

1 Zusammenfassungen

1.1 Zusammenfassung

Das maligne Melanom zeichnet sich durch eine sehr hohe Chemotherapie-Resistenz aus, deren Mechanismen bislang nicht näher aufgeklärt werden konnten. Neben der Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2, sind mittlerweile auch Enzyme des Lipidstoffwechsels beschrieben, die eine Resistenz bei Krebszellen auslösen können. Lavie *et al.* (1996), konnten erstmals zeigen, daß die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase mit der Adriamycin-Resistenz von MCF-7^{Adr}-Brustkrebszellen zusammenhängt (Lucci *et al.*, 1998). Für das maligne Melanom liegen bislang keine Daten über diesen Resistenz-Mechanismus und über die Glukosylceramid-Synthase vor.

Ich habe in meiner Arbeit die Glukosylceramid-Synthase in Melanomzellen charakterisiert und ihre Expression und *In-vitro*-Aktivität mit primären humanen Melanozyten verglichen. Zusätzlich wurde noch der Einfluß der Überexpression des Enzyms auf das Apoptoseverhalten der humanen Melanomzelllinie Bro untersucht.

Die Charakterisierung der Glukosylceramid-Synthase hat gezeigt, daß es sich in der humanen Melanomzelllinie Mel-HO um ein Membranprotein handelt, dessen Aktivität durch die Menge an Protein und die Konzentration der eingesetzten Substrate beeinflusst werden kann. Zusätzlich, spielt auch die chemische Struktur des Ceramids eine Rolle. Der Vergleich von vier unterschiedlichen Ceramid-Analoga mit natürlichem Ceramid hat gezeigt, daß neben dem natürlichen Ceramid nur *N*-Octanoylsphingosin als Substrat geeignet ist. Das kurzkettige Analogon *N*-Acetylsphingosin, sowie die beiden Dihydro-Analoga *N*-Acetylsphinganin und *N*-Octanoylsphinganin, zeigten keinen *In-vitro*-Umsatz. Ein Einfluß von Nukleotiden, als Inhibitoren von Nukleotid-Pyrophosphatasen, die Nukleotid-haltige Zucker spalten, konnte im Gegensatz zu publizierten Daten nicht festgestellt werden (Shayman and Abe, 2000).

Für die Untersuchungen der Proteinexpression in Melanomzellen und Melanozyten wurde ein peptidspezifischer Antikörper hergestellt und durch einen Sandwich-ELISA die Bindungsspezifität getestet. Mit Hilfe dieses Antikörpers habe ich zeigen können, daß die Glukosylceramid-Synthase in primären humanen Melanozyten und Melanomzellen unterschiedlich reguliert wird. Im Gegensatz zur Genexpression, die keinen Unterschied zwischen den benignen und den malignen Zellen gezeigt hat, konnte

ich bei der Untersuchung der Proteinexpression und der *In-vitro*-Aktivität zeigen, daß Melanomzellen eine stärkere Expression und daraus resultierend auch eine stärkere Aktivität der Glukosylceramid-Synthase haben. Die höhere Aktivität der Glukosylceramid-Synthase in der Melanomzellen führt jedoch nicht zu einem Anstieg im Glukosylceramid-Pool. Glukosylceramid wird weiter zu den komplexeren Glykosphingolipiden Laktosylceramid und dem Gangliosid GM3 umgesetzt.

Einer der am besten beschriebenen Mechanismen der Apoptose-Resistenz ist die Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie in einem Tumor. Dieser Mechanismus ist auch für die Apoptose-Resistenz von Melanomzellen von Bedeutung (Raisova *et al.*, 2001). Ein Zusammenhang zwischen der Überexpression des Bcl-2-Proteins und der Glukosylceramid-Synthase konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Um den Einfluß der Glukosylceramid-Synthase auf die Apoptose-Resistenz von Melanomzellen zu untersuchen, habe ich das Enzym in Bro-Melanomzellen stabil überexprimiert und anschließend die Apoptoserate der Zellen nach Ceramid-Behandlung gemessen. Dabei konnte ich keinen anti-apoptotischen Effekt nachweisen. Genauso wie in Mel-HO-Melanomzellen, wird auch hier das Glukosylceramid zu Laktosylceramid und dem Gangliosid GM3 weiter umgesetzt.

Zuletzt habe ich noch den Einfluß des Glukosylceramid-Synthase-Inhibitors *D,L-threo*-1-Phenyl-2-hexadecanoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol (PPPP) untersucht. Dabei konnte ich zeigen, daß PPPP das Wachstum von Mel-HO-Zellen konzentrationsabhängig hemmt. Die halb-inhibitorische Konzentration für die *In-vitro*-Aktivität des Enzyms betrug $1,41 \pm 0,06$ nM.

