

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie  
des Fachbereiches Humanmedizin  
Universitätsklinikum Benjamin Franklin  
der Freien Universität Berlin  
(Leiter: Prof. Dr. Prof. h.c. C.E. Orfanos)  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. C.C. Geilen

# **Mechanisms of Regulation of Phospholipase D Isoforms - Involvement in Differentiation and Apoptosis**

**Inaugural-Dissertation**  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Christian Riebeling**  
aus Gütersloh

Berlin 2001

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christoph C. Geilen

2. Gutachter: Prof. Dr. Werner Reutter

Tag der Disputation: 25 Juni 2001

---

## Contents

	page
<b>1. Introduction</b> .....	1
1.1 Phospholipids in cellular signalling .....	1
1.2 Mechanisms of regulation of phosphatidylcholine-specific phospholipase D .....	3
1.3 Biochemistry of phosphatidylcholine-specific phospholipase D .....	14
1.3.1 Catalysis .....	14
1.3.2 Structure .....	16
1.4 Cellular functions of phosphatidylcholine-specific phospholipase D .....	18
1.4.1 Phosphatidic acid-derived diacylglycerol .....	19
1.4.2 Protein targets of phosphatidic acid .....	20
1.4.3 Vesicle transport .....	20
1.4.4 Stress fibre formation .....	21
1.5 Scope of this thesis .....	23
<b>2. Results</b> .....	24
2.1 Tyrosine phosphorylation of phospholipase D1 .....	24
2.2 Expression of phospholipase D and differentiation-associated genes in ceramide induced apoptosis in HaCaT keratinocytes .....	27
2.3 Expression of phospholipase D and its stimulatory proteins in melanoma cells and primary cultured melanocytes .....	30
2.4 Effect of phorbol ester and guanosine-5'- <i>O</i> -(3-thiotriphosphate) on phospholipase D in melanoma cells .....	32
2.5 Effect of oleate on phospholipase D in melanoma cells .....	36
2.6 Effect of pamidronate on melanoma cells .....	37
<b>3. Discussion</b> .....	46
3.1 Effect of tyrosine phosphorylation on phospholipase D1 .....	46
3.2 Expression of phospholipase D in ceramide-induced apoptosis .....	48
3.3 Regulation of phospholipase D in melanoma cells and melanocytes .....	50
3.4 Action of pamidronate on melanoma cells .....	52

---

<b>4.1 Summary</b>	55
<b>4.2 Zusammenfassung</b>	57
<b>5. Materials</b>	59
5.1 Reagents	59
5.2 Cell culture materials	60
5.3 Cell lines	60
5.4 Antibodies	61
5.5 Equipment	62
5.6 Primer	64
<b>6. Methods</b>	65
6.1 Cell culture	65
6.1.1 Growth media and solutions	65
6.1.2 Cultivation of cells	66
6.1.3 Freezing and thawing of cells	66
6.2 Lipid chemistry	67
6.2.1 Preparation of substrate vesicles for the in vitro phospholipase D assay	67
6.2.2 Identification and quantification of radioactively labelled lipids	67
6.3 Enzyme reactions	68
6.3.1 Assay of phospholipase D1 activity	68
6.4 Protein chemistry	69
6.4.1 Preparation of cell lysates and subcellular fractionation	69
6.4.2 Determination of protein concentration	69
6.4.3 Discontinuous sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis	70
6.5 Immunochemistry	73
6.5.1 Purification of antibodies	73
6.5.1.1 Preparation of affinity columns	73
6.5.1.2 Affinity chromatography	74
6.5.2 Denaturing immunoprecipitation	75
6.5.3 Western blotting	76

---

6.5.4	Immunodetection of blotted proteins	77
6.5.5	Immunohistochemical detection using alkaline phosphatase anti alkaline phosphatase antibody (APAAP) complexes	79
6.6	Molecular biology	81
6.6.1	Isolation of total RNA	81
6.6.2	Determination of nucleic acid concentration	82
6.6.3	Synthesis of complementary DNA	82
6.6.4	Polymerase chain reaction	83
6.6.5	Agarose gel electrophoresis	84
6.7	Cell biology	85
6.7.1	Preparation of pervanadate	85
6.7.2	Measurement of proliferation	85
6.7.3	Determination of cytotoxicity	86
6.7.4	Detection of apoptosis	87
<b>7.</b>	<b>References</b>	<b>89</b>
<b>8.</b>	<b>List of publications</b>	<b>108</b>
8.1	Original publications	108
8.2	Short publications	108
8.3	Manuscripts	110
	Curriculum vitae	I
	Acknowledgements	II

---

## 4.1 Summary

The role and function of phospholipase D in cellular proliferation, differentiation and apoptosis is still not understood. Here, I describe the regulation of phospholipase D in some aspects of these cellular processes and the possible therapeutic intervention in one of these pathways.

