

## 7. Zusammenfassung

Charakteristisch für die Phase des Katagens, der Regressions-Periode im Haarzyklus, sind komplexe Rückbildungsprozesse im epithelialen Anteil des Haarfollikels, den folliculären Keratinozyten (FK). Einige Studien konnten zeigen, dass vermutlich Apoptose das zentrale Element dieser Rückbildungs-Periode darstellt. In verschiedenen Zellarten, u.a. auch in von der Haut abgeleiteten Zellpopulationen, konnte gezeigt werden, dass Sphingolipide an signaltransduktorischen Prozessen massgeblich beteiligt sind. So weist Sphingosin-1-phosphat (SPP) in vielen Zellen mitogene Effekte auf und besitzt dem Ceramid entgegengesetzte Eigenschaften.

Ziel dieser Arbeit war die Suche nach neuen intrafollikulären Kontrollmechanismen, die dem Katagen des Haarfollikels zugrunde liegen. Daher bildeten Untersuchungen zur funktionellen Expression der Sphingosin-Kinase (SphK) in Zellen des menschlichen Haarfollikels die zentrale Fragestellung dieser Arbeit.

Die Expression der SphK auf RNA-Ebene konnte sowohl in dermalen Papillenzellen (DPC), als auch in FK des humanen Haarfollikels detektiert werden. In beiden Zellpopulationen konnte mit Hilfe von SphK-Assays der funktionelle Nachweis des Enzyms *in vitro* erbracht werden. Die weitere Charakterisierung der SphK in Keratinozyten zeigte die Spezifität des Enzyms für das trans-Isomer von *D-erythro*-Sphingosin. Die strukturell ähnlichen Derivate des Sphingosins *DL-threo*-Dihydrosphingosin und *D-erythro-N,N*-Dimethylsphingosin erwiesen sich als schlechtere Substrate und führten zu einer kompetitiven Inhibierung der SphK-Aktivität.

Die intrazellulären Effekte der Stimulation mit Ceramid einerseits und SPP andererseits sind z.Z. nicht genau bekannt. Im Rahmen von Expressions-Arrays konnte gezeigt werden, dass die Expression der Caspasen 3 und 8, zwei wichtigen Mitgliedern der Caspasen-Kaskade im Apoptose-Prozess, durch die genannten Sphingolipide gegenläufig reguliert wurden. Die Aktivität der Caspase 3, die den „point of no return“ für eine Zelle markiert, wurde nach Stimulation mit SPP und Ceramid gesondert untersucht. Eine Stimulation mit Ceramid führte zu einer drastischen Aktivierung der Caspase 3. Im Gegensatz dazu führten Stimulationen mit SPP alleine oder Co-Stimulationen mit Ceramid und SPP zu Aktivitätswerten der Caspase 3, die den Basalwerten unstimulierter Kontrollzellen entsprach.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die beiden Sphingolipide Schlüsselfunktionen in der Sphingolipid-vermittelten Signaltransduktion einnehmen und dass sie jeweils als intrazellulärer Gegenspieler des anderen fungieren. Diese Ergebnisse werden als Bestätigung

der „Rheostat-Theorie“ gewertet, die somit auch in Zellen des menschlichen Haarfollikels ihre Gültigkeit besitzt.

Der *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) ist einer der prominentesten Aktivatoren der SphK. Da dieser Wachstumsfaktor darüber hinaus auch für die Entwicklung von Haarfollikeln ein unentbehrliches Mitogen darstellt, wurde das Expressionsmuster von PDGF-Rezeptoren und der entsprechenden Liganden in follikulären Keratinozyten (FK) und dermalen Papillenzellen (DPC) untersucht. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass FK beide Liganden auf Transkriptions-Ebene exprimieren, während in DPC lediglich PDGF-A nachweisbar war. In anschließenden RT-PCR-, Western-Blot-, Tyrosin-Phosphorylierungs- und immunhistochemischen Untersuchungen wurde die Expression der entsprechenden Rezeptoren untersucht. Dabei zeigte sich, dass bis auf die Abwesenheit des PDGFR $\alpha$  in DPC, die Rezeptoren in den untersuchten Zellen exprimiert werden.

