

# A lizofoszfátsav mint potenciális célpont az ováriumtumorsejt molekuláris diagnózisában és kezelésében

TANYI JÁNOS DR.<sup>1</sup> ■ RIGÓ JÁNOS JR., DR.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Gynecologic Oncology, University of Pennsylvania Health System, Philadelphia

<sup>2</sup>Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Budapest

Az ováriumtumorsejt mortalitása a legmagasabb a nőgyógyászati tumorsejtek között. Ez egyrészt a késői diagnózisnak, másrészt a hatásos terápia hiányának következménye. Az ováriumtumorsejt karcinogenezise és metasztázisképzése egy komplikált genetikai, molekuláris és biokémiai folyamatsor eredménye. A lizofoszfátsav (LPA) termelésének, receptorstátuszának és szignáltranszdukciós útvonalának abnormalitása gyakran megtalálható az ováriumtumorsejtben, ami azt sejteti, hogy az LPA nagyon fontos szerepet játszik ennek a betegségnél a kialakulásában és patofiziológiájában. Így jogosan feltételezhetjük, hogy az LPA-szignálkaskád számos célpontot szolgáltat a molekuláris kezelési módok kialakítására és jó példát mutat arra, hogyan lehet új diagnosztikus és terápiás módszereket kialakítani egyes betegségek ellen. Az LPA-t lebontó és termelő enzimcsaládoknak csak a közelmúltban történt felfedezése és a receptorspecifikus molekulák kifejlesztése új fejezetet nyithat a potenciálisan halálos betegség kezelésében. Ebben az összefoglaló tanulmányban ismertetjük, hogy a tumorsejtben lévő LPA-t lebontó enzimek aktivitása csökkent, és ez hozzájárul a tumor progressziójához. Ugyanezen enzimek mesterségesen létrehozott, fokozott aktivitása csökkenti a tumorsejt növekedését és elősegíti a fiziológiás viszonyok helyreállítását. Bemutatjuk azokat az irodalmi adatokat, amelyek egyértelműen bizonyítják, hogy a lipídfoszfát-foszfátáz enzimek hatásukat a sejtet kívüli LPA lebontásával érik el. Minthogy ez a lebontás extracellulárisan történik, ez megmagyarázza a „bystander-effect” előfordulását, amit szintén ismertetünk. Az LPA-lebontás és -termelés enzimjei, illetve az LPA-t kötő receptorok kitűnő célpontok új molekuláris terápia kidolgozására. A különböző LPA-izomformák és más lizofoszfolipidek szintváltozásainak korai detektálása segíthet a tumor korai diagnosztizálásában, illetve később a kezelés hatékonyságának követésében. A közelmúlt jelentős LPA-szignálkaskáddal kapcsolatos kutatási eredményei azt sejtetik, hogy azok jelentős szerepet fognak játszani ennek a még mindig halálos betegségnél a kezelésében, de további kutatások szükségesek a részletek pontos megértéséhez.

**Kulcsszavak:** lizofoszfátsav, apoptózis, kezelés, ováriumtumor

## Lysophosphatidic acid as a potential target for treatment and molecular diagnosis of epithelial ovarian cancers

Ovarian carcinoma has the highest mortality rate of all gynecologic malignancies owing to late diagnosis and a lack of effective tumor-specific therapeutics. Ovarian carcinogenesis and metastasis is accompanied by a complicated cascade of genetic, molecular, and biochemical events. Abnormal lysophosphatidic acid (LPA) production, receptor expression, and signaling are frequently found in ovarian cancers suggesting that LPA plays a role in the pathophysiology of the disease. Moreover, the LPA pathway may provide novel molecular targets, illustrating how the development of new therapeutic and diagnostic strategies can contribute to disease management. The recent identification of the metabolizing enzymes that mediate the degradation and production of LPA and the development of receptor selective-analogues open a potential new approach to the treatment of this deadly disease. In this review, it is clearly presented that aberrations of LPP production contribute to the progression of ovarian cancer, just as overexpression of these metabolizing enzymes return the physiologic situation and inhibit the growth of the cancer cells. LPPs exert their effect through metabolizing extracellular LPA. This also clearly explains the dominant “bystander effect” of these enzymes. LPA through its production, metabolism, and receptors may provide an excellent target for the development of molecular therapeutics, and the early detection of molecular forms of LPA, other lysolipids, and the activities of LPA pathway receptors and enzymes may facilitate both diagnosis and monitoring the response of a given patient to therapy. The impressive development of knowledge about the pathway regulating LPA production and the identification of selective LPA-receptor agonists suggest that targeting the LPA cascade could be a real addition to the management and treatment of this still-deadly disease. Additional studies of the LPA cascade and other phospholipids in ovarian cancer are essential to further elucidate their critical roles.

**Keywords:** lysophosphatidic acid, apoptosis, treatment, ovarian cancer

(Beérkezett: 2009. április 14.; elfogadva: 2009. május 8.)

**Rövidítések**

ATX/lysoPLD = autotaxin/lizofoszfoplipáz D; CMV = cytomegalovirus; Edg = endothelial differentiation gén; FBS = fetal bovine serum; GFP = zöld fluoreszkáló protein; hTERT = human telomerase reverse transcriptase; HU-K5 = humán lizofoszfoplipáz-homológ; LPA = lizofoszfátsav; LPC = lizofoszfátidil-kolin; LPP = lipidfoszfát-foszfahidroláz enzim; NOE = normális ovárium epithelialis sejtvonal; OMPT = 1-oleoyl-Sn-2-O-methyl-Rac-glycero-3-phosphothionate; PAP = foszfátsav-foszfátáz; PI = propidium iodide; PI3K = foszfátidilinozitol-3-kináz; PLA = foszfoplipáz A; RT-PCR = reverse transcription-PCR; SV40 = Simian vírus T 40 antigén; TGF- $\alpha$ , - $\beta$  = transforming growth factor- $\alpha$  - $\beta$ ; VEGF = vascular endothelial growth factor

A nőgyógyászati daganatok között az ováriumtumorkok rendelkeznek a legmagasabb halálozási arányszámmal. Ez a lehangoló adat annak a következménye, hogy effektív szűrővizsgálatok hiányában, az esetek többsége előrehaladott stádiumban kerül felismerésre. Az elmúlt 25 év során kifejlesztett számos új terápiás lehetőség ellenére a tényleges túlélés lényegesen nem változott [1]. A legtöbb beteg rövid időn belül kemoterápiarezisztenssé válik és belehal progrediáló betegségébe, így a tényleges ötéves túlélés a mai napig 30% alatt van [1]. Az elmúlt évtizedekben végzett genetikai vizsgálatok számos molekuláris genetikai eltérést fedeztek fel az ováriumtumorkokban [2, 3, 4, 5, 6]. Ez a genetikai instabilitás hozzájárul a kezelésre rezisztens tumorsejtek kialakulásához [7]. Ennek eredményeképpen, bár némely első vonalú kemoterápia hatásossága jelentős, a gyógyulási arány hosszú távon mégis kompromizált. Az előrehaladott stádiumú ováriumtumorkokat körülvevő ascitesből számos biológiai aktivitással rendelkező molekulát izoláltak, s ezek közül legjelentősebbnek a lizofoszfátsavat tartják [7, 8, 9].

