

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt
Psychosomatik und Psychotherapie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Stressabhängige Regulation von Proliferation und Apoptose
unterschiedlicher Melanozytenpopulationen im murinen
Haarfollikel - Ein Modell zur Erforschung der
Prämaternen Canities

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Rosa Spatz

aus Potsdam

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. E. M. Peters
2. Priv.-Doz. Dr. med. S. Hendrix
3. Prof. Dr. M. Böhm

Datum der Promotion: 03.09.2010

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern und meiner Schwester, und meinen Freunden für ihr Interesse, ihre stetige Unterstützung und Ermutigung, in allen Phasen des Studiums und der Promotion. Sie waren mein unerschütterlicher Rückhalt, ohne den ich viele Ziele nicht erreicht hätte.

Ich bedanke mich bei Frau PD Dr. Eva Peters für die Überlassung dieser interessanten Fragestellung, die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, zahlreiche Anregungen und Kritik sowie die Möglichkeit erste Erfahrung in der Forschung zu sammeln. Ebenso danke ich den übrigen Mitgliedern der Forschungsgruppe für ihre Unterstützung gerade auch in schwierigen Momenten bei der Arbeit.

Weiter gilt mein Dank Dr. Michael Fessing um Prof. Vladimir Botchkarev an der University of Bradford, Susann Förster um PD Dr. Wolfgang Kemmner am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin und Dr. Ralf-Jürgen Kuban des Labors für funktionelle Genomforschung an der Charité Berlin für die Hilfe bei der Kalkulation und der Auswertung der Microarraydaten.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei Herrn Prof. Burghard F. Klapp, der mir die besten Rahmenbedingungen für die Fertigstellung der Arbeit ermöglicht hat.

VORWORT	6
1 HINTERGRUND	7
1.1 Der Haarfollikel und sein Wachstumszyklus - Zyklischer Auf- und Abbau der pigment- bildenden Einheit.....	7
1.2 Melanozytenpopulationen des Haarfollikels.....	11
1.3 Melanogenese	14
1.4 Das Haarergrauen.....	16
1.4.1 Senile Canities	16
1.4.2 Übernacht-Ergrauen	17
2 MELANOZYTEN UND STRESS	18
2.1 Psycho-emotionaler Stress und Haarfollikel.....	18
2.2 Das Schicksal des Melanozyten	19
2.3 Offene Fragen.....	20
3 METHODIK	21
3.1 Tierexperimenteller Versuchsaufbau.....	21
3.1.1 Depilationsinduzierter Haarzyklus	22
3.1.2 Stressexposition.....	22
3.1.3 Applikation von Substanz P	23
3.1.4 Antagonisierung des Neurokinin-1 Rezeptors	23
3.2 Stresseffekte auf die murine Haut	24
3.3 Untersuchung von Stresseffekten auf Proliferations- und Apoptosephasen der melanozytären Entwicklung	24
3.4 Gewebeaufbereitung.....	26
3.5 Histochemie.....	26
3.6 Immunhistochemie.....	26
3.6.1 Immunhistochemische Doppelfärbungen.....	26
3.6.2 Verwendete Marker	27
3.6.3 Nachweis von Apoptose	29
3.7 Photodokumentation und Statistik.....	30
3.8 RNA Präparation für Microarray Analysen.....	31
3.8.1 RNA Isolation	31
3.8.2 Amplifikation, Labeling und Hybridisierung	32
3.9 Microarray Auswertung	32
3.9.1 Analyse der Microarray Daten	32
3.9.2 Annotation	32
3.9.3 Pigmentierungs-relevante Gene	33
3.9.4 Pathway Analyse	33

4	ERGEBNISSE	35
4.1	Stress und Melanozyten während der Etablierung der pigment-bildenden Einheit	35
4.2	Stress und Melanozyten am Übergang zur Haarfollikelregression	44
4.3	Stress-bedingte Veränderungen auf Transkriptionsebene	48
4.3.1	Melanozyten-relevante Gene werden reguliert	48
4.3.2	Pathways unter Stress	52
5	DISKUSSION	54
6	ZUSAMMENFASSUNG	63
7	ERLÄUTERUNGEN	65
7.1	Glossar	65
7.2	Abkürzungen	67
8	LITERATUR	70

Vorwort

Das Haar ist ein vielfältiges Hautanhangsgebilde. Es erfüllt verschiedene physikalische Aufgaben wie Wärmeisolation, Feuchtigkeitsregulierung, Lichtschutz und mechanische Barriere [1]. Darüber hinaus wird der Form, Farbe und Fülle des Haares eine nicht unerhebliche Aussagekraft über sozialen Status, Wohlstand, psychische und physische Gesundheit und das Alter nachgesagt [2]. Diese ihm zugeschriebenen Attribute machen das Haar für uns sehr bedeutsam. Volles, kräftiges und satt pigmentiertes Haar wird mit Gesundheit, Jugend und Vitalität assoziiert, wohingegen weißes oder dünnes Haar an Alter, mannigfaltige Lebenserfahrungen und **Weisheit** denken lässt.

Mit dem Ergrauen, auch *Canities* genannt, wird ein jeder im Laufe seines Lebens unausweichlich konfrontiert und so stellt, im Besonderen, das Haupthaar einen sichtbaren und eindeutigen Indikator für Alterungsprozesse des Körpers dar [3]. Doch paart sich ‚Grauheit‘ nicht mit ‚Alter‘ drängt sich ein Zusammenhang zwischen körperlich-mentaler Auszehrung und einem stress-bedingten damit assoziierten Verlust Haarfarbe auf [4]. ‚Sich über etwas keine grauen Haare wachsen lassen‘ oder ‚Sorgen machen graue Haare‘ sind Verbalisierung dieses Phänomens.

Um sich diesem aus wissenschaftlicher Sicht zu nähern, werden zunächst die anatomischen und physiologischen Grundlagen beschrieben und bisheriges Wissen über die Mechanismen des Ergrauungsprozesses und pathologischer Formen der *Canities* dargestellt [2, 5-9].

1 Hintergrund

1.1 *Der Haarfollikel und sein Wachstumszyklus - Zyklischer Auf- und Abbau der pigment-bildenden Einheit*

Der humane Haarfollikel etabliert sich zwischen der zwölften und 20. Schwangerschaftswoche als neuro-mesenchymal-epitheliale Einheit in der Haut des Fötus [10, 11]. Zur Geburt ist nahezu der gesamte Körper des Neugeborenen vollständig vom so genannten Wollhaar (Lanugo) bedeckt. Dieses wandelt sich in Laufe der weiteren Entwicklung zum Terminalhaar. In der Adoleszenzphase entwickelt sich dann unter Hormoneinfluss die Puberalbehaarung. Der Haarfollikel setzt sich aus verschiedenen Zellpopulationen zusammen. Unter ihnen die dem Epithel entstammenden Keratinozyten, die den Haarschaft sowie die innere und äußere Wurzelscheide bilden, die mesenchymalen Muskelzellen des Musculus arrector pili genauso wie die Sebozyten der Talgdrüse und die Fibroblasten der dermalen Papille und die funktionell essentiellen Zellen neuronaler Abstammung, zum einen die Nervenzellen der Spinalganglien, die ihre Neuriten zu den Haarfollikeln entsenden und die später pigment-bildenden **Melanozyten**. Sie wandern noch vor Beginn der Pigmentproduktion aus der Neuralleiste [12], über die Dermis [11] in der sich bildenden Haarfollikel ein und siedeln sich in den verschiedenen Nischen an [13] (siehe 1.2 Melanozytenpopulationen des Haarfollikels).

Das Haar wächst als eines der wenigen Organe, neben Uterus und Brustdrüse, in zyklische Phasen des Auf- und Abbaus [1]. Zellproliferation und –apoptose sind hier in einem exakt koordinierten Organzyklus genau gesteuert, bei dem man Wachstums- (Anagen), Regressions- (Katagen) und Ruhephase (Telogen) unterscheidet (Abbildung 1). Das Anagen ist von massiver Proliferation gekennzeichnet. Epitheliale und melanozytäre Stammzellen der Wulstregion (Ort der Talgdrüsenmündung und der Insertion des M. arrector pili) differenzieren aus, wachsen mit der dermalen Papille in die Subkutis und bilden dort die Haarzwiebel, den Haarbulbus. Die Keratinozyten und Melanozyten bilden über der dermalen Papille eine funktionelle Einheit der Melaninproduktion und des –transfers, die auch pigment-bildende Einheit genannt wird [14]. Hier hat der reife dendritische Melanozyt Kontakt zu fünf bis sechs Keratinozyten. Diese pigment-bildende Einheit existiert in dieser Form nur im Anagen [15], sie liegt oberhalb der so genannten Auber' schen Linie. Diese Linie markiert eine

Proliferationsgrenze. Nur proximal der Linie proliferieren die Keratinozyten, distal findet keine Zellteilung statt, sondern erfolgen Syntheseprozessen der jeweiligen Zellen, Pigmentproduktion durch Melanozyten, Keratinproduktion, Melaninaufnahme und schließlich Ausdifferenzierung der Keratinozyten.

Diese Phase des pigmentierenden Wachstums dauert beim Menschen je nach individuellen Anlagen zwischen sechs und zehn Jahren, sodass sich ca. 97% aller Skalhaare im Anagen befinden. Auf das Anagen folgt die Regressionsphase, das Katagen, von dem zeitgleich etwa 2% der Skalhaare betroffen sind. Hier kommt es zum programmierten Zelltod, Apoptose, von Keratinozyten und Melanozyten [8], bei der sich der Haarbulbus verschmälert, an Größe verliert und die dermale Papille sich zurück an die dermal-subkutane Grenze verlagert. Anschließend geht der Haarfollikel in die Ruhephase über. Im Telogen finden weder Haar- noch Pigmentproduktion statt. Bei erneuter Anageninduktion werden die Zellen des Haarbulbus' neu aus den Stammzellen [16] der Wulstregion rekrutiert, ein neues Haar wächst und das alte wird heraus gestoßen.

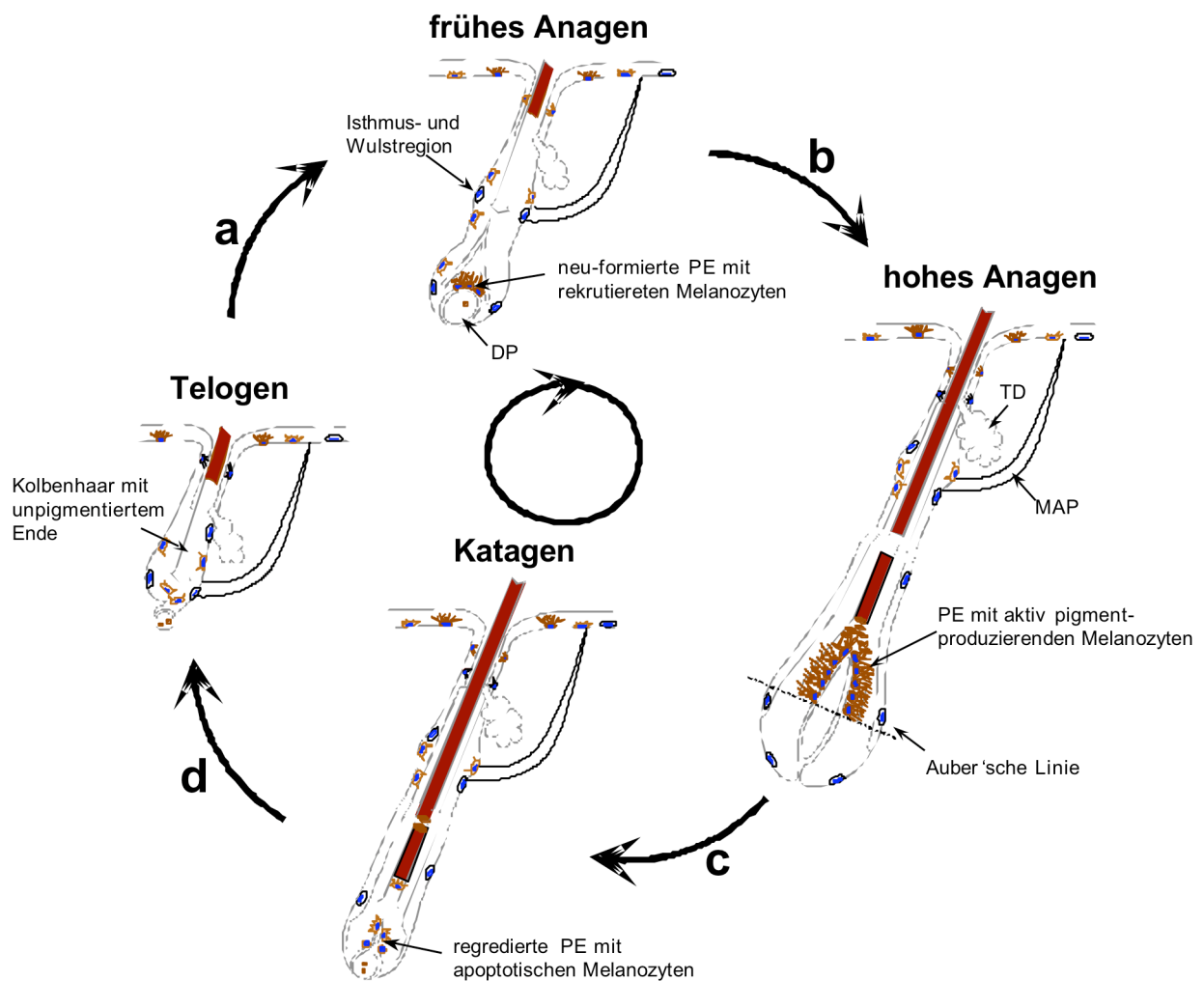


Abbildung 1: Zyklischer Auf- und Abbau der pigment-bildenden Einheit. Die Graphik fasst die Phasen der melanozytären Entwicklung zusammen. **a)** Zu Beginn des neuen Anagens werden neue Melanozyten für die pigment-bildende Einheit des Bulbus aus dem melanozytären Stammzellenpool der Isthmus- und Wulstregion rekrutiert. Im frühen Anagen formiert sich die pigment-bildende Einheit aus Haarschaft- und Pigmentproduktion oberhalb der dermalen Papille.; **b)** Von dieser pigment-bildenden Einheit ausgehend, wird beim Menschen bis zu 10 Jahre lang ein pigmentierter Haarschaft gebildet.; **c)** Durch bislang nicht geklärte Mechanismen, wird die Pigment- und Haarschaftproduktion eingestellt. Es kommt zur Apoptose von pigmentierenden Melanozyten und Keratinozyten. Der Haarfollikel geht in das Katagen über.; **d)** Der gesamte Bulbus regrediert, die apoptotischen Zellen werden abgebaut und der Follikel geht in das Telogen über. Abkürzungen: MAP = Musculus arrector pili; TD = Talgdrüse; DP = dermale Papille; PE = pigment-bildende Einheit. Abbildung modifiziert nach Peters et al. 2001 [2, 7, 17, 18].

Hieraus ergeben sich zwei Schlüsselphasen der melanozytären Entwicklung während des Haarzyklus', die für das vorzeitige Ergrauen von entscheidender Bedeutung sein könnten:

- 1) Zu Beginn des Anagens in der Proliferations- und Differenzierungsphase scheinen die ruhenden melanozytären Stammzellen empfänglich für äußere Stimuli zu werden [6, 19, 20]. Vermutlich werden sie auch vulnerable gegenüber negativen Einflüssen (Abbildung 1 a)).
- 2) Im Anagen-Katagen-Übergang, währenddessen reife Melanozyten der pigmentbildenden Einheit in Apoptose gehen oder zu einem kleinen Teil in der dermalen Papille verweilen. In dieser Phase könnte das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose gestört werden (Abbildung 1 c)).

Neben der im Haarfollikel exakt gesteuerten Proliferation und Apoptose, konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass sich auch die den Haarfollikelbulbus und die Wulstregion umgebenden Nervenfaserbündel zyklisch verändern [17, 21] und das Haarwachstum beeinflussen. So kommt es zu einer Vermehrung adrenerger sympathischer Nervenfasern und peptiderger sensorischer Nervenfasern im frühen Anagen. Für das von ihnen enthaltene Noradrenalin und Neuropeptid Substanz P (SP), konnte in der Organkultur ein wachstumsfördernder Effekt in diesem Zyklusstadium gezeigt werden [17, 22]. Da die Differenzierung und Migration der Melanozyten ebenfalls in dieser Phase stattfindet und sie sich von neuronalen Zellen ableiten, liegt die Vermutung nah, dass diese Neurotransmitter auch auf melanozyten-spezifische Prozesse Einfluss nehmen.

Weiterhin exprimiert der humane Haarfollikel alle Elemente der hormonellen hypothalamisch-pituitären-adrenalen Stressachse (HPA-Achse) [23], dazu gehören das Corticotropin Releasing Hormon (CRH) und dessen Rezeptor, die Spaltprodukte des Proopiomelanocortins (POMC), Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) und alpha-Melanozyten-stimulierendes Hormon (α -MSH) sowie deren Rezeptor Melanocortinrezeptor 1 (MC-R1). Deren Expression steigt unter CRH-Einfluss. Darüber hinaus führt die CRH-Behandlung zu verstärktem Haarwachstum, Katageninduktion und zur Melaninproduktion. Auch im murinen Modell ist CRH bekannt. Hier konnte gezeigt werden, dass seine Expression vom Haarzyklusstadium anhängig ist [24], mit hoher Expression im frühen und mittleren Anagen und nahezu erloschener im Katagen und Telogen. Gleiches gilt für ACTH, α -MSH und deren Spaltenzyme [25, 26]. So wurde postuliert und auch nachgewiesen, dass diese kutane HPA-Achse nicht nur das Haarwachstum, sondern auch die kutane Stressreaktion auf beispielsweise UVB

Strahlung beeinflusst, protektiv eingreift [26-28] und die Funktion des Melanozyten inklusive Pigmentbildung entscheidend mitbestimmt [29-34].

1.2 Melanozytenpopulationen des Haarfollikels

Vorangegangene immunhistochemische Untersuchungen haben ergeben, dass es zu Beginn des Anagens mindestens drei verschiedene Melanozytenpopulationen gibt, die sich in Hinblick auf die von ihnen exprimierten Proteine unterscheiden [5, 6, 35] (Abbildung 2). In der Isthmus- und Wulstregion findet man ruhende nicht-proliferierende, nicht-wandernde frühe melanozytäre Stammzellen. In der äußeren Wurzelscheide gibt es gewanderte Melanozyten, die gleichzeitig so *genannte transient amplifying cells* sind [20]. Dies sind Zellen, die bereits erste Schritte der Differenzierung vollzogen haben, sich aber trotzdem noch teilen können. Schließlich befinden sich in der pigment-bildenden Einheit reife Melanozyten die alle zur Melanogenese notwendigen Enzyme exprimieren und Melanogenese betreiben. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es Melanozyten gibt, die die Apoptosephase im Katagen [7, 8] überleben und über die Wanderung in die dermale Papille, im so genannte ‚zweiten Keim‘ das Telogen überdauern und eventuell auf diesem Wege an der Repopulation der pigment-bildenden Einheit im darauf folgenden Anagen beteiligt sind [7, 36].

Lange Zeit wurde die Hypothese vertreten das Melanozyten zum Ende des Wachstumszyklus, Anagen, de-differenzieren, indem sie die Dendriten retrahieren, die Melanogenese einstellen [10] und in der Haarwurzel verweilen. Es wurde vermutet, dass sie im nächsten Haarzyklus an der Pigmentierung des neu entstehenden Haars beteiligt sind. Jedoch sind Dendritenretraktion und Beendigung der Melanogenese genauso gut mit prä-apoptotischen Veränderungen vereinbar. Die Detektion der Melanozytenapoptose während des Anagen-Katagen-Übergangs warf erneut die Frage nach einem Zellpool auf, aus dem sich diese abgestorbenen Zellen regenerieren können, im Sinne eines melanozytären Stammzellpools [7, 8]. Nach der Entdeckung epithelialer Stammzellen [16], konnten auch melanozytäre undifferenzierte amelanotische Zellen nachgewiesen werden [20]. Seitdem ist bekannt, dass die Isthmus- und Wulstregion des murinen Haarfollikels so genannte BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) ‚*label-retaining cells*‘ beherbergt, die den frühen Melanozytenmarker Tyrosinase-related protein-2 (TRP-2) exprimieren. BrdU ist ein Nukleinsäureanalogon, das während der DNA-Replikation in diese eingebaut wird und später mit einem Antikörper angefärbt werden kann. Behält eine Zelle das ‚Label‘ BrdU so hat sie sich

nicht geteilt. Eine mitotisch inaktive Zelle bedeutet für den Haarfollikel eine Stammzelle, aus deren Pool sich neue Haarfollikelzellen ableiten können.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Isthmus- und Wulstregion ein besonderes Milieu bietet. Zum einen scheint es eine immunprivilegierte Nische zu sein [37] und somit dort ortständige Zellen vor destruktiven immunologischen Prozessen schützt. Zum anderen sind ruhende melanozytäre Zellen in dieser Nische von dem vorübergehenden Mangel an bestimmten Wachstumsfaktoren geschützt, dies konnte für den Migrationsstimulator Stammzellenfaktor gezeigt werden [6, 20].

Dies ist somit ein optimaler Ort für kutane Stammzellen, die hier stärker geschützt sind. Diese Stammzellen können so den apoptotischen Verlust verschiedener Zellpopulationen, Keratinozyten wie Melanozyten nach Verletzungen, nach Strahlenschäden und bei regulärer Abnutzung durch mechanischen Abrieb und Haarwuchs kompensieren.

Für die Etablierung des Melanozyten in der Haut und im Haarfollikel und die letztendliche Produktion des Melanins sind eine Reihe von Faktoren und Genen wichtig. Deren Fehlen oder Mutation zeigt sich in Formen des Leuzismus (Fehlen von Melanozyten) und Albinismus (Unfähigkeit zur Melanogenese) [38, 39]. So kommt es bei den verschiedenen Formen des Waardenburg-Syndroms zur fehlerhaften Entwicklung der Melanozyten auf Grund von Mutationen der Gene EDN3, MITF, PAX3, SNAI2 und SOX10 [38]. Sehr gut erforscht ist auch die Rolle von c-kit, dem Rezeptor für den so genannten Stammzellen- oder Mastzellenfaktor (SCF), der auch KIT, cd117 oder stem cell factor receptor genannt wird. Seine Mutation führt beim Menschen zum Piebaldismus, der meist mit einer charakteristischen weißen Stirnlocke und depigmentierten Hautarealen einhergeht. Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass c-kit eine bedeutende Rolle bei der Einwanderung der Melanozyten in den Haarfollikel spielt [40, 41]. Weiterhin ist die Entwicklung reifer Melanozyten im Anagen des Haarzyklus von c-kit abhängig und die spezifische Antagonisierung des Rezeptors führt zum Ergrauen des Fells betroffener Mäusen [6]. Für die Varianten des okulokutanen Albinismus sind Genmutationen in für die Melanogenese essentiellen Enzymen wie Tyrosinase (Tyr) und Tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) verantwortlich [38, 39].

