

4. Methoden

4.1 Tiere

4.1.1 C57BL/6- Mäuse

Sechs bis neun Wochen alte, 15-20 g schwere, weibliche C57BL/6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) im Telogen-Stadium des Haarzyklus wurden in Gemeinschaftskäfigen artgerecht mit 12-stündigen Licht- und Dunkelzyklen unter konstanten klimatischen Bedingungen gehalten und mit Wasser und Mausfutter *ad libitum* ernährt. Die Tierexperimente wurden tierschutzgerecht nach ordnungsgemäß genehmigten Tierversuchsprotokollen in den Versuchstieranlagen der Humboldt-Universität (Biomedizinisches Forschungszentrum der Charité, Virchow-Klinikum) durchgeführt. Für die Untersuchung der neonatalen Haarfollikelentwicklung wurden Embryonen und neugeborene C57/BL6 Mäuse aus eigener Zucht verwendet [84, 91, 100].

4.1.2 Mausmutanten

Für die Generierung HGF/SF- und Met-defizienter Mausmutanten („knockout“-Tiere) wurde die genomische DNA aus embryonalen Stammzellen (Linie E14) isoliert und für die Konstruktion zielgerichteter Vektoren verwendet. Es wurden jeweils das 2. Exon (bei HGF/SF-Mutanten, s. Abb 5) bzw. das Exon zwischen den Nukleotiden 3.254-3.334 (bei Met-Mutanten) mit einer *neo* (Neomycin)-/ TK (Thymidinkinase, aus herpes simplex)- Kasette ausgetauscht. Die Vektoren wurden mit Hilfe der Elektroporation in E14.1-Zellen eingeschleust und die Struktur der mutierten Loci, sowie die Bestätigung des einmaligen Insertionsvorganges mit „Southern“-Hybridisierung nachgewiesen. Je zwei unterschiedliche Klone wurden durch Blastozysten-Injektion in pseudoschwangeren 129-Mäusen hergestellt. Der jeweilige Phänotyp wurde in 129-Mäusen bzw. in 129-C57BL/6-Hybriden analysiert [92, 93].

Die von Prof.Dr. C. Birchmeier zur Verfügung gestellten, Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Gewebeschnitte von HGF/SF-und Met-„knockout“ Embryonen konnten aufgrund der geringen Anzahl an Tieren ($n \leq 3$) nicht quantitativ nach

histomorphometrischen Kriterien ausgewertet werden. Aus diesem Grund waren nur qualitative, phänomenologische Aussagen über den Einfluß des HGF/SF-Met-Signalsystem bei der Haarfollikelentwicklung in diesen Tieren möglich.

Die transgenen (TG), HGF/SF überexprimierenden Mäuse sind über viele Wochen lebensfähig und stellen ein sehr gutes System dar, den Einfluß von HGF/SF auf das Haarwachstum zu untersuchen [97].

Die von Dr. Merlino bereitgestellten transgenen Tiere wurden auf der Basis von FVB-Albinomäuse generiert, indem die HGF/SF cDNA unter der Kontrolle des Metallothionein (MT-1)-Promotor [97, 98] in das Mausgenom eingefügt wurde. Die anschließend mit C57BL/6-Mäusen verpaarten Tiere zeigten eine starke HGF/SF-Expression innerhalb der Haut. Diese TG Mäuse exprimierten ubiquitär eine charakteristische 2.4kB RNA in 3-50facher Menge im Verhältnis zum endogenen 6kB-großen HGF/SF Transkript [97, 99]. Die Mäuse wurden in den Versuchstieranlagen des National Cancer Institute, NIH, Bethesda, USA gehalten. Die entnommenen Hautfragmente von neonatalen (postnatale Tage 3 und 17) sowie bis zu 6 Wochen alten TG und gleichaltrigen wild-typ (WT) Mäusen (n=3-5) wurden entweder in PBS gewaschen, in Paraformaldehyd fixiert und für die Routinehistologie (Hämatoxylin/Eosin-Färbung) und Histomorphometrie in Paraffin eingebettet oder für immunhistochemische Färbungen (Kryotechnik) prozessiert (s. Gewebeentnahme und Fixation) [82, 84, 85].

4.2 Haarfollikelanalysen

4.2.1 Embryonale und neonatale Haarfollikelentwicklung

Für die Analyse der Haarfollikelmorphogenese wurde embryonale und neonatale Haut zu bestimmten Zeitpunkten der geschätzten Schwangerschaftsentwicklung (Embryonalstadien E14.5- E16.5, wobei E0.5 der Morgen ist, an dem der Vaginalpfropf erkennbar ist) oder zu postnatalen

Zeitpunkten (an den Tagen P0 bis P19) entnommen. Die neonatale Haarfollikelentwicklung der murinen Rückenhaut findet hauptsächlich während der Peri- und Neonatalperiode statt, so daß auch noch ein Tag nach der Geburt (P0) eine Untersuchung aller Stadien der Haarfollikelmorphogenese auch neonatal möglich ist [11, 85]. Die einzelnen Stadien der Haarfollikelmorphogenese wurde nach Hardy [6, 11] mit einigen Modifizierungen nach Paus [3] (s. Abb 1) histologisch klassifiziert.

4.2.2 Mechanische Haarzyklusinduktion durch Depilation

Aktives Haarwachstum in der Rückenhaut von Telogen-Mäuse wurde unter allgemeiner Anästhesie (intraperitoneale Injektion von 0,5 ml einer 10%igen Ketamin-hydrochloridlösung) durch Auftragen einer geschmolzenen Wachs/Harz- Mischung und anschließender Depilation induziert [15, 84]. Nach 17-19 Tagen treten diese depilationsinduzierten Anagenfollikel spontan synchronisiert in die Regressionsphase (Katagen) ein (s. Abb 3) und verweilen dann mehrere Wochen in der darauffolgenden Ruhephase.