## A lizofoszfátsav fiziológiás szerepe és metabolizmusa

A lizofoszfátsav (LPA, 1-acyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphate) a lipidszintézis régen ismert prekuzora és alkotóeleme. Az LPA mint extracelluláris, biológiailag aktív lipidmolekula, szinte minden sejttípusban fontos szerepet játszik a sejtszaporodás, migráció és túlélés szabályozásában [10, 11]. Ismert továbbá az is, hogy az LPA stimulálja a különböző proteázok és neovascularisációs faktorok termelését, így hozzájárul az áttétképződés kialakulásához [12, 13]. A szérumban LPA-szintje fiziológiás körülmények között alacsony (100–200 nM), funkciója és metabolizmusa változatlanul fennmaradt az ontogenezis során [14, 15]. Az LPA egyaránt indukál sejtdifferenciálódást, amely nekrozishoz és apoptozishoz vezet, mint ahogyan szerepe van a korai funkciók kialakulásában is, ideértve a motilitást és a kemotaxist. Hosszabb távon az LPA fokozza a sejttúlélést és gyorsítja a sebgyógyulást is [11]. Az LPA hatással van különböző autokrin szignáltranszdukciós útvonalakra peptidnövekedési faktorok termelésének stimulálásán keresztül [16,

17]. Továbbá az LPA prekuzora más biológiailag aktív lipideknek, például az LPA átalakítása foszfátsavvá, befolyásolja a membránváltozásokat az endocytosis folyamatában [18].

A szérumban LPA-szintje fiziológiás körülmények között alacsony (100–200 nM), ami arra utal, hogy termelése és lebontása *in vivo* szigorúan szabályozott [15]. LPA-t sokfajta sejttípus képes termelni, például adipocyták, aktivált trombocyták, endothelialis sejtek és, ami patológiás jelentőséggel bír, ovárium-tumorsejtek is [7, 10, 14, 19, 20, 21, 22]. Az LPA extracelluláris termelésének fő enzime az autotaxin (autotaxin/lysophospholipase D – ATX/lysoPLD), ami lizofoszfátidil-kolinból egy kolin eltávolításával LPA-t képez [23]. Az ATX/lysoPLD-szint emelkedett különböző rákos megbetegedésekben, ami arra utal, hogy valószínűleg szerepe van a malignus tumorok patofiziológiájában [19, 24].

Az LPA lebontását a lipidfoszfát-foszfátázok (LPP, lipid phosphate phosphatases), más néven foszfátsav-foszfahidrolázok (PAP, phosphatidic acid phosphohydrolases) végzik [25, 26]. Az LPP enzimcsalád eddig ismert három tagja az LPP-1 (PAP2A), LPP-2 (PAP2C) és LPP-3 (PAP2B). Mindhárom sejtmembránfehérje; hat transzmembrán doménnel rendelkeznek, és katalitikus doménjük extracellulárisan helyezkedik el [25, 26, 27, 28]. Az LPP enzimek főképpen a sejten kívül elhelyezkedő, receptorhoz kötött LPA-t tudják metabolizálni [29]. Továbbá azt is feltételezték, hogy az LPP-k közvetlenül gátolják az LPA G-protein-coupled receptorainak működését [29]. A lebontás mellett az LPA gyors kiürülése a keringésből is hozzájárul az alacsony fiziológiás szint fenntartásához.

Az LPA szignáltranszdukció folyamatát a sejtfelszínen elhelyezkedő LPA-receptorok is meghatározzák. Az LPA-t eukaryotasejtekben nagy affinitással megkötő receptorok, az LPA-1 (Edg-2), LPA-2 (Edg-4) és LPA-3 (Edg-7), az endothelial differentiation gene (Edg) receptorcsalád tagjai [30, 31, 32]. Az LPA a sejtfelszínen kapcsolódik ezekhez a G-protein-coupled receptorokhoz [31, 32].

## A lizofoszfátsav-metabolizmus patofiziológiája ováriumtumorkokban

Az ováriumtumoros betegek ascitesében az LPA-szint gyakran emelkedett (80  $\mu$ M-ig) [7, 33]. Ez egyértelműen arra utal, hogy az ovárium-tumorsejtek LPA-gazdag környezetben fejlődnek [33]. Mivel az LPA fokozza néhány neovascularisációs faktor – a „vascular endothelial growth factor”, valamint az IL-8 és IL-6 – termelését, várható, hogy ezáltal a tumor idővel malignusabb fenotípusúvá változik [34]. Ismert továbbá az is, hogy az egészséges petefészekhámsejtek nem termelnek LPA-t, viszont az ovárium-tumorsejtek jelentős mennyiségű LPA-molekulát állítanak elő [7, 35]. Több szerző leírta, hogy ezzel párhuzamosan az ATX/lysoPLD mRNS- és proteinszintje szintén emelkedett a rosszindulatú daga-

atos betegségekben [7, 19]. Feltételezhető, hogy az ascitesben megjelenő magas LPA-szint a szérumban emelkedéséhez vezet, így alkalmazhatóvá válik diagnosztikus célokra, mint tumormarker. Már korábban közölték, hogy a korai stádiumban levő ováriumkarcinómás betegek mintegy 90%-ában emelkedett a szérumban LPA-szint [15].

### Az LPP mRNS-expressziója és enzimaktivitása egyaránt csökken ováriumtumorsejtben

Affymetrix array data set felhasználásával, egészséges epitheliumsejt-mintákat alapul véve, az LPP-1-mRNS-expresszió szintje mintegy ötödére csökkent az ováriumtumorsejt-mintákban [36]. Ahogy az 1. táblázatban látható, az LPP-1 mRNS-szintje szintén alacsonyabb volt ováriumtumorsejtben, mint más tumorsejt-típusokban. Például az LPP-1 RNS-szintje prosztata- és vesetumorsejtben 10-szerese volt az ováriumtumorsejtben mért szintnek [19]. A három LPP-típus összesített RNS-szintje az ováriumtumorsejt-mintákban szintén alatta maradt más tumortípusoknál mért szintnek. Szemikvantitatív RT-PCR analízis megerősítette a microarray-analízis eredményeit, a vizsgált ováriumtumorsejt-minták és ováriumtumorsejt-típusok 80%-ában csökkent az LPP-1-mRNS-szint normális epitheliumsejt-minták LPP-1-mRNS-expressziójával összehasonlítva [36]. Ennek alapján feltételezhető, hogy a tumoros betegek ascitesében emelkedett LPA-szintnek és a tumorsejt-típusok emelkedett LPA-szintjének egyaránt az ováriumtumorsejtben felfedezett, csökkent LPP-1-szint az oka.

Az összesített LPP-aktivitást vizsgálva, az LPP-1 a normális ovárium epithelialis sejtben (IOSE) a mért

össz-LPP-aktivitás 10%-áért volt felelős. Ezzel szemben az ováriumtumorsejt-típusokban (HEY, OVCAR-3 és SKOV3) ennél jelentősen kisebb LPP-1-aktivitás volt megfigyelhető. Az IOSE és malignus sejt-típusokban mérhető LPP-1-aktivitás közötti különbség nagyobb volt, mint az összesített LPP-aktivitások különbsége [36]. Ez arra utal, hogy ováriumkarcinómasejtben az LPP-1-aktivitás szelektíven csökkent. Az LPP-1-aktivitás mérhető csökkenése jól korrelált az mRNS-expresszió már korábban megállapított csökkenésével.

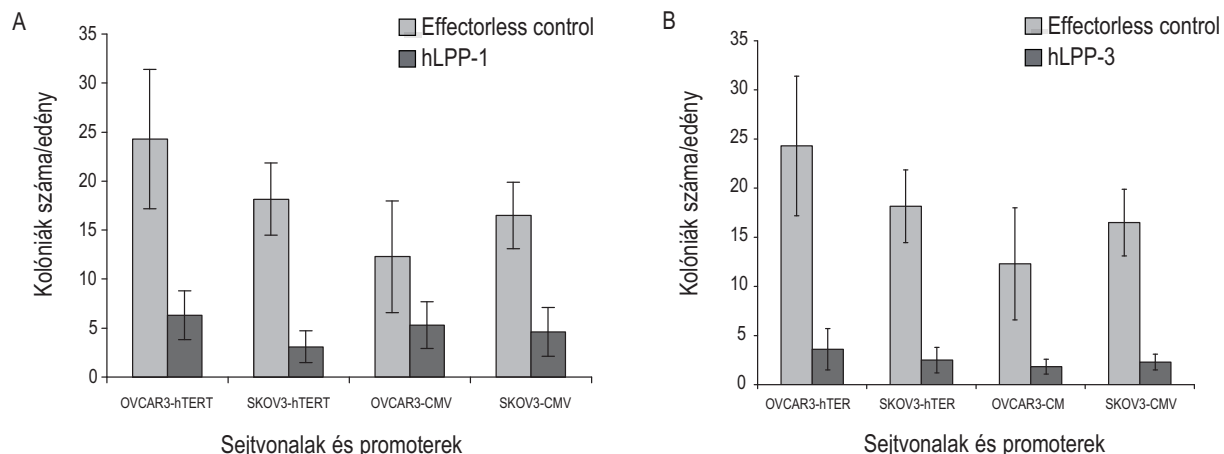
### LPP-1 és LPP-3 mesterségesen létrehozott aktivitása csökkenti a tumorsejt kolóniaképzését és fokozza az apoptózist ováriumkarcinóma-sejt-típusokban

