

## **1. Einleitung**

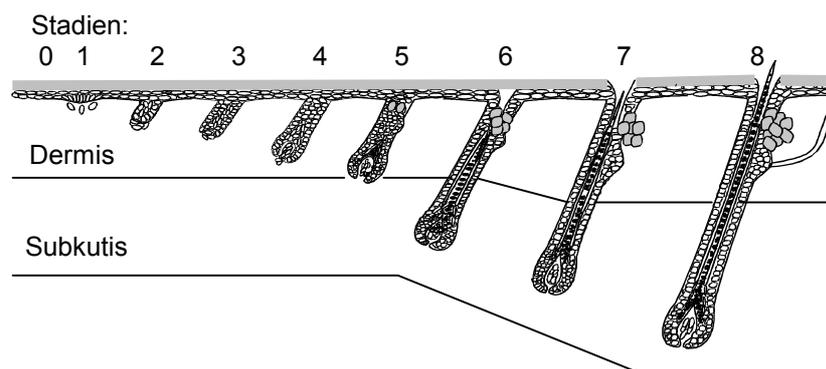
Eine kennzeichnende Besonderheit von Säugetieren ist die Fähigkeit zur Bildung von Haaren. Diese Haarproduktion wird durch Wachstumsfaktoren kontrolliert, von denen der Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF/SF) einer der interessantesten ist, da er eine Vielzahl von Eigenschaften besitzt, die für den Auf- und Abbau eines haarproduzierenden Follikels erforderlich sind. Zur Verbesserung des Verständnis der Regulation des Haarwachstums und dessen krankhaften Veränderungen (Effluvium, Alopezie, Hypertrichose, Hirsutismus), wird in der folgenden Arbeit der Einfluß von HGF/SF auf die Entwicklung und die zyklische Wachstums- und Regressionsaktivität des Haarfollikels untersucht. Über die Haarforschung hinaus kann dabei der Haarfollikel als ideales Modellsystem dienen, in dem die Rolle von HGF/SF in epithelial-mesenchymalen Interaktionssystemen exemplarisch studiert werden kann.

### **1.1 Haarwachstum als Modell für epithelial- mesenchymale Interaktionssysteme**

Haarwachstum ist ein zyklischer Prozeß, der während der gesamten Lebenszeit des Säugetier- Organismus andauert. Jeder Haarfollikel durchläuft dabei ein metabolisch und proliferativ hochaktives Wachstumsstadium (Anagen), eine Regressions- (Katagen) und eine Ruhephase (Telogen) <sup>[1-4]</sup>. Der Eintritt des Haarfollikels in seinen ersten Haarzyklus repräsentiert gleichzeitig den Abschluß der Haarfollikelmorphogenese.

Die Follikelmorphogenese beginnt bei der Maus ungefähr um den Tag 14 post coitum und wird in acht Entwicklungsstadien eingeteilt <sup>[5]</sup>. Zu Beginn der Morphogenese formt sich in der Dermis im Stadium 1 eine mesenchymale Kondensation, die später die Fibroblasten der dermalen Papille bilden. Von diesen Zellen wird das Signal des Mesenchyms an das darüberliegende Epithel gesendet, an dieser Stelle einen Haarfollikel zu bilden <sup>[6]</sup>. Welche Faktoren für die Aggregation mesenchymaler Zellen verantwortlich sind und ob diese vom

Epithel ausgehen, ist bisher ungeklärt [6-10]. Über diesen kondensierten, mesenchymalen Zellen (=spezialisierte Fibroblasten mit morphogenen Eigenschaften) strukturiert sich eine epidermale Verdickung (Haarplakode). In den folgenden Stadien 2 bis 4 wachsen schnell proliferierende Keratinozyten von der Haarplakode in die Dermis ein und umschließen diese Fibroblastenpopulation, die damit zur sogenannten dermalen Papille wird. Dann werden die Wulstregion, die Wurzelscheiden und der Bulbus geformt. Sebozyten formieren sich, um später die Talgdrüse zu bilden und Melanozyten in der Haarmatrix produzieren die ersten Melaningranula (Stadium 5). Die Produktion des ersten Haarschaftes ist im Stadium 6 zu beobachten und wenn dieser die Epidermis durchbrochen hat, ist das letzte Stadium der Follikelmorphogenese abgeschlossen [6, 11].



**Abbildung 1: Schematisch Darstellung der Haarfollikelmorphogenese (verändert nach [5])**

Beendet wird dieser Wachstumsprozeß mit dem Eintritt in die Regressionsphase (Katagen), die –entgegen verbreiteter Fehlvorstellungen– den ersten Haarzyklus einleitet [12].