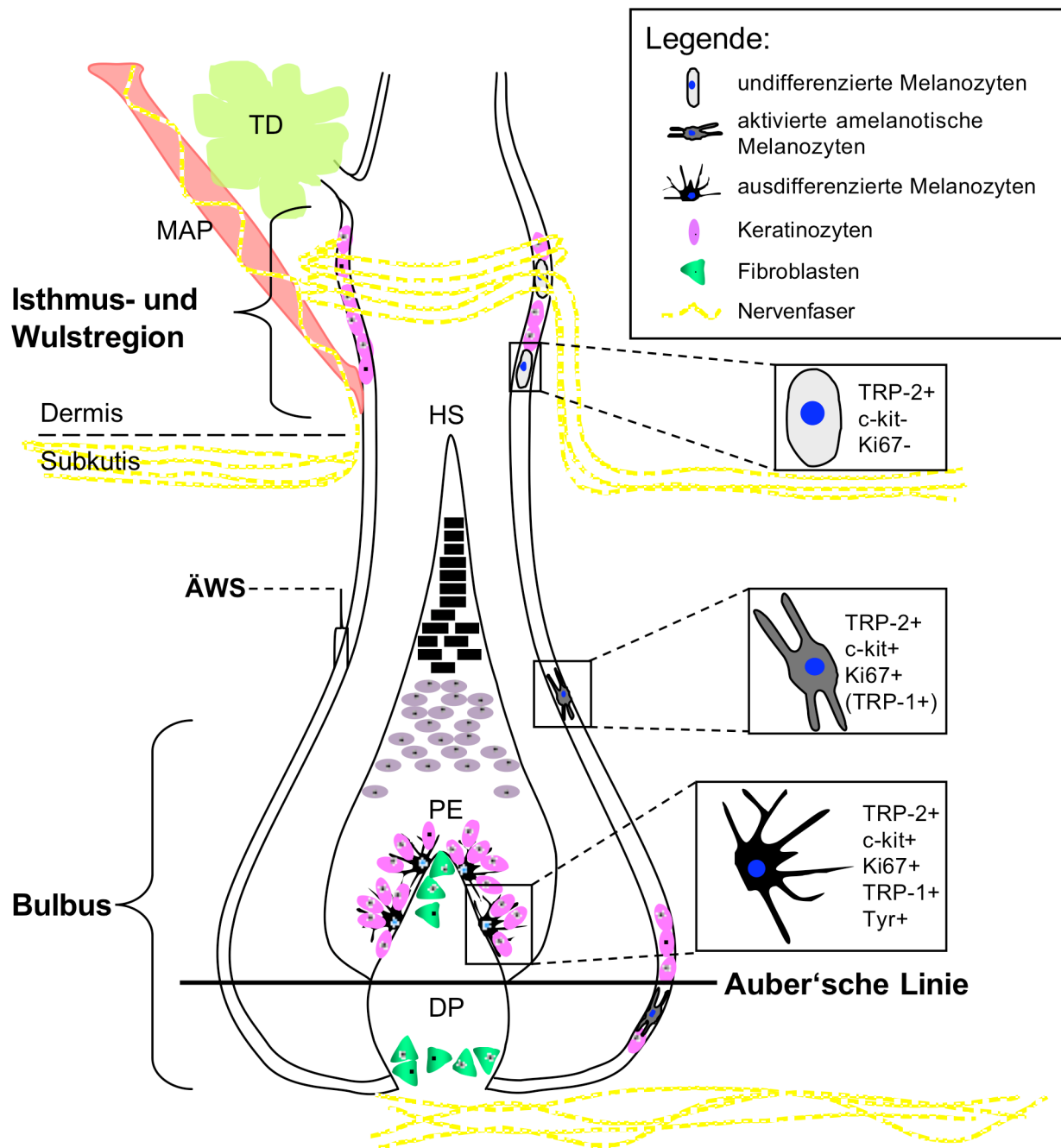


Abbildung 2: Haarfollikel des frühen Anagens mit etablierter pigment-bildender Einheit und beginnender pigmentierender Haarschaftproduktion. Die schematische Darstellung zeigt die verschiedenen Melanozyten-beherbergenden Kompartimente des Haarfollikels. Die vergrößerten Schemata geben die Morphologie und die von den jeweiligen Populationen exprimierter Epitope an. In der äußeren Wurzelscheide der Isthmus- und Wulstregion nahe der Talgdrüsenmündung und der Insertion des Musculus arrector pili, befinden sich die undifferenziert rundlich-ovale melanozytäre Stammzellen, sie exprimieren TRP-2 (+) und befinden sich zum Untersuchungszeitpunkt in der Regel nicht in Proliferation (Ki67-). Die Melanozyten der äußeren Wurzelscheiden zwischen Wulstregion und Bulbus sind oligodendritisch und zeigen Merkmale von frühen (TRP-2+) und reifen (TRP-1+) Melanozyten und exprimieren gleichzeitig den Migrationsmarker c-kit (+) und Proliferationsmarker Ki67 (+). Im Bulbus

angekommen exprimieren sie zusätzlich Tyrosinase (Tyr+), das limitierende Enzym der Melanogenese. (MAP = Musculus arrector pili; TD = Talgdrüse; ÄWS = äußere Wurzelscheide; DP = dermale Papille; HS = Haarschaft; PE = pigment-bildende Einheit; TRP = Tyrosinase-related protein; Tyr = Tyrosinase; Ki67 = Proliferationsmarker; c-kit = Migrationsmarker).

1.3 Melanogenese

Obwohl wenige andere Zellpopulationen zur Melanogenese fähig sind [42], ist sie ein vorwiegend die Melanozyten charakterisierender biochemischer Prozess. Die Melaninbiosynthese findet in dafür spezialisierten Zellkompartimenten, den Melanosomen, statt. Diese bilden sich als vesikuläres Zellkompartiment kernnah aus dem endoplasmatischen Retikulum und werden im Laufe ihrer Ausreifung mit den für die Melanogenese notwendigen Enzymen bestückt, Tyrosinase (Tyr), Tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) und Tyrosinase-related protein-2 (TRP-2). Hier bildet Tyrosinase aus Tyrosin L-Dopa, welches auch unter Einfluss bestimmter Metallionen in Dopaquinon umgewandelt wird (Abbildung 3). Dopaquinon wird bei Mangel an schwefelhaltigen Substraten (Glutathion oder Cystein) durch TRP-2 über die Zwischenstufen Dihydroxyindol und Dihydroxyindolcarboxylsäure in bräunlich-schwarzes Eumelanin umgewandelt. Bei diesem Prozess entsteht reichlich Wasserstoffperoxid (H_2O_2) [43], welches eine Quelle für Sauerstoffradikale darstellt und so oxidativen Stress verursacht. Bei hohen Konzentrationen an Glutathion und Cystein verbindet sich Dopaquinon mit diesen zu Glutathionyldopa bzw. Cysteinyldopa. Durch Tyrosinase und/oder Peroxidase entstehen hieraus über verschiedene Zwischenstufen hell-rötliches Pheomelanin [44-46]. Im Zentralnervensystem werden aus L-Dopa über Dopamin auch die Neuromelanin gebildet [47]. Nach der Synthese wird das Melanin samt Melanosom an die Keratinozyten transferiert [14]. Diese differenzieren aus und bilden so einen pigmentierten Haarschaft.

Melaninbiosynthese

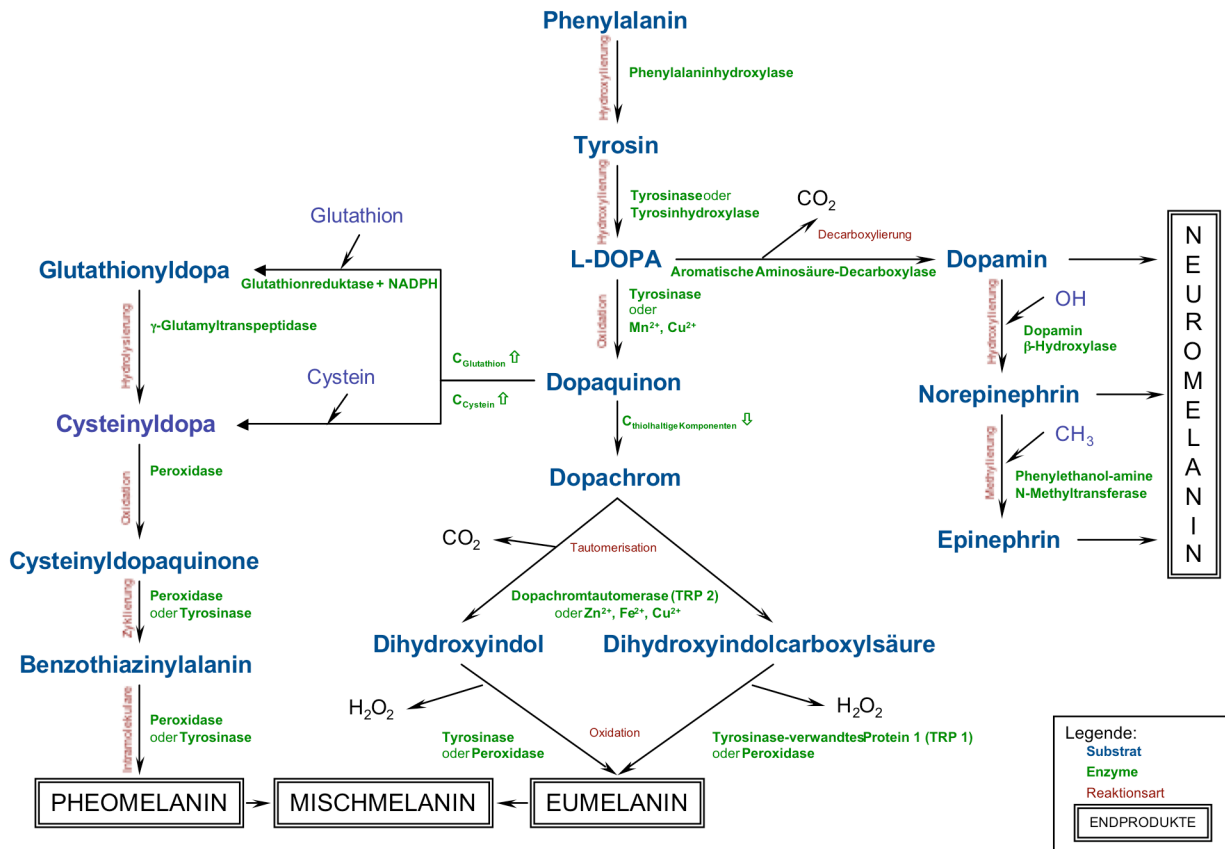


Abbildung 3: Flussdiagramm der Melaninbiosynthese. Die schematische Darstellung verdeutlicht die einzelnen biochemischen Reaktionen. Aus (überwiegend) Tyrosin werden die schwarz-braunen Eumelanine und gelb-rötlichen Pheomelanine gebildet. Bei der Synthese der Eumelanine entsteht reichlich oxidativer Stress in Form von Wasserstoffperoxid. Zur Vollständigkeit sind auch die Syntheseschritte der Neuromelanine aufgeführt, was wiederum die zelluläre und biochemische Verwandtschaft zur neuronalen Linie verdeutlicht. (Abbildung modifiziert nach Slominiski et al. 2004 [43, 46, 47])

1.4 Das Haarergrauen

1.4.1 Senile Canities

Das Ergrauen im Alter wird senile Canities genannt von ‚senil‘ = lat. ‚alters-, und ‚canities‘ = lat. *canus* ‚grau, weißgrau‘ (Duden). Bei Kaukasiern beginnt sie mit Mitte 30 [2]. Als Ursache für die senile Canities wird ein Verlust von Melanozyten verantwortlich gemacht [14]. Histomorphologisch gibt es Hinweise für eine progressive Melanozytendysfunktion mit fehlerhaftem Melanintransfer von Melano- zu Keratinozyten, welche in einer Verringerung der Melanosomenzahl oder ausbleibenden Melanintransfer, sowie zu Fehlablagerungen im umliegenden dermalen Gewebe resultiert. Weiterhin nimmt die Aktivität der melanogenetischen Enzyme ab [2]. Bei den Melanozyten selbst konnte im Verlauf des Ergrauens eine Abnahme der Dendritizität und eine Abrundung ihrer Zellsoma beobachtet werden. Sie erscheinen, bei nur noch schollenartiger Pigmentierung des Haarschafts, vermehrt unterhalb der Auber‘ schen Linie [48]. Tatsächlich verschwinden die Pigmentzellen aus den Bulben und Wulstregionen ergrauender und weißer humaner Haarfollikel [49].

Für c-kit konnte eine entscheidende Rolle für das Migrationsverhalten der Melanozyten nachgewiesen werden. So ist c-kit wichtig für das Einwandern der Melanoblasten in den Haarfollikel während der Morphogenese [40, 50], aber auch entscheidend für die Differenzierung von Melanoblasten im Haarzyklus. Fehlt der c-kit-vermittelte Signalweg im frühen Anagen so reifen keine Melanozyten für die pigment-bildende Einheit heran und das Haar bleibt grau [6, 51], jedoch bleiben hier die Melanoblasten erhalten und die Pigmentierung kann sich erholen.

Es muss weiterhin berücksichtigt werden, dass der Haarfollikel einen Zellverband darstellt. Melanozyten im Besonderen Melanoblasten wachsen *ex vivo* in reiner Zellkultur schlechter als in Co-Kultur beispielsweise mit Keratinozyten [52-54]. So verwundert es nicht, dass auch Zell-Zell-Interaktionen wie die Signalwege des Notch-Rezeptors zum Erhalt der Melanoblasten der Wulstregion beitragen [19, 55] und die Unterbrechung dieser Signalkaskade durch experimentellen Gen-Knock-out zu dosis-abhängigem Ergrauen führt [56].

Des Weiteren scheint der oxidative Stress eine entscheidende Rolle für das Überleben der Melanozyten im Ergrauungsprozess zu spielen. Nicht nur, dass er während der Melanogenese entsteht [43], sondern er ist auch in der Lage, die Melanogenese zu

inhibieren [57]. Außerdem ist oxidativer Stress verantwortlich für nukleäre und mitochondriale (mt) DNA-Deletionen. Eine mitochondriale Deletion, die spezifisch in alternder Haut akkumuliert, ist die Deletion $\Delta 4977$ mtDNA, auch *“common” deletion* genannt [58]. Von dieser weiß man, dass sie in Melanozyten ergrauer humaner Haarfollikel vermehrt auftritt [48]. Diese Akkumulation geht in Melanozyten mit einer Abnahme an c-kit, dem Rezeptor für den Stammzellenfaktor, und Bcl-2, einem anti-apoptotischen und die mitochondriale Atmungskette schützenden Protein, das sich in den Membranen der Mitochondrien befindet, einher.

Auch im Mausmodell führt die gezielte Depletion von Bcl-2 erstens zum Ergrauen des Fells im folgenden Haarzyklus [59, 60] und zweitens zur Apoptose der melanozytären Stammzellen der Wulstregion [61]. Das heißt, dass Bcl-2 sowohl für das Überleben ausdifferenzierter, als auch für den Erhalt von Vorläuferzellen wichtig ist.

Diese bisherigen Ergebnisse können die Mechanismen des Ergrauens nicht abschließend klären. Jedoch deuten sie daraufhin, dass der mangelhafte Erhalt melanozytärer Vorläuferzellen und/oder die reduzierte Apoptoseinhibition melanogenetisch aktiver Zellen der pigment-bildenden Einheit am Ergrauensprozess beteiligt zu sein scheinen.

1.4.2 Übernacht-Ergrauen

Das Übernacht-Ergrauen ist ein Phänomen, das nach plötzlichen, einschneidenden Lebensereignissen auftreten soll. Überlieferungen berichten, dass die französische Königin Marie Antoinette und auch Sir Thomas More in den Tagen vor ihrer Hinrichtung graue Haare bekommen haben [4]. Seit längerem wird hierfür eine besondere Form der Alopecia areata verantwortlich gemacht [9]. Man postuliert hier eine Autoimmunreaktion, die sich gegen melanogenese-spezifische Enzyme richtet und somit nur pigmentierende Melanozyten und den von ihnen populierte Haarfollikel durch Entzündungsprozesse zerstört, wohingegen bestehende weiße Haarfollikel erhalten bleiben sollen und so der Eindruck entsteht, die betroffene Person sei ergraut [62].

2 Melanozyten und Stress

2.1 Psycho-emotionaler Stress und Haarfollikel

Den Ausführungen Hans Selyes folgend ist ‚Stress‘ eine Reaktion und ein Anpassungsprozess des Individuums auf die auf seinen Körper einwirkende äußere Reize [63]. Der betreffende Organismus nimmt die Reize mit den Sinnen wahr. Hierzu gehören Geräusche, visuelle Eindrücke, Hitze aber auch Kognitionen und psycho-emotionaler Stress. Sie werden bewertet und verarbeitet, um schließlich auf sie reagieren zu können. Die systemische Reaktion wird über die hypothalamisch-pituitaren-adrenalen Stressachse (HPA-Achse) vermittelt. Mit Aktivierung dieser Achse kommt es zur Ausschüttung von Stresshormonen wie Corticotropin Releasing Hormon (CRH), Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) und Cortisol [64].

Daneben kommt es zur Aktivierung des sympathischen Nervensystems mit konsekutiver systemischer und lokaler Ausschüttung von Catecholaminen [64].

Als dritte Säule in der Stressreaktion agiert die neuro-peptiderge Achse. Von Vertretern wie Substanz P (SP) ist bekannt, dass es als neuronaler Mediator auf die Sekretion der Stresshormone im zentralen Nervensystem Einfluss nimmt [65] und an der Verarbeitung psycho-emotionalen Stress‘ in Gehirn beteiligt ist [66]. Für Neurotrophine wie Nerve Growth Factor (NGF) konnte ebenso eine vermehrte systemische Ausschüttung unter Stress gezeigt werden [67].

In der Haut selbst werden CRH und der entsprechende Rezeptor exprimiert, was nahe legt, dass die Haut selbst ein stress-reagibles Organ ist [27]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass insbesondere der Haarfollikel in der Gesamtheit seiner Zellen alle Elemente diese HPA-Achse selbst exprimiert [23].

In einem etablierten Tiermodell, das sich der Erforschung der Folgen psycho-emotionalen Stress‘ widmet, wird eine für die Tiere unausweichliche Geräuschquelle als Stressor benutzt, der Lärmstressor. Unter Nutzung dieses Modells konnten Stresseffekte in ihrer Wirkung auf verschiedene Körperorgane nachgewiesen werden [68, 69], darunter auch die Haut [70-75].

In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine systemische Stresswahrnehmung Auswirkung auf die ‚peripher‘ gelegenen Haarfollikel hat. Dass also eine Hirn-Haut-Haarfollikel-Stressachse existiert [75]. So kommt es unter Stress im

Telogen zu einer gesteigerten Apoptose follikulärer Keratinozyten. Während des Anagen-Katagen-Übergangs führt der Stress zu einer vorzeitigen Katagenentwicklung [70, 75]. Auch hier ist die Apoptose follikulärer Zellen erhöht. In beiden Haarzyklusstadien waren die Stresseffekte von einer vermehrten perifollikulären Entzündungsreaktion begleitet, die durch Infiltration von Immunzellen in die interfollikuläre Dermis und Mastzelldegranulation gekennzeichnet ist.

Das Neuropeptid SP konnte als Stressmediator in der Haut identifiziert werden. Den Haarfollikel umgebende Nervenfaserbündel enthalten unter Stress dieses Peptid. Substanz P ist in der Lage ohne Exposition gegenüber dem Lärmstressor, die Stresseffekte hervorzurufen, wohingegen die gezielte Antagonisierung oder der Rezeptor-Knock-out diese Veränderungen auch unter Stressexposition verhindert [76, 77]. Zu diesen Stresseffekten gehören auch die hervorgerufenen immunzellulären Veränderungen, sodass man Auslösung dieser durch Substanz P, als eine neurogene Entzündung ansehen werden kann.

Schließlich kommt auch NGF eine besondere Bedeutung in der Haut zu. NGF reguliert in übergeordneter Position, die durch SP medierte kutane inflammatorische Stressreaktion [74].

2.2 Das Schicksal des Melanozyten

Das Verhalten melanozytärer Zellen ist in dem Kontext von psycho-emotionalem Stress bisher unerforscht. Die im Telogen und Anagen-Katagen-Übergang beobachteten Stresseffekte mit Apoptose und neurogener Entzündungsreaktion ließen die Population der Melanozyten unbeachtet. Die Erkenntnis über die Existenz dieser Hirn-Haut-Haarfollikel-Stressachse legt allerdings nahe, dass auch diese Zellpopulation von stressbedingten Veränderungen betroffen sein kann. Das ACTH ist erstens biochemisch eng verwandt mit dem alpha-Melanozyten-stimulierenden Hormon (α -MSH) und entfaltet zweitens auf Grund der stärkeren Affinität zu dem α -MSH-Rezeptor als α -MSH auch eine ausgeprägte melanogenetische Wirkung [31]. Weiterhin ist der Anagen-Katagen-Übergang im Zyklus der Melanozyten ein entscheidender Zeitpunkt, da sie hier Apoptose gehen, und eine vermehrte Apoptose unter Stress auch sie betreffen könnte. Zusätzlich deuten die Untersuchungen zum oxidativen Stress im senilen ergrauten Haarfollikel [48] darauf hin, dass dieser auch bei der Genese der prämaternen Canities beteiligt sein könnte. Oxidativer Stress entsteht reichlich bei

Entzündungsprozessen [78] somit auch im Rahmen neurogener Entzündungen der Haut [75, 78] und durch die spezifische Funktion der Melanozyten, die Melanogenese [43].

Bezüglich der Differenzierung und Proliferation der Melanozyten aus Vorläuferzellen der Isthmus- und Wulstregion im frühen Anagen gibt es bisher noch keine Untersuchung, auch nicht ob Stress in diesem Haarzyklusstadium einen Einfluss hat. Lediglich für das Telogen konnte eine Verlängerung dessen mit einem anderen Stressmodell gezeigt werden [79] sowie die anageninduzierende Wirkung lokal applizierte Substanz P's [80].

2.3 Offene Fragen

So ergeben sich bezüglich der Pathogenese einer möglicherweise stressinduzierten prämaturnen Canities folgende Fragen:

- ⇒ **Können in Haarfollikeln von gestressten Tieren Veränderungen an Melanozyten festgestellt werden, die auf einen Ergrauen propagierenden Einfluss von Stress hinweisen?**
- ⇒ **Sind Melanozyten ebenso von einer vermehrten Apoptose während des Anagen-Katagen-Übergangs als ein Folge von Stress betroffen und trägt dies möglicherweise zu der Entstehung einer prämaturnen Canities bei?**
- ⇒ **Findet auch im frühen Anagen unter Stress Apoptose statt?**
- ⇒ **Ist die Differenzierung von melanozytären Vorläuferzellen während der frühen Anagenphase unter Stress beeinflusst?**
- ⇒ **Sind mögliche Veränderungen der Melanozytenbiologie unter Stress assoziiert mit oder erklärbar durch Haarzykluseffekte?**
- ⇒ **Ist der für das Haarwachstum hochrelevante Stressmediator Substanz P auch ein für Melanozyten relevanter Stressmediator?**
- ⇒ **Welche molekularbiologischen Signalwege sind in die Stressantwort der Haut involviert, die auf Mechanismen in Melanozyten hinweisen?**

3 Methodik

3.1 Tierexperimenteller Versuchsaufbau

Für alle Versuche wurden weibliche CBA-J (3.3, Abbildung 5) oder C57BL/6 (3.2 und 3.3, Abbildung 6) Mäuse mit einem Gewicht von 16-18 g, das entspricht etwa dem Alter vom sechs Wochen, genutzt (Charles River, Sulzfeld und Harlan Winkelmann Borchon Deutschland). Die Tiere wurden nach der Ankunft in der Versuchstierhaltung in Gruppen von sechs bis sieben Mäusen pro Käfig randomisiert den verschiedenen Untersuchungsgruppen zugeteilt. Den Tieren wurde eine Eingewöhnungsphase an die neue Umgebung von einer Woche gewährt.

Alle Tiere waren bei zwölfstündigem Tag/Nacht-Rhythmus unter pathogenfreien Bedingungen in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM Charité Campus Virchow-Klinikum) bei Futter und Wasser *ad libitum* untergebracht. Die Tierpflege und der experimentelle Versuchsaufbau erfolgten gemäß der FEM-Richtlinien und der staatlichen Auflagen zur Durchführung von Tierversuchen (LaGeSo Berlin (G 0061/02, G 0075/03, G0184/02) in Kooperation mit Prof. Sven Hendrix, Charité, Universitätsmedizin Berlin & Hasselt University - Campus Diepenbeek, Dept. of Morphology & BIOMED Institute, Agoralaan Gebouw D, BE 3590 DIEPENBEEK, Belgium und Prof. Petra Arck, Charité, Universitätsmedizin Berlin & Department of Medicine, McMaster University Hamilton, Ontario Canada).

