

## 7. Diskussion

Der Auf- und Abbau eines Haarfollikels erfordert eine exakt aufeinander abgestimmte Interaktion zwischen proliferierenden, differenzierenden und apoptotischen Zellen neuroektodermaler Herkunft (Keratinocyten der Haarmatrix und der Haarwurzelscheiden, Follikelmelanozyten) und hochspezialisierten mesenchymalen Zellen mit induktiven Eigenschaften (Fibroblasten der dermalen Papille). Jeder einzelne Entwicklungsschritt der Haarfollikelmorphogenese und des Haarzyklus scheint maßgebend durch das lokale Gleichgewicht von Wachstumsfaktoren und deren korrespondierenden Rezeptoren bestimmt zu werden [3, 4, 8, 12, 95, 118, 119].

In dieser Arbeit werden verschiedene zueinander komplementäre phänomenologische und funktionelle Daten herausgearbeitet, die überzeugend nahelegen, daß das Wachstumsfaktor/Rezeptor-Paar HGF/SF und Met einen wichtigen Einfluß auf die Entwicklung und den zyklischen Umbau des murinen Haarfollikels einnimmt, wenn es auch nicht als haarbiologisch völlig unverzichtbar gelten kann.

Es wird erstmals ein zusammenfassender, schematischer Überblick über das Expressionsmuster von HGF/SF und des korrespondierenden Rezeptors Met während der einzelnen Phasen der murinen Haarfollikelmorphogenese und des Zyklus präsentiert (Abb 13). Diese "Expressionskarte" veranschaulicht, daß die Expression von HGF/SF und Met zeitlich und örtlich streng kontrolliert ist und einer straffen, entwicklungsbiologischen und haarzyklusabhängigen Regulation unterliegt. Diese Karte legt außerdem nahe, daß –unter physiologischen Bedingungen– HGF/SF ausschließlich im Mesenchym produziert wird, während Met im Haarfollikelepithel exprimiert wird. Damit erfüllt das HGF/SF/Met-Signalsystem im Haarfollikel geradezu die Idealbedingungen eines klassischen epithelial-mesenchymalen Interaktionssystems, was die Ausgangshypothese voll stützt, daß der Haarfollikel generell ein ideales Modellsystem für die

Erforschung der Rolle des Hepatozyten- Wachstumsfaktors bei mesenchymal-epithelialen Wechselwirkungen liefert.

Der epitheliale Haarbulbus, Bildungsstätte des Haarschaftes, wird regelmäßig während der gesamten Lebensdauer des Säugetierorganismus zyklisch auf- und abgebaut (Haarzyklus Abb 3) [3, 4, 12]. Diese rhythmischen, follikelintrinsisch kontrollierten Transformationsprozesse basieren auf noch weitgehend ungeklärten, epithelialen-mesenchymalen Interaktionen [12, 18]. Diese bewirken vermutlich systematische Veränderungen des peri- und intrafollikulären Wachstumsfaktor-, Hormon-, Rezeptorexpressions- und Adhäsionsmilieus, das die zyklische Aktivität des Haarfollikels zwischen Wachstum (Anagen), Regression (Katagen) und relativem Ruhezustand (Telogen) bestimmen dürfte. In jeder wiederkehrenden Anagenphase wird dabei ein Teil der Morphogenese des Haarfollikels rekapituliert, jede Katagenphase ist durch den massiven, aber streng kontrollierten Vorgang der Keratinozyten-Apoptose charakterisiert [3, 4, 6, 12, 15, 17, 120].

Die außergewöhnlich stringente, spatiotemporal limitierte Expression von HGF/SF in den mesenchymalen Fibroblasten der dermalen Papille (ab dem Stadium 4 der Morphogenese und innerhalb des Haarzyklus zwischen Anagen III und Katagen II) sowie von Met in Keratinozyten des benachbarten Follikel epithels liefert überzeugende, phänomenologische Hinweise für eine konstitutive Beteiligung des HGF/SF-Met-Signalsystems bei der Haarwachstumskontrolle der Maus, sowohl bei der Morphogenese als auch im periodischen Haarzyklus.