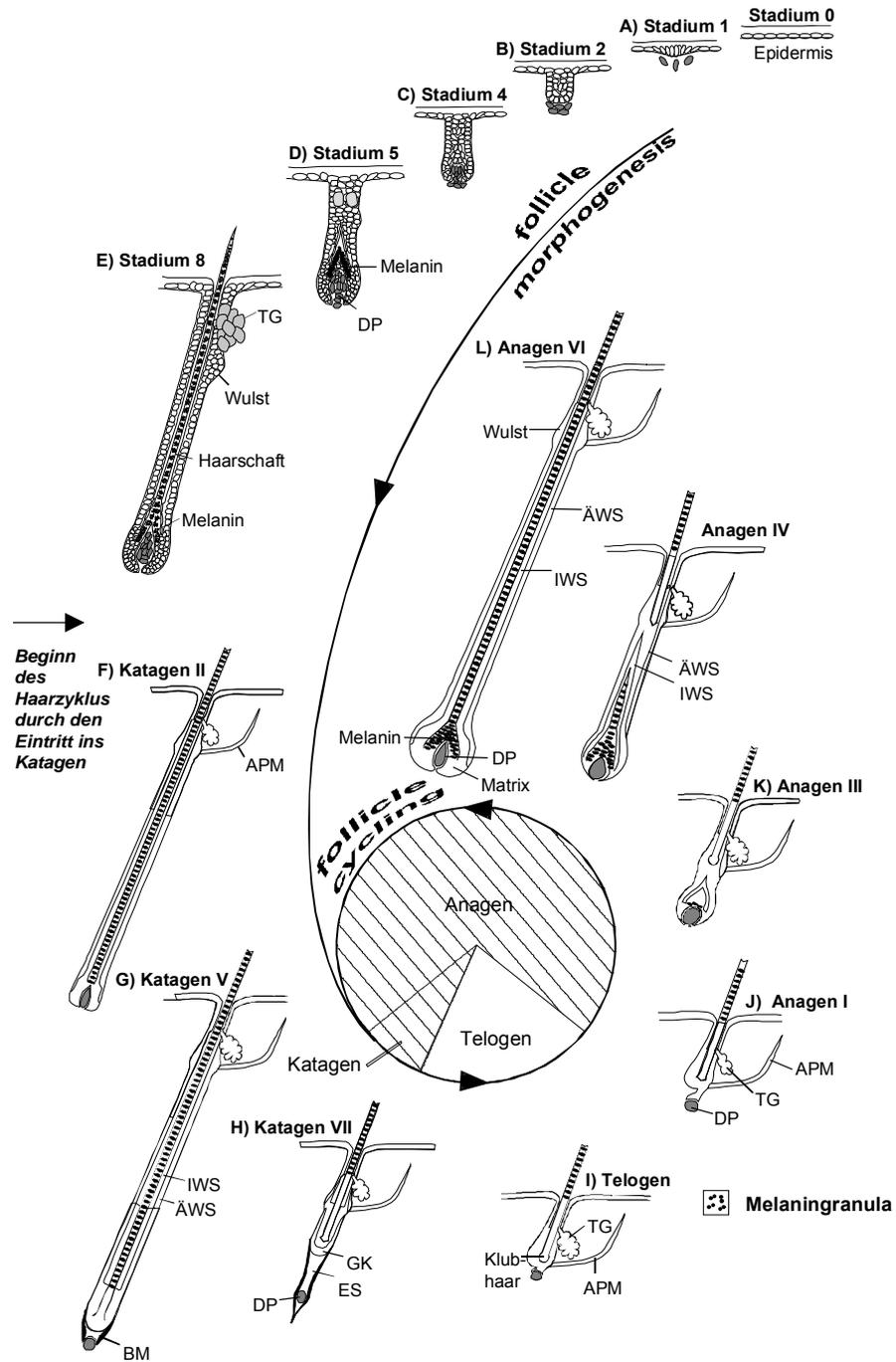


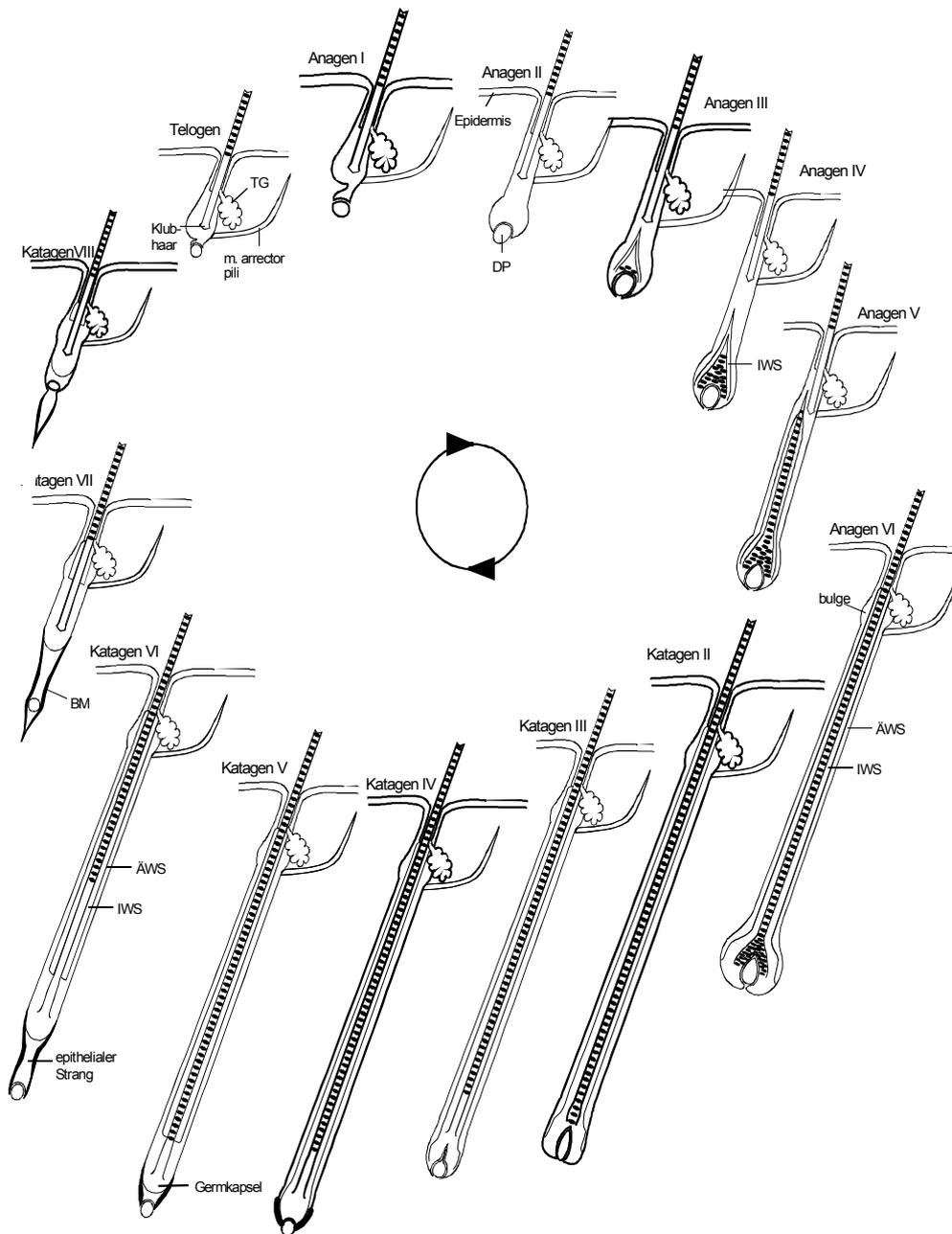
Abbildung 2: Schematische Darstellung ausgewählter Stadien der Haarfollikelmorphogenese und des darauffolgenden Haarzyklus (modifiziert nach [3]).

Abkürzungen: APM - arrector pili Muskel, BM – Basalmembran, DP -dermale Papille, ES – epithelialer Strang, HM – Haarmatrix, IWS und ÄWS – innere- und äußere Wurzelscheide, TD – Talgdrüse, GK – Germkapsel

Die rapide Rückbildung des proximalen Haarfollikelepithels im Katagen ist streng kontrolliert und wird maßgeblich durch zeitlich und örtlich genau regulierte Keratinozyten-Apoptose hervorgerufen [13-15]. Nur ein geringer Anteil an epithelialen Zellen des proximalen Follikels bleiben während dieser Organinvolution als Vorläufer-Population (Stammzellen) für die Produktion eines neuen Haarschaftes im nachfolgenden Haarzyklus erhalten [3, 6].

Nach vollendeter Regression verweilt der Haarfollikel für mehrere Wochen im Telogen. Im Telogenfollikel liegen die epithelialen Stammzellen (mit ihrer besonders niedrigen Teilungsrate) unterhalb der Talgdrüse (Wulstregion) in direkter Nachbarschaft zur dermalen Papille [16]. Zu Beginn eines neuen Haarzyklus senden wahrscheinlich die Fibroblasten der dermalen Papille –bisher noch unbekannte– Signale, die von einigen Stammzellen der Wulstregion aufgenommen werden und daraufhin mit der Entsendung einer rasch proliferierenden Tochterzell-Generation („transient amplifying cells“) reagieren [2, 12].

Aus dem kleineren Telogenfollikel entwickelt sich dadurch über mehrere Zwischenstadien ein Haarschaft-produzierender Anagenfollikel mit einem mehrfachen der vorherigen Größe. Die Wachstumsphase des Haarzyklus (Anagen) ähnelt morphologisch stark der Haarfollikel-Morphogenese, wobei die Follikelstruktur im Haarzyklus periodisch re-organisiert wird [6, 17].



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des gesamten murinen Haarzyklus.**

Abkürzungen: BM – Basalmembran, DP -dermale Papille, IWS und ÄWS – innere- und äußere Wurzelscheide, TG – Talgdrüse.

Die induktiven Signale und deren Wirkmechanismen während der Haarfollikelmorphogenese sind ebensowenig aufgeklärt wie die "Schrittmacher" des Haarzyklus. Diese biologische Uhr scheint weniger durch äußere Faktoren

(z.B. systemisch zirkulierende Hormone) als durch follikelintrinsische Signale angetrieben und kontrolliert zu werden, die integrale Bestandteile eines bidirektionalen Kommunikationssystems zwischen Haarfollikelepithel und -mesenchym darstellen [3, 6, 7, 10, 12, 18, 19].

