKC, proteinkinasa C; Rock, Rho-associated kinase; SRF, serum response factor, S1P, sfingosin-1-fosfát, $LPA_1 - LPA_4$, receptory pro LPA; $S1P_1 - S1P_5$, receptory pro S1P.

Převzato: Anliker, B.; Chun, J.: *Lysophospholipid G Protein - coupled Receptors*. *The Journal of Biological Chemistry*. 279:20, 20555 – 20558 (2004).

4.1.1. Aktivace Ras/mitogen-aktivované proteinové kaskády

LPA řadíme mezi typické ligandy receptorů spojených s G-proteiny, které aktivují Ras a downstream mitogenem-aktivované proteinkinasy kaskády. Děje se tak cestou G_i proteinů citlivých na pertusis toxin, a to sice způsobem závislým

na tyroxinkinase. Není přesně známo, jak se G_i zapojuje do aktivace Ras, ale s největší pravděpodobností není žádná přímá souvislost mezi G_i proteinem, tyrosin kinasou a akumulací Ras-GTP. Regulace Ras je navíc mnohem komplexnější, než se předpokládalo. Zahrnuje četné GTP/GDP výměnné faktory a GTPasy-aktivující proteiny, které působí navzájem proti sobě. Jejich působení je navíc závislé na buněčném typu. LPA často stimuluje buněčnou proliferaci podobně jako epidermální růstový faktor (EGF). Naopak v lidských rakovinných buňkách linie A431 působí LPA antagonisticky na děje zprostředkované EGF. Dochází k rychlé internalizaci receptorů pro EGF na buněčném povrchu, za což je zodpovědná právě LPA^{7,12}.

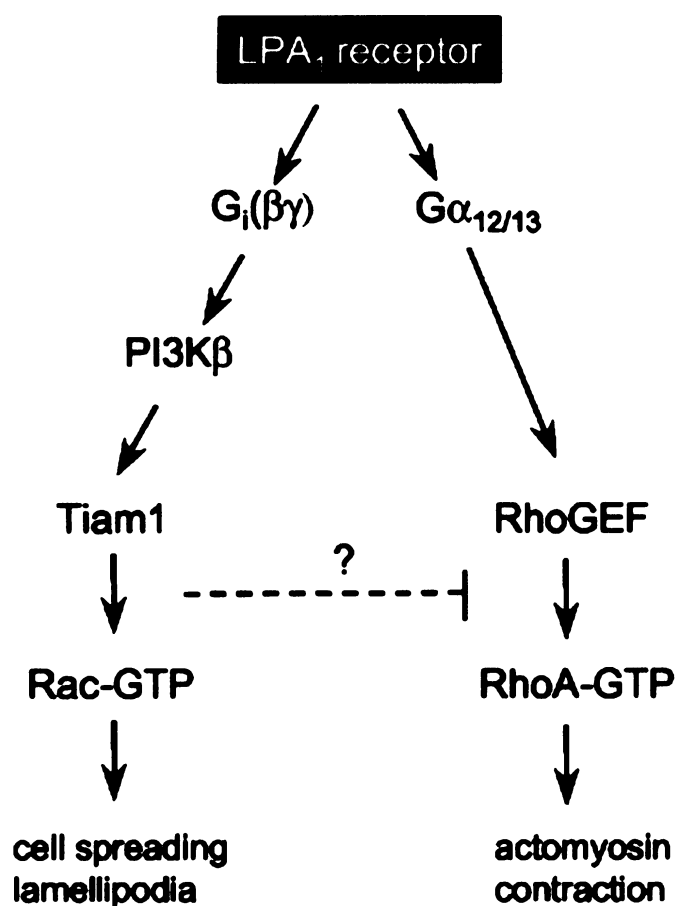
4.1.2. Aktivace Rho/Rac

LPA ovlivňuje organizaci cytoskeletu a tvar buněk. Děje se tak prostřednictvím koordinovaného působení tří Rho GTPas: RhoA, Rac1 a Cdc42.

