

## 6. Diskussion

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, stellt ein zentrales Ereignis für einen lebenden Organismus dar, welches zur Aufrechterhaltung einer normalen Gewebephysiologie benötigt wird (Teraki und Shiohara, 1999). Um diese Homöostase zu erreichen, ist ein feinabgestimmtes Wechselspiel zwischen der Proliferation von Zellen und dem Zelltod notwendig. Dies gilt insbesondere für die Haut, in der apoptotische Prozesse nicht nur während entzündlicher Dermatosen oder Tumoren (Paus et al., 1993; Raskin, 1997) auftreten, sondern auch zur Aufrechterhaltung einer normalen Homöostase der Haut benötigt werden.

Der menschliche Haarfollikel als Anhangsgebilde der Haut ist insofern von besonderem Interesse, da sich bei keinem anderen Organ des Menschen die Morphogenese mit ähnlicher Geschwindigkeit vollzieht. Charakteristisch in diesem Prozess ist die Kommunikation zwischen unterschiedlichen Zellpopulationen mesenchymalen und epithelialen Ursprungs, die zu mehreren, klar voneinander abgrenzbaren Stadien führen (vom Anagen über das Katagen zum Telogen). Wie Untersuchungen gezeigt haben, zeichnet sich die Phase des Katagens durch das Auftreten signifikanter apoptotischer Prozesse im epithelialen Bestandteil des Follikels, den Keratinozyten des Haarfollikels, aus (Lindner et al., 1997). Im Gegensatz dazu zeigen sich dermale Papillenzellen weitgehend Apoptose-resistent. Lediglich für Staurosporin und Trypsin sind bis heute Apoptose-induzierende Potentiale in diesen Zellen nachgewiesen worden (Ferraris et al., 1997; Seiberg et al., 1997). Aus diesem Grund stellt das Katagen auch den in der Haarforschung am meisten beachteten Abschnitt des Haarzyklus dar, da diese zum Telogen führende Phase mit dem Verlust des Haares einhergeht. Ein besseres Verständnis der beteiligten Prozesse könnte gleichzeitig dazu führen, dass die Prozesse der Proliferation (Anagen) und der Apoptose (Katagen) im Haarfollikel selektiv beeinflussbar wären und sich therapeutische Ansatzpunkte zu ihrer Regulation ergäben.

Mit den im Rahmen dieser Arbeiten gewonnenen Daten lässt sich ein Modell zeichnen, das der besonderen Bedeutung des PDGF-Systems in Zellen des Haarfollikels Rechnung trägt. Gleichzeitig wurde mit dem erstmaligen Nachweis der Funktion eines zentralen Enzyms des Sphingolipid-Signallings, der Sphingosin-Kinase (SphK) in Zellen des Haarfollikels, die Möglichkeit eröffnet, dass neben den bekannten im Haarzyklus auftretenden, zumeist Zytokin-vermittelten, Apoptose-Wegen, möglicherweise ein neuer Sphingolipid-vermittelter Weg hinzugefügt werden könnte. Der SphK, deren Aktivität durch Wachstumsfaktoren wie den *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) signifikant gesteigert werden kann, könnte somit eine maßgebliche Beteiligung an anti-apoptotischen Prozessen in Zellen zugeordnet werden.

Die gewonnenen Daten können somit einen Ansatz zur teilweisen Klärung eines spezifischen Mechanismus apoptotischer Prozesse in Zellen des Haarfollikels liefern.

Die Entwicklung eines Haarfollikels als Anhangsgebilde der Haut kann als die Summe vieler bekannter und vermutlich weiterer noch unbekannter Faktoren aufgefasst werden, in der es zu einem komplizierten Wechselspiel zwischen dem epithelialen Anteil des Haarfollikels, den folliculären Keratinozyten und dem mesenchymalen Teil, der dermalen Papille, kommt. Die dermale Papille scheint in diesem Kommunikationssystem eine leitende Funktion auszuführen, da sie die Signale zu sezernieren scheint, die für die folliculäre Proliferation notwendig sind (Jahoda et al., 1984; Cotsarelis et al., 1990).