Die Verwendung von CBA-J und C57BL/6 Mäusen hat verschiedene Vorzüge. Sie sind wie der Mensch Säugetiere und können akustische Stressquellen wie unter 3.1.2 beschrieben wahrnehmen [71]. Die verschiedenen Stämme sind in ihrer Stressreaktion vergleichbar, wobei C57BL/6 Mäuse etwas stress-sensitiver zu sein scheinen [70]. In vorangegangenen Untersuchungen wurden diese speziell für die Versuchsmedizin gezüchtete Tiere, dermatologisch, haarbiologisch und neuro-immunologisch genau definiert und in den verschiedensten Stress- und Neuroendokrinologie-Modellen verwandt [6, 13, 17, 24, 40, 71, 81]. Die Mäuse sind klein, einfach zu halten und durch jahrzehntelange Inzucht syngon. Dieser Umstand erlaubt die Arbeit mit sehr kleinen Gruppen von Tieren, da die zu erwartende Streuung der Daten gering ist. Des Weiteren weisen diese Tiere eine Reihe von anatomischen und physiologischen Besonderheiten auf:

- a) die zyklische Aktivität muriner Haarfollikel ist, anderes als beim Menschen, stark synchronisiert, d.h., es ist eine Vielzahl von Haarfollikeln in exakt derselben Haarzyklusphase verfügbar [82, 83].
- b) mittels Depilation im Telogen bei ca. sieben Wochen alten Mäuse, lässt sich ein exakt vorhersagbarer Haarzyklus induzieren, dessen Stadien morphologisch und biochemisch, wie zahlreiche vorangegangene Untersuchungen gezeigt haben, mit dem spontanen Haarzyklus vergleichbar sind [18].
- c) dieser depilationsinduzierte Haarzyklus ist in zahlreichen vorangegangenen Untersuchungen sehr genau charakterisiert worden, so dass eine Reihe von Vergleichsdaten existieren [5, 8, 17, 18, 21, 24, 36, 84, 85].
- d) die kutanen Melanozyten sind bei diesen Tieren auf die Haarfollikel beschränkt. Da die Melanogenese strikt mit der Haarwachstumsphase, Anagen, gekoppelt ist [15], ist bereits makroskopisch über die Hautfarbe eine Beurteilung der beginnenden Haarfollikelaktivität möglich, ohne dass das Haar bereits die Epidermis durchbrochen hat.

3.1.1 Depilationsinduzierter Haarzyklus

In der siebten Lebenswoche befinden sich alle Haare der Rückenhaut in der Ruhephase (Telogen) [83]. Dieses Haarzyklusstadium ist einfach zu erkennen, da die Haut rosafarben erscheint. Zu diesem Zeitpunkt wird bei allen Mäusen der Nacken- und Rückenbereich unter allgemeiner Anästhesie (12,5 mg/ml, Curamed, Karlsruhe, Deutschland; 0,025 mg/ml Rompun 2%, Bayer, Leverkusen, Deutschland; Injektion pro Maus 0,15-0,2 ml) depiliert. Hierzu wird eine erwärmte Wachs-Harz-Mischung (Beeswax, 243221, Aldrich und Gum Rosin, R3755, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) auf Nacken und Rücken aufgetragen, die bei Erkalten erstarrt. Die sich leicht lösenden Kolbenhaare verkleben in dem Wachs und werden mit dem Wachs-Harz-Gemisch entfernt. Der Wachstumszyklus dieser Follikel wird damit synchronisiert und alle Haarfollikel der Rückenhaut treten in die Wachstumsphase (Anagen) ein [18, 86, 87].

3.1.2 Stressexposition

Im Modell zur Testung der Effekte psycho-emotionalen Stress' werden die Tiere einem Lärmstressor ausgesetzt. (Maulwurfsscheuche, Conrad, Berlin, Deutschland,

Abbildung 4) Diese Methode ist eine seit vielen Jahren etablierte und anerkannte Methode zur Simulation psycho-emotionalen, psycho-sozialen Stress' [68-77, 88-91]. Das Gerät emittiert brummende Töne mit einer hörbaren Frequenz von 300 Hz und einem Schalldruckpegel von 75-80 Dezibel in unregelmäßigen Abständen ca. 4 x 1sec/min, sodass sich die Tiere sich nicht an den Stressor gewöhnen können.



Abbildung 4: Maulwurfsscheuche der Firma Conrad. Die vom Gerät emittierten Töne lösen bei den Nagern Fluchtverhalten aus. Das Gerät ist batterie-betrieben und zur Handhabung im Garten wird das Gerät für gewöhnlich bis zum Gehäuseoberteil in die Erde gesteckt.

3.1.3 Applikation von Substanz P

Für Substanz P ist bereits eine stress-mediierende Wirkung in Bezug auf die Haut und den Haarfollikel nachgewiesen [70, 74, 75, 77]. Unter Stress steigt in der Haut die Anzahl Substanz P-positiver Nervenfasern in der perifollikulären Dermis [70, 71, 75]. Wird der Rezeptor, der die Substanz P-Wirkung mediiert Neurokinin-1 Rezeptor geblockt oder fehlt gentechnisch veränderten Tiere dieser Rezeptor, bleiben unter Stressexposition die Effekte aus [70, 76]. So ist Substanz P als Stressmediator anzusehen. Daher wurde zur Untersuchung eines stress-mediierenden Effekts von Substanz P auf Melanozyten den Tieren einmalig eine Dosis von 10 nmol Substanz P (in steriler desoxygenierter Phosphat-gepufferten Saline (PBS), 100µl pro Tier; S 6883, Sigma, München, Deutschland) intraperitoneal verabreicht. Diese Dosis hat sich als intraperitoneale systemische Applikation in wiederholten Versuchen als effektiv erwiesen [70, 75].

3.1.4 Antagonisierung des Neurokinin-1 Rezeptors

Der Neurokinin-1- (NK-1) Rezeptor mediiert die Effekte vom Substanz P [92]. Um die Abhängigkeit vom Substanz P-Signalweg zu prüfen, erhielten die Tiere vor und nach der Stressexposition 200 µg eines NK-1-Rezeptorantagonisten (in sterilem PBS 100µl pro Tier; RP 67580 Rhône-Poulenc, Frankreich; S 3144, Sigma, München, Deutschland) intraperitoneal.

3.2 Stresseffekte auf die murine Haut

Um isoliert die Stresseffekte auf die murine Haut auf Transkriptionsebene zu untersuchen, wurden ca. sieben Wochen alte C57BL/6 Mäuse für 24 Stunden einem Lärmstressor ausgesetzt. Im Alter von sieben Wochen befinden sich die Mäuse im Telogen [83], der Ruhephase des Haarzyklus, das heißt die Zellen des Haarfollikels exprimieren keine Signale der Zellproliferation oder –apoptose, die eine Stressantwort möglicherweise modifiziert verarbeiten würden. So ist eine Analyse der an der Stressantwort beteiligten Signalwege möglich. 48 Stunden nach Beginn Stressexposition wurden die Tiere getötet. Es erfolgte die Entnahme von ca. 10 cm² Rückenhaut und die Aufbereitung des Gewebes wie unter 3.8.1 beschrieben.

3.3 Untersuchung von Stresseffekten auf Proliferations- und Apoptosephasen der melanozytären Entwicklung

Um Stresseffekte während der Proliferations- und –Wachstumsphase des Haarfollikels zu untersuchen, wurden die Mäuse in zwei unterschiedlichen Versuchsanordnungen untersucht. Die unter 3.1 beschriebenen Behandlungen mit Stressoren und Substanz P und deren Antagonisierungen wurden hier in Bezug zum Haarzyklusstadium gesetzt. Im ersten Versuchsaufbau wurden die Tiere an Tag zwei nach Depilation dem Lärmstressor ausgesetzt, mit Substanz P oder mit dem Neurokinin-Rezeptorantagonisten NK-1 behandelt (Abbildung 5). Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Tiere im frühen Anagen [18, 83], das heißt in der Phase des Haarzyklus, in der die pigment-bildende Einheit neu etabliert wird. In dieser Phase konnte ein möglicher Stress-Effekt auf die Ausbildung der pigment-bildenden Einheit und die Mobilisierung melanozytärer Stammzellen untersucht werden (Abbildung 1 a)).

Zur Prüfung der Stresswirkung auf die Apoptose der Melanozyten, wurde die gleiche Behandlung in den Zeitpunkt des Anagen-Katagen-Übergangs auf die Tage 14 und 15 nach Depilation verschoben (Abbildung 6). In dieser Phase der Entwicklung konnte bereits gezeigt werden, dass der Stress ein prämaures Katagen induziert [70]. Unsere Untersuchungen fokussierten auf die Population reifer Melanozyten in der pigment-bildenden Einheit und deren Apoptoseverhalten und Stress (Abbildung 1 c)).

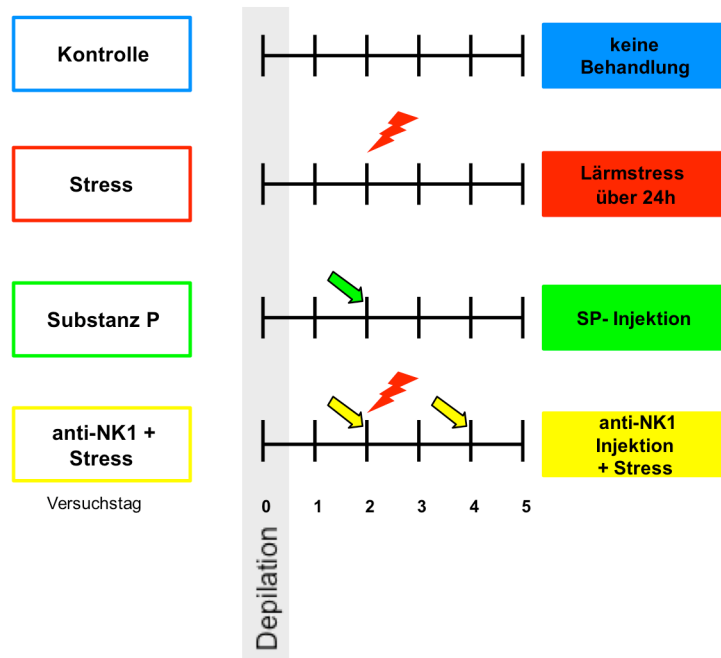


Abbildung 5 Versuchsaufbau im frühen Anagen

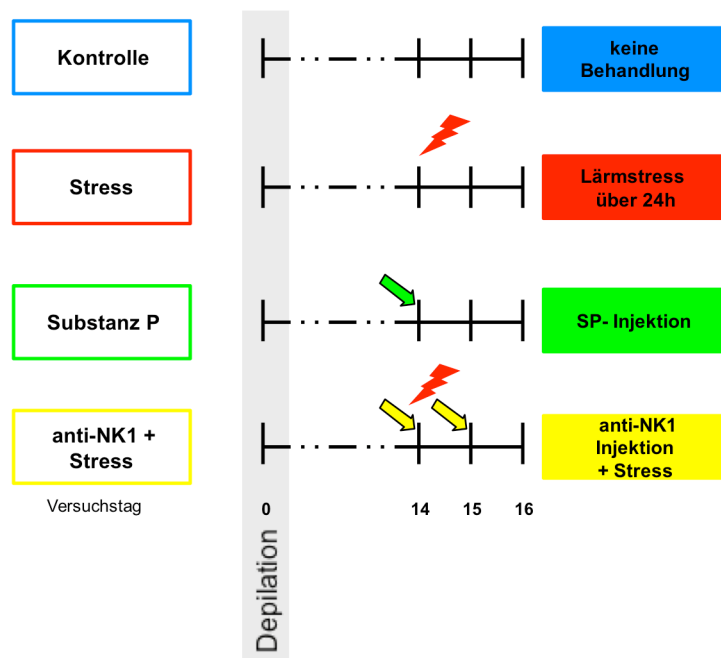


Abbildung 6 Versuchsaufbau im Anagen-Katagen-Übergang

Abbildung 5 und 6: Versuchsaufbau zu den Schlüsselphasen der melanozytären Entwicklung. Die unter 3.1 beschriebenen Behandlungen mit Stressoren und Substanz P und deren Antagonisierung wurden nach Anageninduktion durch Depilation (grau unterlegt) durchgeführt. Die gruppenspezifische Behandlung begann am Tag 2 für das Anagen (Abbildung 5) bzw. an Tag 14 für das Katagen (Abbildung 6). Kontroll-Tiere (blau) erhielten keine weiteren Behandlungen, die Stressgruppe (rot) wurde von Tag 2 auf Tag 3 bzw. Tag 14 auf 15 der Lärmquelle (rote Blitze) ausgesetzt. Die dritte Gruppe (grün) erhielt an

Tag 2 bzw. 14 eine einmalige intraperitoneale Injektion von 10 nmol Substanz P (SP, grüne Pfeile). Die letzte Gruppe (**gelb**) wurde wie die Stressgruppe der Lärmquelle ausgesetzt, erhielt aber zusätzlich direkt vor und nach der Stressexposition jeweils 200 µg eines Substanz P – Rezeptorantagonist (anti-NK1, gelbe Blockpfeile) intraperitoneal. An Tag 5 für das Anagen bzw. Tag 16 für das Katagen nach Depilation wurden die Tiere getötet. Dann erfolgte die Entnahme von ca. 10cm² Rückenhaut und die Aufbereitung des Gewebes wie unter 3.4 beschrieben.

3.4 Gewebeaufbereitung

An Tag fünf bzw. 16 nach Depilation wurden die Tiere durch zervikale Dislokation für die Immunhistochemie getötet. Für die Molekularbiologie erfolgte dies 48 h nach Beginn der Stressexposition. Die Entnahme der Haut am Rücken geschah am getöteten Tier. Es wurde eine geschlossene Schere kurz über dem Schwanz inseriert und subkutan nacktenwärts vorgeschoben. Die gespreizte Schere wurde zurückgezogen, um die Haut zu lösen. Die so gelöste ca. 10 cm² Haut, wurde entnommen und ein Streifen von 1 cm Breite und 3 cm Länge in Nacken-Schwanz-Längsrichtung, parallel zur Wirbelsäule präpariert. Der Hautstreifen wurde in Längsrichtung gefaltet und in einem Tropfen OCT Tissue Tek Einbettmedium (VWR International, Darmstadt, Deutschland) in flüssigem Stickstoff schock gefroren [84]. So aufbereitetes Gewebe ist für immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen gleichermaßen nutzbar.

3.5 Histochemie

Für die Analyse des Haarzyklusstadiums wurden 8 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Das Haarzyklusstadium wurde nach bekannten etablierten Methoden für murines Gewebe analysiert, hierzu erfolgte der Nachweis der Alkalischen Phosphatase im Gewebe [18]. Die Schnitte wurden 10 Minuten bei -20°C Aceton-fixiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur mit frischem Neu-Fuchsin-Substrat inkubiert (tief-rote Färbung). Darauf folgte die Gegenfärbung mit Hämalaun (bläulich-violette Färbung). Dazwischen wurde mit Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) dreimal fünf Minuten gewaschen und zur mikroskopischen Auswertung unter einem Tropfen Kaiser's Glyceringelatine mit einem Deckgläschen bedeckt.

3.6 Immunhistochemie

3.6.1 Immunhistochemische Doppelfärbungen

In Anlehnung an bereits etablierte und veröffentlichte Protokolle wurden an 8 µm dicke Gefrierschnitte immunhistochemische Färbungen durchgeführt [6, 40]. Hierbei wurden

die Schnitte übernacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit den in Tabelle 1 gelisteten Antiseren inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit entsprechenden Sekundärantikörpern in der Verdünnung 1:200 für eine Stunde bei 37°C ebenfalls in einer feuchten Kammer. Die Sekundärantikörper waren entweder Tetramethylrhodamine-isothiocyanate (TRITC) oder Fluorescein-isothiocyanate (FITC)-konjugierte F(ab)₂ Fragmente aus Ziege oder Esel und richteten sich gegen IgG der Spezies des Primärantikörpers (TRITC-Ziege-anti-Kaninchen 111-026-045, FITC-Ziege-anti-Kaninchen 111-095-144 Jackson Immunoresearch, Dianova, Hamburg, Deutschland). Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die Schnitte in PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) mit pH 7,4 dreimal fünf Minuten gewaschen. Alle Sekundärantikörper wurden im entsprechenden Waschpuffer mit 2% Normalseren der Ursprungsspezies verdünnt.

Das Signal des Migrationsmarkers c-kit wurde mit einer Tyramidamplifikation verstärkt (Tyramidamplifikations-Kit, Renaissance TSA Direct (Red) NEN Life Science Products, Boston, MA, USA). Hierzu wurde bei aceton-fixierten Schnitten zunächst die endogene Peroxidase sowie unspezifische Avidin- und Biotinbindung geblockt und 30 Minuten mit TNB-Puffer inkubiert (in Kit enthalten). Es folgte die Übernachtinkubation mit c-kit-Antiserum 1:1000 in TNB. Der geeignete biotinilierte Sekundärantikörper (biotiniliertes Ziege-anti-Ratte IgG gegen IgG (H+L), 112-065-167 144 Jackson Immunoresearch, Dianova, Hamburg, Deutschland) wurde 1:200 in TNB 30 Minuten inkubiert. Darauf folgte die Inkubation mit Meerrettichperoxidase (im Kit enthalten) 1:100 in TNB für 30 Minuten. Die Färbung wurde mit TRITC 1:50 in Amplifikationsdiluent (im Kit enthalten) entwickelt. Zwischen den Färbeschritten wurden die Schnitte in TN (Tris-HCl, NaCl) Puffer mit pH 7,5 dreimal fünf Minuten gewaschen [6].

Die Zellkerne wurden jeweils abschließend mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gegengefärbt [93] und die Schnitte unter einem Tropfen Immu-Mount (9990402, Thermo Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) mit einem Deckgläschen bedeckt.

3.6.2 Verwendete Marker

Zur Darstellung differenzierter pigment-bildende Melanozyten im Anagen wie Katagen wurden Antikörper gegen Tyrosinase-related Protein-1 (TRP-1) gewählt. Mit diesem Marker wurden bereits in einer Vielzahl von Untersuchungen reife Melanozyten in den entsprechenden Haarzyklusstadien markiert [5, 6, 94].

Zur Identifizierung wenig differenzierter Melanozyten und melanozytärer Stammzellen dienten Antikörper gegen Tyrosinase-related Protein-2 (TRP-2 auch dopachrome Tautomerase (DCT) genannt). Hier ist ebenfalls eine Expression in den Melanozyten des Anagens, der Wandel der Expression im Verlauf der Haarzyklus [5, 6] sowie die Expression dieses Proteins durch melanozytäre Stammzellen [20, 61] belegt.

Migrationfähige Melanozyten exprimieren den Stammzellenfaktor-Rezeptor c-kit. Dies wurde zum einem während der Einwanderung in die Haut gezeigt [40] und zum anderen im frühen Anagen [5, 6] (Abbildung 2).

Tabelle 1: Liste der verwendete Primärantikörper mit Angabe der zugesetzten Normalseren (ZNS - Ziegennormalserum), Amplifikationsmethoden sowie Detergenzien zur besseren Passage der Zellmembran:

Antikörper gegen	Abkürzung	Charakteristika	Verdünnung mit Zusatz	generiert in	Hersteller
Tyrosinase-related Protein-1	TRP-1	Polyklonales Antiserum gegen ein synthetisches Peptid, das dem carboxyl-Terminus des murinen <i>brown locus</i> encoded protein (=TRP-1) entspricht. [94]	1:200 2% ZNS	Kaninchen	Dr. V. J. Hearing, Bethesda, Maryland, USA
Tyrosinase-related Protein-2	TRP-2	Polyklonales Antiserum gegen ein synthetisches Peptid, das dem carboxyl-Terminus des murinen <i>slaty locus</i> encoded protein (=TRP-2) entspricht. [6]	1:200 2% ZNS 0,3% Triton X 100	Kaninchen	Dr. V. J. Hearing, Bethesda, Maryland, USA
c-kit Rezeptor	c-kit (CD 117)	Monoklonaler Antikörper gegen einen transmembranen Tyrosinkinase Rezeptor, der von <i>dem dominant spotting locus</i> (CD 117) kodiert wird. [95]	1:1000 mit Tyramid-amplifikation	Ratte	Pharming, San Diego, Kalifornien, USA

3.6.3 Nachweis von Apoptose

Zum Nachweis apoptotischer Zellen wurde die TUNEL-Methode verwandt [96]. TUNEL steht für *TdT-mediated d-UTP nick end labeling*. Gelabelt werden hierbei die freien 3'-OH-DNA-Enden, die speziell bei Apoptose entstehen. Mit dem APODETECT Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit (APOD7411, Q-Biogene, Harefield, UK) wurden diese entsprechend den Angaben des Herstellers nachgewiesen.

8 µm dicke Gefrierschnitte wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur in 10%igem Formalin fixiert, dreimal fünf Minuten in PBS gewaschen und weitere 10 Minuten bei -20°C in Ethanol/Essigsäure postfixiert. An die freien 3'-OH-DNA-Enden wurden Digoxigenin-gelabelten Nukleotiden (Digoxigenin-dUTP) über die terminalen Deoxynucleotidyltransferase (TdT) gekoppelt. Anschließend wurde bei Doppelfärbung mit der immunologischen Methode dieser Teil wie unter 3.6.1 beschreiben durchgeführt. Im nächsten Schritt wurden mit einem grünen fluoreszenz-gelabelten (FICT) anti-digoxigenin-Antikörper die TUNEL-positive Zellen visualisiert. Eine Negativkontrolle wurde ohne TdT-Enzym mitgeführt. Die Zellkerne wurden ebenso mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gegengefärbt und die Schnitte unter einem Tropfen Immu-Mount mit einem Deckgläschen bedeckt.

In alle Untersuchungsgruppen konnten zwischen perfusionsfixiertem und nicht-perfusionsfixiertem Gewebe keine Unterschiede in der Immunhistochemie oder anderen angewendeten Färbetechniken festgestellt werden. Somit können alle Tiere einer Untersuchungsgruppe pro Zeitpunkt zusammenfasst betrachtet. Tabelle 2 zeigt eine Zusammenfassung über alle durchgeführten Färbungen.

Tabelle 2: Übersicht über die durchgeführten Färbungen. Angegeben sind alle histochemischen und immunhistochemischen Einfach- und Doppelfärbungen der verschiedenen Versuchsansätze:

Versuchsansatz		
Färbung	frühes Anagen 3.3	Anagen-Katagen-Übergang 3.3
Alkalische Phosphatase: für die Ermittlung des Haarzyklusstadiums 3.5	X	X
TUNEL und TRP-1: für Apoptose und reife Melanozyten 3.6.1, 3.6.2, 3.6.3	X	X
c-kit und TRP-2: für Migration und undifferenzierte Melanozyten 3.6.1, 3.6.2,	X	

3.7 Photodokumentation und Statistik

Alle histochemischen Färbungen wurden bei 400-facher Vergrößerung an einem Zeiss Axiophot Licht Mikroskop ausgewertet und mit der Axiocam HRc (Zeiss, Göttingen, Deutschland) photodokumentiert. Die immunhistochemischen Fluoreszenzfärbungen wurden ebenfalls bei 400-facher Vergrößerung an einem Zeiss Axioplan Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Göttingen, Deutschland) ausgewertet und mit einer RT slider Spot Kamera (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, Michigan, USA) photodokumentiert.

Da bei einer Gruppengröße von vier bis sechs Tieren pro Gruppe ist nicht von einer Normalverteilung auszugehen ist, obgleich die zu erwartende Streuung der Daten aufgrund der Nutzung von Inzuchtstämmen als gering einzuschätzen ist, werden die gesammelten Daten statistisch mit den Mann-Whitney-U – Test analysiert. Dieser Test eignet sich für unabhängige Gruppen mit nicht-parametrischen Daten ohne

Normalverteilung. Die Unterschiede wurden als signifikant gewertet, wenn der p-Wert $<0,05$ (*) bzw. $<0,001$ (**) war.

3.8 RNA Präparation für Microarray Analysen

Zur Untersuchung der an der Stressreaktion in der Haut beteiligten Signalwege, wurde aus der Rückenhaut von jeweils drei Mäusen aus Kontroll- und Stressgruppe RNA isoliert.

3.8.1 RNA Isolation

Die Haut wurde wie oben beschrieben direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff tief gefroren. Aus ca. 200 mg Gewebe wurde mit einem Phenol/Chloroform Protokoll die gesamte zelluläre RNA isoliert. Hierzu wurden von dem gefrorenen Gewebe 20 μm dicke Schnitte angefertigt. In dem so zerkleinerten Gewebe wurde mit 1 ml Trizol (Trizol Reagent, 15596-026, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) die RNA erschlossen. Die Phasenseparation erfolgte nach Zusatz von 0,2 ml Chloroform durch 2-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und 15-minütiger Zentrifugation in einer vorgekühlten (4°C) Zentrifuge bei 10.000 rpm. Die wässrige, die RNA-enhaltende Phase wurde abgenommen und zu gleichen Teilen mit 70% Ethanol versetzt. Das Gemisch wurde anschließend durch Zentrifugation (eine Minute bei 10.000 rpm) auf eine Säule übertragen.