Ein Großteil der beim Menschen auftretenden Haarwachstumsstörungen ist vor allem auf Anomalien der Haarzyklusregulation zurückzuführen (vereinfacht: das Anagen ist entweder zu kurz, was zu Effluvium und/oder Alopezie führt, oder zu lang, was mit Hypertrichose/Hirsutismus assoziiert ist). Daher ist die Identifizierung der Schlüsselsignale des epithelial-mesenchymalen Interaktionssystems, das sowohl die Haarfollikelentwicklung als auch den Haarzyklus determiniert, von großer klinischer Bedeutung [3]. Diese Signale müssen als sehr wirkungsvolle Morphogene operieren, da sie offenbar nicht nur den Haarfollikelaufbau während der Morphogenese und des Zyklus steuern, sondern bei Entzug auch eine kritische Rolle bei der Katageninduktion –und damit auch der Apoptose von Keratinozyten– haben [3, 14, 15].

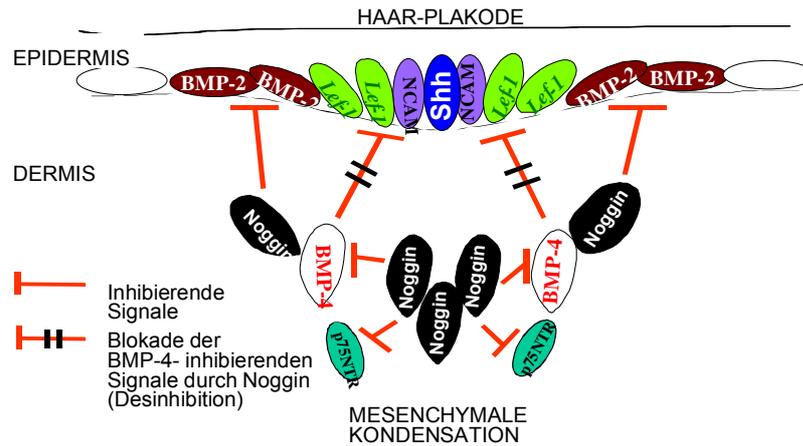
Bisher sind bereits einige Faktoren –z.B. Mitglieder der TGF- $\beta$ / BMP-Familie, sonic hedgehog (Shh), Lef-1, noggin sowie  $\beta$ -catenin– als wichtige molekulare Signale für die Follikelentwicklung und die Haarzykluskontrolle identifiziert worden, auch wenn ihre genaue Rolle und die exakte Choreographie der bei der Haarfollikelentwicklung und beim Haarzyklus entscheidenden Signalschleifen zwischen Epithel und Mesenchym bisher nicht aufgeklärt werden konnten [7-9, 10, 19-21].

**Tabelle 1: Molekulare Protagonisten der Haarwuchskontrolle\***

<i>Faktoren</i>	<i>Wirkspektrum</i>
EGF	Inhibiert Follikelentwicklung (N), induziert Katagen (A)
TGF- $\alpha$	stimuliert Proliferation von Bulbuskeratinozyten (N), stimuliert proteolytische Aktivitäten von Haarfollikeln (N)
NGF	Follikelentwicklung (H), Aufbau des perifollikulären Nervenplexus (?)
TGF- $\beta$ -Familie	Follikelentwicklung (N), Matrixkeratinozyten- differenzierung (N), Haarzyklusregulation (?)
FGF-Familie	Follikelentwicklung (N). Haarzyklusregulation (N, A), z.B. bFGF: Inhibition der Follikelentwicklung (N), z.B. FGF-5: Katageninduktion (N)
TNF- $\alpha$	Stimuliert Haarzyklus-abhängige Proteolyse (N), Überexpression: Haarwuchsretardierung (N)
HGF/SF	stimuliert Proliferation von Bulbuskeratinozyten (N, H) und Follikelwachstum <i>in vitro</i> (N, A)
sonic hedgehog (Shh)	Follikelentwicklung (N, A), Anageninduktion (N)
Lef-1/ $\beta$ -catenin	Follikelentwicklung (N, A)
Noggin	Follikelentwicklung (N, A)
IL-6/ IL-1	Anageninduktion und/oder Katageninhibition (N)
Neurotrophine (NT-3)	Katageninhibition (N)
Androgene	Ausbildung der Sexual- und Körperbehaarung (H), Katageninduktion in bestimmten Skalphaarfollikeln (H) Hirsutismus (bei Frauen)
Östrogene	Katageninhibition (H)
Thyroxin	Katageninduktion (H), auch Anageninduktion (H)
Prolaktin	Körperbehaarung (H): Anageninduktion und/oder Katageninhibition (A), Skalphaarfollikel (H): Katageninduktion, Hirsutismus + Glatzenbildung (bei Frauen)
Retinoide	Follikelentwicklung (N) Anageninduktion und/oder Katageninhibition (N)
Calcitriol	Haarzyklusregulation (?)
ACTH	Hypertrichose (H),
Substance P	Anageninduktion (N)

\* Auswahl aus [2-4, 12, 18] Abkürzungen: (H) = beim Menschen; (N) = bei Nagetieren; A = bei einer anderen Säugetierspezies; (?) = wahrscheinlich, aber nicht gesichert

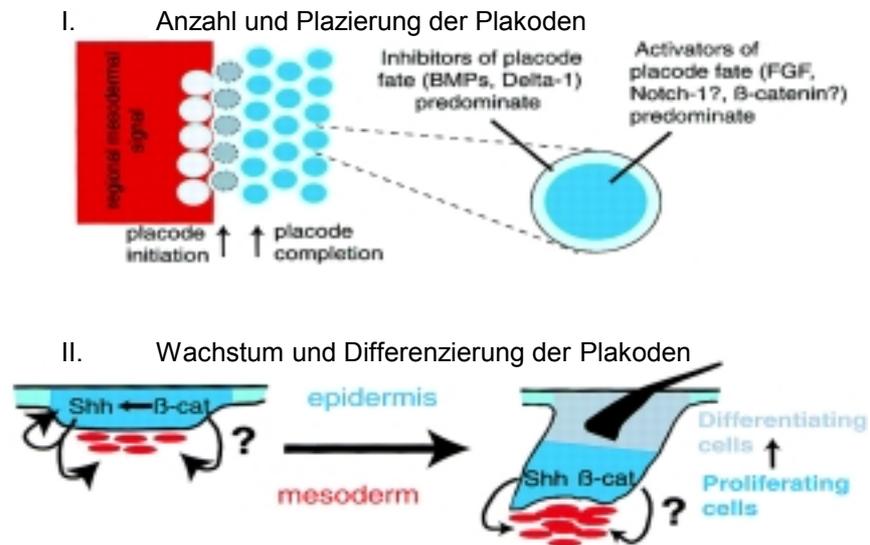
Exemplarisch für die z.Zt. geführte Diskussion zu diesem Thema sind hier zwei kürzlich postulierte Szenarien der Haarfollikelinduktion dargestellt.



**Abbildung 4A:**

**Schematische Darstellung postulierter Szenarien der Haarfollikelinduktion.**

Das mesenchymal sezernierte Noggin wirkt antagonistisch auf die inhibitorische Aktivität von BMP-4 und auf BMP-2 und stimuliert mit Hilfe dieses Desinhibitions-Mechanismus die Expression von Lef-1 und NCAM -und somit die Follikelentwicklung. Modifiziert nach [7].



**Abbildung 4B:**

**Schematische Darstellung postulierter Szenarien der Haarfollikelinduktion.**

I. Die Verteilung der Plakoden wird durch ein mesenchymales Signal bestimmt, das gleichzeitig die Produktion von aktivierenden (z.B. FGF,  $\beta$ -catenin) und inhibitorischen Faktoren (z.B. BMP's) im darüberliegenden Epithel veranlaßt. Die Plakoden werden dort geformt, wo die Aktivatoren die Inhibitoren übertreffen.

II. Nachdem die Plakode geformt wurde, induziert  $\beta$ -catenin die Expression von Shh, welches für Proliferation und Differenzierung des sich entwickelnden Follikels verantwortlich ist. Modifiziert nach [8].