Der *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) ist ein wichtiger Wachstumsfaktor in der Entwicklung eines Haarfollikels. Wie Untersuchungen von Akiyama und Kollegen gezeigt haben, konnte die Expression der entsprechenden Rezeptoren in der dermalen Papille bislang lediglich während der Entwicklung des Haarfollikels nachgewiesen werden (Akiyama et al., 1996). Obwohl die volle biologische Bedeutung der Expression der PDGF-Rezeptoren im Haarfollikel nicht im Detail bekannt ist, weisen doch einige grundlegende Experimente auf deren fundamentale Bedeutung hin. So ließ sich die Proliferation von Haarfollikeln der Ratte durch PDGF maßgeblich steigern (Goodman und Ledbetter, 1992). Andere Experimente an Haarfollikeln der Maus konnten im übrigen eine Beteiligung von PDGF an der Embryogenese des Follikels zeigen, indem die Bildung des Haarkanals durch Antikörper-vermittelte Blockierung des PDGFR $\alpha$  verhindert wurde (Takakura et al., 1996). Somit scheint es sich beim *Platelet-derived Growth Factor* möglicherweise um einen der Faktoren zu handeln, über den die epitheliale-mesenchymale Kommunikation im Haarfollikel ablaufen könnte.

Um die Expression und Funktionalität des PDGF-Systems in Zellen des Haarfollikels zu untersuchen, wurden zwei ausgewählte Zellarten epithelialen und mesenchymalen Ursprungs aus dem Haarfollikel isoliert und kultiviert. Dabei handelte es sich einerseits um folliculäre Keratinozyten (FK), diejenige Zellart, die während des Katagens im Haarzyklus auffälligen apoptotischen Prozessen unterliegt, und andererseits um dermale Papillenzellen (DPC), diejenigen Zellen, von denen man vermutet, dass sie eine übergeordnete Steuerungsfunktion im Haarzyklus ausüben und durch Sezernierung von Wachstumsfaktoren die Interaktion zwischen den Zellpopulationen steuern.

Für den Nachweis der Expression beider PDGF-Rezeptoren in den Zellen auf der Transkriptionsebene wurden ihre jeweiligen RNA revers transkribiert und die resultierenden cDNA in RT-PCR-Untersuchungen eingesetzt. Die Untersuchungen hierzu waren zwar semi-quantitativer Natur, jedoch konnten diese Experimente in beiden Zellarten die eindeutige

Expression von PDGFR $\alpha$  und PDGFR $\beta$  nachweisen. Gleichzeitig offenbarten sie jedoch auch die auffällig schwache und gerade noch detektierbare Expression beider Transkripte in FK. Kultivierte DPC wiesen dagegen eine auf hohem Niveau liegende Expression der Rezeptoren auf. Um die eindeutige Identität der in diesen Untersuchungen detektierten Banden zu beweisen, wurden die jeweils amplifizierten Fragmente in den pT-Adv-Vektor ligiert und DH5 $\alpha$ -Zellen mit diesem transfiziert. Durch die anschließende Sequenzierung dieser Fragmente wurde der eindeutige Nachweis erbracht, dass diese von PDGF-Rezeptoren abgeleitet waren.

Western-Blot-Analysen wurden zur Detektion der Rezeptor-Proteine in FK und DPC durchgeführt. Interessanterweise ergab sich hier jedoch ein gegenüber den RT-PCR-Analysen zu korrigierendes Bild. Auffallend war in diesen Untersuchungen die eindeutige Nachweisbarkeit beider Rezeptor-Typen in FK, während die untersuchten DPC in allen Experimenten PDGFR $\alpha$ -negativ blieben.

Immunhistochemische Färbungen der PDGF-Rezeptoren an zentrifugierten Zellen bestätigten die durch Western-Blot-Analysen erzielten Ergebnisse. Auch hier zeigte sich die vollkommene Abwesenheit des PDGFR $\alpha$  in den DPC, während der PDGFR $\beta$  eindeutig nachgewiesen werden konnte.

Die Abwesenheit des PDGFR $\alpha$  in DPC kann meiner Meinung nach nicht durch die von Kishimoto und Kollegen erzielten Ergebnisse gedeutet werden, die einen Verlust an induktiver Kapazität in DPC beschreiben, wenn diese Zellen vom Epithelium isoliert kultiviert werden (Kishimoto et al., 1999). In ihren Experimenten zeigte sich ein rascher Verlust der GFP (*green fluorescent protein*)-Expression von DPC einer transgenen Maus unter *in-vitro*-Bedingungen.

Um einen durchaus möglichen Expressionsunterschied von PDGFR $\alpha$  in DPC durch *in-vitro*-Kultur auszuschließen, wurden ganze Haarfollikel in der sog. „Whole Organ Culture“ (WOC) kultiviert, am Kryostaten geschnitten und die Schnitte auf Expression der beiden PDGF-Rezeptoren immunhistochemisch untersucht (APAAP).