The role of tyrosine phosphorylation in regulation of phospholipase D1 was investigated using a protein tyrosine phosphatase inhibitor. The induced accumulation of tyrosine phosphorylated proteins was accompanied by increased phospholipase D1 activity *in vitro*. Immunoprecipitation demonstrated that phospholipase D1 is not directly tyrosine phosphorylated in HaCaT keratinocytes in contrast to HL60 cells. These effects can be abolished using a protein tyrosine kinase inhibitor. As shown by Ras overexpressing HaCaT keratinocytes, the Ras/Raf/mitogen activated protein kinase pathway is not involved. This shows that tyrosine phosphorylation is a pathway indirectly regulating phospholipase D1.

Transcriptional regulation of phospholipase D in ceramide-induced apoptosis affects phospholipase D1. I could show that several differentiation-associated genes including phospholipase D1 are downregulated whereas members of the AP-1 transcription factor are upregulated. AP-1 is involved in the expression of differentiation-associated genes but the data presented suggest that the subunits which are upregulated in apoptosis form a repressor. In contrast, levels of phospholipase D2 mRNA are unchanged.

Moreover, I demonstrate that malignant melanoma exhibits augmented phospholipase D1 activity in comparison to primary cultured melanocytes. This increase is attained through enhanced protein expression in degenerated cells. In addition, although protein kinase C $\alpha$  expression is not altered, activation of phospholipase D1 by phorbol ester is marginal in melanocytes in contrast to melanoma cells suggesting loss of an inhibitory factor of this interaction.

Cytoskeletal reorganisation is important for metastasis, and phosphatidic acid and the phospholipase D1 regulating Rho family proteins are involved in this process. Pamidronate interferes with Rho action via altering its membrane association. Here, I can show that pamidronate strongly induces apoptosis in melanoma cells. Addition of farnesol or geranylgeraniol reduces apoptosis by pamidronate with geranylgeraniol being a stronger inhibitor. This suggests geranylgeranylation being the more important step in pamidronate-induced apoptosis. However, one of the cell lines tested, Mel2A, is resistant against pamidronate

mediated inhibition of proliferation and induction of apoptosis. This resistance is not achieved by alteration of the bax/bcl-2 ratio as was shown by bcl-2 overexpressing A375 cells. The levels of RhoB mRNA expression show no significant difference between melanoma cells and melanocytes. RhoA and RhoC in contrast are elevated in melanoma cells underscoring them as possible therapeutic targets. Although cytosolic RhoA levels are increased in all four melanoma cell lines after pamidronate treatment, levels of membrane-bound RhoA are not or only slightly altered. This suggests that decreased geranylgeranylation is counteracted by increased expression of Rho proteins. It remains to be investigated if the metastatic potential of these cells is nevertheless decreased.

---

## 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 $\alpha$  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.

---

## Curriculum Vitae

Name: Christian Riebeling  
Date of Birth: September 9th, 1971  
Place of Birth: Gütersloh, Germany  
Nationality: German  
Parents: Hans Georg Riebeling  
Barbara Riebeling, née Kriele

### *School Education*

1978 - 1979 Primary school, Steinheim, Wstfl.  
1979 - 1982 Primary school, Vlotho  
1982 - 1991 Secondary school, Wesergymnasium Vlotho  
June 12th, 1991 School-leaving examination, Wesergymnasium Vlotho

### *University Education*

1992 - 1998 Study of biochemistry, The Free University of Berlin  
January 1st, 1998 Diploma in biochemistry  
since Mai 1998 Ph.D. thesis in the group of Prof. C.C. Geilen  
University Medical Center Benjamin Franklin  
The Free University of Berlin