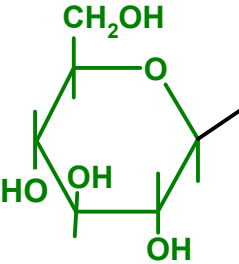
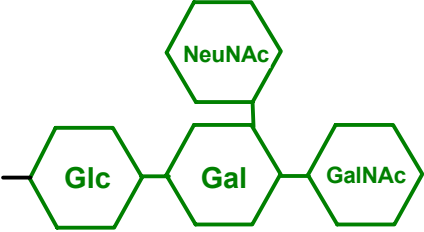




Name der Kopfgruppe	Struktur der Kopfgruppe	Resultierendes Sphingolipid
Phosphocholin	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ -\text{P}-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\   \\ \text{O} \end{array}$	Sphingomyelin
Glukose		Cerebrosid Glucosylceramid
komplexere* Oligosaccharide  (* Sialinsäure-haltig)		Gangliosid (GM <sub>2</sub> )

**Abb. 2: Die drei Unterklassen der Sphingolipide mit ihren jeweiligen Kopfgruppen (nach Lehninger, Nelson, Cox, 1994):** Fungiert Phosphocholin als Substituent X, so handelt es sich bei dem Sphingolipid um Sphingomyelin. Besteht der Substituent dagegen nur aus neutralen Zuckern, so liegt ein neutrales Glykosphingolipid vor. Die Ganglioside dagegen, die dritte Gruppe der Sphingolipide, besitzen komplexer aufgebaute Oligosaccharide als Substituenten, deren wesentlicher Bestandteil die Sialinsäure ist. Sie bilden auch zugleich die komplexeste und vielfältigste Gruppe der Sphingolipide.

### 1.1.2 *de-novo*-Biosynthese von Sphingolipiden

Im intrazellulären Konzentrationsspiegel der Ceramide spiegelt sich das Verhältnis ihrer Synthese und ihrer weiteren Verstoffwechslung zu anderen Sphingolipiden wider. Die *de-novo*-Synthese der Sphingolipide findet am Endoplasmatischen Retikulum (ER) statt und beginnt mit der durch die Serin-Palmitoyl-Transferase (SPT) katalysierten Kondensation von *L*-Serin mit Palmitoyl-CoA, wodurch 3-Ketosphinganin (3-Ketodihydrosphingosin) gebildet wird. Das gebildete 3-Ketosphinganin wird in der sich anschließenden Reaktion sofort durch die NAD(P)H-abhängige 3-Ketosphinganin-Reduktase zu Sphinganin (Dihydrosphingosin) reduziert. Untersuchungen bezüglich der Spezifität dieser Reduktase haben gezeigt, dass das Enzym ausschließlich für das *D*-Isomer des 3-Ketosphinganin spezifisch ist.

*N*-Acylierung der Amino-Gruppe von Sphinganin durch die Dihydroceramid-Synthase führt zum *D-erythro*-Dihydroceramid. Durch den Einbau einer *trans*-Doppelbindung zwischen den Kohlenstoff-Atomen C4 und C5 durch die Dihydroceramid-Desaturase entsteht aus dem Dihydroceramid schließlich Ceramid (Merrill und Wang, 1992; Michel und van Echten-Deckert, 1997).

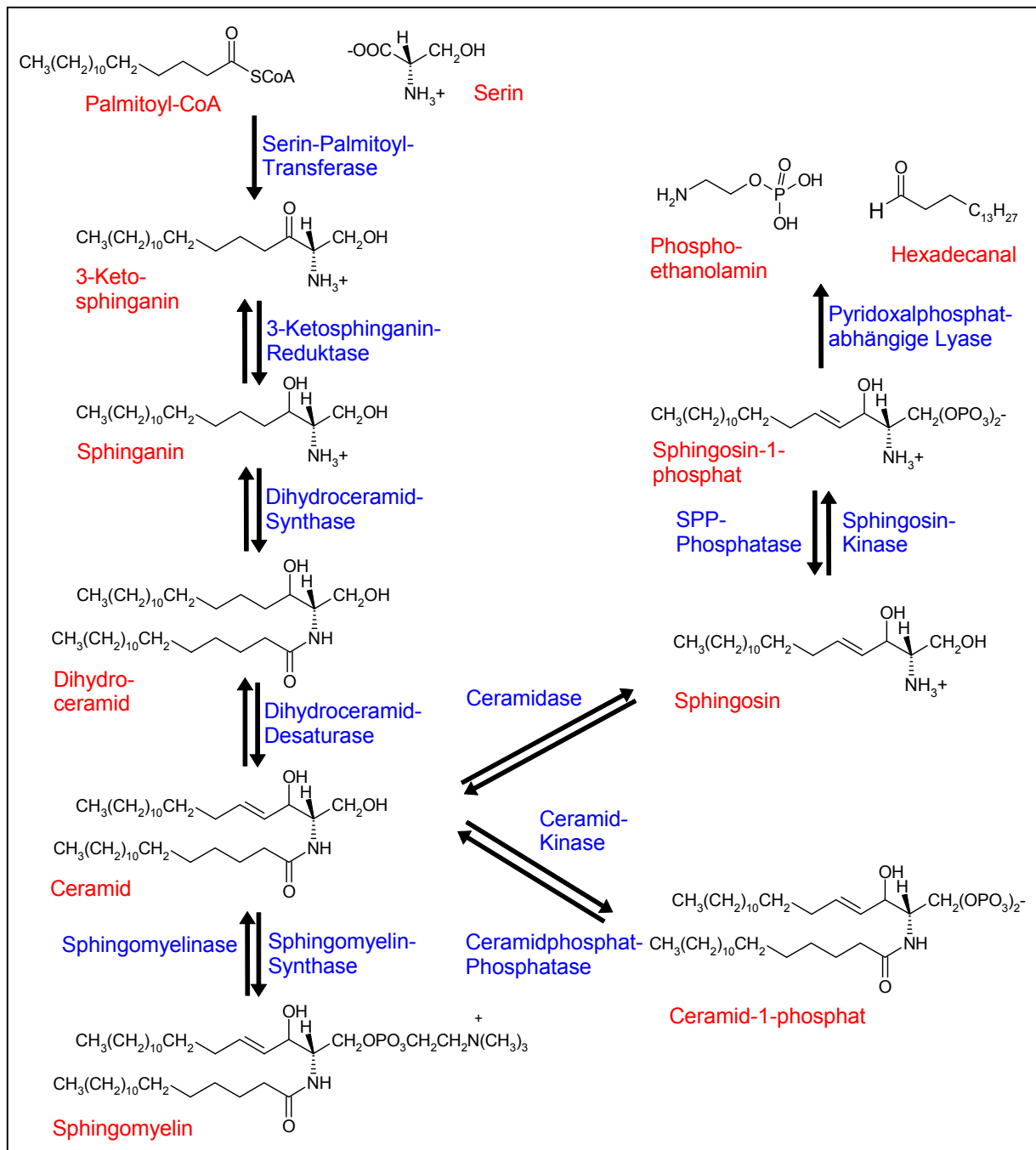
Die für die vier genannten ersten Umsetzungsreaktionen verantwortlichen Enzyme sind sämtlich auf der zytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert (Michel et al. 1997). Das Vorkommen von freiem Ceramid ist lediglich auf die *de-novo*-Biosynthese der Sphingolipide beschränkt; ebenso entsteht freies Sphingosin nicht durch *de-novo*-Synthese, sondern nur während katabolischer Prozesse des Ceramids durch Deacylierung (Maceyka et al., 2002).

Ceramid stellt das zentrale Molekül der Sphingolipid-Biosynthese dar und dient als Vorläufer für die Synthese weiterer komplexerer Sphingolipide. Die *de novo* synthetisierten Ceramide können durch Einbau von Zuckerresten im Golgi-Komplex zu Glykosphingolipiden metabolisiert werden, katalysiert durch die enzymatische Aktivität der Glucosylceramid-Synthase. Ebenso dient das Ceramid als direkte Vorstufe des Sphingomyelins, welches durch den Transfer einer Phosphocholingrouppe vom Phosphatidylcholin auf das Ceramid unter gleichzeitiger Freisetzung von Diacylglycerin entsteht. Diese Reaktion wird durch die Sphingomyelin-Synthase katalysiert. Der umgekehrte Weg, die Spaltung der Phosphodiesterbindung durch Sphingomyelinase-Aktivitäten und damit einhergehende Freisetzung von Phosphocholin und Ceramid, ist ebenso beschrieben worden und hat eine große physiologische Bedeutung für die Zelle. Durch Ceramidase-Aktivitäten lassen sich die Fettsäurereste der Ceramide abspalten, wodurch freie Fettsäuren und das entsprechende Sphingosin entstehen. Umgekehrt lässt sich durch Reacylierung von Sphingosin mit einer

Fettsäure das entsprechende Ceramid erhalten (Ogretmen et al., 2002). Sphingosin selbst kann auch durch Aktivität der Sphingosin-Kinase an der primären Hydroxyl-Gruppe zum Sphingosin-1-phosphat (SPP) phosphoryliert werden (siehe Kapitel 1.1.9). Die Aktivität einer Pyridoxalphosphat-abhängigen Lyase führt zur irreversiblen Spaltung von SPP in Phosphoethanolamin und Hexadecanal. SPP kann aber ebenso durch SPP-Phosphatase- und Ceramid-Synthase-Aktivitäten über das Sphingosin zurück zum Ceramid verstoffwechselt werden. Das Ceramid nimmt in dem dargestellten Syntheseweg der Sphingolipide insofern eine zentrale Position ein, da seine unmittelbare Beteiligung an zellulären Stress-Reaktionen gezeigt werden konnte (siehe Kapitel 1.1.3). Die Enzymaktivitäten Ceramidase, Sphingomyelin-Synthase und Glucosylceramid-Synthase und ihre jeweiligen Funktionen wurden bereits genannt. Zusätzlich dazu kann das Ceramid durch die Ceramid-Kinase zum Ceramid-1-phosphat umgesetzt werden. Charakteristisch für das Ceramid ist, dass sich fast alle strukturellen Umsetzungen, in denen Ceramid als Edukt fungiert, auf die Hydroxyl-Gruppe am C1-Atom beschränken. Lediglich die Ceramidase-Aktivität, die zu einer Spaltung des Ceramids in eine freie Fettsäure und Sphingosin führt, greift nicht am C1-Atom an (siehe Abb. 3).

Nahezu alle Reaktionen der in der Abbildung 3 schematisch dargestellten Synthesewege werden durch Membran-gebundene Enzyme katalysiert und sind umkehrbar. Eine gemeinsame Eigenschaft vieler Zwischenprodukte der Sphingolipid-Biosynthese ist ihre hohe biologische Wirksamkeit, wodurch eine stringente Kontrolle der Biosynthese für die Zelle unabdingbar ist. Eine gestörte Balance zugunsten eines bestimmten Sphingolipids kann über den weiteren Weg einer Zelle entscheiden. So entsteht durch Aktivität der Dihydroceramid-Desaturase aus dem biologisch unwirksamen Dihydroceramid (Hannun, 1996) das äußerst wirksame Ceramid, dessen Generierung bei Stress-Situationen in der Zelle bekannt und beschrieben ist (Geilen et al., 1997; Bektas et al., 1998). Aus diesem können im weiteren Verlauf durch Ceramidase- und Sphingosin-Kinase-Aktivität die ebenfalls biologisch hochwirksamen Intermediate Sphingosin und Sphingosin-1-phosphat (SPP) gebildet werden, für die beide, in einer Zelltyp-spezifischen Weise, eine mitogene und damit dem Ceramid entgegengesetzte Wirkung bewiesen wurde (Zhang et al., 1991; Olivera und Spiegel, 1993). Gerade in dem Einfluss von Ceramiden und Sphingosin-1-phosphat auf Zellen spiegelt sich eine der prägnantesten Eigenschaften der Sphingolipide wider. Stoffe, die sich strukturell sehr ähnlich sind und die sich durch wenige enzymatische Aktivitäten ineinander umwandeln lassen, können auf die Zellen gänzlich verschiedene Einflüsse ausüben. So kann sich durch Konversion von Ceramid in Sphingosin-1-phosphat der Status einer Zelle von einem

apoptotischen in einen proliferativen ändern. Das Ausmaß der Synthese von Ceramiden und Sphingosin-1-phosphat scheint somit maßgeblichen Einfluss auf den weiteren Weg einer Zelle zu besitzen. Die geschilderten mannigfaltigen Synthesewege der Sphingolipide sind sehr komplex und werden daher schematisch in der Abbildung 3 dargestellt.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der *de-novo*-Biosynthese von Sphingolipiden:** Die für die Umwandlungen verantwortlichen enzymatischen Aktivitäten sind an den jeweiligen Reaktionsrichtungen angegeben (blau). Der Name des entsprechenden Sphingolipids (rot) ist unter der jeweiligen Strukturformel angegeben.

### 1.1.3 Sphingolipide und Signaltransduktion

Sphingolipide kommen bei allen Eukaryonten, teilweise aber auch bei Prokaryonten vor und sind strukturelle und ubiquitäre Komponenten der Plasmamembranen. Zusätzlich dazu findet man sie u.a. auch in den Membranen des Golgi-Netzwerkes, der Lysosomen und der Endosomen (Smith und Merrill, 2002). Den größten Anteil an den Hautbarriere-bildenden Lipiden haben die Ceramide, in geringeren Anteilen kommen aber auch Cholesterin und freie Fettsäuren vor. Ursprünglich nahm man an, dass diese Lipide nicht viel mehr als eine strukturgebende Funktion in der Lipiddoppelschicht ausüben und für die Permeabilität der Haut verantwortlich sind.

Wichtige Entdeckungen, die man in den letzten 15 Jahre machte, wiesen dann aber auf eine Signal-vermittelnde Bedeutung der Sphingolipide für die zellulären Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Zelltod hin. Eine von mehreren entscheidenden Entdeckungen in diesem Zusammenhang war, dass eine Mutation in der Serin-Palmitoyl-Transferase (SPT) von Pilzen, dem Enzym, das den ersten Schritt der *de-novo*-Sphingolipid-Synthese katalysiert, so lange zu einem dramatischen Vitalitätsverlust der Zellen führte, bis diese wieder durch externe Zugabe von Sphingolipiden versorgt wurden (Nagiec et al., 1991; Hanada et al., 1992). Weiterführende Studien konnten im Folgenden zeigen, dass die Aktivität der Proteinkinase C (PKC), eines zentralen Enzyms in Signal-vermittelnden Prozessen, durch Sphingosin inhibiert wird (Hannun et al., JBC 1986; Hannun und Bell, 1989). Ebenso konnte bewiesen werden, dass das Sphingomyelin der Plasmamembran auf externe Stimulationen der Sphingomyelinase-Aktivität (SMase) hin im sog. „Sphingomyelin-Zyklus“ zum Ceramid metabolisiert werden kann, wodurch es zu einer intrazellulären Akkumulation von Ceramiden und damit einhergehender Induktion von apoptotischen Prozessen kommt (Obeid et al., 1993; Geilen et al., 1997).