Die Technik der *Whole Organ Culture* (WOC) bietet gegenüber *in-vitro*-Untersuchungen den großen Vorteil, einen ganzen Haarfollikel und somit die Zellen im Zellverbund untersuchen zu können und interzelluläre Kommunikation und Interaktionen qualifizieren zu können. Somit lassen sich mit diesem neuen Kultivierungs-Modell *in-vivo*-Bedingungen simulieren und mögliche Expressionsartefakte durch *in-vitro*-Kultur minimieren.

Auch in histochemischen Untersuchungen des Ganzfollikelmodells zeigte sich die Abwesenheit des PDGFR $\alpha$  in DPC während die anderen zuvor an FK erzielten Ergebnisse

wiederum bestätigt wurden. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Ergebnisse könnte darin begründet liegen, dass die Expression des Rezeptors auf RNA-Ebene, jedoch seine vollkommene Abwesenheit auf Protein-Ebene die Herkunft, aber nicht die Funktion der Zellen verdeutlicht. DPC stammen von während der Embryogenese PDGFR $\alpha$ -positiven Zellen ab, verlieren aber vermutlich postnatal diese Funktion.

Die genannten Ergebnisse zeigten somit die exklusive und auch stärkere Expression des PDGFR $\beta$  in kultivierten mesenchymalen DPC, während beide Rezeptor-Typen in den epithelialen FK nachgewiesen wurden, allerdings auf einem schwächeren Niveau.

Die verschiedenen Isoformen des PDGF-Liganden üben ihre Funktion durch Bindung an ihre entsprechenden Rezeptoren aus, die zur Klasse der Liganden-induzierten Tyrosin-Kinasen gehören. Zur Zeit sind vier verschiedene PDGF-Polypeptide, PDGF-A, -B, -C und -D, bekannt, von denen das letztgenannte allerdings erst kürzlich beschrieben wurde (LaRoche et al., 2001). Die drei erstgenannten Polypeptide können vier verschiedene Isoformen des PDGF-Liganden bilden (PDGF-AA, -AB, -BB und -CC), die sämtlich als biologisch aktiv beschrieben worden sind. Während der PDGFR $\alpha$  für die drei Isoformen PDGF-A, -B und -C spezifisch ist, binden die PDGF-B-Polypeptide lediglich an den PDGFR $\beta$ . Als Folge einer Stimulation mit PDGF phosphorylieren sich je zwei Rezeptoren über Kreuz an intrazellulären Tyrosin-Resten. Diese Phospho-Tyrosine stellen die Bindungsstellen für Adapter-Moleküle mit Src homology 2 (SH2)-Domänen dar und sind für die Funktion des Rezeptors unerlässlich (Heldin und Westermark, 1999).

Das Ereignis der Tyrosin-Phosphorylierung in Zellen des Haarfollikels durch Stimulation mit PDGF wurde durch Western-Blot-Analysen untersucht. Um intrazelluläre Tyrosin-Phosphatasen zu inhibieren, wurden die Zellen für 10 min mit Natriumorthovanadat (1 mM) präinkubiert und anschließend mittels eines monoklonalen anti-Phospho-Tyrosin-Antikörpers bezüglich der Tyrosin-Phosphorylierung der PDGF-Rezeptoren untersucht. Stimulation von FK mit entweder je 100 ng/ml PDGF-A oder PDGF-B führte innerhalb von 10 min zu einer eindeutigen Zunahme der Phosphorylierung gegenüber den unbehandelten Kontroll-Zellen. Phosphorylierte Tyrosin-Reste des PDGFR $\beta$  in kultivierten DPC konnten lediglich nach Stimulation mit PDGF-B nachgewiesen werden. Die PDGF-A-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung in DPC gelang mangels Expression des betreffenden Rezeptors erwartungsgemäß nicht.

