

5. Ergebnisse

5.1 Expression der PDGF-Rezeptoren α/β in dermalen Papillenzellen (DPC) und folliculären Keratinozyten (FK) auf Gen-Ebene

Die Expression der beiden PDGF-Rezeptoren wurde in folliculären Keratinozyten und dermalen Papillenzellen auf der Transkriptionsebene durch RT-PCR-Analyse untersucht. Die experimentelle Vorgehensweise für die Gewinnung der cDNA entsprach exakt derjenigen wie unter 4.4.10 beschrieben. Die gewählten Primer spezifizierten Fragmente von 491 bp für PDGFR α und 524 bp für PDGFR β . Das unten stehende Temperatur-Profil wurde sowohl für die Amplifikation der PDGFR-Fragmente verwendet, als auch für die β -Actin-PCR.

Folgendes Programm-Profil wurde gewählt

- | | |
|---------------------|-----------------------------------|
| 1. 94 °C für 3 min | Initiale Denaturierung |
| 2. 94 °C für 1 min | Denaturierung |
| 3. 61 °C für 1 min | Primer-Hybridisierung |
| 4. 72 °C für 45 s | Synthese |
| 5. 29 x | Wiederholung der Schritte 2. - 4. |
| 6. 72 °C für 10 min | Terminale Synthese |

Eine starke mRNA-Expression der beiden Rezeptoren konnte in kultivierten DPC nachgewiesen werden (A), während FK lediglich eine schwache, aber noch detektierbare Expression der beiden untersuchten Rezeptoren aufwies (B). Die zusammengefassten Ergebnisse sind in der Abbildung 12 gezeigt.

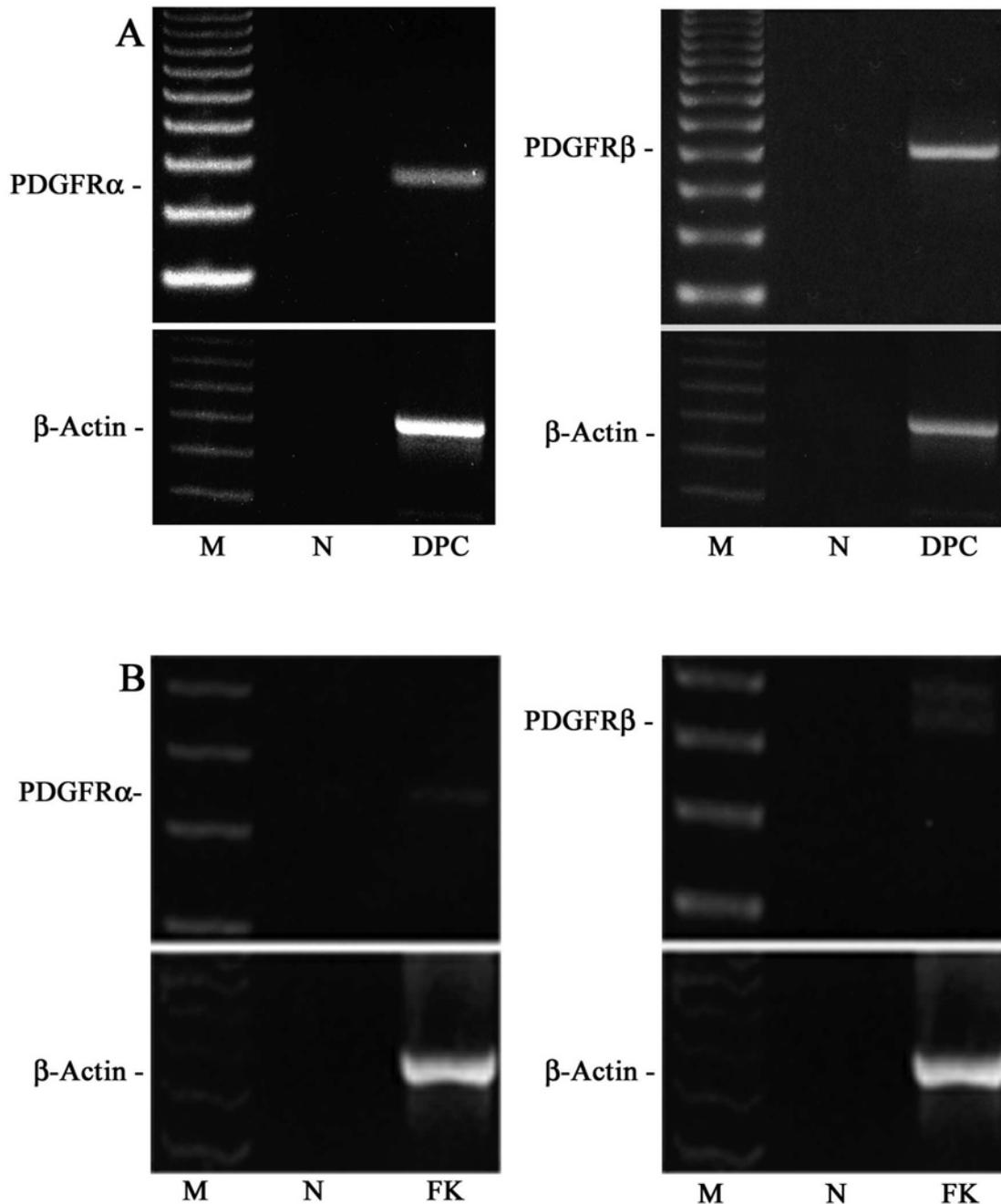


Abb. 12: Expression von PDGFR α und PDGFR β in folliculären Keratinozyten (FK) und dermalen Papillenzellen (DPC): RT-PCR-Analysen zeigen die Anwesenheit von PDGFR α (491 bp) und PDGFR β (524 bp) in dermalen Papillenzellen (A). Die beiden Rezeptoren sind dagegen nur schwach in folliculären Keratinozyten exprimiert (B). Als Marker (M) diente 123-bp-DNA (Gibco BRL, Karlsruhe, D, Spur 1). Die Negativkontrolle (N) ist auf der Spur 2 aufgetragen. Die Abbildungen zeigen charakteristische Ergebnisse von drei Untersuchungen dieser Art (n = 3).

5.2 Klonierung und Sequenzierung der amplifizierten PDGFR-Fragmente

Die durch RT-PCR generierten Fragmente wurden in den pT-Adv-Vektor kloniert und damit DH5 α -Zellen (*E.coli*) transfiziert. Nach der Identifikation der positiven Insert-enthaltenden Klone wurden die Inserts sequenziert, um sicherzustellen, dass die ursprünglich amplifizierten Fragmente tatsächlich aus den jeweiligen PDGF-Rezeptoren abgeleitet und nicht durch eine mögliche Interferenz der Primer mit ähnlichen Zielsequenzen anderer Gene entstanden waren. Da es zu Beginn der PCR-Untersuchungen Spezifitätsprobleme beim Nachweis der PDGF-Rezeptoren gab, wurden die folgenden PCR-Untersuchungen mit eingerückten Primerpaaren („Nested PCR“) durchgeführt, womit eine wesentliche Steigerung sowohl in der Sensitivität als auch in der Spezifität der PDGF-spezifischen Amplifikate für diese zwei Rezeptoren erzielt werden konnte. Dabei entstand im ersten Zyklus das größere (524 bp)-Fragment, welches in der zweiten Amplifikationsrunde als Template diente. In dieser zweiten Runde entstand ein kleineres (403 bp)-Fragment. Im Rahmen der Sequenzanalyse wurde das zweite, kleinere Fragment des PDGFR β untersucht.

Diese Arbeiten begannen mit der Isolierung der totalen RNA aus den zu untersuchenden Zellen (Kapitel 4.4.2) und der Untersuchung dieser RNA, um jegliche Degradationsprozesse auszuschließen (Kapitel 4.4.7). Nach der Optimierung der PCR-Protokolle für DPC und FK waren in den Untersuchungen jeweils nur noch diejenigen Banden für PDGFR α und PDGFR β erkennbar, welche die vorausberechneten Größen aufwiesen (491 bp für PDGFR α und 403 bp für PDGFR β). Diese Fragmente wurden aus den Gelen ausgeschnitten, und das jeweilige Fragment wurde eluiert (Kapitel 4.4.9). Nach Ligation der Fragmente in den pT-Adv-Vektor (Kapitel 4.4.11) wurden die DH5 α -Zellen chemisch transfiziert (Kapitel 4.4.13). Nach Ausstreichen der Zellen auf Selektions-Medium wurden am nächsten Tag die positiven Klone gepickt. Insgesamt wurden für PDGFR α sieben Klone und für PDGFR β 5 Klone gepickt. Nach der PCR mit den positiven Klonen (Kapitel 4.4.15) wurden für das weitere experimentelle Vorgehen von den PDGF-Rezeptoren je zwei Klone ausgewählt (Nr. 4 und 7 für PDGFR α (Abb. 13 A) und Nr. 4 und 5 für PDGFR β) (Abb. 13 B).

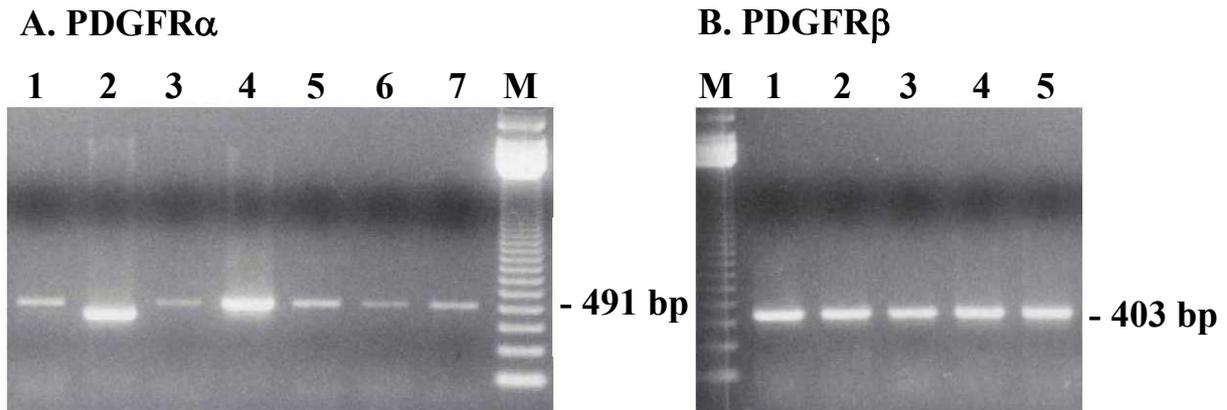


Abb. 13: PCR-Untersuchung der gepickten positiven Klone der PDGF-Rezeptoren: Die Klone 4 und 7 für PDGFR α bzw. 4 und 5 für PDGFR β wurden durch RT-PCR-Analyse auf das Vorhandensein des passenden PDGFR-spezifischen Inserts untersucht (Kapitel 4.4.15). Zur Größenkontrolle wurde ein Marker (M) mit dem n-Fachen von 123 bp aufgetragen.

Die jeweiligen Klone der transfizierten *E. coli* wurden üN in der Schüttelkultur vermehrt (Kapitel 4.4.12) und anderntags die Plasmide wie beschrieben aufgereinigt (Kapitel 4.4.14). Da die ligierten Fragmente beiderseits von *EcoR*-I-Schnittstellen flankiert waren, wurden die Fragmente mit dieser Restriktionsnuklease aus dem Vektor geschnitten (Kapitel 4.4.16) und auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und überprüft (Abb. 14).

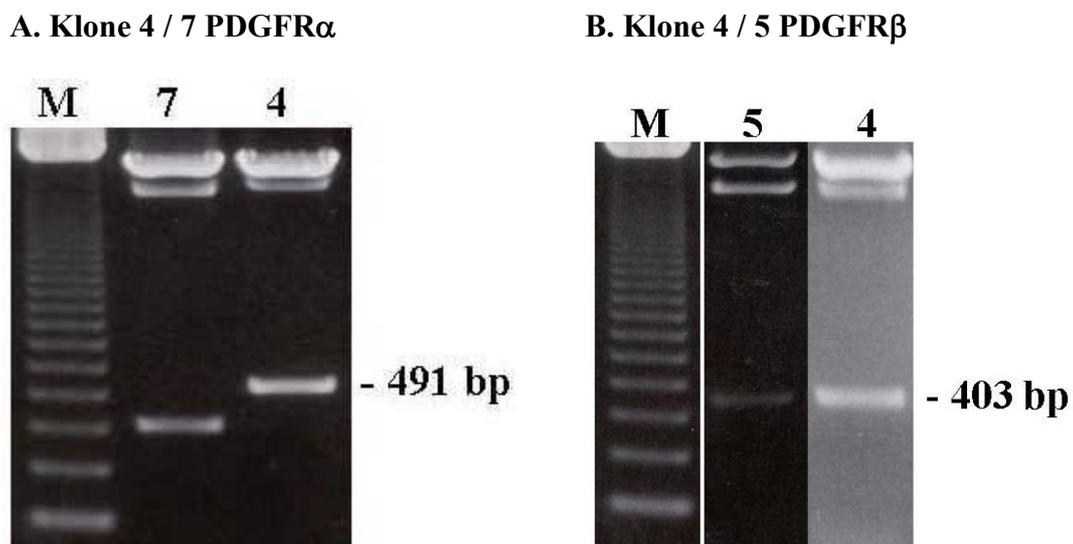


Abb. 14: Restriktionsverdau der Plasmide mit *EcoR* I: Die Klone 4 und 7 für PDGFR α bzw. 4 und 5 für PDGFR β wurden durch *EcoR* I aus dem pT-Adv-Vektor geschnitten und auf Agarose-Gelen überprüft. Zur Größenkontrolle wurde ein Marker (M) mit n-Fachen von 123 bp aufgetragen.