Heute sind insgesamt acht verschiedene Sphingomyelinasen (SMase) bekannt, die man aufgrund ihrer pH-Abhängigkeit, ihrer Kationen-Abhängigkeit und der intrazellulären Lokalisation klassifiziert (Birbes et al., 2002). Die am besten untersuchte SMase ist die saure SMase (a-SMase), die man in Lysosomen findet. Sie arbeitet bei einem pH-Wert um 5.0 optimal und wird durch Diacylglycerol (DAG) stimuliert. Das Fehlen ihrer Aktivität wird für die Niemann-Pick-Krankheit verantwortlich gemacht (Otterbach und Stoffel, 1995). Des weiteren sind die neutrale  $Mg^{2+}$ -abhängige SMase (n-SMase), die ihr pH-Optimum bei 7.4 hat, die  $Zn^{2+}$ -abhängige saure SMase, die zytosolische  $Mg^{2+}$ -unabhängige und die alkalische SMase bekannt und beschrieben worden, die überwiegend in der Plasmamembran, dem Endoplasmatischen Retikulum oder dem Zytosol lokalisiert sind.

Die Generierung von erhöhten intrazellulären Ceramid-Konzentrationen durch Aktivitätssteigerung von Sphingomyelinasen stellt nicht die einzige Möglichkeit dar. Gesteigerte Ceramid-Konzentrationen findet man ebenso bei erhöhter Aktivität der Ceramid-Synthase bzw. bei verminderter Aktivität von Ceramidasen. Zu den prominentesten Induktoren zählen  $\text{TNF}\alpha$ , der Fas-Ligand, Dexamethason, NGF,  $\text{IFN}\gamma$  u.a. (Zhang und Kolesnick, 1995; Hannun, 1996).

Bis heute sind drei verschiedene Typen von Ceramidasen in Säugetierzellen bekannt, die man analog zu den Sphingomyelinasen anhand ihres pH-Optimums drei Gruppen zuordnet. So ist eine saure Ceramidase (Koch et al., 1996), die lysosomal lokalisiert ist, eine neutrale/alkalische Ceramidase (El Bawab et al., 2000) und eine alkalische Ceramidase (Mao et al., 2001) beschrieben worden.

Die Ceramide waren die ersten Sphingolipide, deren funktionelle Beteiligung man an Prozessen wie dem regulierten Zelltod (Apoptose) erkannte. Gesteigerte intrazelluläre Ceramid-Konzentrationen durch Sphingomyelin-Hydrolyse entstehen als Antwort auf Stress-Signale, die zur Apoptose oder zum Wachstumsstopp von Zellen führen (Geilen et al., 1996). Heutzutage ist es allgemein anerkannt, dass Sphingolipide an Signal-vermittelnden Prozessen teilnehmen, wenngleich das molekulare Verständnis bezüglich der biologischen Wirksamkeit der Sphingolipide Ceramid, Sphingosin und Sphingosin-1-phosphat (SPP) für die Proliferation und die Apoptose von Zellen noch nicht vollständig ist und sich in manchen Details erst zu komplettieren beginnt. Das am besten charakterisierte intrazelluläre Ziel von Ceramiden stellt die CAPK (*ceramide-activated protein kinase*) dar, deren Aktivität durch Zytokine wie  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{TNF}\alpha$  stimuliert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass die aktive CAPK an der Phosphorylierung und Aktivierung der Raf-1-Kinase beteiligt ist, deren Aktivität über Phosphorylierung von MEK die Kaskade der MAP-Kinasen auslöst und zur Apoptose führt (Basu und Kolesnick, 1998).

Generell sind die meisten Zwischenprodukte der Sphingolipid-Biosynthese in einer Zelltyp-abhängigen Weise zytotoxisch und Apoptose-induzierend. Im Gegensatz zum Ceramid zeigt das phosphorylierte Derivat des Sphingosins, das Sphingosin-1-phosphat (SPP), entgegengesetzte Eigenschaften und ist mitogen bzw. Apoptose-verhindernd. Es kann somit als intrazellulärer Gegenspieler von Ceramid aufgefasst werden. Diese Auffassung spiegelt sich in der sog. „Rheostat-Theorie“ wider, die besagt, dass das intrazelluläre Konzentrationsverhältnis zwischen Ceramiden einerseits und Sphingosin bzw. Sphingosin-1-phosphat (SPP) andererseits über das Schicksal der Zelle entscheidet (Mandala et al., 1998; Spiegel, 1999).

Die intrazellulären Konzentrationen dieser drei Sphingolipid-Metaboliten in den Zellen sind unter normalen Bedingungen äußerst niedrig und steigen erst auf ein spezifisches Signal von außen hin an. So führt z.B. die Bestrahlung mit UV-Licht oder die Behandlung mit verschiedenen Zytokinen zu einer Aktivitätssteigerung von SMasen, die zu gesteigerten Ceramid-Konzentrationen in vielen Zellen führen und im Folgenden dazu, dass diese den Weg der Apoptose einschlagen. Das Ereignis der erhöhten Generierung von intrazellulären Ceramid-Konzentrationen kann vielmehr als eine Voraussetzung angesehen werden, dass Zellen apoptotisch werden können, da in Zellen, denen die saure SMase-Aktivität fehlt, die Apoptose-Empfindlichkeit erst durch externe Ceramid-Zugabe wiederhergestellt werden konnte (Morita et al., 2000; Lozano et al., 2001; Paris et al., 2001).

Für das Sphingosin, ein intermediäres Produkt auf dem Stoffwechselweg vom Ceramid zum SPP (siehe Abb. 3), ist in einer Zelltyp-abhängigen Weise eine Förderung bzw. Minderung der Proliferation von Zellen nachgewiesen worden (Pyne et al., 1997). Sphingosin, als potenter PKC-Inhibitor, kann das Zellwachstum mindern und zu apoptotischen Prozessen führen (Cuvillier et al., 2000). Im Gegensatz dazu sind bei humanen Keratinozyten allerdings auch Proliferations-fördernde Effekte durch Sphingosin beobachtet worden. Diese werden allerdings auf eine weitere Verstoffwechslung des Sphingosins zum SPP zurückgeführt (Zhang et al., 1991). Aufgrund dieser zellspezifischen Effekte des Sphingosins ist es nicht möglich, ein einheitliches Bild seiner Wirkungsweise zu zeichnen.

Im Gegensatz zu Ceramid und Sphingosin besitzt das phosphorylierte Sphingosin, das Sphingosin-1-phosphat (SPP) mitogene und Apoptose-verhindernde Wirkungen und entsteht durch Wachstumsfaktor-induzierte Stimulation der Sphingosin-Kinase. Diese gegenläufigen Effekte, die durch Ceramide und SPP vermittelt werden, sind in der bereits erwähnten „Rheostat“-Theorie zusammengefasst, welche das Verhältnis dieser beiden Sphingolipid-Metaboliten zum entscheidenden Faktor über das Schicksal der Zelle macht. Nach dieser Theorie sind nicht die absoluten Konzentrationen von Ceramid und SPP entscheidend, sondern vielmehr ihr Verhältnis zueinander. Aufgrund der verschiedenen enzymatischen Aktivitäten sind die beiden Metaboliten rasch konvertierbar (siehe Abb. 3). Ceramidase-Aktivitäten führen zu einer Minderung von Ceramid-Konzentrationen unter gleichzeitiger Generierung von Sphingosin, welches durch die Sphingosin-Kinase zum SPP metabolisiert werden könnte. Somit wird nicht nur ein pro-apoptotisches Signal in seinem Ausmaß gemindert, sondern gleichzeitig ein anti-apoptotisches generiert.



#### 1.1.4 Apoptotische Prozesse

Der Begriff der Apoptose kommt aus dem Griechischen und steht für „Herunterfallen“. Gemeint ist damit das Herabfallen absterbender Blätter von einem Baum im Herbst. So wie das Herunterfallen alter Blätter einen natürlichen Prozess darstellt, der zur Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen eines Baumes wichtig ist, da sie dem Baum nicht mehr von Nutzen sind und dieser auch nicht unter den fehlenden Blättern leidet, so ist die Apoptose von grundlegender und lebenserhaltender Bedeutung für den Organismus, in dem sich diese apoptotischen Prozesse abspielen. Somit ist sie für die normale Entwicklung eines Organismus von zentraler Wichtigkeit.

Entdeckt wurden apoptotische Prozesse bereits sehr früh, in der Mitte des 19. Jahrhunderts, wenngleich es sich lediglich um die morphologische Beschreibung dieses Prozesses handelte und dieser auch noch nicht so bezeichnet wurde. Der Begriff der Apoptose wurde erstmalig 1972 von Kerr eingeführt (Kerr et al., 1972). Vorher war der 1965 von Lockshin und Williams geprägte Begriff des regulierten Zelltods (PCD, *Programmed Cell Death*) gebräuchlicher, die eben diesen Prozess des selektiven Sterbens von Zellen bei Insekten untersuchten (Lockshin und Williams, 1965a und 1965b). Prinzipiell beschreiben beide Termini allerdings denselben Vorgang, der sich durch das selbst-induzierte Sterben und das selektive Entfernen einzelner Zellen auszeichnet. Bei diesen Zellen handelt es sich meist um in ihrem Genom geschädigte und entartete Zellen, die sodann eliminiert werden, weil sie keine Funktion mehr für den betreffenden Organismus haben. Es werden allerdings nicht nur direkt geschädigte Zellen eliminiert, sondern auch solche, die ihre Lebenszeit überschritten haben und für die Aufrechterhaltung der Vitalfunktionen des Organismus nicht mehr benötigt werden.

Wie man anhand der Publikationsanzahl erkennen kann, hat sich die Apoptose in den letzten 15 Jahren zu einem intensiv erforschten Gebiet innerhalb der Biowissenschaften entwickelt. Diese Prozesse umschließen die normale Embryonalentwicklung, die Erhaltung der normalen Physiologie eines Gewebes, aber auch immunregulative Vorgänge. Gerade bei dem erstgenannten Beispiel der Entwicklung von Embryonen sorgt eine normal gesteuerte Apoptose für ein selektives Entfernen von Zellen und hat so maßgeblichen Einfluss auf die Embryonalentwicklung (Vaux und Korsmeyer, 1999).

Die Apoptose kann als der zelluläre Gegenprozess zur normalen Proliferation von Zellen aufgefasst werden. Verschiedene Krankheitsbilder zeichnen sich gerade durch eine einseitig gestörte Balance zwischen der Proliferation und der Apoptose-Rate aus. So konnte bei mehreren Arten von Tumoren eine verminderte Apoptose festgestellt werden. Eben dieser

Umstand wird für die ausufernde Proliferation bei Tumoren verantwortlich gemacht. Umgekehrt kann eine erhöhte Apoptose-Rate ebenso Auslöser verschiedener Erkrankungen sein.

Wie bereits erwähnt, sorgt die Induktion der Apoptose in geschädigten Zellen dafür, dass diese entfernt werden. Diese Funktion des Abräumens apoptotischer Zellen wird *in vivo* durch Makrophagen übernommen, die dafür eine Strukturumwandlung in den Membranen der geschädigten Zellen ausnutzen. In der frühen Phase des programmierten Zelltodes kommt es zu einer Umverteilung von Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran. Diese Umverteilung wird zur Erkennung und Eliminierung der geschädigten Zelle durch die Makrophagen genutzt (Fadok et al., 2001).

In Säugetierzellen kann die Einleitung der Apoptose auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Sie kann einerseits von außen durch Aktivierung von Oberflächenrezeptoren (siehe Kapitel 1.1.6) induziert werden, andererseits auch von den Zellen selbst als Reaktion auf einen Kontakt mit schädigenden Agenzien, die unterschiedlichster Natur sein können. Zu den prominentesten Auslösern zählen UV-Licht,  $\gamma$ -Strahlung, der Entzug von Wachstumsfaktoren, verschiedene Zytokine und die Aktivierung von sog. Todes-Rezeptoren durch ihre entsprechenden Liganden.

In ihrem Ergebnis unterscheidet sich die Apoptose nicht von einer weiteren Form des Zelltods, der Nekrose, da beide Prozesse mit dem Tod der Zelle enden. Die Apoptose allerdings, die auch physiologischer Zelltod genannt wird, unterscheidet sich durch eine Reihe von Kriterien von dem unphysiologischen Prozess der Nekrose. Fasst man die Apoptose als Selbstmord der Zelle auf, so müsste man die Nekrose passenderweise als „tödlichen Unfall“ bezeichnen, da sie nicht von der Zelle selbst gesteuert wird bzw. nicht programmiert abläuft. Die Unterscheidungskriterien für Apoptose und Nekrose sind morphologischer, physikalischer und biochemischer Natur.

Morphologische Unterscheidungskriterien betreffen z.B. die Membranintegrität und das Volumen der Zelle. Während der Apoptose bleibt die Integrität der Zellmembran erhalten, die Zelle schrumpft und es kommt zur Kondensation des Chromatins und letztlich zur Spaltung der chromosomalen DNA. Bei nekrotischen Vorgängen verlieren die Zellen ihre Membranintegrität und schwellen an. Von entscheidender Bedeutung ist ebenso, dass die Apoptose generell einen Energie-verbrauchenden Prozess darstellt, während die Nekrose keine Energie erfordert. Zur Regulation der Apoptose ist das Vorhandensein einer intrazellulären Kaskade verschiedenster Enzyme erforderlich, die fein reguliert eben den Prozeß des zellulären Tods steuern. In der terminalen Phase der Apoptose kommt es zur

gezielten Eliminierung der apoptotischen Zelle, während bei nekrotischen Vorgängen größere zelluläre Verbände betroffen sind. Des Weiteren kommt es während der Nekrose durch die Freisetzung zellulärer Enzyme wie Proteasen in das umgebende Gewebe zumeist zu Entzündungsreaktionen. Diese inflammatorischen Reaktionen bleiben bei apoptotischen Prozessen durch die schnelle gezielte Eliminierung der betroffenen Zelle aus. Tabelle 1 zeigt eine Darstellung der Unterscheidungskriterien zwischen der Apoptose und der Nekrose.