Untersucht wurden alle Stadien des murinen Haarzyklus (Klassifizierung nach Straile, 1961): Anagen I-VI (0- 16 Tage nach Anageninduktion durch Depilation [p.d.]), Katagen I-VIII (17., 18., 19. Tag p.d.) und Telogen (Tag 25. p.d.) [17, 81] (vergl. Abb 3)

4.2.3 Pharmakologische Anageninduktion durch Cyclosporin A

Telogen-Mäusen wurde insgesamt dreimal (Tag 0, 1, und 3) intraperitoneal (i.p.) ohne Anästhesie jeweils 5mg Cyclosporin A (CsA), gelöst in 0,5 ml Maisöl und 0,02 % Ethanol, injiziert. Die Kontrollmäuse erhielten nur Vehikellösung [82, 88].

Der für die Entwicklung des Anagen charakteristische Farbumschlag der Haut erfolgte bei der Induktion des Anagen durch i.p. Applikation von CsA fünf bis zehn Tage nach der letzten Injektion [88]. Die Mäuse wurden jeweils an verschiedenen Tagen getötet und das Haarzyklusstadium histologisch nach der Klassifikation von Chase bestimmt [80]. Hautgewebe in den Entwicklungsstadien Anagen I–III wurden für immunhistologische Untersuchungen herangezogen.

4.2.4 Pharmakologisch induziertes Katagen

Die spontan eintretende Haarfollikelregression wurde mit pharmakologisch induziertem Katagen verglichen. Pathologisches, dystrophisches Katagen, begleitet von diffusem Haarausfall (Chemotherapie-induzierte Alopezie), wurde durch 120 mg/ kg Körpergewicht Cyclophosphamid induziert (einmalige, intraperitoneale Injektion dieses DNA-alkylierenden Zytostatikums am Tag 9 p.d. an dem sich alle Follikel im frühen Anagen VI befinden [3, 82]. Kontrollmäuse erhielten intraperitoneal (i.p.) physiologische Natriumchlorid-Lösung. Nach 24 Stunden wurde die Rückenhaut entnommen und für die folgende Immunhistochemie (s.u.) prozessiert.

4.2.5 Gewebeentnahme und Fixation

Die Tiere wurden unter Ethernarkose durch zervikale Dislokation getötet. Die Rücken-Vollhaut wurde in Höhe des Muskels panniculus carnosus paravertebral entnommen und aufgespannt [15, 17, 85]. Um morphologisch auswertbare Kryostatschnitte für die folgenden *In situ* –Techniken (*In situ*-Hybridisierung, immunhistochemischen Färbungen, quantitative Histomorphometrie und die "*in situ*-endlabeling"-Technik, TUNEL) zu erhalten, wurde in der Vertebrallinie entlang der Körperlängsachse ein 0,5 x 1cm großes Hautstück entnommen. Die Oberseite wurde mit Einbettmedium bedeckt, umgeklappt, der entstandene Block gänzlich in Medium eingebettet und sofort

in flüssigen Stickstoff überführt. Die Kryoblöcke wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert [15, 17, 85].

Alternativ wurden Hautstreifen des gleichen Areals in Formalin fixiert. Nach Passage einer Alkoholreihe wurden sie mit Hilfe eines Einbettautomaten in Paraffin eingebettet [15, 17, 101].

Für die Nukleinsäureisolation wurde die geschnittene Maushaut direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die spätere Verwendung bei -80°C aufbewahrt [15].

Für Kontrollversuche wurden zusätzlich Organe (i.e. Leber und Thymus) von jungen, unbehandelten Mäusen entnommen, mit Einbettmedium bedeckt und für die spätere Verwendung ebenfalls bei -80°C aufbewahrt oder (wie oben beschrieben) in Paraffin eingebettet [15, 17, 101].

4.2.6 Mikroskopie

Die Mikroskopie bietet eine schnelle und einfache Methode markierte Moleküle in einzelnen Zellen oder in gesamten Gewebekompartimenten zu lokalisieren. Es wurde neben der normalen Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie auch die Konfokale Lasermikroskopie angewandt, um den Vorteil der räumlichen Darstellung auszunutzen.

Bei Vergrößerungen zwischen 20x bis 600x können mit den verschiedenen Filtern die einzelnen Fluorochrome (Fluoreszenz), radioaktiven Signale (Dunkelfeldfilter) oder Farbfilter (Durchlicht) getrennt ausgewertet und später mit einem digitalen Bildbearbeitungssystem (s. 4.3.4) wieder zusammengefügt werden.

4.2.7 Quantitative Histomorphometrie und statistische Auswertung

Die Immunreaktivitätsmuster wurden evaluiert, indem mindestens 50 Haarfollikel pro Maus bei jeweils 5 Mäusen pro Haarfollikelstadium untersucht wurden.

Die Gesamtzahl der HF in TG und gleichaltrigen WT Mäusen wurde an horizontal geschnittenem Hautgewebe nach anerkannten morphologischen Kriterien [5, 10] untersucht. Die Anzahl der HF / Längeneinheit der Epidermis (HF ostia) in Gewebeschnitten von HGF/SF TG Mäusen (n=3) am postnatalen Tag P3 wurde mit gleichaltrigen WT Kontrollmäusen des gleichen Wurfs (n=3) verglichen.