Für die Säulenaufreinigung wurden RNeasy Säulen inklusive DNA Verdau (RNeasy Mini Kit, 74104; Qiagen, Valencia, Kalifornien, USA) nach Angaben des Herstellers verwandt. Nach einem Waschschrift erfolgte der DNA-Verdau auf der Säule (RNase-Free DNase Set, 79254; Qiagen, Valencia, Kalifornien, USA) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach fünf weiteren Waschschriften (350-500 μl) mit im Kit enthaltenen Pufferlösungen, gefolgt von einminütiger Zentrifugation bei 10.000 rpm, wurde die so aufgereinigte RNA mit 40 μl RNase-freiem Wasser 5 Minuten auf Eis eluiert und eine Minuten bei 15.000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde erneut auf die Säule gegeben und nochmals zentrifugiert.

Die Qualitätskontrolle erfolgte spektrophotometrisch (SmartSpec™ 3000 Spectrophotometer, BioRad, Hempstead, Großbritannien).

3.8.2 Amplifikation, Labeling und Hybridisierung

Die Isolate von drei Mäusen wurden gepoolt und 90 ng RNA für zwei Runden einer RNA-Amplifikation mit RiboAmp RNA Amplification Kit (KIT0201, Arcturus, Sunnyvale, Kalifornien, USA) genutzt. Anschließend wurde biotin-gelabelte antisenseRNA hergestellt unter Verwendung des BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kit (42655-10, ENZO Diagnostics, Farmingdale, New York, USA). 10 µg gelabelte antisenseRNA wurde mit dem *Mouse Genome 430A 2.0* (900498, Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien, USA) hybridisiert. Dieser Genchip enthält ca. 14.000 gründlich annotierte Vertreter des Mausgenoms, welche von ca. 22.600 *probe sets*^{Glossar} repräsentiert werden. Die Hybridisierung wurde von der *Microarray Core Facility* der Universität Boston (Boston University School of Medicine, Department of Genetics & Genomics, Microarray Resource, 715 Albany St. Boston, Massachusetts 02118, USA) gemäß Affymetrix Standard Protokollen durchgeführt.

3.9 Microarray Auswertung

3.9.1 Analyse der Microarray Daten

Die Rohdaten wurden mit *Affymetrix® Microarray Suite* (MAS) 5.0 und *Operating Software GCOS 1.4* normalisiert und quantifiziert. Differentiell exprimierte Gene mussten in mindestens einer Untersuchungsgruppe exprimiert sein, d. h. die Bedingung einer minimalen Signalintensität von 300 aufweisen, einen positiven *present call*^{Glossar} besitzen (Affymetrixmethode in der die spezifische Bindung über 11 so genannte *perfect match* und 11 *mismatch* Sonden untersucht wird) und der Unterschied in der Expression mindestens dem Zweifachen entsprechen. D.h. ein Gen wurde als differentiell exprimiert angesehen, wenn es mindestens doppelt so hoch reguliert war, wie in der Kontrolle, oder aber in seiner Expression halbiert, also runterreguliert wurde.

3.9.2 Annotation

Die Annotation der Gene weist den Gensonden des *Mouse Genome 430A 2.0* Chips die bis dato zu ihnen bekannten Informationen zu. Sie umfasst zum Beispiel ein international einheitliches Gensymbol, den ausführlichen Gennamen, die *Entrez Gene ID*^{Glossar} Nummer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), sowie die chromosomale Lokalisation, beteiligte Signalwege und die *Gene Ontology* Terminologie bezüglich biologischer Prozesse, molekularer Funktion und zellulären Kompartiment. In dieser Arbeit erfolgte sie mit dem web-basierten *NetAFFX*^{Glossar} *analysis center*

(<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>). Diese Datenbank ist speziell auf die von Affymetrix verwendeten Gensonden ausgerichtet und wird in ca. zehnmütigen Abständen aktualisiert.

Auf den Chips sind auch Gensonden vertreten, die in ihrer Funktion bisher unbekannt sind. Für sie existieren nur wenige oder keine Annotationen. Das heißt nicht alle Gene eines Chips sind annotiert. Der in dieser Arbeit verwandte *Mouse Genome 430A 2.0* Chip enthält ca. 14.000 gut erforschten Gene.

3.9.3 Pigmentierungs-relevante Gene

Öffentlich zugängliche Annotationen wie die von *NetAFFX* oder *Entrez Gene* beinhalten vor allem sehr gut und seit langem erforschte Gene und die ihnen zugeordneten Proteine mit deren biologischen Funktionen. Bezüglich der Melanogenese und der Melanozytenbiologie werden hier leider den neuen autokrin und parakrin, sowie lokal und systemisch wirkenden Faktoren wenig Beachtung geschenkt. Die melanozytenspezifischen Annotationen gehen häufig nicht über tradiertes Wissen hinaus. Zu diesen neueren Faktoren gehören beispielsweise Wachstumsfaktoren, Zytokine und deren Rezeptoren oder Apoptoseinhibitoren. Um eine möglichst vollständige und aktuelle Abfrage aller Faktoren in dem entstandenen Array durchzuführen, wurde eine separate Liste auf Basis der über *pubmed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) erhältlich Literatur unter Nutzung der Schlagworte *melanocyte*, *melanogenesis*, *pigmentation*, *autocrin*, *paracrin*, *receptor*, *cytokine*, *growth factor*, *apoptosis*, *proliferation*, *differentiation* und *gene* erstellt.

Diese Liste enthält 251 melanozyten- und pigmentierungsrelevanter Gene. Von diesen sind 222 auf dem Chip von 377 verschiedene *probe sets* repräsentiert. Dieser Unterschied kommt dadurch zustande, dass ein Gen von mehreren unterschiedlichen *probe sets* repräsentiert werden kann.

3.9.4 Pathway Analyse

Um nach Signalwegen zu suchen, die durch die Stressbehandlung beeinflusst werden, wurde die Anreicherung differentiell exprimierter Gene in bereits bekannte Signalwege untersucht. Hierzu wurden diese Gene mit Hilfe von *DAVID^{Glossar} Bioinformatics Resources* (National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) analysiert und das so genannte *pathway enrichment^{Glossar}* mit dem modifizierten *Fisher's exact test* (EASE) analysiert [97, 98].

Eine solche Analyse dient der Identifikation der durch den Stress möglicherweise veränderten biochemischen und metabolischen Prozesse, die der Betrachtung der bloßen Kumulation hoch- und runterregulierter Gene verschlossen bleiben.

In dieser Arbeit wurde eine differentielle Mindestexpression der Gene um das Zweifache gewählt. Alle differentiell exprimierten Gene die hoch- oder runterreguliert waren, wurden in die Online-Abfrage eingeschlossen, da für die Aktivität eines Signalweges verschieden Elemente, sprich Gene und ihre Produkte unterschiedlich reguliert sein können oder müssen.

4 Ergebnisse

4.1 Stress und Melanozyten während der Etablierung der pigmentbildenden Einheit

Gesteigerte Melanozytenzahl in der Nische der Vorläuferzellen unter Stress und Substanz P im frühen Anagen

Unter Verwendung von TRP-1 in Kombination mit dem Apoptosenachweis TUNEL ergab die vergleichende Betrachtung, dass die Zahl der apoptotischen nicht-melanozytären Zellen in der pigment-bildenden Einheit des Haarfollikelbulbus' im frühen Anagen unter dem Einfluss von Stress und Substanz P (SP) ansteigt ($p=0,063$ bzw. $p=0,016$). Diese trifft für die Melanozyten in der SP-Gruppe ebenfalls zu ($p=0,063$), bleibt in den anderen Versuchsgruppen jedoch nicht signifikant (Abbildung 7, Abbildung 8, Abbildung 9). Dieser Stress-Effekt ist in der mit anti-NK1-Antikörpern behandelten Gruppe nicht zu beobachten. Dabei bleibt die Gesamtzahl der nicht-apoptotischen Melanozyten nahezu konstant, lediglich in der anti-NK1-Gruppe sind weniger Melanozyten vorhanden. Die apoptotischen Ereignisse beeinflussen also nicht die absolute Melanozytenzahl, die Blockade der SP-Signaltransduktion jedoch reduziert die absolute Zahl.



Abbildung 7: Apoptotische nicht-melanozytäre Zellen in Haarfollikelbulben des frühen Anagens.

Die Graphen zeigen den prozentualen Anteil an Haarfollikeln die apoptotische Zellen enthalten. In Follikel der Kontrollgruppe gab es keine apoptotischen Zellen. In der Stress- und SP-Gruppe waren in 18% bzw. 58% der Haarfollikel apoptotische nicht-melanozytäre Zellen zu finden. In der SP-Gruppe ist dieser Anstieg signifikant ($p=0.016$) Der p-Wert für die Stressgruppe liegt mit 0,63 nur knapp über der Signifikanzgrenze. (Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Gruppen: $p<0,05 = \star$)

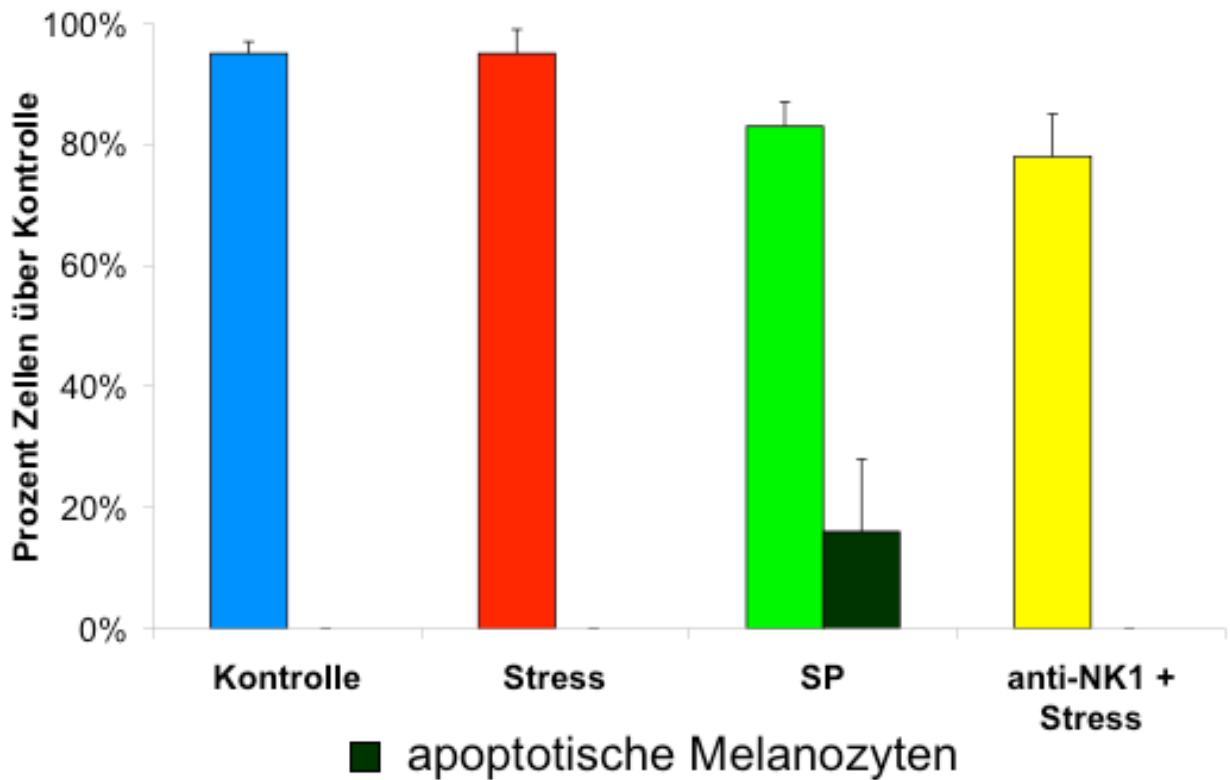


Abbildung 8: Melanozyten in Haarfollikelbulben des frühen Anagens. Die Graphen zeigen den prozentualen Anteil an Haarfollikeln die Melanozyten beherbergen. Die durchschnittliche Anzahl der Melanozyten pro Follikel unterscheiden sich zwischen den Gruppe nicht signifikant. Auffällig ist allerdings das auftreten apoptotischer Melanozyten in der mit SP behandelten Gruppe ($p=0,063$) (Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Gruppen).

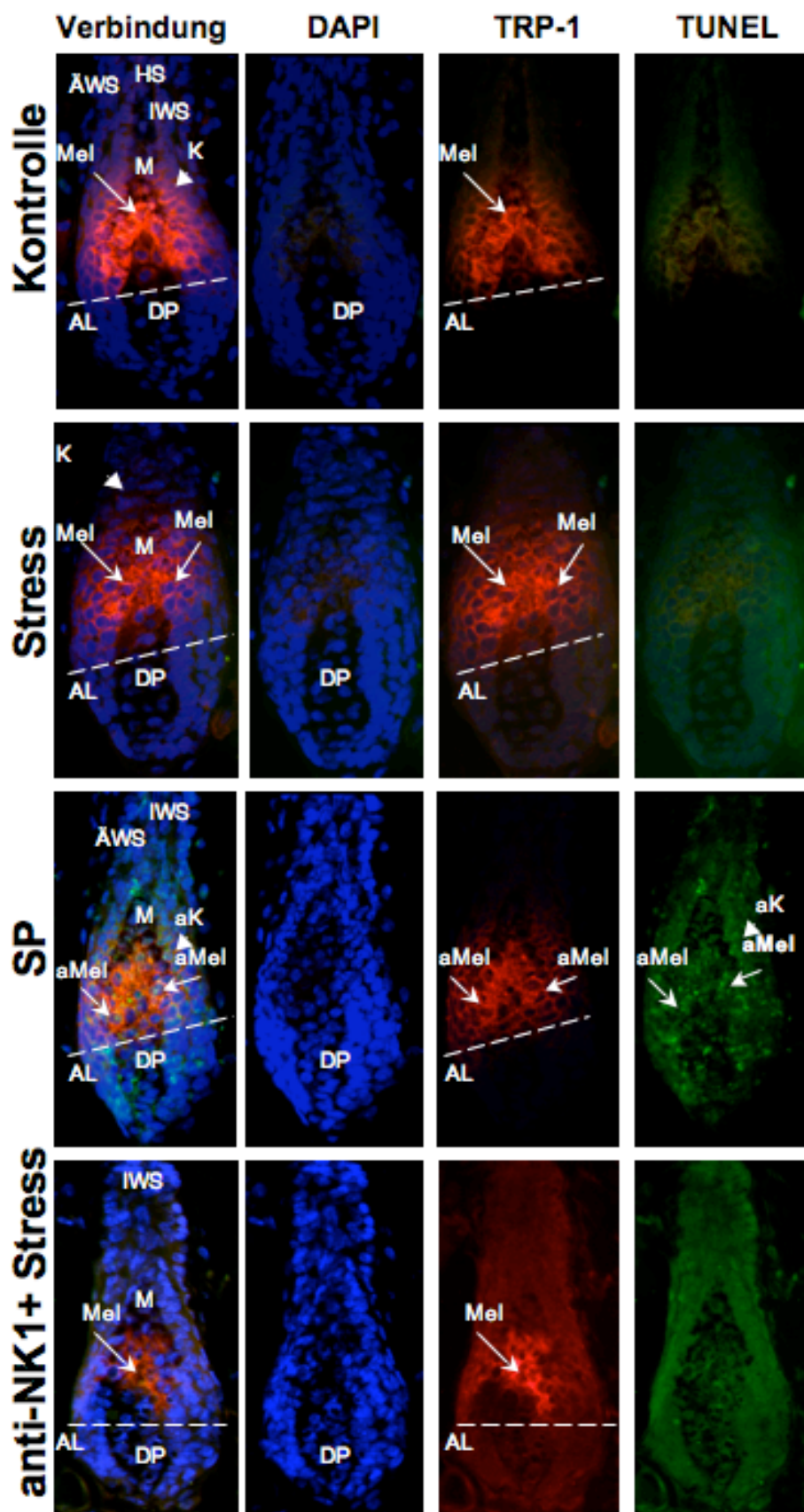


Abbildung 9: Haarfollikelbulben des frühen Anagens mit vitalen und apoptotischen Melanozyten.

Die Abbildung zeigt Immunfluoreszenzfärbungen muriner Haarbulben der verschiedenen Untersuchungsgruppen. Blau (DAPI) färbt die Zellkerne aller Zellen. Die rote Fluoreszenz markiert Melanosomen, die pigment-bildenden Organellen der Melanozyten. Ein Zellkern umgeben von roter Fluoreszenz definiert damit einen Melanozyten. In grün ist der Apoptosenachweis dargestellt. Hier werden DNA-Bruchstellen grün angefärbt. Grüne Punkte in einem Zellkern markieren somit eine apoptotische Zelle. In der Matrix (M) befindet sich die pigment-bildende Einheit der Melanozyten (Mel) und Keratinozyten (K) eine funktionelle Einheit zur Haarschaft- und Pigmentproduktion bilden. Zu sehen sind in dieser Region Melanozyten (Pfeile) und Keratinozyten (Pfeilköpfe). In Haarfollikeln der SP-Gruppe sind apoptotische Keratinozyten und Melanozyten zu sehen. Die Apoptose beider Zellarten war in dieser Gruppe erhöht ($p=0,016$ Keratinozyten und $p=0,063$ Melanozyten). Abkürzungen: ÄWS - äußere Wurzelscheide; IWS - innere Wurzelscheide; HS - Haarschaft; DP - dermale Papille; AL - Auber' sche Linie; M - Matrix; Mel - Melanozyt; aMel - apoptotischer Melanozyt; K - Keratinozyt; aK - apoptotischer Keratinozyt.

Mit der Doppelmarkierung von wenig differenzierte Melanozyten mit TRP-2 und dem Migrationsmarker c-kit, wurde daraufhin die äußeren Wurzelscheide der Haarfollikel auf Melanozyten untersucht, die mutmaßlich aus der Stammzellregion in der Isthmus- und Wulstregion stammen (Abbildung 2). Hier zeigte sich, dass die Anzahl der nicht-melanozytären c-kit-positiven Zellen in dieser Region durch die verschiedenen Behandlungen unbeeinflusst bleibt (Abbildung 10). Bei den Melanozyten hingegen fanden sich in der Stress- und SP-Gruppe signifikant mehr Zellen, die für den Migrationsmarker c-kit-positiv waren (c-kit+) ($p=0,016$ Stress; $p=0,016$ SP) (Abbildung 10, Abbildung 11). In der anti-NK1-Gruppe ist dieser Anstieg nicht in diesem Ausmaß zu beobachten ($p=0,343$), er erscheint allerdings durch die Rezeptorblockade nicht vollständig inhibiert zu werden. Melanozyten die c-kit negativ waren, waren praktisch nicht vorhanden.

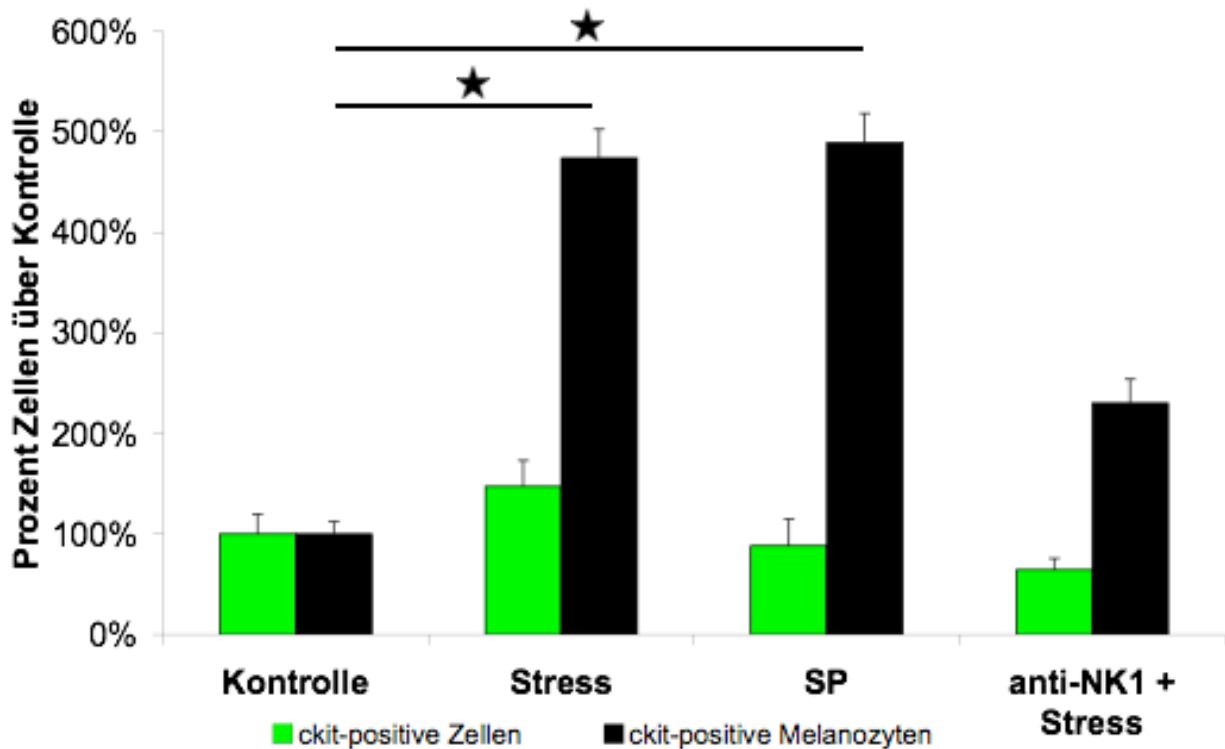


Abbildung 10: C-kit-positive nicht-melanozytäre Zellen und c-kit-positive/TRP2-positive Melanozyten in der äußeren Wurzelscheide von Haarfollikeln im frühen Anagen. Die Graphen zeigen die Zellzahl in Prozent in Relation zur Kontrolle (100%). Die Anzahl der c-kit-positiven nicht-melanozytären Zellen, in der äußeren Wurzelscheide zwischen Isthmus- und Wulstregion und Bulbus, bei denen es sich überwiegend um Keratinozyten handelt, bleibt im Rahmen einiger Schwankungen nahezu konstant. Bei den c-kit-positiven/TRP2-positiven Melanozyten hingegen finden sich in der Stress- und SP-Gruppe signifikant mehr Melanozyten als in der Kontrolle ($p=0,016$ Stress; $p=0,016$ SP). In der anti-NK1-Gruppe ist dieser Effekt nicht in diesem Maße zu beobachten. (Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Gruppen: $p<0,05 = \star$).