**Tabelle 1: Überblick über die wichtigsten Unterscheidungskriterien zwischen apoptotischen und nekrotischen Prozessen in der Zelle**

Apoptose	Nekrose
Erhalt der Membranintegrität	Verlust der Membranintegrität
Schrumpfen der Zellen	Anschwellung der Zellen und Organellen
Kondensation des Chromatins	Keine Kondensation des Chromatins
"Apoptotic Bodies" als Finalstadium	Zellyse mit Freisetzung der Enzyme
Energie (ATP)-abhängig	Nicht Energie-verbrauchend
Typisches „DNA-Laddering“ durch DNA-Spaltung zwischen Nukleosomen	Zufällige DNA-Spaltung
Auflösung des Nukleus	Keine Auflösung des Nukleus
Keine Entzündungsreaktionen	Von Entzündungsreaktionen begleitet
Tod einzelner Zellen	Tod ganzer Zellverbände
Beteiligung von Enzymkaskaden	Keine enzymatische Regulation
Physiologischer Vorgang	Pathologischer Vorgang

### 1.1.5 Gliederung der Apoptose

Der Verlauf der Apoptose kann *in vivo* in vier verschiedene Phasen unterteilt werden, in die Einleitungs-Phase (*Indictment*), die Entscheidungs-Phase (*Judgement*) und die Ausführungs-Phase (*Execution*). Letztendlich erfolgt mit dem Abräumen der apoptotischen Zelle durch Makrophagen die Beerdigungsphase (*Burial*) (Amarante-Mendes und Green, 1999). Die erste Phase stellt den variabelsten Teil der Apoptose dar, in der es in Abhängigkeit von der Art und Intensität eines pro-apoptotischen Signals zur Einleitung der Apoptose kommen könnte. Wie bereits erwähnt, kann dieses Signal unterschiedlichster Natur sein. An der Kontrolle der *Judgement*-Phase ist ein fein-reguliertes Wechselspiel verschiedener pro - bzw. anti-apoptotischer Faktoren (z.B. Mitglieder der bcl-2-Familie) beteiligt, deren Verhältnis zueinander darüber entscheidet, ob es zur Initiation der Apoptose kommt. Kommt es zur nächsten Phase, der *Execution*-Phase, so werden diverse Mitglieder der Familie der Caspasen aktiviert, die bis zu diesem Moment inaktiv als Zymogene in der Zelle vorlagen. Ihre Wirkungsweise ist für die dramatischen, in Tabelle 1 zusammengefassten Änderungen der Zelle während der Apoptose verantwortlich. Die Aktivierung der Caspasen-Kaskade führt letztendlich zur Aktivierung der Caspase-3. Das Vorhandensein dieser aktiven Caspase markiert den sog. „point of no return“, der zum Tod der Zelle führen wird. Letztendlich resultiert daraus *in vivo* in der abschließenden *Burial*-Phase die Entfernung der apoptotischen Zelle durch Makrophagen.

### 1.1.6 Die Rezeptor-vermittelte Apoptose

Auf der molekularen Ebene ist die Rezeptor-vermittelte Apoptose über sog. „Todes-Rezeptoren“ (*death receptors*, DRs) das gegenwärtig am besten verstandene Modell der Apoptose-Induktion. Diese erfolgt über die Bindung eines Todes-Rezeptors an seinen entsprechenden Liganden. Alle Todes-Rezeptoren zeichnen sich durch eine hohe Strukturhomogenität aus. Sie besitzen eine intrazelluläre Domäne, die sog. Todes-Domäne (*Death Domain*, DD), die für die Weiterleitung eines von außen kommenden Todes-Signals auf die zytoplasmatische Seite verantwortlich ist und zur Anbindung des Rezeptors an die Caspasen-Kaskade benötigt wird. Auf der extrazellulären Seite finden sich, je nach Rezeptor, zwischen zwei und vier Cystein-reiche Domänen. Alle Rezeptoren dieser Art gehören der Superfamilie der *Tumor Necrosis Factor* (TNF)-/*Nerve Growth Factor* (NGF)-Rezeptoren an. Gegenwärtig sind acht verschiedene Rezeptoren dieser Art beschrieben worden, die die Bezeichnungen TNF-R1 (CD120a), CD95 (APO-1, Fas), TRAMP (APO-3, WSL-1, LARD, DR3), TRAIL-R1 (APO-2, DR4), TRAIL-R2 (DR5, KILLER, TRICK2), DR6, EDA-R und

NGF-R tragen (Schmitz et al., 2000; French und Tschopp, 2003). Die z.T. etwas unübersichtliche Mehrfachbenennung eines Rezeptors rührt von der zeitgleichen Untersuchung und Veröffentlichung des betreffenden Rezeptors durch verschiedene Arbeitsgruppen her.

Der CD95 (*cluster of differentiation 95*) - Rezeptor, für den es auch die Bezeichnungen Fas (*fibroblast associated*) oder APO-1 (*apoptosis 1*) gibt, ist von den genannten Todes-Rezeptoren eingehend untersucht worden. Dieser Rezeptor wird von den meisten Zellen exprimiert. Seine Aktivierung erfordert die Bindung des CD95-Liganden, der von T-Zellen und weiteren immunprivilegierten Geweben exprimiert wird (French et al., 1996).

Die Bildung des Rezeptor / Liganden-Komplexes initiiert die Ligandierung von Rezeptoren und die Weiterleitung des Apoptose-Signals über strukturelle Motive wie Todes-Domänen (DD), DED (*death effector domain*) oder CARD (*caspase recruitment domain*). Zur weiteren Vermittlung der Apoptose werden zytoplasmatische Adapterproteine benötigt, die Todes-Domänen (DD) enthalten. Dazu gehören u.a. FADD (*Fas-associated death domain*), TRADD (*TNF receptor protein associated with death domain*) und RIP (*receptor-interacting protein*), aber auch Todes-Rezeptoren wie CD95, TNF-R1, TRAIL-R1 oder TRAIL-R2.

Das Motiv der DED ist dagegen in Adapterproteinen und den Caspasen 8 und 10 enthalten und wird zur Weiterleitung des Todes-Signals benötigt, da die Interaktion zwischen den Adapterproteinen und den Caspasen 3 oder 8 die Voraussetzung zur Bildung des DISC-Komplexes (*death-inducing signalling complex*) darstellt (Lee et al., 2000).

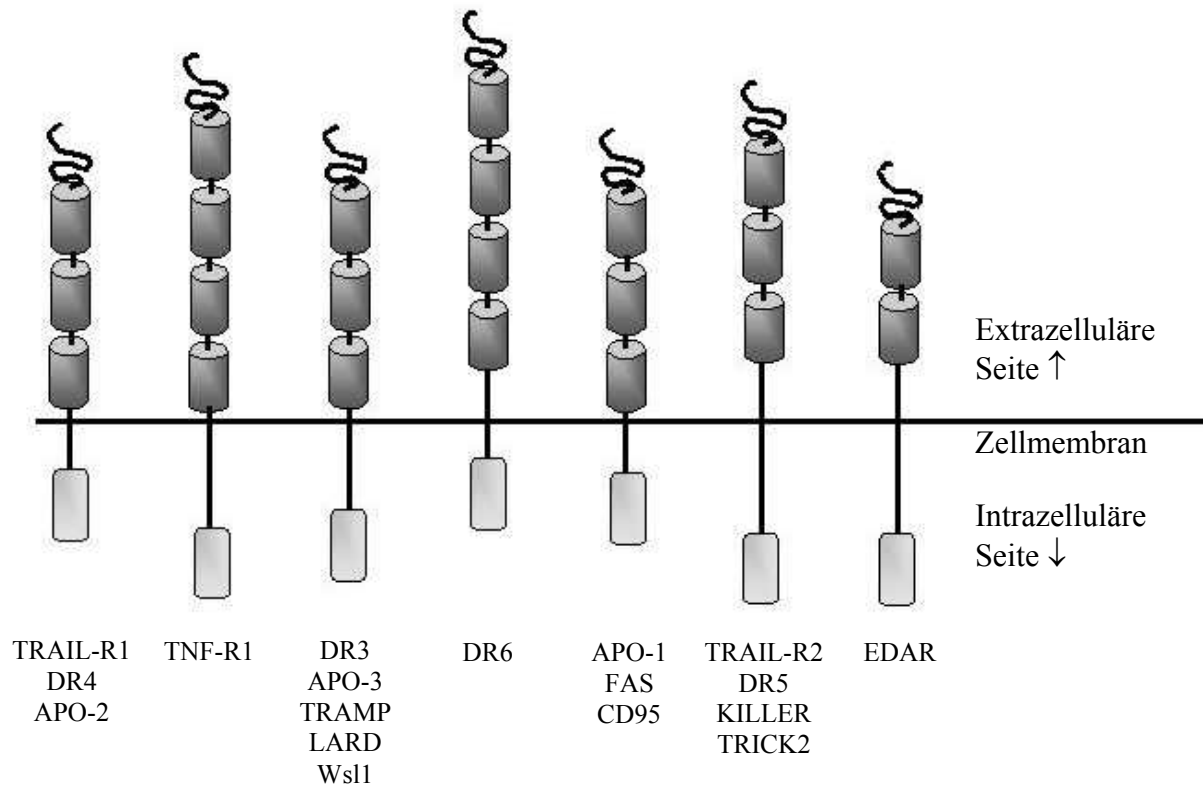
Im Falle des aktivierten CD95-Rezeptors kommt es zur Interaktion mit dem Adapterprotein FADD, das aus einer amino-terminalen DED und einer carboxy-terminalen DD besteht. Die Bindung von FADD an CD95 erfolgt hierbei über Interaktionen der DD beider Proteine. Im Anschluss daran erfolgt die Bindung der DED-enhaltenen Procaspasen 8 und 10 über DED-DED-Interaktionen, wodurch der DISC-Komplex gebildet wird (Boldin et al., 1996). Die Bildung dieses Komplexes kann durch FLIP (*Fllice-inhibitory protein*) unterbunden werden, da es mit der Caspase 8 um die Bindung im Komplex konkurriert (Tschopp et al., 1998). Die Bildung von DISC führt zur proteolytischen Spaltung der inaktiven Procaspase 8 zur aktiven Caspase 8 und somit zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade (Weber et al., 2001). Diese beinhaltet die Aktivierung der Effektor-Caspasen 7 und 6 und im finalen Stadium die der Haupteffektor-Caspase 3. Ihre Aktivität führt zur Spaltung von Substraten, die zur Apoptose führen (Beere, 2001). Der beschriebene Weg erfordert das Zusammenspiel vieler Faktoren. In Abhängigkeit der Intensität eines Todes-Signals und der Art der betroffenen Zelle kann dieser Weg aber schon nach wenigen Minuten initiiert werden und die Apoptose nach einer Stunde

abgeschlossen sein. Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung der beiden beschriebenen Apoptose-Wege.

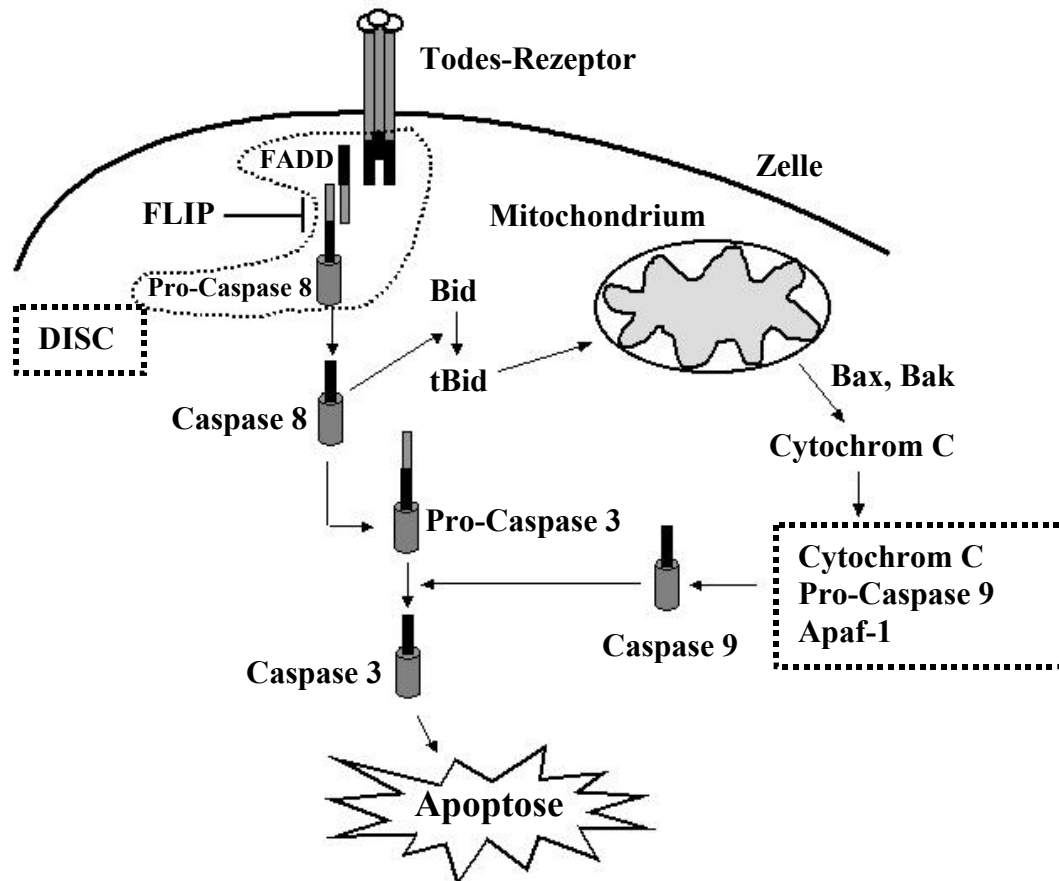
Neben dem über FADD/Caspase 8-vermittelten Apoptose-Weg ist für CD95 ein weiterer beschrieben worden (Scaffidi et al., 1998). Über Induktion von pro-apoptotischen Faktoren wie Bid (*bcl-2-interacting domain*), Bad (*bcl-X<sub>L</sub>/ bcl-2-associated death promotor*), PUMA (*p53-upregulated modulator of apoptosis*) und Noxa (*PMA-induced protein*) kommt es zu einer Einlagerung von pro-apoptotischen Faktoren wie Bax (*bcl-2-associated X protein*) und Bak (*bcl-2 antagonist killer 1*) in die Membran von Mitochondrien. Hierdurch kommt es zu einer Störung der Membranintegrität mit einhergehender Freisetzung von Faktoren wie Cytochrom C, AIF (*apoptosis-inducing factor*) oder SMAC/DIABLO (Wu et al., 2002).

