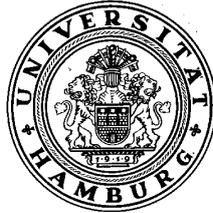


Aus dem Kopf- und Hautzentrum des Universitätsklinikums Eppendorf
Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
Medizinische Fakultät der Universität Hamburg
Direktorin: Prof. Dr. Ingrid Moll



**Tretinoin (all-trans Retinoic Acid) induziert eine vorzeitige Regression (Katagen)
von humanen Skalp-Haarfollikeln durch Hochregulation von TGF- β 2 in
Fibroblasten der dermalen Papille**

D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
im Fachbereich der Humanmedizin
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Tanja Spexard
aus Reinbek

Hamburg 2003

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 7. 6. 2004

Veröffentlicht mit der Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r: Prof. Dr. R. Paus

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. P. Höger

gewidmet meinen Eltern

Inhaltsübersicht

ABKÜRZUNGEN	4
ABBILDUNGEN	5
TABELLEN	6
1 ZIELSETZUNG	7
2 EINLEITUNG	8
2.1 Retinoide und Tretinoin	8
<i>2.1.1 Entdeckung und Definition von Retinoiden</i>	<i>8</i>
2.2 Allgemeine biologische Effekte von Retinoiden	9
<i>2.2.1 Therapie und Nebenwirkungen von Retinoiden</i>	<i>10</i>
<i>2.2.2 Retinoid bindene Proteine und Retinoid Rezeptoren</i>	<i>14</i>
<i>2.2.3 Einfluss von Retinoiden auf Aktivität und Synthese von Wachstumsfaktoren</i>	<i>16</i>
2.3 Transforming Growth Factor-β 2	18
<i>2.3.1 Die TGF-β Familie</i>	<i>18</i>
<i>2.3.2 Signaltransduktion durch TGF-β Rezeptoren</i>	<i>20</i>
<i>2.3.3 Allgemeine biologische Effekte von TGF-β</i>	<i>22</i>
2.4 Physiologische und pathologische Funktionen von Retinoiden und TGF-β2 in der Haut	25
2.5 Retinoide und TGF-β2: Stand der Haarforschung	28
2.6 Der Haarfollikel und der Haarzyklus	30
2.7 Die humane Haarfollikelorgankultur	36
2.8 Das C57BL/6 Mausmodell in der Haarforschung	36
3 MATERIAL UND METHODEN	38
3.1 Materialien, Reagenzien und Geräte	38
3.2 Tiere	41
<i>3.2.1 Mechanische Anageninduktion durch Depilation</i>	<i>41</i>

3.2.2	<i>Hautentnahmetechnik und Fixation</i>	42
3.3	Die humane Haarfollikel Organkultur	43
3.3.1	<i>Isolation humaner Kopfhauthaarfollikel</i>	43
3.3.2	<i>Kultivierung humaner Haarfollikel</i>	45
3.3.3	<i>Fotodokumentation und Statistische Auswertung</i>	45
3.3.4	<i>Die Haarzyklusberechnung</i>	46
3.4	Färbungen	46
3.4.1	<i>Herstellung der Kryostatschnitte</i>	46
3.4.2	<i>TGF-β1, TGF-β2 und TGF-RII Immunfluoreszenz- Färbung</i>	47
3.4.3	<i>Ki 67/-TUNEL Immunfluoreszenz-Doppelfärbung</i>	49
3.4.4	<i>Hämalaun- Eosin Färbung</i>	50
3.4.5	<i>Histologische Auswertungstechnik</i>	50
3.5	Polymerasekettenreaktion	51
3.5.1	<i>RNA Extraktion</i>	51
3.5.2	<i>Reverse Transkription</i>	52
3.5.3	<i>Real Time (TaqMan) Polymerase Kettenreaktion</i>	53
3.5.4	<i>Herstellung der Positivkontrolle</i>	55
4	ERGEBNISSE	57
4.1	Haarzyklusabhängige Verteilung von TGF-β2 während des adoleszenten murinen Haarzyklus	57
4.2	Effekte von TGF-β2 und Tretinoin auf humane Haarfollikel <i>in vitro</i>	59
4.2.1	<i>TGF-β2 induziert Katagen und vermindert das Haarfollikellängenwachstum <i>in vitro</i></i>	59
4.2.2	<i>Tretinoin induziert Katagen und reduziert das Haarfollikellängenwachstum <i>in vitro</i></i>	61
4.2.2	<i>Tretinoin Effekte werden in Kultur durch einen neutralisierenden TGF-β_{1,2,3} – Antikörper signifikant reduziert</i>	64
4.3	Tretinoin Behandlung steigert die Apoptoserate und vermindert die Proliferation	69
4.4	Einfluss von Tretinoin auf die Expression von TGF-β	72
4.4.1	<i>Hochregulation von TGF-β2 Immunreaktivität bei Tretinoin behandelten Haarfollikeln</i>	72

4.4.2	<i>Real Time (TaqMan) PCR: bei den Tretinoin behandelten Haarbulbi wird das TGF-β2 Transkript hochreguliert</i>	74
4.4.3	<i>Keine qualitativen Veränderungen der TGF-β1, TGF-β3 und TGF-β R II Immunreaktivität bei Tretinoin behandelten Haarfollikeln</i>	76
5	DISKUSSION	78
6	ZUSAMMENFASSUNG	87
7	LITERATURVERZEICHNIS	88
8	DANKSAGUNG	105
9	LEBENS LAUF	106
10	ERKLÄRUNG	108

Abkürzungen

ADH	Alkoholdehydrogenase
ALDH	Aldehyddehydrogenase
Anti-TGF- β	TGF- β _{1,2,3} neutralisierender Antikörper
ÄWS	Äußere Wurzelscheide
BMP	Bone morphogenic protein
CRABP	Cellular Retinoic Acid Binding Protein
CRBP	Cellular Retinol Binding Protein
DP	Dermale Papille des Haarfollikels
EGF	Epidermal Growth Factor
FGF	Follikular Growth Factor
IGF	Insulin Growth Factor
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IR	Immunreaktivität
IWS	Innere Wurzelscheide
LAP	Latent Associated Peptide
LTBP	Latent TGF- β Binding Protein
RA	Retinoic Acid
at-RA	all-trans Retinoic Acid (Tretinoin)
RAR	Retinoic Acid Receptor
RARE	Retinoic Acid Hormone Response Element
RBP	Retinol Binding Protein
RXR	Retinoic X Receptor
RAL	Retinal
ROH	Retinol
TGF- β	Transforming growth factor-beta
TGF- β RI	TGF- β Rezeptor Typ I
TGF- β RII	TGF- β Rezeptor Typ II
TR	Tretinoin

Abbildungen

Abb. 1:a. all-trans Retinol (Vitamin A) b. Tretinoin (all-trans Retinoic Acid).....	8
Abb. 2: Biologische Vielfalt der Retinoide (modifiziert nach Kligmann 1998).....	10
Abb. 3: Therapeutische Vielfalt der Retinoide (modifiziert nach Kligmann 1998).....	11
Abb. 4: Die Retinoid- Signaltransduktion (nach Roberts, Sporn und Goodman 1994)	15
Abb. 5: Struktur und Aktivierung von latentem TGF- β (nach Böttinger 1997)	20
Abb. 6: TGF- β Rezeptor Aktivierung und Signaltransduktion (nach Massague et al. 1997, Govinden und Bhoola, 2003)	21
Abb. 7: Allgemeine biologische Effekte von TGF- β	24
Abb. 8: Aufbau eines Anagenhaarfollikels (modifiziert nach Klein 1993).....	30
Abb. 9: Schematische Darstellung des Haarzyklus am Beispiel der C57BL/6 Maus (nach Paus 1996).....	33
Abb. 10: Haut- und Haarparameterveränderungen während der depilations - induzierten Anagenentwicklung (nach Paus 1996)	37
Abb. 11: Vollhautbiopsie aus der humanen Kopfschwarte unter dem Dissektionsmikroskop (modifiziert nach Weitz 1998).....	43
Abb. 12: Haarfollikelisolation modifiziert nach Philpott (1994).....	44
Abb. 13: Methode der Immunfluoreszenz-Markierung (modifiziert nach Santa Cruz Biotechnology).....	47
Abb. 14: Humanes TGF- β 2.....	54
Abb. 15: TGF- β 2 Immunfluoreszenzfärbung während verschiedener Stadien des murinen Haarzyklus	58
Abb. 16: Anagen - / Katagenverteilung von TGF- β 2-Haarfollikeln.....	60
Abb.17: Vermindertes Haarschaftlängenwachstum in TGF- β 2 Kultur.....	60
Abb. 18: Verminderte Haarschaftverlängerung der Tretinoin kultivierten Follikel....	62
Abb. 19: Katageninduktion durch Tretinoin.....	63
Abb. 20: Haarschaftwachstum in Tretinoin (TR) und Anti-TGF- β Antikörper- Kultivierung	65
Abb. 21: Hair Cycle Score	66