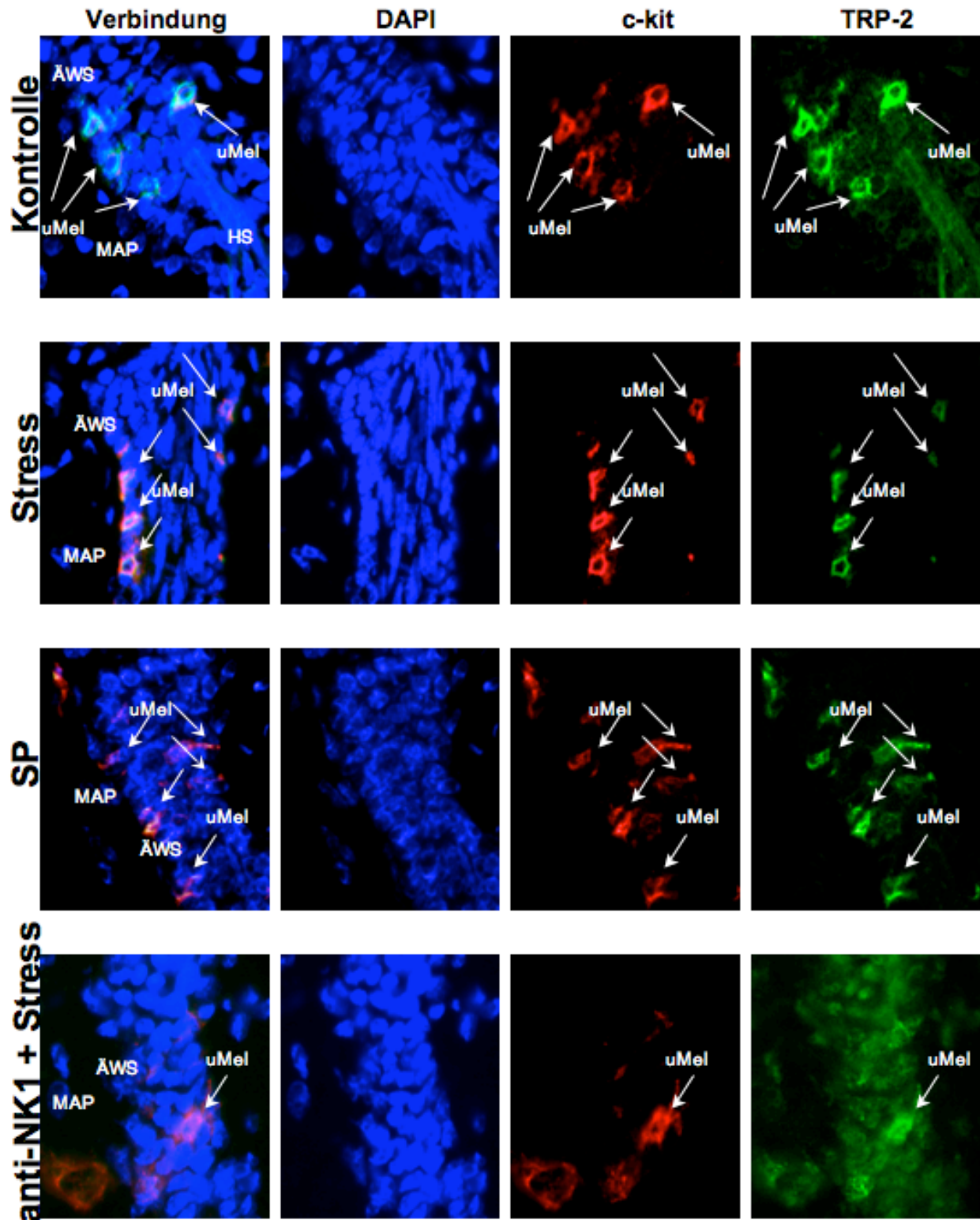


Abbildung 11: Die äußere Wurzelscheide zwischen Isthmus- und Wulstregion und Haarfollikelbulbus im frühen Anagen. Die Abbildung zeigt Immunfluoreszenzfärbungen muriner Haarfollikel der verschiedenen Untersuchungsgruppen. Blau (DAPI) färbt die Zellkerne aller Zellen. In diesem Fall markiert die grüne Fluoreszenz Melanosomen, die pigment-bildenden Organellen den

Melanozyten. Ein Zellkern umgeben von grüner Fluoreszenz definiert damit einen Melanozyten. In rot ist der Migrationsmarker c-kit dargestellt. Hierbei handelt es sich um einen Rezeptor der auf der Zellmembran angefärbt wird. Ein von roter Fluoreszenz umgebener Zellkern markiert somit eine migrierende Zelle. Melanozyten sind in dieser Region mit Pfeilen markiert. In Haarfollikeln der Stress- und SP-Gruppe sind deutlich mehr doppelt positive Zellen (c-kit positive Melanozyten) zu erkennen ($p=0,016$ Stress; $p=0,016$ SP). Abkürzungen: ÄWS - äußere Wurzelscheide; HS – Haarschaft; MAP – Musculus arrector pili; uMel – undifferenzierter Melanozyt.

Um zu prüfen, ob die beobachteten Veränderungen in der Zahl der Zellen auf einen veränderten Haarzyklus unter Stress in der frühen Wachstumsphase zurückzuführen ist, wurde eine Haarzyklusanalyse durchgeführt. Diese ergab, dass nur die anti-NK1-Gruppe signifikant im Haarzyklus zurückbleibt ($p=0,016$) (Abbildung 12).

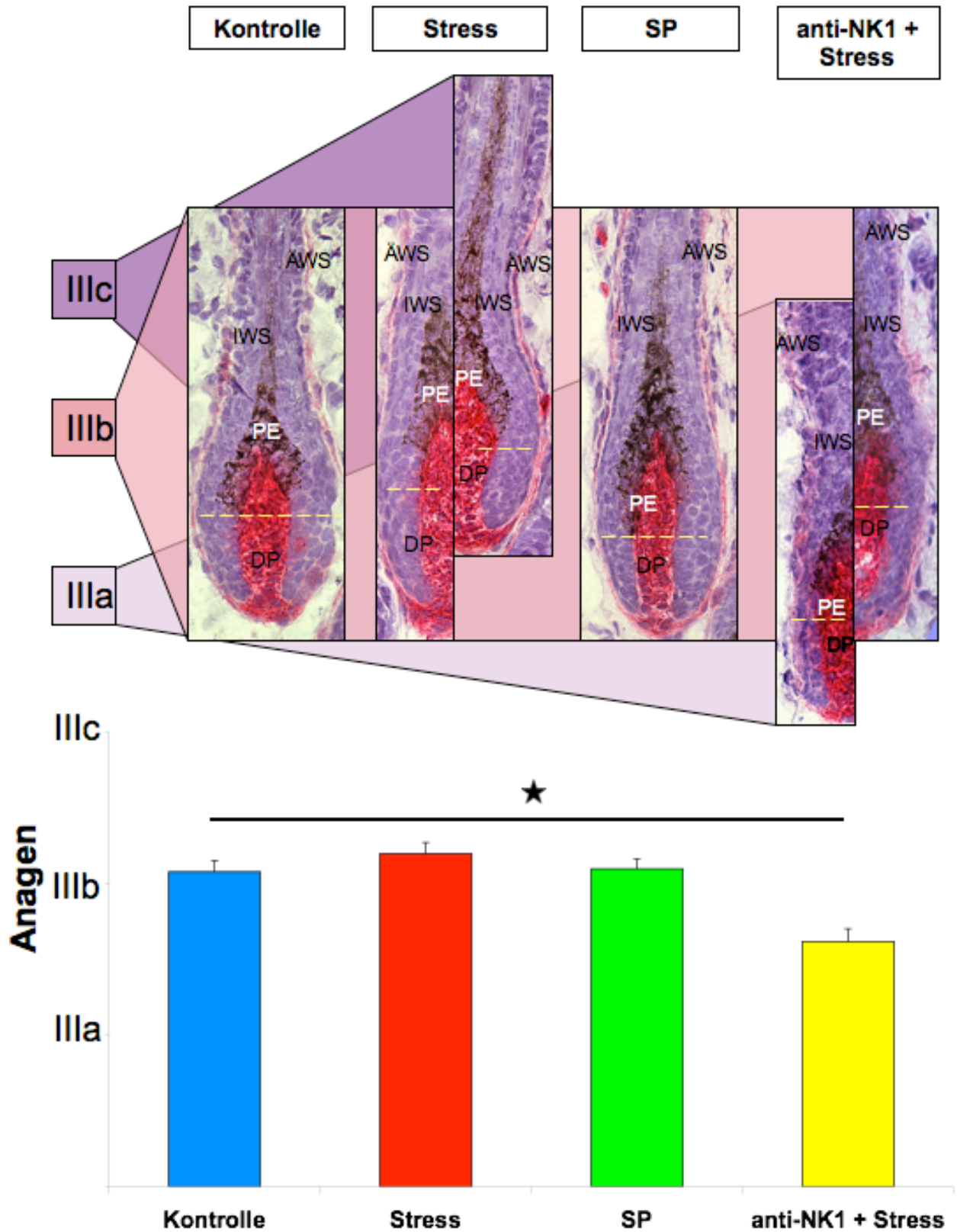


Abbildung 12: Visualisierung und Differenzierung der Haarzyklusstadien mittels Färbung der alkalischen Phosphatase von Haarfollikelbulben im frühen Anagen. Die Abbildung zeigt zur Illustration der statistischen Ergebnisse exemplarisch Haarfollikelbulben jeder Untersuchungsgruppen. Anagen IIIa zeichnet sich durch beginnende Pigmentbildung aus, wohingegen im Anagen IIIb diese

bereits deutlich und kappenartig ist. Im Anagen IIIc ist die Haarschaftproduktion schon fortgeschritten, der Haarschaft befindet sich noch unterhalb der Talgdrüsenmündung (nicht im Bild) [18]. Die Follikel der anti-NK1-Gruppe bleiben in der Haarzyklus-Progression zurück. Die Graphen zeigen den mittleren Haarzyklus der Haarfollikel der jeweiligen Untersuchungsgruppen. Die meisten Haarfollikel aller Gruppen befanden sich im Anagen 3b. Nur in der anti-NK1-Gruppe ist der Haarzyklus verzögert ($p=0,016$) (Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Gruppen: $p<0,05 = \star$). Abkürzungen: ÄWS - äußere Wurzelscheide; IWS - innere Wurzelscheide; DP – dermale Papille; PE- pigment-bildende Einheit.

4.2 Stress und Melanozyten am Übergang zur Haarfollikelregression

Vermehrte Melanozytenapoptose unter Stress und Substanz P in der pigment-bildenden Einheit im Anagen-Katagen-Übergang

Im Übergang vom Anagen (Proliferationsphase) zum Katagen (Repressionsphase) des Haarfollikels fallen ausdifferenzierten Melanozyten der Apoptose zum Opfer. In der Vergangenheit konnten wir beobachten, dass Stress den Übergang aus dem Anagen in das Katagen beschleunigt und dieser Vorgang mit einem vermehrten Absterben von Zellen im Haarfollikelepithel einhergeht. Um einen möglichen Einfluss von Stress und SP auf Melanozytenapoptose im etablierten Haarfollikel zu untersuchen wurden hier Melanozyten wiederum mit TRP-1 markiert und die Zellkerne mit der TUNEL-Methode auf Apoptose untersucht. Es zeigte sich, dass die Apoptose unter den Melanozyten in der Stress- und SP-Gruppe deutlich erhöht ist, hingegen nicht in der anti-NK1-Gruppe (Abbildung 13, Abbildung 14). Jedoch sind diese Unterschiede in der Zellzahl nicht signifikant ($p=0,146$ Stress; $p=0,101$ SP; $p=0,279$ anti-NK1). Diese apoptotischen Melanozyten befinden sich oberhalb der pigment-bildenden Einheit am Übergang zum Haarschaft. Es erscheint so, als ob sich die abgestorbenen Melanozyten aus der pigment-bildenden Einheit lösen und später mit den ausdifferenzierenden Keratinozyten über den Haarschaft ausgeschieden werden.

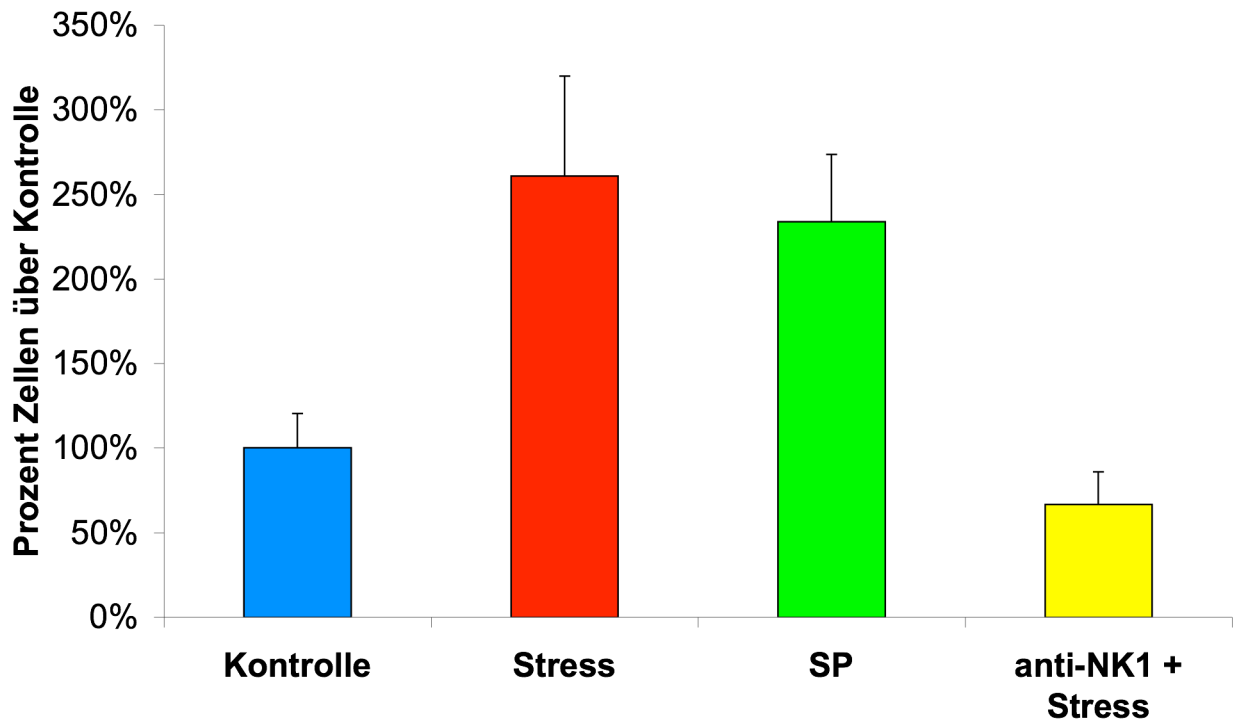


Abbildung 13: Apoptotische Melanozyten in Haarfollikelbulben zum Anagen-Katagen-Übergangs. Die Graphen zeigen den prozentualen Anteil an Haarfollikeln die apoptotische Melanozyten beherbergen. In der Stress- und SP-Gruppe fanden sich mehr als doppelt so viele Haarfollikel mit apoptotischen Melanozyten (Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Gruppen: $p=0,146$ Stress; $p=0,101$ SP; $p=0,279$ anti-NK1).

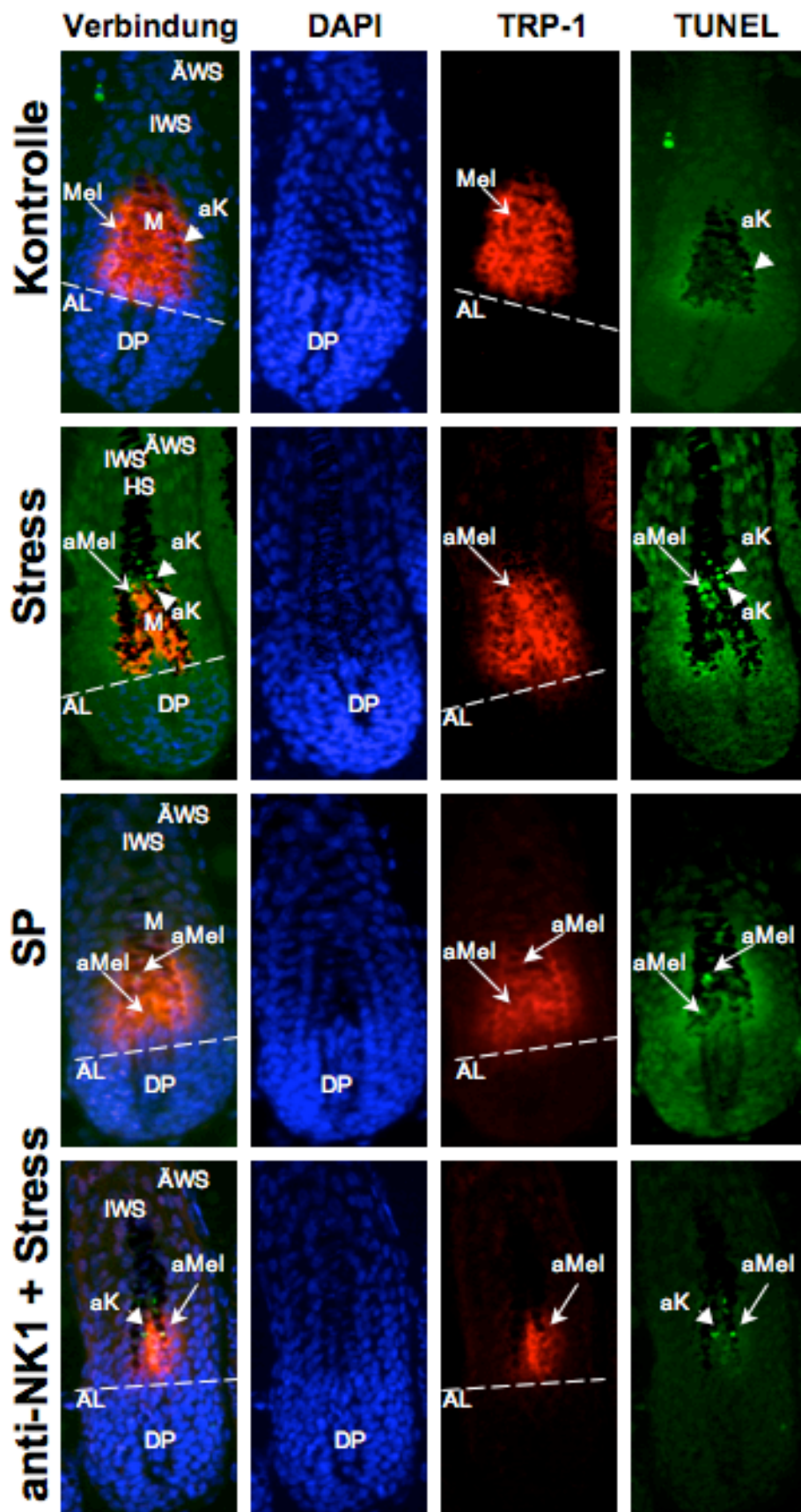


Abbildung 14: Apoptotische Melanozyten zum Zeitpunkt des Anagen-Katagen-Übergangs. Die Abbildungen zeigen Immunfluoreszenzfärbungen muriner Haarbulben der verschiedenen Untersuchungsgruppen. Blau (DAPI) färbt die Zellkerne aller Zellen. Die rote Fluoreszenz markiert Melanosomen, die pigment-bildenden Organellen der Melanozyten. Ein Zellkern umgeben von roter Fluoreszenz definiert damit einen Melanozyten. In grün ist der Apoptosenachweis dargestellt. Hier werden DNA-Bruchstellen grün angefärbt. Grüne Punkte in einem Zellkern markieren somit eine apoptotische Zelle. Zu diesem Zeitpunkt im Haarzyklus erlischt die Pigmentbildung und die Melanozyten der pigment-bildende Einheit gehen in die Apoptose. Melanozyten sind mit Pfeilen und Keratinozyten mit Pfeilköpfen gekennzeichnet. In Haarfollikeln der Stress- und SP-Gruppe sind mehr apoptotische Melanozyten zu sehen als in der Kontrolle oder in der anti-NK1-Gruppe ($p=0,146$ Stress; $p=0,101$ SP; $p=0,279$ anti-NK1). Abkürzungen: ÄWS - äußere Wurzelscheide; IWS - innere Wurzelscheide; HS - Haarschaft; DP - dermale Papille; AL - Auber'sche Linie; M - Matrix; Mel - Melanozyt; aMel - apoptotischer Melanozyt; K - Keratinozyt; aK - apoptotischer Keratinozyt.

4.3 Stress-bedingte Veränderungen auf Transkriptionsebene

4.3.1 Melanozyten-relevante Gene werden reguliert

Von den 14.000 Genen auf dem *Mouse Genome 430A 2.0* Chip waren durch die 24-stündige Stressbehandlung 3098 Gensignale, so genannte *probe sets*^{Glossar} bestehend aus 25 Nukleotiden, in der definierten Weise (Signalintensität mindestens 300, *present call*^{Glossar} in einer der Gruppen) detektiert. Davon waren 415 *probe sets* mindestens zweifach schwächer exprimiert als die entsprechenden *probe sets* der Kontrolle und sind damit runterreguliert. 267 *probe sets* sind doppelt so stark exprimiert wie die der Kontrolle und sind damit hochreguliert. Von diesen waren 369 bzw. 224 *probe sets* eindeutig einem Gen zuzuordnen. Das bedeutet, dass alle *probe sets* die potenziell kreuzreagible mit anderem Genen oder solche die nur mit funktionellen Sequenzen von Genen reagieren aus der Analyse ausgeschlossen wurden. Somit wurden nur *probe sets* in die Analyse eingeschlossen, die eindeutig einem Gen zugeordnet werden konnten.

Unter den 369 runterreguliert und 224 hochregulierten Genen des Vollhautisolats fanden sich neun Vertreter der melanozyten- und pigmentierungsrelevanten Genliste (3.9.3). Hier finden sich Gene die für die Proliferation (*Dpep1*), die Migration (*Ednrb*, *Dpep1*), die Melanogenese (*Ap3d1*, *Ltb4dh*, *Tyrp1*), das Überleben (*Sod3*, *Birc2*) die Apoptose (*Tgfb2*) und die Seneszenz (*Glb1*) von Melanozyten von Bedeutung sind.

Das folgende Szenario soll die mögliche Bedeutung und Funktion der einzelnen Gene zueinander in Beziehung setzen. Tabelle 3 fasst die Regulierung und bisher bekannte pigmentierungs-relevante Funktionen zusammen.

Im ruhenden Telogenmilieu könnte die Hochregulierung von *Dpep1*, *Ednrb*, *Ap3d1* und *Sod3* die Population der neuen ausdifferenzierenden melanozytären Vorstufen widerspiegeln. Diese sind vermehrt nach Stressexposition zu finden (4.1). Ihre Proliferation und Migration würden durch vermehrte Expression von *Dpep1* bzw. *Ednrb* positiv beeinflusst. Die Hochregulierung von *Ap3d1* ergänzte den melanozytären Reifungsprozess. Es ist für die regelrechte Ausstattung der Melanosomen mit den für die Melanogenese essentiellen Enzym Tyrosinase zuständig (1.3). *Sod3* konnte im Tierversuch UVA-induziertes Haarergrauen verhindern. Es wirkt so den Schäden durch UVA-induzierten oxidativen Stress entgegen [57, 99].

Auf der anderen Seite zeugte eine Erhöhung der *Glb1* von stattgehabten

Alterungsprozessen. Glb1 ist in alternden Melanozyten vermehrt exprimiert [100, 101]. Ein erhöhtes TGF β 2 wirkt sich gegebenenfalls negativ auf das Überleben der Melanozyten aus [102, 103]. Seneszente oder sterbende Melanozyten wiederum exprimierten dann vielleicht auch weniger an melanogenetischen Enzymen wie Tyrp1 und in reduziertem Maße Apoptoseinhibitoren wie Birc2 [104].

Zusätzlich scheint das „gestresste“ veränderte Milieu den Melanozyten auch parakrine und tyrosinase-supportive Faktoren wie Leukotrien B4 zu entziehen, wenn dessen Synthese durch Runterregulierung von Ltb4dh abnimmt [105, 106].

Von in der Immunhistologie verwendeten Epitopen (Tabelle 1) findet sich lediglich das Tyrosinase-related Protein-1 (auch TRP-1 oder Tyrp1) unter den regulierten *probe sets*. Dies kann auf die im Vergleich zur Gesamtzellzahl der Haut geringe Anzahl der Melanozyten zurückzuführen sein. Dadurch werden auch im Verhältnis weniger melanozytenspezifischer Epitope erfasst, da ihr Signal vermutlich stark verdünnt wird. Umso erstaunlicher, dass Tyrp1 hier reguliert erscheint.

