

EINLEITUNG

Die Zytostatika-induzierte Alopezie (ZIA) stellt als häufig auftretende Nebenwirkung einer Chemotherapie ein zusätzliches Problem für Patienten mit malignen Erkrankungen dar. Sie wird als Eingriff in die körperliche Integrität und als Attraktivitätsverlust empfunden. Weiterhin reduziert die ZIA das Selbstwertgefühl und erhält infolge der sozialen Isolation eine sekundäre Krankheitsbedeutung. Aufgrund der schlechten Prävention stellt die ZIA eine ernsthafte psychische Belastung für die Patienten und deren Angehörige dar. Sie wird, besonders nach der Gabe des Zytostatikums Cyclophosphamid (CYP), zu einer Herausforderung für die klinisch behandelnden Ärzte. Entscheidende Fortschritte in der Prophylaxe und der Therapie der ZIA sind von der Entwicklung geeigneter Tiermodelle zu erwarten, an denen sich die Pathobiologie der ZIA ebenso wie die protektiven Effekte potentieller Anti-ZIA-Agentien studieren lassen. Solche Tiermodelle sind ferner nützlich, um unter den potentiellen Anti-ZIA-Agentien diejenigen auszuwählen, welche die gewünschten Antitumoreffekte aufweisen.

In diesem Zusammenhang sind die reifen Haarfollikel (HF) der C57BL/6 Maus mit ihrer gut studierten Morphologie und zyklischen Aktivität ein attraktives Modell für das Studium der Pathologie diverser Formen des Haarverlusts, einschließlich der ZIA. Die hier vorgelegte Arbeit hat zur Aufgabe, anhand des C57BL/6 Mausmodells für die Haarforschung ein einfaches und gleichzeitig hoch leistungsfähiges Modell für das *in vivo* Studium der Pathologie und Manipulation der ZIA zu etablieren. In der Studie wird die Wirkung einer intraperitonealen Einzeldosis von 150 mg/kg CYP auf den Haarwuchs, die Pigmentierung und die Wiederherstellung der Haarfollikelmorphologie von depilationsinduzierten reifen Anagen VI-HF detailliert dargestellt. Die CYP-bedingten Effekte sind sowohl makroskopisch anhand der Veränderung des Hautkolorits und der Reduktion des Haarfells als auch licht- und elektronenmikroskopisch analysiert worden.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die behandelten Versuchstiere sowohl makroskopisch als auch histologisch die für die Pathologie der ZIA nach einer CYP-Behandlung bei Menschen charakteristischen Phänomene erfolgreich imitieren können. Auffallend sind das anfangs diffuse Effluvium, die dann ungleichmäßig verteilte Alopezie mit plötzlichem Eintritt und rapider Progression, welche innerhalb kurzer Zeit mehr als die Hälfte der Rückenhaut erfassen kann. Die Befunde konnten histologisch mit massivem Verlust der Bulbuskeratinozyten, Schwellung der dermalen Papille (DP), Melanininkontinenz und Clumping sowie mit einem Haarschaftverlust

und einer außergewöhnlichen Erweiterung des distalen Haarkanals begründet werden. Die ungewöhnliche Verteilung der multiplen, ektopischen Melaningranula sowie die morphologisch stark geschädigten Matrixkeratinozyten in den HF von CYP-behandelten Tieren wurden auch auf ultrastruktureller Ebene bestätigt.

Die Daten belegen die Existenz von zwei pathologischen Grundreaktionen der Anagen VI-HF auf zytostatische Noxen, wobei die HF ab einer bestimmten Dosischwelle in die dystrophe Anagen VI- oder die dystrophe Katagenphase eintreten können. Auffallend sind die regionalen Differenzen der folliculären Reaktion auf CYP. Auch nach schwersten Schäden ist die HF-Morphologie reparierbar. Die registrierten primären und sekundären Erholungsmuster während der Reparaturprozesse der HF-Morphologie, der Repigmentation und der Wiederherstellung des Haarkleides entsprechen den bekannten Mustern der Wiederherstellung der Kopfhaare nach einer ZIA bei Menschen.

Darüber hinaus konnte die CYP-bedingte Alopezie durch systemische Applikation von Immunophilinliganden (IPL) wie Cyclosporin A (CsA) signifikant beeinflusst werden. Die dreimalige Gabe von 5mg/Maus CsA hat eine protektive Wirkung auf die HF-Morphologie und reduziert die CYP-induzierten Schäden. Der Eintritt der ZIA konnte verzögert, jedoch nicht komplett aufgehoben werden. Die CsA-Gabe favorisiert den dystrophen Anagen VI-Pathomechanismus und unterstützt dadurch die schnelle primäre Erholung der geschädigten HF. Im Gegensatz dazu beschleunigt die CYP-Alleingabe den Übertritt ins dystrophe Katagen, schaltet die primäre Erholung für diese HF-Population aus und begründet die sekundäre Erholung.

Die hohe Relevanz der Ergebnisse der vorgeschlagenen Technik für die pharmakologische Initiation der ZIA garantiert eine detaillierte Untersuchung ihrer Pathologie unter klinisch vergleichbaren Verhältnissen, sodass sie als zuverlässiges Modell für Studium und Selektion geeigneter Pharmaka mit protektiver Wirkung gegen die ZIA erfolgreich herangezogen werden kann.

1.1 ZIA: Hintergrund und Stand der Forschung

Die ZIA ist als Nebenwirkung einer Chemotherapie ein häufiger klinischer Befund (Crouse & Van Scott, 1960, Tierney *et al.*, 1990) und Grund für gravierendes psychisches Unbehagen der Betroffenen (Davidhizar & Bartlett, 1993). Intensität und Stärke des Effluviums sind von der Art des Zytostatikums, seiner Halbwertszeit, der Art (Mono- oder Polychemotherapie) und Dauer der Chemotherapie sowie von der Menge der applizierten Dosis (Einzel- und Gesamtdosis) abhängig (Zaun, 1967, Hood, 1986, Howser, 1996, Branzan, 2005). Kleinere Mengen von CYP, Methotrexat oder Doxorubicin treiben die HF in die Katagenphase, ohne nennenswerte Veränderungen der HF-Morphologie und ausgeprägten Haarausfall (*Effluvium telogenicum*, Kligman, 1961) zu provozieren (Crouse & Van Scott, 1960, Bleiker *et al.* 2005). Hochdosiert stellen sie die HF-Morphologie dystroph um (Zaun, 1967) und bewirken ein lokal begrenztes bis totales Effluvium und eine ZIA bei mehr als 40 % der Patienten. Oral verabreichte Zytostatika verursachen generell eine schwächer ausgeprägte ZIA (Mendelson *et al.* 1970, Tierney *et al.* 1990). Eine besonders schwere Alopezie wird nach der Behandlung mit Daunorubicin, Adriamycin, Vincristin, Ifosfamid und Etoposid beobachtet (Branzan *et al.* 2005).

Die Pathologie der ZIA, einschließlich der CYP-bedingten Alopezie, ist seit Anfang der sechziger Jahre gezielt studiert worden (Crouse & Van Scott, 1960, Braun-Falco, 1961a, Kostanecki *et al.* 1966). Grundsätzlich ist für die ZIA ein *Effluvium anagenicum* des Capillitiums charakteristisch, das infolge einer gestörten Haarschaftformation und veränderter Haarschaftkonsistenz entsteht (Orfanos & Gerstein, 1976, Cotsarelis & Millar, 2001, Branzan *et al.*, 2005). Ein telogenes Effluvium zeigt sich erst Monate später (Braun-Falco, 1961a, Bleiker *et al.* 2005). CYP führt in kleinen Dosen zu schwächer ausgeprägtem Haarverlust als eine intermittierende hochdosierte Behandlung (Zaun, 1967, Stoll, 1976). Klinische Befunde zeigen, dass das zunächst diffusere Effluvium in der Regel sieben bis zehn Tage nach Beginn der Behandlung einsetzt und ausschließlich die zentralen Partien des Capillitiums erfasst (Braun-Falco, 1961b, Kostanecki *et al.* 1966, Tierney *et al.* 1990). Die übrige Körperbehaarung, wie Augenbrauen, Wimpern, Scham-, Achsel- und Flaumhaare, bleibt erhalten (Wagner & Bye, 1979).

Die ZIA kann in ihrer Dauer von zwei Wochen bis zu zwei Monate nach der Initialbehandlung unterschiedlich stark ausgeprägt sein (Tierney *et al.* 1990, Koppel & Boh, 2001). Dabei ist zu beachten, dass die geschädigten HF in der Lage sind, während weiterer sechs bis acht Wochen die Schäden der HF-Architektur zu reparieren und den Haarverlust noch während der Therapie

durch neue, häufig besser pigmentierte Haarschäfte zu ersetzen (Fitzpatrick & Hood, 1988, Howser, 1996). Auch die schwerste ZIA ist reversibel. Manche Therapeutika, wie Adriamycin, bewirken sogar eine Änderung der Beschaffenheit des Haares von glattem zu lockigem Haar. Andere können eine dunkle Pigmentierung bei sonst heller Haarfarbe hervorrufen (Branzan *et al.* 2005).

Publizierten histopathologischen Daten zufolge werden in der Kopfhaut bei Menschen mit ZIA wenig normale, ungeschädigte Anagen VI- und Katagenhaare (Kolbenhaare) beobachtet, dagegen gehäuft dystrophe HF in beiden Phasen des Haarzyklus mit stark geschädigten Haarschäften und leeren Haarkanälen (Braun-Falco, 1961a, Kostanecki *et al.* 1966, Fitzpatrick & Hood, 1988). Am meisten betroffen sind die Matrixkeratinozyten der Anagen VI-Population (ca. 85 % der Kopfhaare), die sich gerade in ihrer produktivsten Phase befinden (Fitzpatrick & Hood, 1988). Licht-, fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Analysen bestätigen, dass diese Schäden einen regulären Befund gleich nach Beginn der Behandlung darstellen (Lindner *et al.* 1997, Slominski *et al.* 1996, Tobin *et al.* 1999). Diese Reaktion der HF auf zytostatische Pharmaka ähnelt der Reaktion auf ionisierende Strahlen (Braun-Falco, 1961a, Braun-Falco, 1961b, Müller-Rover *et al.* 2000, Shirai *et al.* 2001, Hendrix *et al.* 2005).

Heute ist bekannt, dass die Zytostatika-bedingte massive Apoptose (Goldberg *et al.* 1990, Lindner *et al.* 1997, Sharov *et al.* 2003) und die Onkose (Selleri *et al.* 2004) eine entscheidende Rolle bei der Umstrukturierung der HF spielen. Im Unterschied zur physiologischen Anagen-Katagen-Transformation, bei der die Keratinozyten des HF-Bulbus einen genetisch programmierten Zelltod zu einer festgelegten Zeit während der Initiationsphase des Katagens starten, wird die Apoptose nach einer Behandlung mit Zytostatika erst nach DNS-Schäden in Gang gesetzt (Goldberg *et al.* 1990, Lindner *et al.* 1997). Sie erfolgt mit der aktiven Beteiligung von proapoptotisch wirkenden Faktoren wie p53, Bax und Fas (Botchkarev *et al.* 2001, Botchkarev *et al.* 2003, Sharov *et al.* 2003 / 2004). Der massive Zellverlust stört die Formation und Strukturqualität der Haarschäfte und ist der eigentliche Grund für ihren Ausfall.