A tumorsejt-proliferáció vizsgálatának érzékeny módszere a „colony formation assay”. Ahogy az 1. ábrán látható, az LPP-1-gyel stabilan transzfektált SKOV3 ováriumtumorsejt kolóniaformáló aktivitása csaknem felére csökkent a nem transzfektált sejtekkel összehasonlítva ( $49 \pm 8,4$ -ról  $26 \pm 4,3$ -re kolónia/edény). Minthogy nehéz magas LPP-1-expressziót elérni a stabilan transzfektált tumorsejtben, tranziens transzekciót követően, az LPP-1-expresszió jelentősen csökkentette az OVCAR-3 és SKOV3 sejtek növekedését és kolóniaformáló képességét. Az LPP-1 fokozott expressziójának gátlóhatása az OVCAR-3 és SKOV3 sejtek növekedésére 2,3–5,8-szeres volt, attól függően, hogy CMV vagy humán telomeráz (hTERT) promotor volt beépítve a DNS-vektorba [36]. A fenti eredmény egyértelműen arra utal, hogy az LPP-1 sejt felszíni aktivitásának fokozásával jelentősen gátolni tudjuk az ováriumtumorsejt proliferációját *in vitro*.

1. táblázat | A DNS-array adatok elemzése

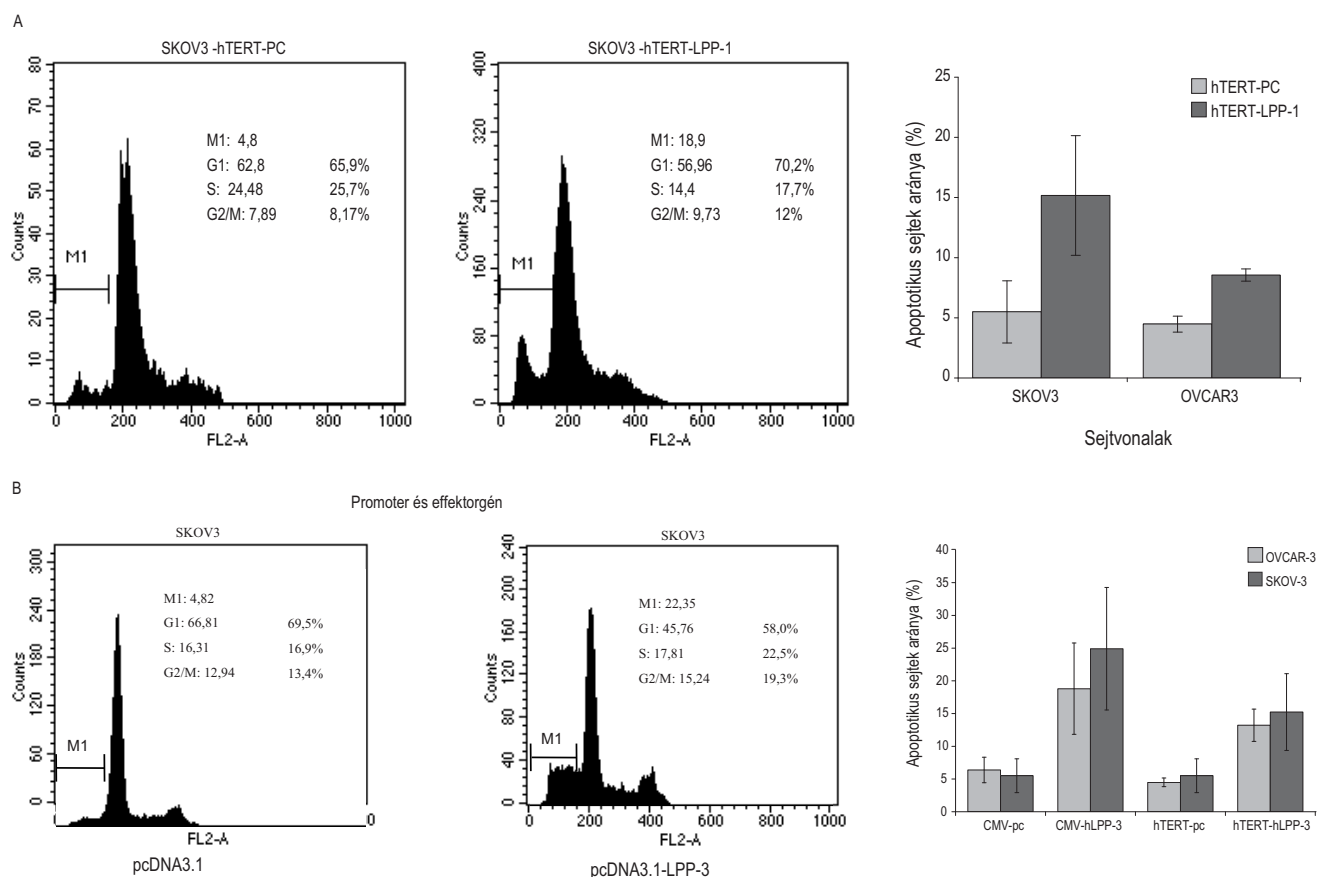
Enzime	Génbank sorsszám	Átlagok								Arányok (%)		
		Normális epithelium	Petefészek* (n = 27)	Emlő* (n = 25)	Tüdő* (n = 27)	Vastagbél* (n = 23)	Prosztata* (n = 26)	Vese* (n = 11)	Hasnyálmirigy* (n = 6)	Petefészek/normális epithelium	Emlő/normális epithelium	Tüdő/normális epithelium
PAP-2a1 (hLPP-1)	AFO 14402	388	91	163	199	119	2310	980	284	0,2	0,4	0,5
PAP-2b (hLPP-3)	AFO 17786	634	663	404	686	311	1767	3009	612	1,0	0,6	1,1
PAP-2γ (hLPP-2)	AFO 35959	230	264	642	509	718	230	103	856	1,1	2,8	2,2
LPAATα	U 56417	490	812	773	632	757	595	725	653	1,7	1,6	1,3
LPAATβ	U 56418	544	359	481	411	953	399	640	473	0,7	0,9	0,8
HU-K5	U 67963	339	151	109	296	292	106	815	494	0,4	0,3	0,9
LPL1	AFO 81281	512	458	665	417	561	576	248	355	0,9	1,3	0,8

\* A táblázatban látható számértékek minden egyes tumortípusnál az összes DNS-array eredményátlaga [Tanyi és mtsai, Clinical Cancer Research 2003. ref. 36].