Normalerweise werden weder PDGF-Rezeptoren noch die Liganden in epithelialen Zellen unter physiologischen Bedingungen exprimiert. Die Expression von PDGFR $\alpha$  wird lediglich für kurze Zeit in neonataler Epidermis, aber nicht in Basal-Zellen, follikulären Keratinozyten

oder den mesenchymalen Zellen, die dem folliculären Epithelium benachbart sind, beobachtet (Takakura et al., 1996). In epithelialen Zellen lässt sich die Expression von PDGF-Rezeptoren und den entsprechenden Liganden nur während Wundheilungsprozessen beobachten, allerdings nicht mehr, nachdem diese abgeschlossen sind (Campochiaro et al., 1994). Interessanterweise zeigten die kultivierten FK sowohl die Expression der PDGF-Rezeptoren als auch die der Liganden PDGF-A und PDGF-B, deren Expression ebenso wie die der Rezeptoren mittels RT-PCR nachgewiesen wurde. Vielleicht werden die Liganden in einem autokrinen Stimulationsweg von den FK freigesetzt und stimulieren sich somit über die eigenen Rezeptoren zum Wachstum. Da der Haarfollikel kontinuierlichen Regenerationsprozessen unterliegt (Lavker et al., 1993; Taylor et al., 2000), könnte das gleichzeitige Vorhandensein der PDGF-Rezeptoren und Liganden in FK die besondere Stellung bzw. die spezialisierte Funktion dieser Zellen im Haarfollikel unterstreichen. Dies gilt allerdings nur für den Haarfollikel, nicht für die gesamte Haut.

Das Haarwachstum stellt einen fein regulierten rhythmischen Prozess dar, in welchem jeder Haarfollikel zyklische Zustandsformen durchläuft. Während der Phase des Katagens kommt es zu Rückbildungsprozessen im epithelialen Bestandteil des Follikels, die vermutlich durch apoptotische Prozesse bei den FK ausgelöst werden (Weedon und Strutton, 1981; Lindner et al., 1997). Von der dermalen Papille wird dabei angenommen, dass sie regulierend auf die Steuerung der einzelnen Phasen einwirkt, indem sie verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine produziert und freisetzt (Camacho et al., 2000) und diese dann vermutlich regulierend in den Haarzyklus eingreifen. Die Annahme, dass es diese Zytokin-vermittelte Regulation gibt, ist umso mehr berechtigt, als dass verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren regulierende Kapazitäten im Haarzyklus besitzen. So konnte gezeigt werden, dass die pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) *in vitro* das Haarwachstum komplett hemmen können (Jindo et al., 1994; Philpott et al., 1996). Ebenso können die anti-inflammatorisch wirkenden Zytokine Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) und Interleukin-4 (IL-4), die im Haarfollikel im Stadium des späten Anagens bzw. des frühen Katagens detektiert werden, an den Katagen-induzierenden Mechanismen beteiligt sein (Seiberg et al., 1995; Goerdts und Orfanos, 1999). IL-4 wird durch mononukleäre Zellen sezerniert, die man im späten Anagen um den Haarfollikel detektieren kann (Clerici et al., 1997).

Um eine mögliche Beteiligung von Zytokinen an Wachstums-regulierenden Prozessen im Haarfollikel zu demonstrieren, wurde der Einfluss von das Haarwachstum negativ beeinflussenden Zytokinen auf die Expression der PDGF-Faktoren in DPC und FK näher

untersucht. Zu diesen Zytokinen zählen TGF $\beta$ , IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ . Zusätzlich dazu wurden IL-4 und IFN $\gamma$  in diese Experimente eingeschlossen.

Das in follikulären Strukturen stark exprimierte TGF $\beta$  führt *in vitro* zu einer partiellen Inhibition der follikulären Proliferation und des Haarwachstums (Blume-Peytavi et al., 1998). Ebenso sind IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  als starke Inhibitoren des Haarwachstums *in vitro* beschrieben worden. Lediglich für IL-4 und IFN $\gamma$  waren bis auf eine Hemmung der Proliferation bislang keine das Haarwachstum negativ beeinflussenden Eigenschaften bekannt (Hoffmann et al., 1996; Philpott et al., 1996; Mandt et al., 2002). Für diese Experimente wurden die Zellen, wie in Kapitel 5.6 beschrieben, für 24 Stunden mit den genannten Zytokinen stimuliert und die nach reverser Transkription der gewonnenen RNA erhaltenen cDNA in RT-PCR-Untersuchungen eingesetzt.