Im weiteren Verlauf kommt es zur Bildung eines Komplexes aus Cytochrom C, Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor*) und der Procaspase 9, durch den die Caspase 9 zur aktiven Form gespalten wird. Die aktive Caspase 9 stellt den Verknüpfungspunkt der beiden dargestellten Wege dar, da sie ebenfalls die Caspase 3 aktiviert.

Zusätzlich zu den Todes-Rezeptoren gibt es eine Gruppe von strukturell ähnlichen Decoy-Rezeptoren, welche die Bezeichnungen TRAIL-R3 (DcR-1, LIT, TRID, DR6), TRAIL-R4 (DcR-2, TRUNDD), OPG und DcR-3 (TR6) tragen. Diese Rezeptoren besitzen wie die Todes-Rezeptoren unterschiedlich viele Cystein-reiche Domänen in ihrem extrazellulären Bereich, allerdings fehlt ihnen die intrazelluläre Todes-Domäne (Abb. 4). Es konnte gezeigt werden, dass die Liganden CD95L und LIGHT an den DcR-3 (TR6)-Rezeptor binden (Pitti et al., 1998; Yu et al., 1999), wohingegen TRAIL an die anderen Decoy-Rezeptoren bindet (Ashkenazi und Dixit, 1998). Da die Expression von TRAIL-R3 oder TRAIL-R4 allerdings nicht die TRAIL-induzierte Apoptose verhindern konnte, bleibt es weiterhin zu klären, ob die Decoy-Rezeptoren *in vivo* zu einer Verhinderung der Apoptose beitragen (Zhang et al., 1999).



**Abb. 4: Super-Familie der Todes-Rezeptoren:** Die Todes-Rezeptoren zeichnen sich durch zwei bis vier Cystein-reiche extrazelluläre Domänen und eine zytoplasmatische Todes-Domäne (DD) aus. Gegenwärtig sind acht Rezeptoren dieser Art bekannt: TRAIL-R1, CD95, TRAIL-R2, DR3, DR6, TNF-R1 und EDAR (gezeigt), zusätzlich NGF-R.



**Abb. 5: Die Todes-Rezeptor-vermittelte Apoptose:** Die Kaskade wird durch Bindung des Liganden (z.B. CD95L) an seinen Rezeptor (CD95) initiiert. Die Bildung des Rezeptor / Liganden-Komplexes führt zur Ligation der Todes-Rezeptoren und zur Weiterleitung des Apoptose-Signals über die Bildung von DISC, die durch FLIP unterbunden werden kann. Die Aktivierung der Pro-Caspase 8 führt zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade.

Darüberhinaus ist für CD95 ein weiterer beschrieben worden. Über Induktion von pro-apoptotischen Faktoren wie Bid, Bad, PUMA und Noxa kommt es zu einer Einlagerung von Bax und Bak in die Membran von Mitochondrien. Durch die Störung der Membranintegrität kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C und zur Bildung eines Komplexes aus Cytochrom C, Apaf-1 und der Procaspase 9, durch den die Pro-Caspase 9 zur aktiven Form gespalten wird.



### 1.1.7 Caspasen

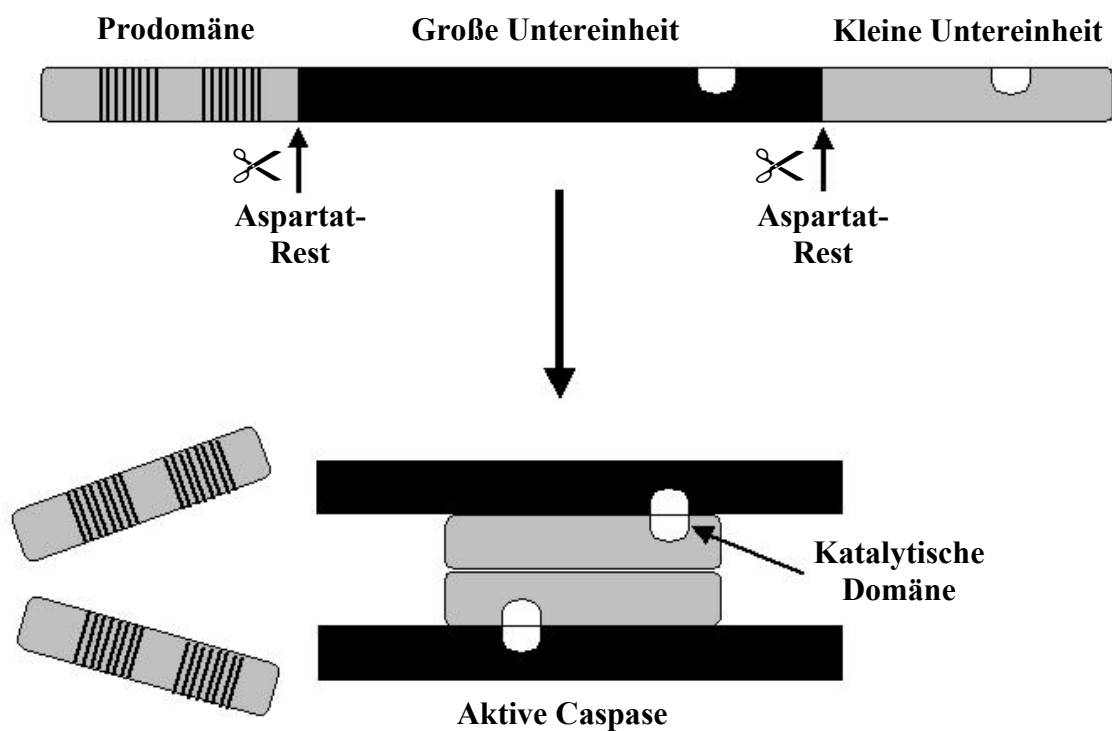
Eine Beteiligung der Caspasen an apoptotischen Prozessen erkannte man mit der Entdeckung, dass CED-3, ein Enzym der Apoptose beim Nematoden *Caenorhabditis elegans*, ein Homolog zum Interleukin-1 $\beta$ -Converting Enzyme (ICE, Caspase 1) von Säugetierzellen ist (Thornberry et al., 1992; Miller et al., 1997). Obwohl eine unmittelbare Beteiligung an apoptotischen Prozessen für die Caspase 1 zwar bis heute nicht bewiesen ist, leitete ihre Entdeckung die Entdeckung weiterer Caspasen ein, von denen man weiß, dass ihnen eine zentrale Rolle in der Ausführung der *Execution*-Phase der Apoptose zukommt.

Die Namensgebung „Caspase“ leitet sich von ihrer Funktion ab. Caspasen sind Cystein-Proteasen, die ihre Substrate hinter Aspartat-Resten spalten, für die sie zugleich eine außergewöhnlich hohe Spezifität besitzen. Die Endung „ase“ kennzeichnet die allgemeine Funktion als Enzym. Zur Zeit sind 15 verschiedene Mitglieder der Familie der Caspasen bekannt.

Alle Caspasen liegen in der Zelle als inaktive Proenzyme (Zymogene) vor und werden auf ein Apoptose-Signal hin zu ihren aktiven Formen gespalten. In ihrer inaktiven Form bestehen Caspasen aus drei Domänen, einer variablen Pro-Domäne am Aminoterminus, einer großen Untereinheit ( $\approx 20$  kDa) in der Mitte und einer kleineren Untereinheit ( $\approx 10$  kDa) am Carboxyterminus (Thornberry und Lazebnik, 1998). Kommt es zur Aktivierung der Caspasen, so werden diese an zwei Stellen proteolytisch gespalten. Durch die erste Spaltung wird die aminoterminal Pro-Domäne entfernt, durch die zweite Spaltung werden die beiden Untereinheiten voneinander getrennt. Das aktive Zentrum der Caspase sitzt in der großen Untereinheit, ist aber lediglich dann aktiv, wenn diese mit der kleinen Untereinheit assoziiert ist. Das aktive Enzym bildet einen heterotetrameren Komplex, bestehend aus zwei großen und zwei kleinen Domänen (siehe Abb. 6). Wie bereits erwähnt, sind Caspasen sehr spezifische Proteasen, die zur Erkennung und Spaltung ihrer Substrate vier Aminosäurereste NH<sub>2</sub>-terminal zur Spaltungsstelle (Aspartat) benötigen. Da dieses tetrapeptidische Bindungsmotiv stark variieren kann, ist die biologische Funktion der Caspasen entsprechend vielfältig (Thornberry et al., 1997). Aufgrund ihrer Beteiligung an proteolytischen Prozessen, die zu den in der Tabelle 1 genannten Auswirkungen führen, und an regulatorischen Prozessen ordnet man Caspasen entweder der Gruppe von Effektoren oder derjenigen von Initiatoren zu. Zur erstgenannten Gruppe gehören z.B. die Caspasen 6, 7 und 3, da sie unmittelbar an der *Execution*-Phase beteiligt sind. Zur zweitgenannten Gruppe gehören die Caspasen 8, 10, 9 und 2.

Die Aktivität der Caspasen zielt auf anti-apoptotische Proteine ab, zu denen u.a. ICAD (*inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease*) zählt. Es handelt sich bei diesem Protein um einen Inhibitor der Caspasen-aktivierten Deoxyribonuklease (CAD) (Sakahira et al., 1998; Enari et al., 1998). Kommt es im Verlauf der Apoptose zu einer Caspasen-induzierten Spaltung und Inaktivierung von ICAD, so induziert die normalerweise inaktive CAD eine Fragmentierung der DNA.

Ein weiteres Substrat, das durch Caspasen gespalten wird, ist die Poly (ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), die an DNA-Reparatur-Prozessen beteiligt ist (Gu et al., 1995). Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass PARP ein Substrat der Caspase 3 darstellt.



**Abb. 6: Allgemeines Schema der Aktivierung von Caspasen:** Durch proteolytische Spaltung werden die aminoterminalen Pro-Domänen der bis dahin inaktiven Caspasen entfernt. Die gebildete aktive Caspase ihrer katalytischen Domäne stellt einen heterotetrameren Komplex aus je zwei großen und kleinen Untereinheiten dar.

### 1.1.8 Die Bcl-2-Familie

Das Bcl-2-Proto-Onkogen (B cell lymphoma gene-2) wurde 1985 entdeckt (Vaux et al., 1988) und bildet mit den anderen Mitgliedern der Bcl-2-verwandten Proteine eine Klasse von Apoptose-regulierenden Faktoren. Diese lassen sich durch ihre Funktion in zwei Klassen einteilen. Zur ersten Gruppe gehören Genprodukte wie Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1 und Bfl-1, die anti-apoptotisch wirken und das zelluläre Überleben fördern. Dieser Gruppe stehen Bax, Bak, Bcl-X<sub>S</sub>, Bad, Bid, Bik, Bim, Hrk und Bok gegenüber, die zusammen eine Gruppe Apoptose-fördernder Proteine bilden. Strukturelle Untersuchungen haben gezeigt, dass Proteine der Bcl-2-Familie über bis zu vier BH-Domänen (*Bcl-2 homology domains*) verfügen und alle mindestens eine davon gemeinsam besitzen. Alle anti-apoptotischen und einige pro-apoptotischen (Bax, Bok, Bak) Mitglieder der Bcl-2-Familie besitzen drei solcher Domänen (BH1, BH2 und BH3). Lediglich einige anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie verfügen über eine BH4-Domäne, die zur Interaktion mit nicht zur Bcl-2-Familie gehörenden Proteinen (Bag-1, Raf-1) benötigt wird (Zamzami et al., 1998). Die meisten Proteine der Bcl-2-Familie besitzen zusätzlich zu den BH-Domänen eine carboxyterminale hydrophobe Transmembran (TM)-Sequenz aus 20 Aminosäureresten, die für eine mögliche Einbindung des entsprechenden Proteins in Membranen von Mitochondrien sorgt. Die TM-Sequenz scheint für die Lokalisierung an der Mitochondrienmembran und damit für die Wirkungsweise der Proteine der Bcl-2-Familie von außerordentlich wichtiger Bedeutung zu sein, da z.B. ihre Deletion die Bax-induzierte Letalität bei Hefen verhinderte (Zha et al., 1996). Während die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> überwiegend an der äußeren mitochondrialen Membran gebunden sind, liegt das pro-apoptotische Bax im Zytosol vor und wird erst bei der Induktion der Apoptose durch Translokation zur mitochondrialen Membran verbracht. Das gleiche gilt für die weiteren pro-apoptotischen Mitglieder Bid, Bad und Bim. Die Mitochondrien sind auch der Ort, an dem die Proteine der Bcl-2-Familie ihre Funktion ausüben.

Obwohl das genaue Wirkungsprinzip bis heute unklar ist, scheint das Verhältnis der Expression pro- und anti-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie ein das zelluläre Schicksal maßgeblich beeinflussender Faktor zu sein. Man nimmt an, dass die Apoptose über die Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren gesteuert wird, wofür Interaktionen über die BH3-Domänen von zentraler Wichtigkeit sind. Diese Homo-/Heterodimere lagern sich im Folgenden in die mitochondriale Membran als integrales Membranprotein ein und sorgen für eine mitochondriale Dysfunktion (Eskes et al., 2000). Für diese Hypothese gibt es *in-vitro*-Daten, es ist *in vivo* allerdings nie beschrieben worden (Baliga und Kumar, 2002). Durch

diese Penetration der Mitochondrienmembran kommt es zu einem Efflux von Cytochrom C, das an Apaf-1 bindet und im weiteren Verlauf zur Aktivierung der Caspasen, die für die in Tabelle 1 zusammengefassten Änderungen in der Zelle verantwortlich sind (Kluck et al., 1997).

### 1.1.9 Sphingosin-1-phosphat (SPP)

Sphingosin-1-phosphat (SPP) ist ein polares bioaktives Sphingolipid, dessen Bedeutung für das zelluläre Wachstum 1991 entdeckt und beschrieben wurde (Zhang et al., 1991). Durch Untersuchungen in der folgenden Zeit erkannte man, dass dieses Sphingolipid an der Regulation zahlreicher weiterer biologischer Prozesse beteiligt ist, die entweder durch die intrazelluläre Synthese von SPP gesteuert oder durch die Bindung von SPP als extrazellulärem Liganden an spezielle Rezeptoren vermittelt werden. Zu diesen Prozessen zählen u.a. die Regulation der Zellbeweglichkeit (Hobson et al., 2001), die Mobilisierung von intrazellulärem Calcium (Mattie et al., 1994), die Zelldifferenzierung und das Sichern des zellulären Überlebens durch Inhibierung der Apoptose (Edsall et al., 1997).

