

Bedeutung von Sphingolipiden als Signalmoleküle in der Regulation des Haarzyklus

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines

Doktors der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie

der Freien Universität Berlin

von

Hartwig Kamp

aus Essen / Ruhr

Berlin 2003

Gutachter:

1. Herr Professor Dr. F. Hucho
2. Herr Professor Dr. Dr. C.C. Geilen

Tag der Disputation: 17. Dezember 2003

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Sphingolipide.....	7
1.1.1 Bedeutung der Sphingolipide.....	7
1.1.2 <i>De-novo</i> -Biosynthese von Sphingolipiden.....	9
1.1.3 Sphingolipide und Signaltransduktion.....	12
1.1.4 Apoptotische Prozesse.....	15
1.1.5 Die Gliederung der Apoptose.....	18
1.1.6 Die Rezeptor-vermittelte Apoptose.....	18
1.1.7 Caspasen.....	23
1.1.8 Die Bcl-2-Familie.....	25
1.1.9 Sphingosin-1-phosphat (SPP).....	26
1.1.10 Aktivierung der Sphingosin-Kinase.....	27
1.1.11 SPP als extrazellulärer Ligand.....	30
1.2 Die Biologie des Haarfollikels.....	34
1.2.1 Die Bedeutung des Haarfollikels.....	34
1.2.2 Der Aufbau des Haarfollikels.....	35
1.2.3 Der Haarschaft.....	37
1.2.4 Die Haarwurzel (Bulbus).....	38
1.2.5 Die Haarwurzelscheiden.....	38
1.2.6 Haarzyklus und Haarwachstum.....	39
1.2.7 Apoptose im Haarfollikel.....	43
2. Fragestellung und Zielsetzung	45
3. Material	46
3.1 Geräte.....	46
3.2 Verbrauchsmaterialien.....	47
3.3 Chemikalien.....	47
4. Methoden	50
4.1 Zellkultur-Methoden.....	50
4.1.1 HaCaT-Keratinocyten.....	50
4.1.2 Dermale Papillenzellen (DPC).....	50
4.1.3 Follikuläre Keratinocyten (FK).....	51
4.1.4 Kultivierung von Ganzfollikel-Kulturen (WOC).....	51
4.1.5 Zellzählung.....	51

4.1.6	Subkultivierung von Zellen.....	52
4.1.7	Hitze-Inaktivierung von FCS.....	52
4.1.8	Einfrieren von Zellen.....	52
4.1.9	Auftauen von Zellen.....	53
4.1.10	Medien für die Zellkultur.....	53
4.2	Proteinchemische Methoden.....	54
4.2.1	Proteinbestimmung.....	54
4.2.1.1	BCA-Methode.....	54
4.2.1.2	Bradford-Methode.....	55
4.2.2	Eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
4.2.3	Analytische SDS-PAGE.....	57
4.2.4	Western-Blot.....	58
4.2.5	Indirekte Immunfärbung.....	59
4.2.6	Entfernung von Antikörpern.....	60
4.2.7	Coomassie-Färbung.....	60
4.3	Immunhistochemische Methoden.....	61
4.3.1	Zytozentrifugation von Zellen.....	61
4.3.2	Herstellung von Gewebeschnitten.....	61
4.3.3	Fixierung von Gewebeschnitten und Zellen.....	61
4.3.4	Immunhistochemie (APAAP).....	61
4.3.5	Fotodokumentation von immunhistochemischen Färbungen.....	63
4.4	Molekularbiologische Methoden.....	64
4.4.1	Steriles Arbeiten.....	64
4.4.2	Isolation von Gesamt-RNA.....	64
4.4.3	Isolation von mRNA.....	65
4.4.4	Konzentrationsbestimmung von RNA.....	65
4.4.5	Fällung von Nukleinsäuren.....	65
4.4.6	Vorbereitung von RNA-Proben.....	66
4.4.7	Qualitätsüberprüfung von RNA.....	66
4.4.8	Agarose-Gelelektrophorese.....	67
4.4.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen.....	67
4.4.10	RT-PCR.....	67
4.4.11	Ligation.....	68
4.4.12	Kultivierung von <i>E. coli</i>	70