Histopathologisch sind mehrere Phasen der ZIA differenziert worden (Braun-Falco, 1961a, Hendrix *et al.*, 2005), die der Dynamik der HF-Umstellung folgend auch in der Haut von Versuchstieren erkannt werden können. Dazu gehören:

1) Die **Degenerationsphase**, die innerhalb kurzer Zeit nach Beginn der Chemotherapie einsetzt. Dabei werden proliferierende und teildifferenzierte Zellpopulationen durch direkten DNS-

Angriff und Apoptose stark geschädigt (Lindner *et al.*, 1997, Müller-Rover *et al.*, 2000, Shirai *et al.*, 2001, Hendrix *et al.*, 2005). Neben dem dramatischen Verlust von Matrixkeratinozyten ist auch das Verhalten der HF-Pigmentzellen auffällig. Publizierten Daten zufolge reagieren die Melanozyten auf die Zytostatika mit massiver Einschaltung von Apoptose und Proliferation sowie mit Migration (Tobin *et al.* 1999, Sharov *et al.* 2003). Slominski *et al.* weisen auf die auffallende Verminderung der Aktivität wichtiger Enzyme der Melanogenese, wie z. B. der Tyrosinase und der DOPA-chromen Tautomerase, hin (Slominsky *et al.* 1996).

Aktuell haben Sharov *et al.* über eine erhöhte Expression des C-kit Liganden des SCF (Stem Cell Factor) in der Epidermis und der gesamten Haut des C57/BL6 ZIA-Mausmodells berichtet (Sharov *et al.* 2003). Die Autoren stellen fest, dass Pigmentzellen mit nachweisbarer Expression von Fas Apoptose erleiden. C-kit exprimierende Bulbusmelanozyten dagegen bleiben erhalten, proliferieren und wandern in die Äußere Wurzelscheide (ÄWS) aus, um kurz danach in der Epidermis zu erscheinen. Durch die Wirkung der Zytostatika kommt es zur Unterbrechung von Keratinozytendifferenzierung und Formation der Inneren Wurzelscheide (IWS), der ÄWS und des Haarschafts, zur Hemmung der Melanosomenformation, zur Störung ihres Transfers in die benachbarten Keratinozyten und zu einer ausgeprägten Melanosomeninkontinenz (Braun-Falco, 1961a, Kostanecky *et al.* 1967, Paus *et al.* 1994a), welche auf ultrastruktureller Ebene gut belegt sind (Slominski *et al.* 1996, Tobinn *et al.* 1999). Abhängig vom Grad der Dystrophie kann noch während dieser Phase eine katagenartige Verkürzung des HF beobachtet werden (Braun-Falco, 1961a, Paus *et al.* 1994a).

2) Der massive Zellverlust unter den Bulbuskeratinozyten stört die normale Haarschaftproduktion. Sie bricht ab, und der Haarschaft wird während der ***Expulsionsphase*** ausgeschieden. Ein Anagen-Effluvium entsteht binnen weniger Tage nach der Zytostatika-Gabe und führt zu breitflächiger ZIA (Lindner *et al.* 1997). Parallel wird ein Teil der HF zusätzlich in die Katagen- und Telogenphase des Haarzyklus getrieben (Zaun, 1967, Paus *et al.* 1994a, Bleiker *et al.* 2005). Aufgrund der stark geschädigten HF-Morphologie und des Haarschaftverlusts besitzen solche Katagen-HF eine ausgeprägte dystrophe Konfiguration und oftmals kein Kolbenhaar (Braun-Falco, 1961a, Hendrix *et al.* 2005, Bleiker *et al.* 2005).

3) Die ***Phase der leeren HF*** und schließlich die **4) *Regenerationphase***, durch die die Wiederherstellung des Haarkleids ermöglicht wird, folgen. Der Haarverlust ist reversibel, weil die Fibroblasten der DP und die HF-Stammzellen resistent gegenüber den chemischen Noxen

sind (Selleri *et al.* 2004). Die ZIA klingt meistens noch während der Therapie oder nach Absetzen des Medikaments ab (Kostanecki *et al.* 1966).

Diese für die ZIA charakteristischen Etappen der HF-Umstellung und histomorphologischen Merkmale einer Dystrophie laufen unabhängig von der Art des Zytostatikums ab. Sie treten nach den gleichen Mustern auf und stellen eine einheitliche Reaktion der HF auf schädigende chemische Noxen dar (Braun-Falco, 1961b, Hendrix *et al.* 2005).

1.2 Grundzüge der Haarfollikelbiologie

1.2.1 Haarfollikel als Forschungsobjekt

Weil die HF-Morphologie durch Zytostatika dystroph umgestellt wird, wird im Falle einer Dystrophie das Wissen über die morphologische Organisation der HF sowohl das Verständnis der Dynamik der Umstrukturierung während einer Katagentransformation als auch die Erkennung veränderter HF-Komponenten erleichtern. Strukturell sind HF aus konzentrisch angeordneten Zylindern mit epithelialen Keratinozyten gebaut. Mit dabei sind Pigmentzellen neuroektodermaler Herkunft und mesenchymale Fibroblasten der DP. Der reife HF besteht aus ÄWS, ÄWS-Begleitschicht, IWS mit Henlescher Schicht, Huxleyscher Schicht und Cuticula, sowie dem Haarschaft mit Haarcuticula, Cortex und Haarmedulla (Paus *et al.*, 1994b, Krause & Foitzik, 2006) (**Abb. 1**). Die HF sind von einer mesenchymalen Schicht, der bindegewebigen Wurzelscheide (BWS), umhüllt und sowohl in der Dermis als auch in der Subkutis eingebettet.

Innerhalb der HF befinden sich Zellpopulationen auf unterschiedlichen Stufen der Differenzierung und Spezialisierung, welche durch Strukturproteine, Matrix- und Adhäsionsmoleküle sowie durch spezifische Enzymaktivitäten gezeichnet sind (Müller-Rover & Paus, 1998, Langbein *et al.* 1999). Prominenter Bereich und Sitz der HF-eigenen Stammzellen im distalen Teil der HF ist der Wulst (Cotsarelis *et al.* 1990) Die ÄWS ist aus mehrreihig angeordneten Zellen gebildet, liegt vor der IWS und hat v.a. stützende, trophische und regulatorische Aufgaben (Straile, 1962). Sie geht in die Basalschicht der Epidermis über, während die IWS unterhalb des Infundibulums abbricht. Der proximale Teil, der Haarbubus, beinhaltet die Proliferationszone der Haarmatrix mit Generationen unreifer Keratinozyten. Ein Teil dieser Zellpopulation vollendet seine terminale Differenzierung zu Trichozyten innerhalb der präkortalen Zone und formt den Haarschaft. Der Haarbubus umschließt fast vollständig die mesenchymale DP (Paus *et al.* 1994b). Seine Volumengröße und Zellmenge bestimmen die Länge der Anagenphase und damit auch die Länge und den Diameter der Haarschäfte (Jahoda & Reynolds, 1996). Über der Kuppe der DP sind Melanozyten angesiedelt, die für die Pigmentierung der Haarschäfte verantwortlich sind (Starrico, 1960). Die Haarfarbe wird von der Art der Melaningranula bestimmt (Slominski *et al.* 2004).

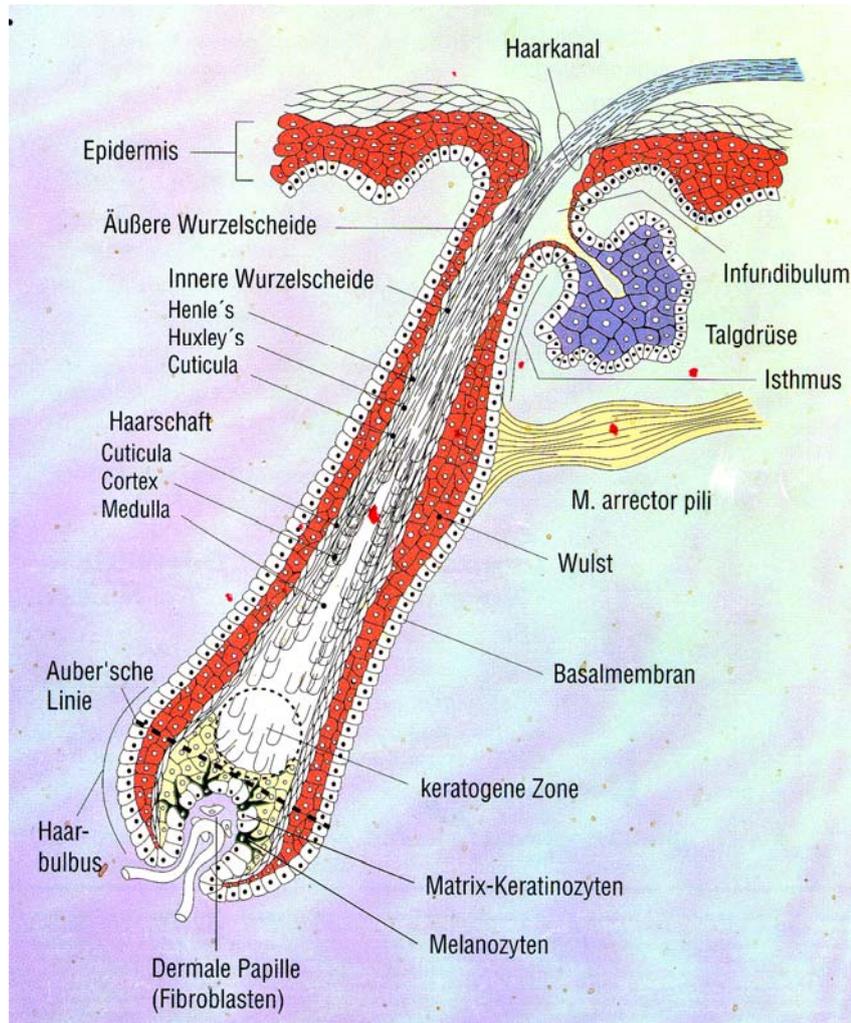


Abb. 1 Schematische Zeichnung des reifen menschlichen Anagen VI-HF. Die Architektur der HF der C57BL/6 Maus besitzt die gleichen Strukturkomponenten, jedoch ohne das feine Kapillarsystem innerhalb der DP (Darstellung nach Paus *et al.* 1994b).

Im Prozess der Haarschaftformation kommunizieren alle HF-Zellpopulationen untereinander mittels Biomolekülen mit phasenspezifischer Expression und regulieren anhand von Schalt-/Stopp-Signalen die zyklische Aktivität (Krause & Foitzik, 2006). Aufgrund seiner morphologischen Organisation und der standardisierten, rhythmischen Aktivität ist der HF ein geeignetes Testsystem für das Studium der epithelial-mesenchymal-neuroektodermalen Wechselwirkungen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* und kann als physiologisch relevantes Modell von besonderem Wert für das Studium der Auswirkungen chemischer Noxen auf die HF und für die Aufklärung der Pathogenese von pharmakologisch bedingter HF-Dystrophie und ZIA genutzt werden.

1.2.2 Der Haarzyklus

Der Haarzyklus ermöglicht eine lebenslange rhythmische Veränderung der gesamten HF-Morphologie und beinhaltet sich wiederholende Vorgänge der Regression und des Wiederaufbaus der HF-Architektur (Kligman, 1959, Davis, 1962, Saitoh *et al.* 1970). Dabei werden Phasen aktiven Wachstums (Anagen) von Phasen rapider Apoptose-gesteuerter Transformation (Katagen), Telogen und Exogen regelmäßig abgelöst. Sie laufen für alle Spezies nach dem gleichen biologischen Schema ab und sichern eine fehlerfreie und funktionsfähige HF-Architektur, kontrollieren die Haarschaftlänge, und sichern das Gleichgewicht innerhalb der Haut (Paus *et al.* 1994b, Paus & Foitzik, 2004).