Die Induktion der Haarfollikelmorphogenese scheint indessen aber nicht unmittelbar von der Expression von HGF/SF und Met abhängig zu sein. Dies läßt sich von der Beobachtung ableiten, daß HGF/SF- bzw. Met-defiziente Mäuse zumindest rudimentäre Haarfollikelansätze ausbilden (Abb 15). Bei diesen Tieren scheint durch das Fehlen des jeweiligen anderen Signalpartners eine gestörte mesenchymal-epitheliale Kommunikation vorhanden zu sein, die

nicht völlig von anderen Signalsystemen kompensiert werden kann. Daher kommt es teilweise zu einer veränderten Haarfollikelmorphologie, bei der z.B. die dermale Papille kein exakt definiertes Kompartiment mehr zu sein scheint bzw. eine überproportionale Größe annimmt (Abb 15 C).

Um noch genauer studieren zu können, welche Rolle das HGF/SF/Met-Signalsystem für die Haarfollikelmorphogenese spielt, wäre es als nächstes wichtig, embryonale Haut von (nach E16.5 nicht mehr lebensfähigen) HGF/SF- bzw. Met „knockout“-Mäusen auf geeignete Empfängermäuse zu transplantieren. Dies würde die Beobachtung erlauben, bis zu maximal welchem Entwicklungsstadium die Haarfollikelmorphogenese in Abwesenheit dieses Signalsystems überhaupt gelangen kann (in Analogie zu vergleichbaren Studien bei Shh-defizienten Mäusen [19]).

Daß HGF/SF einen entscheidenden Einfluß auf die Kontrolle der besonders wichtigen Transitionsübergängen zwischen Telogen zu Anagen und von Anagen zu Katagen auszuüben vermag, wird schon durch die hier eruierten Gen- und Proteinexpressionsmuster suggeriert (Abb 10-13). Das starke morphogene Potential von HGF/SF wird aber erst durch die funktionellen Studien (Abb 19-21) sowie durch den außergewöhnlichen Phänotyp der HGF/SF-überexprimierenden Tiere deutlich. Diese Tiere zeigen im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen während der frühen Stadien der Morphogenese nahezu doppelt so viele Haarfollikel, die sich darüber hinaus sehr viel schneller entwickeln. Interessanterweise zeigen diese Follikel aber wieder eine deutliche Verzögerung bei der Apoptose-regulierten Haarfollikelretardierung. Diese Entwicklung wiederholt sich analog im darauffolgenden ersten Haarzyklus.

Solche Beobachtungen lassen sich im Haarzyklus möglicherweise mit der veränderten Expression von HGF/SF während zweier relevanter Stadien veranschaulichen: im sehr frühen Wachstumsstadium (Anagen I) ist bereits eine HGF/SF-IR in den induktiven Fibroblasten der dermalen Papille zu messen, während bei normalen Mäusen dies erst in späteren Phasen des

wachsenden Follikels (Anagen III) zu beobachten ist. Auf der anderen Seite zeigt sich partiell im späten Katagenstadium eine HGF/SF-IR der dermalen Papille, des epithelialen Stranges und der Germkapsel, die bei WT-Mäusen zu keiner Zeit zu beobachten war und unter Umständen für die Verzögerung der Haarfollikelregression verantwortlich ist so, als sei die normalerweise Anagen-assoziierte HGF/SF-Sekretion der dermalen Papille bis in die gefolgten Katagenphasen verschoben.

Gab-1-defiziente Mäuse, denen dieses intrazelluläre Met-Rezeptorbindungsprotein (s. Abb 7) fehlt, zeigen einen sehr ähnlichen Phänotyp wie HGF/SF- bzw. Met-„knockout“ Tiere [58]. Besonders spannend ist aber, daß Gab-1-„knockout“-Tiere genau gegensätzlich zu HGF-überexprimierenden Mäusen während der frühen Follikelmorphogenese (E17.5) eine Verzögerung der Haarfollikelentwicklung sowie eine reduzierte Anzahl von Haarfollikeln zeigen [58].

Daß bei HGF/SF-überexprimierenden Mäusen teilweise nach dem zweiten Haarzyklus eine stark veränderte, geschädigte Haut- und Haarstruktur beobachtet werden kann, ist möglicherweise zusätzlich auf systemische Effekte des gestörten Gesamtorganismus zurückzuführen. Direkte lokale Einflüsse scheinen jedoch –speziell bei den Phänomenen der doppelten dermalen Papille und dem stark verbreiterten epithelialen Strang– durch Veränderungen der peri- und intrafollikulären Kommunikation der Gewebekompartimente im Vordergrund zu stehen. Die Genese prämaligener Zellstrukturen ist vermutlich die Folge pathologischer Veränderungen der Signalübermittlung vom parakrinen zum autokrinen Weg [99, 121, 122]. Da neuere Untersuchungen zeigen konnten, daß HGF/SF mit Hilfe des Transkriptionsfaktors AP-1 (aktiviertes Protein-1) in der Lage ist, die Transkription seines eigenen Rezeptor-Gens (Met) direkt zu induzieren, könnte sich eine positive „feedback“-Schleife entwickeln, die mit einer Überstimulation von Met einhergeht [123].