Mit zwei der vier Klone (Klon 4 für PDGFR α und Klon 4 für PDGFR β) wurden die Sequenzreaktionen gestartet (Kapitel 4.4.17). Die Sequenzierung erfolgte doppelsträngig. Die Ergebnisse der Sequenzierung mit anschließender vergleichender Datenbankanalyse belegten die eindeutige Abstammung der amplifizierten Fragmente aus den jeweiligen Rezeptoren.

5.3 Expression der PDGF-Rezeptoren α/β in dermalen Papillenzellen (DPC) und follikulären Keratinozyten (FK) auf Protein-Ebene

Um die Expression der beiden PDGF-Rezeptoren auf Protein-Ebene zu untersuchen, wurden die kultivierten DPC und FK lysiert und 50 μ g der Lysate auf denaturierende Polyacrylamid-Gele (SDS-PAGE) aufgetragen. Nach dem Transfer auf Nitrocellulose-Membranen erfolgte eine Inkubation mit polyklonalen anti-PDGFR α - und anti-PDGFR β -Antikörpern. In diesen Untersuchungen dienten Lysate von Swiss-3T3-Fibroblasten als Positivkontrolle, da die Expression der beiden Rezeptoren in diesen Zellen eindeutig nachgewiesen ist (Olivera und Spiegel, 1993).

Die Western-Blots der dermalen Papillenzellen zeigen eine ausgesprochen starke Immunreaktion mit den anti-PDGFR β -Antikörpern bei einem apparenten Molekulargewicht von 180 kDa. Diese Größe entspricht exakt derjenigen des PDGFR β (Abb. 15 D). Des Weiteren zeigen die Lysate der als Positivkontrolle genutzten Swiss-3T3-Fibroblasten ein vergleichbares Färbemuster. Zwei weitere Proteinbanden mit 130 kDa und 85 kDa stellen vermutlich Degradationsprodukte des Rezeptors dar (Hart et al., 1987). Diese Degradation wird auf die Aufarbeitung der Zellen im Rahmen der Lysatherstellung zurückgeführt. Nach der Entwicklung der Blotmembran wurde diese gestrippt und mit anti-PDGFR α -Antikörpern inkubiert. Hier zeigte sich jedoch die völlige Abwesenheit des Rezeptor-Proteins in dermalen Papillenzellen (Abb. 15 C), obwohl in vorherigen Untersuchungen das entsprechende Transkriptions-Produkt nachgewiesen werden konnte.

Die follikulären Keratinozyten zeigten dagegen bei beiden Färbungen eine starke Immunreaktion (Abb. 15 A und B).

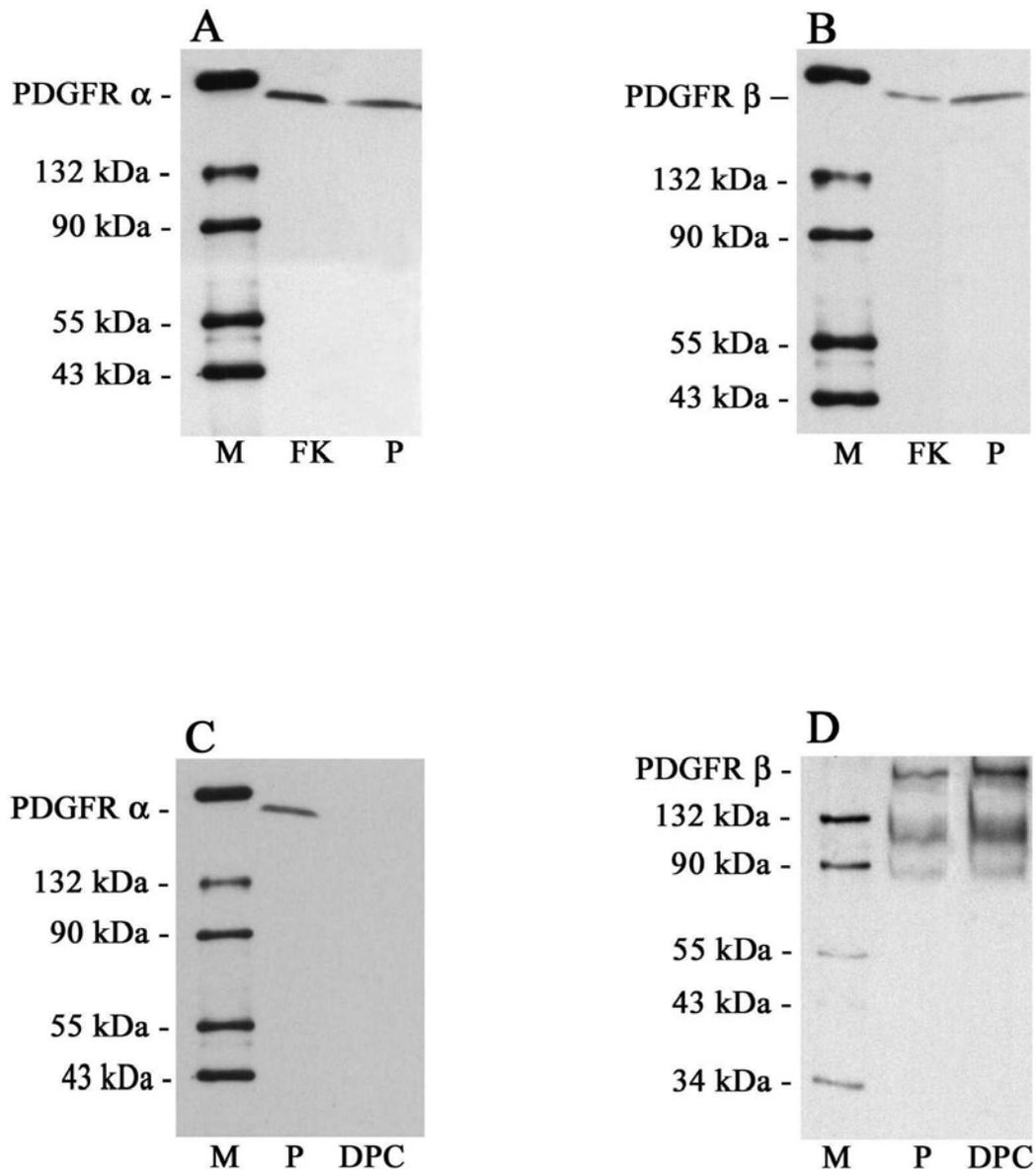


Abb. 15: Western-Blot-Analyse der Expression beider PDGF-Rezeptoren in folliculären Keratinozyten (FK) und dermalen Papillenzellen (DPC): Äquivalente Mengen (50 μ g) der Zytosole von FK und DPC wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf NC-Membranen geblottet. Die Abbildungen 15 A und 15 B zeigen die Immunblots der FK mit anti-PDGFR α - und anti-PDGFR β -Antikörpern. Das Zytosol von Swiss-3T3-Fibroblasten diente als Positivkontrolle. Die Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 180 kDa bei beiden Färbungen entspricht dem PDGF-Rezeptor. Die Expression beider Rezeptoren konnte lediglich bei FK nachgewiesen werden. Kultivierte DPC exprimierten lediglich den PDGFR β und blieben für den PDGFR α negativ.

5.4 Immunhistochemische Färbung der PDGF-Rezeptoren in dermalen Papillenzellen (DPC) und folliculären Keratinozyten (FK)

In weiteren Studien wurde die Expression der PDGF-Rezeptoren in DPC und FK durch immunhistochemische Techniken untersucht. Dabei wurde einerseits die APAAP-Methode verwendet, andererseits wurde das Verfahren der sog. „Whole Organ Culture (WOC)“ angewandt. Bei der letztgenannten Technik werden ganze Haarfollikel kultiviert, so dass ein Vergleich beider Methoden mögliche Expressionsunterschiede zwischen der *in-vitro*- und *in-vivo*-Situation aufdecken kann.

Für die APAAP-Methode wurden die Zellen auf Objektträger zentrifugiert und nach der Fixierung mit Aceton gegen beide PDGF-Rezeptoren gefärbt. Die Ergebnisse bestätigten die Western-Blot-Analyse und zeigten die Expression beider Rezeptoren in FK (PDGFR α , Abb. 16 C, und PDGFR β , Abb. 16 D), aber nur die Expression von PDGFR β in DPC (Abb. 16 A), während keine PDGFR α -positive Färbung in DPC zu erkennen war (Abb. 16 B).

Kultivierte DPC zeigten eine besonders intensive Färbung an den Membranen, während FK wesentlich weniger intensiv immunhistochemisch färbten. Obwohl das Verfahren des APAAP nur als semi-quantitativ betrachtet werden kann, so weisen die Ergebnisse auf eine deutlich stärker ausgeprägte Expression des PDGFR β in DPC im Vergleich zu FK hin.

Es war keine positive Färbung erkennbar, wenn die primären Antikörper durch Serum in gleicher Konzentration ersetzt wurden, was die eindeutige Spezifität der Färbungen beweist (Abb. 16 E und Abb. 16 F).

Die Färbung der WOC bestätigten die Ergebnisse der APAAP-Methode. Es ist eine starke Expression von PDGFR β in der dermalen Papille (Abb. 17 B) und im Epithelium des Haarfollikels erkennbar (Abb. 17 D). Der PDGFR α ist dagegen in den Zellen der dermalen Papille nicht detektierbar, wohl aber in den Zellen der fibrösen Hülle (Abb. 17 C) und im epithelialen Teil des Haarfollikels (Abb. 17 C).

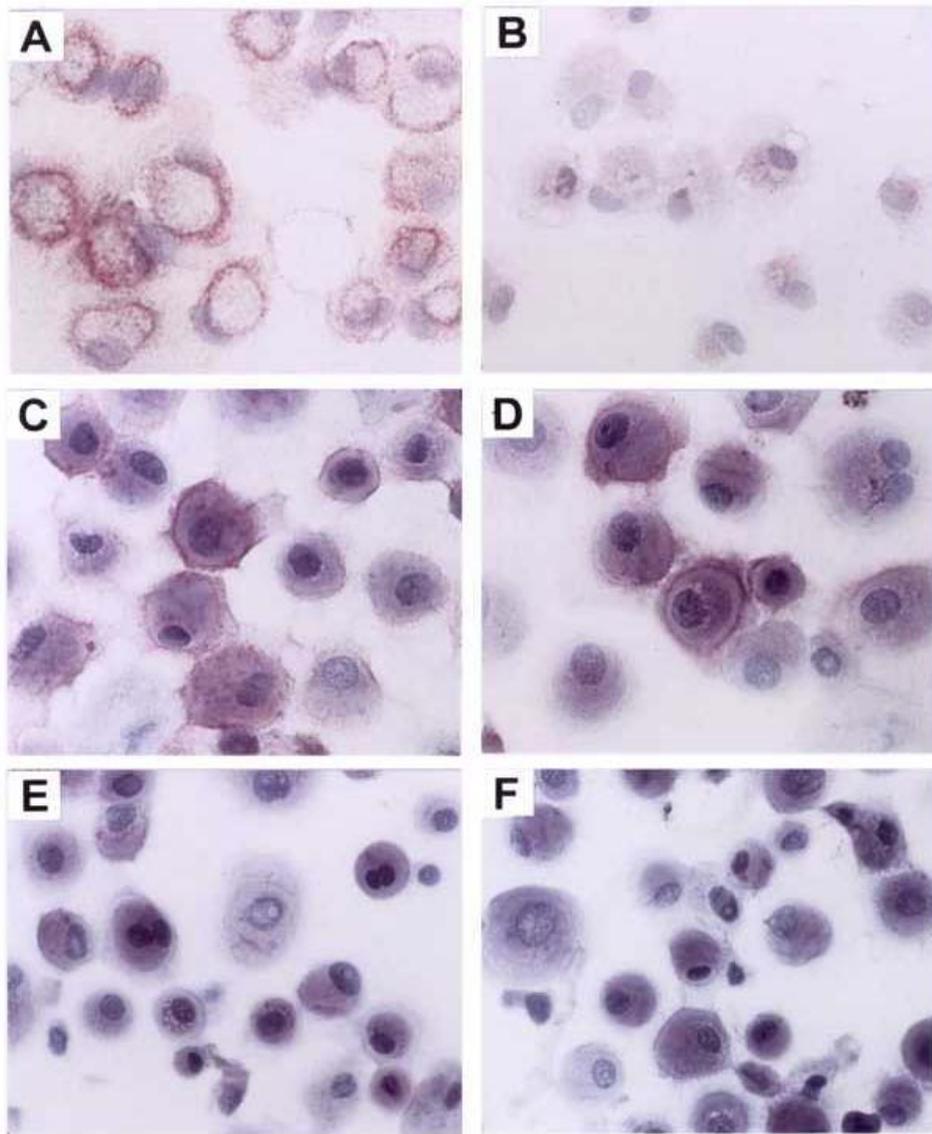


Abb. 16: Immunhistochemische Färbung der PDGF-Rezeptoren in folliculären Keratinozyten (FK) und dermalen Papillenzellen (DPC) durch APAAP: Kultivierte FK und DPC wurden auf Objektträger zytozentrifugiert, mit kaltem Aceton fixiert und anschließend einer immunhistochemischen Färbung (APAAP) gegen PDGFR α und PDGFR β unterzogen. Die Abbildung 16 A zeigt die Expression des PDGFR β in DPC, während keine PDGFR α -positive Färbung auftritt (Abb. 16 B). Im Gegensatz dazu zeigen kultivierte FK die Expression beider Rezeptor-Typen (PDGFR α , Abb. 16 C, und PDGFR β , Abb. 16 D). Die Negativkontrollen für PDGFR α und PDGFR β sind den Abbildungen 16 E und 16 F zu entnehmen. Die Zellen sind in einer 200 fachen Vergrößerung gezeigt.