Chronologisch betrachtet, startet der Haarzyklus mit dem Katagen (Foitzik & Paus, 2005). Während acht separater Einzelphasen werden der Haarbulbus und die geordnete Struktur der proximalen HF mitsamt IWS, ÄWS und dem proximalen Haarschaft verändert (Straile *et al.* 1961). Nach einer relativen „Ruhephase“ (Telogen) wird die Morphologie der unteren zwei Drittel der HF-Einheit während der Anagenphase *de novo* gebildet und die Produktion des Haarschafts wiederhergestellt. Neueren publizierten Daten zufolge sind während des Telogens metabolische und proliferative Aktivitäten in der distalen ÄWS, dem Wulst sowie innerhalb des Haargerms nachgewiesen worden (Foitzik & Paus, 2005, Lin *et al.* 2004). Dies spricht gegen eine Ruhephase im engeren Sinn. Vielmehr findet hier eine Reihe genetisch geregelter Vorgänge statt, welche zu einem aktiven Verlust (*Teloptyosis*) der Resthaarschäfte führt (Rebora & Guarera, 2004). Das Ereignis erreicht einen Peak im Mittel- anagen und wird als selbstständige Phase (*Exogen*) beschrieben (Milner *et al.* 2002). Unter Umständen kann der aktive physiologische Verlust eines Haarschafts den HF so lange leer und inaktiv lassen, bis ein neues Initiationssignal den Haarwuchs wieder in Gang setzt. Das Phänomen wird als *Kenogen* bezeichnet und als „wahre Ruhephase“ diskutiert (Rebora & Guarera, 2002, Rebora & Guarera, 2004). Die zyklische Transformation der HF-Anatomie wird von der Umstellung der Morphologie und der Physiologie aller Strukturkomponenten der Haut begleitet, einschließlich Schwankungen im Immun- und Genexpressionsstatus (Braun-Falco, 1959, Tobin *et al.* 2003).

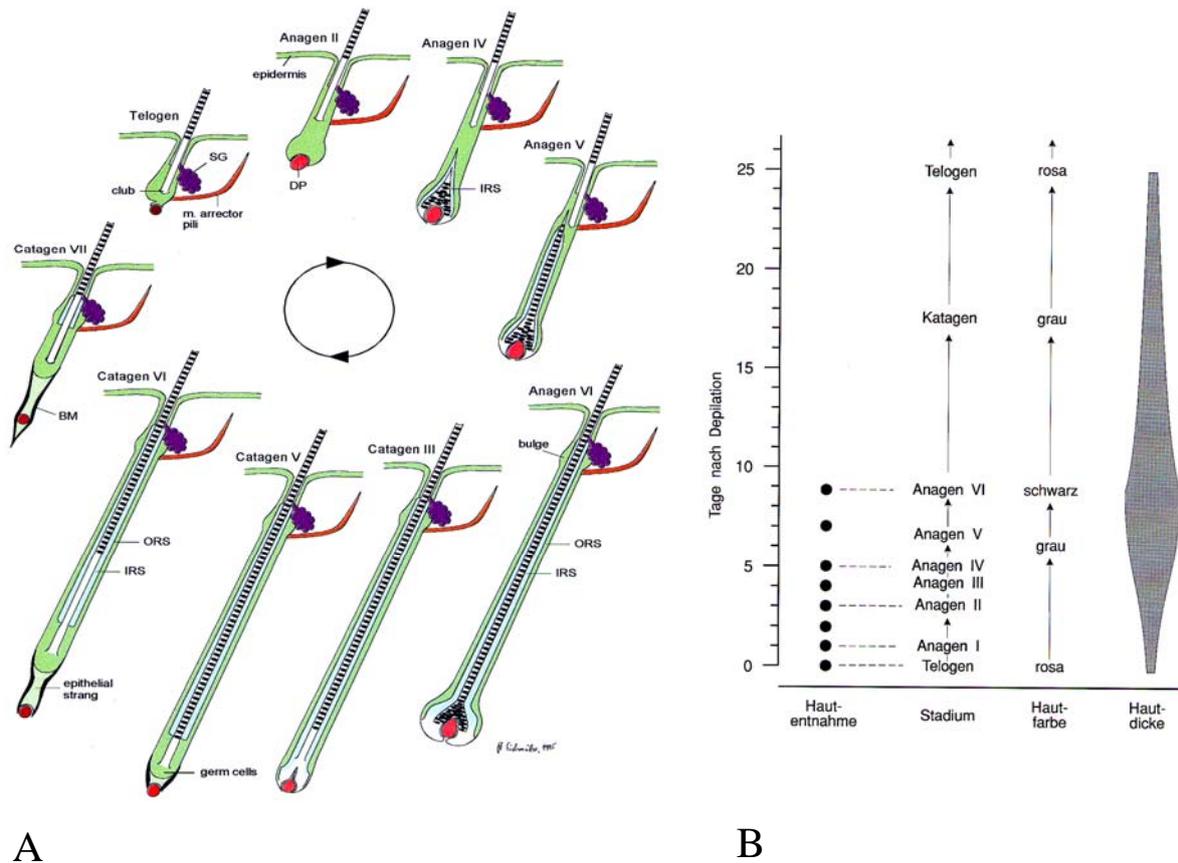


Abb. 2 Schematisierte Darstellung des Haarzyklus und der zyklusabhängigen Veränderungen von Hautfarbe und Hautdicke der C57BL/6 Maus. **A)** Progressive Umstellung der HF-Morphologie und HF-Länge während ausgewählter Phasen des murinen Haarzyklus. **B)** Änderung der Rückenhautfarbe und der Hautdicke im Zusammenhang mit den verschiedenen Zyklusphasen. Die Hautfarbe ist zyklusbedingt. Gleich nach der Depilation ist die Telogenhaut zartrosa. Die Pigmentproduktion ist ausschließlich während der Wachstumsphase (Anagen III-VI) aktiv und bedingt das schwarze Hautkolorit. Die steigende Pigmentakkumulation im Frühanagen ändert zunächst die Grundfarbe der Haut von hellgrau zu gesättigtem dunkelgrau. Im Spätanagen (VI) dominiert die homogene schwarze Farbe. Sie reflektiert die Pigmentansammlung in den Melanozyten des Haarbulbus und den kutanen Haarschäften. Weil während der Katagenphasen die Melanogenese unterbrochen wird, ändert sich die schwarze Farbe der Haut mit dem Fortschreiten der Transformation zu hellgrau und rosa. Im Telogen setzt sich wieder das Rosakolorit durch (nach Paus, 1996c, Müller-Rover *et al.* 2001).

1.2.3 Terminale Differenzierung und Apoptose als Mechanismen der Haarfollikel-Regression; Apoptose unter pathologischen Umständen

Der Bestand der körpereigenen Zellpopulationen wird sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen durch Prozesse wie die „Terminale Differenzierung“ und diverse Formen des genetisch programmierten Zelltodes reguliert (Danial & Korsmeyer, 2004, Fink & Cookson, 2005). Per definitionem handelt es sich um unabhängige, genetisch determinierte und grundsätzlich auch unter physiologischen Bedingungen ablaufende Vorgänge mit der Aufgabe, das zelluläre Gleichgewicht und die spezifischen Funktionen eines Gewebes im Körper zu erhalten (Gandarillas *et al.* 1999, Raj *et al.* 2006). Diese physiologischen Vorgänge stehen im Gegensatz zum pathologischen Verlauf der Nekrose, welche ausschließlich als Antwort auf exogene Noxen entsteht und das Gewebe schädigt (Kanduc *et al.* 2002, Lockhin & Zakeri, 2004).

Die Terminale Differenzierung ist ein im Laufe der Evolution entwickelter Vorgang und wichtig für die Funktion aller Lebewesen. Im Prozess der Zelldifferenzierung verlässt eine undifferenzierte Zelle den Proliferationspool, exprimiert differenzierungsspezifische Gene und erreicht unter Ausbildung spezifischer Funktionen ihren Tod (Paus *et al.* 1994b, Allombert-Blaise *et al.* 2003).

Der programmierte Zelltod ist besonders innerhalb aller Gewebsstrukturen mit hoher Proliferations- und Differenzierungsrate stark vertreten (Paus *et al.* 1993a, Zakeri & Lockskin, 2002, Hog, 2005). Er ist abhängig von genetisch kodierten Signalen oder Zellaktivität innerhalb der sterbenden Zelle und stellt eine Kaskade von Ereignissen dar, die den Zelltod herbeiführen. (Fink & Cookson, 2005). In der Haut reguliert der kontrollierte Zelluntergang die Morphogenese der Epidermis und ihrer Anhangsgebilde (Magerl *et al.* 2001, Chaturvedi *et al.* 2006), erhält die Gewebsosmose aufrecht und sorgt für physiologische Prävention und Kontrolle der Geschwulstbildung (Korsmeyer, 1999a, Raj *et al.* 2006).

Die Apoptose ist eine Variante des genetisch programmierten Zelltods, welche enzymatisch durch Cysteinproteasen (sog. Caspasen) gesteuert wird (Boatright & Salvesen, 2003, Lavrik *et al.* 2005). Der Vorgang führt morphologisch zur Kondensation und Fragmentierung der nukleären DNS, zur Kondensation des Zellkerns und des Zytoplasmas sowie zur Abkapselung von Zellbestandteilen, welche als *apoptotic bodies* beschrieben worden sind (Fink & Cookson, 2005). Eine weitere Variante ist die Autophagie (Fink & Cookson, 2005). Dabei findet eine

Degradation von zellulären Komponenten innerhalb autophagischer Vakuolen einer absterbenden Zelle statt.

Der Pathomechanismus der Apoptose ist für die Eukaryoten gut untersucht (Oltvai & Korsmeyer 1994, Lockskin & Zakeri, 2004, Danial & Korsmeyer, 2004). Ursachen für Apoptose können der Verlust von Wachstumsfaktoren oder Zell-Zell-Kontakten, bestimmte Zell-Substrat-Wechselwirkungen, Veränderungen der Zytokinexpression, sowie die Wirkung von Neurotrophinen, Hormonen und diversen exogenen Noxen sein (Krajewski *et al.* 1994a, Krajewski *et al.* 1994b, Raj *et al.* 2006). Die Vorgänge werden durch Biomoleküle reguliert (Boatright & Salvesen, 2003, Schultz & Harrington, 2003, Botchkareva *et al.* 2006) (**Abb. 4**).

Äußere Einflüsse wie UV- und Röntgenstrahlen, Hyperthermie oder Kälte, Toxine, lytische Viren sowie chemische Noxen, zu denen auch zytostatisch wirksame Medikamente gehören, können eine pathologische Apoptose sowohl *in vivo* als auch *in vitro* auslösen (McGregor *et al.* 1997, Hasmall & Roberts, 1999, Aurelian, 2005). Unter solchen Einflüssen kommt auch das Phänomen der *Onkose* vor (Majno & Joris, 1995, Fink & Cookson, 2005). Der Begriff bezeichnet eine Form der Nekrose bzw. des akzidentellen Zelltods mit Schwellung von Zellkern, Mitochondrien und des Zytoplasmas sowie Karyolyse (Majno & Joris, 1995). Damit ist sie der morphologische Gegensatz zur Apoptose. Die Onkose ist häufig Folge einer Ischämie (Iaschke & Lemasters, 2003). Sie kommt verstärkt nach toxischen Noxen, insbesondere nach Anwendung von Chemotherapeutika, vor (Selleri *et al.* 2004).