Die Haarzykluskontrolle erfolgt sehr wahrscheinlich durch Umschaltungen des intra- und perifollikulären Signalmilieus (vergl. [3, 9]), deren organisierendes chronobiologisches System allerdings umstritten bleibt [18].

Ein idealer Kandidat für ein Haarwuchs-kontrollierendes Morphogen sollte nicht nur die Fähigkeit besitzen, im Zielgewebe mittels Proliferation, Differenzierung und Apoptose komplexe organisatorische Umgestaltungen zu induzieren, sondern sollte ebenso in der Lage sein, den Umbau der extrazellulären Matrix sowie die Angiogenese zu regulieren. Diese zellulären Veränderungen sind essentielle Schlüsselphänomene während der Haarwachstumsinitiation, -entwicklung und -termination [3, 4, 9, 18, 22].

Der Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF/SF) erscheint aufgrund seines einzigartigen Spektrums von biologischen Eigenschaften ein besonders interessanter Kandidat als eines dieser viel-gesuchten Follikel-Morphogene zu sein.

## **1.2 Der Hepatozyten-Wachstumsfaktor**

### **1.2.1 Entdeckung**

HGF (engl.: hepatocyte growth factor), ist das Paradebeispiel eines pleiotropischen Faktors mit multiplen Funktionen in epithelial-mesenchymalen Interaktionssystemen. Er wurde von Nakamura et al. als wachstumsförderndes Protein für epitheliale Leberzellen (Hepatozyten) isoliert [23]. Unabhängig davon konnte der Faktor in Stoker's Labor als ein von Fibroblasten sezerniertes Protein entdeckt werden, das die Fähigkeiten besaß, Verbände von Epithelzellen zu trennen und deren Dissoziation durch zentrifugale Migration einzelner Zellen ("scattering") zu initiieren (engl.: scatter factor) [24, 25]. Dies führte zum Doppelnamen HGF/SF, nachdem bestätigt werden konnte, daß es sich um ein und dasselbe Protein handelte [26, 27].

## 1.2.2 Struktur und Aktivierung

Der HGF/SF-Genlokus befindet sich auf dem Chromosom 7q11.1-21 (bei der Maus: 3q22) und besteht aus 18 Exons und 17 Introns mit einer ungefähren Länge von 70 kb [28, 29].

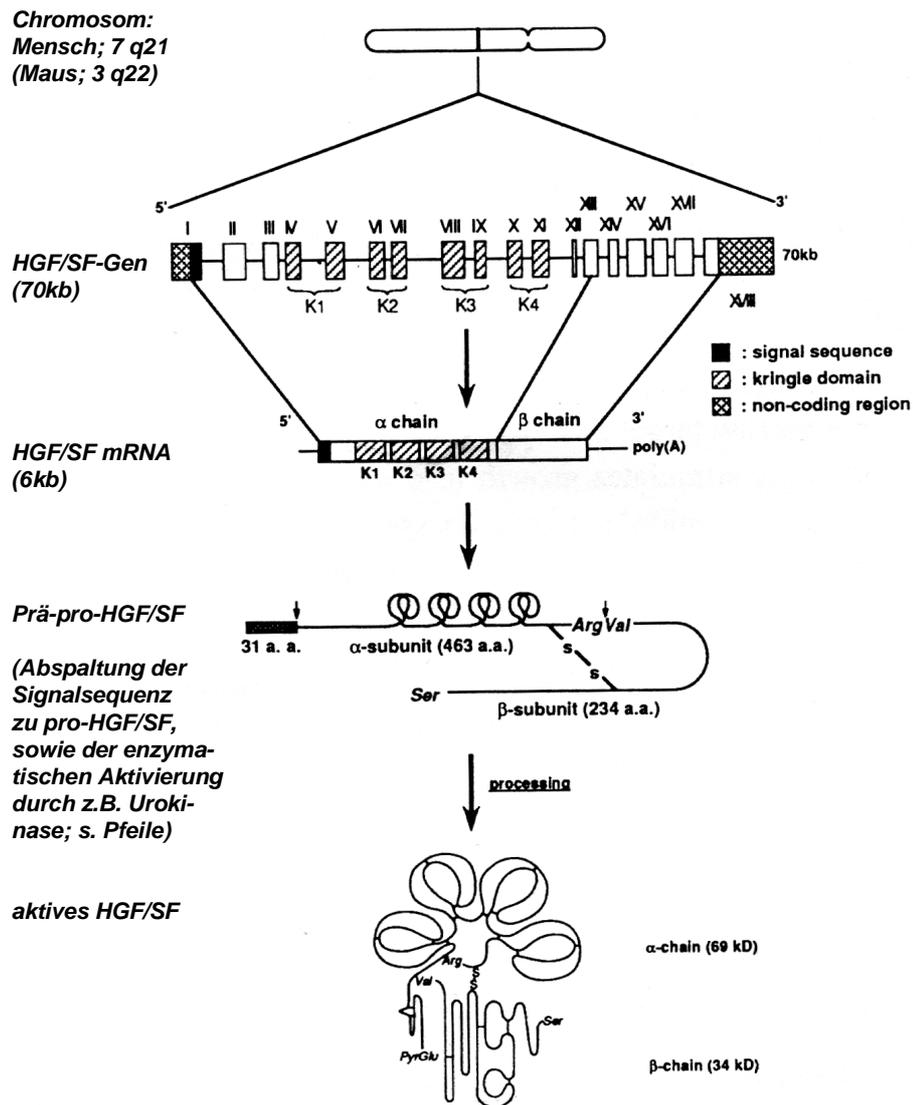


Abbildung 5: Struktur des HGF/SF-Gens, der HGF/SF-mRNA, von prä-pro-HGF/SF und HGF/SF sowie die Prozessierung zum aktiven Signalprotein (modifiziert aus [30])

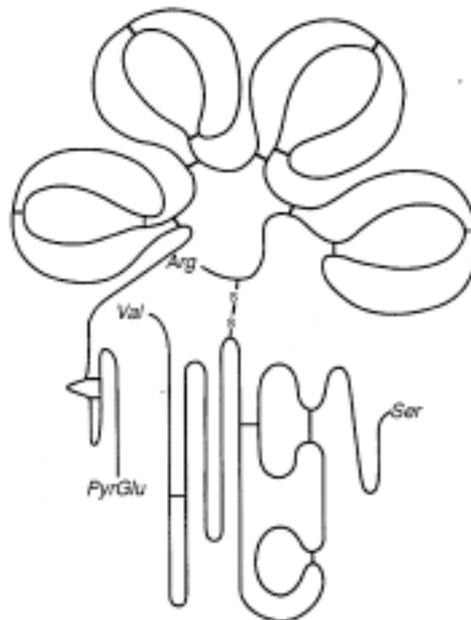
Das 5'-Ende des HGF/SF-Genabschnittes der Maus enthält eine Vielzahl an regulativen Bindungselementen: ein inhibierendes TGF- $\beta$ -Element, vier IL-6-RE's ("Responds elements"), ein cAMP (zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat)-RE, potentielle Bindungsstellen für TNF $\alpha$ , Östrogen, Vitamin D und Transkriptionfaktoren wie dem COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promotor -transcription factor), der zur Steroid/Thyroid-Rezeptorsuperfamilie gehört. Dies läßt darauf schließen, daß besonders auf der Transkriptionsebene eine Vielzahl von Faktoren bei der Regulation der Expression von HGF/SF beteiligt sind [28, 31-34].

Durch alternatives „splicing“ können gewebe- und zelltypspezifische Transkripte unterschiedlicher Länge (6, 3, 2.2 und 1.3 kb) generiert werden [35, 36], deren prozessierte Proteinvarianten abweichende Rezeptor-Bindungseigenschaften haben (s.u.).