Abb. 22: Mikroskopisches (A-C) und histologisches (a-c) Aussehen humaner Haarfollikel nach 6 Tagen in Tretinoin Organkultur	67
Abb. 22: Mikroskopisches (D-F) und histologisches (d-f) Aussehen humaner Haarfollikel nach 6 Tagen in Tretinoin und TGF-β2 Organkultur	68
Abb. 23: Verminderung der Proliferation und Steigerung der Apoptose in Tretinoin Kultur	70
Abb. 24 : Reduktion der proliferierenden Zellen und Steigerung der Apoptose bei Tretinoin behandelten Haarfollikeln.....	71
Abb. 25 : TGF-β2 Immunfluoreszenzfärbung nach 4 Tagen in Tretinoin- Kultur.....	73
Abb. 26: TGF-β2 Real Time (TaqMan) PCR nach 4 Kulturtagen in Tretinoin.....	75
Abb. 27: TGF-β1 Immunfluoreszenzfärbung nach 4 Tagen in Tretinoin- Kultur.....	76
Abb. 28: TGF-β R II Immunfluoreszenzfärbung nach 4 Tagen in Tretinoin- Kultur..	77

Tabellen

Tabelle 1: Die Nebenwirkungen der Retinoide im Tierexperiment (modifiziert nach Bauer und Gollnick)	13
Tabelle 2. Effekte von Retinoiden auf Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren (nach Roberts, Sporn und Goodman 1994)	17
Tabelle 3. Mitglieder der TGF-β Genfamilie (nach Moses und Serra 1996).....	19
Tabelle 4: Spezielle Funktionen von TGFβ - 1, 2 und 3.....	24
Tabelle 5. Molekulare Mediatoren des Haarfollikelwachstums (nach Stenn und Paus, 2001).....	34

1 Zielsetzung

Zielsetzung dieser Arbeit ist es

- a.) an einem definierten, geeigneten Mausmodell die exakte Lokalisation und Verteilung des Proteines Transforming Growth Factor- β 2 (TGF- β 2) während der einzelnen Stadien des Haarzyklus zu charakterisieren,
- b.) an einem geeigneten humanen *in vitro* Modell die Potenz von TGF- β 2 zur Katageninduktion und seine Folgen für das Haarfollikellängenwachstum zu überprüfen,
- c.) an diesem gut definierten Modell die Auswirkungen von Tretinoin auf humane Haarfollikel hinsichtlich des Haarzyklus und des Haarfollikellängenwachstums zu untersuchen,
- d.) die Expression der TGF- β Isoformen in den Tretinoin kultivierten humanen Haarfollikeln mit unbehandelten Kontrollfollikeln mittels Immunfluoreszenz qualitativ und auf RNA Ebene durch eine TaqMan PCR quantitativ zu vergleichen
- e.) sowie eine mögliche Neutralisation dieser Tretinoin - Effekte auf humane Haarfollikel *in vitro* durch einen Anti-TGF- β -Antikörper zu testen.
- f.) Auf Grundlage der erhobenen Daten zur Expression von TGF- β 2 im Mauszyklus und der mit Tretinoin und TGF- β 2 kultivierten humanen Haarfollikel sollen Erkenntnisse bezüglich der möglichen Hochregulation von TGF- β 2 durch Tretinoin gewonnen werden. Vor dem Hintergrund der Literatur soll die Rolle von TGF- β 2 als möglicher Mediator der Retinoide und dessen Bedeutung für die Haarforschung diskutiert werden.

2 Einleitung

2.1 Retinoide und Tretinoin

2.1.1 Entdeckung und Definition von Retinoiden

Retinoide sind synthetische Derivate des Vitamin A (Retinol). In ihrer Struktur und biologischen Wirkungen ähneln sie sehr dem natürlichen Vitamin A, für dessen Strukturermittlung Karrer et al. 1931 den Nobelpreis erhielt (**Abb. 1a**). Bei dem Molekül Vitamin A kann leicht die carboxische Endgruppe, die polypene Kette oder der aromatische Ring substituiert werden, so dass es aufgrund dieser Eigenschaften für Modifikationen ideal geeignet ist. Es wurden 3 Generationen von synthetischen Retinoiden entwickelt:

- nichtaromatische Retinoide,
- monoaromatische Retinoide,
- polyaromatische Arotinoide.

Durch Oxidation von Retinol zu Retinal entstand vor 30 Jahren all-trans Retinoic Acid (Tretinoin), das erste kommerziell hergestellte Retinoid (**Abb. 1b**). Es findet seitdem hauptsächlich im Rahmen Akne Therapie Verwendung (Klingman 1998, Gollnick und Krautmann 2003).

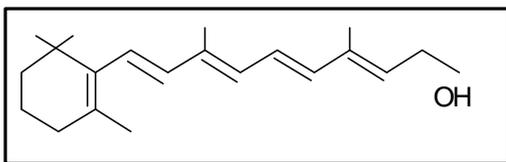
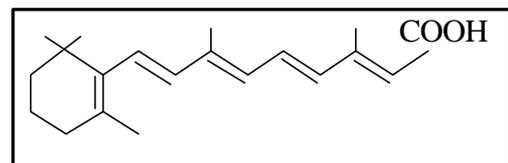


Abb. 1a. all-trans Retinol (Vitamin A)



b. Tretinoin (all-trans Retinoic Acid)

2.2 Allgemeine biologische Effekte von Retinoiden

Das Spektrum der biologischen Effekte von Retinoiden ist sehr mannigfaltig (**Abb. 2**). Sie sind existenziell für die zelluläre Differenzierung (reviewed in Love and Gudas 1994, Maden and Hind 2003) und Morphogenese (reviewed in Hoffmann and Eichele 1994, Maden 2000).

1925 untersuchten Wolbach und Howe die Gewebeveränderungen von Ratten unter Vitamin A Mangel. Bei diesen Ratten waren vor allem die epithelialen Gewebe Veränderungen durch Differenzierungs- und Proliferationsstörungen unterworfen. Betroffen waren insbesondere die Haut, Trachea, Schweißdrüsen, Kornea und Geschlechtsorgane. Diese Relevanz der Retinoide für Wachstum, Differenzierung und Erhaltung von Epithelien resultiert aus ihrem Einfluss auf die Zellproliferation.

Fell und Mellanby haben 1953 an Hühnerembryonen eine Inhibition der Keratinisation durch Retinoide festgestellt. Die gleichen morphologischen Veränderungen beobachtete auch Peck et al. 1977 bei Behandlung mit all-trans Retinoic Acid und entdeckte Reversibilität sowie Dosis- und Zeitabhängigkeit dieser Keratinisationsinhibition.

Die frühen Studien von Wollbach und Howe (1925) ließen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Vitamin A Mangel und Immundefunktionsstörungen vermuten, da die Versuchstiere unter Vitamin A Mangel eine Unterentwicklung der lymphatischen Organe aufzeigten. Weitere Versuche deckten die Fähigkeit von Retinoiden zur Immunmodulation auf, und zwar durch Stimulation von humoraler und zellvermittelter Immunität. Außerdem besitzen Retinoide antiinflammatorische Aktivität, indem sie Immunfaktoren wie Leukozyten oder proinflammatorische Zytokine herunterregulieren (Wolf 2002). Dubertret et al. (1982) beobachtete eine verminderte Neutrophilen Migration nach oraler Gabe von dem Retinoid Etreinate.

Des Weiteren sind Retinoide an der Synthese von dermalen Matrix in der Haut und an der Angiogenese beteiligt (Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS 1994, Axel et al., 2001).

Retinoide sind außerdem in die Karzinogenese involviert (Sun and Lotan, 2002). Experimentelle Karzinogenesemodelle haben eine Behinderung der Tumorentwicklung durch Retinoide in verschiedenen Geweben gezeigt (Kraemer et al., 1988, Ralhan and Knauer 2003).

Neuere Untersuchungen zeigten, dass Retinoide die Expression einiger kritischer Zell-Zyklus Gene steuern und damit auf den programmierten Zelltod (Apoptose) Einfluss nehmen (Sanders und Wride, 1995; Bosman et al., 1996; Cole und Prasad, 1997, Soma et al., 2001, 2002).

Eine weitere wichtige Funktion haben Retinol und seine Derivate bei der Photopigmentbildung in der Retina des Auges (John C Saari, 1994).