In diesen Untersuchungen zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der Expression von PDGF-A in DPC und FK auf transkriptioneller Ebene durch die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-4 und IFN $\gamma$ . Von IL-1 $\beta$  ist bekannt, dass es in epidermalen Keratinozyten, Lymphozyten und Fibroblasten produziert wird. Während FK den Interleukin-1-Rezeptor exprimieren (Danilenko et al., 1996; Little et al., 1996), ist dies in DPC nicht der Fall. Diese exprimieren allerdings IL-1 $\beta$ , so dass dieses eine Schlüsselfunktion im mesenchymal-epithelialen Wechselspiel des Haarfollikels einnehmen könnte. Es ist allerdings bislang unbekannt, ob diese Annahme zutrifft. Weitere Studien müssten dies im Detail klären.

Humane FK zeigten nach Inkubation mit TNF $\alpha$  keine auffällige Änderung der Expression von PDGF-Faktoren, während dieses Zytokin in DPC zu einer ähnlichen Reduzierung von PDGF-A führte wie durch IL-1 $\beta$ . Beide Zytokine hatten in vorherigen Studien ein hohes Potential zur Inhibierung von Haarfollikel-Kulturen gezeigt (Xiong und Harmon, 1997; Philpott et al., 1996).

Die anderen getesteten Zytokine hatten entweder keinen oder keinen signifikanten Einfluss auf die Regulation der Expression beider PDGF-Faktoren in DPC und FK. Von den beobachteten Wirkungen der Zytokine war die IL-1 $\beta$ -induzierte die auffälligste. Sie führte sowohl in DPC als auch in FK zu einer 50 % igen Reduzierung der Expression von PDGF-A. In DPC war der inhibitorische Effekt von TNF $\alpha$  auf die PDGF-A- Synthese vergleichbar stark wie der IL-1 $\beta$ -induzierte, während FK unbeeinflusst blieben. TGF $\beta$  zeigte von allen eingesetzten Zytokinen den geringsten Einfluss auf die Expression von PDGF-A und PDGF-B sowohl in DPC als auch in FK und führte zu keinen signifikanten Änderungen.

Die Ergebnisse bezüglich der Zytokin-vermittelten Regulation der beiden PDGF-Faktoren fügen sich in das gegenwärtige Wissen über regulatorische Kapazitäten von pro-inflammatorischen oder Apoptose-induzierenden Zytokinen im Haarzyklus ein. Die Faktoren IL-1 $\beta$ , IL-4 und IFN $\gamma$  folgen diesem Muster und induzierten die auffälligsten Regulation der PDGF-Synthese.

Interessanterweise haben Studien unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass sowohl IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , die man auch als Th1-Zytokine klassifiziert, als auch TGF $\beta$  keine Apoptose in FK *in vitro* auslösen (Mandt et al., 2002). Diese Experimente fanden vor dem Hintergrund statt, eine mögliche Beteiligung dieser pro-inflammatorischen Zytokine an apoptotischen Prozessen in FK zu untersuchen, um potentielle Zytokin-vermittelte Mechanismen bei der Rückbildung des Haarbulbus im Katagen aufzudecken. Anhand der gewonnenen *in-vitro*-Daten kann allerdings nur geschlossen werden, dass das bekannte Haarwachstum-reduzierende Potential der genannten Zytokine vermutlich nicht durch apoptotische Prozesse der FK vermittelt wird. Ob das reduzierte Wachstum über eine Expressionsreduktion von PDGF-Faktoren vermittelt wird, bleibt spekulativ und müsste in weiteren Untersuchungen detaillierter erforscht werden. Lediglich IL-4, ein anti-inflammatorisches Th2-Zytokin, zeigte als einziges Zytokin ein deutliches Apoptose-induzierendes Potential in Relation zur getesteten Konzentration. *In vivo* wird dieses Zytokin z.B. durch Monozyten, die während des späten Anagens um den Haarfollikel herum auftreten, sezerniert (Westgate et al., 1997). Da der IL-4-Rezeptor in Haarfollikeln der menschlichen Haut exprimiert wird (Varricchio et al., 1997), könnten den Rückbildungsprozessen des Haarbulbus im Katagen IL-4-vermittelte apoptotische Prozesse zugrunde liegen.