RhoA zprostředkovává kontraktilitu aktomyosinu, Cdc42 kontroluje tvorbu filopodií a Rac reguluje tvorbu výčnělků lamelipodií a řídí buněčný pohyb.

Mechanismus aktivace RhoA pomocí LPA je poměrně dobře známý. Aktivace RhoA probíhá přes $G_{\alpha_{12/13}}$ podjednotky, které se pevně vážou na nejméně tři odlišné Rho-specifické GTP/GDP výměnné faktory (RhoGEF) podporující akumulaci RhoA-GTP. Výsledkem je aktivace Rho kinasy, která způsobuje smršťování neuritů a zakulacování buněk. O modulaci aktivit Rac a Cdc42 je ve srovnání s RhoA známo jen velmi málo.

LPA zprostředkovává také aktivaci Rac. Ta má oproti aktivaci RhoA spíše dlouhodobější charakter. Je závislá na PI-3 kinasové aktivitě a vede k tvorbě lamelipodií a pohybu buněk. Pro spojení mezi LPA₁ receptory a aktivací Rac je však nezbytná přítomnost Rac – specifického výměnného faktoru zvaného Tiam1. V buňkách, kde je nedostatek Tiam1, neaktivuje LPA Rac, ale aktivuje RhoA. Tiam1 tedy působí na RhoA inhibičně a na jeho expresi je tak závislá rovnováha mezi aktivitou RhoA a Rac. Aktivaci Rac je možné inhibovat pertussis toxinem (PTX)^{7,12}.



Obr 5.: Signalizační dráhy zprostředkované LPA_1 receptorem vedoucí k aktivaci Rac a RhoA

Zkratky: $PI3K\beta$, fosfatidylinositol 3-kinasa β ; RhoGEF, Rho-specifický GTP/GDP výměnný faktor; Rac-GTP, Rac-guanosintrifosfát; RhoA-GTP, RhoA-guanosintrifosfát.

Převzato: Moolenaar, W. H.: *Rac Activation by Lysophosphatidic Acid LPA_1 Receptors Through the Guanine Nucleotide Exchange Factor Tiam1*. *The Journal of Biological Chemistry*. 278:1, 400 – 406 (2003).

4.1.3. Výlev chloridů zprostředkovaný $G\alpha_{13}$

Odpovědí klidových buněk na stimulaci LPA je rychlá a dočasná ztráta jejich membránového potenciálu. Membránová depolarizace vzniká díky aktivaci chloridové vodivosti, která je závislá na vápníkových iontech. Chloridový výlev je zprostředkován

proteinem $G\alpha_{13}$. Membránová depolarizace způsobená LPA patrně hraje roli ve vývoji nervové soustavy⁷.

4.1.4. Aktivace fosfolipas

LPA aktivuje fosfoinositid-specifickou PLC. Následně dochází k mobilizaci Ca^{2+} a aktivaci proteinkinasy C. Ve fibroblastech způsobuje LPA uvolňování kyseliny arachidonové z lipidů. Doposud však není objasněno, zda je to vyvoláno aktivací PLA_2 nebo aktivací diacylglycerollipasy. LPA aktivuje také PLD, která z fosfatidylcholinu generuje kyselinu fosfatidovou a volný cholin⁴.

4.1.5. Inhibice a aktivace adenylátcyklasy

LPA inhibuje adenylátcyklasu ve fibroblastech prostřednictvím G_i proteinu, což vede ke snížení hladiny cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Tento proces je plně inhibován pertussis toxinem (PTX)⁴. Zároveň však LPA může aktivovat adenylátcyklasu prostřednictvím G_s proteinu. To vede ke zvýšení koncentrace cAMP, aktivaci proteinkinasy A (PKA) a k následné fosforylaci buněčných proteinů¹¹.

4.1.6. Aktivace fosfatidylinositol 3-kinasy

LPA v cílových buňkách aktivuje fosfatidylinositol 3-kinasu. PI 3-kinasová aktivita, indukovaná LPA, byla nalezena např. v buněčných liniích 3T3 buněk, nebo v megakaryoblastických buňkách. PI 3-kinasová aktivita však není pro mitogenní signalizaci nutná, což naznačují pozorování, kdy při aplikaci neutralizačních protilátek nebyla ovlivněna syntéza DNA indukovaná LPA⁴.