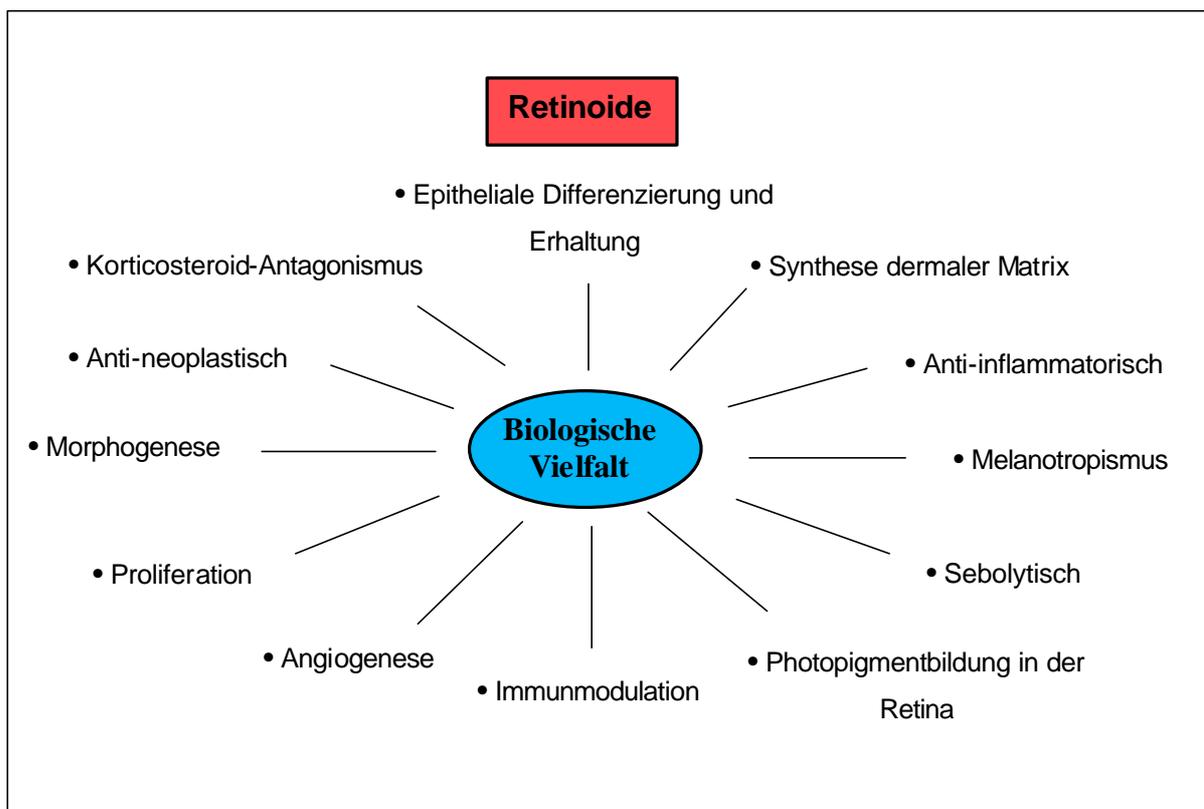


Abb. 2: Biologische Vielfalt der Retinoide (modifiziert nach Kligmann 1998)

2.2.1 Therapie und Nebenwirkungen von Retinoiden

Aufgrund der Vielzahl von biologischen Funktionen der Retinoide ergibt sich eine noch größere Anzahl von klinischen Applikationen (Brtko and Thalhamer 2003). Abbildung 3 zeigt einige der Hautkrankheiten auf, die mit Retinoiden therapierbar sind. Retinoic Acid hat sich dank seiner inhibierenden Wirkung auf Proliferation und Differenzierung in ver-

hornenden Epithelien zur Behandlung einiger Dermatosen durchgesetzt. Besonders bei der Akne Therapie wirkt Tretinoin (all-trans Retinoic Acid) und Isotretinoin (13-cis Retinoic Acid) bei 80-90% der Patienten gut bis sehr gut aufgrund seiner komedolytischen, sebolytischen und anti-inflammatorischen Eigenschaften (Gollnick 2003).

Der „Antikeratineffekt“ der Retinoide ist der Angriffspunkt der Medikamente bei Krankheiten mit pathologisch verhornender Epidermis wie z.B. Psoriasis, Ichthyosis oder Keratosis (Kligmann, 1998).

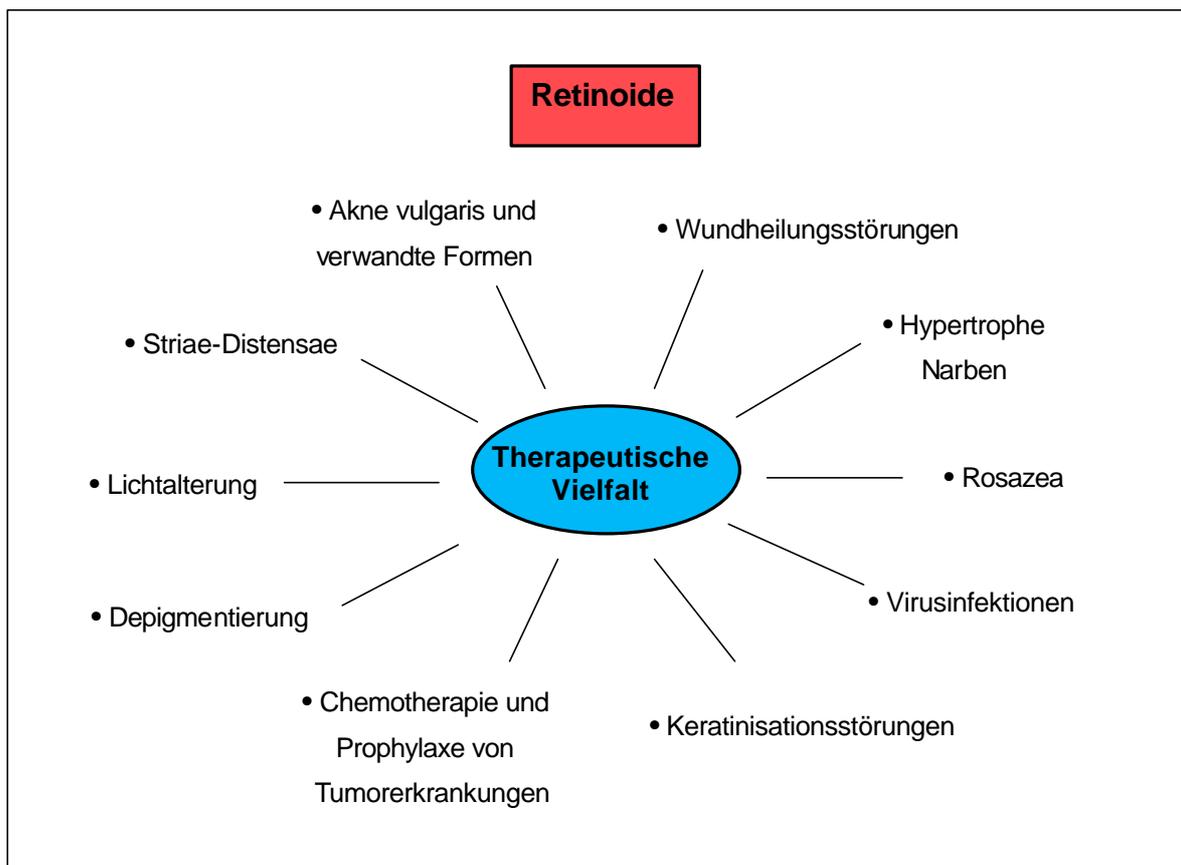


Abb.: 3 Therapeutische Vielfalt der Retinoide (modifiziert nach Kligmann 1998)

Das vielseitige therapeutische Potential der Retinoide wird durch ihre Nebenwirkungen, die teilweise schon in pharmakologischen Dosen auftreten, begrenzt (**Tabelle 1**). Nach nur einmaliger sehr hoher Verabreichung weisen Retinoide noch relativ geringe Toxizität auf. Im Tierversuch wurden orale bzw. parenterale Dosen bis zu 1000 mg/kg ohne größere Nebenwirkungen beobachtet. Erst nach wiederholten Gaben reduzierten sich die gut ver-

tragenen Dosen. Dies deutet darauf hin, dass die Bindungskapazitäten der Transport- bzw. Bindungsproteine der Retinoide überschritten wurden und erst ungebundene Retinoide für den Körper toxisch sind (Goodman 1974, 1984). Bei akuter Überdosierung von Vitamin A oder Retinoiden sind vor allem neurologische Nebenwirkungen wie Reflexverlust, Kopfschmerzen, Muskelschwäche, erhöhter Liquordruck und sogar Koma zu beobachten (The Retinoids, MB Sporn, AB Roberts, DS Goodman, 1994).

Die Kennzeichen chronischer Retinoid Überdosierung, der „Hypervitaminose A“, sind reduzierte Nahrungsaufnahme, Gewichtsverlust, Schwäche, reduzierte Bewegungsaktivität, Knochen- und Hautläsionen bis hin zum Tod.