Tabelle 3 Liste der melanozyten- und pigmentierungsrelevanter Gene, die durch eine 24-stündige Stressbehandlung in Telogenhaut reguliert wurden. Jedes Gen wird international mit einem Symbol abgekürzt und ist in der Datenbank des National Institutes of Health der USA (über PubMed) mit einer Nummer (*Entrez ID*) katalogisiert. Der *Fold Change* (FC) gibt das Vielfache der differentiellen Expression an. Der FC beträgt mindestens zwei. (↑ -hoch- bzw. ↓ -runterreguliert)

Gen-symbol	Genname	Entrez ID	FC	Biologische Bedeutung für Melanozyten
Ap3d1	adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit	11776	3,049 ↑	Dieses Protein sorgt für den regelrechten Transport der Tyrosinase in die Melanosomen und ist somit unerlässlich zur Melanogenese [107]. Mutation im Ap3d1-Gen führen zu Pigmentverlust in Haar und Auge [108].
Sod3	superoxide dismutase 3, extracellular	20657	2,445 ↑	Tiere deren Haut mit Superoxiddismutase behandelt wurde, ergrauten nicht unter den Einfluss von UVA-Strahlung [109].
Ednrb	endothelin receptor type B	13618	2,165 ↑	Der Endothelin B-Rezeptor ist von herausragender Bedeutung für das Auswandern der Melanoblasten aus der Neuralleiste in die Haut. Bei genetischen Defekten kommt es z.B. bei Morbus Hirschsprung, neben der ausbleibenden Formation des enteralen Nervenplexus zu Pigmentstörungen [110, 111].
Glb1	Galactosidase, beta 1	12091	2,132 ↑	Eine erhöhte Aktivität der beta-Galaktosidase ist ein Marker für Seneszenz [101]. Diese konnte in ausdifferenzierten, damit seneszenten Melanozyten nachgewiesen werden [100, 112].
Tgfb2	transforming growth factor, beta 2	21808	2,053 ↑	TGF- β und im Speziellen auch TGF- β 2 hemmt das Wachstum von Melanozyten [103] [102]. Darüber hinaus ist TGF- β als Katageninduktor bekannt [113, 114].
Dpep1	dipeptidase 1 (renal)	13479	2,028 ↑	Die Dipeptidasen sind an der Synthese und Umwandlung der Leukotriene beteiligt, besonders Leukotrien D4 [115]. Die Leukotriene C4 und D4 beeinflussen das Migrationsverhalten

[116] und die Zellteilung [106] von Melanozyten positiv.

Ltb4dh	leukotriene B4 12-hydroxy-dehydrogenase	67103	2,141 ↓	Dieses Enzym dient der Synthese des Leukotrien B4. Leukotrien B4 kann den Anteil an Tyrosinase in Melanozyten erhöhen [105] und beeinflusst so möglicherweise die Pigmentierung.
--------	---	-------	---------	--

Tyrp1	tyrosinase-related protein 1	22178	2,072 ↓	Das Tyrosinase-related protein 1 unterstützt die Funktionen der Tyrosinase in der Melanogenese und katalysiert einige Reaktionsschritte selbst (Abbildung 3) [45].
-------	------------------------------	-------	---------	--

Birc2	baculoviral IAP repeat-containing 2	11797	2,043 ↓	Das Enzym Birc2 (c-IAP-1) ist ein Apoptoseinhibitor der von Melanozyten stark exprimiert wird [104].
-------	-------------------------------------	-------	---------	--

[Glossar](#)

4.3.2 Pathways unter Stress

Die 369 runterregulierten und 224 hochregulierten Gene (insgesamt 593 *probe sets*) wurden geschlossen der Online-Pathway-Analyse mittels *DAVID*^{Glossar} zugeführt. Die Datenbank offeriert mehrere Quelle zur Visualisierung der Signalwege. Für diese Arbeit wurde die *Pathway maps* von KEGG, BIOCARTA^{Glossar}. Tabelle 4 zeigt sie in der Übersicht.

In diesen *Pathways* finden sich Hinweise auf eine immunologische Beteiligung zellulärer Komponenten, den Makrophagen, nämlich *Pertussis toxin-insensitive CCR5 Signaling in Macrophage* und *METS affect on Macrophage Differentiation*, die mit bereits bekannten Ergebnissen der Stressforschung vereinbar sind [70, 74, 75]. Ebenso passend erscheint die Beteiligung des *Biosynthesis of steroids Pathways* unter Stress, da der Haarfollikel Quelle und Zielorgan für alle hormonellen Elemente der Stressachse ist und Cortisol produziert [23, 26, 117].

Olfactory transduction scheint ein neuronaler Pathway aus dem extrakutanen Sensorium zu sein. Neuronale Signale spielen auch in der Stressreaktion der Haut eine Rolle beispielsweise über den Wachstumsfaktor *Nerve Growth Factor* (NGF) [118]. Dieser *Pathway* könnte neue Erkenntnisse über die komplexen Mechanismen der neurogen Entzündung liefern.

Hinweise auf parakrine Regulatoren liefern die Pathways *Adipocytokine signaling pathway* und *Linoleic acid metabolism*. Adipozytokine, werden Zytokine genannt, die von Fettzellen ausgeschüttet werden. Sie sind Gegenstand neuerer inflammatorischer Forschung [119, 120]. Zu diesen Adipozytokinen gehören zum Beispiel Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor- α . Beide inhibieren das Wachstum und die Proliferation von Melanozyten [121, 122]. Die Linolsäure (*Linoleic acid*) gehört zu den mehrfach ungesättigten essentiellen Fettsäuren. Sie ist Bestandteil der Zellmembran und ist eine Vorstufe der Arachidonsäure, die ihrerseits den Ausgangsstoff für eine Vielzahl von pro-inflammatorischen Eicosanioden wie den Prostaglandinen und Leukotrienen darstellt [123]. Von Leukotrien D4 ist eine positive Wirkung auf die Proliferation von Melanozyten bekannt [106]. Dieses Ergebnis geht mit der Regulation von leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase einher.

Tabelle 4: Liste möglicher in die Stressantwort involvierte Signalwege, die durch eine 24-stündige Stressbehandlung in Telogenhaut reguliert wurden.

Die regulierten Gene werden bei dieser Pathway-Analyse bereits bekannten Signalwegen zugeordnet. Die einzelnen Signalwege bilden häufig nur einen Bruchteil der Regulationsmöglichkeiten eines Substrats ab. D.h. die Anreicherung von Genen eines z.B. extrakutanen Signalweges, kann bedeuten, dass dieser Signalweg auch an kutanen Prozessen beteiligt ist und hier möglicherweise eine neue Bedeutung erlangt. Der Kommentar liefert erste Interpretationsansätze. Jeder Signalweg hat je nach Quelle (KEGG oder BIOCARTA) eine eigene *Pathway ID*_{Glossar}. (↑ -hoch- bzw. ↓ -runterreguliert)

Signalweg	Pathway ID	Kommentar	p-Wert	Gesamtzahl	Gene		
					↑	↓	
<i>Pertussis toxin-insensitive CCR5 Signaling in Macrophage</i>	m_Ccr5Pathway	Der CCR5 Chemokine-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Makrophagen. Die perifollikuläre Infiltration von Makrophagen ist ein Merkmal der neurogenen kutanen Entzündung unter Stress [75].	0.041	4	1	3	-
<i>Olfactory transduction</i>	mmu04740	Verschiedene Elemente der Olfaktorischen neuronalen Transduktion, eines offensichtlich extrakutanen Signalweges scheinen auch in der murinen Haut unter Stress reguliert zu sein.	0.063	4	-	4	-
<i>METS affect on Macrophage Differentiation</i>	m_etsPathway	Auch in diesem Signalweg spiegelt sich die Anwesenheit von Immunzellen und ihre Differenzierung wider [128].	0.074	4	2	2	-
<i>Adipocytokine signaling pathway</i>	mmu04920	Adipokine sind Zykokine die von Fettzellen, Adipozyten, produziert werden und in die Immunantwort eingreifen. Auch in der Haut kommt es unter Stress zu einer neurogenen Entzündung [71, 74].	0.077	7	4	2	1 (1/1)
<i>Biosynthesis of steroids</i>	mmu00100	Steroide sind Elemente der Stressachse. Ihre kutane Produktion durch Fibroblasten und Melanozyten, sowie in Zellverband des humanen Haarfollikels ist seit langem bekannt [23, 129, 130].	0.078	4	2	2	-
<i>Linoleic acid metabolism</i>	mmu00591	Linolsäure ist eine mehrfach ungesättigte essentielle Fettsäure. Sie ist Bestandteil von Zellmembranen und stellt die Vorstufe von Arachidonsäure, dem Ausgangsstoff zahlreicher Immunmodulatoren wie Prostaglandine und Leukotriene dar [127].	0.099	5	2	3	-

5 Diskussion

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Stress-Exposition das biologische Verhalten von Melanozyten im Haarfollikel maßgeblich beeinflusst und nahe legt, dass es unter Stress zu einem erhöhten *Turn-Over* von Melanozyten im Haarfollikel kommt. Im Einzelnen wird diese Vermutung durch die folgenden Ergebnisse gestützt:

Differenzierte Melanozyten sterben im frühen Anagen unter dem Einfluss von Stress ab, während Zellen der Vorläuferregion vermehrt aktiviert werden. Hierbei kommt es nicht zu einer vorzeitigen Progression des Haarzyklus, er bleibt von der akuten Stressapplikation unbeeinflusst. Im Anagen-Katagen-Übergang gehen unter Stresseinwirkung ebenfalls vermehrt Melanozyten in die Apoptose. Diese Effekte sind durch Substanz P reproduzierbar, jedoch durch Blockierung des NK-1 Rezeptors nicht vollständig zu verhindern. Apoptotische Melanozyten gehen dem Gesamtpool der melanozytären Zellen verloren. Auf Transkriptionsebene lassen sich im proliferations- und apoptosearmen Telogenstadium durch Stressexposition melanozytenrelevante Gene, die reife und undifferenzierte Melanozyten repräsentieren, induzieren. Die durch Stress induzierten Signalwege scheinen überwiegend Teilbereiche einer kutanen Entzündung unter der Beteiligung von Adipozyten wiederzuspiegeln. Diese inflammatorischen Prozesse schaffen einerseits ein Melanozyten-feindliches Milieu durch Generation zusätzlichen oxidativen Stress', andererseits wirken einzelne Zytokine direkt anti-proliferativ auf die Melanozyten.

Im frühen Anagen etabliert sich aus proliferierenden Keratinozyten und Melanozyten die pigment-bildende Einheit im Haarfollikelbulbus neu und alles ist auf Proliferation und Erneuerung ausgerichtet. Hier führt die Applikation des Stressmediators Substanz P zur Vermehrung von c-kit-positiven Melanozyten in der Stammzellregion des Haarfollikels. C-kit-Positivität bedeutet Migrationfähigkeit und ist für die Ausstattung der pigment-bildenden Einheit von essentieller Bedeutung [5, 6, 61]. Im Haarbulbus dagegen führt die Applikation von Substanz P zur Apoptose von reifen melanotischen Melanozyten (Abbildung 8, Abbildung 9). Der Lärmstressor reicht nicht aus um diese Effekte zu erzielen. Interessanterweise bleibt die Anzahl der aktiv pigment-produzierenden Melanozyten im Haarfollikelbulbus trotz Apoptoseinduktion relativ konstant. Der Haarfollikel in seiner Gesamtheit muss also über Kompensationsmechanismen verfügen.

Es ist nahe liegend, dass die vermehrte Aktivierung migrationsfähiger Pigmentzellen in der distalen äußeren Wurzelscheide zur Konstanz der Melanozytenzahl im Haarfollikelbulbus beiträgt (Abbildung 10, Abbildung 11). Unter Stress und Substanz P sehen wir hier eine signifikante Vermehrung, also genau in den Behandlungsgruppen, die Apoptose im wachsenden Bulbus induzieren. Auf der anderen Seite besitzen Melanozyten zahlreichen Redoxmechanismen, die sie befähigen, das während der Melanogenese entstehende Wasserstoffperoxid abzubauen. [127] [43]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass exogen zugeführtes Wasserstoffperoxid für die Melanogenese wichtige Proteine wie Tyrosinase, Tyrosinase-related protein 1 und 2 hemmt und ihre Regeneration bis zu 48 Stunden dauert [57]. Einzelne Redoxmechanismen der gleichen Zellen benötigten allerdings nur 6 Stunden um auf 250% der Ausgangswerte zu regenerieren.

Geht man nun davon aus, dass systemisch applizierte Stressoren eine intrakutane Entzündungsreaktion verursacht [70, 74, 75], die mit der Produktion von oxidativem Stress einhergeht [78], die Regenerationszeit melanozytärer Redoxmechanismen kurz und überschießend ist [57], dann lässt dies vermuten, dass einige Melanozyten durch die Stressbehandlung eine Art „Stress-Impfung“ erfahren haben. Einige Melanozyten haben diesem Stressor nicht widerstanden. Sollten aber die verbliebenen differenzierten Melanozyten der pigment-bildenden Einheit auf einen Stressor mit einer Erhöhung ihrer Redoxkapazität reagieren, dann hätten sie sich adaptiert, wären der andauernden Stressbehandlung weniger suszeptibel und würden einem erhöhten Zellverlust durch Apoptose vorbeugen.

Im Übergang von Anagen zu Katagen beobachtet man einen starken Anstieg apoptotischer Melanozyten unter Stress und Substanz P. Diese Zellen befinden sich oberhalb der pigment-bildenden Einheit am Übergang zum Haarschaft (Abbildung 13, Abbildung 14). Dies lässt vermuten, dass sie über den Haarschaft umbaut von ausdifferenzierten Keratinozyten „ausgeschieden“ werden. Zu Beginn des Katagens kann die Entwicklung der Melanozyten zwei Wege einschlagen. Entweder sie gehen in Apoptose [7, 8] und gehen so als aktive Zellen verloren, oder sie wandern über die dermale Papille in den sich formenden so genannten zweiten Keim. Dieser persistiert im Telogen unterhalb der Isthmus- und Wulstregion und repopuliert möglicherweise von hier aus die sich neu etablierende pigment-bildende Einheit des nächsten Haarzyklus [36]. Im zweiten Fall bleiben sie dem Haarfollikelsystem erhalten. Bei dem hier

vorliegenden Versuchen führen Stress und SP zum Verlust von Pigmentzellen aus dem Gesamtpool.

Diese Ergebnisse deuten eine Überaktivierung des Stammzellpools unter Stress und Substanz P an, die eine verbesserte Versorgung des Bulbus mit Melanozyten nach stress-bedingtem Apoptoseschaden zur Folge hat. Im Sinne einer „Stress-Antizipation“ wäre der Haarfollikelbulbus für den nächsten Stressor gewappnet haben. Allerdings geht dieser erhöhte *Turn-Over* melanozytärer Zellen wahrscheinlich auf Kosten der Stammzellpopulation. Um diese These zu belegen, wären ein längerer Beobachtungszeitraum und gegebenenfalls wiederholte Stressexpositionen erforderlich, um ergrauenden Tiere zu beobachten.

Eine Möglichkeit wäre die Labelung der follikulären Stammzellen mit Hilfe von Nukleotidanaloga wie BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) oder isotopmarkiertes [³H]-Thymidin. Die Verabreichung an schwangere Mäuse [16] hätte den Vorteil der Labelung aller potenziellen kutanen Vorläuferzellen der Nachkommen, allerdings wäre eine epigenetische Beeinflussung durch die Schwangerschaft nicht mit Sicherheit auszuschließen. Außerdem erforderte ein solcher Versuchsaufbau einen erheblichen Mehraufwand was die Anzahl der zu labelnden Tiere betrifft, die Hälfte eines Wurfes ist männlich und könnte nicht eingeschlossen werden

Eine Verwendung von Isotopen, wie [³H]-Thymidin würde spezielle Sicherheits- und Entsorgungsmaßnahmen erforderlich, deren Umsetzung zur Erzeugung deutlichen 'Umgebungsstress' führen könnte. Die Nutzung von BrdU erscheint da sinnvoller. Mögliche Applikationswege sind die orale Gabe durch das Futter, bei der die individuelle Zufuhr schlecht zu kontrollieren und so Unterschiede zwischen den Tieren und damit die Streuung der Daten größer wäre. Eine intraperitoneale Applikation hätte den Vorteil jedem Tier die gleiche gewichtsadaptierte Dosis zu verabreichen. Zu beachten ist nur eine mögliche zusätzliche Belastung der Tiere durch Anfassen und Spritzen.

Nicht-melanozytäre Zellen scheinen in allen Haarzyklusstadien auf systemischen Stress und Substanz P-Applikation mit Apoptose zu reagieren. Für den Zeitpunkt des Anagen-Katagen-Übergangs war dies bereits bekannt [70]. Auch in der Ruhephase Telogen führt systemisch applizierter Stress und Substanz P zur Apoptose von nicht-melanozytären Zellen [75]. In den vorliegenden Untersuchungen sehen wir ebenfalls Apoptose nicht-melanozytären Zellen im auf Proliferation aufgerichteten frühen Anagen

(Abbildung 7, Abbildung 9). Bei diesen Zellen handelt es sich aufgrund ihrer Lokalisation im Haarbulbus und in Nachbarschaft zu den Melanozyten mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um haarschaft-bildenden Keratinozyten. Diese apoptotischen Effekte sind durch die Verabreichung des NK-1-Rezeptorantagonisten auf Kontrolleniveau zu senken.

Apoptose von Haarfollikelmelanozyten kann als terminale Differenzierung interpretiert werden, wie sie am Übergang vom Anagen zum Katagen zu beobachten ist [8]. Diese Apoptose ist physiologisch und als eine dem Haarzyklusstadium entsprechende Entwicklung einzustufen. Unter Stress kommt es zu einer vorzeitig eintretenden katagenen Regression der Haarfollikel [70]. Es stellte sich somit die Frage, ob die im frühen Anagen beobachteten Veränderungen ebenfalls mit einer Beschleunigung des Haarzyklus zu erklären sind, oder ob die Stressbehandlung die Zellpopulationen isoliert beeinflussen. Hier zeigt sich in Anagenversuchsansatz (Abbildung 5), dass weder die Stressexposition noch die systemische SP-Applikation zu einer Beeinflussung des Haarzyklus führen. Im Gegenteil die Blockierung des SP-Signalwegs durch den NK-1-Rezeptorantagonisten führt zu einer Verzögerung der Haarentwicklung nach Depilation. So erscheinen die apoptotische und proliferativen Stresseffekte der hier verwendete Stressoren isoliert auf die einzelnen Zellpopulationen zu wirken.

Eine intradermale also lokale Applikation von Substanz P im Telogen induziert hingegen unter Degranulation von Mastzellen Haarwachstum [80]. Was darauf hinweist, dass die hier simulierte systemische Stressreaktion komplexer und differenzierter zu sein scheint und vermutlich weitere Signalwege involviert sind.

Substanz P ist im Zusammenhang mit frühzeitiger Katagenentwicklung und Apoptose im Telogen bereits als wirksamer systemischer Stressmediator identifiziert worden [70, 75]. Durch die gleichzeitige systemische Applikation des NK-1-Rezeptorantagonisten und die dadurch verhinderten Stresseffekte, zeigte sich auch, dass diese über den NK-1-Rezeptor mediiert werden.

Auch in den hier vorliegenden Ergebnissen ist Substanz P in der Lage proliferative und apoptotische Stresseffekte auf Melanozyten und Keratinozyten nachzuahmen. In systemischer Applikation übertrifft es sogar die Effekte des Lärmstressors auf die beispielsweise die Apoptose im Anagen und während Anagen-Katagen-Übergangs (Abbildung 7, Abbildung 8, Abbildung 13). Auch im Hinblick auf die Proliferation ist Substanz P in der Lage Stresseffekte nachzuahmen. Jedoch unterscheiden sich

diesbezüglich Keratinozyten und Melanozyten. Wohingegen die Proliferation von Melanozyten in pigment-bildender Einheit und Isthmus- und Wulstregion durch Stress und Substanz P gefördert wird, bleiben die Keratinozyten davon unbeeinflusst (Abbildung 10).

Interessanterweise lässt sich diesen isolierten Stresseffekten auf die Melanozytenproliferation nicht komplett durch die Applikation des NK-1-Rezeptorantagonisten entgegenwirken. Dies legt den Schluss nahe, dass Substanz P seine Wirkung offenbar nicht ausschließlich über den NK-1-Rezeptor vermittelt. Bis heute gibt es keine Hinweise auf das Vorhandensein Neurokininrezeptoren auf Melanozyten. Es gibt allerdings Untersuchungen, die eine Beteiligung von NK-2-Rezeptoren an der Signaltransduktion des Substanz P auf Keratinozyten zeigen konnte [128].

Die Untersuchung auf Transkriptionsebene im Telogen, wo es weder haarzyklusbedingte Apoptose noch haarzyklusbedingte Proliferation gibt, sollte zeigen ob 24-stündiger Lärmstress in der Lage ist, pigmentierungs- und melanozytenrelevante Genexpression zu beeinflussen. Hier zeigt sich das unter den zahlreichen hoch- und runterregulierten Genen, auch solche zu finden sind, die die zuvor beschriebenen Effekte auf die verschiedenen Melanozytenpopulationen widerspiegeln (Tabelle 3).

Undifferenzierte migrationsfähige Melanozyten im frühen Anagen würden von einer erhöhten Expression von Endothelin B-Rezeptoren [110, 111], Superoxiddismutase [109] und den Leukotrien C4- und D4-bildenden und migrationfördernden Dipeptidasen [106, 115, 116] profitieren. Die antioxidative Superoxiddismutase steht aktuell im Fokus der Melanozytenbiologie. Neuere Untersuchungen zur Weißfleckenkrankheit Vitiligo, für die eine Kumulation von oxidativem Stress ursächlich diskutiert wird [129], stützen das hier vorliegende Ergebnis. In Untersuchungen zeigte sich eine Erhöhung von Superoxiddismutase in der Haut [130] und im Blut der betroffenen Patienten [131]. Zusätzlich spricht die Hochregulierung der adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit spricht für die regelrechte Ausstattung der Melanosomen mit Tyrosinase und fördert eine ungestörte Melanozytenfunktion [107, 108].

Die Runterregulierung von Genen, die die Melanogenese fördern oder vor Apoptose schützen, wie Leukotriene B4 12-hydroxy-dehydrogenase (synthetisiert Leukotrien B4, welche intrazellulär die Tyrosinase erhöht) [105], tyrosinase-related protein 1 [45] oder baculoviral IAP repeat-containing 2, ein Apoptoseinhibitor, der von differenzierter

Melanozyten exprimiert wird [104] sowie die Hochregulierung von Seneszenzmarkern (Galactosidase, beta 1) [100, 101] und Melanozytenproliferationshemmern bzw. Katageninduktoren (transforming growth factor, beta 2) [102, 103, 113, 114] passt zu beobachteten Melanozytenapoptose in Anagen- und Katagenhaarbulben.

Diese auf den ersten Blick entgegengesetzten Ergebnisse spiegeln die zweiseitigen Stresseffekte auf die Melanozyten wider, die in den einzelnen Kompartimenten beobachtet werden können: Apoptose in der pigment-bildender Einheit des Bulbus und Proliferation in der Isthmus- und Wulstregion.

Die in der Pathway-Analyse ermittelten Signalwege spiegeln verschiedene Teilbereiche einer kutanen Entzündung wider (Tabelle 4). Zwei Signalwege enthalten Elemente, die an der Makrophagendifferenzierung und -aktivierung beteiligt sind (*METS affect on Macrophage Differentiation* und *Pertussis toxin-insensitive CCR5 Signaling in Macrophage*) [124]. Die Infiltration der Haut mit Makrophagen als Folge einer neurogenen Inflammation unter Stress, ist bereits mehrfach mit dem in dieser Arbeit verwendeten Stressor belegt [70, 74, 75]. Formen der neuronalen Signaltransduktion bilden sich ab (*Olfactory transduction*). Die gut belegten systemischen und kutanen hormonellen Elemente der Stressachsen sind ebenfalls bei den Signalwegen vertreten (*Biosynthesis of steroids*). Die Expression der Stressachsenhormone, die in der Synthese von steroidalen Glukokortikoiden mündet, ist von zweierlei Bedeutung. Zum einen spiegelt sie die Prozesse einer ablaufenden kutanen Stressreaktion wider, zum anderen können die einzelnen Vertreter direkt Einfluss auf Melanozyten nehmen [33, 34].

Besonders interessant in diesem Zusammenhang sind die Signalwege *Adipocytokine signaling pathway* und *Linoleic acid metabolism*. Als Adipokine werden Zytokine bezeichnet, die von Adipozyten, also Fettzellen, synthetisiert und ausgeschüttet werden können und gehören überwiegend zur Gruppe der pro-inflammatorischen Zytokine. Zu den Adipokinen zählen unter anderem Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor- α [119]. Von Beiden ist bekannt, dass sie sich negativ auf die Proliferation, Differenzierung und Pigmentierung von Melanozyten auswirken. [121, 122]. So könnten Adipokine aus dem perifollikulären subkutanen Fettgewebe direkt auf die verschiedenen Melanozytenpopulationen wirken. Des Weiteren gibt es Untersuchungen, dass das Capsaicin, der Scharfstoff des Chilipfeffers, die Adipokine-induzierte Inflammation abschwächen kann [132]. Interessant ist in diesem Zusammenhang das Capsaicin,

seine nozi-sensorische Wirkung über eine Substanz P-Ausschüttung mediiert [133]. Substanz P ist wiederum ein in der Haut gut erforschter Stressmediator [72, 74, 76, 134]. Es wäre also möglich, dass Substanz P seine Wirkung nicht nur über NK1-Rezeptoren auf Mastzellen entfaltet [76], sondern dass es einen weiteren Signalweg für das ausgeschüttete Substanz P gibt. Es gibt erste Untersuchungen, dass Substanz P über NK1-Rezeptoren auf Adipozyten wirkt und diese beeinflusst [135].