4.4.13	Transformation von Bakterien.....	70
4.4.14	Reinigung von Plasmid-DNA in kleinen Mengen (Minipräparation).....	70
4.4.15	PCR mit positiven Klonen.....	71
4.4.16	Restriktionsverdau der ligierten Fragmente.....	72
4.4.17	Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung.....	72
4.4.18	Herstellung des Sequenziergels.....	73
4.4.19	Vorlauf des Sequenziergels.....	73
4.4.20	Sequenzierung mit dem ABI-377.....	73
4.4.21	Expressions-Array.....	73
4.4.22	Strippen der Membranen.....	75
4.5	Lipidchemische Methoden.....	75
4.5.1	Lipid-Extraktion.....	75
4.5.2	Derivatisierung von SPP mit OPA und HPLC-Bestimmung.....	75
4.5.3	Sphingosin-Kinase-Bestimmung (SphK-Assay).....	78
4.6	Sonstige Methoden.....	79
4.6.1	Proliferations-Assay.....	79
4.6.2	Apoptose-Assay.....	80
4.6.3	Zytotoxizitäts-Assay.....	81
4.6.4	Aktivitätsmessung der Caspase 3.....	82
4.6.5	Statistische Auswertung.....	82
5.	Ergebnisse.....	83
5.1	Expression der PDGF-Rezeptoren α/β in dermalen Papillenzellen (DPC) und follikulären Keratinozyten (FK) auf Gen-Ebene.....	83
5.2	Klonierung und Sequenzierung der amplifizierten PDGFR-Fragmente.....	85
5.3	Expression der PDGF-Rezeptoren α/β in dermalen Papillenzellen (DPC) und follikulären Keratinozyten (FK) auf Protein-Ebene.....	87
5.4	Immunhistochemische Färbung der PDGF-Rezeptoren in dermalen Papillenzellen (DPC) und follikulären Keratinozyten (FK).....	89
5.5	Tyrosin-Phosphorylierung der PDGF-Rezeptoren in dermalen Papillenzellen (DPC) und follikulären Keratinozyten (FK).....	92
5.6	Expression von PDGF-A und -B in dermalen Papillenzellen (DPC) und follikulären Keratinozyten (FK) auf Gen-Ebene.....	94

5.7 Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine auf die Expression von PDGF-A und PDGF-B in dermalen Papillenzellen (DPC) und folliculären Keratinozyten (FK).....	96
5.8 Expression der Sphingosin-Kinase in dermalen Papillenzellen (DPC), folliculären Keratinozyten (FK) und HaCaT-Keratinozyten.....	99
5.9 Nachweis von Sphingosin-Kinase-Aktivität in dermalen Papillenzellen (DPC) und folliculären Keratinozyten (FK).....	100
5.10 Vergleich zwischen folliculären Keratinozyten (FK) und der Zelllinie HaCaT.....	101
5.11 Charakterisierung der SphK-Aktivität in Keratinozyten.....	101
5.11.1 Einsatz steigender Mengen Zytosol im SphK-Assay.....	101
5.11.2 Zeit-abhängige Produktion von SPP in Keratinozyten.....	102
5.11.3 Substrat-Spezifität der SphK-Aktivität in Keratinozyten.....	103
5.12 Bestimmung von SPP-Konzentrationen in folliculären Keratinozyten.....	107
5.13 PDGF-vermittelte Stimulation der Sphingosin-Kinase-Aktivität in dermalen Papillenzellen (DPC) und folliculären Keratinozyten (FK).....	108
5.14 Gen-Expressions-Profil von HaCaT nach Stimulation mit C ₈ -Ceramid und SPP.....	110
5.15 Gegenläufige Aktivierung der Caspase 3 in HaCaT durch C ₈ -Ceramid und SPP.....	114
6. Diskussion.....	116
7. Zusammenfassung.....	127
7.1 Summary.....	129
8. Anhang.....	131
8.1 Literaturverzeichnis.....	131
8.2 Abkürzungsverzeichnis.....	149
8.3 Curriculum Vitae.....	152
8.4 Publikationen.....	153
8.5 Danksagung.....	154