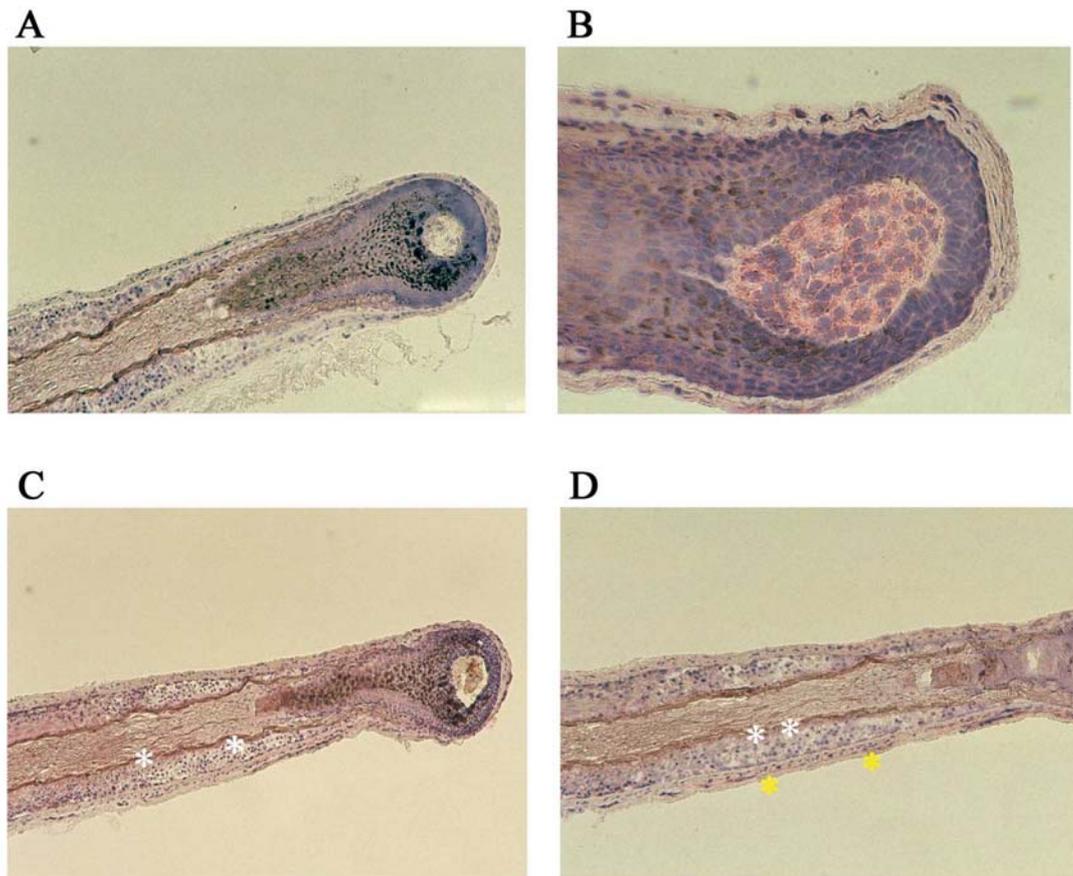


Abb. 17: Immunhistochemische Färbung der PDGF-Rezeptoren in der Whole Organ Culture (WOC): WOC von ganzen Haarfollikeln wurden gemäß Anleitung präpariert und nach dem Schneiden am Kryostaten gegen PDGFR α/β gefärbt. Abbildung 17 B zeigt die Expression von PDGFR β in der mesenchymalen DP, während PDGFR α nicht nachweisbar ist (Abb. 17 C). Beide Rezeptoren sind dagegen in den epithelialen FK detektierbar (PDGFR α , Abb. 17 C, und PDGFR β , Abb. 17 D, weiße Sterne). Die Abb. 17 D belegt, dass auch die Zellen der fibrösen Hülle des Haarfollikels PDGFR β -positiv sind (gelbe Sterne). Die Negativkontrolle ist in der Abbildung 17 A gezeigt.

5.5 Tyrosin-Phosphorylierung der PDGF-Rezeptoren in dermalen Papillenzellen (DPC) und folliculären Keratinozyten (FK)

Die verschiedenen Isoformen des PDGF entfalten ihre biologische Wirkung durch Bindung an den PDGF-Rezeptor, der über eine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität verfügt. Als Folge einer Stimulation mit PDGF dimerisieren zwei Rezeptoren und phosphorylieren den jeweils anderen Rezeptor an Tyrosin-Resten der intrazellulären Domäne. Durch diese Phosphotyrosin-Reste werden Bindungsstellen für Adaptermoleküle mit Src homology 2 (SH2)-Domänen geschaffen.

Um die Funktion der nachgewiesenen PDGF-Rezeptoren in DPC und FK zu überprüfen, wurde diese Tyrosin-Phosphorylierung als Folge der Stimulation mit PDGF im Western-Blot untersucht. In der Wachstums-Phase befindliche Zellen wurden 24 h vor Stimulationsbeginn auf Serum-freies Medium umgesetzt. Um intrazelluläre Phosphatase-Aktivitäten zu unterbinden, wurde für 10 min mit 1 mM Na_3VO_4 inkubiert, bevor mit PDGF-A oder PDGF-B für jeweils 10 min stimuliert wurde. Im Anschluss daran wurden die Zellen lysiert und die Lysate in der SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf NC-Membranen wurde mit anti-Phosphotyrosin-Antikörpern inkubiert.

Wie erwartet sind sowohl PDGF-A als auch PDGF-B in der Lage, die Tyrosin-Phosphorylierung bei folliculären Keratinozyten (FK), die beide Rezeptor-Typen exprimieren, zu induzieren. Diese Phosphorylierung wird bei dermalen Papillenzellen (DPC), die lediglich PDGFR β exprimieren, nur dann ausgelöst, wenn diese mit PDGF-B stimuliert werden. Die Abwesenheit von PDGFR α in DPC lässt diese Zellen insensitiv gegenüber einer Stimulation mit PDGF-A werden. Da PDGFR β lediglich das B-Polypeptid des PDGF bindet, kann die Tyrosin-Phosphorylierung nicht durch Stimulation mit PDGF-A ausgelöst werden.

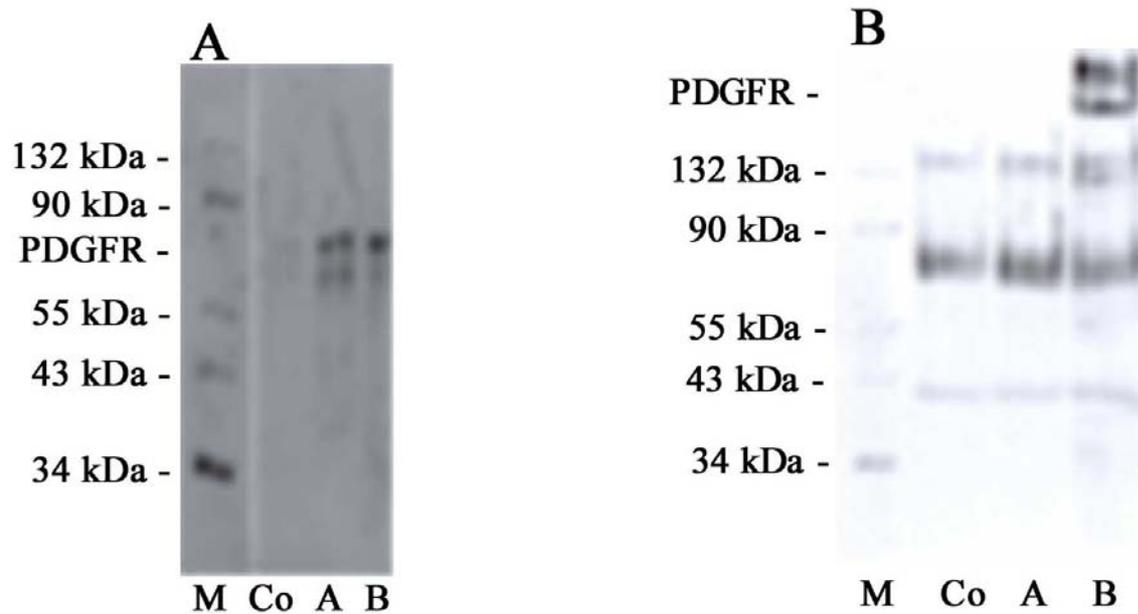


Abb. 18: Tyrosin-Phosphorylierung der PDGF-Rezeptoren in folliculären Keratinozyten (FK) und dermalen Papillenzellen (DPC): Kultivierte FK, die beide PDGF-Rezeptoren exprimieren, wurden entweder mit PDGF-A (A) oder PDGF-B (B) (Abb. 18 A) stimuliert und zeigten in beiden Fällen einen phosphorylierten Rezeptor. Nicht stimulierte Zellen dienten als Kontrolle (Co). Die in DPC exprimierten PDGFR β konnten nur durch PDGF-B zur Tyrosin-Phosphorylierung stimuliert werden (Abb. 18 B). Der Versuch wurde einmal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

5.6 Expression von PDGF-A und -B in dermalen Papillenzellen (DPC) und folliculären Keratinozyten (FK) auf Gen-Ebene

PDGF-A als auch PDGF-B mit ihren jeweiligen Rezeptoren sind für die Embryogenese des Haarfollikels von zentraler Bedeutung. Daher wurde zuerst die Expression der beiden Isoformen des Wachstumsfaktors in kultivierten dermalen Papillenzellen (DPC) und folliculären Keratinozyten (FK) auf Transkriptionsebene untersucht. Zu diesem Zweck wurde aus den in ihrer Wachstums-Phase befindlichen Zellen die totale RNA extrahiert. Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden jeweils 5 µg der RNA zur Synthese der jeweiligen cDNA mittels reverser Transkription (Ready-To-Go T-Primed First Strand Kit) eingesetzt. In den sich anschließenden PCR-Untersuchungen diente jeweils die gleiche Menge an cDNA als Template.

Die zur Amplifikation gewählten Oligonukleotide spezifizierten ein Fragment von 303 bp für PDGF-A und 252 bp für PDGF-B. Da die gewählten 5'-Primer und 3'-Primer ausschließlich nach Primer-technischen Gesichtspunkten und nach der Größe des zu amplifizierenden Fragments der PDGFR gewählt wurden, die Intron-Exon-Grenzen jedoch unberücksichtigt blieben, wurde ein Verdau mit DNase I vorgeschaltet, um mögliche DNA-Kontaminationen während der RNA-Aufarbeitung auszuschalten. Eine solche wäre allerdings aufgrund des Auftretens längerer (Intron-enthaltender) Fragmente leicht erkennbar gewesen. Diese traten nach dem DNase-I-Verdau nicht auf. Die PCR-Produkte wurden am Ende der Amplifikation in einem adäquaten Volumen Probenpuffer aufgenommen, auf Ethidiumbromid-enthaltenden Agarose-Gelen (1,5 %) aufgetrennt und dokumentiert.

Die Produkte der erwarteten Größe bezüglich PDGF-A konnten sowohl in folliculären Keratinozyten als auch in dermalen Papillenzellen detektiert werden (Abb. 19). Die Expression von PDGF-B auf mRNA-Ebene konnte dagegen lediglich für folliculäre Keratinozyten nachgewiesen werden, während dermale Papillenzellen negativ blieben. Grundsätzlich blieben sämtliche PCR-Untersuchungen negativ, wenn keine reverse Transkriptase eingesetzt wurde, was beweist, dass RNA und nicht genomische DNA als Template für diese Untersuchungen diente.