Bei der Translation der 6kb-HGF/SF-mRNA entsteht ein 728 Aminosäuren großes, einzelsträngiges Polypeptid (prä-pro-HGF/SF), dessen Primärstruktur zu 90% in Mensch und Nagetier homolog ist [28, 37]. Nach der Abspaltung einer Signalsequenz kann das Vorläuferprotein (pro-HGF/SF) durch unterschiedliche Proteasen in das aktive HGF/SF mit heterodimerer Konformation prozessiert werden (s. Abb 5). Zum Beispiel sind die Proteasen Urokinase, der HGF-Aktivator sowie tPA (gewebespezifischer Plasminogenaktivator) in der Lage das ungeschnittene Protein in eine 69kDa große  $\alpha$ -Kette und eine 34kDa große  $\beta$ -Kette zu spalten. Das aktive, vielfach glykolisierte Protein wird durch eine Disulfidbrückenbindung stabilisiert (s. Abb 5 und 6) [28, 37-39].

Erstaunlicherweise besitzt HGF/SF kaum strukturelle Ähnlichkeit zu anderen bekannten Wachstumsfaktoren. Aufgrund seines molekularen Bauplans wird HGF/SF in die Familie der hochmolekularen, plasminogen-ähnlichen Peptide eingeordnet. Tatsächlich besitzt HGF/SF große strukturelle Analogien zu Plasminogen, einer für die Blutgerinnung essentiellen Protease [36, 39-44].

Neben der Intron/Extron- Abfolge und der proteolytischen Aktivierung ähneln sich auch die Konformationen der mehrfach angeordneten "Kringeldomänen" und einer "hairpin loop"-Struktur der  $\alpha$ -Kette und einer Serinprotease in der  $\beta$ -Kette (s. Abb 5 und 6). Neben der Anzahl der "Kringeldomänen" (4 gegenüber 5 beim Plasminogen) und der durch Punktmutationen inaktiven Serinprotease unterscheidet sich HGF/SF vom Plasminogen besonders in der hochaffinen Bindung zum Rezeptor Met [29, 39]. In diesem Zusammenhang scheint HGF/SF ein besonders interessantes Modellprotein für die Untersuchung der Proteinevolution zu sein, denn anhand seiner Molekülstruktur könnte man die Funktionsanpassung eines reinen Enzyms bishin zum signalübertragenden Transmittermolekül nachvollziehen [39].



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der hypothetischen Tertiärstruktur von HGF/SF.** Die 4 "Kringeldomänen" und der "hairpin loop" sind die Hauptcharakteristika der glykosylierten  $\alpha$ -Kette, die über eine Disulfidbindung (Cys487/Cys604) mit der  $\beta$ -Kette, einer inaktiven Serin-Protease, verbunden ist (modifiziert aus [30]).

Durch das o.g. alternative splicing können drei unterschiedliche Isoformen gebildet werden [45, 46], die nach ihrer Länge vom N-Terminus bis zu den jeweiligen „Kringeldomänen“ unterschieden werden (NK-1 mit einer

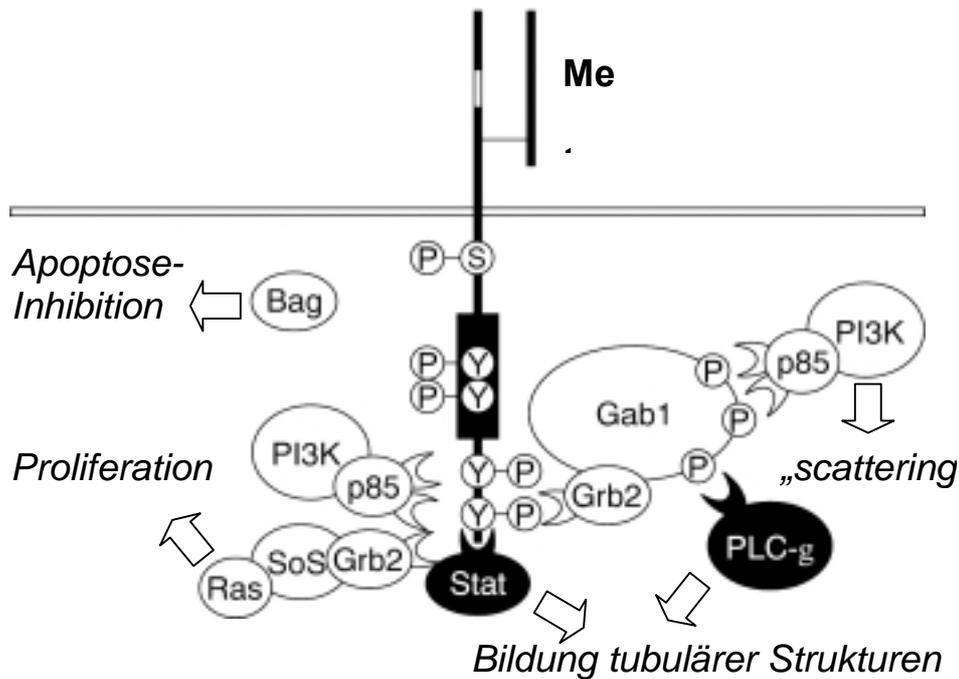
Kringeldomäne, bzw. NK-2 mit zwei Kringeldomänen, sowie dHGF/SF mit den gleichen Eigenschaften von HGF/SF, aber mit fünf Aminosäuren weniger). NK-1 und NK-2 können gewebespezifisch und durch Bindung an Glykosaminoglykanen sowohl partiell agonistisch –z. B. nur Proliferation oder nur Motilität induzieren (s.u.)– als auch antagonistisch zu HGF/SF wirken [28, 29, 39, 47]. Daneben gibt es eine Vielzahl von synthetisch hergestellten Varianten von HGF/SF, von denen z.B. NK-4 als effektiver Antagonist zu der durch HGF/SF- induzierten Motilität und Migration von Tumorzellen *in vitro* beschrieben wird [48-50]. Die Bindung an Heparin über die „hairpin“-Struktur verursacht die Dimerisation von HGF/SF und kann so die Bindungsaffinität zum Rezeptor Met erhöhen [43].

### 1.2.3 HGF/SF-Rezeptor

HGF/SF bindet mit hoher Affinität an das Produkt des Protoonkogens c-met (Chromosom 7q 31) [36]. Der Rezeptor Met ist eine transmembrane Tyrosinkinase bestehend aus einer 145-kD  $\beta$ - und einer 50kD  $\alpha$ -Untereinheit, die durch Disulfidbrückenbindungen stabilisiert werden [51-53]. Die C-terminale  $\beta$ -Kette durchspannt den Transmembranbereich einfach und besitzt an seiner zytoplasmatischen Einheit neben der Proteinkinase und einer Autophosphorylierungsstelle einen Mehrfachbindungsbereich, der bei Rezeptordimerisation –als Folge einer Ligandbindung– aktiviert wird (s. Abb 7). Eine folgende Transphosphorylierung mit einhergehender Konformationsänderung ermöglicht die Bindung zahlreicher Kopplungsproteine mit SH2-Bindungsmotiv wie u.a. PI3-Kinase, Ras, PLC- $\gamma$  und dem GRB-2-Adaptermolekül Gab-1 [54-58].