5. Biologické a patofyziologické aktivity LPA

Přestože je LPA strukturně velmi jednoduchou molekulou, jsou její biologické a patofyziologické aktivity díky aktivaci řady odlišných signalizačních drah velmi různorodé. LPA se účastní indukce buněčné tenze, neurogeneze, myelinizace, kontrakcí hladkého svalstva, shlukování krevních destiček, stimulace buněčné proliferace (u fibroblastů, endoteliálních buněk, vaskulárních buněk hladkého svalstva a keratinocytů), inhibice buněčné proliferace (u myelomatičtých buněk), inhibice komunikace pomocí spojení gap-junction, tvorby sítě aktinových vláken, shlukování fibronektinu, smršťování neuritů, aktivace depolarizačního chloridového proudu, mobilizace Ca^{2+} a chemotaxe^{4,5,8}.

5.1. Vliv LPA na apoptózu

Apoptóza je typ buněčné smrti. Je charakterizována srážením, kondenzací chromatinu, fragmentací DNA a tvorbou apoptických tělísek uzavřených membránou. Původně se předpokládalo, že LPA má pouze antiapoptický vliv⁸, v současné době však řada výzkumů naznačuje, že by LPA mohla působit i proapopticky¹³. Apoptózu podporují proteiny zvané Bax, Bad a Bak, naopak antiapopticky působí proteiny Bcl-2 nebo Bcl-x_L⁸.

5.1.1. Antiapoptické působení LPA

LPA chrání před apoptózou celou řadu buněčných typů, např. nádorové buňky vaječnicků, intestinální buňky epitelu, fibroblasty, osteoblasty, hepatocyty, Schwannovy buňky, makrofágy, T-buňky a renální proximální tubulární buňky.

Apoptická kaskáda zahrnuje ztrátu integrity vnější mitochondriální membrány, což vede k uvolnění cytochromu c, který stimuluje kaspasovou kaskádu. Jedním z navržených mechanismů, kterým by LPA mohla zabraňovat apoptóze, je selektivní potlačení exprese Bax proteinu, který apoptózu podporuje^{8,13}.

5.2. Proces hojení

LPA má význam i během hojení poranění. Za normálních okolností se LPA v krvi nevyskytuje, ale během poranění aktivují poškozené cévy krevní destičky. Ty následně uvolňují řadu bioaktivních mediátorů, které vyvolávají buněčnou proliferaci, buněčnou migraci, srážení krve a angiogenezi. Jedním z těchto bioaktivních mediátorů je právě LPA, která iniciuje první děje hojení. Činí tak pomocí stimulace fosfatidylinositol 3-kinasy, na které je závislé shlukování krevních destiček. LPA zároveň mění jejich morfologii⁸.

5.3. Kardiovaskulární onemocnění

LPA signalizace má podstatný význam během angiogeneze, tvorby aterosklerotických plátů a udržování srdečního rytmu.

Angiogeneze, vznik nové kapilární sítě z již existujících cév, je standardně vyvolávána během hojení ran a během růstu tkání. Peptidové růstové faktory, jako např. vaskulární endoteliální růstový faktor a lysofosfolipidy, kontrolují koordinovaně proliferaci, migraci, adhezi, diferenciaci a shlukování vaskulárních endoteliálních buněk. Porucha regulace procesu angiogeneze může vést k ateroskleróze, hypertenzi, nádorovému růstu, rheumatoidní artritidě a diabetické retinopatii. Dysfunkce vaskulárního endotelu může posunout rovnováhu od vasodilatace k vasokonstrikci. To vede k hypertenzi a vaskulárnímu přestavbě, což jsou rizikové faktory pro progresi aterosklerózy. Oxidované LDL a krevní destičky hrají centrální roli v patogenezi aterosklerotických kardiovaskulárních onemocnění. LPA přispívá jak k časně, tak pozdní fázi aterosklerózy. Během časně fáze se LPA akumuluje v mírně oxidovaném LDL a v lidských aterosklerotických lézích a aktivuje příslušné receptory spojené s G-proteiny exprimované na krevních destičkách. Vyvolává tak změnu jejich tvaru. Když totiž dojde k prasknutí aterosklerotického plátu, LPA se stane dostupnou pro cirkulující krevní destičky a spouští jejich aktivaci. Tím je zahájena pozdní fáze aterosklerózy, protože změna tvaru krevních destiček a jejich agregace vede k tvorbě intraarteriálního trombu a potenciálně k infarktu myokardu a mrtvici, či akutnímu koronárnímu syndromu. Aktivace krevních destiček je vyvolána již nanomolárními koncentracemi LPA a je zprostředkována pomocí proteinu G_{12/13}. Tuto interakci je

