

6. Ergebnisse

6.1 Met- Genexpression in normaler Maushaut ist Haarzyklus-abhängig

Als erste phänomenologische Indikatoren eines möglichen Einflusses von HGF/SF und Met bei der Haarwachstumskontrolle sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob HGF/SF- und Met-Transkripte in muriner Haut exprimiert werden und zu welchen Zeitpunkten dies geschieht. Hierzu wurde die Gesamt-RNA aus der Haut adulter Mäuse mit induziertem Follikelwachstum an unterschiedlichen Haarzyklustagen isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels semiquantitativer RT-PCR HGF/SF- und Met Transskripte nachgewiesen [111, 114].

Während keine Met-Transkripte in Telogenhaut zu beobachten waren (Telogen; **Abb 10A und B Tag 0**), zeigten sich in RNA-Extrakte aus Maus-Vollhaut Transkriptionsmaxima in der frühen (**Abb 10A und B, Tag 1**) und späten Wachstumsphase (**Abb 10A und B, Tag 12**), sowie während der Anagen-Katagen-Transformation (**Abb 10A und B, Tag 17**). Ein geringeres Met-Transkriptionsniveau konnte im mittleren Anagen beobachtet werden (**Abb 10A und B, Tag 8**). Minimale, aber detektierbare, HGF/SF-Transkripte wurden im frühen und späten Anagen (**Abb 10A und B, Tage 3 und 12**) gemessen. Bei der RT-PCR mit HGF/SF-Sonden wurde im Vergleich zu den Versuchen mit Met und der internen Kontrolle β -Aktin die zehnfache Menge an cDNA eingesetzt.

Hiermit konnte eine Haarzyklus-abhängige Expression von Met- (und in geringerer Konzentration von HGF/SF-) Transkripten in normaler Maushaut nachgewiesen werden.

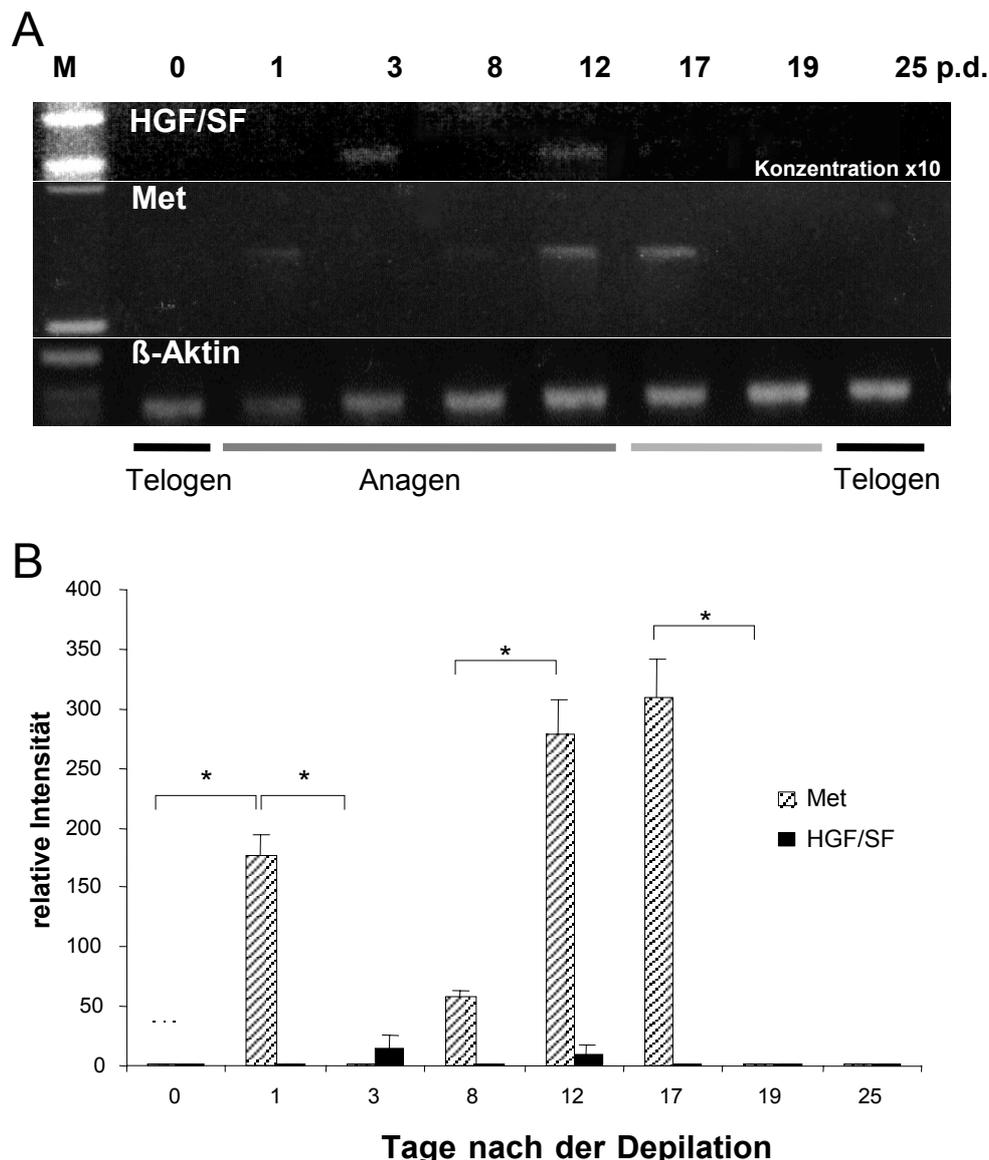


Abbildung 10: Semiquantitative RT-PCR von HGF/SF- und Met- mRNA während des depilations-induzierten Haarzyklus.

A) mRNA "steady-state" Niveaus während des induzierten Haarzyklus. Von ausgewählten Zeitpunkten des Haarzyklus wurde die Gesamt-RNA aus Rückenhaut von C57BL/6-Mäusen extrahiert und in cDNA (reverse Transkription) umgeschrieben. Mit spezifischen Primern für Met, β -Aktin und HGF/SF (für die PCR mit HGF/SF wurde die 10fache Menge an cDNA im Vergleich zu Met und β -Aktin eingesetzt) wurde eine semiquantitative PCR durchgeführt. Repräsentative Ergebnisse von einem aus drei Experimenten (Tag 0 und 25 – Telogen; Tage 1-12 Anagen; Tage 17-19 Katagen).

B) Densitometrische Analyse der RT-PCR Signale spezifisch für HGF/SF (schwarze Balken) und Met (gestreifte Balken) (Mittelwerte von \pm n=3). Die x-Achse zeigt die Tage nach der Wachstumsinduktion durch Depilation und die korrespondierenden Haarzyklustage. Sterne indizieren signifikante Unterschiede zwischen ausgewählten Haarzyklusstadien, Student's t-test (* =p<0.05).

6.2 HGF/SF- mRNA ist im Follikelmesenenchym und Met- mRNA im benachbarten Follikelepithel exprimiert

Wird HGF/SF- und Met auch im Haarfollikel exprimiert und wie ist deren exaktes Expressionsmuster? Dies sollte an exemplarischen Stadien der Haarfollikelmorphogenese und des Haarzyklus mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung untersucht werden. Eine umfassendere spatiotemporale Analyse der inter- und intrafollikulären Expression von HGF/SF und Met wurde daraufhin anschließend auf der Proteinebene mittels Immunfluoreszenz analysiert.

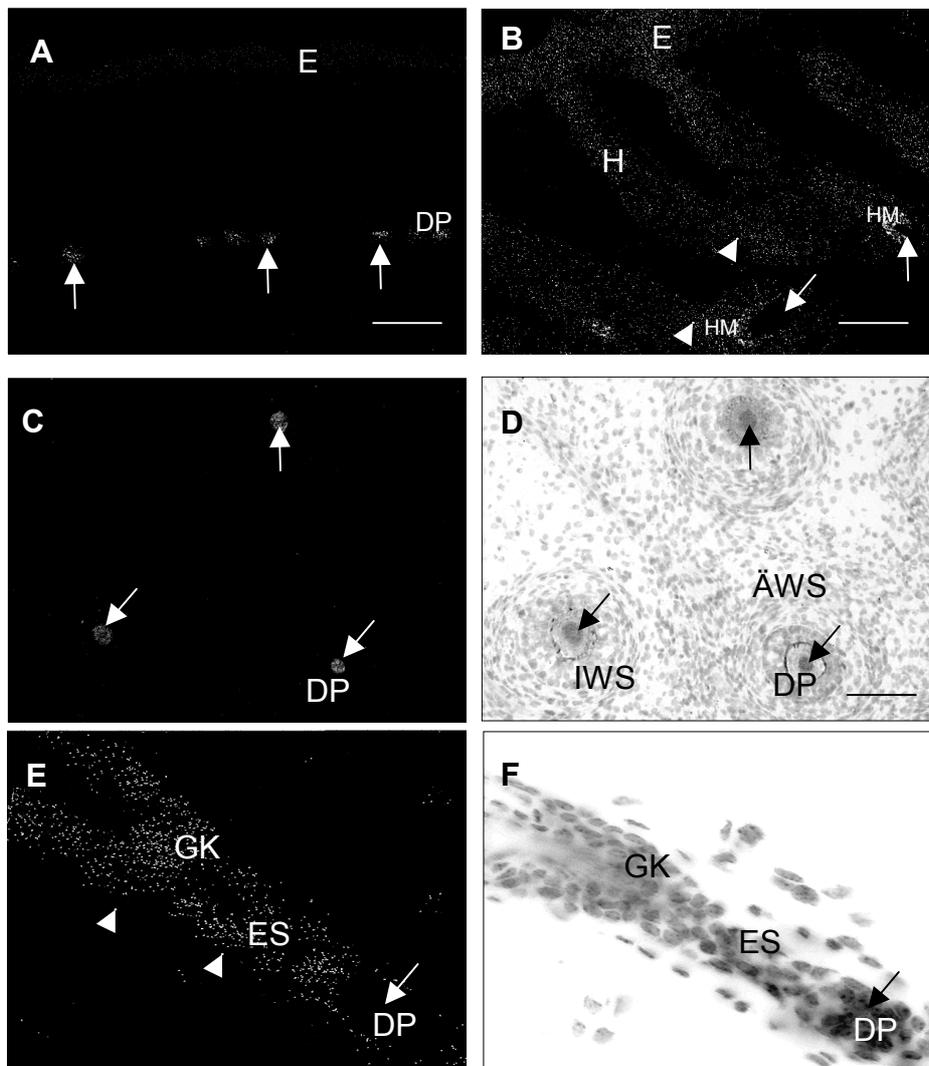


Abbildung 11 **HGF/SF- und Met- *In situ*-Hybridisierung während der murinen Haarfollikelmorphogenese und des Haarzyklus**

Mikroskopische Aufnahmen 10 µm- dicker Kryostatschnitte von Maushautgewebe mit ³⁵S-markierter HGF/SF- und Met-Proben. Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte durch Giemsa-Standardfärbung. Die Abbildungen repräsentieren Expressionsmuster der Analyse von longitudinal und transversal geschnittenen Haarfollikeln von C57BL/6-Mäusen.

Mit Beginn des Stadiums 4 der Haarfollikelmorphogenese zeigten Fibroblasten der dermalen Papille (DP) mesenchymaler Herkunft eine deutliche Markierung mit radioaktiver HGF/SF-Proben (**A, Pfeile**). Met markierte Sonden zeigten während dieser Entwicklungsphase (Stadium 3-4) ein -dem HGF/SF-Expressionsmuster komplementäres Expressionsprofil: Fibroblasten der dermalen Papille waren negativ (**B, Pfeile**), hingegen zeigte das aus dem Neuroektoderm hervorgegangene umliegende Follikelepithel (innere/äußere Wurzelscheiden, Haarmatrix, Epidermis) eine charakteristische Markierung (**B, Pfeilspitze, HM, E**).

Auch in Vibrissa-Follikeln zeigten dermale Papillen Fibroblasten eine eindeutige Markierung mit radioaktiv markierten HGF/SF-Sonden (**C, Pfeile**). Zur eindeutigen morphologischen Identifizierung des Follikelgewebes desselben Ausschnittes ist die kongruente Kernfärbung gezeigt. Die Pfeile kennzeichnen die Zellen der dermalen Papille (**D**). Während der Haarfollikelregression (Katagen VII) zeigen besonders der epitheliale Strang und die Germkapsel ("secondary hair germ") eine intensive Färbung mit Met-markierten Proben (**E, Pfeilspitzen**). Die Fibroblasten der dermalen Papille waren zu diesem Zeitpunkt -wie auch zu allen anderen Entwicklungsstadien der Morphogenese und des Zyklus- Met-negativ (**E, Pfeil**). Die Abbildung F zeigt die zur Abbildung E analoge, durchlichtmikroskopisch aufgenommene Kernfärbung (**F**).

Abkürzungen: DP -dermale Papille, E – Epidermis, ES – epithelialer Strang, HM - Haarmatrix, HS - Haarschaft, GK - Germkapsel, IWS/ÄWS - innere/äußere Wurzelscheide . Maßstab: 100µm (außer E und F =50µm).

Die Haarfollikelmorphogenese war gekennzeichnet durch eine entwicklungsbiologisch regulierte Verteilung der HGF/SF-Expression, die ausschließlich in den Fibroblasten der dermalen Papille (mesenchymaler Abstammung) beobachtet werden konnte. Die **Abbildung 11A** zeigt die mit einem Dunkelfeld-Filter sichtbar gemachte radioaktive Markierung von HGF/SF innerhalb der dermalen Papille von Stadium 4-Haarfollikeln (**Abb. 11A, Pfeile**).