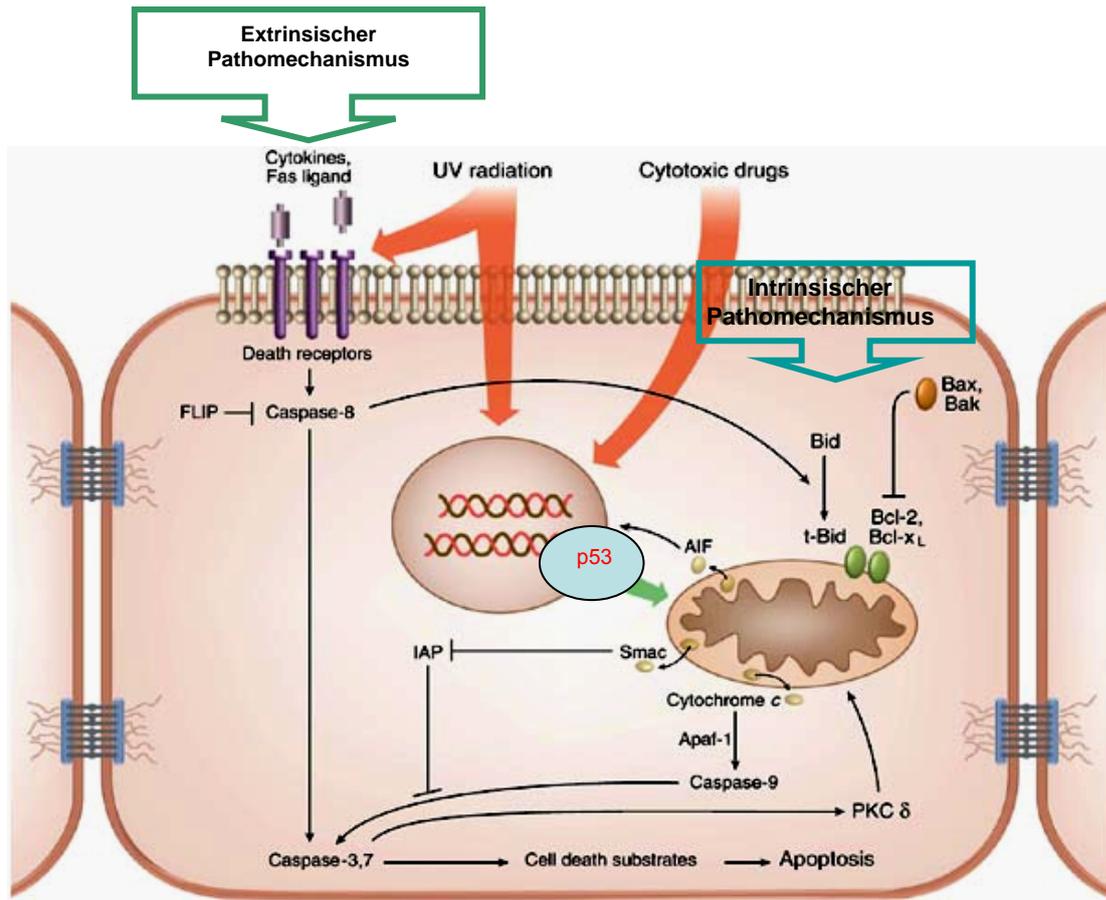


Abb. 3 Schematische Darstellung der wichtigsten Pathomechanismen der Apoptoseinitiation. 1) *Negative Induktion* (Intrinsischer Pathomechanismus) durch Verlust eines Inhibitorsignals (z.B. **Bcl-2, Bcl-x_L**) und 2) *Positive Induktion* (Extrinsischer Pathomechanismus) durch Zytokine und Ligandenbindung (z.B. **Fas**) an der zellulären Plasmamembran und induktive Stimulation bestimmter Death Receptors (DR). Eine Negative Induktion durch zusätzliche Aktivierung des zytoplasmatischen Proteins Bid zu t-Bid ist durch Caspase-8 möglich. Externe Faktoren wie UV-Strahlung oder auch Zytostatika provozieren DNS-Schäden im Zellnucleus und aktivieren über **p53** den Intrinsischen Pathomechanismus (nach Raj *et al.* 2006).

Heute sind zwei separate Pathomechanismen für die Initiation der Apoptose bekannt (**Abb. 3**). **1** Positive Induktion (*Extrinsischer Pathomechanismus*) durch Ligandenbindung an die zelluläre Plasmamembran und induktive Stimulation bestimmter Rezeptoren wie des Apo-1/fas (CD95) und Tumor Necrosis Factor Receptor 1 (TNF-R1, p55) sowie der Death Receptors (DR) DR3,

DR4, und DR5 (Ashkenazi & Dixit, 1998, Danial & Korsmeyer, 2004). Dies führt zur Aktivierung der Initiatorcaspase-8 und weiter über die Effektorcaspase-3 zum definitiven Tod der Zelle. **2) Negative Induktion (*Intrinsischer Pathomechnismus*)** durch den Verlust eines Inhibitors und Aktivierung von proapoptotischen Faktoren. Der Vorgang findet mit aktiver Beteiligung der Mitochondrien und der Caspase-9 statt (Schultz & Harrington, 2003). Schließlich leiten beide Mechanismen über die Aktivierung der Effektorcaspasen-3, 6 und 7 die Spaltung einer Vielzahl von Substraten im Zytosol ein, einschließlich der Desoxyribonuklease, welche für die Spaltung der nukleären DNS zuständig ist (Schultz & Harrington, 2003, van Gulp *et al.* 2003).

Die Negative Induktion wird von Mitgliedern der Bcl-2 Familie kontrolliert, welche als Inhibitoren (z.B. bcl-2) und Promotoren der Apoptose (z.B. Bak, Bax) eingeteilt worden sind (**Abb. 5**) (Korsmeyer, 1999b, Petros *et al.* 2004, van Gulp *et al.* 2003). Charakteristisch dabei ist die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien (van Gulp *et al.* 2003). Dadurch wird die Bildung eines Holoenzymkomplexes (Apoptosome) aus dem Apaf-1 und der Caspase-9 ermöglicht (Li *et al.* 2000, Crow *et al.* 2004). Gleichzeitig neutralisieren Proteine wie Smac / DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspase / Direct IAP-binding protein with low pI) und Omi/htrA2 die Neutralisierung des für die Caspase-3 suppressiven IAP (Inhibitor of apoptosis) (Yu & Zhang, 2004). Weitere Faktoren aus den Mitochondrien wie der AIF (Apoptosis-inducing factor) und die Endonuklease G sorgen für die Fragmentierung der nukleären DNS (Li *et al.* 2000, Crow *et al.* 2004).

Extrazelluläre und intrazelluläre Signale durch Strahlung, oxidativen Stress sowie DNS-Schäden durch chemische Substanzen können eine Funktionsstörung der Mitochondrien verursachen und den *Intrinsischen Pathomechanismus* in Gang setzen (Schultz & Harrington, 2003, Raj *et al.* 2006). Obwohl die Bedeutung einiger proapoptotischer Proteine aus den Mitochondrien kürzlich in Frage gestellt wurde (Ekert & Vaux, 2005), wird allgemein angenommen, dass Faktoren wie p53 und Nur77 / TR3 /NGFB-1 vom Zellkern in die Mitochondrien diffundieren und über Cytochrom C und weiterhin über noxa und PUMA eine Apoptose auslösen (Li *et al.* 2000, Friedman & Lowe, 2003, Yu & Zhang, 2005).

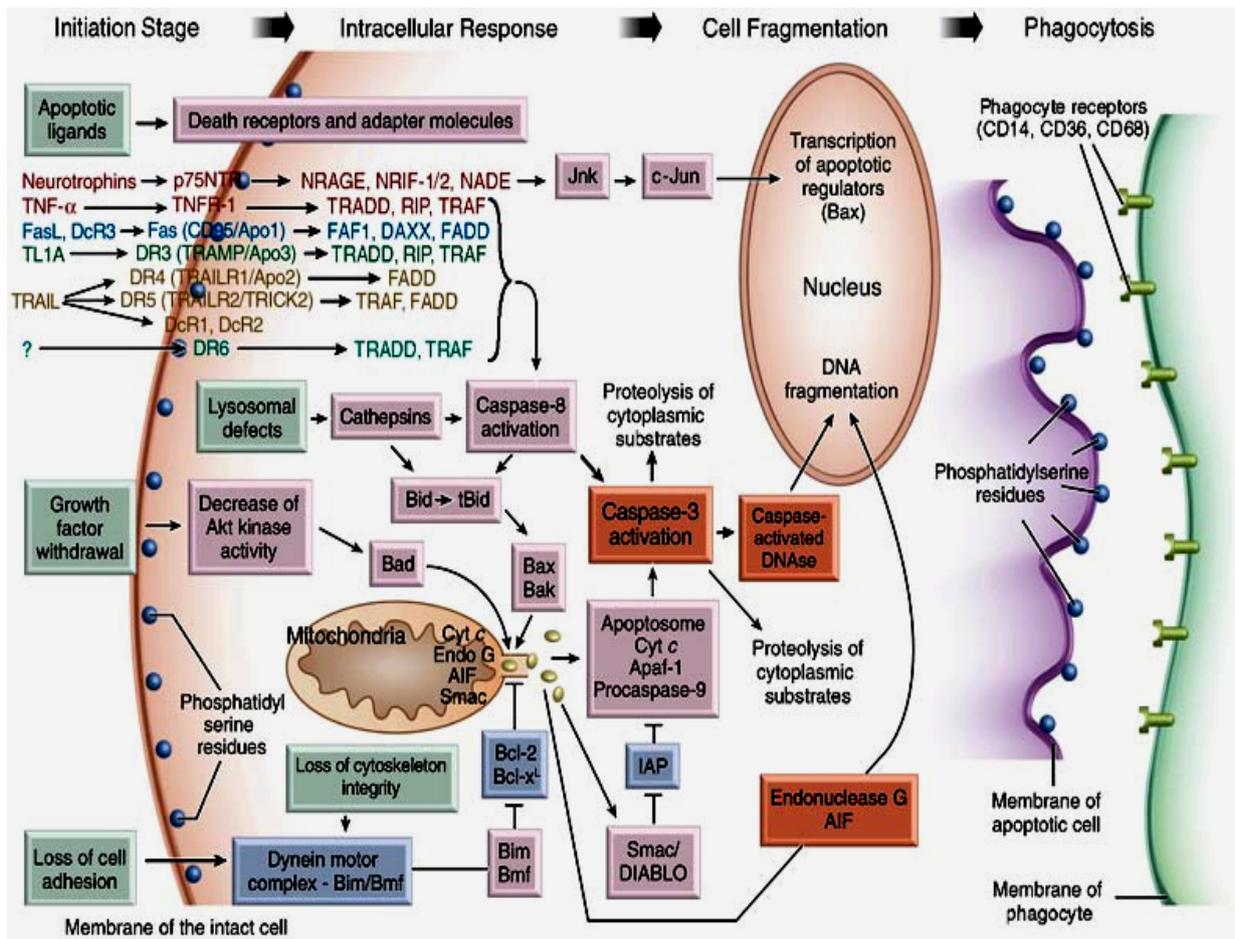


Abb. 4 Phasen und Molekularmechanismen der Apoptose. Äußere Einflüsse, chemische Noxen, Verlust von Wachstumsfaktoren und Zell-Zell-Kontakte sowie Zell-Substrat-Wechselwirkungen, Veränderung der Zytokinexpression, als auch Hormone und Neurotrophine sind als Auslöser der Apoptose bekannt. Der Prozess durchläuft Phasen der Initiation, der intrazellulären Antwort, der Zellfragmentierung und der Phagozytose. Der Ablauf wird mittels diverser Signalmoleküle während des intrinsischen und des extrinsischen Pathomechanismus reguliert (nach Botchkareva *et al.* 2006).

Der Vorgang der Apoptose ist während des Haarzyklus *in vivo* und *in vitro* intensiv studiert worden (Lindner *et al.* 1997, Soma *et al.* 1998, Peters *et al.* 2006). Die Studien zeigen, dass sie innerhalb aller morphologischen Strukturkomponenten des HF, mit Ausnahme der Fibroblasten der DP stattfindet (Botchkareva *et al.* 2006). Gleichzeitig entstehen durch Terminale Differenzierung qualitativ neue Strukturkomponenten (Straile *et al.* 1961, Müller-Rover *et al.* 2001). Die Erkenntnisse des letzten Jahrzehnts bestätigen sie als Grundfaktor für die Umstrukturierung der HF-Architektur sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Verhältnissen (UV-Licht, Zytostatika) und als treibende Kraft während der Katagenphase (Weedon & Strutton, 1990, Lindner *et al.* 1997, Botchkarev, 2003a, Peters *et al.* 2006). Das Phänomen ist auch während der postnatalen HF-Morphogenese, während des Frühanagens und des Telogens bekannt (Magerl *et al.* 2001, Ito *et al.* 2004).