Verschiedene Zytokine, die das Haarwachstum negativ beeinflussen, wurden auf ihr Potential getestet, die Expression der PDGF-Liganden zu modulieren. In diesen Untersuchungen bewirkten die das Haarwachstum negativ beeinflussenden Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-4 und IFN $\gamma$  sowohl in FK als auch in DPC eine deutliche Minderung der Expression von PDGF-A. Interessanterweise kann IL-4 Konzentrations-abhängig apoptotische Prozesse in FK induzieren, wie unsere Arbeitsgruppe kürzlich zeigen konnte. Wie Konzentrationsbestimmungen von SPP über HPLC gezeigt haben, reguliert IL-4 die Aktivität der SphK deutlich herunter. Eine Beteiligung von IL-4 an apoptotischen Prozessen in FK, entweder durch direkte Aktivitätsminderung der SphK oder über eine Minderung der Expression von PDGF-A müsste eingehender untersucht und diskutiert werden. Wie *in-vitro*-Untersuchungen gezeigt haben, kann die SphK-Aktivität in FK und DPC signifikant durch PDGF gesteigert werden.

Die erzielten Ergebnisse deuten auf eine starke Beteiligung von Sphingolipid-vermittelten Prozessen in der Regulation des Haarzyklus hin. Wie hoch dieser Anteil an den apoptotischen Prozessen im Katagen des Haarzyklus ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

## 7.1 Summary

A characteristic feature of the catagen stage of the hair follicle cycling are complex degeneration processes in the epithelial portion of the hair follicle, i.e. the follicular keratinocytes (FK). A few studies could show that in all probability apoptosis may be the central incident underlying these degeneration processes. Sphingolipids have been demonstrated to take part in signalling processes in different types of cells, thereunder, skin-derived cells. Thus, sphingosine-1-phosphate (SPP) has been shown to possess mitogenic activity in many cell types and to promote opposing effects to ceramide.

This dissertation was designed to search for new intrafollicular control mechanisms underlying the catagen stage of the hair follicle. In this context, the functional expression of sphingosine kinase (SphK) in cells of the human hair follicle was explored.

Both of the dermal papilla cells (DPC) and FK could be shown to express SphK on the RNA level. In addition, the functional expression of the enzyme activity was investigated by SphK assays *in vitro*. Further characterisation of the enzyme properties displayed the specificity for the trans-isomer of *D-erythro*-sphingosine. The structurally related sphingosine derivatives *DL-threo*-dihydrosphingosine and *D-erythro-N,N*-dimethylsphingosine were shown to be poor substrates which led to a competitive inhibition of SphK activity.

In actual fact, the intracellular effects of stimulations by either ceramide or SPP are not known in detail. Expression-arrays could show that the expression of caspases 3 and 8, two important members of the family of caspases, were controversially regulated by these two sphingolipids. The activity of caspase 3, whose activity marks the 'point of no return' for the cell, was investigated precisely after stimulation with either ceramide or SPP. Stimulation with ceramide led to a significantly increased activity of caspase 3. In contrast, stimulation with either SPP alone or co-stimulation with ceramide and SPP led to normal caspase 3 activity values.

The results clearly show that both sphingolipids are key players in sphingolipid-mediated signal transduction and that they mediate opposing effects in the cell. Thus, the results confirm the validity of the 'rheostat theory', also in cells of the human hair follicle.

Platelet-derived growth factor (PDGF) is one of the most prominent activators of SphK. As this growth factor is also an essential mitogen for the development of hair follicles, the expression pattern of PDGF receptors and their corresponding ligands were investigated in follicular keratinocytes (FK) and dermal papilla cells (DPC). In these examinations it could be shown that both ligands are expressed in FK on the RNA level, whereas, DPC only express PDGF-A. In RT-PCR -, Western-Blot -, tyrosine-phosphorylation - and immunohistochemical

examinations, subsequently the expression of corresponding PDGF receptors was investigated. Apart from the expression of PDGFR $\alpha$  in DPC, the receptors were shown to be expressed in the investigated cells.

Different cytokines, known to negatively regulate the hair growth activity, were investigated for their ability to modulate the expression of PDGF ligands. The cytokines IL-1 $\beta$ , IL-4 and IFN $\gamma$  caused a significant decrease of PDGF-A synthesis in FK and DPC. Interestingly, as recently shown by our study-group, IL-4 is able to induce apoptosis in FK in a concentration-dependent manner. As seen by determination of SPP levels by HPLC, IL-4 negatively regulates SphK activity. Therefore, a participation of IL-4 in apoptotic processes in FK, either by reduction of SphK activity or by reduction of PDGF-A expression, should be clarified in further investigations. As shown by investigations *in vitro*, SphK activity can be significantly increased by PDGF.

The results obtained in this dissertation indicate a strong participation of sphingolipid-mediated processes in the regulation of hair follicle cycling. The proportion of sphingolipid signalling on apoptotic processes during hair follicle cycling needs to be further investigated.