Der Prozentsatz der HF der unterschiedlichen Stadien der HF Morphogenese wurde nach morphologischen Standardkriterien ermittelt [5, 10]. Mindestens 60 longitudinal geschnittene HF in mehr als 50 mikroskopischen Feldern der Gewebeschnitte von mindestens 3 TG und 3 WT Tieren wurden analysiert und verglichen.

Mit einem digitalen Bildanalysesystem (Zeiss KS400, Jena) wurden jeweils mindestens 100 Messungen an 4 Schnitten pro Tier evaluiert. Die Gewebeschnitte wurden bei einer 200 bis 400fachen Vergrößerung (Leica Mikroskop) analysiert und Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte aus den Gesamtdaten ermittelt. Unterschiede galten als signifikant sobald die p-Werte (probability value) kleiner als 0.05 waren (Student's t-test für unverbundene Stichproben).

Die Hautdicke, als zusätzliches Kriterium für die Bestimmung der HF Stadien, wurde standardmäßig vom stratum corneum bis zur distalen Grenze des subkutanen Muskels (panniculus carnosus) gemessen. Insgesamt kamen 40-50 solcher Messungen in einer korrespondierenden Anzahl an mikroskopischen Feldern von jeweils 3 Tieren (WT und TG) zur Anwendung. Alle Objektträger

wurden bei 20-200facher Vergrößerung analysiert, Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte wurden mit den Gesamtdaten ermittelt. Signifikante Werte wurden bei $p < 0.05$ bestimmt (Student's t-test für unverbundene Stichproben).

4.2.8 Dokumentation in Computerschemata

Die Zusammenfassung aller erfaßten Parameter der immunhistologischen Färbungen wurden in standardisierte Schemazeichnungen übertragen, die mit Hilfe eines vektorbasierten Computerprogrammes (Mikrografx Designer) erstellt wurden. Diese Schemazeichnungen repräsentieren die wichtigsten Charakteristika der murinen Haarfollikelanatomie und deren Veränderung während der Haarfollikelmorphogenese und des adulten Haarzyklus. Für ausgewählte "Schlüsselstadien" der HF Morphogenese und des HF Zyklus wurden die IR Muster in Schemata übertragen damit, ein standardisiertes, leicht reproduzierbares System entstehen konnte, das Vergleiche der unterschiedlichen follikulären IR-Muster erlaubt [5, 15, 85, 102].

4.3 Immunhistologie

4.3.1 HGF/SF-Met-Doppelmarkierung

Für die simultane Detektion der Immunreaktivitäten (IR) von HGF/SF und Met in muriner Haut wurde eine kombinierte, standardisierte Immunfluoreszenz-Doppelfärbung angewandt [15]. Kryostatschnitte der o.b. Gewebeblöcke (10 µm dick) wurden in Aceton fixiert (10 min bei -20° C) und prä-inkubiert mit 10%igem Esel-Normalserum, gefolgt von einer Inkubation mit dem ersten Primärantikörper (Schaf-anti-Maus HGF/SF; s. Tabelle 3) übernacht bei 4° C. Die Gewebeschnitte wurden dann mit dem ersten FITC-gekoppelten Sekundärantikörper (Esel-anti-Schaf) für 30min bei RT inkubiert. Im zweiten Teil dieser Doppelfärbung wurden die Objektträger 10 min bei RT mit 10%igem Ziegen-Normalserum geblockt und mit dem zweiten Primärantikörper

(Kaninchen-anti-Maus Met) bei 4°C über Nacht inkubiert. Der zweite Sekundärantikörper (TRITC-konjugierte F(ab)₂ Fragmente Ziege-anti-Kaninchen) wurde daraufhin bei RT für 30 min hinzugegeben. Nuklei wurden ko-visualisiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff HOECHST 33342. Jeder Färbeschritt (außer nach einem Blockvorgang) wurde durch einen Waschschrift mit PBS unterbrochen. Auf den Objektträgern wurden Deckgläschen mit speziellem Eindeckmedium fixiert. Positive Färbungen von HGF/SF und Met wurden jeweils durch grüne und rote Fluoreszenz detektiert, blaue Fluoreszenz zeigte die Nuklei. Als Negativkontrollen wurden jeweils entweder das rekombinante Protein oder das Kontrollpeptid eine Stunde im Verhältnis 1:10 bzw. 1:50 bei RT mit dem Primärantikörper vorinkubiert bzw. der Primärantikörper wurde weggelassen. Als Positivkontrollen dienten die in der Literatur mit positivem Expressionsmuster beschriebenen Organe und Gewebe (Organ- und Embryopräparate) [103, 104].

4.3.2 Immunhistochemische Markierung mit Pep-1-Antikörpern

Der Pep-1-Antikörper erkennt ein Fragment des für die Melaninproduktion wichtigen Tyrosinase-proteins [105] und kann somit eine melanozyten-spezifische HGF/SF-Expression in Geweben HGF/SF-überexprimierender bzw. Cyclophosphamid-behandelter Tiere nachweisen, sowie eine veränderte Verteilung dermalen und follikulärer Melanozyten detektieren.

10 µm dicke Kryostatschnitte von Mausgeweben (C57BL/6- und HGF/SF transgene Tiere) wurden in Aceton fixiert (10 min bei -20 C) und mit 10%igem Ziegen-Normalserum prä-inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit dem Primärantikörper (Kaninchen anti Maus Pep-1; s. Tabelle 3) für 1 Stunde bei RT. Die Gewebeschnitte wurden dann mit dem TRITC-gekoppelten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen) für 30min bei RT inkubiert.