Somit ist SPP das erste Sphingolipid, dessen duale Funktion als intrazellulärer „second messenger“ und als extrazellulärer Ligand bewiesen wurde. Aufgrund dieser dualen Eigenschaften wird SPP einer neuen Klasse von Lipid-Mediatoren zugeordnet.

In den Zellen entsteht Sphingosin-1-phosphat durch Phosphorylierung von Sphingosin. Das hierfür verantwortliche Enzym, die Sphingosin-Kinase (SphK), ist ein ubiquitäres Enzym, welches z.B. in Hefen (Stoffel et al., 1974), Hirn-, Leber- und Nieren-Zellen der Ratte (Keenan und Maxam, 1969; Buehrer und Bell, 1992), Rinderhirn (Louie et al., 1976), sowie in humanen und porcinen Blutplättchen (Buehrer und Bell, 1992) vorkommt.

Die SphK wurde erstmalig 1998 aus Nierenzellen der Ratte extrahiert und gereinigt (Olivera et al., 1998). Dabei zeigte sich, dass sie ein apparentes Molekulargewicht von 49 kDa hat und Michaelis-Menten-Konstanten ( $K_M$ ) von 5  $\mu$ M für Sphingosin und 93  $\mu$ M für ATP besitzt. Des weiteren zeigt das Enzym eine ausgeprägte Spezifität für das *trans*-Isomer von D-*erythro*-Sphingosin. Auf der Basis von Sequenzuntersuchungen der hoch-aufgereinigten SphK der Ratte wurden die ersten SphK, kloniert und untersucht. Es handelte sich hierbei um Kinasen der Maus, die als mSPHK1a und mSPHK1b bezeichnet wurden (Kohama et al., 1998). Diese zwei Isoformen des Enzyms entstehen durch alternatives Splicen einer gemeinsamen mRNA und unterscheiden sich lediglich in einigen Aminosäuren, die amino-terminal liegen. Zusätzlich zu den klonierten murinen Isoformen der Sphingosin-Kinase liegen zwei klonierte humane Formen der SphK vor, die die Bezeichnungen hSphK1 und

hSphK2 tragen (Liu et al., 2000; Nava et al., 2000). Die entsprechenden Gene kodieren für Proteine mit 384 (42,4 kDa) und 618 (65,6 kDa) Aminosäuren. Beide Kinasen zeichnen sich durch fünf konservierte Domänen aus, die bis zu 50 % identisch sind und die zweite eine ATP-Bindungs-Domäne darstellt (Pitson et al., 2000). Die Kinasen hSphK1 und hSphK2 stellen die einzigen Sphingosin-Kinasen dar, die bis dato aus Säugetierzellen kloniert wurden. Strukturelle Untersuchungen an den klonierten Isoformen zeigten, dass diese mindestens drei Calcium-/Calmodulin-bindende Sequenzen sowie mehrere Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen, darunter acht mögliche Stellen für die Proteinkinase C (PKC), enthalten. Durch das Aufstellen eines Hydrophathie-Index für die hSphK2 wurden sieben mögliche Transmembransequenzen für das Enzym vorhergesagt, obwohl auch für diese Isoform der überwiegende Anteil ihrer Aktivität zytosolisch gefunden wurde (Liu et al., 2000).

#### **1.1.10 Aktivierung der Sphingosin-Kinase**

Es ist ein breites Spektrum an stimulierenden Faktoren bekannt, die die Aktivität der SphK erhöhen und somit zu gesteigerten intrazellulären SPP-Konzentrationen führen. Zu den prominentesten Aktivatoren zählen Wachstumsfaktoren wie der *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) (Olivera und Spiegel, 1993), der *Nerve Growth Factor* (NGF) (Edsall et al., 1997) und der *Epidermal Growth Factor* (EGF) (Meyer zu Heringdorf, 1999), aber auch andere Faktoren wie Vitamin D<sub>3</sub> (Kleuser et al., 1998), *Tumor Necrosis Factor α* (TNFα) (Xia et al., 1998 und 1999), LPA (Young et al., 1999), Cross-Linking der Immunglobulin-Rezeptoren FcγR1 (Melendez et al., 1998), FcγRIII (Chuang et al., 2000), FcεR1 (Prieschl et al., 1999) und Agonisten, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren funktionieren (Meyer zu Heringdorf et al., 1998; van Koppen et al., 2001). Die Stimulation der SphK durch die genannten Aktivatoren erfolgt allerdings in einer zellspezifischen Weise. Tabelle 2 zeigt eine Auswahl der für die verschiedenen Zelltypen bekannten Aktivatoren der SphK.

Viele der Untersuchungen bezüglich der Agonist-stimulierten SphK-Aktivierung stützen sich auf *in-vitro*-Untersuchungen. Da Zellen allerdings ebenso über eine SPP-Phosphatase- bzw. SPP-Lyase-Aktivität verfügen, könnte einer Agonist-induzierten Konzentrationserhöhung von SPP eine Inhibierung der SPP-Phosphatase bzw. Lyase zugrunde liegen und müsste nicht zwangsläufig das Ergebnis einer Aktivitätssteigerung der SphK sein (Maceyka et al., 2002).

Der genaue Mechanismus der Stimulation der SphK ist zu weiten Teilen noch nicht bekannt, wengleich es einige Hinweise auf einen möglichen Funktionsmechanismus gibt. Der überwiegende Anteil der SphK-Aktivitäten wird zytosolisch gefunden (Liu et al., 2000; Gijbers et al., 2001), während das eher hydrophobe Substrat Sphingosin in den Membranen

der Zelle generiert wird. Die Aktivierung des Enzyms durch Phosphatidylserin (Liu et al., 2000) deutet die Möglichkeit an, dass eine Translokation des Enzym vom Zytosol zur Membran stattfinden könnte und dieses dort durch das Phosphatidylserin aktiviert wird oder durch dieses in eine günstige Position für sein Substrat gebracht wird. Da allerdings im Fall der PDGF-vermittelten Aktivitätserhöhung der SphK auch eine solche Erhöhung in Zytosolpräparationen ohne Membranen gefunden wird, ist dieser Translokations-Mechanismus nicht für sämtliche Aktivitätssteigerungen der SphK verantwortlich zu machen (Olivera et al., 1999; Osawa et al., 2001).

Ein anderer möglicher Funktionsmechanismus wird durch die möglichen Calcium/Calmodulin-Bindungsstellen der SphK diskutiert. Bei beiden Isoformen der humanen SphK, hSphK1 und hSphK2, wurden mehrere dieser Bindungsstellen identifiziert (Kohama et al., 1998; Nava et al., 2000), was auf die besondere Rolle von Calcium bei der Aktivierung der SphK hinweist. Einige der genannten Aktivatoren stimulieren die Aktivität des Enzyms durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Olivera et al., 1999; Alemany et al., 2000). Der genaue Mechanismus der Aktivitätssteigerung durch Calcium ist unbekannt, da weder Calcium alleine (Olivera et al., 1998) noch der Zusatz von Calcium/Calmodulin eine Aktivitätssteigerung der SphK brachte (Pitson et al., 2000). Somit könnte der beobachtete Effekt ein indirekter sein, der weitere bislang noch nicht identifizierte Proteine einbezieht.

Eine weiterer möglicher Wirkmechanismus könnte in der Phosphorylierung durch Proteinkinasen C (PKC) liegen, deren Aktivität durch Calcium und Diacylglycerol gesteigert werden kann. Wie in Tabelle 2 zusammengefasst ist, zählen klassische PKC-Aktivatoren wie z.B. Phorbolster zu den wichtigsten Stimulatoren der SphK. Diese These wird durch die Entdeckung gestützt, dass sowohl hSphK1 als auch hSphK2 mehrere PKC-Phosphorylierungsstellen besitzen. Während Phorbolster alleine keine direkte Aktivitätssteigernde Wirkung auf die SphK aufwies, minderten klassische PKC-Inhibitoren in Analogie auch die Aktivität der SphK. Diese Daten deuten stark auf eine mögliche Beteiligung der PKC an der Aktivitätssteigerung der SphK hin. Die PDGF-vermittelte Aktivierung der SphK in TRMP-Zellen zeigt sich dagegen unabhängig vom Aktivitätsstadium der PKC. Eine Inhibierung der PKC hatte in diesen Zellen keine Auswirkung auf die Aktivität der SphK, so dass die PKC-vermittelte Aktivitätssteigerung nur einen Mechanismus darstellt (Olivera et al., 1999).

Möglicherweise stimuliert auch die Proteinkinase A (PKA) die Aktivität der SphK, da in letzterer ebenso eine mögliche PKA-Phosphorylierungsstelle gefunden wurde. Darüber hinaus

weisen zwei klassische PKA-Aktivatoren, Forskolin und Dibutyryl-cAMP, einen Aktivitätssteigernden Einfluss auf die SphK auf (Rius et al., 1997).

Eines der vielleicht am besten verstandenen Modelle der Aktivitätssteigerung der SphK ist das der PDGF-vermittelten in TRMP-Zellen. In diesen konnte gezeigt werden, dass die Substitution des Tyrosin-Restes 1021 des PDGF-Rezeptors  $\beta$  zu keiner weiteren Stimulation der Sphingosin-Kinase führte. Dieser Tyrosin-Rest wird zur Interaktion mit der Phospholipase  $C\gamma$  (PLC $\gamma$ ) benötigt, die somit an der PDGF-vermittelten Stimulation der Sphingosin-Kinase beteiligt zu sein scheint. Wurden hingegen die Tyrosin-Reste 740, 751 und 1009, die zur Interaktion mit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und SHP-2 benötigt werden, durch Phenylalanin substituiert, so funktionierte die PDGF-vermittelte Aktivitätssteigerung der Kinase unverändert (Olivera et al., 1999).

Eine Beteiligung der Phospholipase D (PLD) an der Aktivitätssteigerung der SphK konnte ebenso bewiesen werden. In IFN $\gamma$ -stimulierten U937-Zellen konnte nach Cross-Linking des Immunglobulin-Rezeptoren Fc $\gamma$ R1 eine rasche Stimulierung (< 30 s) der SphK beobachtet werden, die PLD-abhängig war (Melendez et al., 1998). Wie bei der Phosphatidylserin-induzierten SphK-Aktivierung führte die PLD-abhängige Stimulierung zu einer Translokation des Enzyms zur zellulären Membran. Eine Inhibierung der PLD führte dagegen zu keiner Stimulation.

Die gegenläufigen Wirkungen von SPP einerseits und Ceramid/Sphingosin andererseits werden z.T. über Proteinkinasen der ERK 1/2 - und JNK/p38-Familien vermittelt mit unterschiedlichen Einflüssen auf Proliferation und Apoptose (Xia et al., 1995; Verheij et al., 1996). ERK kann das pro-apoptotische Bad inhibieren und wirkt somit oberhalb der Freisetzung des Cytochroms C. Ebenso ist eine Wirkung unterhalb durch Inhibierung der Caspasen-Aktivierung beschrieben worden (Cross et al., 2000).

TNF $\alpha$ -induzierte Bildung von SPP in humanen Hepatozyten führt zu einer Aktivierung der PI3-Kinase und Akt, welches die Bad-vermittelte Freisetzung von Cytochrom C unterbindet und somit die Zellen vor Apoptose schützt (Osawa et al., 2001).

**Tabelle 2: Agonist-stimulierte Produktion von SPP in verschiedenen Zell-Typen**

Zelltyp	Stimulator	Referenz
Swiss 3T3	PDGF / FCS	Olivera und Spiegel, 1993
HEK 293	EGF	Meyer zu Heringdorf et al., 1999
HUVEC	TNF $\alpha$	Xia et al., 1999
Airway Smooth Muscle	PDGF	Pyne et al., 1996
HEL	PMA	Buehrer et al., 1996
PC12	NGF	Rius et al., 1997
RP11	Forskolin	Machawate et al., 1998
HL60	Vitamin D3	Kleuser et al., 1998
U937	Fc $\gamma$ R1	Melendez et al., 1998
Neutrophile (human)	Fc $\gamma$ RIII	Chuang et al., 2000
Mastzellen	Fc $\epsilon$ R1	Prieschl et al., 1999
Balb/c 3T3 Fibroblasten	Phorbolester	Mazurek et al., 1994
HL60	FMLP	Aleman et al., 1999

### 1.1.11 SPP als extrazellulärer Ligand

Neben den intrazellulären Funktionen des SPP sind ebenso extrazelluläre beschrieben worden, die Rezeptor-vermittelt ablaufen. Diese Rezeptoren, die die Bezeichnung *EDG* tragen, gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und haben Lysophospho- und Lysosphingolipide (LPL) als spezifische Liganden. Die Bezeichnung *EDG* steht für „*Endothelial Differentiation Gene*“ und rührt von der Entdeckung des ersten Rezeptors, *EDG-1*, bei der Differenzierung von Endothelzellen her (Okazaki et al., 1993). Wie in folgenden Untersuchungen gezeigt werden konnte, ist SPP ein hoch-affiner Ligand des *EDG-1*-Rezeptors mit einem  $K_d$ -Wert von 8.1 nM (Lee et al., 1996).

Die *EDG*-Rezeptoren sind, wie alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, integrale Membranproteine, die sieben  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen aufweisen, die durch abwechselnde intrazelluläre und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Der N-Terminus des Rezeptors liegt extrazellulär, der C-Terminus dagegen intrazellulär. Allerdings sind keine Disulfidbrücken zwischen der ersten und zweiten extrazellulären Domäne beschrieben worden. Die Kopplung des Rezeptors an verschiedene trimere G-Proteine, darunter  $G\alpha_1$ ,  $G\alpha_q$  und  $G\alpha_{12/13}$ , sorgt für eine Weiterleitung des Signals ins Innere der Zelle und bedingt die unterschiedlich ausgeprägten zellulären Antworten auf das ursprüngliche Signal.



Heute sind insgesamt acht verschiedene *EDG*-Rezeptoren identifiziert, die sich durch unterschiedliche Affinitäten für ihre jeweiligen Liganden, eine unterschiedliche Expression in den Zellarten und Geweben sowie durch eine Kopplung an unterschiedliche G-Proteine auszeichnen.