možné inhibovat albuminem. Naopak další plazmatický protein, gelsolin, který také váže LPA, interakci LPA s krevními destičkami neinhibuje.

K vyvolání agregace krevních destiček jsou potřebné vyšší, mikromolární koncentrace LPA. Na LPA jsou však citlivé pouze krevní destičky lidí a koček. U ostatních živočišných druhů, např. psů, prasat, myší, králíků a krys nebyly destičky *in vivo* pomocí LPA aktivovány.

LPA přítomná v cirkulujícím oxidovaném LDL by mohla přispívat k hyperaktivitě krevních destiček pozorované u pacientů s koronárními arteriálními chorobami.

U pacientů s kardiovaskulárními chorobami by tedy bylo možné využít antagonisty pro LPA receptory. Tím by se snížilo riziko tvorby trombů a plátů neointimy. Velkou výzvou pro výzkum jsou také léky, které by selektivně zasahovaly do aktivace krevních destiček vyvolané LPA^{14,15}.

5.4. Nádorové bujení

Vznik nádorového bujení, jeho vývoj a tvorba metastáz zahrnuje několik konkurenčních a po sobě jdoucích procesů včetně buněčné proliferace a buněčného růstu, antiapoptózy, migrace buněk, penetrace cizích buněk do definovaných buněčných vrstev či orgánů a stimulace nádorové angiogeneze. V každém z těchto procesů se uplatňuje signalizace prostřednictvím LPA, a to za fyziologických i patofyziologických podmínek¹⁴.

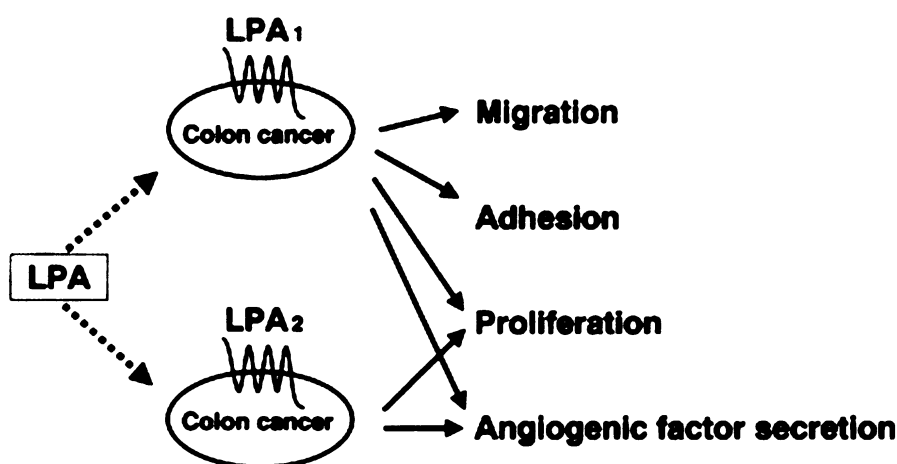
5.4.1. Maligní nádory vaječníků

Signalizace prostřednictvím LPA byla nejlépe prozkoumána u maligních nádorových buněk vaječníků. Rakovinné buňky vaječníků produkují ve srovnání s normálními buňkami epitelu vaječníků zvýšené množství LPA. LPA se vyskytuje v ascitické tekutině pacientek s maligními nádory na vaječnicích, a to v poměrně vysokých koncentracích (2–80 μM), u 90% pacientek s rakovinou vaječníků ve stadiu I nebo II zároveň pozorujeme zvýšenou hladinu LPA v séru, což by teoreticky mohlo umožnit využití LPA jako biomarkeru tohoto onemocnění. Problémem však zůstává skutečnost, že hodnoty LPA v séru mohou být vyšší z důvodu aktivace krevních destiček během přípravy vzorku.