Met markierende Sonden zeigten während dieser Entwicklungsphase (Stadium 4-5) ein dem HGF/SF-Expressionsmuster komplementäres Expressionsprofil: Fibroblasten der dermalen Papille waren negativ (**Abb. 11B, Pfeile**), hingegen konnte aber in dem die dermale Papille umgebenden Follikelepithel (i.e. Haarmatrix, Wurzelscheiden, **Abb. 11B, Pfeilspitze**), im distalen Haarfollikel, sowie in der Epidermis eine spezifische Met-Expressionverteilung beobachtet werden (**Abb. 11B**).

Die während der embryonalen Entwicklung am weitesten entwickelten Vibrissa-Follikel zeigten ausschließlich in den Fibroblasten der dermalen Papille eine Markierung mit radioaktiv markierten HGF/SF-Sonden (**Abb. 11C, Pfeile**). Zur eindeutigen, morphologischen Identifizierung des Follikelgewebes desselben mikroskopischen Feldes ist die kongruente Kernfärbung gezeigt. Die Pfeile kennzeichnen die Zellen der dermalen Papille (**Abb. 11D**).

Während der Follikelregression im adulten Haarzyklus (Katagen VII) zeigten besonders der epitheliale Strang und die Germkapsel eine intensive Markierung durch Met-detektierende Proben (**Abb. 11E, Pfeilspitzen**). Die Fibroblasten der dermalen Papille waren zu diesem Zeitpunkt -wie auch zu allen anderen untersuchten Entwicklungsstadien der Morphogenese und des Zyklus- Met-negativ (**Abb. 11E, Pfeil**). Die Abbildung F zeigt die zur Abbildung E entsprechende Kernfärbung (**Abb. 11F**) in der mikroskopischen Aufnahme im Hellfeld.

Die internen Positivkontrollen wurden am Embryo-Schnitt (E.14.5-18.5) durchgeführt und mit den in der Literatur beschriebenen Expressionsmustern verglichen [103, 104]. Die "sense"-Kontrolle war negativ (o.Abb).

Hiermit konnte eine Expression von HGF/SF- mRNA im Follikelmesenchym und von Met- mRNA im benachbarten Follikelepithel nachgewiesen werden.

6.3 Die HGF/SF- und Met- Proteinexpression *in situ* zeigt eine spezifische spatiotemporale Verteilung während definierter Stadien der Haarfollikelmorphogenese und des Haarzyklus

Variiert die HGF/SF- und Met-Expression während der einzelnen Stadien der Haarfollikelmorphogenese und des Zyklus? Um die mit der *In situ*-Hybridisierung ermittelten spezifischen Expressionsmuster von HGF/SF (ausschließlich im Mesenchym) und Met (ausnahmslos im Epithel) zu

bekräftigen und detailliert zu untersuchen, wurden mittels immunhistochemischer Doppelmarkierung alle Stadien der Haarfollikel-Morphogenese sowie des adulten Haarzyklus gefärbt.

Während der gesamten Haarfollikelmorphogenese zeigten fast alle epidermalen Keratinozyten (besonders die der basalen und suprabasalen Schichten) eine positive Met-IR (**Abb 12A und B, rote Fluoreszenz; Abb. 13 Stadium 0-8**). Die invaginierenden Keratinozyten, die während des sichtbaren Beginns der Haarfollikelmorphogenese (Stadium 1) den neuen Haarfollikelansatz ("plug") bilden, sind Met-IR (**Abb 12A, Stern; Abb 13A**).

Das Stadium 2 ist durch die Bildung des Haarfollikel-"peg's" (rudimentäres, stiftähnliches Haarfollikelgebilde) charakterisiert, der sich homogen Met-IR zeigte (**Abb 12B, Pfeilspitze; Abb 13B**). In den Morphogenesestadien 3 und 4 schwächt sich die Met-IR in den äußeren Zellschichten des distalen peg's ab, bleibt aber in der sich entwickelnden Inneren Wurzelscheide (IWS) präsent (**Abb 12C, Pfeilspitze; Abb 13C**).

Gruppierte Fibroblasten proximal zum peg, die später die dermale Papille bilden sollten, zeigten weder Met- noch HGF/SF-IR während der frühen Stadien der Haarfollikelmorphogenese (Stadien 1 bis 3) (**Abb 12A-B; Abb 13A-B**).

HGF/SF-IR Fibroblasten in der dermalen Papille zeigten sich das erste Mal einheitlich im Stadium 4 der HF Morphogenese (**Abb 12C, grüne Fluoreszenz, Pfeil; Abb 13C, grün**) und verblieben HGF/SF-IR bis zur beginnenden Regressionsphase (Katagen II), in der der Haarfollikel in den ersten Haarzyklus eintritt (**Abb 12D-F, Pfeilspitze; Abb 13D-F**).

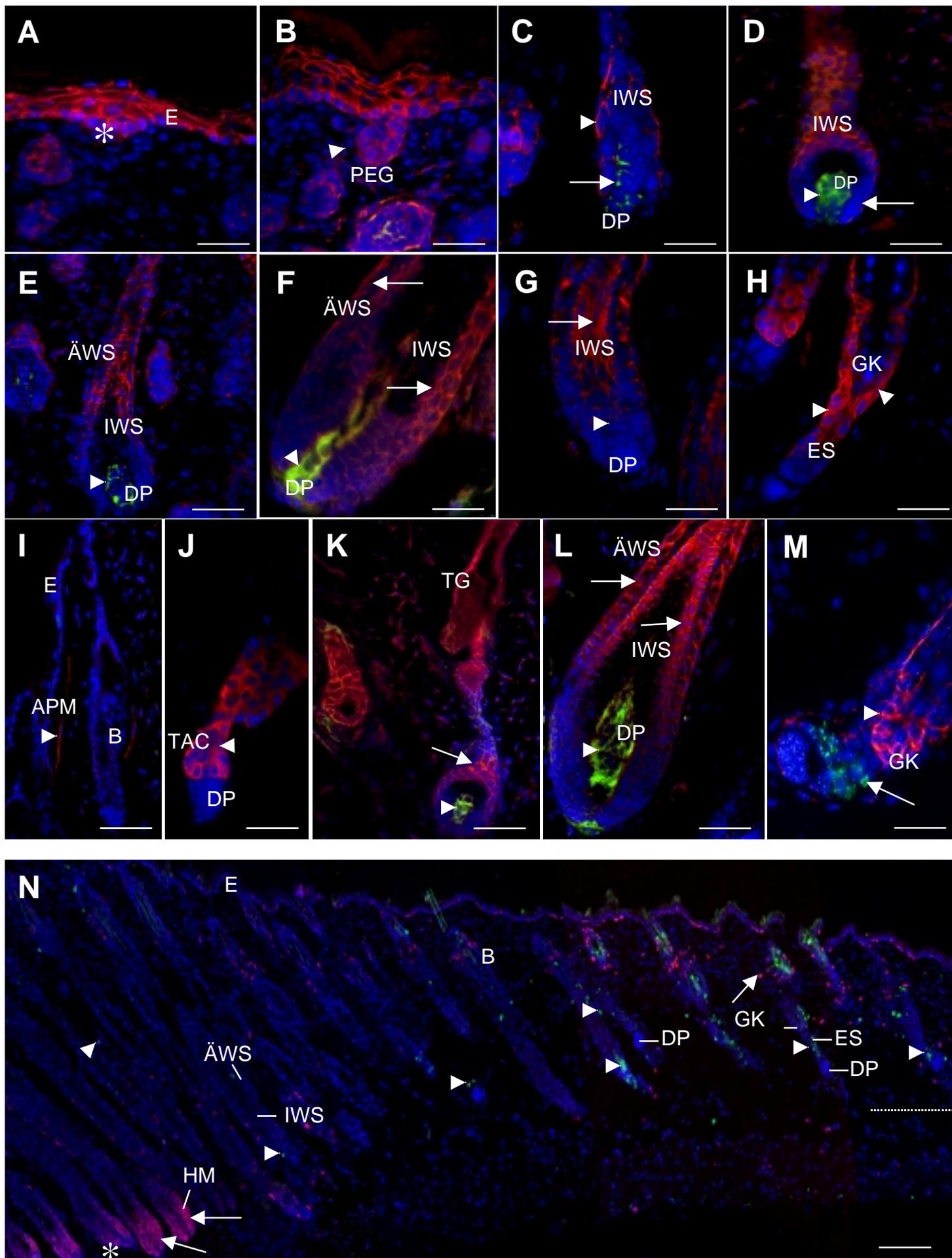


Abbildung 12

HGF/SF- und Met- Immunreaktivität (IR) in der murinen Haarfollikelmorphogenese und des Haarzyklus

Kryostatschnitte (10 µm) von C57BL/6-Maushautgewebe wurden mittels immunhistochemischer Doppelfärbung für HGF/SF- (**grüne Fluoreszenz**) und Met- (**rote Fluoreszenz**) Antigenen spezifisch markiert. Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte durch den Farbstoff Hoechst 33342 (**blaue Fluoreszenz**) (A-L). Eine kombinierte TUNEL/ Hoechst 33342/ Antikörper – Dreifachfärbung ^[95] wurde verwendet um eine Ko-lokalisierung von apoptotischen Zellen und den IR-Mustern zum einen des Met-Rezeptors (M) oder zum anderen des Ki67-Antigens (ein Markierungsprotein für proliferierende Zellen ^[7](N) nachzuweisen. Die Abbildungen repräsentieren IR-Muster der Analyse von mindestens 50 longitudinal geschnittenen Haarfollikeln (HF) der Rückenhaut von jeweils 5 C57BL/6-Mäusen pro Zeitpunkt.

Abkürzungen: APM - arrector pili Muskel, DP -dermale Papille, TAC – „transient amplifying cells“ (kurzzeitig verstärkt auftretende, proliferierende Zellen), E – Epidermis, ES – (regredierender) epithelialer Strang, HM -Haarmatrix, IWS und ÄWS – innere- und äußere Wurzelscheide, TD - Talgdrüse, GK - Germkapsel. Maßstab: 50µm (außer der für E, I, K und L =100µm, und für N, der 200µm beträgt).

A) Im beginnenden Stadium 1 der HF-Morphogenese zeigten Keratinozyten, die den neuen Follikelansatz ausbilden sollten, Met-IR (**rote Fluoreszenz, Stern**). Keratinozyten der Epidermis waren während aller Stadien der HF-Morphogenese Met-IR.

B) Das Stadium 2 zeigt die Bildung des "peg" (stabförmiger HF-Ansatz), der positiv für Met-IR war (**Pfeilspitze**).

C) Fibroblasten der dermalen Papille (DP) im Morphogenese-Stadium 4, waren die ersten Zellen, die HGF/SF-IR zeigten (**Pfeil**) und die sich entwickelnde, proximale IWS zeigte Met -IR (**Pfeilspitze**)

D) Im Stadium 5 steigerte sich die Intensität der HGF/SF-IR in DP Fibroblasten (**Pfeilspitze**) hingegen reduzierte sich die Met-IR im proximalen HF. Der mittlere Abschnitt der IWS zeigte weiterhin Met-IR.

E) Met-IR nahm im Stadium 8 in der proximalen IWS und ÄWS ab, während der zentrale und distale Bereich konstant gefärbt blieb. Die DP-Fibroblasten waren weiterhin HGF/SF-IR (**Pfeilspitze**).

F) Beim Eintritt in den ersten Haarzyklus, nahm die HGF/SF-IR der DP Fibroblasten stark ab (Katagen II, **Pfeilspitze**) und verschwand gänzlich in den Stadien Katagen III-Anagen II. Met-IR nahm in der proximalen IWS und ÄWS (**Pfeile**) im Katagen II zu.

G) IWS Keratinozyten oberhalb der DP zeigten keine Met-IR (**Pfeilspitze**), während die noch vorhandene proximale und zentrale IWS /ÄWS Met-IR im Katagen V aufwies.

H) Die Mehrzahl der Zellen des regredierenden epithelialen Stranges und der Germkapsel (**Pfeilspitzen**) zeigten eine starke Met-IR im Katagen VI-VIII.

I) In der Ruhephase (Telogen) war fast keine Met-IR wahrnehmbar (außer im Muskel arrector pili, **Pfeilspitze**) und keine HGF/SF-IR im murinen HF zu beobachten.

J) Verstärkt auftretende, proliferierende Zellen (transient amplifying cells, TAC) im proximalen HF Epithel oberhalb der DP zeigten als erste Zellpopulation Met- IR im frühen Anagen I (**Pfeilspitze**).

K) Im Haarzyklus zeigten die DP Fibroblasten im Anagen III HGF/SF-IR (**Pfeilspitze**) und blieben gefärbt bis zum Katagen II. Met-IR verstärkte sich in der sich entwickelnden proximalen IWS (**Pfeil**)

L) Anagen VI HF wiesen eine intensive HGF/SF-IR in der DP auf (**Pfeilspitze**) und Met-IR war stark in der zentralen IWS und ÄWS exprimiert (**Pfeile**).

m) TUNEL+ Zellen zeigten keine intrazelluläre Ko-lokalisierung mit Met-IR (**Pfeil**) während in der Germkapsel intensive Met-IR zu sehen war (**Pfeilspitze**).