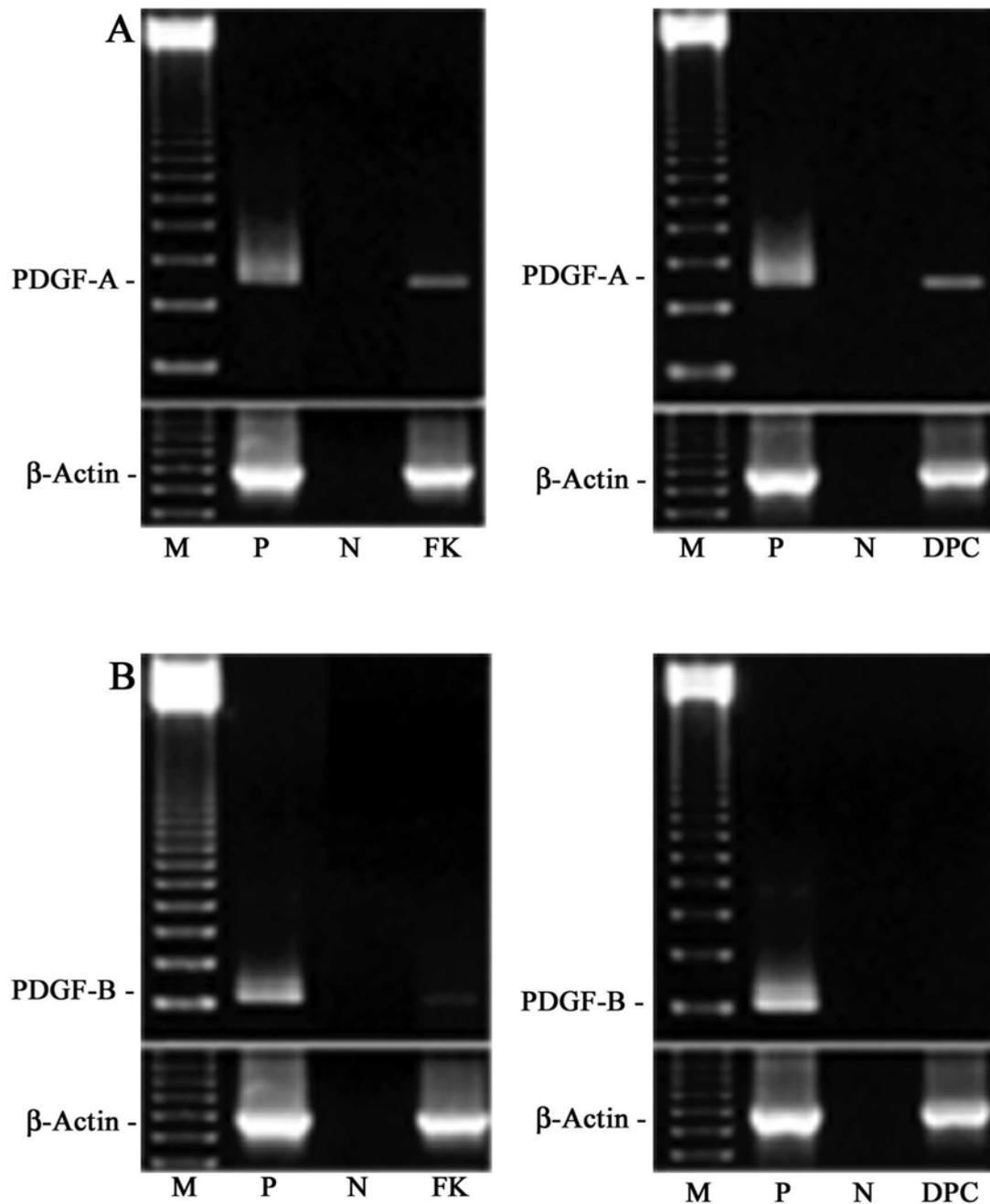


Abb. 19: Expression von PDGF-A und PDGF-B in folliculären Keratinozyten (FK) und dermalen Papillenzellen (DPC): Transkripte von PDGF-A (303 bp) sind sowohl in FK als auch in DPC (A) detektierbar, während die mRNA für PDGF-B lediglich schwach in FK, aber gar nicht in DPC nachweisbar ist (B). Als Marker (M) diente 123 bp-DNA (Gibco BRL, Karlsruhe, D, Spur 1). Die Positivkontrolle (P) (RT-PCR Amplimer Sets, Clontech, Heidelberg, D) ist in Spur 2 aufgetragen, die Negativkontrolle (N) auf der Spur 3. Die dargestellten Experimente wurden zwei mal mit gleichen Ergebnissen wiederholt ($n = 3$).

5.7 Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine auf die Expression von PDGF-A und PDGF-B in dermalen Papillenzellen (DPC) und folliculären Keratinozyten (FK)

Die Entwicklung des Haarfollikels und sein zyklisches Wachstum werden durch eine komplexe epithelial-mesenchymale Kommunikation koordiniert, von der man annimmt, dass sie zu großen Teilen durch von der dermalen Papille sezernierten Zytokinen und Wachstumsfaktoren gesteuert wird (Jahoda et al., 1984; Jahoda und Reynolds, 2001). Einige von ihnen sind bekannte Inhibitoren des Haarwachstums und fördern apoptotische Prozesse im epithelialen Bestandteil der Haarwurzel (Jindo et al., 1994; Hoffmann et al., 1996; Ruckert et al., 2000). Die prominentesten von ihnen, IL-1 β , TNF α , TGF β 1, IL-4 und IFN γ , wurden daher auf ihr Potential hin untersucht, die Expression der PDGF-Faktoren zu regulieren.

Alle Faktoren bis auf IL-4 (100 ng/ml) wurden in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt. Acht Stunden nach Beginn der Stimulationen wurde die gesamte RNA extrahiert und nach reverser Transkription deren cDNA in den beschriebenen Experimenten eingesetzt. Die für diese Untersuchungen verwendeten Primer entsprachen denjenigen, die für die im Kapitel 5.1 beschriebene Methode eingesetzt wurden. Die aufgetrennten Reaktionsprodukte wurden photographisch dokumentiert und eingescannt. Die Intensitäten der Banden wurden durch Vergleich mit den Banden einer β -Actin-PCR angegeben.

Von den zur Stimulation eingesetzten Zytokinen zeigten nur IL-1 β , IL-4 und IFN γ ein signifikantes Potential, die Synthese von PDGF-A in DPC (Abb. 20 A) und FK (Abb. 20 B) zu verringern. Alle weiteren Zytokine hatten entweder keinen oder keinen signifikanten Einfluss auf die Synthese. Von den drei genannten Zytokinen war der IL-1 β -induzierte Effekt am stärksten ausgeprägt und führte zu einer 50 %igen Verringerung. Der TNF α -vermittelte Einfluss auf die Expression von PDGF-A in DPC war ähnlich stark ausgeprägt wie bei der Stimulation mit IL-1 β (Abb. 20 A). Dagegen war kein Einfluss von TNF α in FK erkennbar (Abb. 20 B). Von allen eingesetzten Zytokinen hatte TGF β den moderatsten, aber zugleich einen nicht signifikanten Einfluss auf die Regulation von PDGF-A und -B in FK and DPC. Die Intensitäten der PDGF-Banden sind, nach Abgleich gegen die β -Actin-Banden, als n-Faches gegenüber der Kontrolle angegeben (Abb. 20 und Tabelle 7).

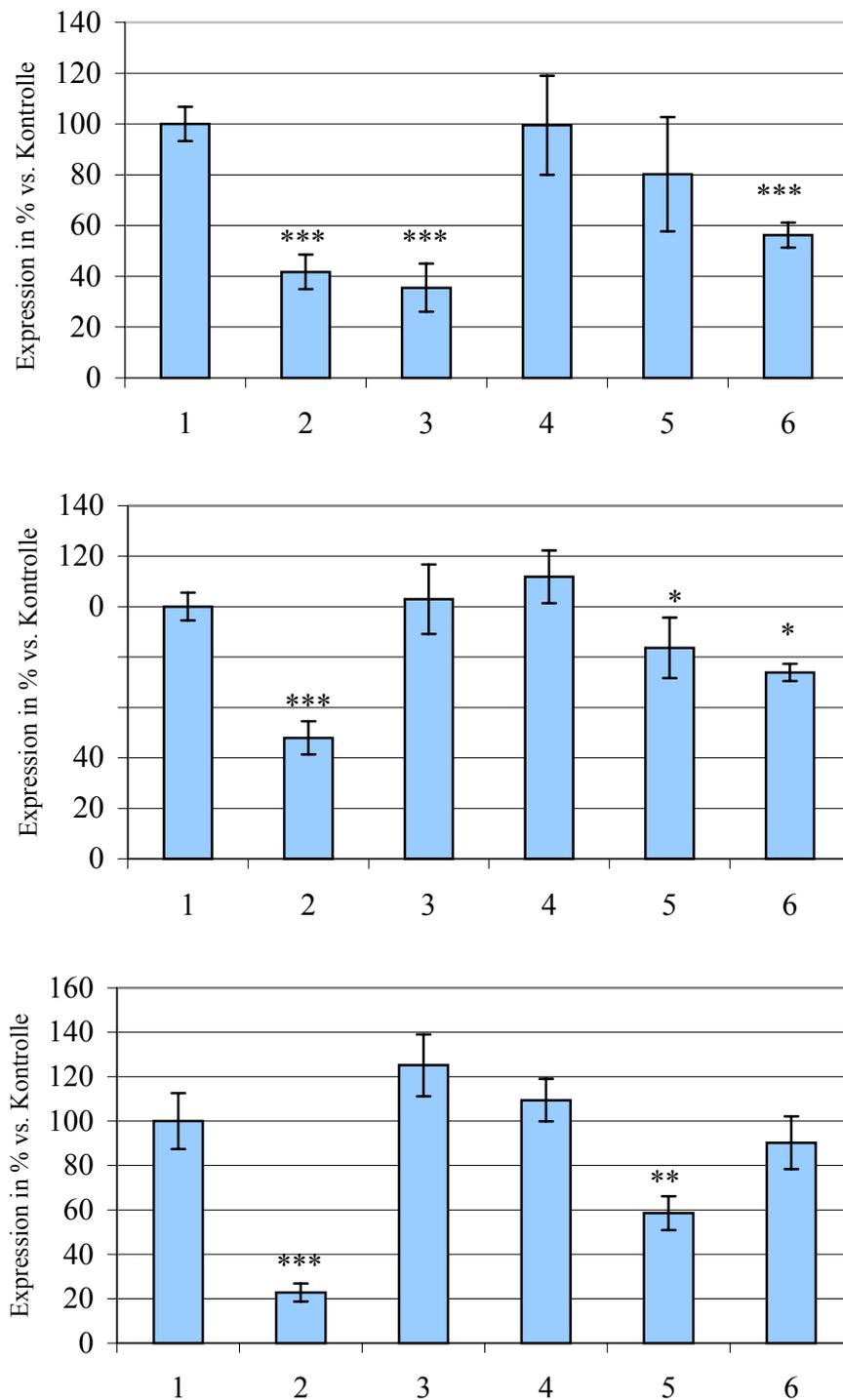


Abb. 20: Zytokin-vermittelter Einfluss auf die PDGF-Expression in DPC und FK: Abbildung 20 A zeigt den Einfluss auf die Expression von PDGF-A in DPC, die Abbildungen 20 B und C den Einfluss auf die Synthese von PDGF-A und PDGF-B in FK. Folgende Stimulationsbedingungen sind gezeigt: Kontrolle (1), IL-1 β (2), TNF α (3), TGF β 1 (4), IL-4 (5) und IFN γ (6). * $p < 0.05$ vs. Kontrolle, ** $p < 0.01$ vs. Kontrolle, *** $p < 0.001$ vs. Kontrolle.

Tabelle 7: Zytokin-vermittelter Einfluss auf die Synthese von PDGF-A und PDGF-B in DPC und FK: Die dargestellten Ergebnisse sind Durchschnittswerte von zwei Bestimmungen (n = 2). *p < 0.05, **p < 0.01 und ***p < 0.001 gegenüber der Kontrolle. Aufgrund fehlender Expression von PDGF-B in DPC wurde die Zytokin-vermittelte Änderung der Expression nicht untersucht (nicht bestimmt, n. b.)

Zytokin	DPC			FK			
	PDGF-A		PDGF-B	PDGF-A		PDGF-B	
IL-1β	42 \pm 7 %	(***)	n. b.	48 \pm 7 %	(***)	23 \pm 4 %	(***)
TNFα	36 \pm 9 %	(***)	n. b.	103 \pm 14 %	(-)	125 \pm 14 %	(-)
TGFβ₁	99 \pm 19 %	(-)	n. b.	112 \pm 11 %	(-)	109 \pm 10 %	(-)
IL-4	80 \pm 22 %	(-)	n. b.	84 \pm 12 %	(*)	59 \pm 8 %	(**)
IFNγ	56 \pm 5 %	(***)	n. b.	74 \pm 4 %	(*)	90 \pm 12 %	(-)

5.8 Expression der Sphingosin-Kinase in dermalen Papillenzellen (DPC), folliculären Keratinozyten (FK) und HaCaT-Keratinozyten

Um die Expression der Sphingosin-Kinase in Zellen des humanen Haarfollikels und in HaCaT-Keratinozyten zu untersuchen, wurde die gesamte RNA post-konfluenten Zellen isoliert. Jeweils 3 µg der isolierten RNA wurden revers transkribiert und in nachfolgenden PCR-Untersuchungen eingesetzt. Die Sequenz der verwendeten Primer ist in Tabelle 4 angegeben. Folgendes Programm-Profil wurde gewählt:

Initiale Denaturierung bei 94 °C für 5 min, 30 x Wiederholung aus Denaturierung bei 94 °C für 1 min, Primer-Hybridisierung bei 60 °C für 1 min, Kettenverlängerung bei 72 °C für 1 min und finale Synthese bei 72 °C für 10 min.

Die Reaktionsprodukte wurden auf 1,5 % igen Agarose-Gele aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Abbildung 21 zeigt die deutliche Expression der SphK in den untersuchten Zellen.