LPA zároveň stimuluje proliferaci rakovinných buněk vaječníků. U těchto buněk také pozorujeme nápadně zvýšenou expresi LPA₂ a LPA₃. Největší mírou exprese ve vaječnicích se však vyznačuje LPA₄. Zásahy do metabolismu LPA, specifické blokády receptorů a inhibice následných signálních drah by mohly přispět k léčbě rakoviny¹⁴.

5.4.2. Maligní nádory tlustého střeva

LPA zvyšuje metastatický potenciál v liniích DLD1 buněk tlustého střeva. Stimuluje zde buněčnou migraci, proliferaci, adhezi a sekreci faktorů podporujících angiogenezi (viz. obr. 6). Mezi tyto faktory řadíme vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a interleukin 8 (IL-8). U jiných linií buněk tlustého střeva (HT 29 a WiDR) zvyšuje LPA proliferaci a sekreci angiogenních faktorů. Stimulace adheze a migrace u těchto linií však nebyla prokázána¹⁶.



Obr 6.: Působení LPA na rakovinné buňky tlustého střeva prostřednictvím receptorů LPA₁ a LPA₂

Zkratky: LPA, kyselina lysofosfatidová; LPA₁, LPA₂, receptory pro LPA.

Převzato: Shida, D.; Kitayama, J.; Yamaguchi, H.; Okaji, Y.; Tsuno, N. H.; Watanabe, T.; Takuwa, Y.; Nagawa, H.: *Lysophosphatidic Acid (LPA) Enhances the Metastatic Potential of Human Colon Carcinoma DLD1 Cells through LPA1*. *Cancer Research*. **63**, 1706 – 1711 (2003).

5.4.3. Lysofosfolipasa D a autotaxin

Teprve v posledních letech bylo objeveno, že lidská lysofosfolipasa D, přítomná v plazmě, a autotaxin (ATX) jsou identické. Autotaxin je široce rozšířená ektofosfodiesterasa stimulující motilitu buněk. Má svou roli při nádorovém bujení a tvorbě metastáz. Podporuje angiogenezi, diferenciaci oligodendrocytů a myelinizaci. Hlavním fyziologickým ligandem pro ATX je lysofosfatidylcholin (LPC), který je vylučován játry a cirkuluje ve vysokých koncentracích v plazmě.

Mnoho buněčných druhů exprimuje autotaxin a uvolňuje podstatné množství LPC, a tím produkuje LPA, která u řady buněk stimuluje nádorové bujení. Zvýšená aktivita lysoPLD je však pozorována i v lidském séru zdravých těhotných žen během třetího trimestru těhotenství a u pacientek s rizikem předčasného porodu. LPA může být také přítomná i ve folikulární tekutině zdravých žen^{17,18}.

5.5. Úloha LPA při neuropatiích

Chronická neuropatická bolest nastupuje v některých případech po akutní bolesti, která má ochranný charakter. O dějích, které tento druh bolesti spouštějí, je známo jen velmi málo. Současné výsledky naznačují možnou roli LPA v tomto procesu. Hlavní buněčné komponenty nervových tkání jako centrální a sensorické neurony, Schwannovy buňky a oligodendrocyty, jsou totiž schopné odpovědi na LPA. Dnešní výzkum se soustřeďuje zejména na úlohu receptorů LPA₁ během spouštění neuropatické bolesti. Časná intervence na úrovni receptorů pro LPA by mohla představovat nové terapeutické možnosti při léčbě neuropatické bolesti¹⁴.