Die Linolsäure gehört zu den mehrfach ungesättigten essentiellen Fettsäuren. Sie ist Bestandteil der Zellmembran und ist eine Vorstufe der Arachidonsäure, die ihrerseits den Ausgangsstoff für eine Vielzahl von pro-inflammatorischen Eicosanoiden wie den Prostaglandinen und Leukotrienen darstellt [123]. Für Vertreter beider Substanzklassen wurden dendritizität-fördernde [136] sowie migrations- und proliferations-fördernde Eigenschaften nachgewiesen [116]. Darüber hinaus geht man zunehmend davon aus, dass einzelne Fettsäuren als interzelluläre Signalmoleküle fungieren, besonders im Kontext von Entzündung, Alterung und Zellertergang [137]. Unklar bleibt ob dieser Signalweg ursächlich an der neurogenen Entzündung beteiligt ist oder eine Folge des inflammationsbedingten Zellertergangs mit Freisetzung intrazellulärer Fettsäuren ist.

Die hier dargestellten Microarraydaten stellen selbstverständlich nur erste Hinweise dar. Eine genauere Analyse erfordert die Verifizierung der Microarraydaten durch Nachweis einzelner hoch- und runterregulierter Gene sowie ausgewählter Elemente der Pathway-Analyse durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) aus dem ursprünglichen RNA-Isolat die bislang aussteht. Auch bleibt das Poolen der RNA mehrerer Tiere pro Chip umstritten, da dies die natürliche Streuung der Ergebnisse verschleiert, obgleich die Tiere aus Inzuchtstämmen stammen und die zu erwartende Streuung gering wäre. Darüber hinaus bietet sich bei der Analyse der Ko-Regulation von Genen, also Gruppen von Genen, die unter unseren Versuchsbedingungen reguliert werden, an, weitere Versuchsgruppen hinzuzufügen, die erwartungsgemäß ähnlich oder genau gegenteilig reagieren. In dem hier präsentierten Fall würden sich mit Substanz P und mit Substanz P Rezeptorantagonisten behandelte Gruppen anbieten. Dennoch erhöht die Kombination aus einem höher gewählten *Fold change* (in dieser Arbeit zweifach) und die Prüfung auf Anreicherung dieser Gene in funktionellen Signalwegen die Aussagekraft der hier vorgelegten Daten über die biologische Bedeutung der regulierten Gene deutlich gegenüber der Annahme, dass nur die am höchsten regulierten Gene im Eins-zu-eins-Vergleich eine Relevanz hätten.

Die Apoptose von differenzierten Bulbusmelanozyten im frühen Anagen und die gleichzeitige Aktivierung undifferenzierten melanozytären Stammzellen in der Isthmus- und Wulstregion sowie vermehrte Apoptose im Anagen-Katagen-Übergang unter Stress und Substanz P in Verbindung mit der Beeinflussbarkeit pigmentierungsrelevanter Gene durch Stress und der Involvierung möglicher alternativer Signalwege des Substanz P, deuten daraufhin, dass es zu einem erhöhten Durchsatz an Pigmentzellen unter Stress kommt, welcher in der Folge zu einer vorzeitigen Erschöpfung des melanozytären Stammzellpools führen kann. (Abbildung 15) fasst die Hypothesen der Vorgänge im frühen Anagen graphisch zusammen.

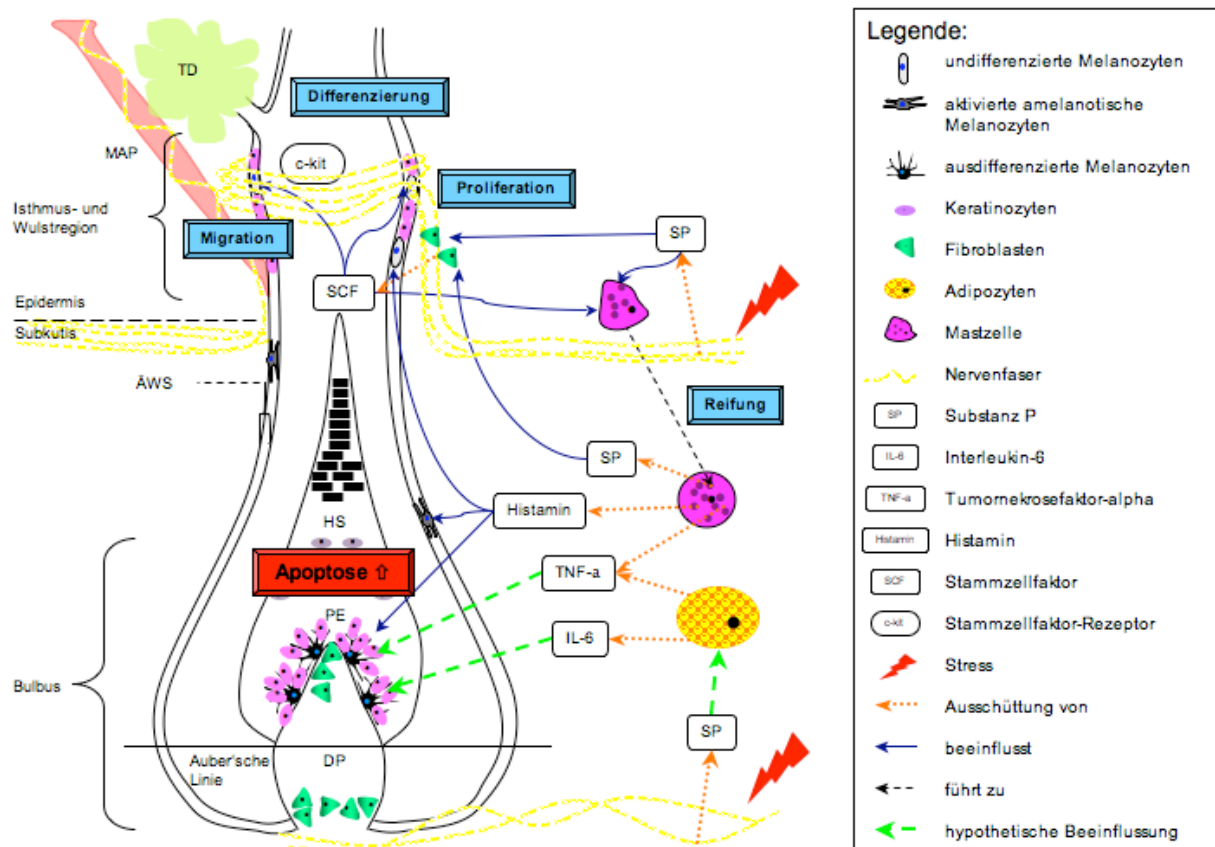


Abbildung 15: Haarfollikel-Melanozyten unter der Beeinflussung von Stress. Das Schema verdeutlicht die Hypothese der Wirkung von Stress auf den Anagenhaarfollikel. Die Stressapplikation führt zur Ausschüttung von Substanz P aus den den Haarfollikel umgebenden Nervenfasern. Dieses führt seinerseits Proliferation von Fibroblasten, die u.a. Stammzellenfaktor (SCF) ausschütten [138, 139]. Dieses wirkt auch auf Melanozyten, für deren Differenzierung und Migration dieser essentiell ist [6, 40]. Unklar bleibt jedoch wie die Vorläuferzellen der Isthmus- und Wulstregion unter Stress für SCF sensibilisiert werden. Das SCF der Fibroblasten kann ebenso die Ausreifung von Mastzellen fördern [140], die dann unter Substanz P-Einfluss eine Vielzahl von weiteren Botenstoffen sezernieren. Z.B. Substanz P, welches den angestoßenen Prozess wie ein Perpetuum mobile aufrecht erhält [141, 142], oder Histamin, welches als Schlüsselfaktor der postinflammatorischen Hyperpigmentierung gilt und Melanozyten stimuliert [143, 144]. Aber auch Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α) [145]. Andererseits könnte das ausgeschüttete Substanz P auch auf die Fettzellen, Adipozyten, wirken und hier die neurogene kutane Entzündung über die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-6 oder TNF-α fördern [119]. Von diesen Zytokinen weiß man, dass sie auch direkt die Proliferation, Differenzierung und Pigmentierung Melanozyten negativ beeinflussen [121, 122]. In unserem Versuch könnten sie auf differenzierte Melanozyten apoptose-induzierend wirken. So könnte es über den Verlust differenzierter Melanozyten aus dem Gesamtpool bei gleichzeitiger Ausdifferenzierung melanozytärer Vorläufer zu einen erhöhter Turn-Over der Melanozyten und so zur vorzeitigen Erschöpfung des Stammzellpools und schlussendlich zum prämaturnen Ergrauen kommen. (MAP = Musculus arrector pili; TD = Talgdrüse; ÄWS = äußere Wurzelscheide; DP = dermale Papille; HS = Haarschaft; PE = pigment-bildende Einheit)

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die bisherigen Untersuchungen zum Ergrauen und der Melanozytenbiologie [2, 3, 9, 49] um die Fragestellung des Einflusses psycho-emotionalen Stress' auf die Proliferation und Apoptose von Melanozyten und die Integrität der pigment-bildenden Einheit des Haarfollikels erweitert.

Vor dem Hintergrund des gut erforschten Haarzyklus [82] und den damit gekoppelten Entwicklungsstufen follikulärer Melanozyten [6, 7, 15] sowie neuerer Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen der Akkumulation von oxidativem Stress und Haarergrauen [48], wurde ein etabliertes murines Stressmodell zur Simulation systemisch wahrgenommenen psycho-emotionalen Stress verwandt [70, 72, 74, 75].

In diesem Modell werden C57BL/6- und CBA/J-Mäuse für die Dauer von 24 Stunden einem Lärmstressor ausgesetzt oder erhalten eine Injektion mit dem Neuropeptide und Stressmediator Substanz P (SP) während eines durch Depilation induzierten eng umschriebenen Zeitfensters im murinen Haarzyklus. Einmal zur Etablierung der pigment-bildenden Einheit im frühen Anagen und zu Beginn der Regression am Übergang vom Anagen zum Katagen. Zusätzlich wurden Tiere in der Ruhephase (Telogen) stressexponiert, um dessen Effekte auf Transkriptionsebene zu untersuchen.

Mit immunhistologischen melanozytenspezifischen Markern in Kombination mit c-kit, zur Erfassung der Aktivität und dem TUNEL-Label zur Apoptosedetektion, wurde die Rückenhaut der Tiere untersucht. Aus der Rückenhaut der Telogentiere wurde die totale RNA isoliert und zur Analyse einer Microarray zugeführt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass SP-Applikation zum Absterben differenzierter Melanozyten im frühen Anagen führt, während Zellen der Vorläuferregion vermehrt aktiviert werden. Hierbei kommt es nicht zu einer vorzeitigen Progression des Haarzyklus, er bleibt von der akuten Stressapplikation unbeeinflusst. Im Anagen-Katagen-Übergang sterben unter Stresseinwirkung vermehrt Melanozyten ab. Diese Effekte sind durch Substanz P reproduzierbar, jedoch durch Blockierung des NK-1 Rezeptors nicht vollständig zu verhindern.

Auf Transkriptionsebene werden im proliferations- und apoptosearmen Telogenstadium durch Stressexposition melanozytenrelevante Gene, die reife und undifferenzierte Melanozyten repräsentieren, induziert. Die durch Stress induzierten Signalwege scheinen überwiegend Teilbereiche einer kutanen Entzündung unter der Beteiligung von

Adipozyten wiederzuspiegeln. Diese inflammatorischen Prozesse schaffen einerseits ein Melanozyten-feindliches Milieu durch Generation zusätzlichen oxidativen Stress, andererseits wirken einzelne Zytokine direkt anti-proliferativ auf die Melanozyten.

Die Apoptose von differenzierten Bulbusmelanozyten im frühen Anagen und die gleichzeitige Aktivierung undifferenzierten melanozytären Stammzellen in der Isthmus- und Wulstregion sowie die vermehrte Apoptose im Anagen-Katagen-Übergang unter Stress und Substanz P bedeutet, dass diese apoptotischen Zellen dem Gesamtpool der melanozytären Zellen verloren gehen. In Verbindung mit der Beeinflussbarkeit pigmentierungsrelevanter Gene durch Stress und der Involvierung möglicher alternativer Signalwege des Stressmediators Substanz P, deutet dies daraufhin, dass es zu einem erhöhten Durchsatz an Pigmentzellen unter Stress kommt, welcher in der Folge zu einer vorzeitigen Erschöpfung des melanozytären Stammzellpools führen kann (Abbildung 15:)

7 Erläuterungen

7.1 Glossar

BioCarta: ist eine frei zugängliche Datenbank, die Informationen über Proteine, DNA-Strukturen, vor allem aber auch über humane und murine Signalwege anbietet. Sie besteht seit 2000.

DAVID: bedeutet: **D**atabase for **A**notation, **V**isualization and **I**ntegrated **D**iscovery. Diese Online-Software dient einerseits der Annotation von Genen, vor allem aber ist sie ein Instrument zur Pathway-Analyse, um die regulierten Gene auf ihre bisher bekannte biologische Relevanz hin zu untersuchen. Es besteht eine Kooperation zum National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), National Institutes of Health (NIH) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>).

Entrez ID: ist die eindeutige Identifikationsnummer eines jeden Gens, mit der es in der Entrez-Datenbank des National Institutes of Health (NIH) katalogisiert und zu finden ist (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).

Fold change: gibt das Vielfache an, um das ein Gen der Probe im Vergleich zur Kontrolle höher oder niedriger exprimiert ist

Genname: international gültiger vollständiger Name eines Gens bzw. Genprodukts, welcher in der Entrez-Datenbank des National Institutes of Health (NIH) katalogisiert und zu finden ist.

Gensymbol: international gültige Abkürzung eines Gennamens, welches in der Entrez-Datenbank des National Institutes of Health (NIH) katalogisiert und zu finden ist.

KEGG: die **K**yoto **E**ncyclopedia of **G**enes and **G**enomes ist eine online frei zugängliche Datenbank und bietet strukturierte Informationen über funktionale Zusammenhänge von Genen an, die graphisch in Signalweg-Karten (Pathway maps) dargestellt sind. Darüber hinaus sind zahlreiche weitere Informationen zu Strukturen von Genen aber auch Biomolekülen und Medikamenten abrufbar. Aufgebaut und gepflegt wird die Datenbank von den Kanehisa Laboratories im Bioinformatikzentrum der Universität Kyoto und dem Human Genome Center der Universität Tokio. Sie besteht seit 1995.

NetAFFX: auch NetAFFX analysis center; ist eine von der Firma Affymetrix zur Verfügung gestellte Online-Software zur Annotation der Affymetrix-Chips, bzw.

deren probe sets. Sie fasst die Informationen zu einem Gen aus einer Vielzahl von anderen Online-Datenbanken zusammen. Sie ist frei zugänglich und wird in sehr kurzen Abständen aktualisiert (ca. alle 10 Minuten) (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>).

pathway enrichment: bedeutet die Anreicherung von Genen in einem bestimmten Signalweg. Ein Signalweg gilt als vermehrt angereichert und damit mutmaßlich in einem Prozess reguliert, wenn z.B. ausgehend von einer experimentellen Stichprobe im Vergleich zu einer Normalstichprobe mehr Gene vertreten sind als zu erwarten wären. Für diese Analyse wurde in dieser Arbeit die DAVID Datenbank verwendet, die zur statischen Berechnung einen Fischer Exakt Test anwendet.

pathway ID: jeder Signalweg jeder Datenbank hat zum Zwecke der Systematisierung eine Identifikationsnummer. Bei KEGG z.B. mmu04740 für *Olfactory transduction* oder bei BIOCARTA m_Ccr5Pathway für *Pertussis toxin-insensitive CCR5 Signaling in Macrophage*.

present call: gibt an, ob ein Gen an die Sonden des Chips gebunden hat oder nicht. Jedes 25-mer Oligonukleotid probe set, wird in seiner spezifischen Bindung überprüft. Das geschieht indem jeweils 11 so genannte perfect und mismatch-Sonden, insgesamt also 22 Sonden pro Oligonukleotid auf dem Chip vorhanden sind. Die mismatches unterscheiden sich von den perfect matches in nur einer Nukleinsäure an Position 13. Im Idealfall bindet nur RNA an die perfect match-Sonden. Bei unspezifischer Bindung würde allerdings ein falsch positiver present call hervorgerufen, so wird aus dem Verhältnis aus perfect match- zu mismatch-Bindung die Richtigkeit des Signals verifiziert. => present (vorhanden), absent (nicht vorhanden), marginal (grenzwertig)

probe sets: sind 25-mer Oligonukleotide, die eine Sequenz eines spezifischen oder potenziellen Gens widerspiegelt. Diese Sequenz ist in vielen Fällen allerdings nicht eindeutig, es gibt probe sets, die potenziell kreuzreagible mit verschiedenen Genen sind oder solche die nur mit funktionellen Sequenzen von Genen reagieren. Ein Gen kann durch mehrere probe sets repräsentiert sein, die für verschiedene Transkripte bzw. Splicing-Varianten stehen können, sodass diese auch in ein und dem demselben Versuch hoch- und gleichzeitig runterreguliert sein können. In dieser Arbeit wurden alle probe sets, die nicht

eindeutig einem Gen zugeordnet waren aus der Analyse ausgeschlossen, um eine spezifischere Aussage zu erhalten.

7.2 Abkürzungen

ACTH - Adrenocorticotropes Hormon

aK - apoptotischer Keratinozyt

AL - Auber' sche Linie

aMel - apoptotischer Melanozyt

anti-NK1 - Substanz P-Rezeptorantagonist

Ap3d1 - adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit

ÄWS - äußere Wurzelscheide

Bcl-2 - B-cell CLL/lymphoma 2

bMel - Melanozyt in beginnender Differenzierung

BrdU - 5-bromo-2-deoxyuridine

c-kit - v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog, KIT, Migrationsmarker

CRH - Corticotropin Releasing Hormon

D1 - Depilation 1

d1 - erste Depilation

d1 - erste Depilation

D2 – Depilation 2

d2 - zweite Depilation

DAPI - 4,6-Diamidino-2-phenylindol

DCT - dopachrome Tautomerase

Digoxigenin-dUTP - Digoxigenin- Uridintriphosphat

DNA - Desoxyribonukleinsäure

DP - dermale Papille

DP - dermale Papille

Dpep1 - dipeptidase 1 (renal)

EDN3 - Endothelin 3

Ednrb - endothelin receptor type B

FITC - Fluorescein-isothiocyanate

Glb1 - Galactosidase, beta 1

HCl – Hydrochlorid

HPA-Achse - hypothalamisch-pituitaren-adrenalen Stressachse

HS – Haarschaft

IWS - innere Wurzelscheide

K - Keratinozyt

Ki67 - Proliferationsmarker

KIT - v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog, c-kit, cd117

Ltb4dh - leukotriene B4 12-hydroxy-dehydrogenase

M - Matrix

MAP - Musculus arrector pili

MC-R1 - Melanocortinrezeptor

Mel - Melanozyt

MITF - Microphthalmia-associated Transcription Factor

NaCl - Natriumchlorid

NGF - nerve growth factor (beta polypeptide)

NK-1-Rezeptor - Neurokinin-1-Rezeptor

PAX3 - paired box 3

PBS - Phosphat-gepufferten Saline

PCR - Polymerase-Ketten-Reaktion

PE - pigment-bildende Einheit

POMC – Proopiomelanocortin

RNA- Ribonukleinsäure

rpm - rounds per minute, Umdrehungen pro Minute

SCF - stem cell factor , KIT ligand

SNAI2 - snail homolog 2 (Drosophila)

Sod3 - superoxide dismutase 3, extracellular

SOX10 - SRY (sex determining region Y)-box 10

SP - Substanz P

TBS - Tris-gepufferter Salzlösung

TD - Talgdrüse

TdT - terminalen Deoxynucleotidyltransferase

Tgfb2 - transforming growth factor, beta 2

TRITC - Tetramethylrhodamine-isothiocyanate

TRP-1 - Tyrosinase-related protein-1

TRP-2 - Tyrosinase-related protein-2

TUNEL - für TdT-mediated d-UTP nick end labeling

Tyr - Tyrosinase

Tyrp1 - tyrosinase-related protein 1

uMel - undifferenzierte Melanozyten

UVA - Ultraviolett A

UVB – Ultraviolett B

α -MSH - alpha-Melanozyten-stimulierendes Hormon

8 Literatur

1. Chase HB, *Growth of the hair*. Physiol Rev, 1954. **34**(1): p. 113-26.
2. Tobin DJ, Paus R, *Graying: gerontobiology of the hair follicle pigmentary unit*. Exp Gerontol, 2001. **36**(1): p. 29-54.
3. Sarin KY, Artandi SE, *Aging, graying and loss of melanocyte stem cells*. Stem Cell Rev, 2007. **3**(3): p. 212-7.
4. Lévy A, Danzer G, Rattner J, *Haut und Seele. Auf dem Weg zu einer psychosomatischen Dermatologie*, K. Neumann, Editor. 1997, Lévy, A.: Würzburg. p. 135-39.
5. Botchkareva NV, Botchkarev VA, Gilchrist BA, *Fate of melanocytes during development of the hair follicle pigmentary unit*. J Invest Dermatol Symp Proc, 2003. **8**(1): p. 76-9.
6. Botchkareva NV, Khlgatian M, Longley BJ, et al., *SCF/c-kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit*. FASEB J, 2001. **15**(3): p. 645-58.
7. Tobin DJ, Slominski A, Botchkarev V, et al., *The fate of hair follicle melanocytes during the hair growth cycle*. J Invest Dermatol Symp Proc, 1999. **4**(3): p. 323-32.
8. Tobin DJ, Hagen E, Botchkarev VA, et al., *Do hair bulb melanocytes undergo apoptosis during hair follicle regression (catagen)?* J Invest Dermatol, 1998. **111**(6): p. 941-7.
9. De Villez RL, Buchanan JM, *The graying phenomenon: an unusual manifestation of alopecia areata*. Int J Dermatol, 1982. **21**(6): p. 344-6.
10. Leonhardt H, *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. 1990: Thieme.
11. Holbrook KA, Underwood RA, Vogel AM, et al., *The appearance, density and distribution of melanocytes in human embryonic and fetal skin revealed by the anti-melanoma monoclonal antibody, HMB-45*. Anat Embryol (Berl), 1989. **180**(5): p. 443-55.
12. Rawles ME, *Origin of pigment cells from the neural crest in the mouse embryo*. Physiol Zool, 1947. **20**: p. 248-266.
13. Peters EM, Botchkarev VA, Muller-Rover S, et al., *Developmental timing of hair follicle and dorsal skin innervation in mice*. J Comp Neurol, 2002. **448**(1): p. 28-52.
14. Nordlund JJ, Boissy RE, Hering VJ, et al., *The Pigmentary System*. 1998: Oxford University Press. 1106.
15. Slominski A, Paus R, *Melanogenesis is coupled to murine anagen: toward new concepts for the role of melanocytes and the regulation of melanogenesis in hair growth*. J Invest Dermatol, 1993. **101**(1 Suppl): p. 90S-97S.
16. Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM, *Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis*. Cell, 1990. **61**(7): p. 1329-37.
17. Peters EM, Botchkarev VA, Botchkareva NV, et al., *Hair-cycle-associated remodeling of the peptidergic innervation of murine skin, and hair growth modulation by neuropeptides*. J Invest Dermatol, 2001. **116**(2): p. 236-45.
18. Muller-Rover S, Handjiski B, van der Veen C, et al., *A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages*. J Invest Dermatol, 2001. **117**(1): p. 3-15.

