
4.2 Zusammenfassung

Die Rolle und Funktion der Phospholipase D in Zell-Proliferation, Differenzierung und Apoptose ist bislang nur wenig verstanden. In dieser Arbeit beschreibe ich die Regulation der Phospholipase D in einigen Aspekten dieser zellulärer Prozesse und eine mögliche therapeutische Intervention in einen dieser Signalwege.

Die Rolle der Tyrosinphosphorylierung in der Regulation der Phospholipase D1 wurde mittels eines Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitors untersucht. Die induzierte Akkumulation an tyrosinphosphorylierten Proteinen wurde von einer gesteigerten *in vitro* Phospholipase D-Aktivität begleitet. In Immunpräzipitationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Phospholipase D1 in HaCaT Keratinozyten im Gegensatz zu HL60 Zellen nicht direkt tyrosinphosphoryliert wird. Beide Effekte konnten durch einen Tyrosin-Kinase-Inhibitor aufgehoben werden. Der Ras/Raf/Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Signalweg ist hierbei nicht beteiligt, wie mit Ras-überexprimierenden HaCaT Keratinozyten gezeigt werden konnte. Phospholipase D1 wird indirekt über Tyrosinphosphorylierung reguliert.

Phospholipase D1 wird in der Ceramid-induzierten Apoptose transkriptionell reguliert. Verschiedene Differenzierungs-assoziierte Gene wie auch Phospholipase D1 werden herunterreguliert während Untereinheiten des Transkriptionsfaktors AP-1 verstärkt exprimiert werden. AP-1 ist an der Expression von differenzierungsassoziierten Genen beteiligt. Die hier präsentierten Daten deuten aber darauf hin, dass die gebildeten Untereinheiten an der Bildung eines Repressors beteiligt sind. Die Expression der Phospholipase D2 verändert sich dagegen nicht.

Im weiteren konnte ich zeigen, dass Zelllinien vom malignen Melanom eine erhöhte Phospholipase D1-Aktivität im Vergleich zu primären Melanozyten besitzen. Während die mRNA-Expression nicht verändert ist, ist die Protein-Menge geringer. Zusätzlich ist die Aktivierbarkeit der Phospholipase D1 mit Phorbolestern in Melanozyten im Gegensatz zu Melanomzellen kaum nachweisbar, obwohl die Expression der Protein-Kinase C α sich nicht unterscheidet. Möglicherweise fehlt ein inhibitorischer Faktor dieser Interaktion.

Die Reorganisation des Zytoskeletts ist ein wichtiger Prozess in der Metastasierung. Phosphatidsäure und die Phospholipase D1-regulierenden monomeren G-Proteine der Rho-Familie sind an diesem Vorgang beteiligt. Pamidronat wirkt auf Rho-Proteine durch Verringerung seiner Membranassoziation. In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass Pamidronat in Melanomzellen Apoptose auslösen kann. Die Zugabe von Farnesol oder Geranylgeraniol verringert die Pamidronat-induzierte Apoptose, wobei Geranylgeraniol einen stärkeren

Inhibitor darstellt. Daraus lässt sich ableiten, dass die verminderte Geranylgeranylierung der wichtigere Schritt in der Pamidronat-induzierten Apoptose ist. Eine der Zelllinien, Mel2A, ist jedoch resistent gegen Pamidronat und zeigt keine verminderte Proliferation und keine Apoptose. Diese Resistenz ist nicht durch ein verändertes Bax/Bcl-2 Ratio verursacht wie mit Bcl-2 überexprimierenden A375 Melanomzellen gezeigt wurde. Die Expression der mRNA von RhoB zeigt keinen starken Unterschied zwischen Melanomzellen und Melanocyten. RhoA und RhoC dagegen sind in Melanomzellen stärker exprimiert, was RhoA und RhoC als mögliche therapeutische Ziele unterstreicht. Während der zytosolische Gehalt an RhoA bei allen vier Melanomzelllinien nach Pamidronat-Behandlung ansteigt, ist in Membranfraktionen die Menge an RhoA nicht verändert. Möglicherweise wirkt eine erhöhte Expression des RhoA-Proteins der verminderten Geranylgeranylierung entgegen. Ob das metastatische Potential durch Pamidronat beeinflusst wird muss im Weiteren noch untersucht werden.