5.6. Psychiatrické poruchy

LPA hraje podstatnou roli při vývoji nervové soustavy. Během embryogeneze ovlivňuje morfologii nervových progenitorových buněk (smršťování a zakulacování), jejich přežití nebo apoptózu a pohyb. Fyziologická a patofyziologická důležitost LPA v nervovém systému je zdůrazněna biologicky relevantní koncentrací ve vyvíjejícím se mozku. Signalizace spojená s LPA patrně přispívá k progresi psychiatrických onemocnění jako např. schizofrenie¹⁴.

5.7. Reprodukce

Úloha LPA v patofyziologii reprodukce savců byla již zmíněna v kapitole 5.4.1. Mnohá pozorování však naznačila i možné zapojení LPA do fyziologických procesů jako je těhotenství a porod. Zvýšenou hladinu ATX, PLA₂ a LPA pozorujeme ve třetím trimestru těhotenství a ve větší míře u žen s rizikem předčasného porodu. LPA a ATX/lysoPLD byly nalezeny také ve folikulární tekutině zdravých žen^{2,14}.

5.8. Obezita

Obezita je klíčovým faktorem vedoucím k diabetu 2. typu a ke zvýšenému riziku kardiovaskulárních onemocnění. Adipocyty regulují lipidový a lipoproteinový metabolismus pomocí několika sekrečních produktů. Jedním z nich je právě LPA či ATX/lysoPLD. Poměr prekurzorových adipocytů a diferenciovaných adipocytů je u lidí s normální hmotností přísně kontrolován. LPA moduluje proliferaci a diferenciaci pre-adipocytů. Současné studie poukazují na skutečnost, že intracelulárním receptorem pro LPA je také peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). Aktivace LPA₁ receptorů v pre-adipocytových buněčných liniích snižuje genovou expresi PPAR γ a inhibuje tak akumulaci triacylglycerolů a genovou expresi specifických adipocytů, které jsou markery adipogeneze. Aktivace LPA₁ je tedy patrně antiadipogenní. Možnost terapeutického využití stimulace signalizace prostřednictvím LPA₁ receptorů však vyžaduje podrobnější studie, a to zejména z hlediska vedlejších účinků na ostatní orgánové soustavy¹⁴.

5.9. Imunita

Řada buněk imunitního systému, včetně T-lymfocytů, B-lymfocytů a makrofágů, exprimuje receptory specifické pro LPA. Imunitní odpovědi jsou regulovány jak množstvím, tak typem produkovaných receptorů. LPA má mitogenní vliv na B- i T-lymfocyty. Do proliferace T-buněk je zapojen receptor LPA₁ a do migrace T-buněk receptor LPA₂. LPA zároveň pomocí receptorů LPA₁ a LPA₂ chrání makrofágy a T-lymfocyty před apoptózou^{2,11}.

6. Závěr

V posledních letech zaznamenal výzkum LPA obrovský pokrok. Došlo k identifikaci čtyř specifických receptorů a s nimi spojených G-proteinů. Dále bylo popsáno šest hlavních signálních drah pro LPA. Ukázalo se, že LPA ovlivňuje celou řadu lidských onemocnění.

Vzhledem k narůstajícímu počtu nemocí vyvolaných nádorovým bujením se výzkum soustřeďuje zejména na souvislost LPA s progresí maligních chorob. Bylo prokázáno, že lysofosfolipasa D, jeden z enzymů produkujících LPA, je identická s autotaxinem, který podporuje tvorbu metastáz. To je možno označit za jeden z nejvýznamnějších objevů. Nelze také opomenout účast LPA během přenosu signálu při patofyziologických, resp. fyziologických procesech jako jsou kardiovaskulární choroby, obezita, psychiatrické poruchy, resp. reprodukce, imunitní obrana a proces hojení.

CITACE:

¹ Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.: **Essential Cell Biology**. Garland Publishing, Inc. (1998).

² Ishii, I.; Fukushima, N.; Ye, X.; Chun, J.: **Lysophospholipid Receptors: Signaling and Biology**. Annual Review of Biochemistry. **73**, 321 – 354 (2004).

³ Xie, Y.; Gibbs, T. C.; Meier, K. E.: **Lysophosphatidic acid as an autocrine and paracrine mediator**. Biochimica et Biophysica Acta. **1582**, 270 – 281 (2002).