An der Haut zeigen sich vor allem Erytheme, Haarausfall, epitheliale Hyperplasie, Schuppung und Brüchigwerden der oberen Hornschichten, teilweise seröse Dermatitis, Pigmentverlust und Verminderung der Talgdrüsenproduktion (Studor, 1950; Kamm, 1982; Teelmann, 1981). Die Auswirkungen der Retinoide auf die Haut sind dosisabhängig und reversibel.

Eine sehr wichtige Nebenwirkung aller bisher bekannten Vitamin A Abkömmlinge sowie des Vitamin A selbst ist der Einfluss auf die embryonale bzw. fötale Genese. Abhängig vom Zeitpunkt der Embryogenese führte Tretinoin im Tierversuch zu Morphogenese- und Differenzierungsstörungen (Geelen 1979). Die beobachteten Mißbildungen betrafen vorwiegend das Skelettsystem (Gaumenspalten, Gliedmaßendeformationen), das Nervensystem (Enzephalus, Anophthalmie) und in seltenen Fällen die parenchymatösen Organe (Sporn et al., The Retinoids, 1994).

Tabelle 1: Die Nebenwirkungen der Retinoide im Tierexperiment

Wirkung	Vitamin A	Tretinoin
<i>Körpergewicht:</i> verminderte Zu- bzw. Abnahme	++	++
<i>Haut:</i>		
Erythem	+	++
Proliferation (Akanthose)	+	++
Hyperkeratose	+	++
Haarausfall	+	++
s.c. Blutungen	+	+
<i>Blut:</i>		
hypochrome Anämien	+	++
GOT, GPT - Anstieg	++	++
Alkalische Phosphatase - Anstieg	+++	+++
Triglycerid - Anstieg	+	+
<i>Organe:</i>		
Lebervergrößerung	+++	++
Leberverfettung	++	++
Herzverfettung	+	-
Organverkalkungen	++	+
Nephrosen	+	-
vermind. Spermiogenese	+	+
<i>Skelett (prim. Nager):</i>		
vermind. Knochenwachstum	++	++
vorzeit. Verschluss der Epiphysenfuge	+	+
Aktivierung der Osteoklasten	++	++
Knochenfrakturen	++	++
<i>Nervensystem:</i>		
erhöhter Liquordruck	++	+
Hydrozephalus	+	?
<i>Fortpflanzung:</i>		
Teratogenität	++	++

(modifiziert nach Bauer Gollnick, Retinoide in der Praxis, 1984)

+ bis +++ => leichter bis starker Einfluss, - => kein Einfluss

2.2.2 *Retinoid bindene Proteine und Retinoid Rezeptoren*

Aufgrund der hydrophobischen Natur und Labilität der Retinoide benötigt der Körper für den Transport dieser Moleküle spezielle Carrier Proteine. Retinol (Vitamin A) wird zur Beförderung im Blutserum von der Leber, dem Speicherort der Retinoide, zu seinen Zielzellen an ein spezifisches retinol-binding protein (RBP) gebunden, welches zusätzlich einen Komplex mit Präalbumin bildet (Goodman; 1984). Im Gegensatz zum Retinol benötigt Retinoic Acid kein spezifisches Transport-Eiweiß im Blut, sondern wird durch Komplexbildung an Serumalbumin gebunden und seinem Wirkort zugeführt (Sporn et al., *The Retinoids*, 1994).

Auch im Zytoplasma der Zelle gibt es Proteine, die Retinoide spezifisch und mit hoher Affinität binden. Bis jetzt wurden vier intrazelluläre Retinoid-bindende Proteine beschrieben: cellular retinol-binding protein I (CRBP I); cellular retinol-binding protein type II (CRBP II); cellular retinoic acid-binding protein I (CRABP I) und cellular retinoic acid binding protein type II (CRABP II). Sie gehören zur Familie der Fettsäure-bindenden Proteine (FABP). Beobachtungen haben gezeigt, dass Bindungsproteine eine wichtige Rolle bei der Steuerung des Retinoid-Metabolismus spielen, dadurch dass Retinoide im gebundenen Zustand nur für bestimmte Enzyme verfügbar sind (Chytil, Ong and Newcomer; 1994).

Zwei verschiedene Klassen von nuklearen Rezeptoren sind für Retinoide identifiziert worden: Retinoic Acid Rezeptor (RAR) und Retinoic X Rezeptor (RXR), für die jeweils drei Isotypen (α , β , γ) existieren (Klaholz et al., 2000, Kelly et al., 2001, Wei 2003)). Die nuklearen Retinoid Rezeptoren sind hoch konserviert (>75% Aminosäureidentität) und man findet sie in Säugern, Vögeln und Amphibien. Sie gehören zur großen Familie der Liganden induzierbaren Transkriptionsfaktoren, zu denen man z.B. auch die Steroid-, Vitamin D- und Thyroid Hormon Rezeptoren zählt (Pemrick et al., 1994). Während Tretinoin (all-trans Retinoic Acid) vor allem an die RAR Isotypen bindet, bevorzugt 9-cis Retinoic Acid den RXR Rezeptor (Feng et al., 1997).

Bei der Retinoid- Signaltransduktion ist die Expression der Zielgene mit der Verfügbarkeit der Retinoide verknüpft und wird auf verschiedenen Ebenen reguliert (**Abb.:4**)

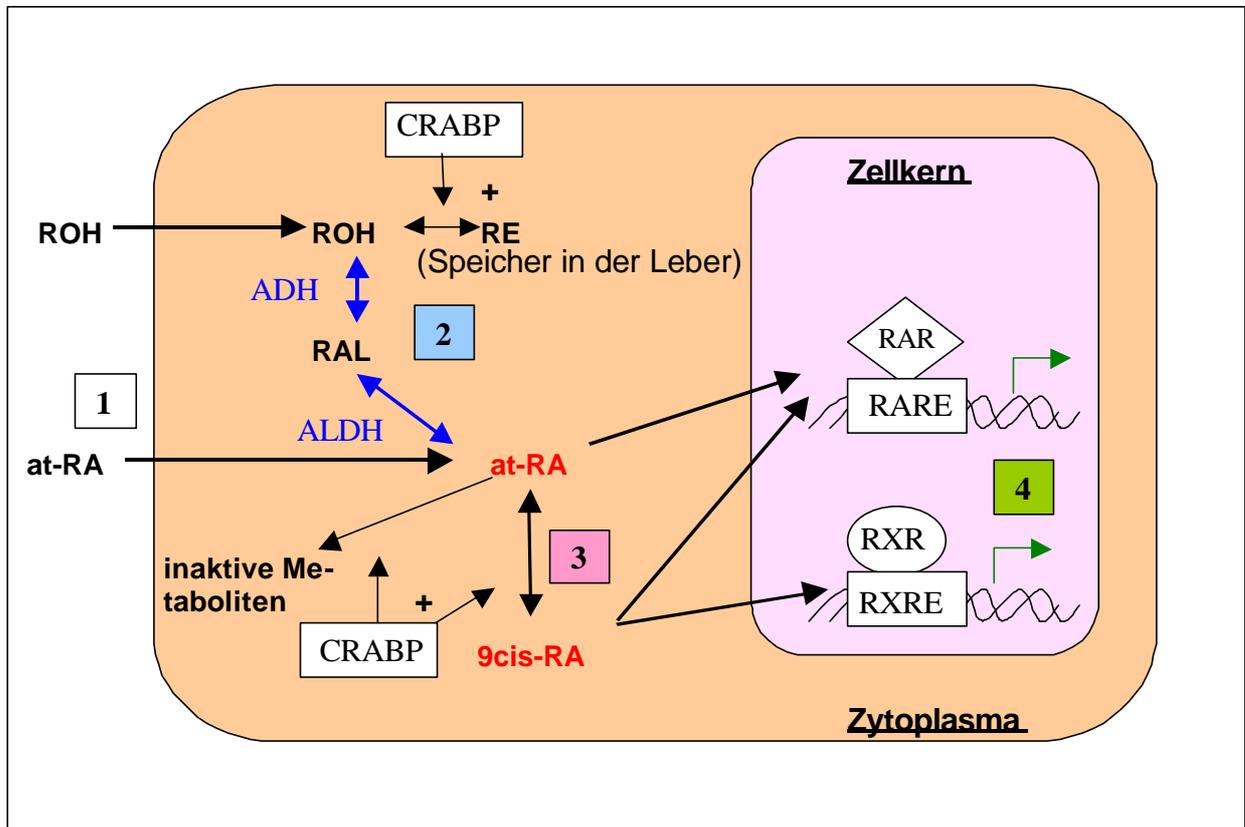


Abb.: 4 Die Retinoid- Signaltransduktion

(modifiziert nach Sporn, Roberts, Goodman; The Retinoids, 1994)

In diesem Modell ist die Retinoid Signaltransduktion vereinfacht dargestellt. Die Zelle verfügt über all-trans Retinoic Acid (at-RA) auf drei Wegen. Es gelangt zum einen direkt aus der Blutzirkulation in das Zytosol (1), oder aus Retinol (ROH) und Retinal (RAL) wird mit Hilfe der Alkoholdehydrogenase (ADH) und der Aldehyddehydrogenase (ALDH) all-trans RA in der Zelle synthetisiert (2). Außerdem können 9 cis-RA und at-RA enzymatisch und temperaturabhängig in die jeweils andere Form übergehen (3).