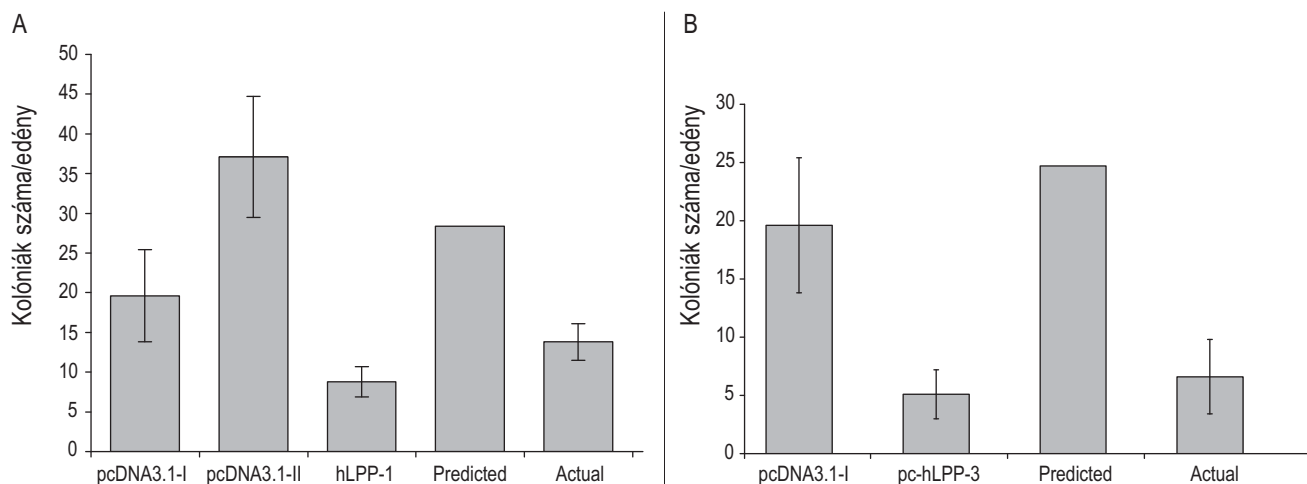
1. ábra

Az LPP-1 és LPP-3 tumorsejt-növekedést gátló hatása. **A)** Két nappal az LPP-1-et expresszáló vektorral elvégzett transzfekeiót követően a sejteket tripszinnel mobilizáltuk és PBS-oldatban mostuk. Ezt követően  $3 \times 10^4$  tumorsejtet 30 mm-es sejt kultúraedényekbe telepítettünk. Két héttel később a tumorsejt-kolóniákat 0,1% Coomassie blue, 30% methanol és 10% acetic-acid oldattal festettük. Az ábrán a kolóniák számának hat, egymástól függetlenül megismételt kísérletről számolt edényenkénti átlagát és standard deviációját láthatjuk. **B)** Az előző kísérlethez hasonlóan, az LPP-3-at expresszáló vektorral elvégzett transzfekeiót követően a sejteket tripszinnel mobilizáltuk és PBS-oldatban mostuk.  $3 \times 10^4$  tumorsejtet 30 mm-es sejt kultúraedényekbe telepítettünk. Két héttel később a tumorsejt-kolóniákat 0,1% Coomassie blue, 30% methanol és 10% acetic-acid oldattal festettük. Az ábrán a kolóniák számának hat megismételt kísérletről számolt edényenkénti átlagát és standard deviációját láthatjuk. Az „effectorless control” az üres vektorral transzfekeiót tumorsejt-kolóniákat jelenti [36, 37].



2. ábra

Az LPP-1 és LPP-3 fokozott expressziója növeli az apoptózis arányát az ováriumtumor-sejtvonalakban. Két nappal a transzfekeiót követően, a sejteket összegyűjtöttük és 0,25% paraformaldehid- és PBS-oldatban fixáltuk, majd a DNS-t propidium iodide (10 ug/ml) oldattal festettük. Kettősszint-érzékelő cytometric analízist végeztünk és a „hypodiploid” sejteket mint az apoptózis indikátorait CellQuest szoftverprogrammal számoltuk. **A)** Az hTERT promoterral rendelkező és LPP-1-et expresszáló vektorral SKOV3 tumorsejteken végrehajtott transzfekeiót követően, az eredeti flow citometriás diagram látható. Az M1 a „hypodiploid” sejteket mutatja. A G1, S és G2/M sejt ciklusfázisban lévő sejtek arányát a diagramok jobb oldalán láthatjuk. **B)** Az LPP-3-mal elvégzett transzfekeiót szintén fokozta az apoptotikus sejtek arányát. A „hTERT-pc vagy CMV-pc” az üres vektorral végrehajtott, míg a „hTERT-LPP-1, hTERT-LPP-3 vagy CMV-LPP-3” az LPP-1 vagy LPP-3 géneket tartalmazó vektorral végrehajtott transzfekeiót jelöli. Az oszlopdiaagramban a három, egymástól függetlenül megismételt kísérletről eredő apoptózisráta (M1) átlaga és standard deviációja látható [36, 37].



**3. ábra** | Az LPP-1 és LPP-3 fokozott expressziója csökkenti a transzfektált sejtek környezetében elhelyezkedő, de nem transzfektált (bystander) sejtek kolóniaformáló képességét. **A)** A  $3 \times 10^4$  pcDNA3.1 üres vektorokkal transzfektált kontroll tumorsejteket (I), vagy kétszeres mennyiségű ugyanezen sejteket (II) és  $3 \times 10^4$  LPP-1-et expresszáló tumorsejteket külön edényekbe telepítettük. Ahhoz, hogy a „bystander” hatást vizsgálhassuk,  $3 \times 10^4$  üres vektorral transzfektált kontrollsejtet és ugyanezen mennyiségű LPP-1-gyel transzfektált tumorsejtet együtt, ugyanazon sejt kultúraedénybe telepítettünk. Két héttel később a kolóniákat megfestettük és megszámláltuk. Az ábrán látható „predicted value” a várt eredmény, ami a  $3 \times 10^4$  külön telepített kontroll és  $3 \times 10^4$  LPP-1-gyel transzfektált kolóniák összege. Az „actual value” az a kapott kolóniaszám, ami az együtt telepített  $3 \times 10^4$  kontrollsejtekből és  $3 \times 10^4$  LPP-1-gyel transzfektált sejtekből keletkezett. **B)** A kísérletet megismételtük LPP-3-mal végrehajtott transzfekcióval is ugyanolyan kísérleti feltételek mellett. A diagramokban látható számadatok hat, egymástól függetlenül megismételt kísérletből származó adatok átlaga és standard deviációja [36, 37]

Az LPP-3-at expresszáló CMV vagy hTERT promoter által vezérelt vektorokkal végrehajtott transzfekció után az LPP-3 jelentősen csökkentette mind a SKOV3 sejtek (7,1–7,3-szeres = 86% csökkenés), mind az OVCAR-3 sejtek (6,7–6,8-szeres = 85% csökkenés) kolóniaformáló képességét [36, 37].

Az LPP-k hatása az ovárium-tumorsejtek kolóniaformáló és proliferációs képességére valószínűleg a sejtciklus-progresszió lassulásán vagy fokozott apoptózisráján alapul. Flow citometriával vizsgálva, a sejtciklus különböző fázisaiba lépő sejtek aránya a LPP-1-gyel transzfektált SKOV3 vagy OVCAR-3 sejtek és a kontrollsejtek között meglepő módon hasonló volt (2.A ábra). A sejtciklus analízise során különbség mutatkozott a hipodiploid csúcs magasságában, és ez az apoptózisba lépő, a sejtciklusból kiszekelődött sejtek százalékos arányát reflektálja. Így megállapítható, hogy a proliferációs és kolóniaformáló képesség csökkenése az emelkedett apoptózisráta következménye. Érdekes módon az LPP-1 hatásához hasonlóan a hipodiploid csúcs szignifikáns emelkedése következett be az LPP-3-t expresszáló vektorral történt transzfekció után is (2.B ábra). Ezek szerint az LPP-3 inhibíciós hatása szintén az emelkedett apoptózisráta eredménye [36, 37].