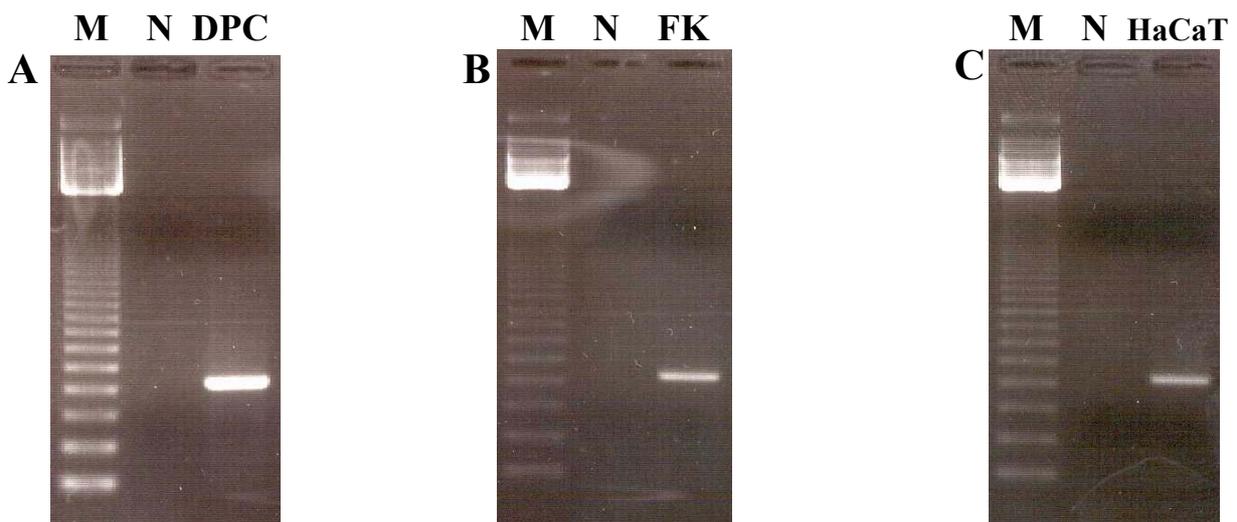


Abb. 21: Expression der Sphingosin-Kinase in Zellen des Haarfollikels und HaCaT-Keratinozyten: RT-PCR-Analysen zeigen die Expression von hSphK (524 bp) in dermalen Papillenzellen (A), folliculären Keratinozyten (B) und HaCaT-Keratinozyten (C).

Als Marker (M) diente 123-bp-DNA (Gibco BRL, Karlsruhe, D, Spur 1). Die Negativkontrolle (N) ist auf der Spur 2 aufgetragen. Die Abbildung zeigt ein charakteristisches Ergebnis mehrerer Untersuchungen dieser Art.

5.9 Nachweis von Sphingosin-Kinase-Aktivität in dermalen Papillenzellen (DPC) und folliculären Keratinozyten (FK)

Die intrazellulären Konzentrationen von SPP in einer Zelle sind unter normalen Bedingungen sehr niedrig, steigen aber als Folge einer Aktivierung des bildenden Enzyms, der Sphingosin-Kinase (SphK), deutlich an. Die Beteiligung von SPP an anti-apoptotischen Prozessen in verschiedensten Zelltypen ist verschiedentlich gezeigt worden (Cuvillier et al., 1996; Xia et al., 1999). Der Umstand, dass eine mögliche Expression der SphK in Zellen des Haarfollikels bislang unbekannt war, machte es daher besonders interessant, die Expression dieses Enzyms zu untersuchen, um dessen Beteiligung an anti-apoptotischen Prozessen im epithelialen Bestandteil des Haarfollikels, den FK, zu verstehen.

Um DPC und FK auf eine Expression der SphK hin zu untersuchen, wurden ihre Zytosole, wie im Kapitel 4.5.3 beschrieben, generiert und aufgearbeitet. Als Positivkontrolle wurden die SphK-positiven Swiss-3T3-Fibroblasten verwendet (Olivera et al., 1994). Nach der Methodenetablierung und Validierung mit Hilfe einer epithelialen Zelllinie konnte die SphK erstmals in DPC und FK nachgewiesen werden.

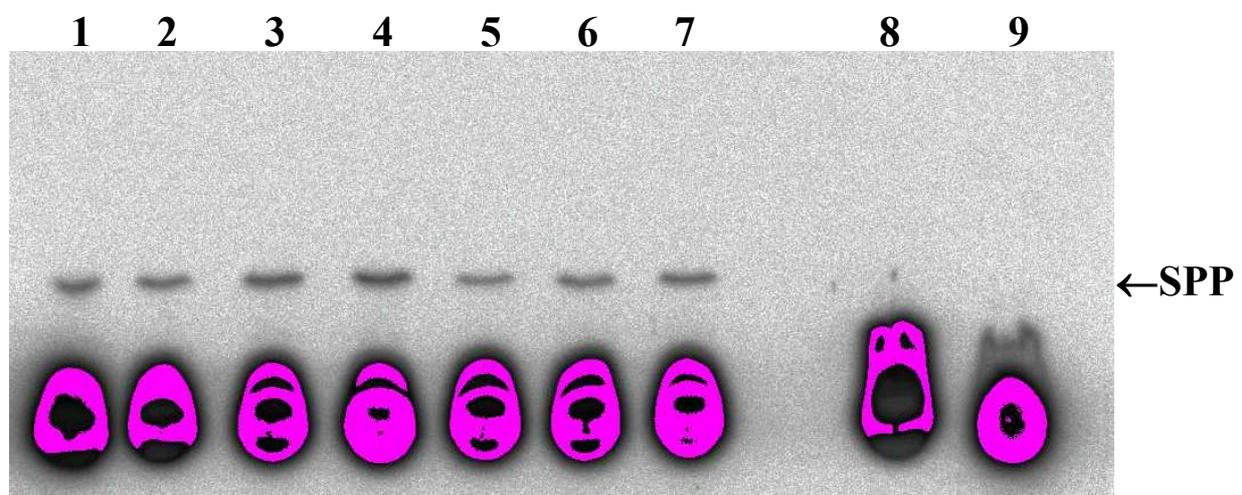


Abb. 22: Nachweis intrazellulärer SphK-Aktivität in folliculären Keratinozyten (FK) und dermalen Papillenzellen (DPC): Zytosole von DPC (1: 25 μg und 2: 50 μg), FK (3: 25 μg und 4: 50 μg) und SphK-positiven Swiss-3T3-Fibroblasten (5: 15 μg , 6: 30 μg und 7: 60 μg) wurden, wie in Kapitel 4.5.3 beschrieben, im SphK-Assay eingesetzt, von Hand auf die DC-Platte aufgetragen und durch TLC aufgetrennt. Die Höhe der SPP-Spots ist markiert (SPP \rightarrow). Die Spuren 8 und 9 zeigen folgende Kontrollen: 8: Ansatz ohne Zytosol (Swiss 3T3) und 9: Ansatz mit Zytosol, aber ohne Sphingosin. Die violette Färbung der Auftragungsstellen ist Programm-bedingt (TINA 2.09g).

5.10 Vergleich zwischen folliculären Keratinozyten (FK) und der Zelllinie HaCaT

Nachdem in weiterführenden Experimenten bewiesen worden war, dass neben folliculären Keratinozyten (FK) auch die humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT über eine intrazelluläre SphK-Aktivität verfügt, wurde ein Vergleich in der SphK-Aktivität zwischen den schwierig zu gewinnenden FK und den leichter zu kultivierenden HaCaT-Keratinozyten angestellt. Als ein grundlegendes und nur schwierig zu beseitigendes Handicap in der Kultur von FK erwies sich ihre ausgesprochen aufwendige und schwierige Präparierung, aber in wesentlich stärkerem Maße die Dauer ihrer Kultivierung bis zu ihrem Einsatz in Experimenten (4 – 6 Wochen). Daher wurden, nachdem sich herausgestellt hatte, dass die SphK-Aktivität in HaCaT-Keratinozyten auf einem sehr ähnlichen Niveau wie in FK des humanen Haarfollikels ausgeprägt war, HaCaT-Keratinozyten als Modell für epitheliale Zellen der Haut genommen und in weiteren Experimenten verwendet (Boukamp et al., 1988).

5.11 Charakterisierung der SphK-Aktivität in Keratinozyten

Um die SphK-Aktivität in Keratinozyten weiter zu charakterisieren, wurde eine Vielzahl verschiedener Experimente durchgeführt, die der näheren Charakterisierung des Enzyms dienen. In diesen Untersuchungen wurde die durch verschiedene Mengen Zytosol bedingte Bildung von SPP untersucht. In weiterführenden Experimenten ist die Zeit-abhängige Bildung von SPP und die kompetitive Inhibierung der SphK-Aktivität durch verschiedene Inhibitoren untersucht worden.

5.11.1 Einsatz steigender Mengen Zytosol im SphK-Assay

Das Zytosol von HaCaT-Keratinozyten wurde, wie in Kapitel 4.5.3 beschrieben, für den SphK-Assay vorbereitet. In diesem wurden steigende Mengen Zytosol eingesetzt, und nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C wurde das SPP extrahiert und über DC-Chromatographie aufgetrennt.

Zu erkennen ist eine deutliche Zunahme der Produktion von SPP mit steigenden Zytosol-Mengen, wobei diese mit einer Ausnahme fast einem linearen Verhältnis folgt. Dargestellt sind die Durchschnittswerte von fünf Ansätzen (n = 5) pro Reaktionsbedingung eines repräsentativen Experiments.

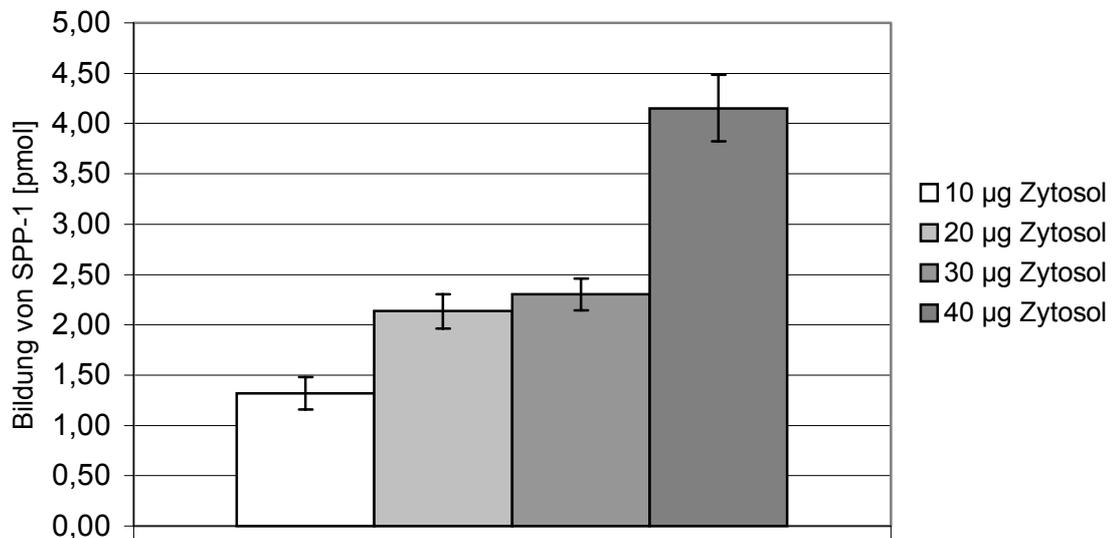


Abb. 23: Charakterisierung von SphK-Aktivität in humanen Keratinozyten: Zytosol-abhängige Bildung von SPP durch SphK-Aktivität in Keratinozyten. Steigende Mengen Zytosol von HaCaT-Keratinozyten wurden im SphK-Assay verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die Lipide extrahiert und über TLC analysiert.

5.11.2 Zeit-abhängige Produktion von SPP in Keratinozyten

In diesen Experimenten wurden die Ansätze über die angegebenen Zeiten inkubiert (37 °C) und die Reaktionsprodukte nach Beendigung dieser Zeiten wie beschrieben aufgearbeitet. In der Abbildung 24 ist eine deutliche Zunahme der Produktion von SPP mit der Zeit zu erkennen. Diese folgt allerdings keinem linearen Verhältnis, sondern nimmt graduell mit zunehmender Dauer ab. Dieses kann auf einen fortschreitenden Verlust der Enzym-Aktivität zurückgeführt werden. Es wurden in allen Ansätzen je 20 µg des Zytosols von HaCaT-Keratinozyten eingesetzt, da bei dieser eingesetzten Menge und einer durchschnittlichen Inkubationsdauer von 30 min eine Enzymaktivität derselben Größenordnung nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der mehrstufigen manuellen Aufarbeitung des SPP aus den Ansätzen war ein relativer Fehler von annähernd 25 % nicht zu vermeiden. Die dargestellten Ergebnisse sind Durchschnittswerte von fünf Ansätzen ($n = 5$) pro Stimulationsdauer.