Nuklei wurden mit HOECHST 33342 angefärbt. Jedem Färbeschritt (außer nach einem Blockvorgang) folgte ein Waschschrift mit PBS. Deckgläschen

wurden mit Eindeckmedium fixiert. Positive Färbungen von Pep-1 wurden durch rote Fluoreszenz detektiert, blaue Fluoreszenz markierte die Zellkerne.

4.3.3 Kombinierte Immunmarkierung mit TUNEL-Technik

Um entscheiden zu können, ob und welche Zellpopulationen Immunreaktivitäten des Met-Rezeptors oder des Proliferationsmarker Ki67 ^[95] und eine gleichzeitige DNA- Fragmentierung (Apoptose) aufzeigten, wurde die kombinierte TUNEL/ Hoechst 33342- Methode (unten detaillierter beschrieben) mit einer Immunhistochemischen Färbemethode zu einer Dreifach-Markierung kombiniert ^[15]. Mit Hilfe dieser *In situ*- Endmarkierung ist es möglich nicht nur Apoptose an sich nachzuweisen, sondern auch die für morphologische Studien wichtige, exakte Lokalisierung apoptotischer Zellen in intaktem Gewebe zu beschreiben.

Der erste Teil dieser Dreifachfärbung bestand in der Ausführung der TUNEL-Reaktion (mit der Ausnahme, daß die anti-Digoxigenin-Fluoreszein-konjugierten F(ab)2-Fragmente weggelassen wurden). Unspezifische Bindungsstellen an den Gewebeschnitten wurden mit 10%igem Ziegen- Normalserum abgeblockt und über Nacht entweder mit den Antikörper gegen Met oder Ki67- Protein inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde das Gewebe mit Anti-Digoxigenin-Fluoreszein (FITC)-konjugierten F(ab)2-Fragmenten inkubiert. Der sekundäre Antikörper (anti- Ziegen-Rhodamin (TRITC)-gekoppelte F(ab)2-Fragmente, 1:200) inkubierte 30min bei 37°C.

Die Verteilung und die Intensität der IR- und TUNEL+ Zellen wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) bei Vergrößerungen von 100x - 400x bestimmt und wie oben beschrieben dokumentiert. Die Verteilung und die Intensität jedes Parameters (Immunreaktivitäten) wurde untersucht, in dem mindestens 50 Haarfollikel von mindestens drei verschiedenen Mäusen pro Zyklusstadium ausgewertet wurden.

Die benutzten primären und sekundären Antikörper, die verwendeten Verdünnungen, sowie die jeweiligen Hersteller sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Wenn kein Kontrollpeptid bzw. Kontrollprotein für Prä-absorptionsstudien zur Verfügung stand (Ki67 und Pep-1), wurde die Inkubation ohne ersten Antikörper als Negativkontrolle benutzt.

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

Antigen	Primärantikörper	Verd.	Quelle	Sekundärantikörper	Verd.	Quelle
Ki67	Kaninchen-anti-Maus Ki67 polyklonal	1:100	Dianova	TRITC-gekoppelt Ziege-anti-Kaninchen F(ab) ₂ Fragmente	1:200	Jackson Immuno Research
Met	Kaninchen- anti-Maus Met polyklonal	1:100	Santa Cruz Biotech.	TRITC-gekoppelt Ziege-anti-Kaninchen F(ab) ₂ Fragmente	1:200	Jackson Immuno Research
Pep-1	Kaninchen-anti-Maus Met polyklonal	1:200	Merlino, NIH, USA	TRITC-gekoppelt Ziege-anti-Kaninchen F(ab) ₂ Fragmente	1:200	Jackson Immuno Research
HGF/SF	Schaf-anti- Maus HGF/SF polyklonal	1:100	Gherardi, Cambridge, UK	FITC-gekoppelt Esel-anti- Schaf	1:200	Jackson Immuno Research

Die beobachteten IR-Muster aller getesteten Antigene wurden mit den in der Literatur beschriebenen Antigennachweisen verglichen und jeweils als interne Positiv- und Negativkontrolle herangezogen. Hierzu wurden außerdem die zusätzlich entnommenen Organe und Gewebeschnitte gesamter Embryonen herangezogen. Die ermittelten IR-Muster wurden in o.g. computergenerierten, schematischen Repräsentationen des murinen Haarzyklus protokolliert.

4.3.4 Digitale Bildbearbeitung und Photodokumentation

Die auf den Gewebeschnitten gebundenen Fluorochrome wurden mit verschiedenen Fluoreszenzfiltern mittels Videokamera getrennt aufgenommen,

anschließend mit einem digitalen Bildbearbeitungssystem (Isis, Zeiss KS400 oder confocal assistent) übereinandergelagert und mit einem Computer-gestützten Bildbearbeitungsprogramm (z.B. Adobe Photoshop oder PaintshopPro) für die Dokumentation bearbeitet [15].

4.4 TUNEL *In situ*- Endmarkierung

Die "Terminale Desoxynukleotid-Transferase vermittelte dUTP-Fluoreszein-gekoppelte DNA-Fragment-Markierung" (TUNEL) wurde verwendet um apoptotische Zellen nachweisen zu können [106, 107]. Die bei der Apoptose durch Endonukleasen in Fragmente gespaltene DNA wird bei dieser Technik durch eine Transferase mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluoreszein) markiert. Mit Hilfe dieser *in situ*- Endmarkierung ist es möglich die exakte Lokalisierung apoptotischer Zellen in intaktem Gewebe zu beschreiben.