Sobald RA in den Zellkern gelangt, bindet es an die nukleären Rezeptoren RAR und RXR. Diese steuern dann die Transkription durch eine weitere Bindung an spezifische DNA Sequenzen, den sogenannten Retinoic Acid hormone response elements (RARE), die in der Promoter Region der zu transkribierenden Gene lokalisiert sind (4).

Eine weitere wichtige Funktion bei der Regulation der Retinoid- Signaltransduktion hat die Retinoid- Aktivierung und Inaktivierung sowie deren Veresterung in eine Speicherform (RE) durch die Retinoid bindenden Proteine (CRBP und CRABP).

2.2.3 Einfluss von Retinoiden auf Aktivität und Synthese von Wachstumsfaktoren

Retinoide sind auf der transkriptionalen, der translationalen oder der posttranslationalen Ebene in der Lage, Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren zu regulieren. Diese Regulation geschieht zum einen über die Expression des Zytokines selbst, zum anderen über die Expression des Rezeptors des entsprechenden Faktors (Sporn, Roberts, Goodman, The Retinoids, 1994).

In den meisten Fällen korrelieren die Effekte der Retinoide mit der suppressiven Wirkung der Wachstumsfaktoren auf epitheliales Zellwachstum. Studien haben gezeigt, dass Retinoide die Aktivität des Wachstumsfaktors TGF- β über Hochregulation seines Liganden und Rezeptors steigern (Glick et al., 1989, Jakowlew et al., 1992). Die Expression von Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- α oder IGF hingegen wird von Retinoiden herunterreguliert (Roberts, Sporn and Goodman 1994) (**Tab. 2**).

Retinoide weisen in ihrem Verhalten zahlreiche Parallelen zum Wachstumsfaktor TGF- β auf:

- sie sind multifunktionale Peptide
- beide sind Inhibitoren des Wachstums epithelialer Zellen (Glick et al., 1989)
- beide haben ähnliche Effekte auf die Synthese von Matrixproteinen und verwandten Proteasen / Proteaseninhibitoren (Clark et al., 1987, Hoosein et al., 1988)
- beide können die Expression von EGF stimulieren (Thompson and Rosner, 1989)
- beide wirken sich gleich auf die Expression des humanen Papilloma Viruses aus (Bartsch et al., 1992).

Tabelle 2. Effekte von Retinoiden auf Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren

Wachstumsfaktor	Retinoid- Effekt	Mechanismus	Referenz
TGF- β	↑	Post- transkriptional	Glick et al., 1989
TGF- β -R	↑	Differenzierung	Jakowlew et al., 1992 Rizzino, 1987 Falk et al., 1991 De Benedetti et al., 1991
TGF-alpha	↓	Transkriptional	Raja et al., 1991
EGF-R	↑	Transkriptional Transkriptional	Oberg und Carpender, 1991 Hudson et al., 1990 Zheng et al., 1992
AFGF, bFGF	↑	Differenzierung	Braunhut et al, 1989
HBNF/MK	↑	Differenzierung	Kretschmer et al., 1991
K-FGF	↑	Transkriptional	Schofield et al., 1991 Schorlemmer and Kruijer, 1991
PDGF A, B	↓	Differenzierung	Mercola et al., 1990
PDGF-R alpha,beta	↑	Differenzierung	Mercola et al., 1990
IGF-I	↓	Transkriptional	Lowe et al., 1992
IGF-II	↑	Transkriptional	Matsumoto et al., 1992
IL-1 β	↑	Transkriptional	Matikainen et al., 1991
IL-2	↓	Transkriptional	Felli et al., 1991
IL-6R	↓	Transkriptional	Sidell et al., 1991
IL-8	↑	Nicht bekannt	Zhang et al., 1992
IFN-gamma	↓	Nicht bekannt	Carman and Hayes, 1991
NGF	↑	Nicht bekannt	Wion et al., 1987
NGF-R	↑	Transkriptional	Scheibe and Wagner, 1992

(modifiziert nach Sporn, Roberts, Goodman, The Retinoids, 1994)

↑ Hochregulation ↓ Herunterregulation

2.3 Transforming Growth Factor- β 2

Die in 2.2 aufgezeigten Zusammenhänge zwischen Retinoiden und TGF-2 legen die Vermutung nahe, dass auch während des Haarzyklus Retinoide und TGF- β interagieren und Schlüsselfunktionen innehaben. Da Haarausfall eine häufige unerwünschte Nebenwirkung der systemischen Retinoidtherapie ist und TGF- β in die Haarfollikelregression als Katageninduktor verwickelt zu sein scheint, wurden in dieser Arbeit die mit Tretinoin behandelten Haarfollikel hinsichtlich ihrer TGF- β Expression untersucht.

2.3.1 Die TGF- β Familie

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) wurde 1978 von de Larco et al. ursprünglich als Sarkoma Growth Factor in Maus Sarkomzellen entdeckt. Frolic et al. charakterisierten TGF- β 1983 als eigene molekulare Entität und 1985 konnten Derynck et al. die erste humane cDNA von TGF- β klonieren.

Zur TGF- β Genfamilie (**Tabelle 3**) gehören miteinander verwandte Signalmoleküle, die eine wesentliche Funktion während des normalen Wachstums und der Entwicklung haben (Moses und Serra, 1996, Govinden and Bhoola 2003).

Tabelle 3. Mitglieder der TGF- β Genfamilie

TGF- β s	MIS/Inhibins	BMP-verwandt
TGF- β 1	MIS	BMP-2
TGF- β 2	GDNF	BMP-3
TGF- β 3	n-Inhibin Inhibin- β A (Aktivin A) Inhibin- β B (Aktivin B) Inhibin- β C GDF-9 Follistatin	BMP-4 BMP-5 BMP-6/Vgr-1 BMP-7 BMP-8/OP-2 GDF-1 GDF-3 Vgr-2 Dpp 60A Screw Nodal

(nach Moses und Serra, 1996)

MIS = Müllerian Inhibiting Substance, BMP = Bone Morphogenic Protein, GDF = Growth and Differentiation Factor, Dpp = Drosophila Decapentaplastic

Es sind fünf Isoformen von TGF- β bekannt, von denen aber nur TGF- β 1-3 in Säugetieren gefunden wurden (Kingsley, 1994, Sporn, Roberts Goodman, The Retinoids 1994). Die Isoformen weisen eine Homologie von 70-80% in ihrer Aminosäuresequenz auf und sind durch Konservierung im Laufe der Evolution zwischen den verschiedenen Spezies untereinander bis zu 98% identisch (Massague et al. 1990).

In den verschiedensten Zellen ist TGF- β Expression von der Embryogenese bis in das spätere Erwachsenenalter zu finden. Hauptquellen sind z.B. Endothelzellen, Knochenzellen, Keratinozyten, Thrombozyten oder Lymphozyten (Massague et al. 1990).

TGF- β wird als biologisch inaktive Form, dem latenten TGF- β , sezerniert, welches aus einem Komplex aus TGF- β und einem TGF- latency associated peptide (TGF-LAP) besteht. Latentes TGF- β kann an ein spezifisches Bindungsprotein koppeln, dem Latent TGF

Binding Protein (LTBP). Die biologisch aktive Form von TGF- β entsteht nach Dissoziation von LAP, wobei der exakte Mechanismus der Aktivierung noch nicht vollständig geklärt ist (**Abb. 5**) (Munger et al., 1997).