### Az LPP-3 a tumorsejtek növekedésének gátlását a sejten kívüli szabad LPA lebontásával éri el

Mint már korábban utaltunk rá, ahhoz, hogy az LPP-3 kifejtsen hatását, intakt katalitikus doménre van szükség. Annak bizonyítására, hogy az LPP-3 tumorsejtekre kifejti, növekedésgátló hatását valóban a sejten kívüli

(extracelluláris) LPA lebontásával éri el, az LPP-3-mal stabilan transzfektált sejtekhez exogén LPA-t vagy egy, az LPP által le nem bontható LPA-analógot, OMPT-t (1-Oleoyl-Sn-2-O-Methyl-Rac-Glycerol-3-Phosphothionate) adagoltunk [37, 38]. Az LPP-3-mal stabilan transzfektált sejtek 4,4-szer gyorsabban bontották le az LPA-t, mint az eredeti, érintetlen tumorsejtek. Az oldathoz adott exogén LPA ugyan nem, de az OMPT képes volt ellensúlyozni az LPP-3 a tumorsejtek kolóniaformáló képességére kifejtett gátló hatását [37, 38]. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a membránasszociált LPP-3 a tumorsejt növekedésére kifejtett gátló hatását valóban az extracelluláris szabad LPA lebontásával éri el.

Ha ez valóban így van, akkor az LPP-1-gyel vagy LPP-3-mal transzfektált tumorsejtek a médiumban található LPA lebontása által csökkenteni fogják az ugyanott található, bystander, nem transzfektált sejtek növekedését is. Ennek vizsgálata egyenlő mennyiségű transzfektált és nem transzfektált sejt összekeverésével és kolóniaformáló képességüknek vizsgálatával történt, tiszta, nem kevert sejtpopulációkkal összehasonlítva (3.A–B ábra). A kevert sejtpopulációkban a sejtnövekedés lelassult, ami arra utal, hogy az LPP-1-et vagy LPP-3-at kiválasztó sejtek hatással vannak a nem transzfektált bystander sejtekre is, feltehetőleg egy extracelluláris mediátor (LPA) lebontása által [36, 37].

### Az LPP fokozott kiválasztása csökkenti a tumorsejtek migrációját *in vitro* és a tumorsejtek növekedését *in vivo*

Az LPA migrációt fokozó hatását már többen is vizsgálták. Közismert, hogy az LPA fokozza mind az ovárium



vagy más, például prosztatatumor sejtek migrációját [39, 40]. Nem vizsgálták azonban azt, hogy az LPP-1 fokozott kiválasztása és aktivitása vajon csökkenti-e az LPA által indukált sejt migrációt? A tumor sejtek LPP-1-expresszálo vektorral történt transzfektálását követően az LPA nem volt képes stimulálni a tumor sejtek migrációját [36]. Következésképpen az LPP-1 által végrehajtott extracelluláris LPA-lebontás negatívan befolyásolta a tumor sejtek migrációs képességét. Ez az információ igen fontos lehet majd az ováriumtumorsok áttétképzésének befolyásolásában.

Az ígéretes *in vitro* eredmények után szükségessé vált az LPP enzimek fokozott expressziójának vizsgálata *in vivo* környezetben is. Ovárium-tumor sejteket (SKOV3) athymiás (thymus nélküli, csökkent celluláris immunitással rendelkező) egerek bőre alá fecskendezve, tíz SKOV3-mal injektált egérből 9-ben alakult ki tumor, az LPP-3-at expresszálo stabilan transzfektált sejtek befecskendezése után viszont a 10-ből csak 4 egérben fejlődött ki daganat, azaz az LPP-3-mal transzfektált sejtekkel jóval kisebb tumorimplantációs százalékat értünk el. Nemcsak az implantáció százalékos előfordulása, hanem a tumornövekedés mértéke is különbözött. Az LPP-3-at expresszálo sejtekből kialakult tumorok jóval lassabban növekedtek, mint az eredeti tumor sejtekből kifejlődő daganatok. Az eredeti SKOV3 sejtekből kialakult tumorok átlagsúlya  $0,48 \pm 0,15$  g volt, ellentétben az LPP-3-at expresszálo SKOV3 sejtekből kialakult tumorokkal található  $0,13 \pm 0,04$  g-mal. Tehát az eredeti sejtvonalból kifejlődött tumorok átlagsúlya négyszerese volt az LPP-3-mal transzfektált sejtekből kialakult daganatoknak [37].

Az ovárium-tumor sejteknél (SKOV3 és SKOV3-IP<sub>1</sub>) az egerek hasüregébe történt fecskendezése után a tumorimplantációs ráta hasonlóképpen jelentősen csökkent (1/5 SKOV3 LPP-3 és 3/5 SKOV3 IP<sub>1</sub>-LPP-3 sejtekből injektált egereknél). A LPP-3 fokozott expressziója csökkentette a SKOV3 és SKOV3 IP<sub>1</sub> sejtek növekedését a hasüregben. Ahogy a 4. ábrán látható, ezt a kísérleti állapotváltozásával és haskörfogatának mérésével nyomon követhető volt.

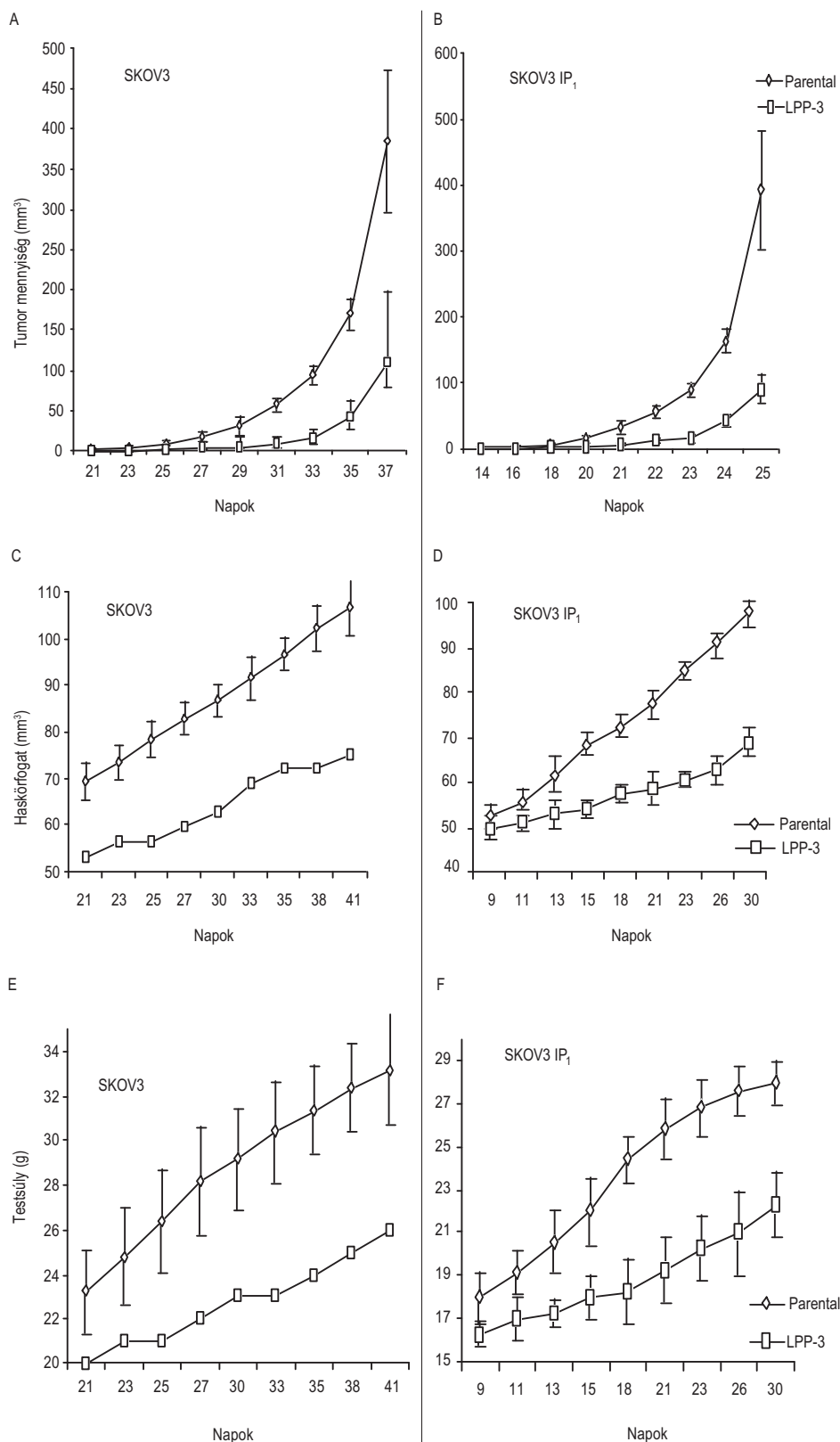
Az előbbieket alapján az LPP-3 fokozott expressziója jelentősen csökkentette a tumorimplantációs rátát és a tumorszigetek növekedését is. Azonban a kezdeti lassú növekedés után egy gyorsabb tumornövekedési tendencia volt megfigyelhető. Az egerek eutanáziája után a hasüregi tumormintából elvégzett RT-PCR igazolta, hogy a hasüregben növekedő tumor sejtekben mérhető LPP-3-expresszió és -aktivitás 4 hét után jelentősen csökkent. Ez arra utal, hogy *in vivo* erős negatív szelekció érvényesül az LPP-3-t fokozottan expresszálo tumor sejtek ellen, és az LPP-3 „down regulation”-ja következik be a túlélő ovárium-tumor sejtekben [37].