10 µm Kryostat-Gewebeschnitte wurden in Formalin (10%) für 10min bei RT und in Ethanol/Essigsäure (2:1) für 5min bei -20°C fixiert. Die Objektträger wurden mit Äquilibrationpuffer überschichtet und anschließend mit terminaler Desoxynukleotid-Transferase (TdT) Lösung für 1h bei 37°C inkubiert. Die so mit Digoxigenin- dUTP markierte DNA wurden mit anti- Digoxigenin-Fluoreszein-gekoppelten F(ab)2- Fragmente detektiert. Anschließend folgte ein Inkubationsschritt mit HOECHST-33342 (10µg ml⁻¹ in PBS). Auf jeden Inkubationsschritt folgte ein Waschvorgang (dreimalig mit PBS). Die Gewebeschnitte wurden schließlich mit Eindeckmedium überschichtet und mit einem Deckgläschen bedeckt. Apoptotische Zellen wurden anhand der grünen Farbe bestimmt. Negativ- Kontrollen wurden, wie im Protokoll des Herstellers beschrieben, durch Weglassen der TdT durchgeführt. Da im Thymus junger Mäuse im Rahmen der Selektion autoreaktiver Thymozyten besonders häufig spontane Apoptose auftritt [108-110], wurde das gleiche Verfahren als positive Kontrolle an Thymus- Gewebeschnitten junger Mäuse durchgeführt.

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 RNA-Isolierung aus Vollhaut

Zur Gewinnung der Gesamt-RNA aus Maus-Vollhaut wurde ein Kit zur RNA-Isolierung (RNeasy, Quiagen) verwendet. Die tiefgefrorene Rückenhaut wurde in flüssigem Stickstoff in einem Mörser mit einem Pastil homogenisiert und in Lysis- Puffer aufgenommen. Das Zellysat mit 70%igem Ethanol wurde in ein spezielles Zentrifugensäulchen gefüllt und bei 8,000 x g (10,000rpm) für 15min zentrifugiert. Das Filtrat wurde anschließend verworfen und die Säule nacheinander einmal mit Waschpuffer gespült und getrocknet. Die an dem Silikagel gebundene RNA wurde mit Aqua dest. eluiert.

4.5.2 Reverse Transkription

Zur Gewinnung komplementärer DNA (cDNA), wurde die gereinigte Gesamt-RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase (virale, RNA-abhängige RNA-Polymerase) umgeschrieben (cDNA-Cycle Kit, Invitrogen). Die RNA wurde mit Aqua dest. verdünnt und mit Random-Primer versetzt. Um die RNA zu linearisieren und eine gleichmäßig verteilte Anlagerung der Primer an die RNA zu gewährleisten, wurde die Lösung auf 65°C erhitzt und der Reaktionslösung folgende Komponenten zugefügt:

RNase-Inhibitor (10 units μl^{-1}), 5x RT Puffer (Kit), 100 mM dNTP's, 80 mM Natrium Pyrophosphat, AMV Reverse Transkriptase.

Es folgte eine Inkubation bei 42°C im Wasserbad für 60 min. Um RNA-/cDNA-Hybride zu denaturieren und die vorhandenen Enzyme zu inaktivieren wurden die Proben für 2 min auf 95°C erhitzt und anschließend zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

4.5.3 Semiquantitative Polymerase- Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der *In vitro*-Amplifikation der zuvor umgeschriebenen cDNA. Dabei wird die bestimmte Sequenz zwischen den spezifischen Bindungsstellen eines 5'- und eines 3'-terminalen Primers amplifiziert. Mit der semiquantitativen RT-PCR wurde das "steady-state"-Niveau der Genexpression von HGF/SF und Met in der Haut bestimmter Haarzyklustage bestimmt.

Für die semiquantitative Evaluation wurden die Transkripte der unterschiedlichen Haarzyklustage jeweils mit einem β -Aktin-Kontrollfragment aus demselben Reaktionsansatz so lange austitriert (durch den Vergleich der Ethidiumbromid-Lichtemission der nachfolgend durchgeführten Gelelektrophorese), bis sie gleiches Niveau erreichten [111]. Die exakte Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines UV-Spektrometers. Die Amplifikation wurde mit Taq-Polymerase in einem Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus, USA) über 30 Zyklen mit folgendem Programm durchgeführt:

1 min 94° C (Denaturierung)

45 s 60° C (Anlagerung der Primer)

45 s 72° C (Elongation)

Die Menge der eingesetzten cDNA für die PCR war bei den Proben für HGF/SF 10x höher als für Met.

Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igem, Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel (s. dort) sichtbar gemacht, fotografiert und mittels Scanner-Densitometrie verglichen. Die aus den integrierten Peakflächen erhaltenen Werte wurden graphisch aufgetragen. In allen Experimenten wurde eine Kontroll-PCR ohne cDNA-Primer durchgeführt, um Kontaminationen auszuschließen. RNA-Proben von mindestens zwei unterschiedlichen Mäusen wurden pro Haarzyklusstadium in wenigstens zwei unabhängigen Ansätzen analysiert.

Die Oligonukleotidsequenzen wurden aus der Literatur entnommen, in einer Datenbank (GeneBank, NCBI) überprüft und mit einem PC-Programm (Blast) optimiert. Die Primer wurden von Tip Molbiol, Berlin mit folgenden Sequenzen hergestellt:

β-Aktin: 5'- GAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'
5'- TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3' (107);

HGF/SF: 5'- TT GGC CAT GAA TTT GAC CTC-3'
5'-AC ATC AGT CTC ATT CAC AGC-3' (98);

Met: 5'-GAA TGT CGT CCT ACA CGG CC-3'
5'-CAG GGG CAT TTC CAT GTA GG-3' (98).