Da die apoptotischen Zellen des epithelialen Stranges unbehandelter C57BL/6-Mäuse keine Met-IR zeigten und HGF/SF-transgene Tiere einen stark vergrößerten epithelialen Strang aufwiesen, liegt die Annahme nahe, daß das HGF/SF-Met-Signalpaar die Apoptose-vermittelte Haarfollikelregression (mit-)reguliert. Neben der Fähigkeit, Wachstum und Migration epithelialer Zellen zu stimulieren, scheint HGF/SF daher auch bei der Kontrolle der Keratinozyten-Apoptose *in vivo* (und damit indirekt der Haarfollikelregression) eine Rolle zu spielen. Dies deckt sich mit der Beobachtung, daß HGF/SF die experimentell induzierte Apoptose von humanen Keratinozyten *in vitro* hemmen kann [68].

Für die These der intrafollikulären Apoptosehemmung durch HGF/SF sprechen auch die Ergebnisse aus den HGF/SF-Stimulationsversuchen (Abb 12N, 19, 20): Sowohl nach Injektion *in vivo* als auch in Hautorgankulturen war rekombinantes HGF/SF in der Lage, signifikant die Haarfollikelregression zu verzögern. Daß diese Katagen-inhibierenden Eigenschaften sogar in Hautorgankulturen zu beobachten waren, spricht um so mehr für die Fähigkeiten von HGF/SF auf lokaler Ebene zu wirken, da in diesem Modellsystem systemische, d.h. über die Blut- und Nervenbahnen zugeführte Faktoren, ausgeschlossen werden können [100, 102, 124].

Bei der Chemotherapie-induzierten Follikelregression durch Cyclophosphamid (CYP), kommt es zu einer massiven Zunahme von apoptotischen Zellen im proximalen Haarbulbus Haarbulbus [15, 117]. Dies scheint eine programmierte Antwort des Haarfollikels auf schwere Schädigung zu sein, die vermutlich dann irreversibel wird, wenn auch Teile der Population epithelialer Stammzellen in der "Wulstregion" und/oder Fibroblasten der dermalen Papille geschädigt werden.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß bei Tieren, die mit i.p. Injektion von CYP in die vorzeitige Haarfollikelregression gebracht wurden, die Met-Expression im gesamten proximalen Haarbulbus stark hoch-reguliert wird (Abb 14). Ebenso bemerkenswert ist dabei die verstärkt auftretende Met-IR in der dermalen Papille, die unter normalen Bedingungen nie Met+ ist. Im

Zusammenhang mit der zurückgehenden HGF/SF-IR in der dermalen Papille scheint hier ein Mechanismus aktiviert worden zu sein, bei dem die dermale Papille vor der Zerstörung bewahrt und im Zytostatika-geschädigten Haarfollikel eine geregelte Regression durch gezielte Keratinozyten-Apoptose eingeleitet wird. Die dermale Papille ist nach der vollzogenen Katagenphase –bei einmaliger CYP-Gabe– wieder in der Lage, die Bildung eines neuen Anagenfollikel zu induzieren [82], was dafür spricht, daß potente Schutzmechanismen aktiviert werden, die den Haarfollikel vor irreversiblen Schäden schützen. Die vorgelegten Daten suggerieren, daß das HGF/SF/Met-Signalsystem zu den „rescue- and protect“-Systemen des Haarfollikels gehört.

Zudem wirft dies die Frage auf, ob nicht die Stimulation der Met-Rezeptor-Expression als allgemeiner Mechanismus der gezielten Suppression in der Keratinozyten-Apoptose rekrutiert wird. Dieses gilt sowohl im frühen und mittleren Anagen (z.B. für die formgebende Gestaltung des wachsenden Haarfollikels), als auch im späten Anagen zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase im Anagen VI-Haarbulbus. Eine gezielte Hoch- bzw. Herunterregulation der Met-Expression könnte außerdem dazu beitragen, die geregelte Involution des Follikels im Katagen zu organisieren, bei der definierte Zellen während der Regression unbedingt intakt bleiben müssen, um die Regenerationsfähigkeit des Haarfollikels für den nachfolgenden Haarzyklus nicht zu gefährden.