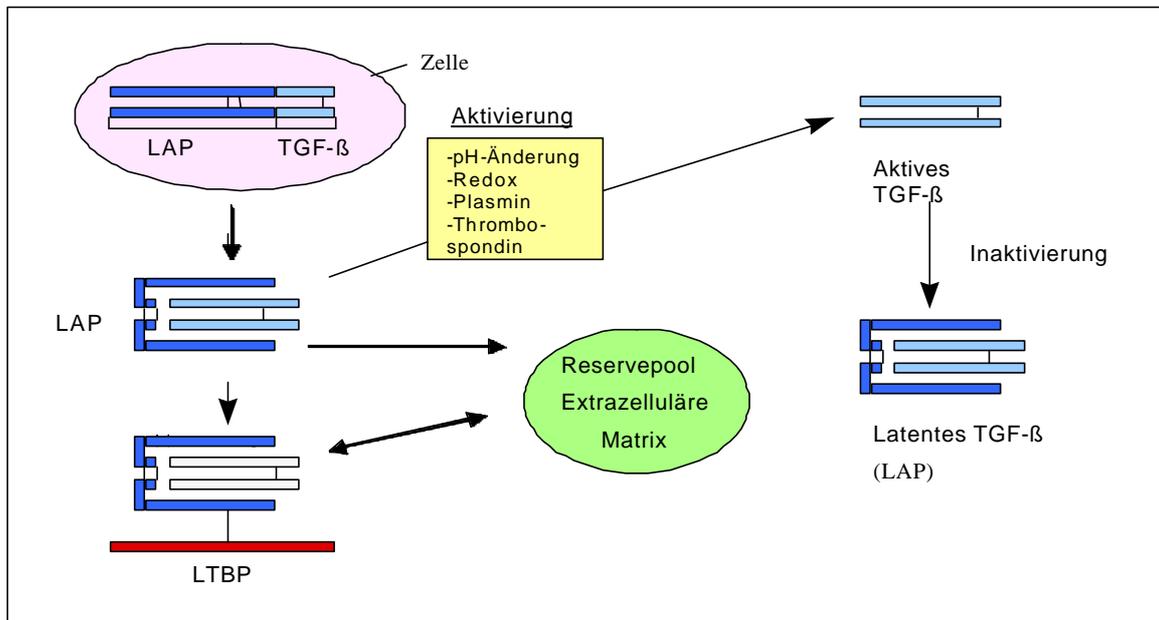


Abb.5: Struktur und Aktivierung von latentem TGF- β

LAP= latent associated peptide, LTBP= latent TGF- β binding protein. TGF- β wird als Vorläuferpeptid in der Zelle synthetisiert, proteolytisch gespalten und als nicht kovalent assoziierter, inaktiver Komplex aus LAP und TGF- β sezerniert. TGF- β kann entweder durch Spaltung aktiviert werden oder der LAP/TGF- β Komplex kann an LTBP binden. Aktives TGF- β kann durch erneute Bindung an LAP inaktiviert werden (nach Böttinger et al., 1997).

2.3.2 Signaltransduktion durch TGF- β Rezeptoren

Für TGF- β wurden drei Rezeptoren isoliert, Rezeptor Typ I-III, von denen jedoch nur Typ I und Typ II für die Signaltransduktion verantwortlich gemacht werden. Typ I und Typ II Rezeptoren sind transmembranöse Rezeptoren, die zu den Serin/Threonin Kinasen gehören (Massague 1998, Attisano und Wrana 2000, Johnson und Newfeld 2002). Typ III Rezeptor, der ein an die Zelloberfläche gebundenes Proteoglykan ist, präsentiert Rezeptor Typ II die einzelnen TGF- β Mitglieder (Lopez-Cassilas et al., 1993).

In Säugetierzellen werden zur Einleitung der Signaltransduktionskaskade beide Rezeptoren, Typ I und Typ II benötigt. TGF- β Rezeptor II ist in der Lage freies TGF- β zu binden, um dann einen Komplex mit TGF- β Rezeptor Typ I einzugehen (**Abb.6**). Nach Phosphorylierung erfolgt die Weiterleitung über sogenannte Smad Proteine, die im Nukleus durch Assoziation mit dem Transkriptionsfaktor Fas-I (fos/cJun) die Transkription des Zielgens aktivieren (Massague et al., 1997, Govinden und Bhoola 2003).

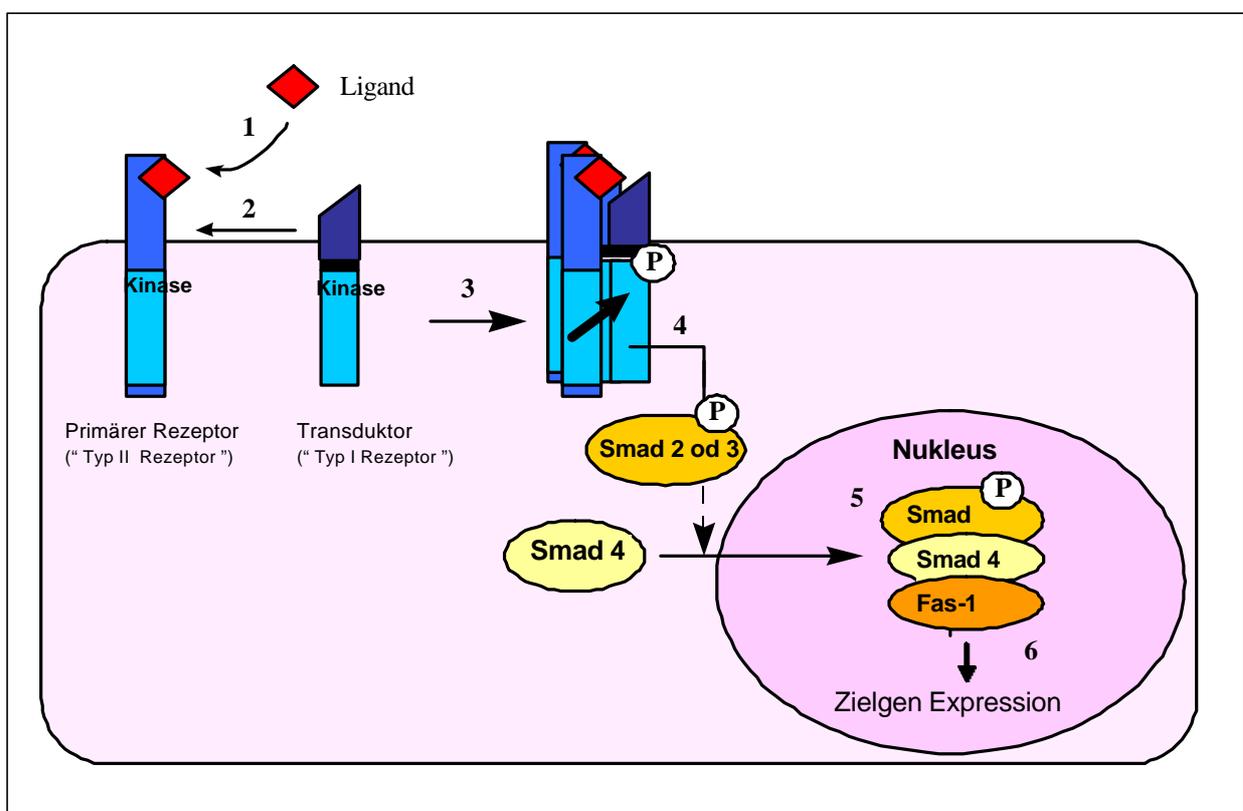


Abb.6: TGF- β Rezeptor Aktivierung und Signaltransduktion

TGF- β RII bindet als der primäre Rezeptor TGF- β Ligand (1) und bildet daraufhin einen Komplex mit TGF- β Rezeptor Typ I (2). Nach Phosphorylierung von Rezeptor Typ I durch Typ II (3) transduziert Typ I das Signal weiter (4). Smad 2 oder 3 wird durch den TGF- β R Komplex phosphoryliert und assoziiert daraufhin mit Smad 4. Smad und Smad 4 binden im Nukleus an Fas-1 (5) und aktivieren so die Transkription des Zielgens (6) (nach Massague et al. 1997 / Govinden and Bhoola 2003).

2.3.3 *Allgemeine biologische Effekte von TGF- β*

Für TGF- β 1, 2 und 3 ist eine große, teilweise widersprüchlich erscheinende Vielfalt von biologischen Funktionen beschrieben (**Abb. 7, Tab. 4**). Jede Isoform hat abhängig vom Zelltyp, Differenzierungsgrad und An- oder Abwesenheit von anderen Wachstumsfaktoren unterschiedliche Eigenschaften (Govinden und Bhoola 2003).

Sie sind potente Morphogene während der Embryogenese und sind an der Organogenese, der Etablierung der lateralen Asymmetrie und der Ausbildung der Extremitäten- Knospen Formation beteiligt (Smith, 1996, King, 1997, Meno et al., 1996). Mäuse mit einer für TGF- β 1, 2 oder 3 null Mutation zeigen unterschiedliche Phänotypen auf (Letterio et al., 1994, Dickson et al., 1995, Snaford et al., 1997, Kaartinen et al., 1995), so dass die verschiedenen Isoformen abhängig vom Expressionszeitpunkt und -muster unterschiedliche Funktionen während der Morphogenese ausüben.

Generell inhibiert TGF- β die Zellproliferation epithelialer Zellen in der späten G1 Phase des Zellzyklus (Hocevar und Howe, 1998), mesenchymale Zellen hingegen, z.B. Fibroblasten der Haut, werden zur Proliferation angeregt (Moses und Serra, 1996, Massague, 1990). TGF- β moduliert die Expression von Adhäsionsmolekülen und vermindert die Produktion von Proteasen wie Plasmin/ Plasminogen Aktivator oder Kollagenasen (Roberts Sporn, 1990). Die Stimulation mesenchymaler Zellen führt zu einer vermehrten Produktion und Deposition von Komponenten der extrazellulären Matrix, zu ihnen gehören Fibronectin, Thrombospondin, Kollagen I, Tenascin und Proteoglykane (Roberts and Sporn 1990).