## Megbeszélés

Fiziológiás körülmények között a testfolyadékok, sejtmembránok és sejtek LPA-szintje alacsony (szubmikro-

moláris). Ez valószínűleg a gyors kiválasztás és lebontás következménye [20]. Az ováriumkarcinómás betegek ascitesében talált, emelkedett LPA-koncentrációt feltehetően az LPA-t termelő sejtek (tumor sejtek) számának emelkedése, illetve az LPA megváltozott lebontása okozza. Az LPA-szint ilyen mértékű változása és annak a tumor sejtekre kifejtett hatása érdekes vizsgálati területnek ígérkezett. A „public transcriptional profiling” adatbankok (CGAP SAGE és az M.D. Anderson Cancer Center „transcriptional profiling” adatbank) felhasználásával megállapítható, hogy ováriumkarcinómában egyértelműen csökken az LPP-k szintje, és ezzel lelassul az LPA lebontása [36]. Ezzel párhuzamosan az ATX/LysoPLD mRNS-szintje jelentősen emelkedett az ováriumkarcinómás betegekből nyert minták nagy százalékában [23, 41]. Ezen enzimek együttes hatásaként várhatóan emelkedni fog az LPA szintje a daganat környezetében. A három LPP-mRNS összesített szintje ováriumkarcinóma-szövetmintában és -sejtvonalakban alacsonyabb volt, mint egészséges hámszövetben, illetve egészséges petefészekből nyert hámsejtekben [36]. Ez ellentétben volt az ATX/lysoPLD aktivitással és megfelelt annak a megállapításnak, hogy ascitesben emelkedett az LPA-szint. Az összesített LPP-mRNS-szintkülönbség az említett mintákban elsősorban a jelentősen különböző LPP-1-szintből eredt – a szint ováriumkarcinóma-sejtekben átlagosan ötször alacsonyabb volt, mint normális hámsejtekben [36]. Az adatok arra utalnak, hogy a petefészek-karcinóma sejtjei, szemben az egészséges petefészekhámsejtekkel, fokozott mennyiségben képesek LPA-t képezni. Az LPA metabolizmusában részt vevő enzimek termelése és működése jelentősen megváltozik ováriumkarcinómában, emiatt az LPA termelésében észlelt minimális változások is jelentős szintemelkedést okozhatnak. Mindezt összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az ováriumkarcinóma LPA-ban gazdag környezete az LPA aberráns termeléséből és metabolizmusából ered [7, 24, 36, 37]. Ez a tény potenciálisan lehetőséget ad új, LPA-termelésre és -aktivitásra alapozott terápiás lehetőségek kialakítására *in vivo* és *in vitro*. Az LPA szintje a tumor sejtek környezetében egyértelműen befolyásolta azok migrációs képességét: ahogy növeltük az LPP expresszióját, úgy csökkent a tumor sejtek migrációs aktivitása. Saunders és mtsai hasonló eredményeket értek el az LPA termelésében részt vevő autotaxin enzim gátlásával [42]. A tumor sejtek migrációja lelassult, a molekuláris inhibitorokkal gátolt autotaxinaktivitás ugyanis csökkent LPA-termeléshez vezetett.

Petefészekkarcinóma-sejtvonalakat és kontroll normál hámsejteket tranziensen és stabilan transzfektálva, a LPP-1 és LPP-3 izoenzimek mesterségesen fokozott aktivitása csökkenti a tumor sejtek proliferációját és túlélését. Az LPP-1 és LPP-3 enzimek ilyen hatása függ az intakt katalitikus doméntól, azaz a mutáns, biológiailag inaktív LPP-3-nak nincs hatása a tumor sejtekre [37]. Az LPP-1 és LPP-3-aktivitás emelkedése jelentősen megnövelte az apoptózis arányát ováriumkarcinóma-sejtvonalakban és



4. ábra

Az LPP-3 fokozott expressziója csökkenti a tumorsejtek növekedését *in vivo*. A tumornövekedést athymicus immunszuppresszált egereken vizsgáltuk nem transzfektált „parental” vagy LPP-3-at stabilan expresszáló tumorsejtek bőr alá vagy hasüregbe történő befecskendezésével. **A–B)** Ebben a kísérletben 4 millió SKOV3 vagy SKOV3 IP eredeti ováriumkarcinóma-sejtet vagy 4 millió LPP-3-mal stabilan transzfektált ováriumkarcinóma-sejtet fecskendeztünk az egerek bőre alá. A tumor növekedését a tumor méretének másnaponkénti pontos mérésével követtük nyomon. A tumorok növekedése az SKOV-3 sejteknél a 21., míg az SKOV-3 IP sejteknél a 14. napon vált mérhetővé. Ezt követően 10 millió SKOV3 vagy SKOV-3 IP tumorsejtet, illetve ugyanezen mennyiségű LPP-3-mal transzfektált tumorsejtet fecskendeztünk az egerek hasüregébe. A tumor növekedését a haskőrfogat mérésével (**C–D**), illetve súlynövekedésével követtük (**E–F**). A haskőrfogat és a testsúly mérését a befecskendezés utáni 9. napon kezdtük meg [37]

kevésbé befolyásolta a sejtciklus progresszióját. Tehát a csökkent proliferáció és emelkedett sejthalalozás egyaránt felelős a csökkent növekedési rátáért. Az exogén, az LPP-3 által nem hidrolizálható LPA3 receptort szelektíven aktiváló agonista OMPT jelentősen ellensúlyozta az LPP-3 által okozott növekedésgátló hatást csakúgy, mint a fokozott apoptózist [37, 38]. Így megállapítható, hogy az LPP-3 hatását az ováriumkarcinóma-sejtek növekedésére valóban az extracelluláris LPA hidrolízisen keresztül fejti ki [24, 37, 43].

Igazolt tény, hogy az LPA jelentősen növeli a sejt migrációt és ezzel valószínűleg hozzájárul a daganat agresszív viselkedéséhez, illetve metasztázis képzéséhez [44, 45]. „Transwell assay”-vel vizsgálva 10  $\mu$ M LPA serkentette a kontroll SKOV3 sejtek migrációját, de érdekes módon az LPP-1-gyel transzfektált SKOV3 sejtekben ez a hatás elmaradt. Ezek szerint az LPP-1 által okozott fokozott extracelluláris LPA-hidrolízis a sejt motilitás, proliferáció, kolóniaformálás és a túlélés változását eredményezi. A fenti adatok igazolják hipotézisünket, miszerint az ováriumkarcinómában lecsökkent LPP-1-szint és -aktivitás, a proliferáció, túlélés és metasztatikus kaskád megnövelésével, befolyásolja a tumor patofiziológiáját. Ehhez kapcsolódik saját és más szerzők által is leírt megállapítás, miszerint az LPA megnövelte a tumorinvázióban és metasztázisban részt vevő proteázok szintjét és aktivitását [17, 24, 43, 46]. A bystander hatás alapján, mind az LPP-1 és LPP-3 fokozott expressziója csökkentette az extracelluláris LPA-szintet, így az emelkedett LPP-1-aktivitású ováriumkarcinóma-sejtpopuláció pozitívan befolyásolja a környezetében levő nem transzfektált tumorsejteket is [36, 37]. Ez az adat hasznosítható lehet génterápiás megoldásoknál, hiszen a bevezetett LPP-1 és LPP-3 a nem transzfektált tumorsejtek halálát is okozhatja.