N) Das TUNEL/ Hoechst33342/ Ki67- gefärbte, repräsentative Gewebe einer 17 Tage alten Maus zeigte eine graduell verzögerte Katagenentwicklung mit abnehmender Distanz zum Injektionsbereich (**Stern**), in dem rekombinantes HGF/SF appliziert wurde. Es werden HF in den Stadien spätes Anagen VI mit sporadischen TUNEL+ Zellen (**grüne Fluoreszenz, Pfeilspitzen**) und Zellanhäufungen mit Ki67-IR Keratinozyten im proximalen HF (**pinke Fluoreszenz, Pfeile**) bishin zu Katagen VIII HF mit einer Ansammlung von TUNEL+ Zellen im ES (**Pfeilspitzen**) und

einer starken Abnahme von Ki67-IR Keratinozyten im proximalen HF Epithel gezeigt. Die Abbildung wurde aus vier konsekutiven, mikroskopischen Aufnahmen desselben repräsentativen Hautgewebes aufgenommen und nachträglich mit einem digitalen Bildbearbeitungssystem zusammengefügt.

Während des Stadium 5 zeigte das distale Segment des Haarfollikels (inklusive der sich formenden "Wulst/Isthmus"- Region), einheitlich Met-IR (**Abb 13D**), die Haarmatrix hingegen wurde Met-negativ (**Abb 12D; Abb 13D**). Während die Met-IR in der proximalen äußeren Wurzelscheide (ÄWS) und der proximalen IWS in den folgenden Stadien 6-8 zurückging (**Abb 12E; Abb 13E**), blieben die DP Fibroblasten prägnant HGF/SF-IR (**Abb 12E Pfeilspitze; Abb 13E**).

Mit dem Eintritt in den ersten adulten Haarzyklus, der durch den Beginn der HF Regression gekennzeichnet ist ^[3], zeigte sich ein Anstieg der Met-IR im regredierenden Haarbulbus, insbesondere in der proximalen IWS und ÄWS (Katagen I und II) (**12F, Pfeile; Abb 13F**). In dieser Phase wird auch ein starker Rückgang der HGF/SF-IR in der schrumpfenden DP sichtbar (**Abb 12F, Pfeilspitze**), die in den folgenden Katagenstadien (Katagen III-VIII) HGF/SF negativ war (**Abb 12G, H; Abb 13G, H**). Während des gesamten Katagen zeigten distale ÄWS- Keratinozyten, einschließlich der Wulst/Isthmus-Region, Met-IR (**Abb 13F-H**). Die Keratinozyten der regredierenden Haarmatrix direkt oberhalb der DP wurden Met-negativ (**Abb 12G Pfeilspitze; Abb 13G**). Die proximale IWS und ÄWS des sich zurückbildenden HF Epithels dagegen verblieben Met- IR, so lange sie im Katagen existierten (bis Katagen V) (**Abb 12G, Pfeil; Abb 13G**). Im Katagen VI und VIII, war das Met-Protein charakteristisch in der Germkapsel und im epithelialen Strang (**Abb 12H, Pfeilspitzen; Abb 13H**) exprimiert, in welchem massive Keratinozytenapoptose stattfindet (siehe **Abb 12M, Pfeil**) ^[15].

In der Ruhephase des adoleszenten Haarzyklus (Telogen) konnte weder Met- noch HGF/SF- IR in den murinen HF beobachtet werden (**Abb 12I; Abb 13I**)

(mit Ausnahme des Muskels arrector pili (**Abb 12I, Pfeilspitze**), der während des gesamten Haarzyklus Met-IR war (**Abb 13F-L**).

Kurzzeitig auftretende, stark proliferierende Zellen („transient amplifying cells“ [TAC]) im HF- Epithel oberhalb der DP ^[16] sind die ersten Zellen, die im frühen Anagen Met- IR zeigten (**Abb 12J, Pfeilspitze; Abb 13J**). Keratinozyten der sich bildenden IWS zeigten substantielle Met-IR im Anagen II und III (**Abb 12K, Pfeil; Abb 13K**).

Anagen III war das erste Stadium des adoleszenten Haarzyklus, in dem HGF/SF-IR wieder in der DP beobachtet werden konnte (**Abb 12K, Pfeilspitze; Abb 13K**). Man beachte die morphologischen Ähnlichkeiten zwischen Anagen III und dem Morphogenesestadium 4 (vergleiche Abb 12C und K, 13C und K) [6, 83].

Während des Anagen III bis Katagen II verblieb die DP durchgehend HGF/SF-IR (**Abb 12K, L und F, Pfeilspitzen; Abb 13 K, L und F**).

Die proximale und zentrale IWS und die zentrale und distale ÄWS zeigten Met-IR im Anagen IV (**Abb 13, Anagen IV**) und Anagen V, im späten Anagen VI hingegen ging die Met-IR in der proximalen Haarmatrix zurück (**Abb 12L, Abb 13L**). Die zentrale IWS und ÄWS waren deutlich Met-IR (**Abb 12L; Pfeile; Abb 13L**) und auch die distale ÄWS inklusive der Wulst/Isthmus-Region verblieben Met-IR (**Abb 13L**).

Die Immunreaktivitätsmuster von Met und HGF/SF während der folgenden Katagenphasen des adoleszenten Haarzyklus stimmten mit den zuvor beschriebenen Katagenphasen infantiler Mäuse überein (siehe oben).

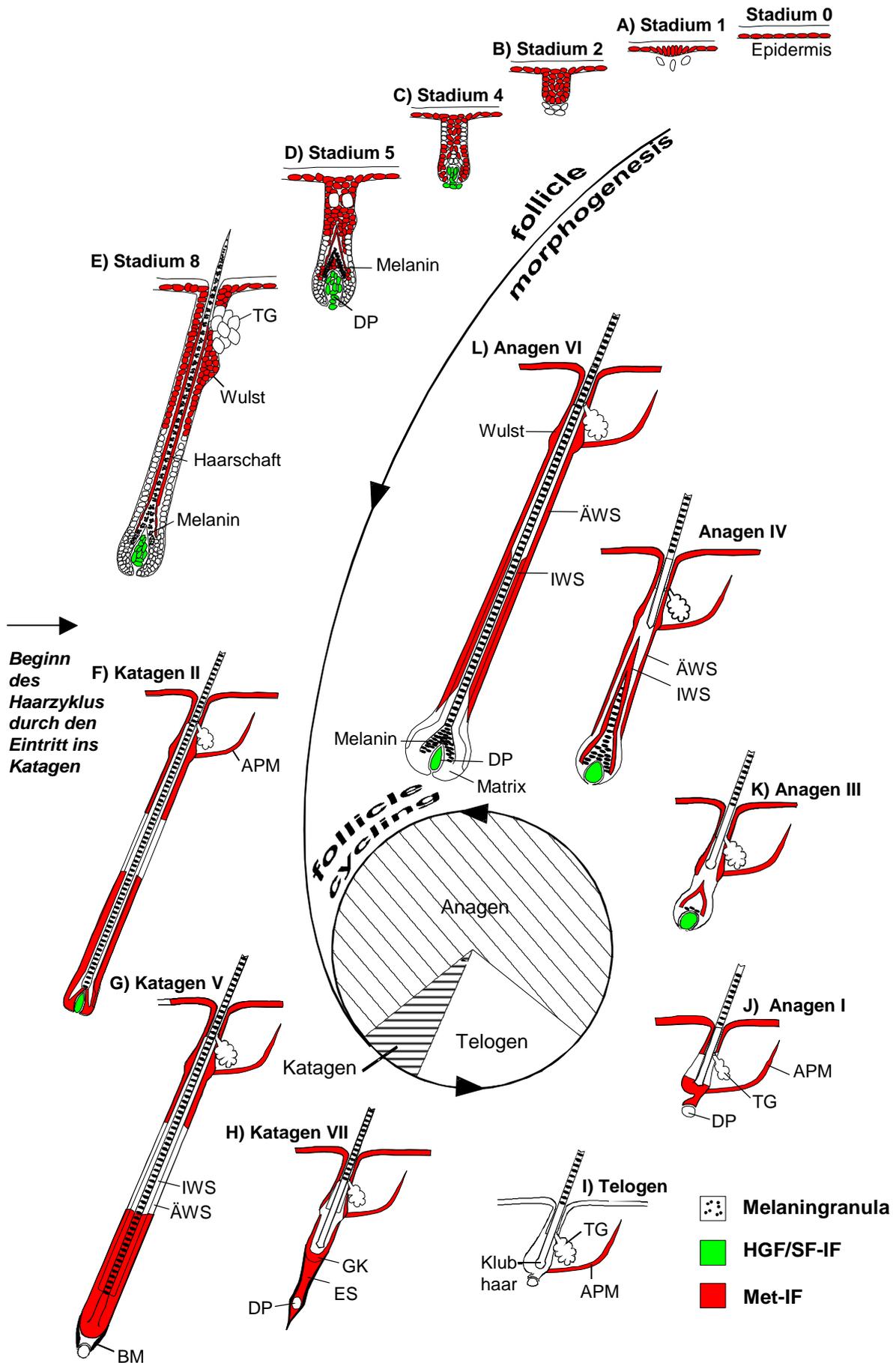


Abbildung 13

Schematische Abbildung der Immunreaktivitätsmuster von HGF/SF und Met während ausgewählter Stadien der murinen Haarfollikelmorphogenese und des folgenden Zyklus

Zellpopulationen, die Met-IR exprimierten wurden als rote Zellen oder Regionen gekennzeichnet, Zellen die HGF/SF-Immunreaktivität (IR) repräsentierten wurden in grün dargestellt. In Anlehnung an Abbildung 12 wurden Schlüsselstadien der murinen Haarfollikel (HF) Morphogenese und des HF Zyklus ausgewählt und schematisch dargestellt [3, 80], deren zusammengefaßten IR-Muster von mehr als 50 longitudinal geschnittenen HF der Rückenhaut von jeweils 5 C57BL/6 Mäusen pro Zeitpunkt stammen. Abkürzungen: APM – arrector pili Muskel, BM – Basalmembran, DP – dermale Papille, E – Epidermis, ES – epithelialer Strang, HM -Haarmatrix, IWS und ÄWS – innere- und äußere Wurzelscheide, TD – Talgdrüse, GK – Germkapsel. Der Pfeil zwischen den Stadien 8 und Katagen II zeigt die Initiation des HF Zyklus mit dem Eintritt in die Katagenentwicklung an.

Stadium 0	Epidermale Keratinozyten waren Met-IR und blieben Met positiv während der gesamten HF Morphogenese (Stadien 1-8, rot).
Stadium 1	Invaginierende Keratinozyten, die den neuen HF bilden sollten wurden Met-IR.
Stadium 2	Charakterisiert durch Bildung des "peg" (HF Ansatz), der Met- positiv gefärbt war.
Stadium 4	Met-IR nahm in den äußeren Zellschichten des distalen "peg's" ab, blieb aber in der proximal Region konstant. Dermale Papillen (DP) Fibroblasten zeigten erstmals HGF/SF-IR (grün).
Stadium 5	HGF/SF -IR intensivierte sich in der DP. Die proximale ÄWS wurde Met negativ wie in den folgenden Stadien 5-8. Die IWS und der distale Bereich des HF, mit der Wulst/Isthmus -Region blieb Met-IR.
Stadium 8	Die DP blieb stark HGF/SF positiv, die Met-IR nimmt in der proximalen ÄWS ab.
Katagen II	Bei Eintritt in den ersten Haarzyklus sank die Intensität der HGF/SF-IR in den DP Fibroblasten und blieb in den Stadien Katagen III-Anagen II aus. Met-IR steigerte sich in der proximalen IWS.
Katagen V	Met-IR bleibt in Teilen der proximalen IWS/ÄWS positiv.
Katagen VII	Met-IR ist ausgeprägt im TES und SHG exprimiert.
Telogen	Außer dem musculus arrector pili zeigte sich keine intrafollikuläre Met-IR. HGF/SF- IR konnte im murinen HF nicht beobachtet werden.
Anagen I	Epithelzellen direkt oberhalb der DP (TAC) sind die ersten Zellen, die Met- IR zeigten.
Anagen III	Keratinozyten der sich bildenden IWS wurden Met-IR. DP Fibroblasten exprimierten erstmals im Anagen HGF/SF-IR.
Anagen IV	Die proximale und zentrale IWS und die zentrale und distale ÄWS zeigten Met-IR. HGF/SF-IR intensivierte sich in der DP.
Anagen VI	Met-IR nahm in der proximalen ÄWS ab. Die zentrale und distale IWS und ÄWS waren Met-IR. Die DP war intensiv HGF/SF-IR.

Wie in der *In situ*-Hybridisierung und der Immunhistochemie gezeigt werden konnte, war die HGF/SF-Expression ausschließlich auf die sehr kleine Zellpopulation der Fibroblasten der dermalen Papille beschränkt (im Verhältnis zu den Zellpopulationen der Gesamthaut), was erklären könnte, weshalb nur eine so geringe Menge an HGF/SF-Transkripten mit der RT-PCR detektiert

werden konnte (**Abb 10A und B**). Die Met-Expression konnte hingegen im benachbarten Follikel epithel nachgewiesen werden. HGF/SF und Met zeigten sowohl in der Haarfollikelmorphogenese als auch im Zyklus eine zeitlich und örtlich stark variierende Expression.

6.4 Apoptose und Met- Expression sind invers korreliert

Basierend auf der Beobachtung, daß die kutanen Met-Transkripte und die korrespondierende Proteinexpression während der Anagen/Katagen-Transformation verstärkt auftraten (**Abb. 10-13**) und daß die Met-Expression besonders stark in ausgewählten Kompartimenten des regredierenden Haarfollikels im Katagen zu beobachten war (**Abb 11E, Pfeilspitzen; Abb 12H, Pfeilspitzen; und 13H**), stellte sich die Frage ob die Keratinozyten des sich zurückbildenden epithelialen Stranges, die apoptotisch waren (TUNEL+), auch Met-IR ko-exprimierten.