Des Weiteren fördern TGF- β Mitglieder die Wundheilung (Roberts und Sporn, 1990, Renner et al., 2002). Lee et al. (2001) injizierte TGF- β 1 exprimierende Fibroblasten in Gelenke und konnte so Knorpeldefekte mit neu gewachsenem hyalinem Gewebe auffüllen. Auch Studien von Howat et al. (2002) beschreiben während der Wundheilung von Bronchialepithel eine Aktivierung der drei TGF- β Isoformen.

Eine weitere wichtige Funktion kommt TGF- β bei der Angiogenese zu. In niedrigen Konzentrationen stimuliert TGF- β 1 z.B. das Wachstum endothelialer Zellen während in hohen Konzentrationen von TGF- β 1 endotheliale Wachstumsfaktoren herunterreguliert werden (Gajdusek et al. 1993). Untersuchungen an *in utero* verstorbenen TGF- β 1 Knock out Mäuse Embryos zeigten Defekte der Hämatopoese und Vaskulogenese (Moses und Serra 1996). Homozygote TGF-RII Knock out Mäuse wiesen ebenfalls Defekte der Hämatogenese und Vaskulogenese des Dottersackes auf und verstarben dadurch *in utero* (Oshima et al., 1996).

Außerdem wirken die Mitglieder der TGF- β Familie inhibitorisch auf das Immunsystem (de Visser et al., 1999, Chung et al. 2000). Sie blockieren die Antikörperproduktion der B-Zellen und supprimieren zytotoxische Antworten von T- Lymphozyten (Letterio and Roberts, 1998).

Gautier et al. (1997) wies in seinen Studien mit fetalen testikulären Rattenzellen den inhibitorischen Einfluss von TGF- β auf die Steroidsynthese nach.

Weitere Studien zeigten bei einer Vielzahl von Zellen wie z. B Hepatozyten, Epithelzellen oder Prostatazellen, dass sowohl TGF- β 1 als auch TGF- β 2 als Induktoren des programmierten Zelltodes, der Apoptose fungieren (Oberhammer et al., 1992, Otha et al., 1997, Kim et al. 1998, Soma et al, 1998, Schuster and Kriegelstein, 2002). Bei TGF- β 3 Knock out Mäusen hingegen wurde eine vermehrte Apoptose in der Epidermis beobachtet, daher scheint TGF- β 3 eher eine protektive Wirkung auf Keratinozyten gegenüber Apoptose zu haben (Missero et al. 1993).

Generell hat TGF- β durch seine wachstumshemmenden Effekte auch Einfluss auf das Tumorstadium und die Karzinogenese. Engle et al. (1999) konnte z.B. eine Suppression von Kolontumoren in frühen Stadien der Tumorentstehung beobachten.

Initial supprimiert TGF- β also Hyperproliferation und maligne Degeneration, auf jedoch noch unbekannt Weise werden Tumorzellen im Verlauf unempfindlich gegenüber TGF- β . In späteren Tumorstadien produzieren maligne Zellen sogar selbst TGF- β und vermitteln so wahrscheinlich die Tumorentstehung und Immunsuppression im Tumorgewebe (Huang and Lee 2003, Gold et al., 1999).

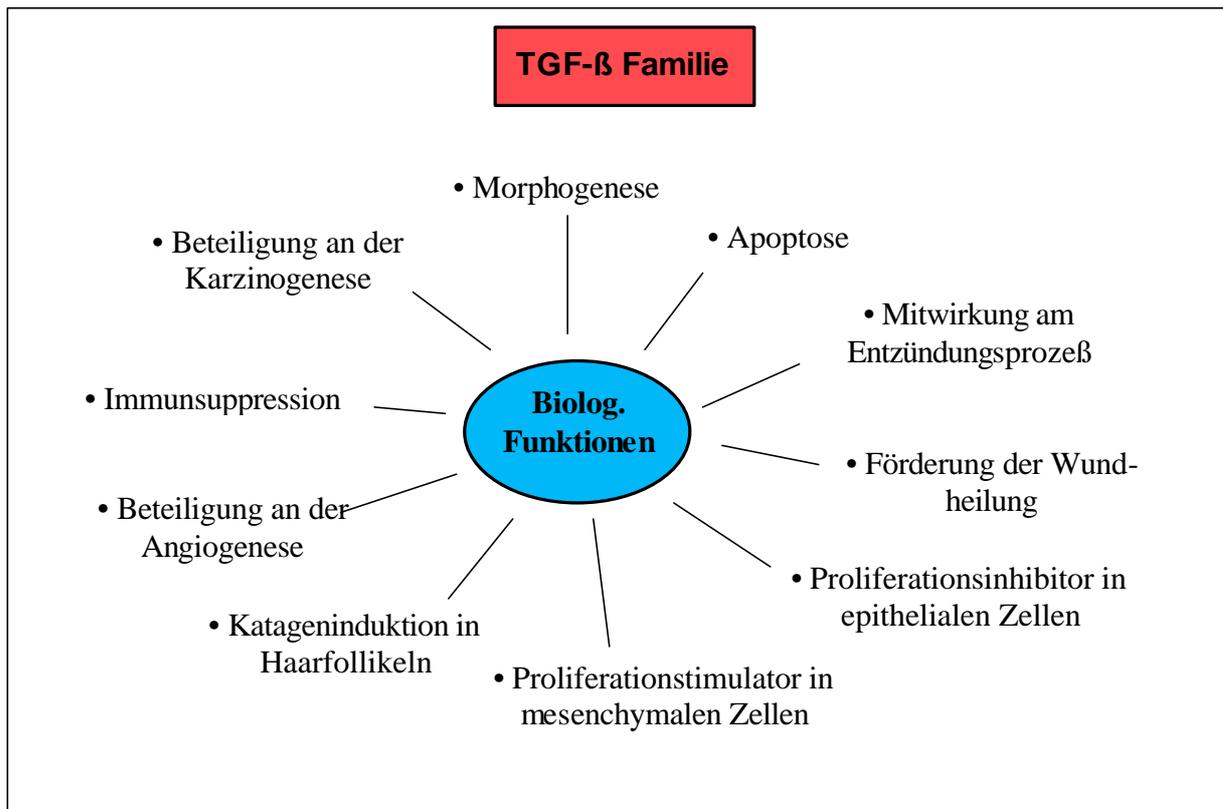


Abb.7: Allgemeine biologische Effekte von TGF-β- Familienmitgliedern

Tabelle 4: Spezielle Funktionen von TGFβ - 1, 2 und 3

TGF-β1	<ul style="list-style-type: none"> • Apoptoseinduktion in Hepatozyten Fibroblasten, B- und T-Zellen, Prostata-epithelzellen u. a. • Wundheilung, Geweberegeneration • Beteiligung an der Angiogenese • Immunsuppression bei TGF-β1 Knock out Mäusen, Lymphozytendifferenzierung- und Proliferationsinhibition • Suppression in früher Stadien der Tumorigenese • TGF-β Überexpression in Tumorzellen vermittelt Immunsuppression und Angiogenese 	<ul style="list-style-type: none"> • Schuster and Krieglstein 2002, Vossbeck et al. 1995 • Lee et al. 2001, Howat et al 2002 • Gadjusek et al 1993, Roberts and Sporn 1990 • Shull et al. 1992, Wahl et al. 1994, Letterio and Roberts 1998 • Engle et al. 1999 • Huang and Lee 2003, Akhurst 2002
---------------	--	--

TGF-β2	<ul style="list-style-type: none"> • Apoptoseinduktion • TGF-β2 Knock out Mäuse : Verzögerte Haarfollikelmorphogenese, Kardio-vaskuläre Defekte • Förderung von Fibrose und Narbenbildung 	<ul style="list-style-type: none"> • Soma et al. 1998, 2001 • Foitzik et al. 1999, Snaford et al. 1997 • Brahmawari et al. 2000, Li et al., 1999
TGF-β3	<ul style="list-style-type: none"> • vermehrte Apoptose bei TGF-β3 Knock out Mäusen – „Apoptoseprotektion?“ • verminderte Narbenbildung • Verminderung von Typ I Kollagenproduktion 	<ul style="list-style-type: none"> • Missero et al. 1993 • Li et al. 1999 • Hosokawa et al. 2003

2.4 Physiologische und pathologische Funktionen von Retinoiden und TGF- β 2 in der Haut

Wesentlicher Angriffspunkt der Retinoide ist die Epidermis. Ihre epitheliale Differenzierung und Erhaltung, eine bedarfsgerechte Verhornung sowie die Synthese dermalen Matrix hängt unter anderem von Vitamin A und seinen Derivaten ab (siehe auch Abb.2). Bei Vitamin A-Mangel entsteht das Phrynoderm, eine exzessive Verhornung der Haut mit Betonung der Follikel (Bauer und Gollnick, 1984, Gollnick 2003).