Auf Molekularebene werden die Vorgänge aufgrund allgemein geltender Prinzipien für den programmierten Zelltod kontrolliert, welche nur teilweise bekannt sind (Foitzik & Paus, 2005, Botchkareva *et al.* 2006, Krause & Foitzik, 2006). Unter den Faktoren mit gesichertem proapoptotischem Effekt für die HF von Mäusen und Menschen sind die Neurotrophine der Nerve Growth Factor (NGF) Familie, Transforming Growth Factor (TGF)- β 1 und 2, die DR Apo-1/Fas, DR3/DR4, L-Catepsin, *hairless*, p53, TNF- α / p55 TNFR, FGF-5, als auch die proapoptotisch wirkenden Mitglieder der Bcl-2 Familie (Bax, Bak etc.) (Foitzik & Paus, 2005, Botchkareva *et al.* 2006). Die Prozesse innerhalb der HF werden ausschließlich durch Caspase-1, Caspase-3, Caspase-4 und Caspase-7 gesteuert (Lindner *et al.* 1997, Soma *et al.* 1998, Botchkareva, 2006).

1.2.4 Haarwuchsstörungen als Haarzyklusprobleme: Klinische Relevanz der Anagen-Katagen-Transformation

Haarleiden wie das Effluvium, die androgenetische Alopezie, die Alopecia areata sowie nicht-androgenetische Alopezien können zumeist als Folge einer Haarzyklusstörung, seltener als Folge einer Haarschaftformationsstörung betrachtet werden (Paus, 1996c, Whiting, 2003, Foitzik & Paus, 2005). Schwere genetisch bedingte oder erworbene endokrine Störungen, Stoffwechselprobleme, chemische Noxen (Pharmaka) und Strahlung sowie extreme Belastung und Stress führen auch zur vorzeitigen Initiation des Katagens (Sperling, 2001, Arck *et al.*, 2006). Der Verlust der Haarschäfte (Telogenes Effluvium) steigt über den täglich normalen Anteil und ist der Grund für die Alopezie (Kligman, 1961, Headington, 1993).

Eine Verlängerung der Anagenphase führt zu Haarwuchsstörungen wie Hypertrichosis oder Hirsutismus (Sperling, 2001, Benett, 2002). Sowohl die Steigerung des Serumsteroidhormonspiegels als auch lokale Dysbalancen des Steroidgleichgewichtes ohne Veränderung des Gesamtserumspiegels können eine Ursache für Hirsutismus sein (Sperling, 2001). Sie können aber auch die androgenetische Alopezie auslösen. Diese kommt durch erhöhte Androgenkonzentration in genetisch prädisponierten HF und durch die Initiation eines vorzeitigen Katagens, gefolgt von telogenem Effluvium, zustande (Vogt & Blume-Peytavi, 2003, Rebora, 2004). Eine Verkürzung der nachfolgenden Anagenphasen (Courtois *et al.* 1994) und eine fortlaufende Miniaturisierung der Terminalhaare zu Vellushaaren bestimmen den weiteren Verlauf (Trüeb, 2002, Rebora, 2004).

Chemische Substanzen und Pharmaka können direkt in die Wachstumsphase eingreifen. Sie stimulieren die Haarschaftproduktion und provozieren eine Hypertrichosis (z.B. Testosteron, Corticotropin (ACTH), anabole Steroide, CsA und Minoxidil) oder leiten plötzlich die Katageninitiation und das Telogen-Effluvium ein (z.B. β -Blocker, ACE-Hemmer, Zytostatika) (Tossi *et al.* 1994 Benett, 2002). Dabei ist für die ZIA ein vom Schweregrad der Schädigung abhängiges sog. *Anagen-Effluvium* charakteristisch (Braun-Falco, 1961a, Kostanecki *et al.* 1966, Orfanos & Gerstein, 1976) (s. **Kapitel 1.1**).

1.3 Einfluss von Zytostatika und Immunophilinliganden auf Haut und Haarwuchs

1.3.1 Zytostatika

Zytostatisch wirkende Pharmaka werden grundsätzlich in der Behandlung maligner Erkrankungen eingesetzt (Batchelor, 2001, Aktories & Unger, 2005). Dazu gehört ein breites Spektrum chemischer Substanzen wie Alkylanzien, Antimetabolite, Antibiotika oder Mitose-Hemmstoffe, welche auf unterschiedliche Art den Zellzyklus beeinflussen (Aktories & Unger, 2005). Sie sind Suppressoren der Zellproliferation und greifen schnell proliferierende Zellen der Tumore an, üben jedoch ihre zytotoxische Wirkung gleichzeitig auch auf Gewebe mit gesundem, physiologischem Stoffwechsel, darunter auch die HF, aus (Cai *et al.* 1998, Kim, 2005).

1.3.1.1 Pharmakologischer Wirkungsmechanismus der alkylierenden Zytostatika

Alkylierende Zytostatika haben gemeinsam, dass die funktionelle Gruppe der chemischen Substanz erst im Organismus aktiv wird und dass aus ihnen reaktive Intermetabolite entstehen, welche an nukleophile Gruppen, wie $-NH_2$, OH, SH, $-COOH$, binden können (Connors *et al.* 1974, Razzaque Ahmed *et al.* 1984, Farmer, 1987). Die alkylierenden Substrate entstehen unter Abspaltung von Chlor, Bildung eines Aziridinium-Ions und nachfolgender kovalenter Bindung des N-Lost-Derivates daran (Connors *et al.* 1974).

Für die gewünschte zytostatische Wirkung ist die Alkylierung der DNS von Bedeutung (Aktories & Unger, 2005). Bevorzugter Angriffspunkt ist das N_7 -Atom der Base Guanin (Henry & Horn, 2002). Die Reaktion bedingt ihre Transformation in die Enolform. Damit wird die Bindungsfähigkeit der Base Guanin an der Base Cytosin gestört. Sie wird als die Base Adenin interpretiert und zu der Base Thymin geleitet. Die Folgen sind Ablesefehler bei der Transkription, oder Herausschneiden von Guaninbasen aus der DNS (Smith & Reynard, 1992). Eine Öffnung des Imidazol-Ringes führt zu weiteren funktionellen Schäden der DNS. Durch Quervernetzung gegenüberliegender Guaninbasen wird die Trennung der beiden DNS-Stränge verhindert (Aktories & Unger, 2005).

1.3.1.2 Einfluss der Zytostatika auf die Haut und die kutanen Zellpopulationen

Alle Zellpopulationen der Haut werden in unterschiedlichem Ausmaß negativ beeinflusst (Fitzpatrick, 1993, Henry & Horn, 2002). Besonders die epithelialen Keratinozyten sind gegenüber den nicht zellzykluspezifischen Zytostatika hoch empfindlich. Sowohl die teilungsaktiven als auch die ruhenden Zellen werden gleichermaßen angegriffen (Henry & Horn, 2002). Stark betroffen sind die Zellen der Epidermis und der HF (Selleri *et al.* 2004). Die negative Wirkung der Zytostatika auf zelluläre Mikrofilamente, Integrine, Keratine, Desmosomen, E-Cadherine, und Calmodulin-Bindungsproteine zeigt einen ungünstigen Einfluss auf die Zelldifferenzierung und damit auf die Struktur der Epidermis insgesamt. Zytostatika-bedingte Apoptose und Onkose sind in der mesenchymalen Komponente der Haut ein regulärer Befund (Cece *et al.* 1996, Selleri *et al.* 2004, Yamamoto & Nishioka, 2005).

Schwer geschädigt werden die epidermalen und die HF-Melanozyten (Fitzpatrick, 1993, Horn, 1997b, Sharov *et al.* 2004). Dadurch entsteht eine Hyperpigmentierung der Haut, welche entweder durch eine Stimulation oder durch direkte Toxizität der Melanozyten begründet sein kann und nicht immer ein Zeichen für systemische Toxizität ist. Sehr eindrucksvoll ist die Störung der Nagelpigmentation (Koppel & Boh, 2003, Branzan *et al.* 2005).

Die klinische Manifestation variiert von unspezifischen und disseminierten Exanthenen und Hyperpigmentation der Haut über Nagelschäden (Onychodystrophie), orale Mukositis, Follikulitis und unterschiedlich stark ausgeprägte Alopezie (**Kapitel 1.1**) bis hin zu Wechselwirkungen mit Strahlung und UV-Licht sowie eine Überempfindlichkeit (Fitzpatrick, 1993, Koppel & Boh, 2003, Branzan *et al.* 2005). Manche zytostatische Pharmaka sind selten Grund für Hautprobleme (Howser, 1996). Andere dagegen sind die Ursache sowohl für einfache kosmetische Schäden als auch für ernsthafte Leiden wie z. B. die Verschärfung bereits bestehender Hautkrankheiten, Infektionen, Graft-vs-Host-Reaktionen wie das akrale Erythem (Hand-Fuß-Syndrom), Hypersensitivität, pruritische Urtikaria und Arzneimittel-Exantheme (DeSpain, 1992, Koppel & Boh, 2001). Auch Erkrankungen der ekkrinen Drüsen wie ekkrine Hidradenitis oder syringosquamöse Metaplasie kommen häufig vor (Branzan *et al.* 2005).

1.3.1.3 Cyclophosphamid

Cyclophosphamid (*Endoxan*, Asta Werke A.G. Brackwede Deutschland) ist der zyklische Propanol-amido-ester des Bis- β -chlorethyl-phosphamids, gehört zur Gruppe der alkylierenden Substanzen und zeichnet sich durch ausgeprägte zytotoxische und immunsuppressive Eigenschaften aus (Sladek, 1973, Hobarst *et al.* 1981, Coggins, 1990). Das Medikament ist aus chemischer Sicht ein Prototyp der Oxazaphosphorine, jedoch ohne direkt alkylierende Wirkung (Colvin *et al.* 1976). Hauptkomponente der chemischen Formel ist der oxazaphosphorine Ring, geprägt durch die N-Propylen-Gruppe, welche einerseits durch amidähnliche Bindung, andererseits durch Esterbindung einen geschlossenen Ring darstellt. Sie ermöglicht den erwünschten zelltoxischen Effekt (Connors *et al.* 1974, Sladek, 1973) (**Abb. 6**).

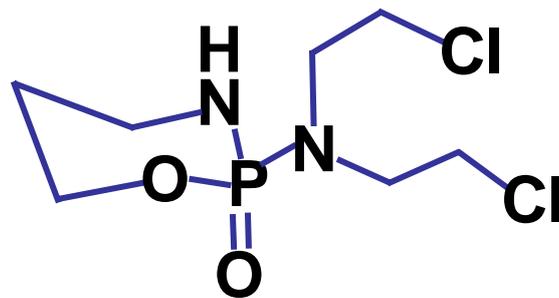


Abb. 6 Cyclophosphamid (ENDOXAN, Asta-Werke, Brackwede). Chemische Strukturformel

1.3.1.3.1 Pharmakokinetik und Wirkungsmechanismus von Cyclophosphamid

Die chemische Grundsubstanz ist *in vitro* inaktiv (Connors *et al.* 1974). CYP übt *in vivo* seine biologische Aktivität durch Metaboliten wie *Phosphoramid Mustard* und *Acrolein* aus, welche als Endprodukte unter Beteiligung von Microsomalenzymen (Zytochrom P 450) in der Leber von lebenden Organismen gebildet werden (**Abb. 7**) (Connors *et al.* 1974, Colvin *et al.* 1976, Ahmed *et al.* 1984). Dem Phosphoramid Mustard wird die charakteristische Zelltoxizität zugeschrieben (Colvin *et al.* 1976). Der Metabolit selbst ist nicht immunsuppressiv (Sensenbrenner *et al.* 1979). Diese Eigenschaft entsteht durch einen zusätzlichen Oxidationsprozess, der zur Bildung des immunsuppressiven Chloracetaldehyd führt (Whitehouse *et al.* 1974).