Ich habe in meiner Arbeit gezeigt, daß die Glukosylceramid-Synthase in primären humanen Melanozyten und Mel-HO-Melanomzellen unterschiedlich reguliert wird. Im Gegensatz zu veröffentlichten Daten über Brustkrebszellen, konnte ich keinen Einfluß der Glukosylceramid-Synthase auf die Chemotherapieresistenz des malignen Melanoms zeigen. Eine Anreicherung von Glukosylceramid konnte ich weder in Mel-HO-Melanomzellen noch in den Glukosylceramid-Synthase überexprimierenden MK12-Zellen nachweisen. Das Glukosylceramid wurde weiter zu Laktosylceramid und GM3 umgesetzt und führte daher nicht zu einem verändertem Glycosphingolipid-Muster. Möglicherweise ist für die Apoptose-Resistenz der Zellen das Verhältnis einzelner Glykosphingolipide wichtig, dieses wurde jedoch in den überexprimierenden Zellen nicht verändert.

1.2 Summary

One of the major problems in the therapy of malignant melanoma is the multi drug resistance of this skin tumor. Mechanisms leading to resistance are still not well understood. In the last few years it has been shown that in addition to anti apoptotic proteins like Bcl-2, also several lipids such as sphingomyelin and glycosphingolipids are also involved in the resistance (Ramu *et al.*, 1984; Hakomori, 1993). Lavie *et al.* (1996), showed that the activity of the glucosylceramide synthase is responsible for adriamycin resistance in MCF-7^{Adr} breast cancer cells. Up to now no Data about this mechanism and about glucosylceramide synthase are available in human malignant melanoma (Lucci *et al.*, 1998).

In the present study I characterized the glucosylceramid synthase in human melanoma cells and compared its expression and *in vitro* activity to primary human melanocytes. Furthermore, I stably overexpressed the enzyme in the human melanoma cell line Bro and examined the anti-apoptotic influence of this overexpression.

Cell fractionation studies of glucosylceramide synthase showed that the enzyme was found in a membrane fraction. *In vitro* activity depends on protein-, UDP-glucose- and ceramide-concentrations. Furthermore the structure of ceramides used is of great importance. I was able to show that only *N*-octanoylsphingosine and natural ceramide are suitable substrates. Short chain ceramide analogues like *N*-acetylsphingosine and dihydro-ceramide analogues are only poor substrates. An influence of different nucleotides serving as inhibitors of nucleotide pyrophosphatases which metabolize nucleotide sugars could in contrast to published results not be detected (Shayman and Abe, 2000).

To examine the protein expression in human primary melanocytes and human melanoma cells a peptide specific polyclonal antibody was generated and tested using an ELISA-technique. Using this antibody I was able to show that glucosylceramide synthase is differentially regulated in benign and malign cells. In contrast to RT-PCR studies of different melanocyte preparations and different Mel-HO melanoma cell populations which showed no differences in gene expression Western blot analysis showed higher protein expression in Mel-HO melanoma cells which correlates to the higher *in vitro* activity of glucosylceramide synthase in this cell line. Comparison studies on total cellular lipids between melanocytes and Mel-HO melanoma cells did

not show an accumulation of glucosylceramide in melanoma cells but a higher amount of more complex glycosphingolipids like lactosylceramide and GM3 ganglioside.

Recently it has been shown that one of the best known anti-apoptotic proteins is Bcl-2, might also be part of mechanisms leading to multi drug resistance of human melanoma cells (Raisova *et al.*, 2001). To examine a possible correlation between Bcl-2 mediated resistance and glucosylceramide-synthase, the *in vitro* activity of the enzyme was measured in Bcl-2 overexpressing cells, but no correlation could be detected.

To examine the effect of glucosylceramide synthase on the apoptotic behaviour of melanoma cells glucosylceramid synthase overexpressing cells (MK12) were generated. In contrast to published results in breast cancer cells I was not able to detect an anti-apoptotic effect of glucosylceramide in these cells. Correlating to the results of Mel-HO melanoma cells MK12 cells did also not show an accumulation of glucosylceramide but an increase of lactosylceramide and GM3.

Finally, I examined the influence of D,L-*threo*-1-phenyl-2-hexadecanoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol (PPPP) on Mel-HO melanoma cells. I was able to show that PPPP inhibits cell proliferation in a concentration dependent manner. The half inhibitory concentration for the *in vitro* activity of glucosylceramide synthase was 1.41 ± 0.06 nM.

I was able to show the different regulation of melanoma cells and primary human melanocytes in this study. In contrast to published results in breast cancer cells I was not able to detect a connection between glucosylceramide and apoptosis resistance. In contrast to the high *in vitro* enzyme activity an accumulation of glucosylceramide could not be detected neither in Mel-HO melanoma cells nor in glucosylceramid synthase overexpressing MK12 cells. It could be possible that the proportion of distinct glycosphingolipids is important for the apoptotic resistance of the cells but the proportion was not changed by overexpression of the glucosylceramide synthase.

