

Abstract

Hair follicles (HFs) of mammalian epidermis undergo cyclic bouts of regeneration throughout lifetime in order to continuously form new hairs. Stem cells (SCs) residing in the HF bulge and hair germ fuel the hair regeneration cycle that comprises three phases: (1) growth (anagen), where bulge and hair germ cells proliferate to generate the new hair shaft; (2) regression (catagen), where part of the HF keratinocytes undergo apoptosis and surviving cells move upwards to regenerate the hair germ; and (3) rest (telogen), where stem cells are mainly quiescent. Thus, the skin undergoes frequent remodelling, especially during catagen, which is a crucial phase for the re-establishment of the new SC niche. However, the cellular and molecular mechanisms regulating catagen-associated tissue remodelling are still not well understood.

Here, we investigate the physiological consequences and the impact of defective apoptosis on the process of tissue remodelling during hair regeneration. In particular, we aimed to interfere with HF regression by overexpressing the anti-apoptotic protein Bcl-2 in murine epidermis (Bcl-2^{EOE} mice) to inhibit the mitochondrial apoptosis pathway. We show a block of cell death specifically in HF keratinocytes of Bcl-2^{EOE} mice during catagen. This increase in HF cell survival led to the formation of an enlarged HF bulge compartment, characterized by the expression of SC markers like SOX9 and Keratin 15, and a change in the architecture of the SC niche in telogen. Thus, we demonstrated that keratinocyte surviving catagen interfere with the formation of the SC niche during the following phase and can acquire some of the SC markers.

On a cellular level, we show that Bcl-2-expressing cells surviving and retracting to the abnormal HF bulge in catagen are descendants of Lgr5+ HF SCs. Importantly, as a consequence of defective catagen-associated remodelling, the next hair regeneration cycle is impaired, as demonstrated by a delay in anagen onset and a stall in SC proliferation.

Mechanistically, telogen prolongation correlated with the upregulation of SC quiescence markers and downregulation of SC activating signals. Thus, our data reveal that keratinocyte apoptosis during catagen is required for a proper regeneration process.

Intriguingly, the dermal white adipose tissue was also affected in Bcl-2^{EOE} mice. Specifically, the block in cell death of HF keratinocytes resulted in lipolysis impairments during catagen and a delay in adipocyte expansion normally taking place at anagen onset. Further mechanistic studies *in vitro*, involving the treatment of adipocytes with the supernatant of apoptotic keratinocytes, indicate that factors produced by dying HF keratinocytes may directly regulate adipocyte lipolysis. Taken together, our novel data demonstrate that precise regulation of cell death during the hair cycle is crucial for the establishment and function of the HF SC niche. Importantly, our model gives new insights into cell autonomous and non-autonomous mechanisms of SC-driven hair regeneration and tissue remodelling and provides a valuable tool to further dissect the mechanistic foundations of cellular interaction ruling hair cycle-associated skin remodelling.

Zusammenfassung

Haarfollikel (HFs) der Epidermis von Säugetieren durchlaufen lebenslang zyklische Regenerationsschübe, um kontinuierlich neue Haare zu bilden. Stammzellen (SCs), die sich in der HF-Ausbuchtung und im Haarkeim befinden, treiben den Haarregenerationszyklus an, der drei Phasen umfasst: (1) Wachstum (Anagen), in dem sich Ausbuchtung und Haarkeimzellen vermehren, um den neuen Haarschaft zu erzeugen; (2) Regression (Katagen), bei der ein Teil der HF-Keratinocyten Apoptose erfährt und überlebende Zellen sich nach oben bewegen, um den Haarkeim zu regenerieren; und (3) Ruhe (Telogen), wo Stammzellen hauptsächlich ruhen. Daher wird die Haut häufig umgebaut, insbesondere während der Katagenzeit, die eine entscheidende Phase für die Wiederherstellung der neuen SC-Nische darstellt. Die zellulären und molekularen Mechanismen, die den Katagen-assoziierten Gewebeumbau regulieren, sind jedoch noch nicht gut verstanden.

Hier untersuchen wir die physiologischen Folgen und den Einfluss einer fehlerhaften Apoptose auf den Prozess des Gewebeumbaus während der Haarregeneration. Insbesondere zielten wir darauf ab, die HF-Regression zu stören, indem wir das anti-apoptotische Protein Bcl-2 in muriner Epidermis (Bcl-2^{EOE}-Mäuse) überexprimierten, um den mitochondrialen Apoptoseweg zu hemmen. Wir zeigen einen Block des Zelltods spezifisch in HF-Keratinocyten von Bcl-2^{EOE}-Mäusen während Katagen. Diese Zunahme des Überlebens von HF-Zellen führte zur Bildung eines vergrößerten HF-Bulge-Kompartiments, das durch die Expression von SC-Markern wie SOX9 und Keratin 15 und einer Veränderung der Architektur der SC-Nische im Telogen gekennzeichnet ist. Somit haben wir gezeigt, dass Keratinocyten, die Katagen überleben, die Bildung der SC-Nische während der folgenden Phase stören und einige der SC-Marker erwerben können.

Auf zellulärer Ebene zeigen wir, dass Bcl-2-exprimierende Zellen, die überleben und sich in die abnormale HF-Ausbuchtung in Katagen zurückziehen, Nachkommen von Lgr5+ HF-SCs sind. Wichtig ist, dass als Folge eines fehlerhaften Katagen-assoziierten Umbaus der nächste Haarregenerationszyklus beeinträchtigt wird, wie durch eine Verzögerung des anagenen Einsetzens und einen Stillstand der SC-Proliferation gezeigt wird. Mechanistisch korrelierte die Telogenverlängerung mit der Hochregulierung von SC-Ruhemarkern und der Herunterregulierung von SC-Aktivierungssignalen. Somit zeigen unsere Daten, dass Keratinozyten-Apoptose während Katagen für einen ordnungsgemäßen Regenerationsprozess erforderlich ist.

Interessanterweise war auch das dermale weiße Fettgewebe bei Bcl-2^{EOE}-Mäusen betroffen. Insbesondere führte die Blockierung des Zelltods von HF-Keratinozyten zu Beeinträchtigungen der Lipolyse während der Katagenphase und zu einer Verzögerung der Adipozytenexpansion, die normalerweise beim Einsetzen des Anagens auftritt. Weitere mechanistische In-vitro-Studien, die die Behandlung von Adipozyten mit dem Überstand von apoptotischen Keratinozyten umfassen, weisen darauf hin, dass Faktoren, die von sterbenden HF-Keratinozyten produziert werden, die Adipozyten-Lipolyse direkt regulieren können. Zusammengefasst zeigen unsere neuartigen Daten, dass eine präzise Regulierung des Zelltods während des Haarzyklus entscheidend für die Etablierung und Funktion der HF-SC-Nische ist. Wichtig ist, dass unser Modell neue Einblicke in zellautonome und nicht-autonome Mechanismen der SC-gesteuerten Haarregeneration und des Gewebeumbaus gibt und ein wertvolles Werkzeug bietet, um die mechanistischen Grundlagen der zellulären Interaktion, die den Haarzyklus-assoziierten Hautumbau bestimmen, weiter zu analysieren.