19. Lee J, Basak JM, Demehri S, et al., *Bi-compartmental communication contributes to the opposite proliferative behavior of Notch1-deficient hair follicle and epidermal keratinocytes*. Development, 2007. **134**(15): p. 2795-806.
20. Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, et al., *Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination*. Nature, 2002. **416**(6883): p. 854-60.
21. Botchkarev VA, Peters EM, Botchkareva NV, et al., *Hair cycle-dependent changes in adrenergic skin innervation, and hair growth modulation by adrenergic drugs*. J Invest Dermatol, 1999. **113**(6): p. 878-87.
22. Peters EM, Maurer M, Botchkarev VA, et al., *Hair growth-modulation by adrenergic drugs*. Exp Dermatol, 1999. **8**(4): p. 274-81.
23. Ito N, Ito T, Kromminga A, et al., *Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and synthesize cortisol*. FASEB J, 2005. **19**(10): p. 1332-4.
24. Roloff B, Fechner K, Slominski A, et al., *Hair cycle-dependent expression of corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF receptors in murine skin*. FASEB J, 1998. **12**(3): p. 287-97.
25. Mazurkiewicz JE, Corliss D, Slominski A, *Spatiotemporal expression, distribution, and processing of POMC and POMC-derived peptides in murine skin*. J Histochem Cytochem, 2000. **48**(7): p. 905-14.
26. Slominski A, Wortsman J, Luger T, et al., *Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress*. Physiol Rev, 2000. **80**(3): p. 979-1020.
27. Slominski AT, Botchkarev V, Choudhry M, et al., *Cutaneous expression of CRH and CRH-R. Is there a "skin stress response system?"*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **885**: p. 287-311.
28. Luger TA, Scholzen T, Brzoska T, et al., *Cutaneous immunomodulation and coordination of skin stress responses by alpha-melanocyte-stimulating hormone*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **840**: p. 381-94.
29. Kauser S, Thody AJ, Schallreuter KU, et al., *A fully functional proopiomelanocortin/melanocortin-1 receptor system regulates the differentiation of human scalp hair follicle melanocytes*. Endocrinology, 2005. **146**(2): p. 532-43.
30. Thody AJ, *alpha-MSH and the regulation of melanocyte function*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **885**: p. 217-29.
31. Wakamatsu K, Graham A, Cook D, et al., *Characterisation of ACTH peptides in human skin and their activation of the melanocortin-1 receptor*. Pigment Cell Res, 1997. **10**(5): p. 288-97.
32. Tsatmalia M, Wakamatsu K, Graham AJ, et al., *Skin POMC peptides. Their binding affinities and activation of the human MC1 receptor*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **885**: p. 466-9.
33. Hunt G, Todd C, Kyne S, et al., *ACTH stimulates melanogenesis in cultured human melanocytes*. J Endocrinol, 1994. **140**(1): p. R1-3.
34. Hunt G, Donatien PD, Lunec J, et al., *Cultured human melanocytes respond to MSH peptides and ACTH*. Pigment Cell Res, 1994. **7**(4): p. 217-21.
35. Commo S, Bernard BA, *Melanocyte subpopulation turnover during the human hair cycle: an immunohistochemical study*. Pigment Cell Res, 2000. **13**(4): p. 253-9.
36. Sharov A, Tobin DJ, Sharova TY, et al., *Changes in different melanocyte populations during hair follicle involution (catagen)*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(6): p. 1259-67.

37. Meyer KC, Klatte JE, Dinh HV, et al., *Evidence that the bulge region is a site of relative immune privilege in human hair follicles*. Br J Dermatol, 2008. **159**(5): p. 1077-85.
38. Oetting W.S. ML, Bennett D.C. *Mouse Coat Color Genes*. 2008 January 30, 2008 [cited].
39. Bennett DC, Lamoreux ML, *The color loci of mice--a genetic century*. Pigment Cell Res, 2003. **16**(4): p. 333-44.
40. Peters EM, Tobin DJ, Botchkareva N, et al., *Migration of melanoblasts into the developing murine hair follicle is accompanied by transient c-Kit expression*. J Histochem Cytochem, 2002. **50**(6): p. 751-66.
41. Kawakami T, Kimura S, Kawa Y, et al., *BMP-4 Upregulates Kit Expression in Mouse Melanoblasts prior to the Kit-Dependent Cycle of Melanogenesis*. J Invest Dermatol, 2007.
42. Gallone A, Sagliano A, Guida G, et al., *The melanogenic system of the liver pigmented macrophages of Rana esculenta L.--tyrosinase activity*. Histol Histopathol, 2007. **22**(10): p. 1065-75.
43. Nappi AJ, Vass E, *Hydrogen peroxide generation associated with the oxidations of the eumelanin precursors 5,6-dihydroxyindole and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid*. Melanoma Res, 1996. **6**(5): p. 341-9.
44. Costin GE, Hearing VJ, *Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress*. FASEB J, 2007. **21**(4): p. 976-94.
45. Slominski A, Moellmann G, Kuklinska E, et al., *Positive regulation of melanin pigmentation by two key substrates of the melanogenic pathway, L-tyrosine and L-dopa*. J Cell Sci, 1988. **89** (Pt 3): p. 287-96.
46. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, et al., *Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation*. Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1155-228.
47. Karow T. L-RR, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie*. 2006.
48. Arck PC, Overall R, Spatz K, et al., *Towards a "free radical theory of graying": melanocyte apoptosis in the aging human hair follicle is an indicator of oxidative stress induced tissue damage*. FASEB J, 2006. **20**(9): p. 1567-9.
49. Commo S, Gaillard O, Bernard BA, *Human hair greying is linked to a specific depletion of hair follicle melanocytes affecting both the bulb and the outer root sheath*. Br J Dermatol, 2004. **150**(3): p. 435-43.
50. Hou L, Panthier JJ, Arnheiter H, *Signaling and transcriptional regulation in the neural crest-derived melanocyte lineage: interactions between KIT and MITF*. Development, 2000. **127**(24): p. 5379-89.
51. Aoki H, Motohashi T, Yoshimura N, et al., *Cooperative and indispensable roles of endothelin 3 and KIT signalings in melanocyte development*. Dev Dyn, 2005. **233**(2): p. 407-17.
52. Yonetani S, Moriyama M, Nishigori C, et al., *In Vitro Expansion of Immature Melanoblasts and their Ability to Repopulate Melanocyte Stem Cells in the Hair Follicle*. J Invest Dermatol, 2007.
53. Sviderskaya EV, Gray-Schopfer VC, Hill SP, et al., *p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2A deficiency in human melanocyte senescence, apoptosis, and immortalization: possible implications for melanoma progression*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(10): p. 723-32.
54. Na GY, Paek SH, Park BC, et al., *Isolation and characterization of outer root sheath melanocytes of human hair follicles*. Br J Dermatol, 2006. **155**(5): p. 902-9.

55. Moriyama M, Osawa M, Mak SS, et al., *Notch signaling via Hes1 transcription factor maintains survival of melanoblasts and melanocyte stem cells*. J Cell Biol, 2006. **173**(3): p. 333-9.
56. Schouwey K, Delmas V, Larue L, et al., *Notch1 and Notch2 receptors influence progressive hair graying in a dose-dependent manner*. Dev Dyn, 2007. **236**(1): p. 282-9.
57. Jimenez-Cervantes C, Martinez-Esparza M, Perez C, et al., *Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress: transient downregulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 12): p. 2335-44.
58. Yang JH, Lee HC, Lin KJ, et al., *A specific 4977-bp deletion of mitochondrial DNA in human ageing skin*. Arch Dermatol Res, 1994. **286**(7): p. 386-90.
59. Yamamura K, Kamada S, Ito S, et al., *Accelerated disappearance of melanocytes in bcl-2-deficient mice*. Cancer Res, 1996. **56**(15): p. 3546-50.
60. Mak SS, Moriyama M, Nishioka E, et al., *Indispensable role of Bcl2 in the development of the melanocyte stem cell*. Dev Biol, 2006. **291**(1): p. 144-53.
61. Nishimura EK, Granter SR, Fisher DE, *Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche*. Science, 2005. **307**(5710): p. 720-4.
62. Paus R, Slominski A, Czarnecki BM, *Is alopecia areata an autoimmune-response against melanogenesis-related proteins, exposed by abnormal MHC class I expression in the anagen hair bulb?* Yale J Biol Med, 1993. **66**(6): p. 541-54.
63. Selye H, *The Physiology and Pathology of Exposure to STRESS*. 1950: ACTA. INC. Medical Publishers.
64. Cacioppo JT, Berntson GG, Malarkey WB, et al., *Autonomic, neuroendocrine, and immune responses to psychological stress: the reactivity hypothesis*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **840**: p. 664-73.
65. Chowdrey HS, Larsen PJ, Harbuz MS, et al., *Endogenous substance P inhibits the expression of corticotropin-releasing hormone during a chronic inflammatory stress*. Life Sci, 1995. **57**(22): p. 2021-9.
66. Ebner K, Muigg P, Singewald G, et al., *Substance P in stress and anxiety: NK-1 receptor antagonism interacts with key brain areas of the stress circuitry*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1144**: p. 61-73.
67. Aloe L, Alleva E, Fiore M, *Stress and nerve growth factor: findings in animal models and humans*. Pharmacol Biochem Behav, 2002. **73**(1): p. 159-66.
68. Zenclussen AC, Joachim R, Hagen E, et al., *Heme oxygenase is downregulated in stress-triggered and interleukin-12-mediated murine abortion*. Scand J Immunol, 2002. **55**(6): p. 560-9.
69. Joachim RA, Quarcoo D, Arck PC, et al., *Stress enhances airway reactivity and airway inflammation in an animal model of allergic bronchial asthma*. Psychosom Med, 2003. **65**(5): p. 811-5.
70. Arck PC, Handjiski B, Peters EM, et al., *Stress inhibits hair growth in mice by induction of premature catagen development and deleterious perifollicular inflammatory events via neuropeptide substance P-dependent pathways*. Am J Pathol, 2003. **162**(3): p. 803-14.
71. Peters EM, Kuhlmei A, Tobin DJ, et al., *Stress exposure modulates peptidergic innervation and degranulates mast cells in murine skin*. Brain Behav Immun, 2005. **19**(3): p. 252-62.

72. Pavlovic S, Daniltchenko M, Tobin DJ, et al., *Further exploring the brain-skin connection: stress worsens dermatitis via substance P-dependent neurogenic inflammation in mice*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(2): p. 434-46.
73. Joachim RA, Kuhlmei A, Dinh QT, et al., *Neuronal plasticity of the "brain-skin connection": stress-triggered up-regulation of neuropeptides in dorsal root ganglia and skin via nerve growth factor-dependent pathways*. J Mol Med, 2007.
74. Peters EM, Handjiski B, Kuhlmei A, et al., *Neurogenic inflammation in stress-induced termination of murine hair growth is promoted by nerve growth factor*. Am J Pathol, 2004. **165**(1): p. 259-71.
75. Arck PC, Handjiski B, Hagen E, et al., *Indications for a 'brain-hair follicle axis (BHA)': inhibition of keratinocyte proliferation and up-regulation of keratinocyte apoptosis in telogen hair follicles by stress and substance P*. FASEB J, 2001. **15**(13): p. 2536-8.
76. Arck PC, Handjiski B, Kuhlmei A, et al., *Mast cell deficient and neurokinin-1 receptor knockout mice are protected from stress-induced hair growth inhibition*. J Mol Med, 2005. **83**(5): p. 386-96.
77. Peters EM, Arck PC, Paus R, *Hair growth inhibition by psychoemotional stress: a mouse model for neural mechanisms in hair growth control*. Exp Dermatol, 2006. **15**(1): p. 1-13.
78. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
79. Katayama M, Aoki E, Suzuki H, et al., *Foot shock stress prolongs the telogen stage of the spontaneous hair cycle in a non-depilated mouse model*. Exp Dermatol, 2007. **16**(7): p. 553-60.
80. Paus R, Heinzelmann T, Schultz KD, et al., *Hair growth induction by substance P*. Lab Invest, 1994. **71**(1): p. 134-40.
81. Peters EM, Maurer M, Botchkarev VA, et al., *Kit is expressed by epithelial cells in vivo*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(5): p. 976-84.
82. Wolbach SB, *The hair cycle of the mouse and its importance in the study of sequences of experimental carcinogenesis*. Ann N Y Acad Sci, 1951. **53**(3): p. 517-36.
83. Dry FM, *The Coat of the Mouse (Mus Musculus)*. J Genet, 1926(16): p. 287-340.
84. Hendrix S, Picker B, Liezmann C, et al., *Skin and hair follicle innervation in experimental models: a guide for the exact and reproducible evaluation of neuronal plasticity*. Exp Dermatol, 2008. **17**(3): p. 214-27.
85. Peters EM, Hendrix S, Golz G, et al., *Nerve growth factor and its precursor differentially regulate hair cycle progression in mice*. J Histochem Cytochem, 2006. **54**(3): p. 275-88.
86. Paus R, Stenn KS, Link RE, *Telogen skin contains an inhibitor of hair growth*. Br J Dermatol, 1990. **122**(6): p. 777-84.
87. Maurer M, Peters EM, Botchkarev VA, et al., *Intact hair follicle innervation is not essential for anagen induction and development*. Arch Dermatol Res, 1998. **290**(10): p. 574-8.
88. Tometten M, Klapp BF, Joachim R, et al., *Nerve growth factor and its functional receptor TrkA are up-regulated in murine decidual tissue of stress-triggered and substance P-mediated abortion*. Am J Reprod Immunol, 2004. **51**(1): p. 86-93.
89. Arck PC, Handjiski B, Peters EM, et al., *Topical minoxidil counteracts stress-induced hair growth inhibition in mice*. Exp Dermatol, 2003. **12**(5): p. 580-90.

90. Joachim RA, Hildebrandt M, Oder J, et al., *Murine stress-triggered abortion is mediated by increase of CD8+ TNF-alpha+ decidual cells via substance P*. Am J Reprod Immunol, 2001. **45**(5): p. 303-9.
91. Arck PC, Slominski A, Theoharides TC, et al., *Neuroimmunology of stress: skin takes center stage*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(8): p. 1697-704.
92. Maggi CA, *The mammalian tachykinin receptors*. Gen Pharmacol, 1995. **26**(5): p. 911-44.
93. Mecklenburg L, Tobin DJ, Muller-Rover S, et al., *Active hair growth (anagen) is associated with angiogenesis*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(5): p. 909-16.
94. Jimenez M, Kameyama K, Maloy WL, et al., *Mammalian tyrosinase: biosynthesis, processing, and modulation by melanocyte-stimulating hormone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(11): p. 3830-4.
95. Nishikawa S, Kusakabe M, Yoshinaga K, et al., *In utero manipulation of coat color formation by a monoclonal anti-c-kit antibody: two distinct waves of c-kit-dependency during melanocyte development*. EMBO J, 1991. **10**(8): p. 2111-8.
96. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA, *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. J Cell Biol, 1992. **119**(3): p. 493-501.
97. Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, et al., *DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*. Genome Biol, 2003. **4**(5): p. P3.
98. Hosack DA, Dennis G, Jr., Sherman BT, et al., *Identifying biological themes within lists of genes with EASE*. Genome Biol, 2003. **4**(10): p. R70.
99. Jimbow K, Chen H, Park JS, et al., *Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo*. Br J Dermatol, 2001. **144**(1): p. 55-65.
100. Sviderskaya EV, Hill SP, Evans-Whipp TJ, et al., *p16(Ink4a) in melanocyte senescence and differentiation*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(6): p. 446-54.
101. Dimri GP, Lee X, Basile G, et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
102. Stavroulaki M, Kardassis D, Chatzaki E, et al., *Exposure of normal human melanocytes to a tumor promoting phorbol ester reverses growth suppression by transforming growth factor beta*. J Cell Physiol, 2007.
103. Rodeck U, Bossler A, Graeven U, et al., *Transforming growth factor beta production and responsiveness in normal human melanocytes and melanoma cells*. Cancer Res, 1994. **54**(2): p. 575-81.
104. Bowen AR, Hanks AN, Allen SM, et al., *Apoptosis regulators and responses in human melanocytic and keratinocytic cells*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(1): p. 48-55.
105. Tomita Y, Maeda K, Tagami H, *Melanocyte-stimulating properties of arachidonic acid metabolites: possible role in postinflammatory pigmentation*. Pigment Cell Res, 1992. **5**(5 Pt 2): p. 357-61.
106. Morelli JG, Yohn JJ, Lyons MB, et al., *Leukotrienes C4 and D4 as potent mitogens for cultured human neonatal melanocytes*. J Invest Dermatol, 1989. **93**(6): p. 719-22.
107. Theos AC, Tenza D, Martina JA, et al., *Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(11): p. 5356-72.

108. Kantheti P, Qiao X, Diaz ME, et al., *Mutation in AP-3 delta in the mocha mouse links endosomal transport to storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles*. *Neuron*, 1998. **21**(1): p. 111-22.
109. Emerit I, Filipe P, Freitas J, et al., *Protective effect of superoxide dismutase against hair graying in a mouse model*. *Photochem Photobiol*, 2004. **80**(3): p. 579-82.
110. Dupin E, Calloni G, Real C, et al., *Neural crest progenitors and stem cells*. *C R Biol*, 2007. **330**(6-7): p. 521-9.
111. Shin MK, Levrone JM, Ingram RS, et al., *The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development*. *Nature*, 1999. **402**(6761): p. 496-501.
112. Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T, *Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes*. *Exp Gerontol*, 2000. **35**(8): p. 927-45.
113. Soma T, Dohrmann CE, Hibino T, et al., *Profile of transforming growth factor-beta responses during the murine hair cycle*. *J Invest Dermatol*, 2003. **121**(5): p. 969-75.
114. Soma T, Ogo M, Suzuki J, et al., *Analysis of apoptotic cell death in human hair follicles in vivo and in vitro*. *J Invest Dermatol*, 1998. **111**(6): p. 948-54.
115. Murphy RC, Gijon MA, *Biosynthesis and metabolism of leukotrienes*. *Biochem J*, 2007. **405**(3): p. 379-95.
116. Horikawa T, Norris DA, Yohn JJ, et al., *Melanocyte mitogens induce both melanocyte chemokinesis and chemotaxis*. *J Invest Dermatol*, 1995. **104**(2): p. 256-9.
117. Slominski A, Wortsman J, Pisarchik A, et al., *Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors*. *FASEB J*, 2001. **15**(10): p. 1678-93.
118. Peters EM, Hansen MG, Overall RW, et al., *Control of human hair growth by neurotrophins: brain-derived neurotrophic factor inhibits hair shaft elongation, induces catagen, and stimulates follicular transforming growth factor beta2 expression*. *J Invest Dermatol*, 2005. **124**(4): p. 675-85.
119. MacDougald OA, Burant CF, *The rapidly expanding family of adipokines*. *Cell Metab*, 2007. **6**(3): p. 159-61.
120. Monzillo LU, Hamdy O, Horton ES, et al., *Effect of lifestyle modification on adipokine levels in obese subjects with insulin resistance*. *Obes Res*, 2003. **11**(9): p. 1048-54.
121. Krasagakis K, Garbe C, Eberle J, et al., *Tumour necrosis factors and several interleukins inhibit the growth and modulate the antigen expression of normal human melanocytes in vitro*. *Arch Dermatol Res*, 1995. **287**(3-4): p. 259-65.
122. Swope VB, Abdel-Malek Z, Kassem LM, et al., *Interleukins 1 alpha and 6 and tumor necrosis factor-alpha are paracrine inhibitors of human melanocyte proliferation and melanogenesis*. *J Invest Dermatol*, 1991. **96**(2): p. 180-5.
123. Deetjen P, Speckmann E-J, *Physiologie*. 3 ed, ed. U. Fischer. 1999, München: Deetjen, P, Speckmann, E-J.
124. Klappacher GW, Lunyak VV, Sykes DB, et al., *An induced Ets repressor complex regulates growth arrest during terminal macrophage differentiation*. *Cell*, 2002. **109**(2): p. 169-80.
125. Slominski A, Zbytek B, Semak I, et al., *CRH stimulates POMC activity and corticosterone production in dermal fibroblasts*. *J Neuroimmunol*, 2005. **162**(1-2): p. 97-102.

126. Slominski A, Zbytek B, Szczesniowski A, et al., *CRH stimulation of corticosteroids production in melanocytes is mediated by ACTH*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(4): p. E701-6.
127. Riley PA, *Radicals in melanin biochemistry*. Ann N Y Acad Sci, 1988. **551**: p. 111-9; discussion 119-20.
128. Song IS, Bunnett NW, Olerud JE, et al., *Substance P induction of murine keratinocyte PAM 212 interleukin 1 production is mediated by the neurokinin 2 receptor (NK-2R)*. Exp Dermatol, 2000. **9**(1): p. 42-52.
129. Schallreuter KU, Bahadoran P, Picardo M, et al., *Vitiligo pathogenesis: autoimmune disease, genetic defect, excessive reactive oxygen species, calcium imbalance, or what else?* Exp Dermatol, 2008. **17**(2): p. 139-40; discussion 141-60.
130. Sravani PV, Babu NK, Gopal KV, et al., *Determination of oxidative stress in vitiligo by measuring superoxide dismutase and catalase levels in vitiliginous and non-vitiliginous skin*. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2009. **75**(3): p. 268-71.
131. Arican O, Kurutas EB, *Oxidative stress in the blood of patients with active localized vitiligo*. Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat, 2008. **17**(1): p. 12-6.
132. Kang JH, Kim CS, Han IS, et al., *Capsaicin, a spicy component of hot peppers, modulates adipokine gene expression and protein release from obese-mouse adipose tissues and isolated adipocytes, and suppresses the inflammatory responses of adipose tissue macrophages*. FEBS Lett, 2007. **581**(23): p. 4389-96.
133. Maggi CA, Meli A, *The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons*. Gen Pharmacol, 1988. **19**(1): p. 1-43.
134. Luger TA, *Neuromediators--a crucial component of the skin immune system*. J Dermatol Sci, 2002. **30**(2): p. 87-93.
135. Gross K, Karagiannides I, Thomou T, et al., *Substance P Promotes Expansion of Human Mesenteric Preadipocytes Through Proliferative and Anti-Apoptotic Pathways*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009.
136. Scott G, Leopardi S, Printup S, et al., *Proteinase-activated receptor-2 stimulates prostaglandin production in keratinocytes: analysis of prostaglandin receptors on human melanocytes and effects of PGE2 and PGF2alpha on melanocyte dendricity*. J Invest Dermatol, 2004. **122**(5): p. 1214-24.
137. Spiteller G, *Do changes in the cell membrane structure induce the generation of lipid peroxidation products which serve as first signalling molecules in cell to cell communication?* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2002. **67**(2-3): p. 151-62.
138. Katayama I, Nishioka K, *Substance P augments fibrogenic cytokine-induced fibroblast proliferation: possible involvement of neuropeptide in tissue fibrosis*. J Dermatol Sci, 1997. **15**(3): p. 201-6.
139. Kimball ES, Fisher MC, *Potentiation of IL-1-induced BALB/3T3 fibroblast proliferation by neuropeptides*. J Immunol, 1988. **141**(12): p. 4203-8.
140. Grabbe J, Welker P, Dippel E, et al., *Stem cell factor, a novel cutaneous growth factor for mast cells and melanocytes*. Arch Dermatol Res, 1994. **287**(1): p. 78-84.
141. Ansel JC, Armstrong CA, Song I, et al., *Interactions of the skin and nervous system*. J Invest Dermatol Symp Proc, 1997. **2**(1): p. 23-6.
142. Okabe T, Hide M, Hiragun T, et al., *Bone marrow derived mast cell acquire responsiveness to substance P with Ca(2+) signals and release of leukotriene*

- B(4) via mitogen-activated protein kinase*. J Neuroimmunol, 2006. **181**(1-2): p. 1-12.
143. Tomita Y, Maeda K, Tagami H, *Histamine stimulates normal human melanocytes in vitro: one of the possible inducers of hyperpigmentation in urticaria pigmentosa*. J Dermatol Sci, 1993. **6**(2): p. 146-54.
144. Tomita Y, Maeda K, Tagami H, *Mechanisms for hyperpigmentation in postinflammatory pigmentation, urticaria pigmentosa and sunburn*. Dermatologica, 1989. **179 Suppl 1**: p. 49-53.
145. Ansel JC, Brown JR, Payan DG, et al., *Substance P selectively activates TNF-alpha gene expression in murine mast cells*. J Immunol, 1993. **150**(10): p. 4478-85.

Anmerkung

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

[Bestandteil der Dissertationen]

Erklärung

„Ich, Katharina Spatz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Stressabhängige Regulation von Proliferation und Apoptose unterschiedlicher Melanozytenpopulationen im murinen Haarfollikel - Ein Modell zur Erforschung der Prämaturen Canities“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum 08.06.2010

Katharina Spatz