Für die Rezeptoren *EDG*-1, -3, -5, -6 und -8 stellt SPP den spezifischen Liganden dar, während LPA an die Rezeptoren *EDG* - 2, - 4 und - 7 bindet. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen *EDG*-Rezeptoren, ihre jeweiligen Liganden und die interagierenden G-Proteine.

Die meisten Studien, die die anti-apoptotische Wirkung des SPP beweisen, führen dies auf die intrazelluläre Entstehung dieses Sphingolipids zurück, obwohl es auch einige Studien gibt, die auf die anti-apoptotischen Eigenschaften des SPP als extrazellulären Liganden eingehen. So schützt SPP in nanomolaren Konzentrationen die T-Lymphoblastoma-Zelllinie Tsup-1 vor Fas – und Ceramid-induziertem Zelltod (Goetzl et al., 1999).

Des Weiteren konnte in Endothelzellen gezeigt werden, dass durch Antisense-Techniken gegen *EDG*-1 und *EDG*-3 der SPP-vermittelte Schutz vor Ceramid-induzierter Apoptose aufgehoben wurde (Lee et al., 1999).

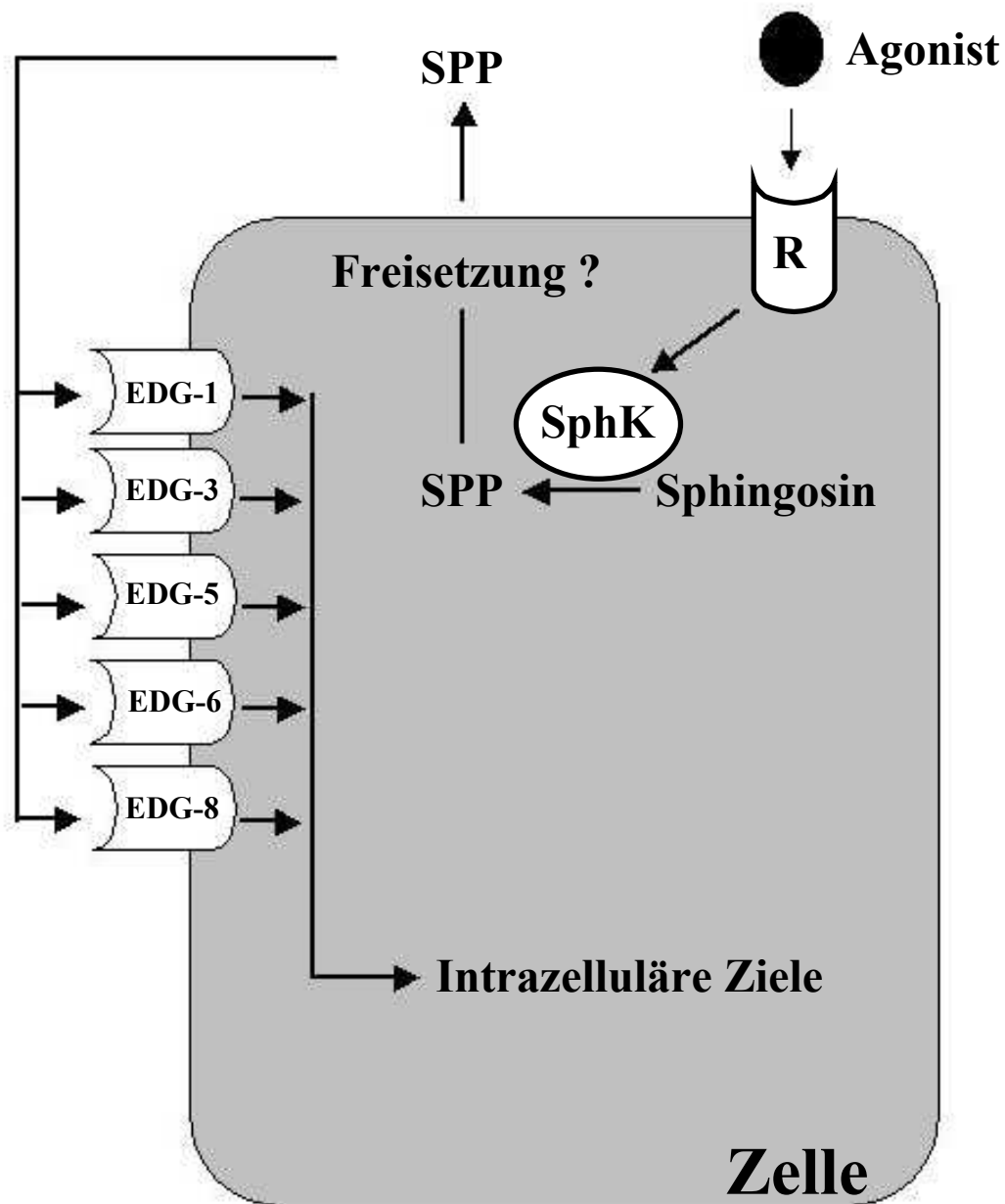
Durch die Antisense-Technik wird die translationale Initiationsstelle einer mRNA blockiert und im Folgenden die Translation des entsprechenden Proteins.

Die intra - und extrazelluläre Wirkung von SPP wirft die Frage nach einer möglichen autokrinen oder parakrinen Wirkungsweise dieses Sphingolipids auf (siehe Abb. 7). Möglicherweise wird intrazellulär gebildetes SPP durch die Zelle freigesetzt und ist in der Lage als Ligand der *EDG*-Rezeptoren benachbarter Zellen zu fungieren. Erst kürzlich wurde ein CFTR-vermittelter aktiver Transport von SPP durch zelluläre Membranen beschrieben, der eine Aufnahme von SPP ermöglicht (Boujaoude et al., 2002). Mit CFTR transfizierte Zellen wiesen eine verminderte Aktivierung der MAP-Kinasen durch SPP auf, was auf eine Konkurrenz des CFTR mit den *EDG*-Rezeptoren zurückgeführt wird.

**Tabelle 3: Mitglieder der Lysophospho- und Lysosphingolipid-(LPL) - bindenden Familie der *EDG*-Rezeptor-Familie**

Rezeptor	Ligand	G-Protein	Aminosäuren
<i>EDG-1</i>	SPP	$G\alpha_i, G\alpha_q, G\alpha_{12/13}$	382
<i>EDG-2</i>	LPA	$G\alpha_i, G\alpha_{11}$	364
<i>EDG-3</i>	SPP	$G\alpha_i, G\alpha_q, G\alpha_{12/13}$	378
<i>EDG-4</i>	LPA	$G\alpha_i, G\alpha_q, G\alpha_{12/13}$	382
<i>EDG-5</i>	SPP	$G\alpha_i, G\alpha_q, G\alpha_{12/13}$	354
<i>EDG-6</i>	SPP	$G\alpha_i, G\alpha_{12/13}$	384
<i>EDG-7</i>	LPA	$G\alpha_i, G\alpha_q$	353
<i>EDG-8</i>	SPP	$G\alpha_i$	398

Die genaue Funktion der genannten Rezeptoren ist zu weiten Teilen unbekannt. Bekannte Funktionen allerdings schließen z.B. die Aktivierung von ERK1/ERK2 über den Pertussistoxin-sensitiven *EDG-1* ein (Goodemote et al., 1995; Wu et al., 1995). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die *EDG-1*-vermittelte ERK-Aktivierung durch SPP von PI3K-Inhibitoren unterbunden wird (Rakhit et al., 1999). Diese Ergebnisse zeigen die Kopplung an *EDG-1* via  $G_i$  an PI3K-vermittelter Signaltransduktion.



**Abb. 7: Mögliche autokrine / parakrine Wirkungsweise von Sphingosin-1-phosphat (SPP):** Intrazellulär gebildetes SPP wird möglicherweise von der Zelle freigesetzt und wirkt als Ligand auf die *EDG*-Rezeptoren der eigenen oder die der benachbarten Zelle.

Abkürzungen: R = Rezeptor, SphK = Sphingosin-Kinase, SPP = Sphingosin-1-phosphat, EDG = Endothelial Differentiation Gene.

## **1.2 Die Biologie des Haarfollikels**

### **1.2.1 Die Bedeutung des Haarfollikels**

Haare findet man mit Ausnahme der Fußsohlen, Handflächen und der Schleimhäute überall am menschlichen Körper, wobei Dichte und Verteilung der Haarfollikel stark mit der Körperregion variieren. Während ein volles Haarkleid anderer Primaten einen wirkungsvollen Schutz vor widrigen Witterungseinflüssen bedeutet und einen gewissen Schutz vor Insekten bietet, so hat die Schutzfunktion der Körperhaare beim heutigen Menschen nur noch eine untergeordnete Bedeutung, da der größte Teil der Körperbehaarung verloren gegangen ist. Dennoch sind die Funktionen des vergleichsweise spärlichen Haarkleides beim heutigen Menschen sehr vielfältig und können im Wesentlichen drei Aspekten zugeordnet werden. Die Schutzfunktion ist dabei von zunehmend geringerer Bedeutung und wird vornehmlich nur noch durch das Kopfhaar bzw. die Wimpern und Augenbrauen ausgeübt. Erstere schützen vor UV-Strahlung und verhindern somit die Bildung von Tumoren, wie z.B. Basaliomen, oder die Entwicklung von aktinischen Keratosen; beide findet man zumeist auf dem unbehaartem Kopf. Die Haare der Wimpern und Augenbrauen verhindern ein Einlaufen von Schweiß in das Auge und somit eine Reizung desselben.

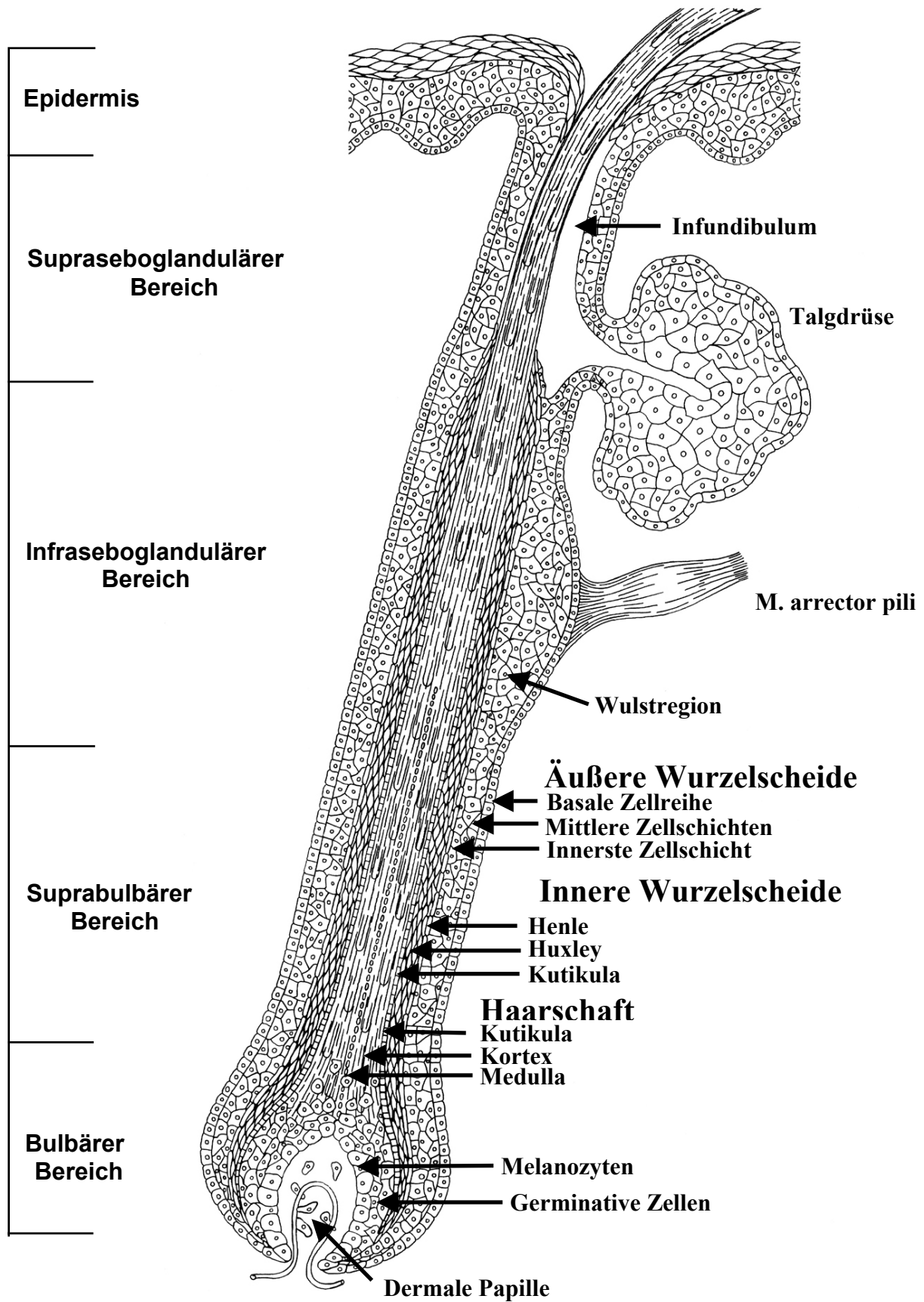
Zusätzlich zu diesen protektiven Funktionen kommt dem Haar auch eine sensorische, vor allem aber, als dritte Funktion, eine soziokommunikative bzw. ästhetische Bedeutung zu. Letztere ist heutzutage von steigender Bedeutung, da das Haar das Erscheinungsbild des Menschen maßgeblich prägt und somit sein Selbstverständnis und sein Selbstbewusstsein. In diesem Zusammenhang kommt dem Haar, besonders dem Haupthaar und dem Bart, eine signifikante Bedeutung als sexuelles äußeres Merkmal zu (Patzner, 1985). Während sich der überwiegende Teil der betroffenen erwachsenen Männer meist über kurz oder lang mit dem Schicksal der fortschreitenden Haarlosigkeit (Alopezie) auf dem Kopf abfindet, wird das selbe Schicksal bei Frauen als ungleich gravierender angesehen, sowohl von diesen selbst als auch von ihrer Umwelt. Gerade Alopezien im Kindesalter können häufig Auslöser schwerwiegender Störungen in der Persönlichkeitsentwicklung des/der Betroffenen sein. Die psychischen Auswirkungen der Haarlosigkeit sind somit offensichtlich und führen nicht selten zu einer Minderung des Selbstwertgefühls. Selbstverständlich sind diese aber in starkem Maße vom Geschlecht und Alter des / der Betroffenen abhängig, und ihre psychischen Folgen lassen sich daher nicht verallgemeinernd darstellen.