Mit einer Doppelfärbetechnik konnte gezeigt werden, daß TUNEL-positive Zellen keine Met-IR (**Abb 12M, Pfeil**) aufwiesen. Dieses Ergebnis suggeriert, daß selektive Met-exprimierende Keratinozyten des epithelialen Stranges einen gewissen Schutz vor dem programmierten Zelltod haben und das Zugabe von HGF/SF möglicherweise den Verlauf des Apoptose-gesteuerten Katagen inhibieren könnte (siehe unten).

5.5 Cyclophosphamid und Cyclosporin A manipuliert die HGF/SF- und Met- Expression im proximalen Haarfollikel

Verändern Cyclophosphamid (CYP) und Cyclosporin A (CsA) die HGF/SF- und Met-Expression? Die vorzeitige, durch CYP-induzierte Follikelregression, die mit einem massiven Anstieg der Apoptoserate einhergeht ^[15], bewirkte ebenso

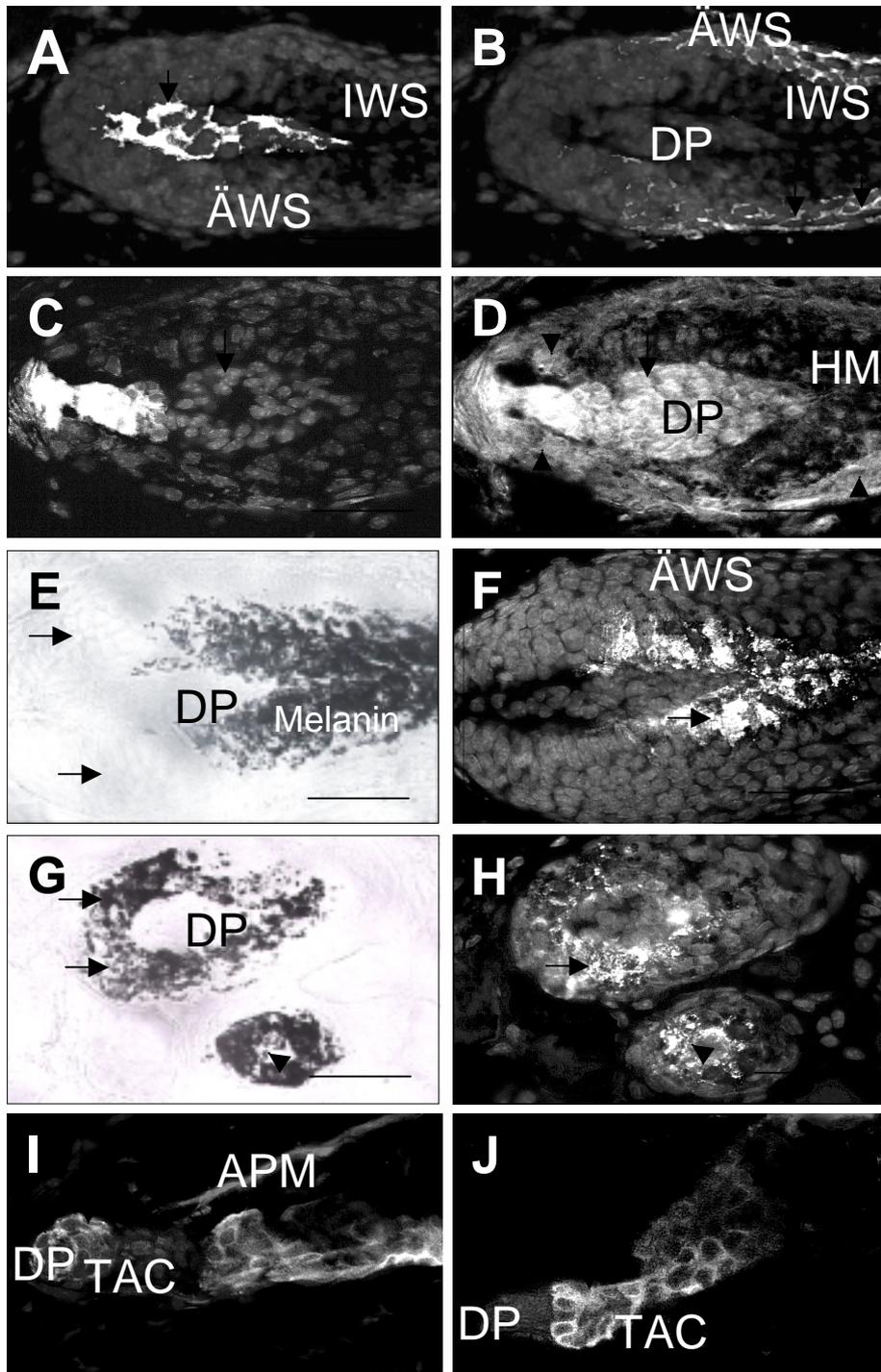


Abbildung 14
 Immunhistochemische HGF/SF- Met - Doppelmarkierung nach pharmakologischer Manipulation durch Cyclophosphamid und Cyclosporin A

Photomikrografische Aufnahmen 10µm dicker Kryostatschnitte Cyclophosphamid- und Cyclosporin A- behandelte Mäuse, die immunhistochemisch mit HGF/SF-, Met und Pep-1 - Antikörpern (Melanozyten-spezifischer Marker) angefärbt wurden. Weiße Markierungen zeigen die nach der schwarz-weiß-Umwandlung erhaltenen positiven IR-Signale (**A-J, außer E und G**). Ungefärbte Schnitte (**E und G**) zeigen die durch die Melaningranula erzeugte Pigmentierung des Haarfollikels (Durchlichtmikroskop).

Die systemische Cyclophosphamid (CYP)-Injektion verursacht eine starke Veränderung in der Expression der HGF/SF- und Met -IR. Während die HGF/SF- IR in unbehandelten Mäusen ausschließlich auf die mesenchymalen Fibroblasten der dermalen Papille beschränkt (**A, Pfeil**) und die Verteilung der Met- Expression im benachbarten Follikelepithel (i.e IWS, ÄWS) zu beobachten war (**B, Pfeile**), bewirkte CYP den spontanen Rückgang der HGF/SF-IR innerhalb der dermalen Papille (**C, Pfeil**) und forcierte die Met-Expression im gesamten proximalen Haarbulbus: der Haarmatrix (**D, Pfeilspitzen**) und insbesondere der Fibroblasten der dermalen Papille (**D, Pfeil**), die bei unbehandelten Tieren während des gesamten Haarzyklus nie Met+ waren (**B**, s. auch Abb. 12 und 13).

Die durch CYP veränderte intrafollikuläre Pigmentverteilung zeigte sich in den stark vermehrt auftretenden Melaninkonglomeraten im proximalen Haarbulbus inner- (**G, Pfeilspitze; schwarz**) und unterhalb der dermalen Papille (**G, Pfeile; schwarz**) in dem während des normalen Haarwachstums zu keiner Zeit Melanin zu beobachten war (**E, Pfeile**). Dieselben Follikel (Abbildungen **E und G**) immunhistochemisch mit Pep-1-Antikörpern markiert (**F und H**) zeigen, daß neben dem Melanin auch die Melanozyten selbst (gezeigt anhand des Melanozyten-spezifischen Enzyms Tyrosinase) von der Haarmatrix in normalen Tieren (**F, Pfeil**) in die dermale Papille (**H, Pfeilspitze**) und in den proximalen Haarbulbus -nach CYP-Applikation- einwandern können (**H, Pfeil**).

Die Anagen-induzierende Injektion von CsA [17,88] bewirkt eine vorzeitige HGF/SF- Expression der dermalen Papille im frühesten Wachstumsstadium (Anagen I) (**I, Pfeilspitze**) bei Met-IR in den benachbarten Epithelzellen (TAC, APM und distaler Follikel; **I, Pfeil**), während im unbehandelten Anagen I-Follikel die dermale Papille HGF/SF negativ ist (**J, Pfeilspitze**). Die umgebenden Keratinozyten sind bereits Met+ (**J, Pfeil**).

Abkürzungen: APM - arrector pili Muskel, DP -dermale Papille, TAC – "transient amplifying cells" (kurzzeitig verstärkt auftretende, proliferierende Zellen), HM -Haarmatrix, IWS und ÄWS – innere- und äußere Wurzelscheide. Maßstab: 50µm.

wie die CsA-induzierte Wachstumsstimulation, eine auffällige Veränderung der HGF/SF-Met-IR im proximalen Haarfollikel. Die durch CYP veränderte Melanogenese zeigte sich neben dem pathologisch verteilten Melaningranula besonders in einer transformierten Pep-1-IR.

Während des normalen, aktiven Haarwachstums (Anagen VI) ist die HGF/SF- IR ausschließlich auf die Fibroblasten der dermalen Papille beschränkt (**Abb 14A, Pfeil**, s. auch Abb 12 und 13). Die Met-IR Verteilung konnte hier im benachbarten Follikelepithel beobachtet werden (**Abb 14B, Pfeile**, s. auch Abb 12 und 13). Im Gegensatz dazu verändert die Injektion mit i.p. CYP die IR der beiden Faktoren gravierend: die HGF/SF-IR in der DP nimmt drastisch ab (**Abb 14C, Pfeil**). Im normalen Haarzyklus wäre sie noch mehrere Tage intensiv

HGF/SF-IR (s. Abb 12L). Die Met-IR intensiviert sich hingegen markant im gesamten proximalen Haarfollikel (Abb 14D, Pfeilspitzen) und ist sogar massiv in der dermalen Papille exprimiert (Abb 14D, Pfeil), die im normalen Haarzyklus nie Met-positiv war (s. auch Abb 12 und 13).

Cyclophosphamid verändert auffallend die der Haut- und Haarpigmentierung zugrunde liegende Melaninproduktion. Unter dem Lichtmikroskop sind deutliche intra- und perifollikuläre und intradermale Pigmentierungsanomalien zu beobachten. Auch die immunhistochemische Markierung mit Pep-1-Antikörpern, die das für die Melaninproduktion essentielle Tyrosinase-Enzym detektieren, zeigte eine deutlich modifizierte Expression, die verdeutlicht, daß nicht nur Melaningranula unkontrolliert aus den Zellen ausgelagert werden, sondern daß die Verteilung der Melanozyten vor allem im proximalen Haarbulbus umstrukturiert wurde.

Während im normalen Anagen-VI-Haarfollikel (aktives Haarwachstum) das Melanin (Abb 14E) und die Melanin-produzierenden Melanozyten (Abb 14F, Pfeil) in der Haarmatrix oberhalb und seitlich der dermalen Papille segmentiert anzutreffen waren, zeigten sich bei Cyclophosphamid-behandelten Tieren die Melaningranula (Abb 14G, Pfeile) sowie auch Pep-1-positiven Zellen (Abb 14H, Pfeil) vornehmlich unterhalb und sogar innerhalb der dermalen Papille (Abb 14G und H, Pfeilspitzen). Dies erscheint besonders im Zusammenhang mit einer veränderten Melanozyten-Verteilung in HGF/SF-überexprimierenden, transgenen Mäusen interessant (s. Abb 18D-F), da HGF/SF die Motilität der Melanozyten sowie die Tyrosinaseaktivität steigert [115].

Die CsA -Injektion von Mäusen mit allen Haarfollikeln im Telogen induziert innerhalb weniger Tage eine Anagenentwicklung [88, 91]. Normale Haarfollikel zeigten schon im frühen Anagen I eine Met-IR in den sich transient akkumulierenden, proliferierenden Zellen (TAC) direkt oberhalb der DP (Abb 14J, Pfeil). Eine positive HGF/SF Färbung der benachbarten Fibroblasten der dermalen Papille (Abb 14J, Pfeilspitze) konnte aber erst im späteren Anagen

III beobachtet werden (s. Abb 12J und 13). In CsA-behandelten Tieren zeigte sich jedoch bereits eine vorzeitige HGF/SF-IR der Fibroblasten der dermalen Papille in Anagen-I-Haarfollikeln (**Abb 14I, Pfeilspitze**). Die Met-IR wies in diesen behandelten Tieren keine wesentlichen Unterschiede auf.

5.6 HGF/SF- und Met- "knockout"- Mäuse zeigen während der frühen Haarfollikelmorphogenese strukturelle Veränderungen

Können HGF/SF- und Met-defiziente Mäuse Haarfollikel ausbilden, und falls ja, ist deren Entwicklung verändert? HGF/SF- und Met "knockout"(KO)- Mäuse zeigen embryonale Lethalität (zwischen E 12.5 -16.5) und geben daher nur bedingt Auskunft über den Einfluß von HGF/SF und Met bei der Haarfollikelentwicklung.

Histochemische Hämatoxylin/Eosin-Färbung von HGF/SF (E16.5)- und Met (E14.5) transgenen Embryonen gaben jedoch Hinweise auf mögliche morphologische Veränderungen während der Haarfollikel-morphogenese.

HGF/SF- und Met-KO-Mäuse zeigten während der beginnenden Haarfollikelmorphogenese strukturelle Veränderungen. Qualitative Auswertungen an Gewebeschnitten von HGF/SF-KO-Tieren von Stadium 2-Haarfollikeln wiesen vermehrt einen aufgetriebenen "peg" (**Abb 15A, Pfeile**) und eine inkongruent kondensierte dermale Papille (**Abb 15A, Pfeilspitze**) im Gegensatz zu Mäusen des Wildtyps (**Abb 15B**) auf.