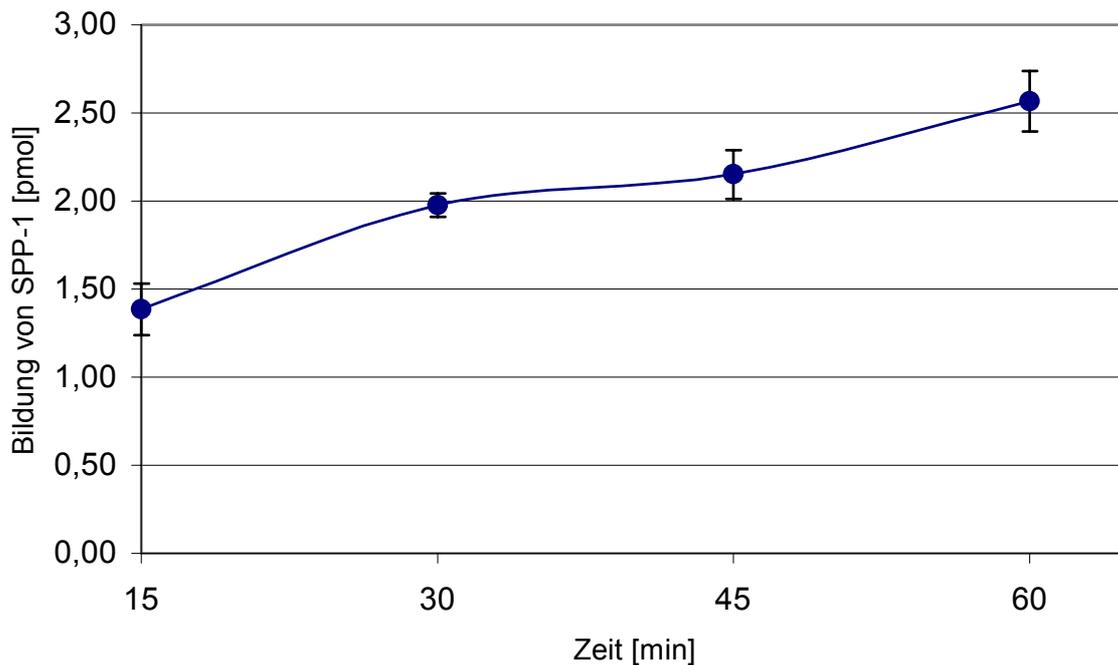


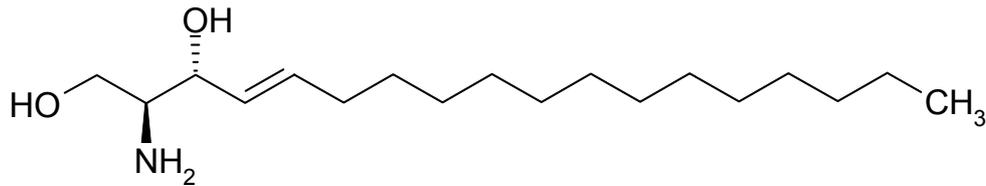
Abb. 24: Charakterisierung von SphK-Aktivität in humanen Keratinozyten: Zeitabhängige Bildung von SPP durch SphK-Aktivität in Keratinozyten. Konstante Mengen Zytosol (20 μ g) von HaCaT-Keratinozyten wurden im SphK-Assay verwendet. Nach den angegebenen Inkubationszeiten von 15, 30, 45 und 60 min wurden die Lipide extrahiert und über TLC analysiert.

5.11.3 Substrat-Spezifität der SphK-Aktivität in Keratinozyten

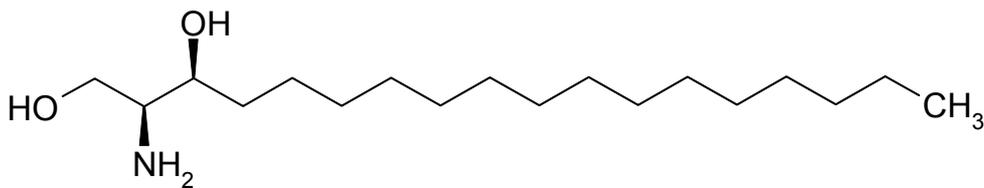
Das natürlicherweise bevorzugte Substrat der SphK ist *D-erythro*-Sphingosin (Abb. 25 a) (Olivera et al., 1998), welches in den Assays eingesetzt wurde, in denen nicht Substratspezifitäten der SphK-Aktivität Gegenstand der Untersuchungen waren.

Darüber hinaus wurden die zwei strukturell verwandten Moleküle *DL-threo*-Dihydrosphingosin (DHS) (Abb. 25 b) und *D-erythro*-N,N-Dimethylsphingosin (DMS) (Abb. 25 c) eingesetzt, die als kompetitive Inhibitoren der SphK-Aktivität z.B. in HEK293-Zellen beschrieben wurden (Kohama et al., 1998). Die Abbildung 25 zeigt die geringfügigen strukturellen Unterschiede der beiden möglichen Substrate der SphK-Aktivität in Keratinozyten.

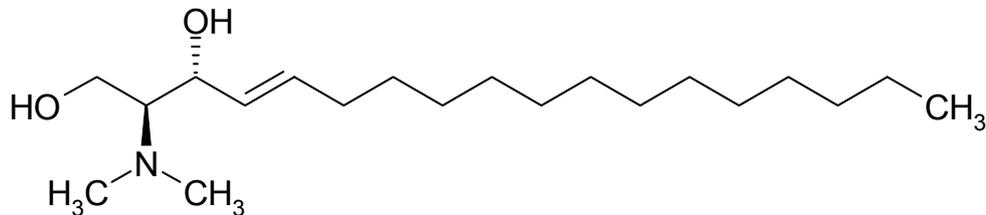
In den Untersuchungen wurde die SphK-Aktivität der HaCaT-Keratinocyten in Gegenwart von 50 μM des bevorzugten *D-erythro*-Sphingosin, sowie steigenden Konzentrationen eines der beiden Inhibitoren inkubiert. Der Konzentrationsbereich lag hierbei zwischen 10 und 40 μM des Inhibitors. Im Anschluss an die Inkubation wurden das markierte SPP wie beschrieben extrahiert und über TLC aufgetrennt.



a. *D-erythro*-Sphingosin



b. *DL-threo*-Dihydrosphingosin



c. *D-erythro-N,N*-Dimethylsphingosin

Abb. 25: *D-erythro*-Sphingosin und zwei Sphingosin-Derivate

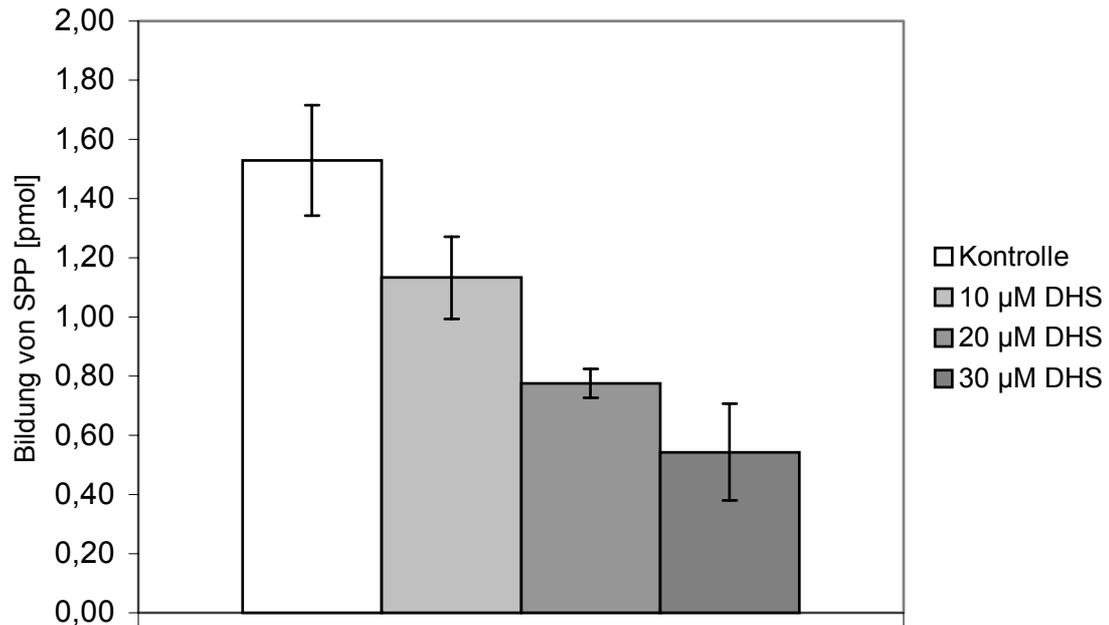


Abb. 26: Charakterisierung von SphK-Aktivität in humanen Keratinozyten: DL-threo-Dihydrosphingosin (DHS) als kompetitiver Inhibitor der SphK-Aktivität in HaCaT-Keratinozyten. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus $n = 5$ Experimenten pro Inhibitor-Konzentration.

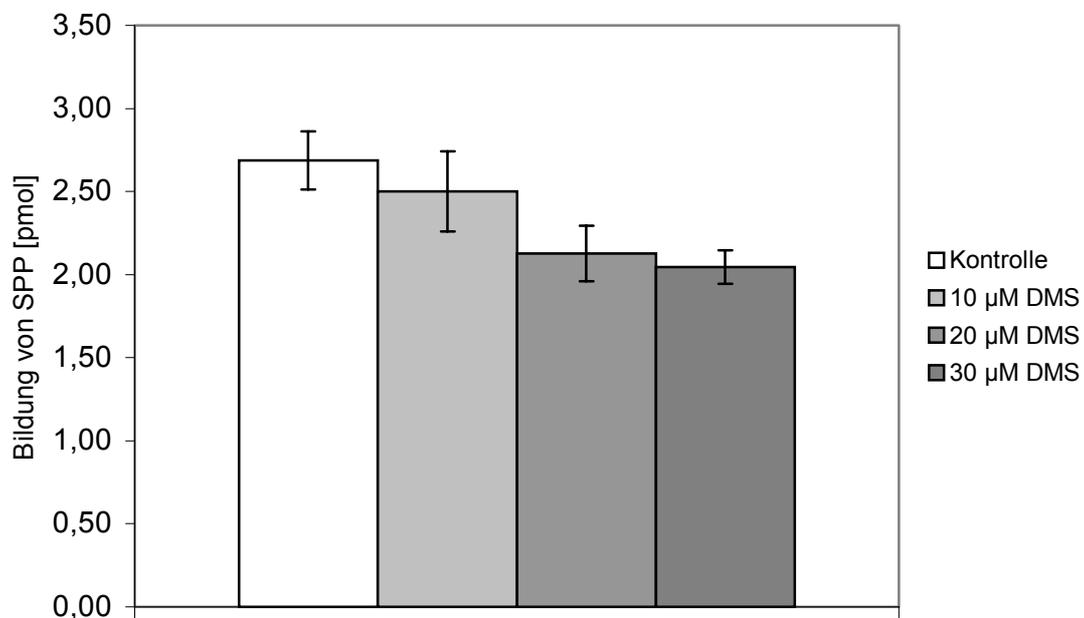


Abb. 27: Charakterisierung von SphK-Aktivität in humanen Keratinozyten: D-erythro-N,N-Dimethylsphingosin (DMS) als kompetitiver Inhibitor der SphK-Aktivität in HaCaT-Keratinozyten. (Darstellung von Durchschnittswerten aus $n = 5$ pro Inhibitor-Konzentration).

Wie in vorherigen Studien bewiesen werden konnte, ist *D-erythro*-Sphingosin das natürliche Substrat der SphK-Aktivität, welches durch das Enzym an der primären Hydroxylgruppe phosphoryliert wird und somit über die Bildung von SPP z.B. die Zellproliferation stimuliert (Zhang et al., 1991).

Da ich in vorherigen Experimenten erstmals die Expression der SphK-Aktivität in HaCaT-Keratinocyten nachweisen konnte, war es von Interesse den Einfluss von Sphingosin-Derivaten auf die Enzymaktivität zu untersuchen, um Erkenntnisse über die Stereospezifität der mitogenen Effekte der SphK in HaCaT-Keratinocyten zu gewinnen. Abbildung 25 zeigt die strukturellen Unterschiede von *D-erythro*-Sphingosin zu zwei weiteren möglichen Substraten der SphK-Aktivität. Sie unterscheiden sich lediglich in der Konfiguration des Liganden am asymmetrischen C3-Atom (*erythro* - oder *threo*-Form) oder der Abwesenheit der Doppelbindung im Fettsäureanteil zwischen den C4 und C5. *D-erythro-N,N*-Dimethylsphingosin weist aufgrund zweier Methyl-Gruppen eine gesteigerte sterische Hinderung um die am C1-Atom sitzende Hydroxylgruppe auf.

Von den beiden eingesetzten Sphingosin-Derivaten erwies sich *DL-threo*-Dihydrosphingosin (DHS) als der wirksamere Inhibitor der SphK-Aktivität *in vitro* und zeigte bereits bei einer eingesetzten Konzentration von 10 μM eine starke Inhibierung (bis 25 %) der SphK in HaCaT-Keratinocyten. Ab einer Konzentration von 20 μM DHS wies die SphK nur noch die halbe Aktivität auf, bezogen auf die Aktivität der SphK bei Abwesenheit des Inhibitors.

Der Einsatz des anderen Derivats *D-erythro-N,N*-Dimethylsphingosin (DMS) führte zwar ebenso zu einer Reduktion der SphK-Aktivität in HaCaT-Keratinocyten, allerdings in einem wesentlich schwächeren Ausmaß. Hier zeigte sich erst ab einer Konzentration von 20 μM eine 25 %ige Inhibierung, die auch durch höhere Konzentrationen nur unwesentlich gesteigert werden konnte.

Die wichtigste Schlussfolgerung dieser Studien liegt darin, dass sich der möglicherweise mitogene Effekt der SphK-Aktivität in HaCaT-Keratinocyten auf die Phosphorylierung von *D-erythro*-Sphingosin beschränkt. Im Gegensatz dazu erwiesen sich die beiden Sphingosin-Derivate *DL-threo*-Dihydrosphingosin und *D-erythro-N,N*-Dimethylsphingosin als Inhibitoren der SphK-Aktivität in HaCaT-Keratinocyten und führten zu einer unterschiedlich ausgeprägten Inhibierung der Enzymaktivität. In diesem Zusammenhang zeigte sich jedoch das größere Potential von *DL-threo*-Dihydrosphingosin zur Inhibition.

5.12 Bestimmung von SPP-Konzentrationen in folliculären Keratinozyten

Um den Einfluss von das Haarwachstum negativ beeinflussenden Zytokinen auf die SphK-Aktivität in folliculären Keratinozyten (FK) zu testen, wurden Kulturen dieser Zellen mit TNF α (10 ng/ml + 100 ng/ml) und IL-4 (10 ng/ml + 100 ng/ml) für 24 h stimuliert. Im Anschluss an die Stimulationen wurde eine totale Lipid-Extraktion nach einem modifizierten Protokoll nach Yatomi et al. (1995) durchgeführt. Die Derivatisierung von SPP mit o-Phthaldialdehyd (OPA) wurde gemäß 4.5.2 ausgeführt.