### 1.2.2 Der Aufbau des Haarfollikels

Man unterscheidet drei verschiedene Typen von Haaren, Lanugo-, Vellus- und Terminalhaare. Unabhängig vom Haartyp kann der Haarfollikel als ein komplex aufgebautes Anhangsgebilde der Haut aufgefasst werden, das sich aus mehr als 20 unterschiedlichen Zellpopulationen zusammensetzt, die epithelialen, mesenchymalen und neuroektodermalen Ursprungs sind. Diese Zellpopulationen bilden in einer präzise gesteuerten epithelialen-mesenchymalen Interaktion den Haarschaft, der als sichtbares Produkt des Haarfollikels über die Oberfläche der Epidermis reicht und im allgemeinen Sprachgebrauch als das „Haar“ bezeichnet wird. Allen drei genannten Haartypen ist gemeinsam, dass der gebildete Haarfollikel histomorphologisch den gleichen Aufbau besitzt und sich anhand der Lage der Talgdrüse hauptsächlich in drei Segmente unterteilen lässt. In vertikaler Richtung unterscheidet man einen suprasedoglandulären (infundibulären) Bereich, einen Isthmus-Bereich und einen infrasedoglandulären Bereich (siehe Abb. 8):

1. **Suprasedoglandulärer Bereich (*Infundibulum*):** Dieser Bereich umfasst den Teil des Haarfollikels, der aus dem Austritt des Follikels und der Einmündung der Talgdrüse in den Follikelkanal besteht.
2. **Isthmus-Bereich:** Dieses Segment des Haarfollikels bezeichnet den Bereich zwischen der Einmündung der Talgdrüse und dem M. arrector pili. Die Kontraktion dieses Muskels lässt die darunterliegende Haut sich zusammenziehen, wodurch die sog. „Gänsehaut“ entsteht. Dem Muskel gegenüber liegt die Wulstregion (Bulge), die nach heutiger Ansicht als Sitz der follikulären und epidermalen Stammzellen angesehen wird.
3. **Infrasedoglandulärer Bereich:** Segment zwischen der Haarwurzel und dem Musculus arrector pili.

Funktionell kann man den Haarfollikel in einen permanenten und einen transienten Abschnitt unterteilen. Der permanente Abschnitt reicht dabei vom Follikelostium bis zur Wulstregion und unterliegt keinen Zyklus-bedingten morphologischen Änderungen während des Haarzyklus (siehe Kapitel 1.2.6). Der transiente Anteil des Haarfollikels umfasst den bulbären Bereich mit der dermalen Papille, den darauf aufliegenden Melanozyten, den Matrixzellen und den germinativen Zellen. Dieser Bereich unterliegt dagegen starken Veränderungen während des Haarzyklus. Während der Phase des Katagens kommt es zu signifikanten Rückbildungsprozessen der Keratinozyten im transienten Teil des Haarfollikels, so dass dieser im Telogen in zwei Bereiche unterteilt werden kann (Parakkal, 1990).



**Abb. 8: Histomorphologischer Aufbau eines menschlichen Terminalhaarfollikels in seiner charakteristischen Gliederung** (nach der Habilitationsschrift von Prof. Dr. U. Blume-Peytavi).

### 1.2.3 Der Haarschaft

Der Haarschaft ist der keratinisierte, ausdifferenzierte Anteil des Haarfollikels, der über die Oberfläche der Epidermis reicht und allgemein als das „Haar“ bezeichnet wird. Er wird durch den Haarfollikel produziert und besteht im Wesentlichen aus komplett keratinisierten Haarmatrixzellen. Diese bilden auch die Haarrinde (Kortex). Diese ausdifferenzierten und axial ausgerichteten Kortexzellen bilden den Hauptteil der Haare und enthalten Keratin- und Tonofilamente, die durch Disulfidbrücken verbunden sind und somit ein äußerst starres Geflecht bilden. Zentral im Haarschaft liegt das röhrenförmige Haarmark (Medulla). Die Medulla ist ein mit Luft gefüllter Hohlraum, der nur beim Terminalhaar vorkommt und sich aus Haarmatrixzellen zusammensetzt, welche direkt oberhalb der Papillenspitze sitzen. Als äußerste Schicht des Haares fungiert die Kutikula, welche aus sich überlappenden Kutikulazellen besteht und die Haarrinde komplett bedeckt.

Die Farbe des Haarschaftes wird durch Art, Verteilung und Anzahl der Melanozyten in der Haarrinde bedingt. Die Ausprägung der verschiedenen Haarformen wird durch ein genetisch bedingtes Expressionsprofil der Keratine und Matrixproteine in der inneren Wurzelscheide bestimmt (Thibaut et al., 2003).

Aufgrund der Morphologie lassen sich in Abhängigkeit vom Alter und der Lokalisation hauptsächlich drei verschiedene Typen von Haaren unterscheiden: Lanugohaar, Vellushaar und Terminalhaar. Da gerade die beiden letzten Typen sich nicht immer eindeutig voneinander unterscheiden lassen, wurde für einen zwischen diesen Typen auftretenden Haartyp der Begriff des „intermediären Haares“ geprägt. Dieser ist wie das Terminalhaar markhaltig, gleichzeitig jedoch dünner und geringer pigmentiert als dieser. Die drei erstgenannten Haartypen lassen sich anhand folgender Kriterien unterscheiden.

Das Lanugohaar ist weich, fein, kurz, ohne Mark und nicht pigmentiert. Lanugohaar ist das Körperhaar der Föten und wird nach der Geburt durch Vellushaare, z. T. auch durch Terminalhaare ersetzt.

Das Vellushaar, auch Wollhaar genannt, ist sehr kurz ( $< 2$  cm) und dünn ( $< \varnothing 30 \mu\text{m}$ ), überwiegend unpigmentiert und marklos. Es stellt das überwiegende Körperhaar dar, das an Armen, Beinen usw. zu finden ist.

Terminalhaare sind lang ( $> 2$  cm), dick ( $> \varnothing 30 \mu\text{m}$ ), meist pigmentiert und markhaltig. Als Kopfhaar, Wimpern und Augenbrauen ist Terminalhaar bereits vor der Geburt vorhanden, ansonsten ersetzt es das Vellushaar am Körper in Androgen-abhängigen Regionen erst nach der Pubertät. Das Terminalhaar macht beim erwachsenen Mann den überwiegenden Anteil der Körperbehaarung aus.

#### **1.2.4 Die Haarwurzel (Bulbus)**

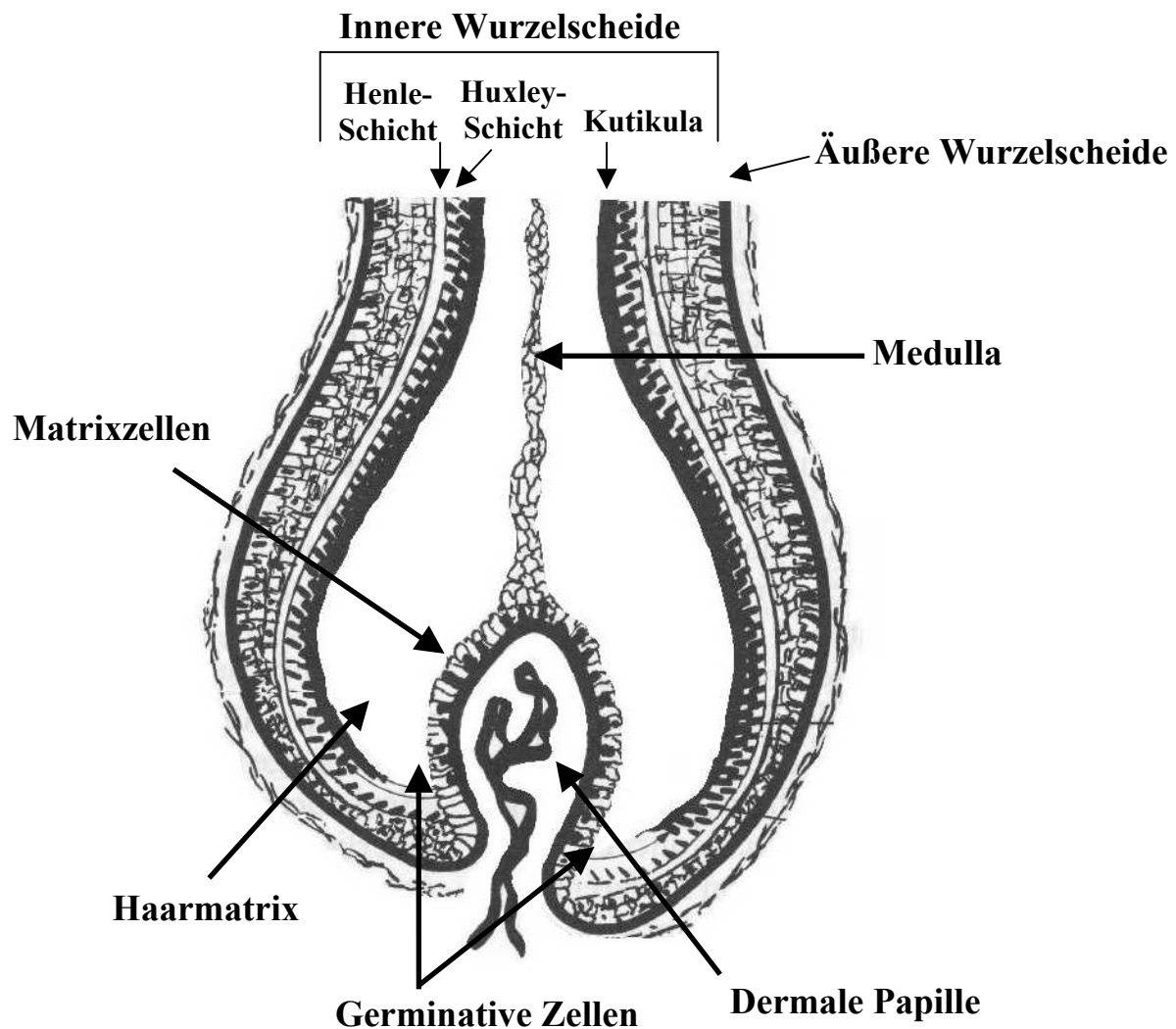
Die Haarwurzel reicht in der Kopfhaut bis in das subkutane Fettgewebe und bildet das Ende des Haarfollikels. Entwicklungsgeschichtlich besteht die Haarwurzel aus zwei Komponenten: einem ektodermalen Teil, der Haarmatrix, sowie einem mesenchymalen Teil, der Papille. Die Matrix weist bei proliferierenden Zellen eine hohe mitotische Aktivität auf und teilt sich alle 23 – 72 Stunden (van Scott et al., 1963). Durch diese Zellaktivität steigen die Matrixzellen in höhere Regionen auf und ordnen ihre Achsen entsprechend der Follikelachse an. Die dermale Papille als mesenchymale Komponente der Haarwurzel wird als die Steuerungszentrale des Haarfollikels betrachtet, die die epitheliale-mesenchymale Interaktion während des Haarzyklus steuert (Jahoda und Oliver, 1990; Oliver, 1991). Strukturell gleicht sie einem Ei, das in die Haarmatrix eingebettet ist. Im Laufe des Haarzyklus ändert die Papille ihre Größe und Form drastisch. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass die Größe der dermalen Papille mit der Größe des Haarbulbus korreliert (Schell, 1997). Da die Größe der Haarwurzel mit der Dicke des Haares korreliert, ist die Größe der Papille zur Dicke des Haares selbst proportional (Durward und Rudall, 1958; Schinkel, 1961). Die Abb. 9 zeigt schematisch die Anatomie der Haarwurzel eines menschlichen Haarfollikels.

#### **1.2.5 Die Haarwurzelscheiden**

Der Haarschaft ist seiner Länge nach von epithelialen Wurzelscheiden umgeben. Die dem Haarschaft am nächsten liegende Schicht ist die innere Wurzelscheide. Sie setzt sich aus der äußeren Henle-Schicht, der mittleren Huxley-Schicht und der Kutikula zusammen (siehe Abb. 9). Alle drei Schichten stammen von am äußeren Rand gelegenen Matrixzellen ab. Die innere Wurzelscheide reicht vom Bulbus bis zum Infundibulum hoch und wird dabei immer dicker. Somit hat die innere Wurzelscheide eine strukturgebende Funktion für den Haarschaft und stützt bzw. formt diesen.

Die äußere Wurzelscheide stellt die äußerste Schicht dar, die den Kortex umgibt. Auch diese Schicht ist in der Region des Bulbus am dünnsten und wird zum Isthmus hin deutlich dicker. Die Zellen der äußeren Wurzelscheide sind epithelialen Ursprungs. In der Region des Musculus arrector pili ist diese Schicht verdickt und bildet den sog. „Bulge“. Diese Region der äußeren Wurzelscheide wird als der Sitz der follikulären Stammzellen betrachtet (Lavker et al., 1993; Akiyama et al., 1996; Taylor et al., 2000). In einem präzise gesteuertem, in seinen molekularen Einzelheiten aber bis heute wenig verstandenem, Wechselspiel mit der dermalen Papille, wird der Aufbau der Haarfollikels gesteuert (siehe Kapitel 1.2.6).





**Abb. 9:** Schematische Darstellung der Haarwurzel eines menschlichen Haarfollikels im Stadium des Anagens (Abb. nach Schell, 1997).

### 1.2.6 Haarzyklus und Haarwachstum

Das Wachstum des Haares ist kein kontinuierlicher Prozess, sondern kann vielmehr als das Ergebnis eines komplexen dynamischen Vorgangs aufgefasst werden, in dem sich einzelne Phasen rhythmisch wiederholen. Dieser Zyklus, der sog. Haarzyklus, lässt sich chronologisch in eine Wachstums-Phase (Anagen), eine Regressions-Phase (Katagen) und eine Ruhe-Phase (Telogen) untergliedern. Der Haarzyklus ist für das Wachstum der Haare insofern von zentraler Bedeutung, als die zeitliche Dauer seiner einzelnen Phasen die Wachstumsaktivität der Haare festlegt. Alles therapeutische Bestreben konzentriert sich somit auf eine zeitliche Ausdehnung des Anagens bzw. auf ein möglichst langes Hinauszögern des Übergangs zum Katagen. Eine verfrühte Induktion des Katagens bzw. ein Abbruch der Wachstums-Phase geht

mit einem vorzeitigen Verlust der Haare einher. Somit kann der Haarausfall auch als Ausdruck einer zugrunde liegenden metabolischen Störung oder Grunderkrankung aufgefasst werden, in deren Folge es zu Differenzierungs - bzw. Proliferationsstörungen und Induktion von apoptotischen Prozessen im Haarfollikel kommt.