4.5.4 Genotypisierung

Zur Bestimmung der Mäuse eines Wurfes, die das HGF/SF-Transgen exprimierten bzw. nicht exprimierten, wurde jeweils die Schwanzspitze mit Proteinase K (10mg/ml) übernacht bei 52°C angedaut und die DNA mit Hilfe von gepuffertem Phenol extrahiert. Die anschließende PCR (s.o.) wurde mit folgenden Primern unter den u.a. Bedingungen durchgeführt:

MT-S: 5'- ACT CGT CCA ACG ACT ATA -3' (108)
292: 5'- CTG AGG AAT GTC ACA GAC TTC GTA-3' (108);

bei 30 Zyklen:

94° C

40 s 55° C

40 s 72° C

1 min 0° C

Die PCR- Produkte wurden auf einem 2%igem, Ethidiumbromid- gefärbten Agarosegel detektiert.

4.5.5 Rekombinantes HGF/SF und Antiserum

Das für die *In vivo*-Injektionsversuche, die *In vitro*-Hautorgankulturen und Zellversuche benötigte rekombinante HGF/SF wurde von Prof. E. Gherardi (GFG, Cambridge) zur Verfügung gestellt. Es wurde in NS0 Mausmyeloma-Zellen mit der gesamten Sequenz der HGF/SF cDNA (s. GeneBank) transfiziert und das rekombinante Protein wurde aus dem Zellüberstand mittels einer kombinierten Heparin-Sepharose6CL- und einer Mono S-Säulenchromatografie (Amersham Pharmacia) gereinigt (Gherardi, nicht publiziert). Mit Hilfe dieses rekombinanten HGF/SF wurden ebenfalls von Prof. E. Gherardi die polyklonalen Antikörper hergestellt. Für die Serumgewinnung wurden Schafe eingesetzt, die mehrfach mit dem rekombinanten HGF/SF immunisiert wurden. Der Serumüberstand wurde mit Hilfe einer Proteinreinigungssäule aufgereinigt und die gewonnenen Antikörper mit Immunoblots auf Spezifität geprüft. Diese Antikörper sind neutralisierend.

4.5.6 Klonierung/ Transfektion

Maus HGF/SF- und Met cDNA wurden in pBluescript KS subkloniert (von Prof. Gherardi zur Verfügung gestellt, nicht publiziert) und als Vorlage für die *in vitro* Transkription (Proben-Herstellung) benutzt. Mit Elektroporation wurden kompetente DH10B Zellen mit der Plasmid-DNA (Maus-HGF/SF(FL, 2.9kb)- und Met(B.2; 2.1kb)- Klone, gesamte kodierende Länge; Sequenzen s. NCBI Gene Bank) transfiziert. Im Moment der elektrischen Entladung kommt es in der Zellsuspension zu einem kurzzeitigen Öffnen der Zellmembran bei der die Fremd-DNA aus der Lösung aufgenommen wird. Der Ansatz (50µl DH 10 B, 1µl Klone, 1µl Transfektionsmix) wurde im Elektroporator für 3 Sekunden bei 2.5 kV (25 µF) pulsiert und anschließend in SOB-Medium (500µl) überführt. Nach kurzer Inkubationszeit (30min bei 37°C) wurde die Suspension auf TYE-Agar (mit Antibiotikum Ampicillin) ausplattiert und übernacht bei 37°C inkubiert. Positive Kolonien konnten dann in 1 ml Flüssigmedium überimpft werden und

zur späteren präoperativen Extraktion der Plasmide (Minipreps) in Flüssigkultur überführt werden. Für die langfristige Lagerung wurden die Kulturen gewaschen und nach der Zugabe von Glycerin (85%) bei -70° C aufbewahrt.

4.5.7 DNA-Konzentrationsbestimmung

Für den Einsatz von DNA-Rekombinationstechniken, wie Transformationen oder der Markierung von *In situ*-Proben, war es nötig, die Menge einzusetzender DNA zu bestimmen. Für die im Agarosegel aufgetrennte DNA war eine ungefähre Abschätzung der DNA-Menge durch den Vergleich mit der Intensität von Banden bekannter DNA-Menge möglich.

Genauere Bestimmungen erfolgten über die Bestimmung der UV-Absorption bei 260nm. Hierfür gilt: $1 \text{ A } 260 = 50 \text{ } \mu\text{g dsDNA/ml}$. Durch die Ermittlung des Quotienten A_{260} / A_{280} lässt sich die Qualität der DNA bestimmen. Der Quotient wird durch Proteinverunreinigungen vermindert. Ein A_{260} / A_{280} - Wert von 1,8 bis 2 ist ein Referenzwert für hochaufgereinigte DNA.

4.5.8 Agarosegelelektrophorese

Die Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte im Agarosegel proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Je nach Größe der zu trennenden DNA wurden Gele mit 0,8-2 % Agarose in 1 x TAE Puffer verwendet. Allen Gelen wurde der DNA interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben um die DNA-Banden mit Hilfe der UV-induzierten Fluoreszenz sichtbar zu machen. Die Elektrophorese erfolgte je nach Größe und gewünschter Trennschärfe bei 50 bis 150 Volt. Analytische Gele wurden mit einer Polaroidkamera oder einer Digitalkamera fotografiert.

4.5.9 Alkoholfällung von DNA

Zur Verringerung des Volumens und zur Abtrennung niedermolekularer Bestandteile wurde zu einer DNA-Lösung Ethanol/3 M Natriumacetat (1:3) gegeben. Nach der Inkubation bei -20° C (oder in Trockeneis) erfolgte eine Zentrifugation mit gefolgtm Waschvorgang (70 % Ethanol) zur Entfernung mitpräzipitierter Salze. Das DNA-Pellet wurde nach erneuter Zentrifugation in TE-Puffer aufgenommen.