Unter den gewählten Reaktions-Parametern wurde das derivatisierte SPP nach ca. 26 min von der Säule eluiert. Um die Konzentration von SPP in Proben zu bestimmen, wurden Standards mit 0, 10, 50 und 100 pmol SPP aufgetrennt und deren Peakflächen in Relation zu denen der zu testenden Proben gesetzt.

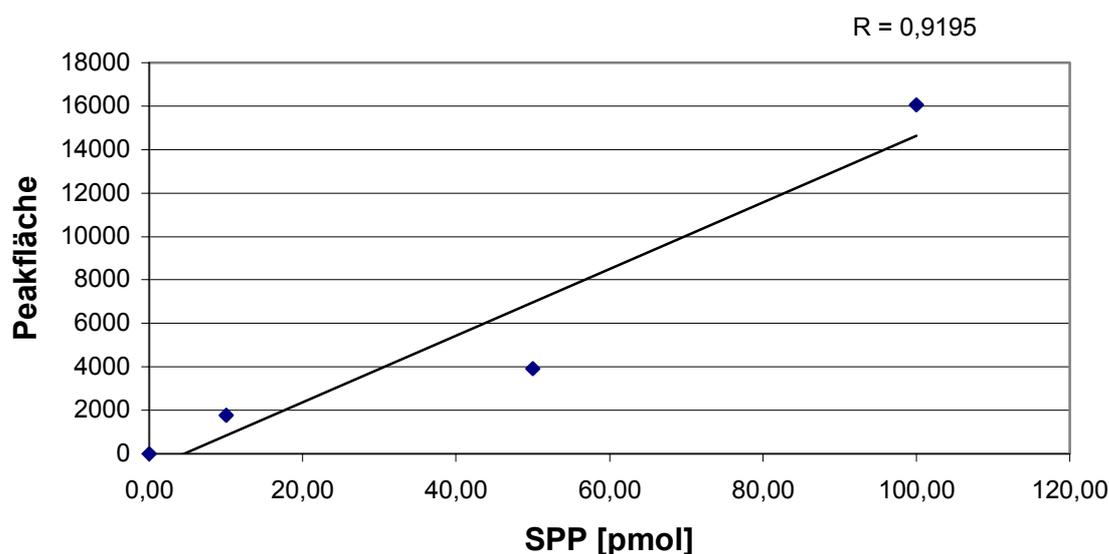


Abb. 28: Verhältnis zwischen der Peakfläche von SPP (Standards) und dem Fluoreszenz-Signal

Tabelle 8: SPP-Konzentrationen in stimulierten folliculären Keratinozyten

Standard / [pmol]	Peakfläche	Probe (2 x 10 ⁶ Zellen)	Peakfläche	Probe / [pmol]
-	-	Kontrolle	8239	58
0	0	TNF α (10 ng/ml)	2390	20
10	1784	TNF α (100 ng/ml)	1372	13
50	3917	IL-4 (10 ng/ml)	7554	54
100	16055	IL-4 (100 ng/ml)	1296	13

5.13 PDGF-vermittelte Stimulation der Sphingosin-Kinase-Aktivität in dermalen Papillenzellen (DPC) und folliculären Keratinozyten (FK)

Nachdem in vorherigen Untersuchungen die eindeutige Expression der SphK-Aktivität in kultivierten FK und DPC erstmals gezeigt werden konnte, wurde die Induzierbarkeit der Kinase durch PDGF untersucht. Zu diesem Zweck wurden kultivierte DPC 24 h vor Stimulationsbeginn auf Serum-freies Medium gewechselt und für 10, 30 und 60 min mit jeweils 100 ng/ml PDGF-B stimuliert. FK wurden entweder mit PDGF-A oder mit PDGF-B (jeweils 100 ng/ml) für je 30 min stimuliert. Anschließend wurden ihre Zytosole wie beschrieben präpariert, im SphK-Assay eingesetzt und über TLC getrennt. Die verbesserte Auftragungsweise des radioaktiv markierten SPP erfolgte mit einem Camag-Linomat-IV. Die Auswertung erfolgte über einen Vergleich der in Bezug zur Kontrolle relativen Intensitäten der Spots.

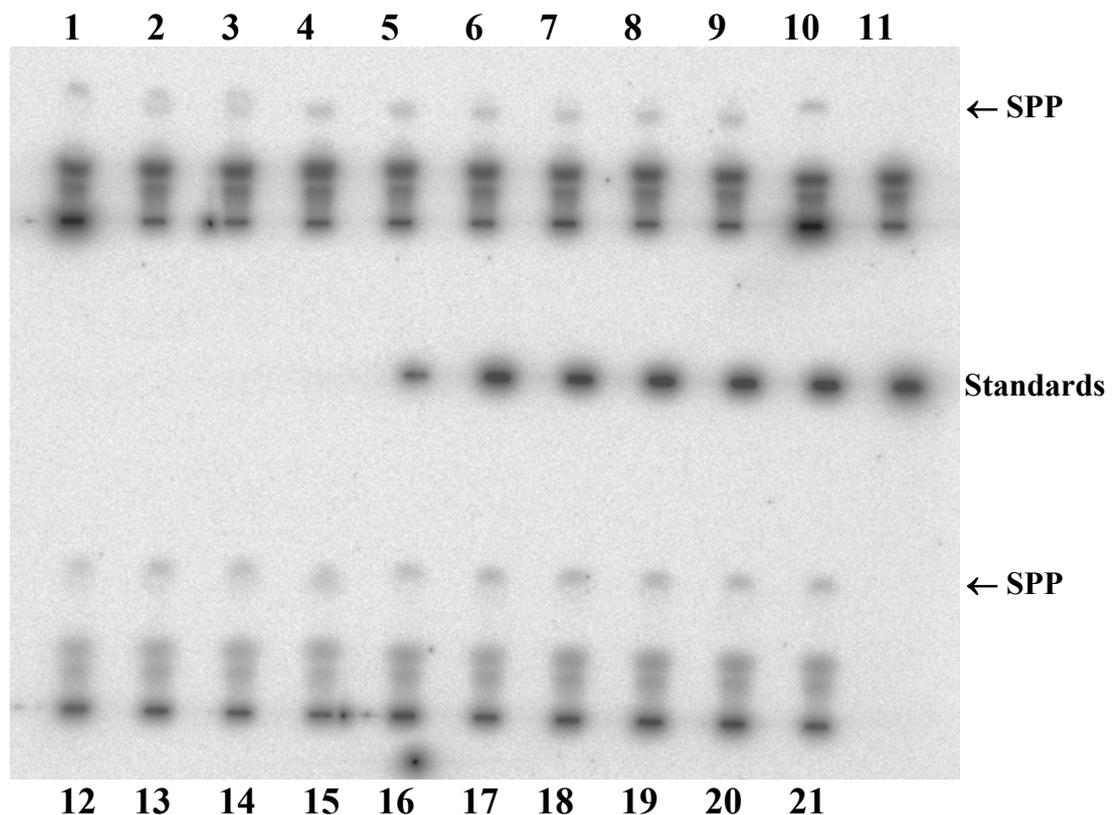


Abb. 29: PDGF-vermittelte Stimulation der SphK-Aktivität in DPC und FK: Abgebildet sind die Ansätze 1. - 3. DPC (Kontrolle), 4. - 6. DPC (PDGF-B, 10 min), 7. - 9. DPC (PDGF-B, 30 min), 10. und 12. (DPC, PDGF-B, 60 min). Ansätze mit FK befinden sich auf den Spuren 13. - 15. (Kontrolle), 16. - 18. (PDGF-A, 30 min) und 19. - 21. (PDGF-B, 30 min). Der Ansatz 11. zeigt die Versuchskontrolle w/o Sphingosin.

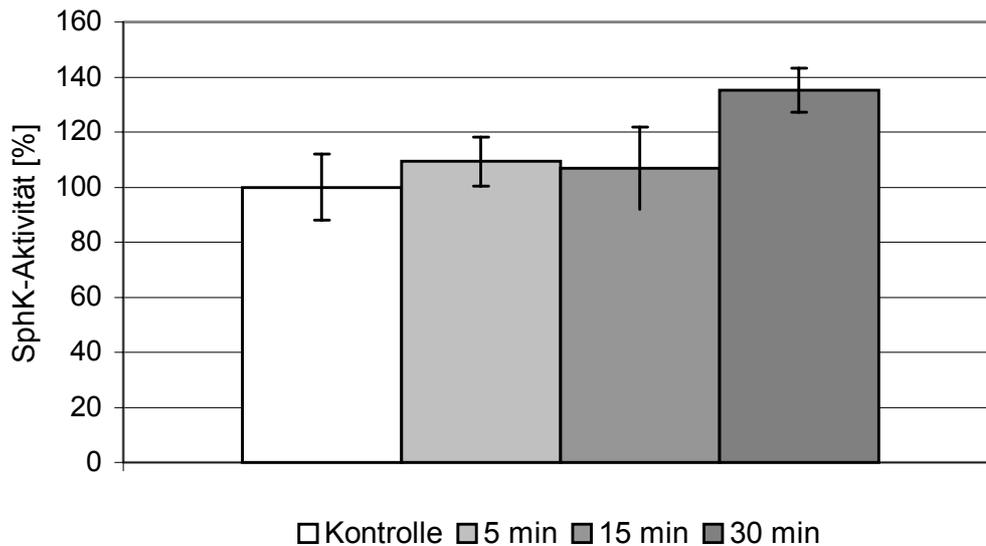


Abb. 30: PDGF-vermittelte Stimulation der SphK-Aktivität in DPC: Kultivierte DPC wurden mit 100 ng/ml PDGF-B für die angegebenen Zeiten stimuliert. Anschließend wurden die gewonnenen Zytosole im SphK-Assay eingesetzt. Dargestellt sind die PDGF-vermittelten Steigerungen der SphK-Aktivität bezogen auf die Kontrolle (100 %) aus n = 3 Experimenten pro Stimulationsbedingung.

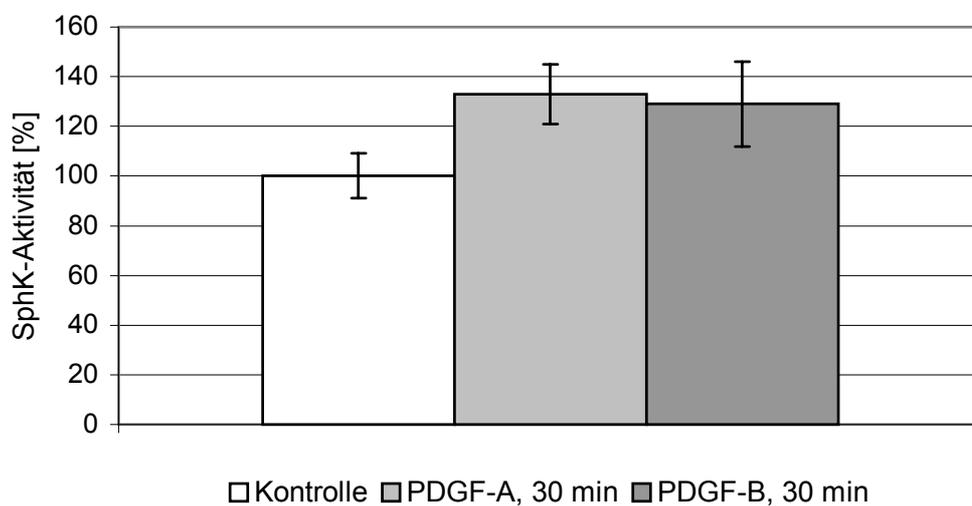


Abb. 31: PDGF-vermittelte Stimulation der SphK-Aktivität in FK: Kultivierte FK wurden mit je 100 ng/ml PDGF-A bzw. PDGF-B für 30 min stimuliert. Anschließend wurden die gewonnenen Zytosole im SphK-Assay eingesetzt. Dargestellt sind die PDGF-vermittelten Steigerungen der SphK-Aktivität bezogen auf die Kontrolle (100 %) aus n = 3 Experimenten pro Stimulationsbedingung.

Wie die Abbildungen 30 und 31 belegen, kommt es in dermalen Papillenzellen (DPC) bzw. folliculären Keratinozyten (FK) im Rahmen von Stimulationen mit PDGF zu eindeutigen Aktivitätssteigerungen der intrazellulären SphK-Aktivitäten *in vitro*.

Die Stimulation von DPC mit PDGF-B führte innerhalb der ersten 30 min lediglich zu einer moderaten Steigerung der SphK-Aktivität um ca. 10 %. Erst ab einer Stimulationsdauer von einer Stunde ist eine Aktivitätssteigerung von annähernd 40 % zu beobachten.

Diesen Grad der Steigerung beobachtet man in FK dagegen schon ab einer Dauer von 30 min, wobei diese Steigerung sowohl von PDGF-A als auch PDGF-B induziert werden.