Vibrissae-Follikel sind in der Entwicklung (zwischen E14.5 und E16.5) weiter fortgeschritten als die übrigen Follikel der Körperbehaarung während der Embryogenese. Bei Met-KO-Mäusen zeigten die Vibrissae-Follikel interessanterweise in stärkeren Maße eine vergrößerte und nicht geschlossene dermale Papille (**Abb 15C, Pfeilspitze**) im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp (WT)-Mäusen (**Abb 15D**).

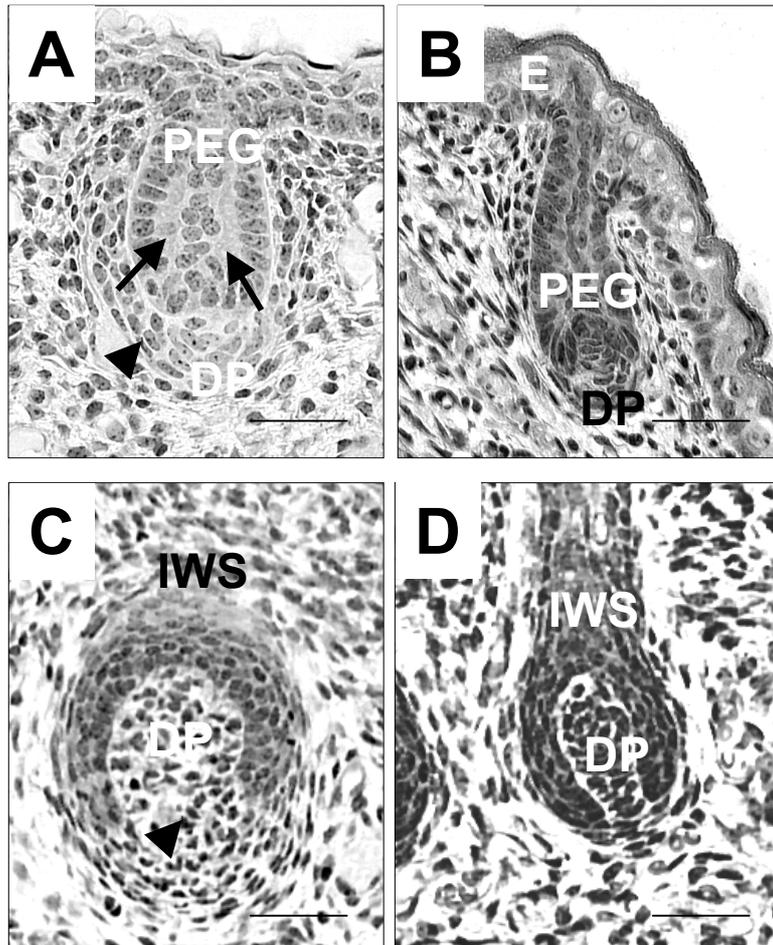


Abbildung 15

Haarfollikel früher morphologischer Entwicklungsstadien von HGF/SF- und Met "knockout"- Mäusen

HGF/SF- und Met "knockout"(KO)-Mäuse zeigen embryonale Lethalität (zwischen E 12.5 -16.5) und geben daher nur bedingt Auskunft über den Einfluß von HGF/SF und Met bei der Haarfollikelentwicklung. HGF/SF- und Met-KO-Mäuse bilden grundsätzlich Haarfollikel aus zeigen aber während der beginnenden Haarfollikelmorphogenese strukturelle Modifikationen.

Die qualitative Auswertungen Hämatoxilin/Eosin-gefärbter, 4µm dicker Gewebeschnitte von HGF/SF- (E16.5) und Met-"knockout"(KO)-Embryonen (E14.5) demonstrieren einen aufgetriebenen "peg" (**A, Pfeile**) und eine inkongruent kondensierte dermale Papille (**A, Pfeilspitze**) im Vergleich zu wildtyp Mäusen (**B**).

Bei Met KO-Mäuse zeigten die während der Embryonalentwicklung weiter fortgeschrittenen Vibrissae-Follikel eine vergrößerte und nicht geschlossene dermale Papille (**C, Pfeilspitze**) im Vergleich zu gleichaltrigen wildtyp Mäusen (**D**). Maßstab: 50 µm.

HGF/SF- und Met-KO Mäuse bilden grundsätzlich Haarfollikel aus (**Abb 15**), womit klar wird, daß HGF/SF bzw. Met für die Haarfollikelinduktion nicht absolut essentiell sind.

5.7 HGF/SF-Überexpression beschleunigt die Haarfollikelmorphogenese

Aufbauend auf der Kenntnis über die charakteristische, entwicklungsbiologisch kontrollierte Expression von HGF/SF während der HF-Morphogenese (Abb 11, 12 und 13), stellte sich die Frage, inwiefern eine HGF/SF –Überexpression die Haarfollikelentwicklung beeinflusst. Mit diesem Ziel wurden neonatale HGF/SF-überexprimierende transgene (TG) Mäuse mit gleichaltrigen WT-Mäusen verglichen und speziell auf die Anzahl der sich entwickelten HF sowie die Entwicklungsgeschwindigkeit der HF-Morphogenese untersucht.

Am postnatalen Tag 3 (P3) waren die meisten HF der HGF/SF überexprimierenden TG Mäuse in weit fortgeschrittenen Stadien (Stadien 7-8) der HF Morphogenese (**Abb. 16A und C**), während sich die HF von WT Mäusen zu diesem Zeitpunkt in früheren Stadien (5 und 6) befanden (**Abb. 16B und C**). Diese relative Beschleunigung der Haarfollikelmorphogenese in HGF/SF TG Tieren wurde zusätzlich mit Hilfe der Hautdickenmessung bestätigt, die eine substantielle, fast verdoppelte Maushautdicke ($735.2 \pm 61.2 \mu\text{m}$) ($p < 0.05$) an P3 im Vergleich zu ($423.3 \pm 52.1 \mu\text{m}$) WT Mäusen aufzeigte. In den repräsentativen mikroskopischen Fotografien wurde dies ebenso deutlich (**Abb 16A und B**).

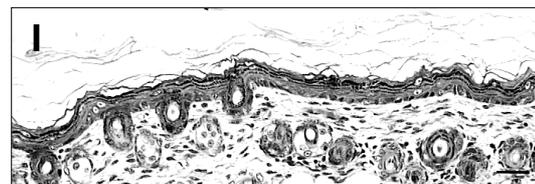
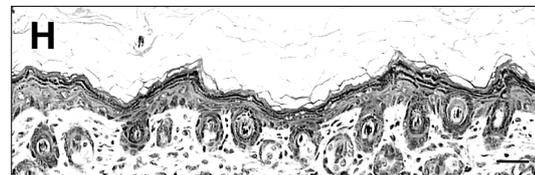
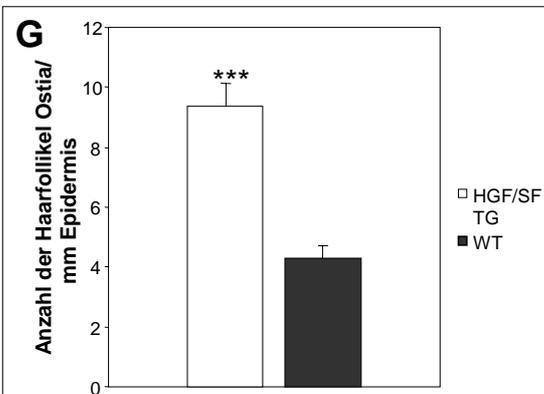
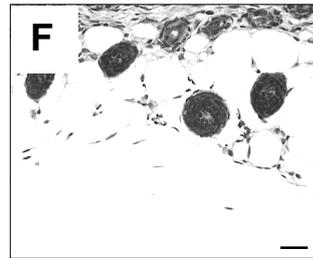
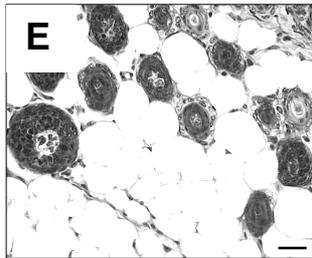
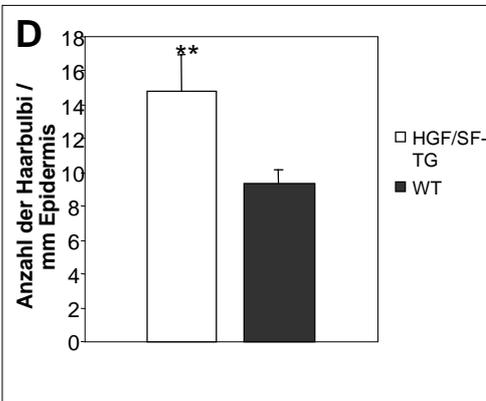
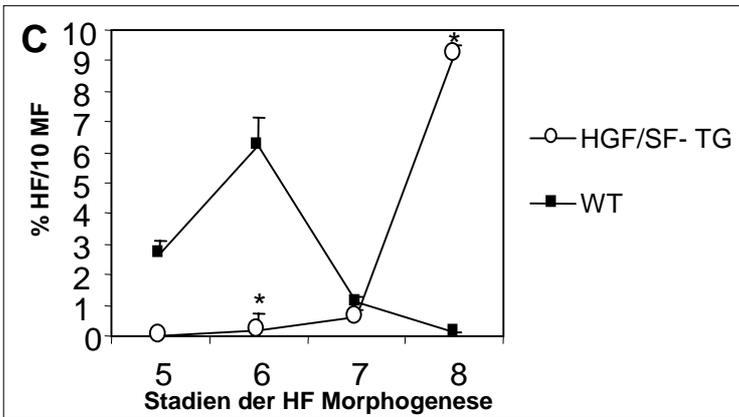
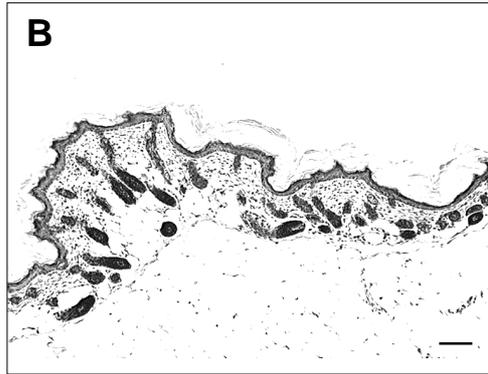
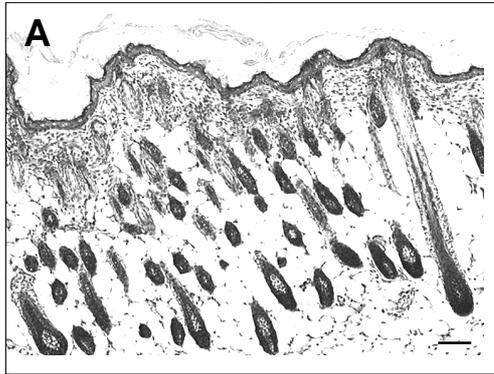


Abbildung 16

HGF/SF -Überexpression in neonatalen Mäusen (P3) resultiert in der Verdopplung der Haarfollikel (HF) und ist mit einer beschleunigten HF Morphogenese assoziiert

Hämatoxylin/Eosin gefärbte Hautgewebeschnitte von 3 Tage alten HGF/SF-überexprimierenden, transgenen (TG) Mäusen und deren korrespondierenden gleichaltrige wildtyp (WT)-Mäusen wurden für die HF Quantifizierung sowie für die Bestimmung der Haarzyklusstadien herangezogen. Der Prozentsatz der einzelnen Stadien wurde mit Hilfe der quantitativen Histomorphometrie nach anerkannten morphologischen Kriterien bestimmt [6, 10] (**A, B und C**), die absolute Anzahl der Follikelheiten wurde in HF Bulben gezählt (**D, E und F**) und epidermale ostia pro mm Epidermislänge (**G, H und I**) anhand horizontal geschnittener Hautbiopsien bestimmt, die das mehrfache Zählen desselben HF vermeidet. Maßstab: 100 µm (A,B), 50 µm (E,F,H,I).

Die repräsentativen Abbildungen zeigen die beschleunigte HF Morphogenese in HGF/SF TG Tieren, bei denen die Mehrzahl der Stadium 7-8 HF bis tief in die verbreiterte Subkutis reichte (**A**), währenddessen WT Mäuse HF in den Stadien 5-6 aufwiesen, die erst die Kutis/Subkutisgrenze erreichten (**B**). Die Grafik faßt den prozentualen Anteil der HF von 10 Mikroskopischen Feldern zusammen, deren Maxima im Stadium 8 bei den TG Tieren zeigte (**C, offene Kreise**) und Stadium 6 bei den gleichaltrigen WT Tieren desselben Wurfes (**C, schwarze Quadrate**).

Während der neonatalen HF Morphogenese an P3 zeigten HGF/SF TG Mäuse einen signifikanten (fast zweifachen!) Anstieg der HF Anzahl in TG Tieren (**E**) verglichen zu WT Mäusen (**F**), grafisch zusammengefaßt in (**D**).

Die grafische Präsentation der Quantifizierung von epidermalen ostia/ mm Epidermislänge zeigte (ähnlich der in Abbildung D) eine Verdoppelung der HF von HGF/SF TG Mäusen (**G, weißer Balken**) verglichen zu gleichaltrigen WT Mäusen (**G, schwarzer Balken**). Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von H&E-gefärbten Hautschnitten HGF-TG-(**H**) und WT-Tieren (**I**) verdeutlicht die Verdopplung der epidermalen HF-Ansätze (Ostia). *** = $p < 0.001$.