Die Beendigung der Sekretion von Apoptose-supprimierenden Faktoren könnte die Anagenphase beenden [3]. Gestützt wird diese These durch die Tatsache, daß mit beginnender Katagenphase die Expression von HGF/SF in der dermalen Papille stark zurückgeht (Abb 12 und 13), sich aber durch die Substitution von exogenem HGF/SF die Katagenentwicklung verzögern läßt (Abb 12N, 19, 20).

Umgekehrt könnte die Anageninduktion in Telogenfollikeln ein Vorgang der Desinhibition darstellen, d.h. die Hemmung der Sekretion eines

Proliferationsinhibitors [12]. Die theoretischen Konzepte zur Regulation des Haarzyklus, denen zufolge entweder Proteine mit induktiven/morphogenen Eigenschaften, oder aber Inhibitoren von Wachstums-hemmenden Faktoren Schlüsselemente der Anageninduktion darstellen [3, 12], scheinen sich in dem einen Morphogen HGF/SF ideal zu vereinen –es ist sowohl in der Lage, die Proliferation von epithelialen Zellen zu stimulieren, als auch die durch TGF $\beta$ -1-induzierte Arretierung des Wachstums epithelialer Zellen aufzuheben [125].

Das Anagen-induzierende Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA) [88, 91] ist möglicherweise ein solcher (künstlicher) „Desinhibitor“ (der z.B. endogene Haarwuchsinhibitoren wie TGF- $\beta$ 1 oder Interferon-  $\gamma$  supprimiert [126]), denn Patienten unter CsA-Therapie zeigen sehr oft eine Hypertrichose [91]. Die vorzeitige Expression von HGF/SF in den Fibroblasten der dermalen Papille bereits im frühen Anagen I nach CsA-Applikation (Abb 14 I) liefert dabei einen neuen Erklärungsansatz zum molekularbiologischen Wirkmechanismus der Anageninduktion durch CsA. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, daß CsA-responsible Genabschnitte in Keratinozyten beschrieben wurden [127] und daß CsA in der Lage, ist die Expression von HGF/SF mRNA in Lungenzellen von Mäusen *in vivo* zu induzieren [128].

Die proteolytische Spaltung der unreifen Vorläuferform von HGF/SF (prä-HGF/SF) zum aktiven Signalprotein ist, neben der Beeinflussung auf der Transkriptionsebene, einer der entscheidenden und limitierenden Regulationsmechanismen bei der Kontrolle der Expression dieses Wachstumsfaktors. Die extrazelluläre Aktivierung von HGF/SF kann z. B. durch die Protease Urokinase vollzogen werden. Es ist daher besonders interessant, daß der potente Urokinase-Inhibitor Nexin-1 [130] in Ratten ausschließlich in der dermalen Papille von Anagen-Follikeln detektiert wird und im Katagen nicht mehr gefunden wird [131]. Diese Expressionsverteilung korrespondiert sehr gut

mit der IR von HGF/SF in der dermalen Papille im Anagen und dem Verschwinden der HGF/SF -IR im Verlauf des Katagen.

Damit ist ein hochwirksames, anti-proteolytisches Kontrollsystem der Aktivierung von HGF/SF im Haarfollikel theoretisch vorstellbar, bei dem die regulierte Abwesenheit von Nexin-1 der Entstehung einer u.U. zu maligner Entartung führenden positiven HGF/SF/Met-Signalschleife vorbeugt und damit eine große Bedeutung in der Kontrolle des murinen Haarzyklus durch HGF/SF einnimmt.

An der Produktion des pigmentierten Haarschaftes sind die aus der Neuralleiste entstammenden Melanozyten des Haarfollikels wesentlich beteiligt. Ihre Melaninproduktion ist streng an die Anagenphase des Haarzyklus gekoppelt [81, 86]. Bereits zwei Tage nach der Anageninduktion lassen sich Transkripte des Tyrosinasegens nachweisen und die Aktivität des Schlüsselenzyms für die Melanogenese steigert sich bis zu einem Maximum im Anagen [86]. Die Retraktion der dendritischen Fortsätze der Bulbusmelanozyten und der Abfall der Tyrosinaseaktivität gehören wiederum zu den frühesten Anzeichen der bevorstehenden Katagenentwicklung [86]. Eine Einflußnahme auf den Haarzyklus wird somit auch Veränderungen der Pigmentierung zur Folge haben. Eine stark veränderte interfollikuläre Pigmentierung ist in HGF/SF-überexprimierenden Mäusen zu sehen, bei denen sich die Melanozyten im subepidermalen Bereich positionieren und verstärkt ektopisches Melanin produzieren (Abb 18D-F).