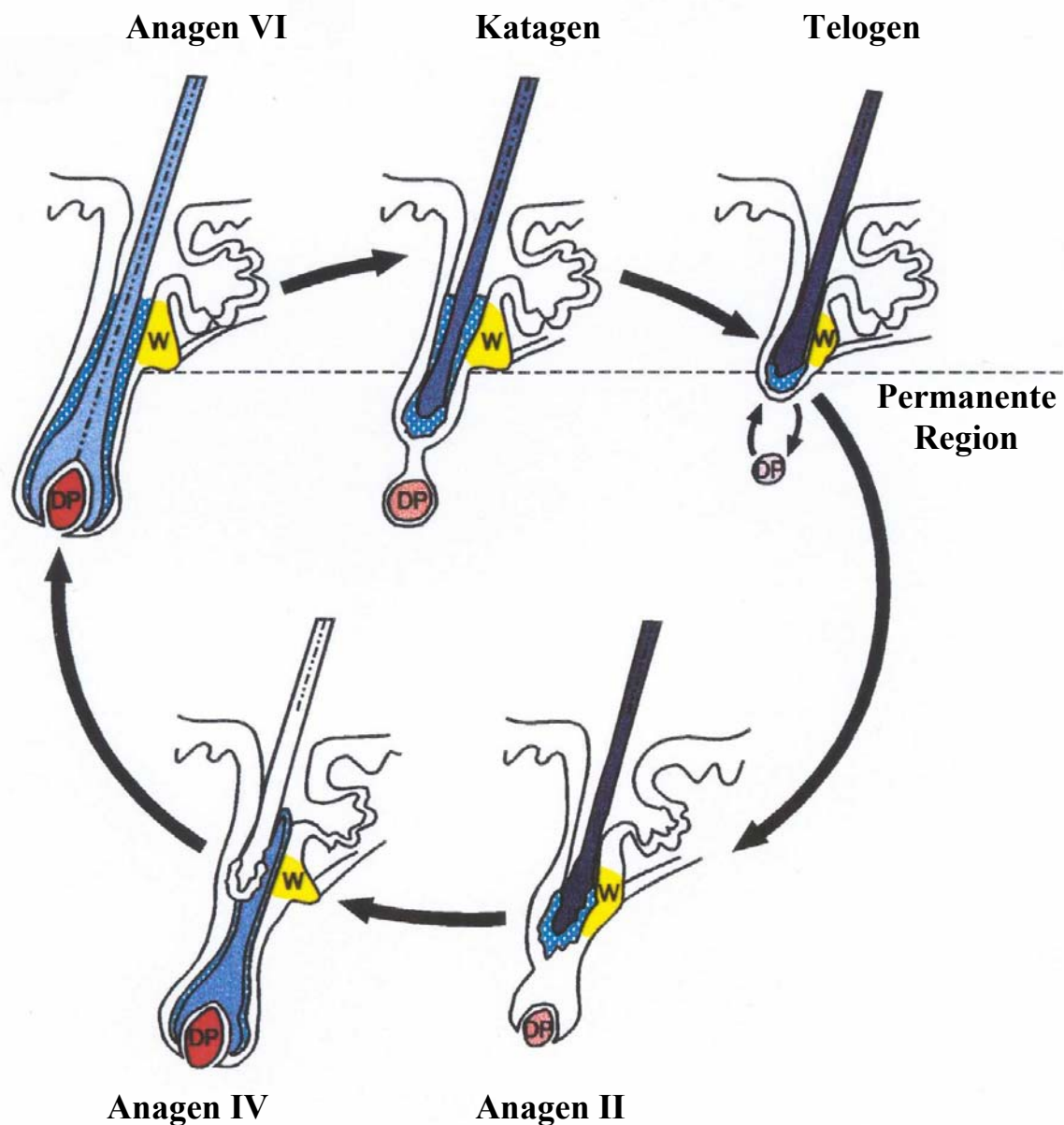
Die anagene Phase wird auch als sog. „aktive Phase“ bezeichnet. In ihr wird das Haar vom Haarbulbus in Interaktion mit den epithelialen follikulären Stammzellen produziert. Die sich anschließende Regressionsphase zeichnet sich durch eine Abnahme der mitotischen Aktivität des Haarbulbus aus. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass ein großer Anteil der follikulären Keratinozyten (FK) während des Katagens durch apoptotische Prozesse zugrunde geht (Cotsarelis et al., 1990; Lindner et al., 1997). In der darauf folgenden Ruhe-Phase kommt es zum Ausfall des Haares. Daran schließt sich die erneute Bildung eines Haarfollikels aus den Resten der dermalen Papille und dem permanenten oberen Follikelabschnitt an. Nun beginnt ein neuer Haarzyklus, der sich durch erneute erhöhte mitotische Aktivität von Zellen im Bereich des Wulstes (Bulge) auszeichnet.

Gleichzeitig verdickt sich die äußere Haarwurzelscheide im Bereich des m. arrector pili (Anagen I). Durch Umwachsen der verbliebenen Zellen der Papille durch Zellen der äußeren Wurzelscheide wird ein neuer Bulbus gebildet (Anagen II). Nun proliferieren die Zellen der Papille und verdicken diesen, wodurch sich der Durchmesser der Papille vergrößert. Die aus den Keratinozyten der äußeren Haarwurzelscheide neu entstandenen Matrixzellen bilden eine neue Keratinkapsel aus, die an der äußeren Wurzelscheide hochwächst (Anagen III). Diese Matrixzellen bilden durch Proliferation die innere Wurzelscheide aus (Anagen IV). Das neu gebildete Haar reicht im Anagen V an die Epidermis heran, wobei die innere Wurzelscheide vollständig ausdifferenziert ist und die Haarwurzel ihren maximalen Durchmesser erreicht hat. Der neu entstandene Haarschaft drängt das noch vorhandene Telogenhaar beiseite. Die nun beginnende Phase des Anagen VI zeichnet sich durch ein Wachstum des Haares durch Proliferation der Matrixzellen aus. Gleichzeitig ändern sich die Strukturen der Haarwurzel in dieser Phase nicht. Das Anagen VI der Kopfhaare kann bis zu 8 Jahren dauern, bevor es zu einer Einleitung der Regressionsphase kommt. Für eine übersichtlichere Gliederung nennt man die Phasen des Anagens I bis V auch *Proanagen*, das Anagen VI auch *Metaanagen*.

Als Zeichen einer Beendigung der Anagenphase ist eine Abnahme der mitotischen Aktivität der Matrixzellen zu beobachten, einhergehend mit einer Verkleinerung der Haarwurzel (Katagen I). Das Haar wird an seinem proximalen Ende zunehmend dünner. Im Katagen II löst sich die Papille nahezu auf, und lediglich einzelne Papillenzellen liegen noch unterhalb der epithelialen Zellen. Im Katagen III wird der Haarkolben in die obere Follikel Ebene

verschoben. In dieser Phase ist er noch von verhornten Zellen umgeben. Sobald diese Hülle sich aufgelöst hat, ist das Katagen beendet, und das Telogen (Ruhe-Phase) schließt sich an. Nach ein paar Monaten wird das Haar dann als Kolbenhaar abgestoßen. Der Haarzyklus schließt sich nun durch eine erneute Bildung eines Haarfollikels mit dem damit verbundenen Eintritt in das Anagen. Die beschriebenen Vorgänge sind in der Abbildung 10 schematisch dargestellt.

Im Gegensatz zum Anagen liegt die Dauer des Katagens lediglich zwischen 2 und 4 Wochen. Die Phase des Telogens beträgt im Schnitt ungefähr 2 bis 4 Monate. Somit ergibt sich, dass sich ungefähr 9/10 der Kopfhaare im Anagen befinden und lediglich 1/10 im Telogen. Das Wachstum der Haare erfolgt beim Menschen nicht synchronisiert, d.h. benachbarte Haarfollikel können sich in unterschiedlichen Stadien des Haarzyklus befinden (Chase, 1954). Man spricht in diesem Zusammenhang von einer Asynchronität des Haarwachstums. Diese hat zur Folge, dass bei einem physiologischen Verlust der Haare (100 Haare/d) keine partielle Alopezie am Kopf entsteht.



**Abb. 10: Die Wachstums-Phasen eines Haares:** Das Haarwachstum verläuft in zyklischen Zuständen über eine Wachstums-Phase (Anagen), eine Regressions-Phase (Katagen) und eine Ruhe-Phase (Telogen). Mit beginnendem Katagen finden Rückbildungsprozesse im unteren transienten Teil des Haarfollikels statt, während der Haarfollikel in der oberen permanenten Region kaum Veränderungen aufweist (unterbrochene Linie) (Abb. nach der Habilitationsschrift von Prof. Dr. U. Blume-Peytavi).

### 1.2.7 Apoptose im Haarfollikel

Eine charakteristische Eigenschaft von Haaren ist ihr zyklisches Wachstum, das in mehreren Phasen verläuft. Dieser Zyklus beinhaltet eine Wachstums-Phase, eine Rückbildungs-Phase (Katagen) und eine Ruhe-Phase, nach welcher dann der Kreislauf durch erneuten Eintritt in die Wachstums-Phase geschlossen wird.

Ein zentrales Ereignis des Haarzyklus sind apoptotische Prozesse von epithelialen Zellen im Katagen (Weedon et al., 1979; Polakowska et al., 1994; Lindner et al., 1997; Magerl et al., 2001). Die ersten Untersuchungsmethoden, um diese apoptotischen Prozesse zu untersuchen, richteten sich auf die DNA-Fragmentierung des Chromatins, die als Folge apoptotischer Prozesse auftritt. Durch internukleosomale Spaltung der DNA entstehen Strangbrüche, die durch die TUNEL-Technik markiert und entsprechend nachgewiesen werden können. Sie ermöglicht somit eine Identifizierung der apoptotischen Zelle. In der Tat wurde mit dieser Technik bei murinen Haarfollikeln im Katagen das typische Spaltungsmuster der DNA gefunden (Lindner et al., 1997; Müller-Rover et al., 1999). Die proximalen Keratinozyten um die dermale Papille zeigten als erste TUNEL-positive Färbung, im weiteren Verlauf dann auch solche des epithelialen Bestandteils des Haarfollikels distal der Haarwurzel. In diesem Zusammenhang konnte ebenso gezeigt werden, dass die apoptotischen Keratinozyten in mehreren Verbänden (Clustern) auftraten und nicht, wie bei apoptotischen Prozessen sonst üblich, als singuläre Zellen. Da das Auftreten des DNA-Spaltungsmusters allerdings zum finalen Stadium der Apoptose zählt und die TUNEL-Technik falsch-positive Ergebnisse ergeben kann, ist sie als alleiniger Nachweis apoptotischer Prozesse von reduzierter Aussagekraft. Erschwert wird die Bewertung TUNEL-positiver Ergebnisse zudem, da selbst Anagen-Haarfollikel eine solche positive Färbung zeigten, wenn auch in geringerem Ausmaß (Kishimoto et al., 1997; Lindner et al., 1997). Im Gegensatz dazu konnten bislang keine apoptotischen Prozesse in den dermalen Papillenzellen mit Hilfe des TUNEL-Assays nachgewiesen werden (Tobin et al., 1998). Aufgrund der geringen Aussagekraft des TUNEL-Assays wurde im Folgenden nach Bestandteilen der Apoptose-Maschinerie in Zellen des Haarfollikels geforscht bzw. nach frühen Ereignissen in der Apoptose.

Wie Studien von Lindner und Kollegen am Maus-Modell zeigen konnten, kommt es während des Katagens zu einer verstärkten Expression des Interleukin-1-converting enzyme (ICE), sowie zu einer Verschiebung des bcl-2 / bax-Verhältnisses im epithelialen Teil des Haarfollikels (Lindner et al., 1997). Im Stadium des Anagens wird die bcl-2-Expression im Bulbus, dem Bulge und den ORS-Keratinozyten gefunden. Mit beginnendem Katagen nimmt diese Expression im follikulärem Epithelium dagegen ab. Diesem Ergebnis stehen allerdings

Untersuchungen an bcl-2-knockout-Mäusen entgegen, bei denen ein zu großen Teilen normales Haarwachstum gefunden wurde (Veis et al., 1993). Somit scheint bcl-2 ein Faktor unter anderen zu sein, der apoptotische Prozesse im Haarfollikel regulieren könnte, es ist allerdings mit Bestimmtheit nicht der zentrale Faktor.

Bei der Untersuchung der Expression von Todes-Rezeptoren im Haarfollikel konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoren CD95, p55TNFR und p75NTR im proximalen Epithelium während des Katagens exprimiert sind, allerdings nicht in der dermalen Papille (Lindner et al., 1997). Im distalen Bereich des Haarfollikels, der keinen Zyklus-bedingten Änderungen unterliegt, wurde eine diffuse Expression dieser Rezeptoren gefunden, während es im sich zurückbildenden Teil des Haarfollikels zu einer partiellen Hochregulierung kam. Das frühe Katagen zeigt lediglich die Expression von p55TNFR in der Haarmatrix, während die Rezeptoren CD95 und p75NTR nur im ORS (*outer root sheath*) gefunden werden. Im weiteren Verlauf findet man dagegen alle drei Rezeptoren im ORS und den epithelialen Bereichen. Transkripte von TGF- $\beta$ 1, einem Katagen-induzierendes Zytokin, werden im follikulären Epithelium kurz vor der Katagen-Induktion gefunden (Foitzik et al., 2000).

Zur Zeit sind die molekularen Mechanismen, die den apoptotischen Prozessen beim Übergang vom Anagen zum Katagen zugrunde liegen, nur unvollständig verstanden. Die Untersuchungen diesbezüglich deuten jedoch darauf hin, dass es das *eine* Signal nicht gibt, sondern dass wahrscheinlich mehrere pro-apoptische Faktoren diesen Prozess begünstigen und für die dramatischen Rückbildungsprozesse im epithelialen Anteil des Haarfollikels verantwortlich sind. Somit ist die Klärung der zugrundeliegenden Prozesse ein zentraler Schwerpunkt der aktuellen Haarforschung.