Az LPP-enzimek által okozott proliferáció és apoptóziscsökkenés *in vitro* hasonlóan megnyilvánult a tumorsejtek megtapadásának és növekedésének jelentős csökkenésében *in vivo*. SKOV3 sejtek szubkután befecskendezése után a kísérleti egerek 90%-ában alakult ki daganat, míg az LPP-3-mal dúsított SKOV3 sejtek befecskendezése után ez az arány 40%-ra csökkent [37]. A megtapadt daganatok növekedési rátája ugyanilyen különbséget mutatott az LPP-3 transzfektált és eredeti sejtek között: a SKOV3 sejtekből eredő tumorok mérete 4-szerese volt az LPP-3-mal dúsított SKOV3 sejtekből kialakult daganatok méretének. A peritoneumba fecskendezett daganatok esetében az LPP-3-aktív minta a kísérleti állatok mindössze 20%-ában tapadt meg, míg az eredeti sejtek minden esetben tumor kialakulásához vezettek. A haskőrfogat mérésével megállapítottuk, hogy a tumor növekedését az LPP-3 ugyanilyen arányban befolyásolta a kísérlet korai fázisában. Később azonban az LPP-3-mal dúsított tumorsejtek növekedése újra felgyorsult. RT-PCR alkalmazásával kimutattuk, hogy *in*

*vivo* a SKOV3 sejtek a transzfektált LPP-3 expresszióját elveszítik. Valószínű, hogy az ováriumkarcinómákban *in vivo* rendkívül erős negatív szelekciós hatás érvényesül az LPP-3-expresszióval szemben. Guo és mtsai hasonló eredményre jutottak, amikor LPA-t nem termelő prosztatatumorsejtekbe stabilan transzfektáltak LPA termeléséért felelős gént. A stabilan transzfektált sejtek fokozott intraperitonealis megtapadást és növekedést értek el a nem transzfektált, eredeti sejtekkel összehasonlítva [47].

Az LPA metabolizmusrendszere ováriumkarcinómákban még számtalan további területet kínál kivizsgálásra. Az ATX/LysoPLD is rendkívül értékes terápiás célpont lehet. Az RNSi hatása az ATX/LysoPLD-re negatív irányban befolyásolhatja a sejtproliferációt és túlélést. Ováriumkarcinómára specifikus aktivitással (például telomeráz) rendelkező adenovírusvektorok sorozata van már kifejlesztve terápiás célokkal. Több szerző vizsgált LPA-receptor-szelektív agonista és antagonistá molekulákat, de valóban effektív terápiát még senki nem fejlesztett ki.

Végezetül, ezek a vizsgálatok arra utalnak, hogy ennek az autokrin LPA-rendszernek kritikus szerepe van az ováriumkarcinóma-sejtek proliferációjában, motilitásában és életképességében *in vivo*. Ugyanakkor ez az autokrin LPA-rendszer potenciális célpont az ovárium és esetleg más karcinómák elleni terápia kifejlesztésében.

## Irodalom

- [1] Penson, R. T., Shannon, N. E., Seiden, M. V.: Ovarian cancer: an update of genetics and therapy. *Compr. Ther.*, 1998, 24, 477–487.
- [2] Gray, J. W., Suzuki, S., Kuo, W. L. és mtsai: Genome copy number abnormalities in ovarian cancer. *Gynecological Oncology Supplement (Suppl)*, 2003, 88, S16–S21.
- [3] Suzuki, S., Moore, D. H., Ginzinger, D. G. és mtsai: An approach to analysis of large-scale correlations between genome changes and clinical endpoints in ovarian cancer. *Cancer Res.*, 2000, 60, 5382–5385.
- [4] Tanyi, J., Tory, K., Amo-Takyi, B. és mtsai: Frequent loss of chromosome 12 in human epithelial ovarian tumors: A chromosomal in situ hybridization study. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 1998, 17, 106–112.
- [5] Tanyi, J., Rigó, J. Jr., Csapó, Z. és mtsai: Trisomy 12 in juvenile granulosa cell tumor of ovary during pregnancy: a report of two cases. *J. Reprod. Med.*, 1999, 44, 826–832.
- [6] Tanyi, J., Pály, A., Rigó J. Jr. és mtsai: The mutation analysis of beta-catenin gene in epithelial carcinomas of the ovary. *Orv. Hetil.*, 2000, 141, 1115–1119.
- [7] Eder, A. M., Sasagawa, T., Mao, M. és mtsai: Constitutive and lysophosphatidic acid (LPA)-induced LPA production: role of phospholipase D and phospholipase A2. *Clin. Cancer Res.*, 2000, 6, 2482–2491.
- [8] Mills, G. B., May, C., McGill, M. és mtsai: A putative new growth factor in Ascetic fluid from ovarian cancer patients: Identification, characterization and mechanism of action. *Cancer Res.*, 1988, 48, 1066–1071.