Die Aktivierung der Ras/MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Kaskade stimuliert die Zellproliferation [59], die Aktivierung von Rac und der Phosphatidylinositol-3-OH Kinase führt hingegen zu Zelldissoziation („scattering“) und Zellmigration [60]. Beide Wege müssen ko- stimuliert werden,

um invasives Zellwachstum anzuregen [29, 61]. Der Stat-Signaltransduktionsweg ist in Verbindung mit der PLC- $\gamma$  z.B. für die Bildung von Tubulusstrukturen [62] und die Bindung von Bag-1 für die Inhibition von Apoptose erforderlich [58, 63, 64] (s. Abb 7).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Rezeptor-Tyrosinkinase Met mit den intrazellulären Bindungsstellen für Signal-transduzierende Proteine (verändert nach [38]).**

#### 1.2.4 Funktionelle Effekte

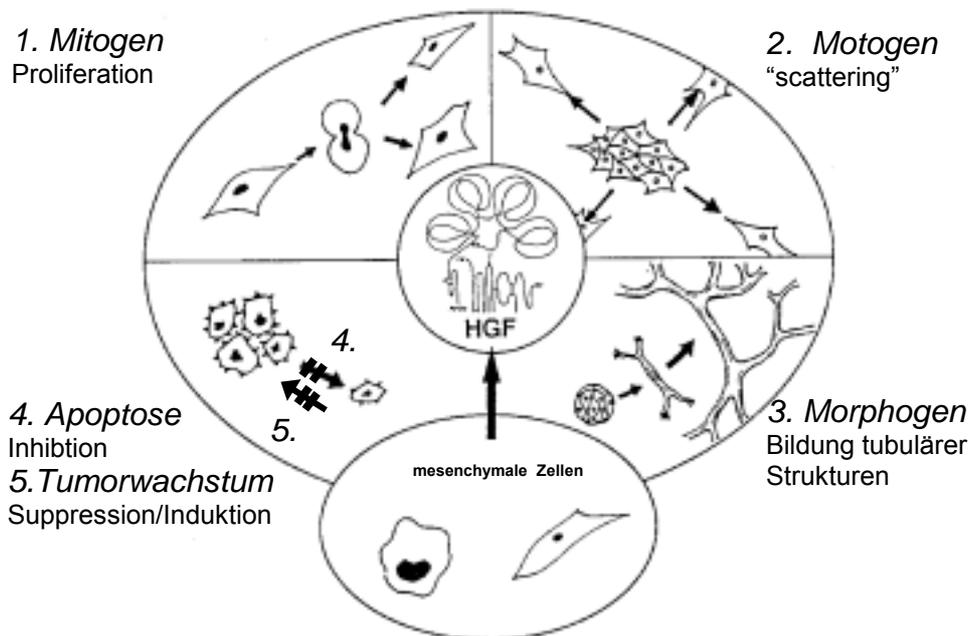
Der Hepatozyten-Wachstumsfaktor und sein korrespondierender Rezeptor Met werden als vielseitige Modulatoren der Zellproliferation, -differenzierung, -migration und der Homöostase des Zellbestands in einer Vielzahl von Säugetierorganismen während mesenchymal-epidermaler Wechselwirkungen bei physiologischen und pathologischer Vorgängen beschrieben (s. Tabelle 2 und Abb 8.) [38, 39, 43].

Unter physiologischen Bedingungen wird HGF/SF mesenchymal sezerniert und

agiert hauptsächlich parakrin auf umliegende Epithel- und Endothelzellen sowie Melanozyten, die den Met-Rezeptor exprimieren [28, 29, 39].

**Tabelle 2: Zusammenfassung funktioneller Effekte von HGF/SF**

<b>Funktionelle Effekte von HGF/SF</b>	<b>Zelltyp/Organ/Spezies</b>	<b>Literatur</b>
Zellwachstum/ Proliferation	Hepatozyten (Mensch, Nagetier, Hund, Schwein) Melanozyten (Mensch, Nagetier) Keratinocyten (Mensch, Nagetier) Endothelzellen (Nagetier) Brustdrüsenepithelzellen	[23, 30, 37] [30, 35, 65,67] [65, 66] [69] [31, 32]
Zellmigration/ Matrix-Umbau	Hepatozyten (Mensch) Keratinocyten (Mensch) Melanozyten (Mensch) Nierenzellen (MDCK [Madin-Darby canine kidney], Hund) Monozyten (J-111, Mensch)	[30, 65, 66] [35] [30] [30,46] [66]
Apoptose-Inhibition	Keratinocyten (Mensch) Hepatozyten (Nagetier) Nierenzellen (HKC, Mensch)	[68] [64]
Angiogenese/ Wundheilung	Endothelzellen (Mensch, Schwein, Nagetier) Keratinocyten (A431, Mensch)	[36, 69-71]
Umbau im Zytoskelett	T-Zellen (Mensch)	[30]
Zellpolarisierung/ epitheliale Morphogenese/ Tubulustrukturen	Brustdrüsenepithelzellen (MCF-10A) Endothelzellen (HUVE, Mensch) Nierenzellen (MDCK, Hund)	[31, 32] [24, 46, 62 ]
Wachstumsinhibition maligner Zellen	B-Lymphoblasten (Mensch) Hepatoma cells (HepG2) Melanomazellen(B6/F1)	[30, 66]
Organregeneration/ Organogenese	Leber, (Nagetier), Niere (Nagetier) Lunge (Nagetier), Milz (Nagetier), Prostata (Nagetier), Skelettmuskel (Nagetier)	[30, 39, 42, 52, 53, 72]



**Abbildung 8: Schematische Zusammenfassung der pleiotropen Eigenschaften von HGF/SF.** HGF/SF wirkt als 1. Mitogen (Stimulation von Zellwachstum /Proliferation/ DNA-Synthese), 2. Motogen (Anregung zur Zellbewegung/Dissoziation), 3. Morphogen (Bildung Epithel-ähnlicher Strukturen) 4. Apoptose-Inhibitor und 5. Suppressor invasiver Tumorzellen (im Uhrzeigersinn, modifiziert nach <sup>[72]</sup>).

Die Bedeutung einer koordinierten Expression von HGF/SF und Met zeigt sich speziell während der Embryonalentwicklung bei HGF/SF-überexprimierenden Mäusen unter der Kontrolle des Metallothionein-1-Promoters, die ausgeprägte Störungen der Skelettentwicklung, der Migration von Zellen der Neuralleiste sowie der Bildung von Melanozyten zeigten. Diese Mäuse bildeten zusätzlich eine Vielzahl an Tumoren unterschiedlicher Gewebe sowohl mesenchymalen als auch epithelialen Ursprungs (s. 1.5.3 und 4.1.2 für Details).

HGF/SF induziert neben der Proliferation, Motilität und Angiogenese <sup>[38, 39, 43]</sup> –allgemein charakteristische Eigenschaften von Tumorzellen– auch die Invasivität einiger Karzinomzelllinien <sup>[46,66]</sup> und veranschaulicht damit die mögliche Beteiligung des HGF/SF-Met-Signalsystems bei der Tumorentstehung und Metastasierung während pathologischer Prozesse.

Zum Beispiel kodiert das humane Onkogen *trp-met* für einen dauerhaft dimerisierten und aktivierten Rezeptor Met mit transformierenden Eigenschaften [61]. Das maligne Entartungen vermutlich auf einen autokrinen Signalmechanismus zurückzuführen sind, verdeutlicht ebenso das invasive Verhalten transformierter Zellen, die Met und HGF/SF ko-exprimieren. [46, 61] .

Neben den zahlreich beschriebenen Wirkspektren von HGF/SF in den unterschiedlichsten Zielgeweben (s. Tabelle 2) sind besonders die folgenden Eigenschaften hervorzuheben, die im Bezug auf die Haarfollikelentwicklung und die Kontrolle des Haarzyklus entscheidend sein dürften: erstens die Stimulation des Wachstums und der Motilität von Keratinozyten *in vitro* [65, 66]. Zweitens die Kontrolle der morphoregulatorischen Bildung von Tubuli im Epithel und Endothel [31, 32]. Drittens die induktiven Fähigkeiten zur Zellmigration und DNA-Synthese von Melanozyten und Keratinozyten, sowie der Melanogenese [35, 67]. Viertens die Apoptose-inhibierende Wirkung bei Keratinozyten [68], sowie fünftens die Stimulation der Angiogenese (erweiterte Blutgefäßbildung) [36, 69-71].