CYP ist besonders aktiv gegen schnell proliferierende Zellen (Bruce *et al.* 1966). Das Medikament ist im Unterschied zu anderen Zytostatika, z.B. Methotrexat, „nicht phasenspezifisch“ und damit in der Lage, Zellen in jeder mitotischen Zyklusphase zu schädigen (Aktories & Unger, 2005). Die Wirkung der Substanz kommt durch die Alkylierung von DNS und Störung der nukleären DNS-Replikation zustande (Sartorelli *et al.* 1975) (Kapitel 1.3.1.1). Die DNS-Schäden steigern zusätzlich die Transkription des proapoptotischen Gens p53 (Smith & Fornance 1996, Botchkarev *et al.* 2001). Die totale p53-Konzentration steigt, p53 wandert in die Mitochondrien und induziert über Bax und Cytochrom C die Apoptose (Yu & Zhang, 2005). Die Elimination findet hauptsächlich durch Leber und Nieren (85 % Metabolyten, 15 % die reine Form) statt (Struck *et al.* 1971, Aktories & Unger, 2005).

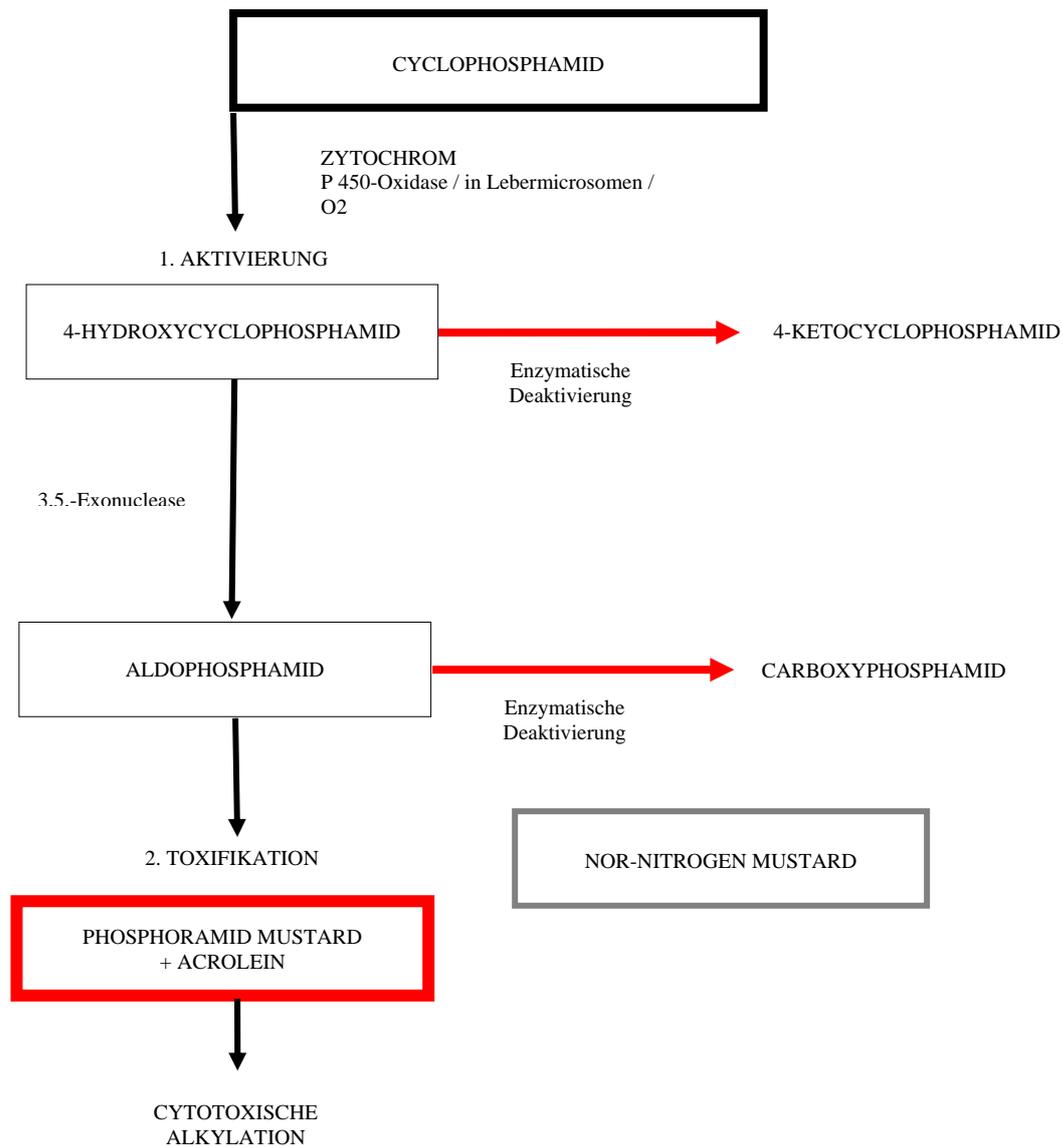


Abb. 7 Pharmakokinetik von CYP. Entstehung von biologisch aktiven Cyclophosphamid-Metaboliten *in vivo*. Die chemische Grundsubstanz wird mit Beteiligung von Microsomal-enzymen, wie der Zytochrom-P-450-Oxidase, und in der Leber von lebenden Organismen über eine Kaskade von Aktivierungs- und Detoxifikationsprozessen gespalten und übt ihre zytotoxische Aktivität durch Metabolite wie Phosphoramid-Mustard und Acrolein aus (modifiziert nach Connors, 1974).

1.4 Immunophilinliganden

Als Immunophiline werden zytoplasmatische Enzyme bezeichnet, welche die Fähigkeit besitzen, die *cis-trans* Isomerisation der *cys*-Peptidylprolyl-Bänder zu katalysieren (Stamnes & Zuker, 1990, Ivery, 2000). Sie sind auch als Peptidylprolyl-Isomerasen (PPIasen) bekannt. Die Immunophiline sind bereits als Ziel bestimmter immunsuppressiver Pharmaka identifiziert worden (Schreiber, 1991, Ke & Huai, 2004, Wang & Heitman, 2005). Sie sind in allen Gewebearten und Spezies nachgewiesen und durch widersprüchliche Endeffekte gekennzeichnet (Galat, 1993, Gothel & Mahiel, 1999). Laut Literaturangaben sind die Immunophiline in der Lage, *in vitro* u.a. die Ca^{2+} -Kanäle zu stabilisieren sowie den Steroidrezeptorkomplex und das Rezeptorprotein Tyrosinkinase zu inaktivieren (Pratt & Toff, 1997, Wang & Heitman, 2005). Das ist mit ihrer Fähigkeit, selektiv andere Proteine zu binden, zu begründen (Wang & Heitman, 2005).

Es sind zwei Gruppen von Immunophilinen identifiziert worden, Cyclophiline (Handschuhmacher *et al.* 1984, Wang & Heitman, 2005) und die FKBP (Stamnes & Zuker, 1990, Dumont & Su, 1996). Als erstes Cyclophilin wurde das Cyclophilin A identifiziert und als Zielobjekt des immunsuppressiven Medikaments CsA bestätigt (Fischer *et al.* 1989, Wang & Heitman, 2005). Es wurde zusätzlich gezeigt, dass die Aktivität dieser PPIase durch CsA inhibiert wird (Fischer *et al.* 1989).

Zur gleichen Zeit wurde auch das erste Mitglied der FKBP-Gruppe, das FKBP12 identifiziert und als Zielscheibe der Substanzen FK 506, und später des Rapamycin, beschrieben (Bierer *et al.* 1990). Die Immunophiline der beiden Grundgruppen sind voneinander unabhängig und nur durch für sie spezifische Liganden (CsA, FK 506 oder Rapamycin) beeinflussbar (Ivery, 2000). Inzwischen ist eine große Anzahl von Isoformen bestätigt worden, welche grundsätzlich durch ein anderes Molekulargewicht und charakteristische Speziesverteilung zu unterscheiden sind (Ivery, 2000, Wang & Heitman, 2005).

1.4.1 Pharmakologischer Wirkungsmechanismus der Immunophilinliganden

Die Immunophilinliganden (IPL) CsA, FK 506 und Rapamycin entfalten ihre Wirkung nach einer Bindung mit intrazellulären Proteinrezeptoren, den Immunophilinen, und führen zur Inhibition von bestimmten Zielmolekülen (Cardenas *et al.* 1995, Pratt & Toft, 1997, Wang & Heitman, 2005). Ihr pharmakologischer Wirkungsmechanismus ist gut an den T-Lymphozyten untersucht worden (Trenn *et al.* 1989, Rao, 1994, Bierer *et al.* 1990) (**Abb. 8**).

Nach Bindung mit CsA und FK 506 verändert der Immunophilin-Ligand-Komplex seine Struktur und blockiert die Calcium-Calmodium-abhängige Phosphatase Calcineurin (Ho *et al.* 1996) (**Abb. 9 B**). Das Enzym Calcineurin (Hemenway & Heitman 1999) ist eine entscheidende Komponente der T-Zell-Aktivierung, und die Unterdrückung seiner Aktivität führt zur kompletten Blockade der Translokation der zytoplasmatischen Komponente des NF-AT (Nuclear Factor of activated T cells) in den Zellkern, wobei die Transkription unterschiedlicher Gene verhindert wird (Ogo *et al.* 1999). Obwohl die chemische Struktur von Rapamycin und FK 506 adäquat ist, kann Rapamycin die Calcineurin-Aktivität nicht hemmen und auf diesem Weg die Transkription der Zytokine in der Frühphase der T-Zell-Aktivierung blockieren (Wiederrecht *et al.* 1995, Cardenas *et al.* 1995). Rapamycin hemmt die Proliferation der T-Zellpopulation, die die Reaktion auf Zytokine wie IL-2 darstellt, durch Blockade der IL-2 vermittelten Elimination des cyclinabhängigen Kinaseinhibitors p27^{Kip1} (Abraham & Wiederrecht, 1996, Dumont & Su, 1996).

Weiterhin werden die proliferationsfördernden und zellprotektiven Fähigkeiten der immunsuppressiven (FK 506 und CsA) und der nicht immunsuppressiven IPL mit ihren antiapoptischen Effekten in Verbindung gebracht (Tanaka *et al.* 2004, Gavter-Gavli *et al.* 2004, Yarosh *et al.* 2005). Die Calcineurin-Inhibition nach CsA Gabe reduziert auch die Expression von Faktoren wie p21(waf/cip1) und p27(kip1), die sonst mit der Zelldifferenzierung erhöht ist, mindert den Anstieg von p53 mRNA, TGF- β , Interleukin-1 β (Gavter-Gavli *et al.* 2003) und hemmt die Caspasen 3, 8 und 9, (Tanaka *et al.* 2004). Dies ist mit einer signifikanten Zunahme des Bcl-2 / Bax-Ratio verbunden.