5.14 Gen-Expressions-Profil von HaCaT nach Stimulation mit C₈-Ceramid und SPP

Die Auswirkungen der intrazellulären Generierung von SPP einerseits und Ceramiden andererseits sind bekannt; während eine Wachstumsfaktor-induzierte SphK-Aktivierung die intrazellulären SPP-Konzentrationen ansteigen lassen und dies mit einer Verhinderung apoptotischer Prozesse in Verbindung gebracht wird, bewirken Ceramide, die im Rahmen der Hydrolyse von Sphingomyelin entstehen, das Gegenteil und induzieren apoptotische Prozesse in humanen Keratinozyten (Bektas et al., 1998; Raisova et al., 2000). Diese Effekte werden insgesamt in der sog. „Rheostat-Theorie“ zusammengefasst, welche besagt, dass das intrazelluläre Verhältnis dieser beiden Sphingolipid-Metaboliten das Schicksal einer Zelle determiniert.

Der Effekt einer intrazellulären Generierung von Ceramiden, z.B. durch Aktivitätssteigerung von Sphingomyelinasen während apoptotischer Prozesse, lässt sich durch externe Zugabe von kurzkettigen Ceramid-Analoga imitieren, da sie in der Lage sind, die zelluläre Membran zu penetrieren.

Um Anhaltspunkte für mögliche Gen-Regulationen als Folge von SPP - respektive Ceramid-Stimulationen zu erhalten, wurden getrennte Kulturen von HaCaT-Keratinozyten mit jeweils einem der beiden Sphingolipid-Metaboliten stimuliert. Subkonfluente HaCaT-Keratinozyten wurden entweder mit Apoptose-induzierenden Konzentrationen von C₈-Ceramid (30 µM), einem Zell-permeablen Ceramid-Analogon, für 24 h oder mit Sphingosin-1-phosphat (10 µM) für 4 h stimuliert.

Wie im Rahmen vorheriger Untersuchungen gezeigt werden konnte, sind kurzkettige Ceramid-Analoga in der Lage, apoptotische Prozesse in HaCaT-Keratinozyten über DNA-Fragmentierung zu induzieren (Bektas et al., 1998). Zusätzlich dazu wurde das Apoptose-induzierende Potential von C₈-Ceramid dieser Konzentration auch im Rahmen dieser

Dissertation mit Hilfe des Cell Death Detection-ELISA untersucht und bestätigt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Im Anschluss an die Stimulationen erfolgte eine Extraktion der gesamten RNA aus diesen Zellen wie in Kapitel 4.4.2 beschrieben. Um im Überschuss vorhandene und nicht interessierende RNA-Spezies von der reversen Transkription auszuschließen, wurde die mRNA aus der gesamten RNA isoliert (Kapitel 4.4.3). Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurde von beiden Stimulationen je 1 µg mRNA für den Apoptose-Array gemäß Kapitel 4.4.21 vorbereitet und revers transkribiert, wobei die Transkripte nach der Reaktion mit [α -³²P] dATP radioaktiv markiert waren.

Der Einsatz dieser markierten cDNA-Population zur Hybridisierung auf den Membranen zeigte das Expressionsprofil von HaCaT-Keratinocyten nach Stimulation mit zwei prominenten Sphingolipid-Metaboliten. Die Filme wurden nach empirisch zu ermittelnder Belichtungsdauer entwickelt, eingescannt und mit Hilfe der Software AtlasImage 1.5 statistisch ausgewertet. Bezüglich der Belichtungszeit zeigte sich, dass in der Regel eine Über-Nacht-Belichtung (-70 °C) aufgrund der geringen Expression mancher mRNA-Spezies nicht reichte und die Hybridisierungssignale zu schwach waren. In den Experimenten musste üblicherweise mindestens für sieben Tage belichtet werden, manchmal sogar für zwei Wochen.

Die relative Expression der Apoptose-Gene ergibt sich aus einem Vergleich der Expression mehrerer Housekeeping-Gene gegenüber den zu untersuchenden Spots. Eine Bewertung der unterschiedlichen Regulationen ist sehr schwierig. Daher sind in die Darstellung der Ergebnisse nur solche mit mindestens 25 % iger Abweichung gegenüber der Kontrolle eingeflossen, um Artefakt-bedingte Regulationen auszuschließen. Zusätzlich dazu musste diese SPP- bzw. Ceramid-vermittelte gegenläufige Regulation in jeweils zwei unabhängigen Versuchen erzielt werden. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich somit auf insgesamt vier unabhängige Versuche (n = 2 für C₂-Ceramid und n = 2 für SPP), da pro Array nur eine Reaktionsbedingung getestet werden kann.

A. Kontrolle

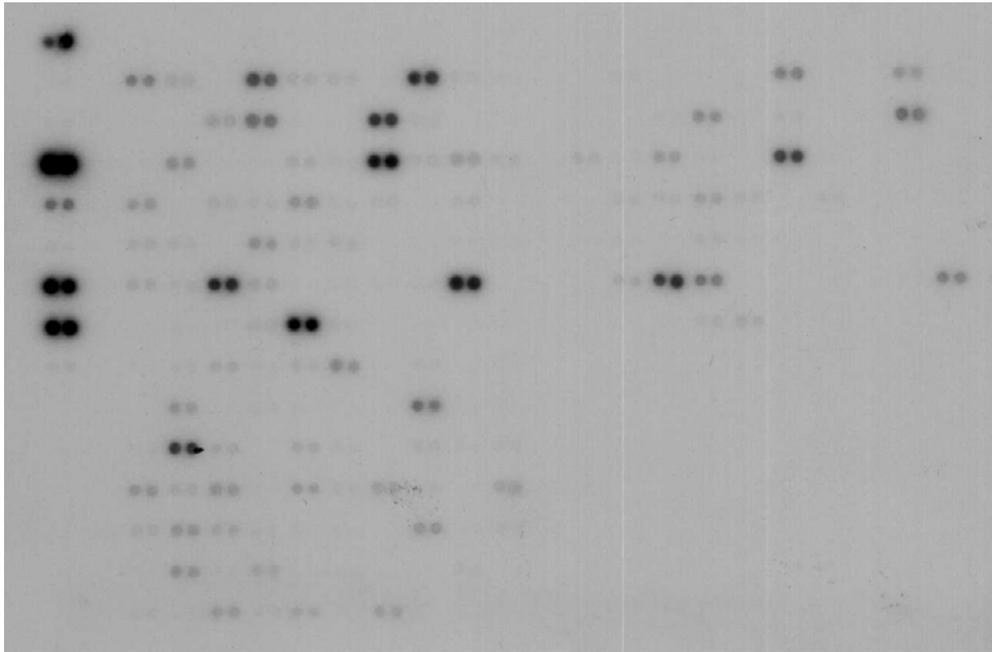
B. C₈-Ceramid

Abb. 32: Gen-Expressions-Profil von HaCaT-Keratinocyten nach Stimulation mit C₈-Ceramid. Je 1 µg mRNA stimulierter und nicht-stimulierter Zellen wurden radioaktiv markiert und mit den Membranen inkubiert. Nach mehreren Stringenz-Waschschrten wurden die Membranen durch Phosphorimaging analysiert. Bei dem Kontroll-Ansatz handelt es sich um Methanol-behandelte Zellen, um einen möglichen Einfluss des Lösungsmittels von C₈-Ceramid auf das Apoptose-Verhalten der Zellen auszuschließen.

Die Unterschiede der Gen-Expression als Folge von Stimulationen sind nur in seltenen Fällen mit dem Auge erkennbar und bedürfen einer gesonderten Computer-Auswertung mit dem Programm AtlasImage (benutzte Version 1.5). Insgesamt sind auf den Membranen die cDNA-Spezies von 205 humanen Apoptose-Genen aufgetragen. In die Darstellung der Ergebnisse sind lediglich die Regulationen eingeflossen, die in vier unabhängigen Versuchen jeweils zweimal dem gleichen Trend folgten (Tabelle 8). Wie sich durch diese Experimente zeigte, wurden durch Stimulationen mit C₈-Ceramid und SPP hauptsächlich zwei prominente Mitglieder der Caspasen-Kaskade in ihrer Expression reguliert. Mit den Caspasen 8 bzw. 3 scheinen somit Mitglieder der Initiator – bzw. Effektor-Caspasen durch SPP und Ceramid-Analoga gegenläufig regulierbar zu sein.

Tabelle 8: Gegenläufige Gen-Regulation in HaCaT-Keratinocyten durch C₈-Ceramid und SPP: SPP und Ceramid bewirken gegenläufige Effekte in HaCaT-Keratinocyten und regulieren eine unterschiedliche Expression der mRNA zweier prominenter Caspasen der Caspasen-Kaskade. Dargestellt sind die Ergebnisse von je zwei unabhängigen Versuchen für jede Stimulationsbedingung (n = 2 für Ceramid und n = 2 für SPP)

Gen	Stimulation	Regulation
Caspase 3	SPP	- 35 %
	C ₈ -Ceramide	+ 30 %
Caspase 8	SPP	- 30 %
	C ₈ -Ceramide	+ 75 %

5.15 Gegenläufige Aktivierung der Caspase 3 in HaCaT durch C₈-Ceramid und SPP

Die in den Expressions-Arrays erzielten Ergebnisse zeigten eine unterschiedliche Regulation der Caspasen 3 / 8 durch SPP und C₈-Ceramid. Um auch eine mögliche gegenläufige Regulation der Aktivität des Enzyms zu untersuchen, wurden HaCaT-Keratinocyten entweder mit SPP (20 µM, 24 h), C₈-Ceramid (30 µM, 24 h) oder beiden zusammen stimuliert. Zusätzlich wurden als Positivkontrollen Ansätze mit Apoptose-Induktoren wie Cycloheximid und Staurosporin behandelt oder mit UVB bestrahlt.

Es zeigte sich, dass eine Stimulation mit SPP (Abb. 33, Spalte 2) zu keiner Aktivierung der Caspase 3 führt. Im Gegensatz dazu belegt Abbildung 33 (Spalte 3) eindeutig, dass C₈-Ceramid in der verwendeten Konzentration zu einer starken Aktivität der Caspase 3 führt. Durch Co-Stimulationen mit SPP und C₈-Ceramid wird das Ausmaß der Caspase 3-Aktivität wieder auf das Niveau der Kontrolle herabgesenkt (Abb. 33, Spalte 4).

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass SPP und C₈-Ceramid nicht nur gegenläufige Einflüsse auf die Expression von Caspase 3 ausüben, sondern ebenso auf die Aktivität des Proteins. Durch selektive Erhöhung eines der beiden Sphingolipid-Metaboliten ist es möglich, die Aktivität der Caspase 3 gegenläufig zu manipulieren und somit potentiell den Weg einer Zelle zu bestimmen. Erhöhte Ceramid-Konzentrationen führen demnach zu einer starken Aktivität der Caspase 3 und im Folgenden somit zu apoptotischen Prozessen, wohingegen SPP kein Caspasen-aktivierendes Potential besitzt. Im Gegenteil kann SPP die Ceramid-induzierte Caspasen-Aktivierung egalisieren und tritt als intrazellulärer Gegengewicht des Ceramids auf. Die erzielten Ergebnisse unterstützen somit maßgeblich die „Rheostat-Theorie“ (Spiegel und Milstien, 2000).

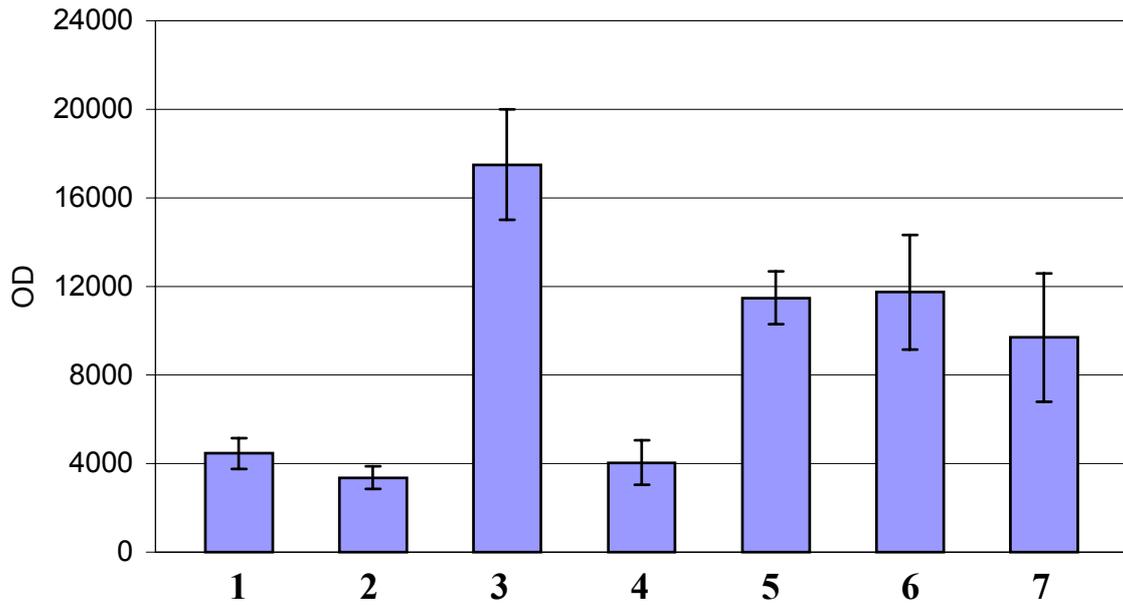


Abb. 33: Aktivität der Caspase 3 in HaCaT-Keratinozyten nach Stimulation mit Sphingolipid-Metaboliten: (1) Negativkontrolle, (2) SPP-Stimulation, (3) Stimulation mit C₈-Ceramid, (4) Co-Stimulation mit SPP / C₈-Ceramid, (5), (6) und (7) Positivkontrollen mit UVB, Staurosporin und Cycloheximid. Abbildung 33 zeigt das Ergebnis von n = 2 Experimenten.