### **1.3 Haarwuchskontrolle durch HGF/SF: Stand der Forschung**

Jindo et al. konnten erstmals HGF/SF-mRNA in kultivierten dermalen Papillen-Zellen nachweisen und eine Wachstumsstimulation von Haarbulbus-Keratinozyten *in vitro* beobachten [73, 74]. Dieselbe Arbeitsgruppe beschrieb humanes HGF/SF als den einzigen Wachstumsfaktor, aus einer Gruppe von 11 Proteinen, der das Haarwachstum von Maus-Vibrissae in Organkultur stimulierte und beschrieben außerdem erste Indizien einer Verzögerung der Rückbildungsphase von Fellhaarfollikeln durch appliziertes HGF/SF [73, 75]. Zudem konnte Yamazaki et al. zeigen, daß die mRNA der HGF/SF-aktivierenden Proteasen Urokinase und des HGF/SF-Aktivators, ebenso wie die

HGF/SF-mRNA in der Wachstumsphase (Anagen) der Haarfollikel von Ratten exprimiert wird [76].

## 1.4 Arbeitshypothese

Diese Studien waren Grundlage für die Hypothese, daß HGF/SF intrafollikulär von Fibroblasten der dermalen Papille produziert wird und durch parakrine Abgabe an die Umgebung das Wachstum von benachbarten Haarfollikel-Keratinocyten stimuliert, bzw. bei einer ausbleibenden Sezernierung die Haarfollikelregression einleitet. HGF/SF ist somit am Auf- und Abbau des Haarfollikels beteiligt und kann durch eine veränderte Expression die Haarfollikelentwicklung bzw. den Haarzyklus beeinflussen.

## 1.5 Verwendete Modellsysteme

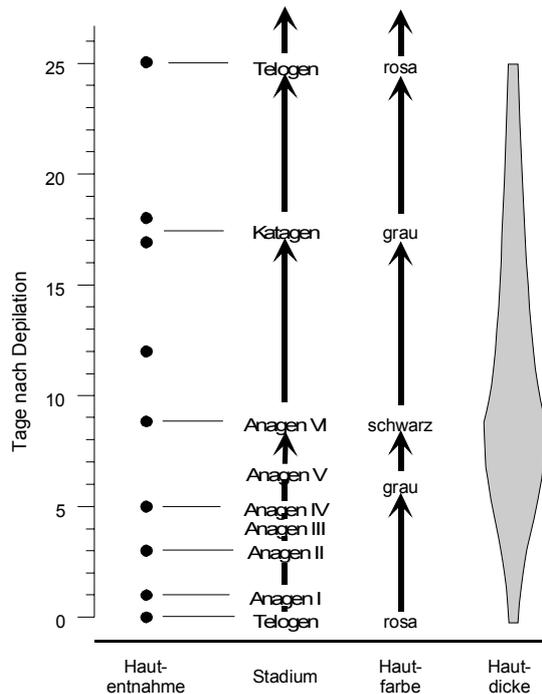
Diese Arbeitshypothese wird in der vorliegenden Dissertation anhand verschiedener, dazu besonders geeigneter Modellsysteme untersucht.

### 1.5.1 C57BL/6-Haarforschungsmodell

Einige *In vitro*-Kultivierungstechniken zur Untersuchung der Haarfollikelentwicklung sind angewendet worden [77-79], sie konnten bisher aber *In vivo*-Modelle nicht ersetzen, da es bis heute nicht gelungen ist, sowohl die Haarfollikelmorphogenese als auch einen vollständigen Haarzyklus *in vitro* ablaufen zu lassen. Der C57BL/6- Mausstamm ist in der Haarforschung etabliert [80] und sehr gut charakterisiert [4, 17, 81-85]. Die Standardisierung dieses Modellsystems erlaubt die Generierung reproduzierbarer Daten. Die Follikelmorphogenese läßt sich sowohl an Embryonen als auch an Jungtieren der frühen postnatalen Tage untersuchen, da auch peri- und postnatal alle Morphogenesestadien zu beobachten sind [5].

Der Haarzyklus von jungen C57BL/6-Mäusen ist hochgradig synchronisiert, und alle HF einer größeren Region der Haut befinden sich in der gleichen Zyklusphase. Dies erlaubt die Untersuchung großer, homogener Follikelpopulationen. Mit 18-20 Tagen Dauer ist der Haarzyklus der Maus im Gegensatz zu dem des Menschen mit 2-6 Jahren relativ kurz. Mittels Depilation der Haarschäfte durch eine Wachs-Harz-Mischung können alle Telogenfollikel in einem behandelten Hautareal synchron in die Wachstumsphase (Anagen) gezwungen werden und durchlaufen daraufhin alle Wachstumsstadien in definierter Zeit <sup>[84]</sup> (s. Abb 9).

Makroskopisch sind die Haarzyklusstadien anhand der Hautfarbe zu unterscheiden, da bei der homogen schwarzen C57BL/6-Maus die pigmentproduzierenden Melanozyten der Rückenhaut ausschließlich im Haarfollikel lokalisiert sind und die Melanogenese der Follikel-Melanozyten auf die Anagenphase des Haarzyklus beschränkt ist <sup>[80, 81, 86]</sup>. Die Haut mit Haarfollikeln im Telogen ist rosafarben, während sich die Induktion einer Anagenwelle durch eine graduelle Änderung der Hautfarbe von grau zu schwarz anzeigt. Dies erlaubt die exakte Zuordnung einer Maus zu einem bestimmten Haarzyklusstadium allein durch Beobachtung der Hautfarbe <sup>[3]</sup>.



**Abbildung 9: Synchroner Veränderung von Haut- und Haarparametern während der Depilations-induzierten Anagen-Katagen-Telogen-Transformation bei C57BL/6-Mäusen**

### 1.5.2 Pharmakologische Manipulation des Haarzyklus

Mit systemisch verabreichtem Cyclophosphamid kann eine vorzeitige Katagenentwicklung induziert werden [82, 87]. Die dadurch ausgelöste Alopezie (Haarausfall) geht mit ausgeprägter Follikeldystrophie und einer massiv ansteigenden Apoptoserate einher und bietet ein geeignetes Modellsystem, Apoptose-inhibierende Substanzen *in vivo* zu untersuchen [83, 88]. Neben einer Vielzahl von sezernierten Signalproteinen, die die Apoptoserate herabregulieren können [14, 89], sollte in der vorliegenden Arbeit auch das HGF/SF/Met-Signalsystem in dieser Funktion genauer erforscht werden [63, 64, 90]. Die durch Cyclophosphamid einhergehende dysregulierte Melanogenese kann anhand von ektopisch auftretenden Melaningranula sowie durch immunhistologischer Tyrosinasemarkierung beobachtet werden [82].

Eine pharmakologisch hervorgerufene Haarwachstumsstimulation (=Anagen-induktion) kann durch Cyclosporin A (CsA) erzielt werden [88, 91]. Der Immunophilinligand zeigt diese Haarwuchs-modulierende Effekte sowohl bei Nagetieren, als auch beim Mensch [82, 91]. Da die Vermutung naheliegt, daß das Immunsuppressivum direkt oder indirekt in die Expression von Schlüsselgenen der Haarwachskontrolle eingreift, könnte CsA sich dazu nutzen lassen, die beteiligten Gene zu identifizieren und diese durch weniger toxische Pharmaka direkt zu beeinflussen [3, 82].