- [9] Van Corven, E. J., Van Rijswijk, A., Jalink, K. és mtsai: Mitogenic action of lysophosphatidic acid and phosphatidic acid on fibroblasts. *Biochem. J.*, 1992, 281, 163–169.
- [10] Fang, X., Gaudette, D., Furui, T. és mtsai: Lysophospholipid growth factor in the initiation, progression, metastases, and management of ovarian cancer. *Ann NY Acad. Sci.*, 2000, 905, 188–208.
- [11] Mills, G. B., Moolenaar, W. H.: The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat. Rev.*, 2003, 3, 582–591.
- [12] Xiao, Y. J., Schwartz, B., Washington, M. és mtsai: Electrospray ionization mass spectrometry analysis of lysophospholipids in human ascitic fluids: comparison of the lysophospholipid contents in malignant vs. nonmalignant ascitic fluids. *Anal. Biochem.*, 2001, 290, 302–313.
- [13] Xu, Y., Gaudette, D., Boynton, J. D. és mtsai: Characterization of an ovarian cancer activating factor (OCAF) in ascites from ovarian cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 1995, 1, 1223–1232.
- [14] Moolenaar, W., Jalink, K., Van Corven, E.: Lysophosphatidic acid: A bioactive phospholipids with growth factor-like properties. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 1992, 119, 7–65.
- [15] Xu, Y., Shen, Z., Wiper, D. W.: Lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic cancer. *JAMA*, 1998, 280, 719–723.
- [16] Nakano, T., Raines, E. W., Abraham, J. A.: Lysophosphatidylcholine upregulates the level of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA in human monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 1069–1073.
- [17] Pustilnik, T. B., Esterella, V., Wiener, J. és mtsai: Lysophosphatidic acid induces urokinase secretion in ovarian cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 1999, 5, 3704–3710.
- [18] Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C. és mtsai: Endophilin I mediate synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature*, 1999, 401, 133–141.
- [19] Umezū-Goto, M., Tanyi, J. L., Lahad, J. és mtsai: Lysophosphatidic acid production and action: Validated targets in cancer. *J. Cell. Biochem.*, 2004, 92, 1115–1140.
- [20] Goetzl, E. J., An, S.: Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factor lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J.*, 1998, 12, 1589–1598.
- [21] Sano, T., Baker, D., Virág, T. és mtsai: Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 21197–21206.
- [22] Aoki, J., Taira, A., Takanezawa, Y. és mtsai: Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 48737–48744.
- [23] Umezū-Goto, M., Kishi, Y., Taira, A. és mtsai: Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J. Cell Biol.*, 2002, 158, 227–233.
- [24] Tanyi, J. L., Crotzer, D., Wolf, J. és mtsai: Functional lipidomics: lysophosphatidic acid as a target for molecular diagnosis and therapy of ovarian cancer. *Functional Lipidomics*. CRC Press/Taylor & Francis, New York, 2006, 101–123.
- [25] Hu, Y. L., Tee, M. K., Goetzl, E. J. és mtsai: Lysophosphatidic acid induction of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001, 93, 762–768.
- [26] Brindley, D., Waggoner, D.: Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 24281–24284.
- [27] Kai, M., Wada, I., Imai, S. és mtsai: Identification and cDNA cloning of 35 KDa phosphatidic acid phosphatase (type 2) bound to plasma membranes. Polymerase chain reaction amplification of mouse H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-inducible hic53 clone yielded the cDNA encoding phosphatidic acid phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 18931–18938.
- [28] Kai, M., Wada, I., Imai, S. és mtsai: Cloning and characterization of two human isozymes of Mg<sup>2+</sup>-independent phosphatidic acid phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 24572–24578.
- [29] Alderton, F., Darroch, P., Sambhi, B. és mtsai: G protein-coupled receptor stimulation of the p42/p44 mitogen-activated protein kinase pathway is attenuated by lipid phosphate phosphatases 1, 1a and 2 in human embryonic kidney 293 cells. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 13452–13460.
- [30] An, S., Dickens, M. A., Bleu, T. és mtsai: Molecular cloning of human Edg 2 protein and its identification as a functional cellular receptor for lysophosphatidic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 231, 619–622.
- [31] An, S., Goetzl, E. J., Lee, H.: Signaling mechanisms and molecular characteristics of G protein-coupled receptors for lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *J. Cell Biochem.*, 1998, 30/31, 147–157.
- [32] Bando, K., Aoki, J., Hosono, H. és mtsai: Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, Edg-7, for lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 27776–27785.
- [33] Xu, Y., Xiao, Y. J., Zhu, K. és mtsai: Unfolding the pathophysiological role of bioactive lysophospholipids. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.*, 2003, 3, 23–32.
- [34] Fang, X., Yu, S., Bast, R. C. és mtsai: Mechanisms of lysophosphatidic acid-induced cytokine production in ovarian cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 9653–9661.
- [35] Luquain, C., Singh, A., Wang, L. és mtsai: Role of phospholipase D in agonist-stimulated lysophosphatidic acid synthesis by ovarian cancer cells. *J. Lipid. Res.*, 2003, 44, 1963–1975.
- [36] Tanyi, J. L., Hasegawa, J., LaPushin, R. és mtsai: Role of decreased level of LPP-1 in accumulation of lysophosphatidic acid (LPA) in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2003, 9, 3534–3545.
- [37] Tanyi, J. L., Morris, A. J., Wolf, J. K. és mtsai: The human lipid phosphate phosphatase-3 decreases the growth, survival and tumorigenesis of ovarian cancer cells: validation of the lysophosphatidic acid signaling cascade as a target for therapy in ovarian cancer. *Cancer Res.*, 2003, 63, 1073–1082.
- [38] Hasegawa, Y., Erickson, J. R., Goddard, G. J. és mtsai: Identification of phosphothionate analogue of lysophosphatidic acid (LPA) as a selective agonist of the LPA3 receptor. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 11962–11969.
- [39] Kim, E. K., Yun, S. J., Do, K. H. és mtsai: Lysophosphatidic acid induces cell migration through the selective activation of Akt1. *Exp. Mol. Med.*, 2008, 40, 445–452.
- [40] Hasegawa, Z., Murph, M., Zu, S. és mtsai: Lysophosphatidic acid (LPA)-induced vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates lamellipodia formation to initiate motility in PC-3 prostate cancer cells. *Mol. Oncol.*, 2008, 2, 54–69.
- [41] Tokumura, A., Majima, E., Kariya, Y. és mtsai: Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 39436–39442.
- [42] Saunders, L. P., Ouellette, A., Bandle, R. és mtsai: Identification of small molecule inhibitors of autotoxin that inhibit melanoma cell migration and invasion. *Mol. Cancer Ther.*, 2008, 10, 3352–3362.
- [43] Mills, G. B., Eder, A., Fang, X. és mtsai: Critical role of lysophospholipids in the pathophysiology, diagnosis and management of ovarian cancer. *Cancer Treat. Res.*, 2002, 107, 259–283.
- [44] Van Leeuwen, F. N., Giépman, B. N., van Meeteren, L. A. és mtsai: Lysophosphatidic acid: mitogen and motility factor. *Biochem. Soc. Trans.*, 2003, 31, 1209–1212.

- [45] *Stable, M., Veit, C., Bachfischer, U. és mtsai*: Mechanisms in LPA-induced tumor cell migration: critical role of phosphorylated ERK. *J. Cell Sci.*, 2003, *116*, 3835–3846.
- [46] *Fishman, D. A., Liu, Y., Ellerbroek, S. M. és mtsai*: Lysophosphatidic acid promotes matrix metalloproteinase (MMP) activation and MMP-dependent invasion in ovarian cancer cells. *Cancer Res.*, 2001, *61*, 3194–3199.
- [47] *Gou, R., Kaszobm, E. A., Arora, P. és mtsai*: Expression and function of lysophosphatidic acid LPA1 receptor in prostate cancer cells. *Endocrinology*, 2006, *147*, 4883–4892.

(Rigó János dr.,  
 Budapest, Baross u. 27., 1088  
 e-mail: rigo@noi1.sote.hu)

Dear Colleague,  
 We are pleased to let you know the latest information about  
**1st Congress of Fatty Liver and Metabolic Syndrome**  
**12–14 November, 2009**  
**Budapest, Hungary Ramada Resort Hotel**

*Preliminary programme*

Details and title of presentations are announced on  
[www.fattyliver.hu](http://www.fattyliver.hu)

**12 November 2009**

ORAL LECTURE SECTION I.

9.00–13.00 Molecular biology of lipid accumulation  
 in the liver I.

14.00–15.30 Molecular biology of lipid accumulation  
 in the liver II.

16.00–18.00 Free papers

ORAL LECTURE SECTION II. Free papers

POSTER SECTION Free papers

**13 November 2009**

ORAL LECTURE SECTION I.

9.00–11.00 Pathology – pathophysiology

11.00–12.30 Round table conference: Metadoxin in fatty  
 liver

14.00–15.30 Clinical forms (fatty liver, NASH, HCC)

16.00–17.30 Free papers

ORAL LECTURE SECTION II. Free papers

POSTER SECTION Free papers

**14 November 2009**

ORAL LECTURE SECTION I.

9.00–10.00 Fatty liver and viral (HBV, HCV) infection

10.00–11.00 Therapeutic modalities

11.30–13.00 Free papers

14.00–16.00 Free papers

ORAL LECTURE SECTION II. Free papers

POSTER SECTION Free papers

*Register and submit your abstract* on the conference  
 webpage: [fattyliver.hu](http://fattyliver.hu).

On behalf of the Organizing Committee,

**Prof. János Fehér MD, DSc.**

Chairman  
 2<sup>nd</sup> Dept. of Medicine  
 Semmelweis University  
 E-mail: [feher@bel2.sote.hu](mailto:feher@bel2.sote.hu)  
 Szentkirályi str. 46.  
 H-1088 Budapest  
 Hungary  
 Phone/Fax: +36 (1) 317-4548

**Ms. Edina Barabás**

Conference Secretary  
 Akadémiai Kiadó Zrt.  
 Scientific, Technical and Medical BC  
 E-mail: [barabas.edina@akkr.hu](mailto:barabas.edina@akkr.hu)  
 Prielle K. str. 19.  
 H-1117 Budapest  
 Hungary  
 Phone: +36 (1) 464-8213  
 Fax: +36 (1) 464-8221