Wie oben bereits beschrieben, verändert sich die Hautdicke proportional zu den sich entwickelnden, synchronisierten Haarzyklusstadien (vergl. Abb 9). Da sich die Hautdicke ebenso mit den aufeinanderfolgenden Stadien der HF-Morphogenese vergrößert [5], unterstützt die annähernd verdoppelte Hautdicke bei TG Mäusen an P3 das Konzept, daß die HGF/SF-Überexpression die HF-Morphogenese beschleunigt.

Ferner steigt bei den TG Mäusen an P3 die Gesamtzahl der HF (gezählt wurden Haarbulben) massiv an (**Abb. 16D weißer Balken; Abb 16E**) im Vergleich zu WT Kontrollmäusen (**Abb. 16D, schwarzer Balken; Abb 16F**).

Um diese außergewöhnlich starke morphogene Veränderung zu verifizieren, wurden ebenso die HF Ostia (Haarfollikelansätze entlang der Epidermis) pro mm Epidermislänge quantifiziert, um mögliche Fehler bei der Auszählung

einzelner Follikel auszuschließen [6, 10]. Auch bei dieser supplementären, histomorphometrischen Auswertung zeigte sich der hochsignifikante ($p < 0.001$) Anstieg der Anzahl an Haarfollikeln in HGF/SF überexprimierenden TG Mäusen (**Abb 16G, weißer Balken**) im Vergleich zu gleichaltrigen WT Tieren (**Abb 16G, schwarzer Balken**).

Zusammenfassend bestätigen diese Daten die potenten morphogenen Eigenschaften von HGF/SF während der Haarfollikelmorphogenese.

5.8 Die Follikelregression (Katagen) ist in HGF/SF- transgenen Tieren signifikant verzögert

Nach dem Durchlaufen der HF Morphogenese beginnt der HF seinen lebenslangen Haarzyklus bestehend aus Regressions-, Ruhe- und Wachstumsphase, den er mit dem Eintritt des ersten Katagen –um den Tag 19 nach der Geburt (P19)– beginnt [3, 6] (s. Abb 2). Neben der beobachteten Beschleunigung der Follikelentwicklung während der neonatalen Morphogenese am frühen P3, zeigte sich bei der histomorphometrischen Auswertung der HF Morphogenese eine weitere interessante Begebenheit: am Tag 19 nach der Geburt konnte reziprok eine signifikante Verzögerung der Katagenentwicklung in HGF/SF TG Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyptieren desselben Wurfes beobachtet werden (**Abb 17A-C**). Dies ist umso bemerkenswerter als aus den vorherigen Daten eine vorzeitige Komplettierung der HF Morphogenese –verglichen mit den Kontrolltieren– angenommen werden muß (**Abb 16A-C**).

Wie in den repräsentativen photomikrographischen Aufnahmen demonstriert werden konnte, zeigte auch die quantitative Histomorphometrie, daß sich die Mehrheit der HF in HGF/SF TG Mäusen an P17 immer noch im späten Anagenstadium bzw. in frühen Katagenstadien befanden (**Abb 17A; Abb 17C weiße Kreise**), während sich zu diesem Zeitpunkt die HF der WT

Kontrollmäuse bereits in den späten Stadien der Katagenentwicklung befanden (Abb. 17B; Abb 17C, schwarze Quadrate).

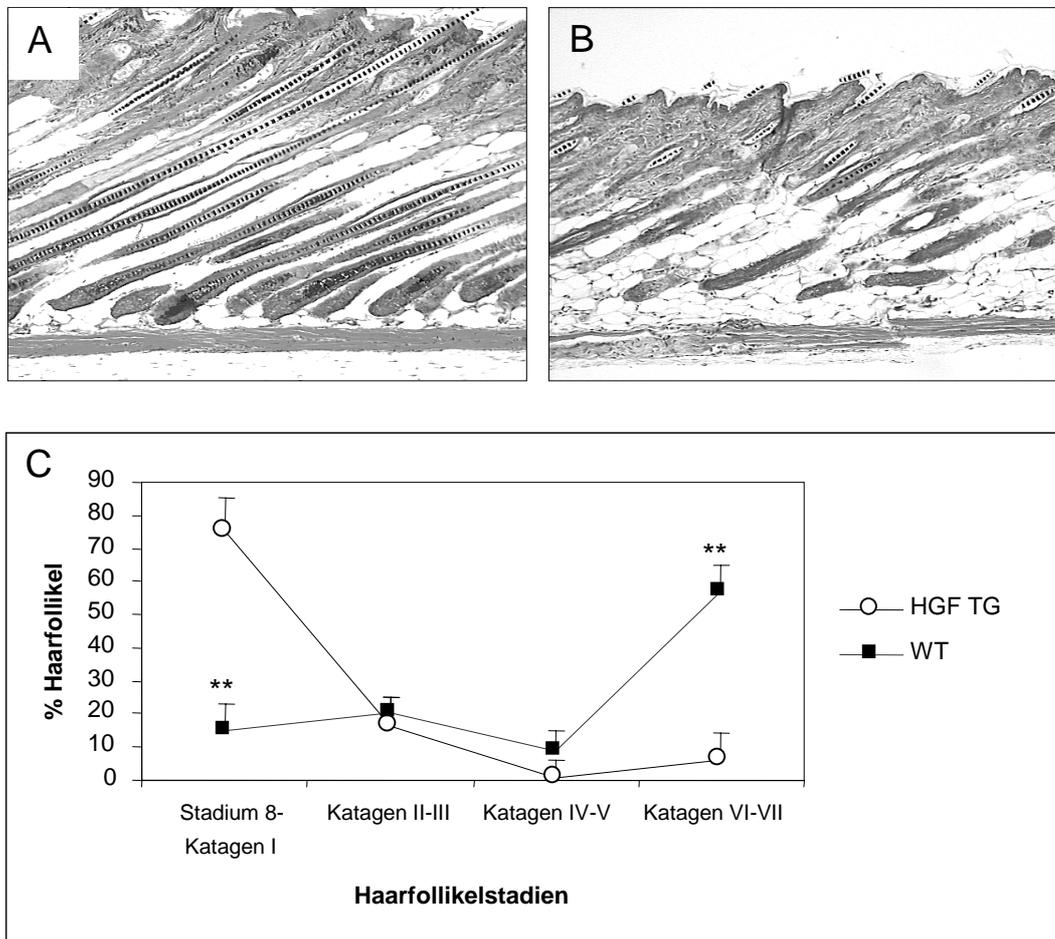


Abbildung 17
Katagenentwicklung am Tag P17 HGF/SF-überexprimierender neonataler Mäuse

Hämatoxylin/Eosin- gefärbte Paraffinschnitte von 17 Tage alten HGF/SF-überexprimierenden transgenen (TG) Mäusen sowie deren korrespondierenden gleichaltrigen wildtyp(WT)-Mäusen wurden für die Quantifizierung der Haarzyklusstadien herangezogen. Der Prozentsatz der einzelnen Stadien wurde mit Hilfe der quantitativen Histomorphometrie nach anerkannte morphologischen Kriterien bestimmt [6, 10] (A, B und C). ** = $p < 0.01$.

Die repräsentativen mikroskopischen Abbildungen zeigen eine deutliche Verzögerung der Katagenentwicklung in HGF/SF-überexprimierenden TG Mäusen, bei denen alle HF im Stadium 8 oder Katagen I tief in die Subkutis hineinragen (A), während WT Mäuse bereits regredierende HF in späten Katagenstadien des ersten Haarzyklus zeigen. Auch die Hautdicke ist deutlich verringert (vergl. A und B). Die Grafik fasst den prozentualen Anteil der HF zusammen, deren Maxima sich im Stadium 8 und Katagen I bei den TG Tieren zeigte (C, wei e Kreise), aber bereits im KatagenVI-VII bei den gleichaltrigen WT Tieren desselben Wurfes (C, schwarze Quadrate).

5.9 HGF/SF- transgene Mäuse entwickeln massive Anomalien in der Haut- und Haarfollikelmorphologie, der Follikel-Pigmenteinheit sowie der konstitutiven HGF/SF- und Met-Expression

Verändert sich die Struktur und Pigmentierung sowie die HGF/SF- und Met-Expression bei HGF/SF-überexprimierenden Mäusen? Bei einem Teil der 6 Wochen alten Tiere entwickelte sich durch die Überexpression von transgenem HGF/SF ein stark pathologisches Haut- und Haarbild mit massiven Störungen der gesamten dermalen und folliculären Struktur.

Die Epidermis zeigte ein stratum lucidum (stark erweiterte, lockere Hornschichten) (**Abb 18A und D**) und war partiell hyperplastisch, die Dermis war atrophisch und die Subkutis zeigte sich stark faserhaltig (nicht gezeigt). Diese TG-Mäuse demonstrierten außerdem eine annormale Haarschaftmalazie mit stark erweitertem Haarkanal (**Abb 18A, Pfeilspitzen**). Im späten Katagen-Follikel konnte ein überdimensionaler epidermaler Strang beobachtet werden, dessen Breite die doppelte Größe eines normalen epidermalen Stranges aufwies (**Abb 18B, Pfeilspitze**). Auch die Germkapsel war stark vergrößert (**Abb 18B, GK**). Besonders interessant war das Auftreten von Follikeln mit zwei strukturell isolierten dermalen Papillen (**Abb 18C, DP**).

HGF/SF ist in der Lage *in vitro* die Proliferation von Melanozyten zu fördern und deren Motilität zu steigern. Außerdem kann HGF/SF die Tyrosinase- Aktivität und, damit verbunden, die Melaninsynthese erhöhen [35, 67]. In transgenen Mäusen, die ubiquitär HGF/SF überexprimieren, zeigte sich eine Hyperpigmentierung der Dermis (ähnlich der ektopen Melaninverteilung bei Tieren, die mit Cyclophosphamid behandelt wurden [82]). Unterhalb der Epidermis wiesen die HGF/SF-überexprimierenden Tiere verstärkt Melaninablagerungen auf (**Abb 18D, Pfeile**). Genau in diesem Bereich (sub-epidermal) zeigten die transgenen Tiere vermehrt HGF/SF-IR Zellen (**Abb 18E, Pfeile**). Die Epidermis und das distale Follikelepithel waren Met-positiv (**Abb 18E**).

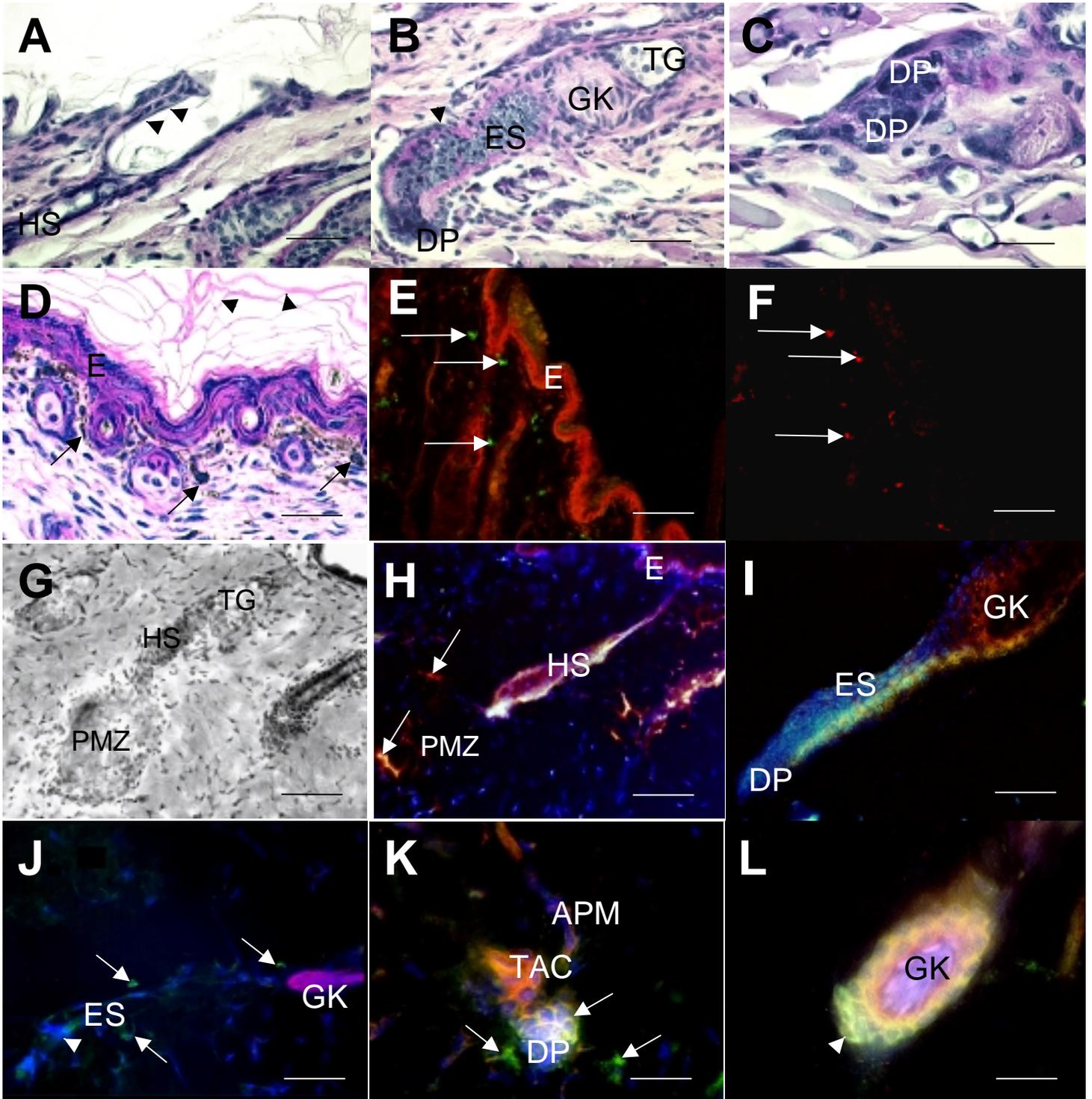


Abbildung 18

Veränderungen des Haut- und Haarbildes, der Melanogenese sowie der HGF/SF-Met-Expression HGF/SF-überexprimierender Tiere

Gewebeschnitte (4-10 µm) von HGF/SF-überexprimierenden transgenen Mäusen wurden entweder mit Hämatoxylin/Eosin angefärbt (**A-D, G**) oder mittels immunhistochemischer Doppelfärbung für HGF/SF- (**grüne Fluoreszenz**) und Met- (**rote Fluoreszenz**) Antigenen (**E, H-L**) bzw. Pep-1 Antikörpern- (**rote Fluoreszenz, F**) spezifisch markiert. **Gelbe Fluoreszenz** signalisiert eine HGF/SF-Met –Kokollisation (additive Farbmischung durch die Überlagerung der einzelnen Farbfilter). Die Zellkernfärbung bei **H-L** erfolgte durch den Farbstoff Hoechst 33342 (**blaue Fluoreszenz**).