Diese beiden pharmakologischen Studien sind vor allem deswegen interessant, da sie klinisch relevante Modelle anbieten, mit denen man zum einen humane Haarwachstumsstörungen (z.B. Chemotherapie-induzierte Alopezie und Telogeneffluvium) untersuchen kann, und zum anderen nähere Informationen zu den Wirkmechanismen von HGF/SF im Rahmen der Anagen- bzw. Katageninduktion gewinnen kann [2, 3, 22].

### **1.5.3 Mausmutanten**

Verfügbare Mausmutanten bieten weitere interessante Möglichkeiten der Exploration von HGF/SF als Haarwuchsmodulator. Die Inaktivierung ("knockout") des HGF/SF- [92] bzw. met-Gens [93] resultiert in embryonaler Letalität aufgrund von Plazenta-Dysfunktionen während der Tage 12.5 -und 16.5 (E 12.5 -16.5) der Embryonalentwicklung. Da die Ausbildung von Follikelansätzen der Körperbehaarung erst frühestens um den embryonalen Tag E 14 beginnt [6] (die Entwicklung der Schnurrbarthaare (Vibrissae) beginnt schon etwas früher) sind klassische "knockout"-Mäuse für umfassende Analysen der HF- Morphogenese und insbesondere des postnatalen Haarzyklus nicht geeignet (in der Zukunft können hier vielleicht vitale, „targeted knockouts“ herangezogen werden). In diesen Tieren können jedoch morphologische Anormalitäten in der frühesten HF Entwicklung bzw. ein Ausbleiben oder eine Verzögerung der Follikelinduktion studiert werden (z.B.

wie bei Neurotrophin-3-, Shh-, TGF $\beta$ 2-, p75NTR- oder noggin- „knockout“-Mäusen [7, 19, 20, 94-96]).

Ein anderes Modellsystem zur Untersuchung des Einflusses von HGF/SF auf das Haarwachstum sind transgene (TG) Mäuse, die HGF/SF überexprimieren. Diese sind im Gegensatz zu "knockout"-Mäusen über viele Wochen lebensfähig und bieten somit die Möglichkeit die gesamte Haarfollikelmorphogenese und einen kompletten Haarzyklus detailliert zu studieren [97]. Die von Prof. Merlino bereitgestellten Mäuse wurden unter der Kontrolle des Metallothionein (MT-1)-Promoter generiert [97, 98]. Das in das Mausgenom eingefügte Transgen führte zu einer starken HGF/SF-Überproduktion innerhalb der Haut. Diese TG Mäuse exprimieren ubiquitär eine charakteristische 2.4kB-RNA in 3-50facher Menge zusätzlich zum endogenen, 6kB-großen HGF/SF Transkript [97, 99].

#### **1.5.4 Hautorgankulturen**

Organkulturen mit funktionstüchtiger Maushaut sind ein besonders wertvolles Modell, da diese im Gegensatz zu Zellkulturen unter physiologisch relevanteren Bedingungen mit nahezu intakter dreidimensionaler Organstruktur und weitgehend erhaltenen epithelial-mesenchymalen Interaktionen arbeiten. Hierbei lassen sich direkte und indirekte Effekte intrinsischer Botenstoffe, extrinsischer Testsubstanzen sowie komplexe interzelluläre Kommunikationsschleifen zwischen interfollikulären Fibroblasten, Mastzellen und Makrophagen einerseits, sowie intrafollikulären Keratinozyten, Fibroblasten und Melanozyten andererseits erfassen [7, 20, 77, 79, 84, 95, 100]. Den Organkulturen aus C57BL/6 Maushaut liegt das Prinzip zugrunde, ein Hautfragment auf einer Luft-Flüssigkeit-Grenzfläche unter angenähert physiologischen Bedingungen wachsen zu lassen, es aber von der Zufuhr durch Blutgefäße und den Einflüssen der Nervenbahnen zu isolieren [77, 84, 100].

## 2. Fragestellung

Folgende Fragestellungen wurden anhand der o.g. Modellsysteme bearbeitet:

- Wird das im Säugetierorganismus in vielen Organsystemen anzutreffende Zytokin-Rezeptor-Paar HGF/SF-Met auch im Haarfollikel exprimiert?
- Wenn ja, ist diese Expression gewebespezifisch, und variiert diese während der einzelnen Stadien der Follikel-Morphogenese und des Haarzyklus?
- Läßt sich diese Expression von HGF/SF und Met mit der Gabe von Cyclophosphamid oder Cyclosporin A verändern?
- Wenn HGF/SF und Met einen Einfluß bei der Kontrolle des Haarwachstums haben, können HGF/SF- und Met- „knockout“- Mäuse überhaupt Haarfollikel aus bilden, und, falls ja, wie ist deren Entwicklung verändert?
- Verändern sich Haarfollikelentwicklung und/oder Haarzyklus bei transgenen Mäusen, die eine stark erhöhte HGF/SF-Expression aufweisen?
- Kann die Haarfollikelregression mit exogen zugeführtem HGF/SF verzögert werden?
- Wenn die Entwicklung der Haarfollikelinvolution inhibiert werden kann, sind HGF/SF und Met an der Kontrolle der massiven Keratinozyten-Apoptose beteiligt, welche der Haarfollikelregression (Katagen) zugrundeliegt?
- Wenn HGF/SF die Transformation von Anagen zu Katagen beeinflussen kann, ist es auch in der Lage bei der Telogen-Anagen-Transformation zu modulieren, d.h. Haarfollikelwachstum zu induzieren bzw. zu beschleunigen?

### 3. Experimentelle Strategie

Da nur unzureichende Informationen über eine mögliche Beteiligung des HGF/SF-Met- Signalsystems bei der Regulation des Haarwachstums vorlagen (s. 1.3), sollte anhand unterschiedlicher Modellsysteme die Rolle von HGF/SF und Met in der Haarfollikelmorphogenese und des -zyklus umfassend analysiert werden.

Mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR von Vollhautextrakten C57BL/6-Mäuse, wurde die HGF/SF- und Met- Genexpression im synchronisierten Haarzyklus ermittelt. Mit der *In situ*-Hybridisierungstechnik und immunhistochemischen Methoden wurden die Expressionsmuster von HGF/SF und Met während aller Stadien der murinen Haarfollikelmorphogenese und des Haarzyklus evaluiert.

Nach pharmakologischen Manipulationen des Haarzyklus durch die Applikation von Cyclosporin A und Cyclophosphamid (induziertes Haarwachstum bzw. Alopezie) wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt, um so eine pharmakologisch induzierte Veränderung der HGF/SF- und Met-Antigenexpression im Haarfollikel zu erfassen.

Die Haut von HGF/SF- bzw. Met-"knockout"- Mäusen, sowie die von HGF/SF überexprimierenden, transgenen Mäusen wurde systematisch auf Veränderungen der Haarfollikelmorphogenese und des Haarzyklus (im Vergleich zu Wildtyp-Tieren) untersucht. Da die Pigmentierung streng an einzelne Haarzyklusstadien gekoppelt ist und HGF/SF als Modulator wichtiger Melanozytenfunktionen bekannt ist, war es außerdem interessant, Unterschiede in der Pigmentablagerung, der Verteilung der Melanozyten und deren HGF/SF-Expression in den transgenen Mäusen zu untersuchen.

Ferner wurde in funktionellen Assays der Effekt einer intradermalen Injektion von rekombinantem HGF/SF *in vivo* und der Supplementierung von HGF/SF in Maushaut-Organokulturen *in situ* auf die spontane Katagenentwicklung

untersucht.

Schließlich wurde der Einfluß auf die Stimulation des Haarfollikelwachstums (Anageninduktion) *in vivo* mittels kutaner Implantation von HGF/SF-gesättigten Agarosekügelchen untersucht.