*In vivo* stimuliert PDGF-A die Angiogenese, allerdings ist dieser Effekt indirekt, da Endothelzellen keine PDGF-Rezeptoren exprimieren (Plate et al., 1992). In geringen Konzentrationen ist PDGF-A ein Lockstoff für Fibroblasten, Monozyten und Neutrophile, die u.a. VEGF sezernieren (Siegbahn et al., 1990). PDGF-B besitzt ebenso die Angiogenese fördernde Eigenschaften. Kürzlich wurde durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt, dass PDGF-A die Synthese von VEGF in dermalen Papillenzellen signifikant stimulierte. Gleiches wurde für Zellen neuroektodermalen Ursprungs bewiesen, in denen PDGF-B die VEGF-Synthese induzierte (Tsai et al., 1995). Obwohl die Bedeutung von PDGF für den Haarzyklus und die Angiogenese im Haarfollikel noch nicht in allen Einzelheiten erkannt ist, wurde doch gezeigt, dass es für die Entwicklung des Haarkanals unentbehrlich ist (Takakura et al., 1996). Durch die PDGF-A-vermittelte VEGF-Expression kommt PDGF-A große Bedeutung in der Bildung neuer Kapillargefäße im Anagen zu.

PDGF ist neben anderen Faktoren ein wichtiger Aktivator der Sphingosin-Kinase (SphK), deren Produkt, das Sphingosin-1-phosphat (SPP), an Apoptose-inhibierenden Prozessen beteiligt ist (Spiegel und Milstien, 2000; Pyne und Pyne, 2002). Da SPP als bioaktives Sphingolipid nicht nur als intrazellulärer „second messenger“ fungieren kann, sondern auch als extrazellulärer Ligand über EDG-Rezeptoren wirkt, gilt es als zu einer neuen Klasse von Lipid-Mediatoren gehörend.

Generell ist eine funktionelle Expression von verschiedenen Enzymen der Sphingolipid-vermittelten Signaltransduktion im Allgemeinen oder der Sphingosin-Kinase im Besonderen in Zellen des Haarfollikels bislang noch unerforscht.

Die mRNA Expression der Sphingosin-Kinase in dermalen Papillenzellen, follikulären Keratinozyten und HaCaT-Keratinozyten wurde mittels RT-PCR untersucht. Zu diesem Zweck wurden gesamte RNA revers transkribiert und 3 µg der resultierenden cDNA in anschließenden Untersuchungen eingesetzt. Die gewählten Primer spezifizierten ein 524 bp großes Fragment der SphK, das in allen drei untersuchten Zellarten deutlich nachweisbar war. In Ermangelung eines zu erwerbenden Antikörpers gegen die SphK, konnte im Rahmen dieser Dissertation kein direkter Protein-Nachweis der SphK erbracht werden.

Um eine mögliche funktionelle Expression der SphK in Zellen des Haarfollikels zu untersuchen, wurden die Zytosole von dermalen Papillenzellen und follikulären Keratinozyten, wie in Kapitel 4.5.3 beschrieben, hergestellt und für den SphK-Assay vorbereitet. Zur Etablierung eines funktionierenden SphK-Assays wurden anfangs Swiss-3T3-Fibroblasten als Positivkontrolle eingesetzt (Olivera et al., 1994), später allerdings nicht mehr. Das Prinzip des SphK-Assays beruht auf der Phosphorylierung von zugefügtem *D-erythro*-Sphingosin, dem natürlicherweise bevorzugten Substrat, mit  $^{32}\text{P}$  durch die im Zytosol nachzuweisende SphK-Aktivität. Nach Beendigung der Reaktionen wurden die Reaktionsprodukte aufgearbeitet und chromatographisch auf DC-Platten getrennt.

Die experimentellen Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen erstmalig die funktionelle Expression der Sphingosin-Kinase in dermalen Papillenzellen und follikulären Keratinozyten. In weiteren Experimenten zeigte sich, dass es im Verlauf der Inkubation zu einem steten Aktivitätsverlust des Enzyms kommt und kein lineares Verhältnis zwischen der Inkubationsdauer und der resultierenden Menge SPP besteht. Zusätzlich zeigte das Enzym in weiteren Untersuchungen eine Spezifität für das Sphingosin-Isomer *D-erythro*-Sphingosin (trans-Isomer), welche auch in der Literatur beschrieben ist (Pyne und Pyne, 2000).

SphK-Aktivität in Keratinozyten kann durch die strukturell ähnlichen *DL-threo*-Dihydrosphingosin (DHS) und *D-erythro-N,N*-Dimethylsphingosin (DMS) kompetitiv



inhibiert werden. Von den beiden Inhibitoren zeigte sich DHS als wirkungsvoller und führte bereits ab einer eingesetzten Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  zu einer gegenüber unbehandelten Kontrollzellen 50 % ige Reduzierung der SphK-Aktivität in Keratinozyten. Der Einsatz von DMS führte zwar ebenso zu einer Reduktion der SphK-Aktivität in Keratinozyten, allerdings zeigte sich erst ab einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  eine 25 % ige Inhibierung, die sich auch durch höhere Konzentrationen des Inhibitors nur unwesentlich steigern ließ.