Abkürzungen: APM – arrector pili Muskel, DP – dermale Papille, TAC – transient amplifying cells (kurzzeitig verstärkt auftretende, proliferierende Zellen), E – Epidermis, ES – (regredierender) epithelialer Strang, HS – Haarschaft, IWS und ÄWS – innere- und äußere Wurzelscheide, TD – Talgdrüse, GK – Germkapsel. Maßstab: 25µm für C, K und L; 50µm für A, B, D, I; 100µm für E-H, und J.

Bei einem Teil der 6 Wochen alten transgenen Tiere entwickelte sich ein stark pathologisches Haut- und Haarbild mit massiven Störungen der gesamten dermalen und follikulären Struktur mit anormaler Haarschaftmalazie (mit stark erweitertem Haarkanal, **A, Pfeilspitzen**). In späten Katagen-Follikeln konnte ein überdimensionaler epidermaler Strang beobachtet werden, dessen Breite und Länge sich bis zum Doppelten der Größe eines normalen epidermalen Stranges entwickelte (**B, Pfeilspitze**) und auch die Germkapsel zeigte sich stark vergrößert (**B, GK**). Besonders interessant war das Auftreten von Follikeln mit zwei strukturell separierten dermalen Papillen (**C, DP**).

In diesen transgenen HGF/SF-überexprimierenden Mäusen, zeigten sich mehrfach übereinandergelagerte Hornschichten (Stratum lucidum) über der Epidermis (**D, Pfeilspitzen**) und starke Pigmentablagerungen in subepidermalen Zellschichten (**D, Pfeile**). Genau in diesem subepidermalen Bereich sind HGF/SF-positive Zellen zu sehen (**E, Pfeile**), die in einem folgenden Sequenzschnitt (zu D) ebenfalls IR für Pep-1-Antikörper (Tyrosinase-Marker, der Melanin-produzierende Melanozyten) aufwies (**E, Pfeile**). In vereinzelt Fällen konnten prä-maligne Zellstrukturen (PMZ) beobachtet werden (**G, schwarz/weiß transformiert**), die eine Ko-Expression von HGF/SF- und Met -IR aufwies (**H, Pfeile**).

In HGF/SF-transgenen Tieren zeigte sich im Vergleich zu wildtyp Mäusen eine stark veränderte HGF/SF-Met-Expression im proximalen Haarfollikel: im regredierenden epithelialen Strang von Katagen 7-Haarfollikeln zeigte sich eine prägnante HGF/SF-IR (**I, ES**), der in normalen Tieren ausschließlich Met-IR war (s. Abb 12 H). Auch die dermale Papille zeigte HGF/SF-IR (**I, DP**), wildtyp-Tieren zu diesem Stadium keine IR mehr zeigte (vergl. Abb 12 H). Zusätzlich konnte in späten Katagenstadien ein verlängerter, oftmals fragmentierter epithelialer Strang beobachtet werden, bei dem nur vereinzelt HGF/SF-IR Zellen (**J, Pfeile**) zu beobachten waren. Bereits in sehr frühen Anagen I-Follikeln zeigte sich bereits die dermale Papille HGF/SF-IR (**K, Pfeilspitze**) und um die dermale Papille herum waren zusätzlich HGF/SF positive perifollikuläre Zellen angesiedelt (**K, Pfeile**). In Katagen VI- Haarfollikeln konnte in der Germkapsel eine Kokollisation von HGF/SF- und Met-IR beobachtet werden (**L, GK**), wobei der benachbarte epitheliale Strang HGF/SF-IR war (**L, Pfeilspitze**).

In folgenden Sequenzschnitten konnte sichtbar gemacht werden, daß diese HGF/SF -positiven Zellen auch gleichfalls Pep-IR waren (**Abb 18F, Pfeile**). Der Pep-1-Antikörper erkennt ein Melanozyten-spezifisches Fragment des für die Melaninproduktion wichtigen Tyrosinase-Proteins ^[105].

In vereinzelt Fällen konnten intrafollikuläre, prä-maligne Zellstrukturen beobachtet werden (**Abb 18G**), die eine Ko-expression von HGF/SF- und Met -IR aufwiesen (**Abb 18H, Pfeile**).

Eine stark veränderte HGF/SF-Met-Expression im Vergleich zu WT Mäusen ließ sich besonders im proximalen Haarfollikel von HGF/SF-transgenen Tieren aufzeigen: im regredierenden epithelialen Strang von Katagen 7-Haarfollikeln zeigte sich eine prägnante HGF/SF-IR (**Abb 18I, ES**), die in WT- und C57BL/6-Mäusen ausschließlich Met-IR war (s. Abb 12 H). Auch in der dermale Papille war HGF/SF-IR zu erkennen (**Abb 18I, DP**), die bei WT Tieren zu diesem Stadium bereits keine IR mehr zeigte. Zusätzlich konnte in späten Katagen-Stadien ein verlängerter, partiell unterbrochener, epithelialer Strang beobachtet werden, in dem Zellen vereinzelt HGF/SF-IR waren (**Abb 18J, Pfeile**).

Bereits in frühen Anagen I-Follikeln war HGF/SF-IR in der dermalen Papille zu erkennen (**Abb 18K, Pfeilspitze**). Dieses Expressionsmuster zeigte Analogien zur HGF/SF-IR Cyclosporin A-behandelter Tiere (s. Abb 14I). In Katagen-VI-Haarfollikeln konnte in der Germkapsel eine Ko-lokalisierung von HGF/SF- und Met-IR beobachtet werden (**Abb 18L, GK**), die normalerweise fehlt und der benachbarte epitheliale Strang war zusätzlich HGF/SF-IR (**Abb 18L, Pfeilspitze**).

Diese Ergebnisse der Untersuchungen an HGF/SF-überexprimierenden Tieren suggerieren, daß das HGF/SF-Met-System nicht nur einen Einfluß auf die Kontrolle des Haarwachstums, sondern darüberhinaus auf die Melanogenese und der pathologischen Entwicklung prä-maligner Zellstrukturen hat.

5.10 HGF/SF- Injektion *in vivo* verzögert die Katagenentwicklung

Um der Frage nachzugehen, ob exogen zugeführtes HGF/SF die Follikelregression verzögern kann, wurde rekombinantes HGF/SF intradermal in die Rückenhaut 14- oder 17 Tage alter Mäuse injiziert, deren Haarfollikel sich in der späten Wachstumsphase –also kurz vor dem Eintritt in das spontane Katagen (P14)– oder bereits am Anfang der Katagenphase des depilations-induzierten Haarzyklus befanden (D17) [3, 5, 12].

HGF/SF-injizierte Mäuse (erste Injektion an P14) zeigen eine graduelle Katagenentwicklung mit zunehmender Entfernung vom Injektionsbereich in die Peripherie (**Abb 12N**), wie mit der TUNEL/Hoechst33342/Ki67- Dreifachfärbung demonstriert werden konnte.

Am Tag P17 waren im Bereich der markierten Injektionsstelle (**Abb 12N, Stern**) immernoch HF in einer späten Wachstumsphase (Anagen/Katagen-Transformation) zu erkennen, die fast keine TUNEL+ Zellen aufwies aber dafür eine große Population proliferierender Zellen im proximalen Follikelepithel zeigten, die Ki67-IR waren (**Abb 12N, Pfeile**). Entlang des HGF/SF-Gradienten mit zunehmender Entfernung zum Injektionspunkt zeigten die meisten Haarfollikel bereits Zeichen der weit-fortgeschrittenen Katagenentwicklung: Dies wurde besonders deutlich an der stark steigenden Anzahl TUNEL+ Zellen im regredierenden epithelialen Strang (**Abb 12N, ES, Pfeilspitzen**) [15], zusammen mit dem Ausbleiben proliferierender Zellen im proximalen HF (**Abb 12N**).

Komplementär zu dieser suggestiven, qualitativen Beobachtung, bestätigte die quantitative Auswertung der HF-Stadien um den definierten HGF/SF-Injektionsbereich die Anwesenheit einer signifikant höheren Zahl an HF in frühen Katagenstadien, verglichen zu Vehikel-behandelten Mäusen, die eine größere Anzahl an späten Katagen-HF aufwiesen (**Abb 19A**).

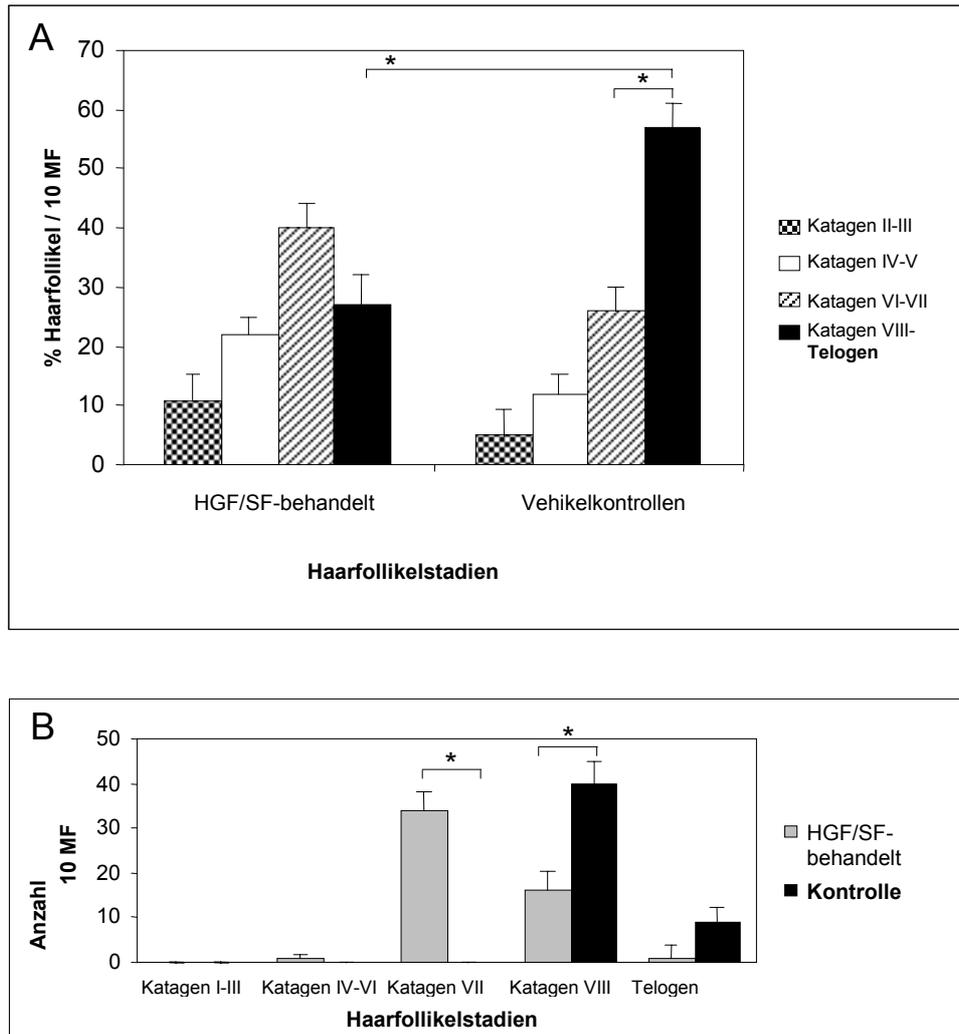


Abbildung 19
Katagenentwicklung HGF/SF-behandelter C57BL/6-Mäuse

Kryostatgewebeschnitte von C57BL/6-Mäusen, die i.c. mit rekombinantem HGF/SF oder Vehikel injiziert wurden: zum einen Jungtiere am Tag P14 (**A**) und zum anderen Tiere die sich am Tag 17 des depilations-induzierten Haarzyklus befanden (**B**). Quantitative Histomorphometrie wurde nach bekannten Kriterien angewandt um den Verlauf der Regressionsentwicklung zu bestimmen.

A Der Prozentsatz der Haarfollikel (HF) in den jeweiligen Stadien der spontanen Katagenentwicklung wurde am Tag P17 evaluiert. Die dynamische Fließgrafik zeigt eine Verschiebung in Richtung früherer Stadien der Katagenentwicklung in HGF/SF behandelten Mäusen mit den meisten HF in Katagen VI-VII (**A, gestreifter Balken**), während in Kontrollmäusen die Mehrzahl der HF im Katagen VIII zu beobachten waren (**A, schwarzer Balken**).