4.5.10 Plasmidisolierung

Für die Plasmidisolierung (QIAGEN-Kit, Herstellerprotokoll) wurden 100 ml der plasmidtragenden Zellkultur (OD 600 ca. 1,5) durch Zentrifugation geerntet, in 10ml P(Puffer)1 aufgenommen und in 10ml P2 lysiert. Nach der Zugabe von 10 ml Neutralisierungspuffer (P3) wurde zentrifugiert und der Überstand auf eine mit QBT-Puffer äquilibrierte Tip 500-Säule gegeben. Anschließend wurde mit Puffer (QC) gewaschen und mit 15 ml QF-Lösung eluiert. Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 400 µl TE aufgenommen. (P1: 50 mM Tris, pH8; 10 mM EDTA; 100 µg/µl RNase A; P2: 0,2 M NaOH; 1 %SDS P3: 2,55 M Kaliumacetat, pH 4,8; QBT: 0,75 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7; 15%Ethanol; 0,15 % Triton; QC: 1 M NaCl; 50 mM MOPS pH 7; 15 % Ethanol; QF: 1,25 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 8,5; 15 % Ethanol).

Die isolierten Plasmide wurden für die *In situ*-Hybridisierung mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen linearisiert und radioaktiv markiert.

4.5.11 Synthese der Proben für die *In situ*-Hybridisierung

Die isolierten Plasmide wurden mit Restriktionsenzymen (Spe I und Apa I für HGFS/F bzw. Spe I und Kpn I für Met; jeweils für die "antisense"- und "sense"-Proben) 2 Stunden lang bei 37°C (bzw. 25 °C bei Apa I) linearisiert, gereinigt und in einem Agarosegel auf Reinheit und richtige Größe überprüft. Die

linearisierte Plasmid-DNA der HGF/SF- und Met-Klone wurde daraufhin als Matrize für die Synthese der "sense"- und "antisense" Riboproben verwendet. Die *In vitro*- Transkription wurden jeweils mit T3- oder T7 RNA-Polymerase in Anwesenheit von ³⁵S - markierten UTP und CTP bei 37°C (1h) durchgeführt:

1 µl DNA
2 µl GTP/ATP (10 mM)
2 µl RNase Puffer (10x)
1 µl RNase-Inhibitor (40Units/µl)
2,5 µl [³⁵S]-UTP (20mM, 10µCi/µl)
2,5 µl [³⁵S]-CTP (20mM, 10µCi/µl)
1 µl RNA-Polymerase (T3 oder T7)
8 µl H₂O_(DEPC)

Die DNA wurde anschließend mit DNase aus dem Reaktionsgemisch entfernt (DNase, MgCl₂, und tRNA in TE-Puffer für 10 min bei 37°C) und die überschüssigen Nukleotide wurden mit Ammoniumacetat abgetrennt. Die präzipitierten, markierten Proben wurden in 50 µl H₂O (mit 50 µl Formamid und 1 µl DTT) aufgenommen. Mit einer alkalischen Hydrolyse (80mM NaHCO₃/120mM NaCO₂, pH=10.2 bei 60°C 30 min) wurde die durchschnittliche Probenlänge auf ca. 200 Basenpaare reduziert, um eine verbesserte Durchdringung der Gewebeschnitte zu erreichen.

4.5.12 *In-situ*-Hybridisierung

Die Technik der *in situ*-Hybridisierung wird zum Nachweis spezifischer Nukleinsäureabschnitte in Gewebeschnitten und Zellpräparationen angewandt. Dabei wird die genomische DNA durch Erwärmung und Zugabe organischer Lösungsmittel (Formamid) denaturiert, so daß die gesuchte Sequenz anschließend durch die spezifische Hybridisierung mit einer markierten DNA-Probe (hier radioaktiv) detektiert werden kann.

Prähybridisierung: 10 µm Kryostatschnitte wurden für 20 min in frisch hergestellter 4%igen Paraformaldehydlösung fixiert und nach zwei Waschgängen (PBS) in einer Proteinase K Lösung (10µg/ml) für 10 Sekunden angedaut. Damit sich die Gewebeschnitte nicht von dem Objektträger lösen wird erneut mit Paraformaldehyd fixiert. Nach einer Behandlung mit Triethanolamin (3.125 ml Triethanolamin; 0.675µl Essigsäureanhydrid ad 250 ml H₂O) wurden die Gewebeschnitte durch eine Ethanolreihe dehydriert und getrocknet (allen Schritten folgte ein Waschwischenschritt).

Hybridisierung: Vor der Hybridisierung wurde die Aktivität der Probe (s. 4.5.11) in einem Szintillationszähler bestimmt und mit Hybridisierungspuffer auf 1.000.000 cpm/ml verdünnt.

Die Probe wurde anschließend für 5 min auf 95°C erhitzt, jeweils 40 µl wurden pro Objektträger aufgetragen und mit einem Deckgläschen bedeckt. Daraufhin wurden die Objektträger übernacht bei 55-60°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Für die Posthybridisierung wurden die Objektträger zuerst in 5x SSC (bei 65°C für 20 min), dann in 2x SSC (30 min bei 65°C, 50% Formamid) und anschließend in Tris-Puffer (10 min bei 37°C; 0,5 M NaCl, 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA) gewaschen. Nach einer Behandlung mit Ribonuklease A (20 µ/ml, 30 min bei 37°C) folgten zwei weitere Waschschrte mit 2x und 0,1x SSC (jeweils 15 min bei 65°C). Anschließend wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und bei Raumtemperatur getrocknet.