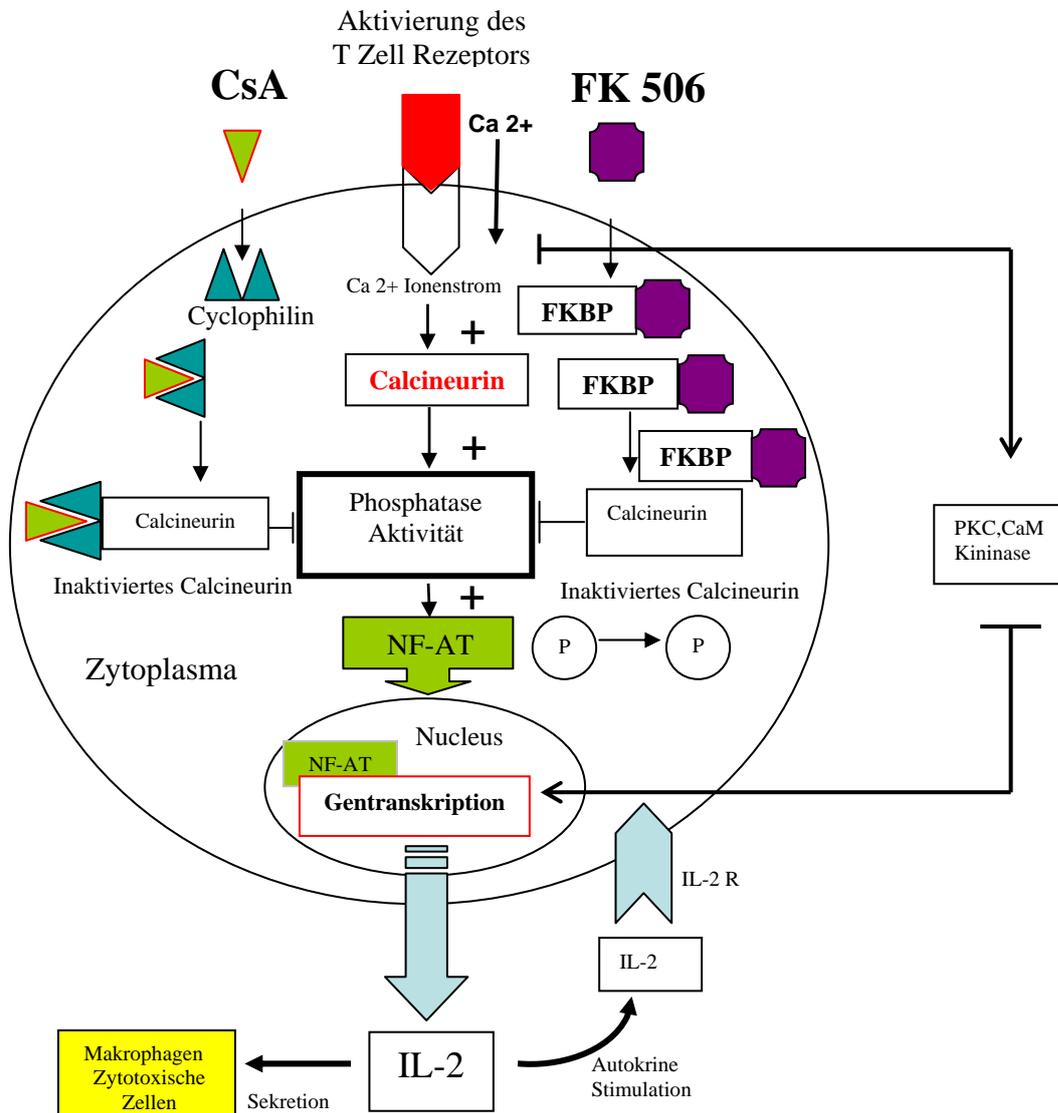


Abb. 8 Wirkungsmechanismus der IPL CsA und FK 506 am Beispiel der Aktivierung der T-Lymphozyten über Zellmembranrezeptoren und anschließender Zytokin-Gentranskription. Die Unterdrückung der Calcineurin-Aktivität durch CsA und FK 506 führt zur kompletten Blockade der Translokation der zytoplasmatischen Komponente des **NF-AT** in den Zellkern, und zur Unterdrückung der Transkription unterschiedlicher Zytokin-Gene, unter denen die für IL-2 sowie IL-3, IL-4, $TNF\alpha$ und $INF\gamma$. Über zusätzliche Pathomechanismen kann via **PKC** (Proteinkinase C) und **CaM**-Kinase eine weitere Blockade der Transkription sowohl dieser als auch anderer Zytokin-Gene in Gang gesetzt werden (nach Rao, 1994.).

1.4.2 Biologische Wirkung auf die Haut und die kutanen Zellpopulationen

Die stark immunsuppressiven IPL beeinflussen die Zellen des Hautimmunsystems sowie jede andere kutane Zellpopulation (Backer *et al.* 1987, Marone *et al.* 2002). IPL können die Proliferation der T4/8-Lymphozyten *in vitro* stark inhibieren (Shevach, 1985). Sie verhindern über die Blockade des Calcineurin-NFAT-Mechanismus die Freisetzung wichtiger Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-4 sowie TNF α und INF- γ und stören damit die Aktivierung von B-Lymphozyten- und T-Lymphozytenpopulationen. Cyclophiline wie CsA und FK 506 können die Funktion von antigenpräsentierenden Zellen, einschließlich der Langerhans-Zellen in der Haut, dramatisch herabsetzen (Furue & Katz, 1988a Teunissen, *et al.* 1991, Panhans-Gross *et al.* 2001), andere hingegen nicht (Hoetzen ecker *et al.* 2004). In höheren Dosen können IPL die Aktivität der Hautmakrophagen blockieren, obwohl es für *in vivo* und *in vitro* Berichte über widersprüchliche Effekte gibt (Ishibashi *et al.* 1991). Allgemein hemmen IPL wie FK 506 die Proliferation der Makrophagen, ohne Calcineurin zu beeinflussen (Comalada *et al.* 2003). Auch die Funktion der Mastzellen wird durch IPL wie CsA und FK 506 dramatisch unterdrückt, wobei die Degranulation gehemmt wird (Stelatto *et al.* 1992, dePaulis *et al.* 1992).

Für die Wirkung der IPL auf die Hautkeratinozyten existieren widersprüchliche publizierte Daten, welche den stimulierenden Effekt auf die HF-Keratinozyten nicht zufriedenstellend erklären können. Einigen Angaben zufolge können IPL wie CsA die Proliferation epithelialer Keratinozyten *in vivo* und *in vitro* nicht stimulieren, sondern hemmen (Furue *et al.* 1988b, Ramirez-Bosca *et al.* 1990). CsA und FK 506 inhibieren die humane Keratinozytenproliferation durch Blockade der Zellen in den G0/G1-Phasen des Zellzyklus (Karashima *et al.* 1996). CsA kann in einer Konzentration von $> 3 \mu\text{g}$ die Proliferationsrate von Maus- und Humankeratinozyten sowie Fibroblasten *in vivo* und *in vitro* dauerhaft in der G1-Phase des Zellzyklus halten und das Zellwachstum effektiv unterdrücken (Nikoloff *et al.* 1988, Khandke *et al.* 1991). Jedoch wurde auch gezeigt, dass IPL wie CsA in optimaler Konzentration die Proliferation epidermaler sowie HF-Keratinozyten erfolgreich stimulieren und der eigentliche Grund für den Haarwuchs sein können (Kato *et al.* 1987, Takahashi & Kamimura, 2001, Gafter-Gvili *et al.* 2003).

1.4.3 Einfluss der Immunophilinliganden auf den Haarwuchs

IPL sind sichere Haarwuchsstimulatoren *in vivo* (Paus *et al.* 1996b, Iwabuchi *et al.* 1995, Maurer *et al.* 1997, Gafter-Gvili *et al.* 2003) und in der Organkultur (Tayler *et al.* 1993, Takahashi & Kamimura, 2001). Sie fördern den Haarwuchs von Telogenmäusen (Paus *et al.* 1989, Jiang *et al.* 1995) sowie bei Nacktmäusen *in vivo* (Sawada, 1987, Gafter-Gvili *et al.* 2003/2004). IPL sind potente Inhibitoren sowohl der physiologischen als auch der pharmakainduzierten Transformation der HF ins Telogen (Hussein *et al.* 1995, Paus *et al.* 1996b, Maurer *et al.* 1997, Shirai *et al.* 2001, Gafter-Gvili *et al.* 2003). In der klinischen Praxis ist eine Hypertrichosis nach Behandlung mit CsA keine Seltenheit und wird mit der Verlängerung der Anagenphase erklärt (Wisocki & Daley, 1987). Dieser haarwuchsfördernde Effekt begründet die Anwendung des CsA in der Behandlung von Haarleiden wie Alopecia areata und androgenetischer Alopezie (Lutz, 1994). Jedoch sind auch Fälle von Alopecia areata nach systemischer Gabe von CsA bekannt (Cerotini *et al.* 1999).

Der Einfluss der IPL auf den Haarwuchs wird mit der proliferationsfördernden Wirkung durch Hemmung der Calcium-Calmodium-abhängigen Phosphatase Calcineurin und des NF-AT begründet (Paus *et al.* 1996b, Gafter-Gvili *et al.* 2003). Jedoch konnten Iwabuchi *et al.* durch Experimente mit Ascomycin und Rapamycin *in vivo* beweisen, dass eine Inhibition des Calcineurin nicht unbedingt erforderlich ist, um einen Haarwuchs zu provozieren (Iwabuchi *et al.* 1995).

Auch wenn sie keinen direkten Blocker der Proteinkinase C (PKC) darstellen, können die IPL *in vivo* die Signalvermittlung über PKC indirekt beeinflussen. Sie sind in der Lage, die Expression mancher PKC-Isoenzyme in der Organkultur mit epidermalen und HF-Keratinocyten signifikant zu reduzieren (Takahashi & Kamimura, 2001). Da die PKC als negativer Wachstumsfaktor für den Haarwuchs bereits beschrieben worden ist, wird spekuliert, dass auch die Unterdrückung oder die komplette Blockade der PKC-Aktivität den wachstumsfördernden Effekt der IPL erklären kann (Takahashi *et al.* 2000, Takahashi & Kamimura, 2001).

1.4.4 Cyclosporin A

Cyclosporin A (CsA) ist ein zyklisches, hoch lipophiles Polypeptid und als Metabolit von *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers), Rifai, *Cylindrocarpon lucidum* Booth, sowie *Tolypolladium infantum* (Gams) beschrieben (Borel *et al.* 1976, Dreyfuss *et al.* 1976, Huai *et al.* 2002) (**Abb. 9, A**). Die chemische Substanz zeigt eine subnanomolare Affinität für Cyclophilin A (Handschumacher *et al.* 1984). Sie dringt leicht durch Zellmembranen und wirkt hauptsächlich durch die Bindung an interzelluläre Proteine (Ivery, 2000), wobei ihre katalytische Aktivität gehemmt wird (Wiederrecht *et al.* 1993, Wang & Heitman, 2005). CsA entfaltet seine biologische Wirkung nur im Komplex mit Cyclophilin A (Friedman & Weissman 1991). Der CsA-Cyclophilin-Komplex (**Abb. 9, B**) führt zur Hemmung der Calcium-abhängigen Serin/Treonin-Phosphatase Calcineurin (Kapitel 1.4.1) (Ho *et al.* 1996, Gupta *et al.* 1989a, Wang & Heitman, 2005). In höheren Dosen sind für CsA toxische Effekte bekannt (Wiederrecht *et al.* 1995).

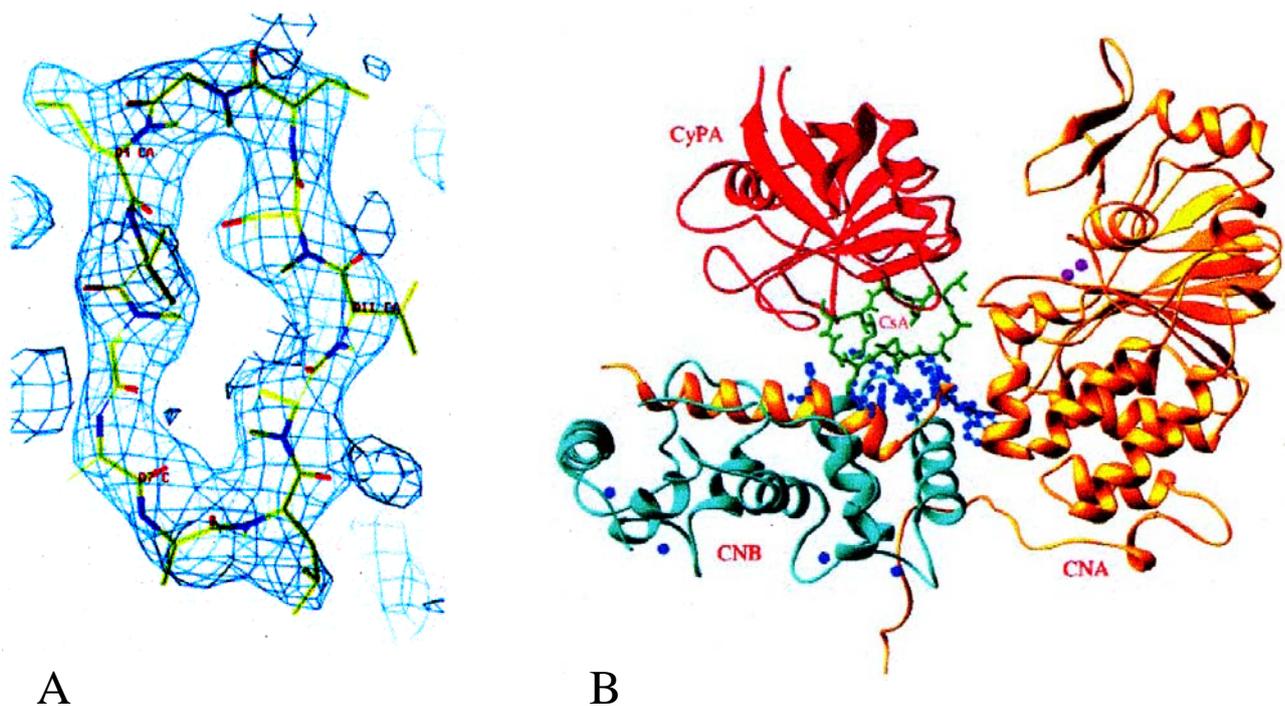


Abb. 9 Cyclosporin. A) Stereodarstellung der Elektronendichte. B) Räumliche Konfiguration des CypA-CsA-CN-Komplexes. Cyclophilin (**CyPA**, rot) Cyclosporin A (**CsA**, grün), Calcineurin A/B (**CNA**, gelb, und **CNB**, türkis), **Fe³⁺** (violette Bälle) und **Calcium** (blaue Bälle) (Darstellung nach Huai *et al.* 2002).