Auch der Vorgang der Angiogenese, der Bildung verstärkter Verzweigungen bereits bestehender Blutgefäße, ist ein präzise definierter Prozeß, in dem ein stetiges örtliches und zeitliches Gleichgewicht von inhibierenden und stimulierenden Faktoren eingehalten werden muß [69-71, 132]. Auch die Anagenphase des Haarzyklus ist physiologischerweise mit Angiogenese assoziiert, und eine Anagenentwicklung kann mit der i.p. Applikation des Angiogenese-Hemmers Fumagillin verzögert werden [132].

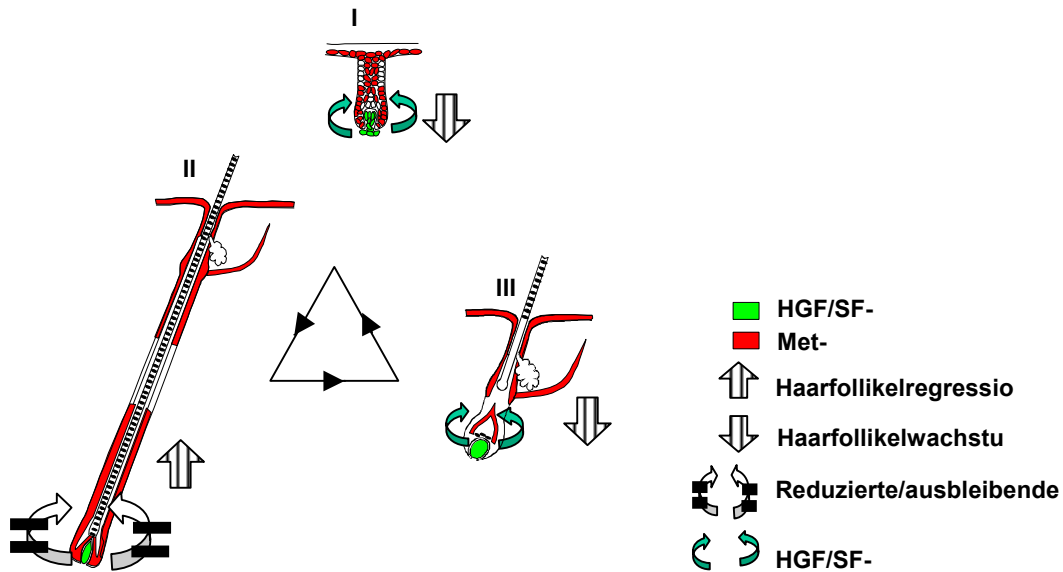


Angesichts der beschriebenen Angiogenese-Stimulation durch HGF/SF [36, 69-71], ist es vorstellbar, daß auch HGF/SF zu den Faktoren gehört, die während der Wachstumsphase des Haarzyklus die Anagen-assoziierte Angiogenese fördern.

HGF/SF ist in der Lage die Expression von TGF- $\beta$ 2 *in vitro* zu stimulieren. In einer negativen Signalschleife schränkt dies wiederum die Aktivität von HGF/SF ein, da TGF- $\beta$ 2 intrazellulär die MAPK-Aktivierung inhibiert und die Phosphorylierung der SRC-Domäne blockiert (vergl. Abb 7) [133]. Somit dient TGF $\beta$ 2 als endogener, physiologischer Inhibitor von HGF/SF. Es ist daher interessant, daß TGF $\beta$ 2 kürzlich als Schlüsselfaktor bei der Induktion der Haarfollikelmorphogenese identifiziert wurde [20]. TGF $\beta$ 2-defiziente Mäuse zeigen eine stark verzögerte Haarfollikelinduktion und -morphogenese, und haben eine verminderte Anzahl an Follikeln, deren Entwicklung stark verzögert wird. Die Expression des korrespondierenden TGF $\beta$ -II-Rezeptors kann schon in den Keratinozyten der Epidermis beobachtet werden, bevor morphologische Veränderungen zur Bildung eines neuen Haarfollikels sichtbar sind [85]. Während des Haarzyklus fungiert TGF $\beta$ -2 hingegen als potenter Katageninduktor (Foitzik und Paus, persönliche Mitteilung).