Autoradiographie, Entwicklung und Kernfärbung: Mit der Exposition eines Röntgenfilmes auf den Objektträgern übernacht konnte die Intensität des Signals der hybridisierten Probe überprüft werden und als Anhaltspunkt für die Länge der folgenden Entwicklung mit Emulsionslösung benutzt werden. Die Objektträger wurden mit Kodak-Emulsion-NTP2 benetzt, bei Raumtemperatur 2 Stunden getrocknet und anschließend im Dunkeln bei 4°C (signalstärkenabhängig für 3-14 Tage, s. Röntgenfilm) gelagert.

Die Entwicklung der Objektträger erfolgte in Kodak D19- Lösung (3min) und Fixierung mit 2% iger Essigsäure (1min) sowie in 30%ger $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (3 min). Die folgende Kernfärbung erfolgte mit einer Standard-Giemsafärbung bei der die Objektträger anschließend unter fließend Wasser entfärbt wurden. Negativkontrollen bildeten die Verwendung von „sense“- Proben, das Weglassen der radioaktiven Markierungsreaktion und positive Expressionen (embryonal) wurden mit denen in der Literatur beschriebenen verglichen [103, 112].

4.6 Funktionelle Studien mit rekombinantem HGF/SF

4.6.1 *In vivo*-Applikation

Um zu untersuchen, ob rekombinantes HGF/SF einen Effekt auf die spontane Katagenentwicklung hat, wurde 14-Tage alten Jungmäusen (weibliche C57BL/6-Mäuse, n=5) an einer genau definierten, markierten Stelle der Rückenhaut intradermal rekombinantes HGF/SF ($8\mu\text{g}/20\text{g}$ Körpergewicht) in $100\mu\text{l}$ PBS (0.1% Rinderserumalbumin) injiziert. Weitere Injektionen folgten an den nächsten 2 Tagen. Die Tiere wurden am dritten Tag nach der Injektion getötet (P17, der Tag an dem die Haarfollikel durch den Beginn des Katagens in den ersten Haarzyklus eintreten [3, 22]) und die Haut für folgende histomorphometrische Untersuchungen und die TUNEL/Ki67-Färbung entsprechend präpariert (s.o). Zusätzlich wurde weiblichen C57BL/6-Mäusen (n=5) 17 Tage nach Depilation-induziertem Anagen (mit Haarfollikeln in der Anagen/Katagen-Transformation) rekombinantes HGF/SF ($1\mu\text{g}/20\text{g}$ Körpergewicht in $100\mu\text{l}$ PBS mit 0.1% Rinderserumalbumin) intradermal in die Rückenhaut injiziert, mit erneuter Injektion am darauffolgenden Tag. Am Tag 19 p.d. wurden die Tiere getötet und wie oben beschrieben wurde die Haut weiter prozessiert (s. 4.2.5)

Um den dramatischen, Konzentrationsgradienten-abhängigen Effekt des rekombinanten HGF/SF auf die Katagenentwicklung aufzuzeigen, wurden 4 konsekutive fotomikrografische Aufnahmen einer einzelnen, repräsentativen

Gewebeprobe mit Hilfe eines computergestützten Digitalanalysesystems (ISIS, MetaSystems) aufgenommen und zusammengefügt.

4.6.2 Hautorgankulturen

8-10 randomisierte Hautfragmente von 17 Tage-alten Mäusen (Anagen-Katagen-Transformation, n=3) wurden in einem definierten Volumen (4 mm/Stanz) aus der Rückenhaut der Maus gestanzt und in einer Luft-Flüssigkeits-Grenzphase auf einem hydratisierten Gelatinegel (Gelfoam, Upjohn) unter standardisierten Bedingungen kultiviert [95, 100]. Unter diesen Bedingungen sind die Stanzbiopsien bis zu 72 Stunden vital (Paus und Stenn, unveröffentlicht) und der Haarzyklus läuft in vergleichbarer Weise zum *In vivo* – System weiter.

Zu dem Medium wurden jeweils 10ng/ml rekombinantes HGF/SF hinzugefügt und für 48 Stunden inkubiert, wobei einmal das Medium mit der äquivalenten Menge HGF/SF erneuert wurde. Am Ende der Inkubationszeit wurden alle Biopsien in PBS gewaschen, in 4% Paraformaldehyd fixiert und für histologische Untersuchungen in Paraffin eingebettet.

4.6.3 In vivo- Implantation

Um eine regulierte, gleichmäßige Abgabe von rekombinantem HGF/SF in unmittelbarer Nähe der HF zu gewährleisten und damit der geringen kutanen Halbwertszeit von HGF/SF entgegenzuwirken, wurde das Modell der "slow release beads" angewandt [7, 20, 113]. Hierzu wurden Agarosekügelchen (Affigel blue beads, Biorad, 100-200µm Durchmesser) in PBS gewaschen und für eine Stunde mit 1 µg/ml rekombinantem HGF/SF inkubiert. Für die Negativkontrollen wurden die Kügelchen mit Vehikellösung inkubiert. Die Lösung wurde anschließend in eine Spritze überführt und erneut für eine Stunde bei 37°C post-inkubiert. Die Injektion erfolgte in einem definierten Areal der rasierten Rückenhaut von Mäusen mit allen HF im Telogen. Die Tiere

wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion fotografiert (makroskopisch). Die Haut wurde anschließend für die Routinehistologie entnommen.