In der Literatur sind einige Methoden beschrieben worden, die einer Bestimmung der intrazellulären SPP-Konzentrationen dienen. Yatomi und Kollegen berichten über eine Bestimmung mittels einer chemischen Modifizierung von SPP zu  $^3\text{H}$ -markiertem Ceramid-1-phosphat (Yatomi et al., 1995). Ein anderes Verfahren beruht auf der Dephosphorylierung von SPP zu Sphingosin und anschließender Phosphorylierung mit  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  (Edsall und Spiegel, 1999). Diese Methoden haben sämtlich den Nachteil, dass sie auf radioaktiven Verfahren beruhen und somit aufgrund von Sicherheitsmaßnahmen im Vergleich zu nicht-radioaktiven Methoden ohne den Einsatz solcher Stoffe aufwändiger durchzuführen sind.

Ich bevorzugte eine Methode, die modifiziert nach Ruwisch et al. (Ruwisch et al., 2001) durchgeführt wurde. Das Verfahren beruhte auf einer Derivatisierung von SPP mittels o-Phthaldialdehyd (OPA) mit anschließender Auftrennung der Derivate über HPLC. Das SPP wurde nach der jeweiligen Stimulation von Zellen über eine alkalische Lipid-Extraktion isoliert. Aufgrund der polaren Phosphatgruppe lässt sich das SPP in dieser Extraktion aus der wässrigen Phase isolieren und anschließend derivatisieren. Die Methode ist wesentlich schneller als die anderen beschriebenen und erlaubt eine SPP-Bestimmung im Konzentrationsbereich von einigen pmol.

Die intrazellulären SPP-Konzentrationen variieren stark aufgrund der Synthese durch die SphK und des Abbaus durch Pyridoxalphosphat-abhängige Lyasen (Mandala et al., 1998) und SPP-Phosphatasen (De Ceuster et al., 1995; Brindley et al., 2000; Mandala, 2001). Alle bisher bekannten Studien führen allerdings gestiegene SPP-Konzentrationen ausschließlich auf eine Agonist-induzierte Steigerung der SphK-Aktivität zurück und weniger auf eine Inhibierung abbauender Enzymaktivitäten. So ist bis heute keine Regulation abbauender Enzyme bekannt. Die geringe basale Konzentration von SPP legt daher die Vermutung nahe, dass SPP eher über eine Steigerung der SphK-Aktivität reguliert wird. Dennoch ist der Zeitpunkt einer Messung von SPP nach einer Stimulation von maßgeblichen Einfluss, da eine Agonist-stimulierte Erhöhung der SphK-Aktivität rasch auf die basale Aktivität zurückfällt.

In meinen Untersuchungen wurden folliculäre Keratinozyten in einer Konfluenz von 70 % eingesetzt und mit den Zytokinen TNF $\alpha$  (10 ng/ml + 100 ng/ml) und IL-4 (10 ng/ml + 100 ng/ml) für 24 h stimuliert. Nach der Extraktion des SPP aus den Zellen und der Derivatisierung konnte in unbehandelten Kontrollzellen ein SPP-Gehalt von ungefähr 58 pmol /  $2 \times 10^6$  Zellen nachgewiesen werden. Ein vergleichbarer Wert war nur noch für IL-4 (10 ng/ml)-behandelte Zellen nachweisbar. Alle anderen Werte waren auf ein so niedriges Niveau heruntergegangen, dass im Rahmen der Messgenauigkeit SPP als nicht mehr nachweisbar eingestuft werden musste.

Legt man das Apoptose-induzierende Potential von IL-4 (100 ng/ml) in folliculären Keratinozyten zugrunde (Mandt et al., 2002), so ließe sich dieses über eine Minderung der Aktivität der SphK in diesen Zellen erklären. Dieser mögliche Erklärungsansatz relativiert sich allerdings wieder durch die gemessenen Daten bezüglich des TNF $\alpha$ . Dieses Th1-Zytokin, dessen negative Beeinflussung auf das Haarwachstum bekannt ist, konnte nicht mit apoptotischen Prozessen in Verbindung gebracht werden. Insofern müsste eine TNF $\alpha$ -vermittelte Herab-Regulierung der SphK in diesen Zellen näher untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass SPP nicht nur mit der Vermittlung anti-apoptotischer Prozesse in Verbindung gebracht wird, sondern ebenso die Proliferation beeinflusst.