1.5 Aktuelle Forschungsmodelle für das *in vivo* Studium von Haarzyklus und ZIA

Die Haarforschung verfügt über unterschiedliche *in vivo* wie *ex vivo*-Modellsysteme für das Studium von HF-Morphologie und Haarzyklus (Randal *et al.* 2003). Für die *in vivo* Versuche werden allgemein kleine Tiere, konstante physiologische Verhältnisse und ein übersichtlicher Ablauf der Ereignisse bevorzugt (Uno, 1991). Mit seinem mosaikartigen Haarwuchs ist das Meerschweinchen (Guinea pig) dem Menschen sehr ähnlich und als Modell gut geeignet (Bosse, 1967). Eine lange Tradition für das Studium von HF-Morphologie und Haarzyklus haben Rattenmodelle (Durward *et al.* 1949, Butcher *et al.* 1951). An Wistar-Ratten wurden die Auswirkungen von Hormonen auf die Haarwuchskontrolle gründlich studiert (Ebling *et al.* 1991). Ein großer Nachteil dieses Modellsystems sind jedoch die Rückenhautareale mit HF in unterschiedlichen Zyklusstadien, welche die Homogenität der HF-Populationen unterbrechen und die Aussagen negativ beeinflussen können.

Für Studien geeignet ist die Maus (*mus musculus*) (Dry, 1926). Dabei ist das weibliche C57BL/6 Mausmodell eines der ältesten Modellsysteme in der Haarforschung (Chase *et al.* 1951, Silver & Chase, 1966, Paus *et al.* 1989). Trotz der standardisierten und physiologisch hoch relevanten Verhältnisse kann dieses Modell jedoch für das Studium der Androgenwirkung auf den Haarzyklus nicht optimal verwendet werden. Dafür sind vielmehr Makaken (Uno, 2000) oder Mäuse mit charakteristischer androgenbedingter Alopezie zu gebrauchen (Matias *et al.* 1989).

In der Haarforschung viel beachtet sind Mausstämme mit genetischen Defekten entweder spontaner Genese oder als Produkt einer gezielten genetischen Manipulation (Randal *et al.* 2003). Unter diesen Mäusen sind die *Hairless* sowie die *Rhino Mice* sehr bekannt (Achmad *et al.* 1999, Sundberg *et al.* 1999, Panteleyev *et al.* 1998). Solche Modellsysteme liefern die Grundinformation über die genetische Basis bestimmter Haarleiden, wie kongenitaler Atrichie, und sind wichtig für das Studium ihrer molekularen Pathomechanismen (Ahmad *et al.* 1999, Sundberg *et al.* 1999).

Die Auswirkungen von Chemotherapeutika auf die HF-Melanogenese und den Haarzyklus sind bereits in den sechziger Jahren an weiblichen braunen und C57BL/6 Mäusen studiert worden, jedoch zu dieser Zeit noch nicht als standardisiertes Modellsystem für die Manipulation der ZIA (Braun-Falco, 1959, Zaun, 1967, Kostanecki *et al.* 1967). Auf der Suche nach Versuchstieren, die den Kriterien einer ZIA bei Menschen entsprechen, wurde weiterhin mit Meerschweinchen

(Bosse, 1967, Braun-Falco 1966) und Angora-Kaninchen experimentiert (Fraser, 1952, Powis & Kooistra, 1987).

Zu der Zeit, als das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Mausmodell mit weiblichen C57BL/6 Mäusen im Prozess der Erstellung war, konzentrierte sich das wissenschaftliche Interesse in Bezug auf die ZIA auf neugeborene, acht Tage alte Ratten (Hussein *et al.* 1990, Hussein, 1991, Hussein *et al.* 1995). In diesem Modell konnte eine durch diverse Zytostatika bedingte ZIA mittels vorheriger oder gleichzeitiger Gabe eines bakteriellen Immunmodulators (ImuVert), durch systemische Applikation von Zytokinen (IL-1, EGF, FGF 1) oder durch topisch applizierte *Vitamin D*-Derivate und CsA, erfolgreich unterdrückt werden (Hussein *et al.* 1990, Hussein, 1991, Jimenez *et al.* 1995, Hussein *et al.* 1995).

Leider ist die Pathobiologie der ZIA in diesem viel gebrauchten Rattenmodell bisher noch uncharakterisiert geblieben. Ferner bleibt zweifelhaft, ob dieses Modell, das ausschließlich neugeborene Ratten mit HF-Populationen mit noch nicht definitiv abgeschlossener Morphogenese und depigmentiertem Flaumhaar gebraucht, ausreichende Gemeinsamkeiten mit der ZIA bei Menschen besitzt.

Auch ZIA-Modelle an drei Wochen alten weiblichen BALB/c und C57BL/6 Mäusen (Chen *et al.* 1998, Sato *et al.* 2001) sowie an neugeborenen männlichen Mäusen des Stammes C3/HeN (Shirai *et al.* 2001) sind für das Studium und die Manipulation der ZIA interessant. In diesen Modellsystemen sind die Anagen VI-HF der ersten postnatalen Haarwuchsphase das Zielobjekt der Chemotherapie. Vorteilhaft dabei ist die synchronisierte HF-Population, die ohne die Belastung durch eine Depilation ihre physiologische Wachstumsphase starten kann. Einschränkend dagegen sind der nicht genau festlegbare Anfang der neuen Wachstumsphase sowie das niedrige Körpergewicht der Tiere und das daraus resultierende Toxizitätsrisiko.

1.5.1 Das C57BL/6 Mausmodell für die Haarforschung

Das C57BL/6 Mausmodell ist eines der etabliertesten *in vivo* Modellsysteme in der Haarforschung. Der entscheidende Vorteil dieses Modells liegt in der Tatsache, dass der Haarzyklus sehr gut beschrieben ist und mit einer Dauer von 17 bis 21 Tagen relativ kurz im Vergleich zu dem anderer Tierarten ausfällt (Dry, 1926, Müller-Rover *et al.* 2001). Der Haarwuchs läuft hier bis zu einem Alter von 6 bis 8 Wochen in synchronisierten Wellen ab

(Chase & Eaton, 1959). Das erlaubt eine Depilation der Haarschäfte während der Telogenphase und die Initiierung eines gleichmäßigen Haarwuchses auf der gesamten Rückenhaut. Damit entsteht eine einheitliche HF-Population im gleichen Entwicklungsstadium mit identischer Morphologie bei standardisierten physiologischen Verhältnissen.

Im Vergleich dazu ist der Haarzyklus bei Menschen, Meerschweinchen oder Hauskaninchen nicht synchronisiert und die einzelnen HF sind meistens in unterschiedlichen Wachstumsphasen (Kligman, 1959, Fraser, 1952, Bosse, 1967). Wellenförmig verläuft der Haarwuchs auch bei Ratten, jedoch mit dem wichtigen Unterschied, dass die HF-Populationen nur in umschriebenen Hautarealen synchronisiert wachsen (Butcher, 1951, Chase *et al.* 1951).

Die Hautfarbe der C57BL/6 Maus ist zyklusbedingt und kann als wichtiges Kriterium für die jeweilige Zyklusphase herangezogen werden. Gleich nach der Depilation ist die Telogenhaut zartrosa. Weil die murine Epidermis melaninfrei ist, wird Pigment nur in den follikel-eigenen Pigmentzellen produziert und von dort in die Haarschäfte weitergeleitet. Diese Zellen sind ausschließlich während der Wachstumsphase (Anagen) aktiv, weshalb eine schwarze Hautfarbe für diese Zyklusphase charakteristisch ist (Slominski *et al.* 1994). Die progressive Pigmentakkumulation im Frühanagen ändert das Hautkolorit von hellgrau zu gesättigtem dunkelgrau. Im Spätanagen dominiert die homogene schwarze Farbe auf der gesamten Rückenhaut. Sie reflektiert die Pigmentansammlung in Haarbulbi und interkutanen Haarschäften. Weil während der Katagenphasen die Melanogenese unterbrochen wird, ändert sich die schwarze Grundfarbe mit dem Fortschreiten der Transformation über hellgrau zu rosa. Im Telogen setzt sich wieder das Rosakolorit durch (Müller-Rover *et al.* 2001).

2 ZIELSETZUNG UND UNTERSUCHUNGSSTRATEGIE

Ziele der Arbeit sind:

1. Anhand des C57BL/6 Mausmodells eine einfache Technik zu etablieren, welche mittels Applikation von zytostatisch wirkenden Pharmaka, zuverlässig und klinisch relevant eine Haarfollikeldystrophie und Alopezie provozieren kann, die der bekannten Problematik einer ZIA bei Menschen weitgehend entspricht.
2. Eine standardisierte Methode zu entwickeln, welche die initiale Antwort und die Generation von dystrophen HF nach Zytostatikaschädigung systematisch und gut reproduzierbar studiert sowie pharmakologisch manipulieren lässt.
3. Die Wirkung des IPL CsA auf die Dynamik des Haarzyklus und die ZIA in diesem Modell zu untersuchen.
4. Leitlinien zur systematischen Klassifikation der Zytostatika-induzierten Haarfollikeldystrophie zu erstellen.

Auf der Basis der Hypothese, dass zytostatisch und proapoptotisch wirkende Chemotherapeutika die HF-Morphologie und den Haarwuchs beeinflussen sowie eine vorzeitige Transformation ins Katagen und eine ZIA provozieren können, wird als erster Schritt in unabhängigen Versuchseinsätzen getestet, ob die intraperitoneale Gabe eines ausgesuchten alkylierenden Pharmakons (CYP) die Morphologie der reifen Anagen VI-HF dystroph umstellen und das Katagen sowie eine ZIA, ähnlich wie nach einer Chemotherapie bei Menschen, einleiten können.

Weiterhin wird das Medikament (CYP) in diversen Konzentrationen getestet, um die optimale, hoch potente und möglichst wenig toxische Konzentration festzulegen. Es wird angestrebt, die Ergebnisse in mindestens zwei separaten Versuchsansätzen zu bestätigen. Die Daten sollen detailliert erfasst werden und als standardisiertes Modell für das Studium der ZIA-Pathologie dargestellt werden. Parallel dazu wird mit Rücksicht auf die haarwuchsstimulierende Wirkung der IPL CsA in separaten Versuchsgruppen getestet. Hierbei wird untersucht, ob CsA in bereits etablierter haarwuchsstimulierender Dosis von 5 mg/Maus den Ablauf der Anagen- und Katagenphasen des Haarzyklus sowie die HF-Morphologie und den Haarausfall einer ZIA protektiv beeinflussen kann.