Eine Änderung des lokalen TGF $\beta$ -2-HGF/SF-Gleichgewichts könnte daher möglicherweise ein wichtiges Signal zur Induktion einer neuen Haarzyklustransition (z.B. Katageninduktion) liefern.

Zusammenfassend lässt sich aus den oben skizzierten Überlegungen das folgende hypothetische Szenario für die Rolle von HGF/SF/Met während der Haarfollikelmorphogenese und des Haarzyklus (Abb 22) postulieren:



**Abbildung 22:**

I. Nach erfolgter Festlegung der Bildung einer Plakode (s. Abb 4A und B) beginnt ab dem Stadium 4 der Haarfollikelmorphogenese die Expression von HGF/SF in den Fibroblasten der dermalen Papille (Mesenchym). Diese geben den Wachstumsfaktor an das benachbarte Follikel­epithel ab und definieren in Form koordinierter mesenchymal-epithelialer Wechselwirkungen die Morphologie des wachsenden Haarfollikels.

II. Infolge reduzierter bzw. ausbleibender HGF/SF-Sekretion der dermalen Papille beginnt der Haarfollikel zu regredieren und vollendet damit die Haarfollikelmorphogenese (Beginn des ersten Haarzyklus). Der Follikel durchläuft dabei eine rapide Involution, bei der aber ausgewählte Keratinozyten des epithelialen Stranges und der Germkapsel durch Met-Expression vor dem programmierten Zelltod bewahrt werden. Nach vollendeter Regression folgt die Ruhephase.

III. Während der Initiierung einer neuen Wachstumsphase exprimieren stark proliferierende Keratinozyten oberhalb der dermalen Papille Met und nehmen während des frühen Anagen (III) das von den Fibroblasten der dermalen Papille erneut sekretierte HGF/SF auf. Das HGF/SF-Met-Signalsystem ist während der Wachstumsphase wieder am Aufbau des Haarfollikel beteiligt. Der wiederholte Eintritt in das Katagen des Haarzyklus erfolgt analog zu II.

Die meisten Haarwachstumsstörungen resultieren aus der Verschiebung des Zeitpunktes der Katageninduktion (bzw. der Anagenterminierung). Daher ist die Regulierung der Katagen- bestimmenden Apoptose von Keratinozyten ein entscheidender Ansatzpunkt für eine effektive Therapie von Haarwachstumsstörungen.

Ein besseres Verständnis der Signalübermittlung zwischen Mesenchym und Epithel ist ein elementarer Baustein für die Entwicklung neuer Möglichkeiten der pharmakologischen Haarwuchsmanipulation zu therapeutischen Zwecken, z.B. um ruhende Haarfollikel in die Haarschaft-produzierende Anagenphase zu zwingen (bei Haarausfall) oder ungewollte Anagenfollikel zur kontrollierten Regression anzuregen (bei übermäßigem, ungewollten Haarwuchs). Mit vor kurzem entwickelten Liposomenpräparationen <sup>[78]</sup>, die zielgerichtet die Matrix des Haarfollikels erreichen können, besteht sogar die Möglichkeit einer wirksamen topischen Applikation solcher Moleküle unter Umgehung möglicher systemischer Nebenwirkungen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ermutigen also zur Entwicklung von Met-Agonisten und Antagonisten als aussichtsreiche, innovative Strategie zur Behandlung von Haarwachstumsstörungen. Ob etwa Met-Agonisten tatsächlich auch im menschlichen Anagenfollikel die Katagenentwicklung supprimieren bzw. Anagen in Telogenfollikeln induzieren können, ist jetzt anhand geeigneter Organkultursystemen (z.B. <sup>[79]</sup>) kritisch zu prüfen. Falls sich dies bestätigen läßt, hätte die vorliegende Arbeit nicht nur weitere Bausteine zum besseren Verständnis der Rolle von HGF/SF und Met in der Biologie des Haarfollikels –eines exemplarischen Modellsystems für epithelial-mesenchymale Interaktionen–, sondern auch wichtige neue Anregungen für die klinische Trichologie geliefert.