B Mäuse wurden mit rekombinantem HGF/SF im fortgeschritteneren Katagen behandelt (i.c. Injektion am Tag 17 und 18, Entnahme am Tag 19 p.d.) und zeigten einen signifikanten Anstieg von HF im Katagen VII und VIII (**B, graue Balken**), verglichen zu Vehikel-behandelten Mäusen, deren Mehrzahl der HF bereits im Katagen VIII oder im Telogen waren (**B, schwarze Balken**). Die Sterne in A und B geben die signifikanten Unterschiede zwischen den definierten Katagenstadien in behandelten Mäusen und Kontrollmäusen an. Student's t-test, * = $p < 0.05$.

Die Quantitative Histomorphometrie an Mäusen, die am Tag 17 p.d. mit HGF/SF behandelt wurden, offenbarte ebenfalls eine Verzögerung der Katagenentwicklung.

Am Tag 19 p.d. war die Mehrzahl der HF der Kontrollmäuse bereits im Katagen VIII oder Telogen (**Abb 19B, schwarze Balken**), die Gewebeschnitte von HGF/SF-behandelten Mäusen zeigten hingegen eine signifikante verzögerte Katagenentwicklung, erkennbar an dem überwiegenden Teil von Haarfollikeln im späteren Katagen (VII-VIII) (**Abb 19B, graue Balken**). Diese Entwicklungsverzögerung bei ungefähr einem HF-Stadium steht im Einklang mit dem signifikanten, morphologisch leicht erkennbaren Unterschied in der Hautdicke von HGF/SF-behandelten ($442.3 \pm 28.6 \mu\text{m}$), und Haut von Kontrollmäusen ($294.7 \pm 34.3 \mu\text{m}$, $p > 0.05$).

Die Dicke der murinen Haut ist an den synchronisierten Haarzyklus gekoppelt. Somit ist Anagenhaut wesentlich dicker als Katagenhaut (s. Abb 9, vergl. Abb 17A und B), die Dicke der Haut innerhalb der Katagenstadien nimmt kontinuierlich ab und Katagenhaut ist dicker als Telogenhaut [80, 116]. Daraus folgt, daß der Katagen/Telogen-Übergang in Vehikel-behandelten Mäusen im Gegensatz zu den HGF/SF-behandelten Tieren zu diesem Zeitpunkt bereits fast abgeschlossen war, was ein zusätzliches, starkes Indiz für die Katagen-inhibierende Aktivität von HGF/SF *in vivo* liefert.

5.11 HGF/SF verzögert die Follikelregression in Hautorgankulturen

Um der Frage nachzugehen ob die beobachteten Auswirkungen von HGF/SF auf den murinen Haarzyklus in den transgenen und den mit rekombinantem Protein behandelten Tieren nicht fälschlicherweise auf systemische oder sekundäre Effekte des Wachstumsfaktors zurückzuführen waren –also z.B. durch andere Substanzen, zugeführt durch Innervation oder Blutgefäße–, wurde die Zugabe von rekombinantem HGF/SF ebenfalls im murinen Hautorgansystem getestet [77]. Hierzu wurden Stanzbiopsien der Rückenhaut von normalen C57BL/6 Mäusen 17 Tage nach der Anageninduktion durch

Depilation entnommen, die einheitlich HF im Stadium der spontanen, Apoptose-gekoppelten Katagenentwicklung [1, 17, 117] aufwiesen. Diese Biopsien wurden an der Luft/Flüssigkeit-Interphase auf Gelatinegel –ohne innervations- und blutgefäßspezifische Einflüsse– mit oder ohne Zugabe von rekombinantem HGF/SF 48 Stunden lang kultiviert.

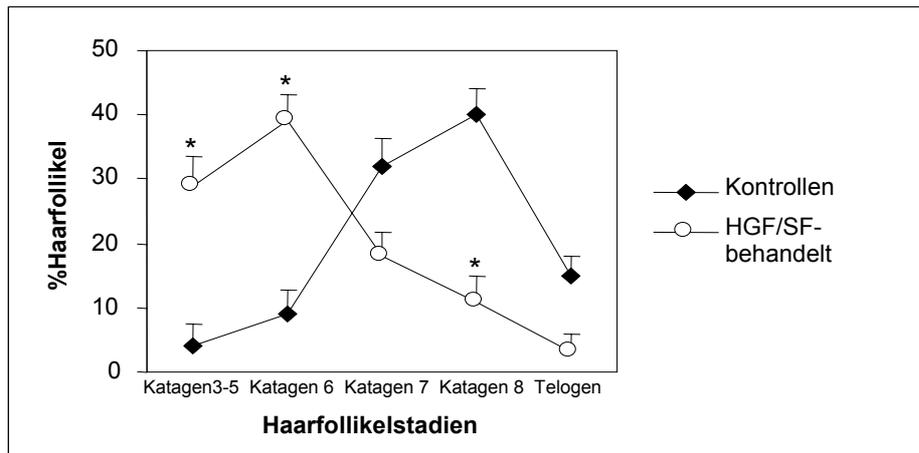


Abbildung 20.
Katagenentwicklung in HGF/SF-supplementierten Hautorgankulturen

Stanzbiopsies der Rückenhaut von C57BL/6-Mäusen, entnommen am Tag 17 des depilations-induzierten Haarzyklus (bei denen sich die HF in der Anagen VI/Katagen Transformation befanden), wurden an der Luft/Flüssigkeitsinterphase auf Gelatine-Gelen für 48 Stunden mit oder ohne 10 ng/ml rekombinantem HGF/SF inkubiert. Der Prozentsatz der HF in den unterschiedlichen Katagenstadien wurde quantitativ bestimmt.

Im Vergleich zu Vehikelkontrollen (**schwarze Quadrate**), zeigten die Hautfragmente, die mit HGF/SF inkubiert wurden eine signifikante Verzögerung der Katagenentwicklung (**offene Kreise**). Verdeutlicht wird dies durch den hohen Prozentsatz an HF in den Stadien Katagen III-VI in HGF/SF-inkubierten Kulturen verglichen zu der Mehrzahl an HF der Stadien Katagen VII und VIII in den Kontrollen (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes, n=8-10 Biopsien pro Gruppe, Student's t-test, Sterne zeigen signifikante Unterschiede zu den Kontrollen, * = $p < 0.05$).

Nahezu kongruent zu den Ergebnissen der oben beschriebenen *in vivo*-Studien zeigte die quantitative Analyse der HGF/SF-supplementierten Hautorgankulturen eine deutliche, signifikante Verzögerung der Katagenentwicklung *in vitro*.

Die Mehrzahl der mit 10 ng/ml rekombinantem HGF/SF kultivierten Haarfollikel war zum Untersuchungszeitpunkt noch in den Katagenstadien III-VI (**Abb 20**,

weiße Kreise), während die HF Vehikel-behandelter Hautbiopsien in den späteren Haarzyklusstadien Katagen VII, VIII oder Telogen waren (**Abb 20, schwarze Quadrate**).

Diese Ergebnisse legen nahe, daß HGF/SF die Katagenentwicklung mittels lokalem, intrakutanem Wirkungsspektrum inhibiert.

5.12 Die intradermale Implantation HGF/SF-getränkter Agarose-Kügelchen induziert beschleunigtes Haarfollikelwachstum

Ist HGF/SF in der Lage Anagen in Telogenfollikeln zu induzieren?

Wie oben gezeigt, kann injiziertes HGF/SF die Katagenentwicklung verzögern (Abb 12N, 18 und 19). Um zu untersuchen, ob rekombinantes HGF/SF auch einen stimulativen Effekt auf die Anagenentwicklung (Haarwachstum) hat, wurden poröse Agarosekügelchen mit HGF/SF getränkt und in die Rückenhaut von C57BL/6-Mäusen mit allen Follikeln im Telogen implantiert. Diese „slow release beads“ haben gegenüber der einfachen Injektion den Vorteil, daß das Protein langsamer an die Umgebung abgegeben wird und so einen relativen „Schutz“ vor zu schnellem Abbau des Wachstumsfaktors durch Enzyme gewährleistet werden kann [7, 20, 113].

Diese implantierten HGF/SF-getränkten "beads" induzierten in der Tat ein beschleunigtes Haarfollikelwachstum, genauer: eine vorzeitige Anageninduktion. Von der Injektionsstelle (**Abb 21A und B, Pfeile**) in der Rückenhaut breitete sich verstärkt das Wachstum von bereits makroskopisch sichtbaren Haaren bzw. verstärkter Pigmentierung in Richtung Nacken aus (**Abb 21A**). In vehikelbehandelten Mäusen konnte ebenfalls eine vorzeitige Anageninduktion beobachtet werden (**Abb 21B**). Nach histologischer Untersuchung zeigte sich in den Kontrolltieren (**Abb 21D**) die Mehrzahl der Haarfollikel um den Bereich des Implantates um 2 Stadien (Anagen II) hinter der Entwicklung der HGF/SF-behandelten Tiere (Anagen IV) (**Abb 21C**).

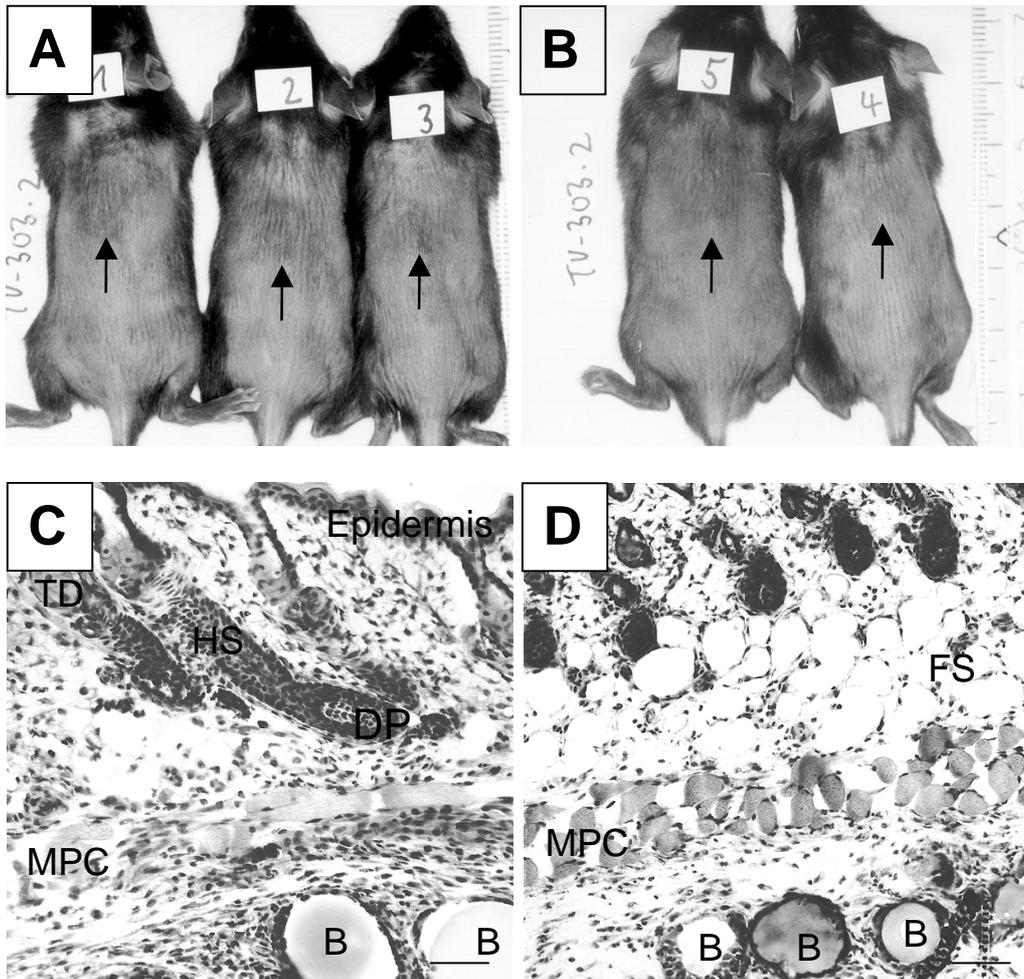


Abbildung 21
Anagenentwicklung nach der Implantation HGF/SF-abgebender Agarose-Kügelchen in die Rückenhaut *in vivo*

HGF/SF getränkte "slow release beads" induzieren ein beschleunigtes Haarfollikelwachstum nach subkutaner Implantation in die Rückenhaut von C57BL/6-Mäusen mit allen Follikeln in der Ruhephase des Haarzyklus.

Von der Injektionsstelle **A, B, Pfeile**) in der Rückenhaut breitet sich verstärkt das Wachstum von makroskopisch sichtbaren Haaren (bzw. verstärkter Pigmentierung) in Richtung des Nackens aus (**A**). In Vehikel-behandelten Mäusen (**B**) konnte ebenfalls eine Induktion des Follikelwachstums beobachtet werden. Nach histochemischer Evaluierung zeigten sich die Mehrzahl der Haarfollikel der Kontrolltiere (**D**) um 2 Stadien hinter der Entwicklung der HGF/SF-behandelten Tiere (**C**) zurück. Hoechst 33342-Kernfärbung 10µm dicker Kryostatschnitte von Mäusen von mit HGF/SF- (**C**) und Vehikel-getränkten (**D**) Agarosekügelchen (**Pfeile**) zeigen jeweils Anagen IV (**C**) und Anagen II Haarfollikel (**D**).

Maßstab: 100µm. Abkürzungen: B – Agarosekügelchen (getränkte „slow-release-beads“); DP – dermale Papille; FS – Fettschicht; HS – Haarschaft; MPC – Muskel panniculus carnosus.