⁴ Moolenaar, W. H.: **Lysophosphatidic Acid, a Multifunctional Phospholipid Messenger**. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. **270**:22, 12949 – 12952 (1995).

⁵ Moolenaar, W. H.: **Lysophosphatidic acid signalling**. Current Opinion in Cell Biology. **7**, 203 – 210 (1995).

⁶ Xie, Y.; Meier, K. E.: **Lysophospholipase D and its role in LPA production**. Cellular Signalling. **16**, 975 – 981 (2004).

⁷ Moolenaar, W. H.; van Meeteren, A.; Giepmans, N. G.: **The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling**. BioEssays. **26**, 870 – 881 (2004).

⁸ Swarthout, J. T.; Walling, H. W.: **Lysophosphatidic acid: receptors, signaling and survival**. Cellular and Molecular Life Sciences. **57**, 1978 – 1985 (2000).

⁹ Anliker, B.; Chun, J.: **Lysophospholipid G Protein - coupled Receptors**. The Journal of Biological Chemistry. **279**:20, 20555 – 20558 (2004).

-
- ¹⁰ H: Zhu, T.; Gobeil, F. Jr.; Vazquez-Tello, A.; Leduc, M.; Rihakova, L.; Bossolasco, M.; Bkaily, G.; Peri, K.; Varma, D. R.; Orvoine, R.; Chemtob, S.: **Intracrine signaling through lipid mediators and their cognate nuclear G-protein-coupled receptors: a paradigm based on PGE₂, PAF, and LPA₁ receptors.** Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. **84**, 377 – 391 (2006).
- ¹¹ Radeff-Huang, J.; Seasholtz, T. M.; Matteo, R. G.; Brown, J. H.: **G protein Mediated Signaling Pathways in Lysophospholipid Induced Cell Proliferation and Survival.** Journal of Cellular Biochemistry. **92**, 949 – 966 (2004).
- ¹² Van Leeuwen, F. N.; Olivo, C.; Grivell, S.; Giepmans, B. N. G.; Collard, J. G.; Moolenaar, W. H.: **Rac Activation by Lysophosphatidic acid LPA₁ Receptors through the Guanine Nucleotide Exchange factor Tiam1.** The journal of biological chemistry. **278**:1, 400 – 406 (2003).
- ¹³ Ye, X.; Ishii, I.; Kingsbury, M. A.; Chun, J.: **Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic factor.** Biochimica et Biophysica Acta. **1585**, 108 – 113 (2002).
- ¹⁴ Gardell, S. E.; Dubin, A. E.; Chun, J.: **Emerging medical roles for lysophospholipid signaling.** Trends in Molecular Medicine. **12**:2, 65 – 75 (2006).
- ¹⁵ Haserück, N.; Erl, W.; Pandey, D.; Tigyi, G.; Ohlmann, P.; Ravanat, C.; Gachet, C.; Siess, W.: **The plaque lipid lysophosphatidic acid stimulates platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation in whole blood: involvement of P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors.** Blood. 103,2585 – 2592 (2004).
- ¹⁶ Shida, D.; Kitayama, J.; Yamaguchi, H.; Okaji, Y.; Tsuno, N. H.; Watanabe. T.; Takuwa, Y.; Nagawa, H.: **Lysophosphatidic Acid (LPA) Enhances the Metastatic Potential of Human Colon Carcinoma DLD1 Cells through LPA1.** Cancer Research. **63**, 1706 – 1711 (2003).

¹⁷ Moolenaar, W. H.: **Lysophospholipids in the limelight: autotaxin takes center stage.** The Journal of Cell Biology. **158**:2, 197 – 199 (2002).

¹⁸ Umezu-Goto, M.; Kishi, Y.; Taira, A.; Hama, K.; Dohmae, N.; Takoi, K.; Yamori, T.; Mills, G. B.; Inoue, K.; Aoki, J.; Arai, H.: **Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production.** The Journal of Cell Biology. **158**:2, 227 – 233 (2002).