Interessanterweise führte eine Stimulation von Keratinozyten mit SPP nicht zu einer gesteigerten Proliferation der Zellen. Um den Effekt von SPP auf die Proliferation zu messen, wurde die Verstoffwechslung von MTT photometrisch gemessen und die Adsorption der stimulierten Zellen in Relation zu unstimulierten Zellen (100 %) gesetzt. Bei Konzentrationen bis 20  $\mu$ M wurde zwar eine geringfügig verminderte Proliferation gemessen, diese ging allerdings nicht mit einer vermehrten LDH-Freisetzung gegenüber der Kontrolle einher, wie man sie bei Zytotoxizität erwarten müsste.

Das intrazelluläre Verhältnis der beiden Sphingolipide Ceramid und SPP scheint das Schicksal einer Zelle maßgeblich zu beeinflussen. Während Ceramide Apoptose-induzierende Eigenschaften besitzen (Bektas et al., 1998; Raisova et al., 2001), zeigt das SPP eine gegenteilige Wirkung. Diese gegenläufigen Effekte bilden die Basis der „Rheostat-Theorie“, die als kritischer Faktor für das zelluläre Schicksal betrachtet wird.

Um intrazelluläre Effekte als Folge von Stimulationen mit diesen Metaboliten zu untersuchen, wurden Expressions-Arrays durchgeführt. Zu 70 % konfluente Kulturen von HaCaT-Keratinozyten wurden mit entweder C<sub>8</sub>-Ceramid in einer Konzentration von 30  $\mu$ M für 24 h oder mit Sphingosin-1-phosphat in einer Konzentration von 10  $\mu$ M für 4 h stimuliert.

Kontrollansätze wurden mit MeOH behandelt, um unspezifische Lösungsmittel-verursachte Expressionsartefakte auszuschließen. Diese Experimente wurden für jede Stimulationsbedingung zwei mal wiederholt. In die abschließende Bewertung flossen lediglich Ergebnisse bezüglich der Expression von Apoptose-Genen ein, die somit in je zwei unabhängigen Versuchen demselben Trend folgten und die durch Ceramid und SPP gegenläufig reguliert wurden.

Lässt man im Rahmen dieser Untersuchungen wohlwissend die Möglichkeit außer Acht, dass *in vivo* selbst eine Veränderung der Expression eines Apoptose-Gens um 10 % gravierende Folgen haben könnte, so ließen sich als Ergebnis der Arrays vornehmlich Effekte bei den Caspasen 3 und 8 feststellen. Stimulation mit C<sub>8</sub>-Ceramid führte zu einer signifikanten Hoch-Regulierung der entsprechenden RNA, während SPP den gegenteiligen Effekt vermittelte. Dieses Ergebnis ist an sich außergewöhnlich, da diese Enzyme in der Zelle als Zymogene vorliegen und nicht erst als Folge apoptotischer Prozesse in der Zelle transkribiert werden.

Die Caspase 8 gehört zur Gruppe der Initiator-Caspasen und aktiviert auf ein Apoptose-Signal hin die Caspase 3, die zur Gruppe der Effektor-Caspasen gehört. Das Auftreten der aktiven Caspase 3 markiert für eine Zelle den „point of no return“, ab dem für die Zelle nur noch der Apoptose-Weg bestimmt ist.

Die Aktivität der Caspase 3 als Folge von Stimulationen mit C<sub>8</sub>-Ceramid (30 µM, 24 h) und SPP (20 µM, 24 h) wurde im Folgenden gesondert untersucht. Während das Ceramid eine hohe Aktivität der Caspase 3 induzierte, war die durch SPP verursachte Aktivität auf dem Niveau der Kontrolle. Zusätzlich dazu lag das Ergebnis einer Co-Stimulation mit SPP und Ceramid der genannten Konzentrationen zwar auf einem höheren Niveau als mit SPP alleine, aber deutlich unter dem Niveau der Ceramid-Stimulation.

Diese Ergebnisse zusammen mit den Resultaten der Arrays beweisen eindeutig die gegenteilige Wirkung der beiden Metaboliten SPP und Ceramid und erhärten die „Rheostat-Theorie“ (Spiegel und Milstien, 2000).