Der genaue Metabolismus der Retinoide in der Haut ist noch unklar, es sind allerdings eine Anzahl von Retinoid Metaboliten identifiziert worden. In der humanen Epidermis wird Retinol vor allem zu 3,4 -Didehydroretinol umgewandelt, ein kleinerer Anteil zu Retinoic Acid, welches schnell weiter in andere Metaboliten wie z.B. 13-cis-RA oder 9-cis-RA und inaktive katabolische Produkte konvertiert wird (siehe auch Abb. 4, Roberts, Sporn, Goodman 1994, Marill et al., 2003).

Lokale Anwendung von Tretinoin und anderen Retinoiden steigert die Zellproliferation der Epidermis und führt zu einer Akanthose (Sporn, Roberts and Goodman, 1994).

Unter systemischer Gabe von Retinoiden tritt dosisabhängig nach zwei bis drei Wochen eine verstärkte Ablösung der Hornschicht auf. Diese Korneolyse wird histologisch von

einer Akanthose und einer Hypergranulose begleitet. Gleichzeitig wird die Differenzierung der Epidermis in Richtung Schleimhaut verschoben (Bauer und Gollnick, 1984, Fell und Mellanby, 1953). Ultrastrukturell resultiert aus der Retinoid Behandlung der Epidermis eine Verminderung der Anzahl der Tonofilamente und der desmosomalen Verbindungen. Vermehrt vorzufinden sind Keratinosomen, Mitochondrien, Ribosomen und Endoplasmatisches Retikulum. In den aufgeweiteten Interzellularräumen ist gehäuft amorphes Material zu sehen (Fritsch, 1981, Williams und Elias, 1981). Außerdem reduziert die Behandlung mit Retinoiden die Keratinmenge in den Keratinozyten und verändert das Keratin Expressionsmuster (Virtane et al., 2000, Blumenberg et al., 1992).

Bedeutend früher als die keratolytische Wirkung oraler Retinoide treten ihre immunmodulatorischen Eigenschaften ein. Retinoide haben einen negativen Einfluss auf die Migration neutrophiler Granulozyten (Dubertret et al., 1982). Ein weiterer anti-entzündlicher Effekt der Retinoide ist die dosisabhängige Lymphozytenproliferationshemmung. Monozyten, Makrophagen und Langerhanszellen werden offenbar in ihrer Aktivität stimuliert (Bauer und Gollnick, 1984, Wolf 2002).

Die Effektivität der Retinoide bei der Akne Therapie wird durch Untersuchungen an humanen Sebozyten in Retinoid (Isotretinoin)- Kultur unterstützt. Diese Zellen zeigten eine Inhibition der Zellproliferation und eine verminderte Lipid- und Talgproduktion (Zoboulis et al., 1991, 2001, Gollnick und Krautheim 2003).

Des Weiteren zeigte äußerlich angewendetes Retinoic Acid positive Effekte auf benigne und maligne epitheliale Tumoren und im Tierversuch ist Hypovitaminose A assoziiert mit einer höheren Inzidenz der Karzinomentwicklung (Sun and Lotan 2002, Bollag, 1972, Lippmann und Meyskens, 1982).

Wie die Retinoide spielen auch die TGF- β Isoformen bei der Regulation des Zellwachstums, der Differenzierung und dem programmierten Zelltod (Apoptose) in epithelialen Geweben eine Schlüsselrolle.

TGF- β inhibiert einerseits in gesunder Haut reversibel die Proliferation von Keratinozyten, andererseits stimuliert es die Zellteilung und -reifung während der epidermalen Regeneration in der Wundheilung (Roberts und Sporn, 1990, Martin et al, 1992). Diese Wirkung wird vor allem durch die Effekte von TGF- β 1 und 2 auf Chemotaxis, Angiogenese, Akkumulation extrazellulärer Matrix und Kollagen – Matrix - Kontraktionen erreicht (Clark

et al., 1997, Roberts und Sporn, 1995). In verwundeter Haut wurden histologisch eine Hochregulation von TGF- β und ein anderes Expressionsmuster der TGF- β Isoformen und Rezeptoren festgestellt (Gold et al., 1997).

In Fibroblasten stimuliert TGF- β die Kollagen- und Fibronectin Synthese (Varga et al., 1987). Als Regulator der extrazellulären Matrix während der Morphogenese und des lebenslänglichen Umbaus des Bindegewebes ist TGF- β auch an der Pathogenese fibrotischer dermaler Erkrankungen beteiligt, wie z.B. der Sklerodermie oder der Ausbildung hypertropher Narben (Mauch et al., 1993, Lee et al., 1999).

Untersuchungen über den Einfluss von TGF- β auf die Karzinogenese von Epithelzellen der Haut zeigten initial eine verminderte Induktion von Hauttumoren, zu späteren Untersuchungszeitpunkten wurde die Tumorprogression durch TGF- β vorangetrieben (Cui et al., 1996). In vivo ist die Expression von TGF- β in Tumorzellen häufig erhöht (Derynk et al., 1985).

Für TGF- β 2 im speziellen zeigten spezifische TGF- β 2 Immunfärbungen gesunder Haut vor allem in der Epidermis und den Blutgefäßwänden TGF- β 2 Immunreaktivität. Die Dermis war TGF- β 2 negativ und nur bei Patienten mit inflammativ veränderter Haut war in den entzündlichen Infiltraten TGF- β 2 Expression vorzufinden (Falanga et al., 1992, Querfeld et al., 1999).

Bei der terminalen Differenzierung von Maus- Keratinozyten konnte Glick et al. (1990) speziell für TGF- β 2 eine Hochregulation auf das 20-fache nachweisen.

Des Weiteren scheinen vor allem TGF- β 1 und 2 die Fibrose und Narbenbildung zu fördern. Behandlung von frischen Wunden bei Schweinen mit TGF- β 2 zeigte größere und prominentere Narben im Vergleich zur Kontrolle, Anti-TGF- β 2 Antikörper reduzierte diesen Effekt (Brahmatewari et al., 2000). Die Untersuchungen von Lee et al. (1999) an Keloid- Fibroblasten ergaben eine Hochregulation von TGF- β 1 und 2, während TGF- β 3 in Keloid- Fibroblasten reduziert exprimiert wurde.

TGF β -3 dagegen scheint Narbenbildung zu vermindern, indem es die Keratinozyten vor Apoptose schützt (Li et al. 1999).

2.5 Retinoide und TGF- β 2: Stand der Haarforschung

Retinoide sind essentiell für die Haarmorphogenese und den Haarzyklus. Retinoic Acid und Retinoid- Rezeptor- „Knock out“ Mäuse weisen unter anderem Haut- und Haaranomalien auf (Kochhar et al., 1998).

Bei der haarlosen Vitamin A defizienten Maus konnte Bazzano et al. (1986) durch äußerlich angewendetes Tretinoin Haarwachstum hervorrufen.

Andererseits ist sowohl die Vitamin A Hypervitaminose, als auch die synthetische Retinoid Therapie von Haarausfall begleitet. Meist 3-8 Wochen nach Beginn der Therapie tritt bei den Patienten ein Telogeneffluvium auf, welches teilweise mit dem Auftreten von dystrophen Anagenhaaren begleitet wird (Orfanos, 1980, Berth-Jones et al., 1990).

Studien an Mäusen über die äußerliche Anwendung von Retinoiden und Minoxidil zeigten ein vermehrtes Haarwachstum, eine Verlängerung der zweiten Anagenphase, sowie eine Verkürzung der zweiten Telogenphase und einem daraus resultierenden Telogeneffluvium (Bazzano et al., 1986, Terezakis und Bazzano, 1988, Bazzano et al., 1993).

Untersuchungen über Retinoid- Rezeptoren deckten eine starke Expression von RA bindenden Protein (CRBP II), Retinoid X Rezeptor (RXR alpha und beta) und Retinoid Acid Rezeptor (RAR alpha, beta und gamma) in den dermalen und epithelialen Kompartimenten des Haarfollikels auf. In isolierten dermalen Papillenzellen wurde konstant RXR alpha sowie RAR beta und teilweise RAR alpha / gamma mRNA nachgewiesen (Billoni et al., 1997). Immunhistochemische Färbungen zeigten eine RAR alpha und gamma Expression in der äußeren Wurzelscheide und schwächer in der inneren Wurzelscheide. RXR (alpha, beta und gamma) wies in den Wurzelscheiden des Haarfollikels gleiches Färbeverhalten wie RAR auf. In den dermalen Kompartimenten der Haut färbten sich nur vereinzelte Fibroblasten positiv für RXR und RAR (Reichrath et al., 1997).

Billoni et al. entdeckte 1997, dass das Zugeben des RAR Agonisten CD367 das Überleben von humanen Haarfollikeln *in vitro* inhibiert, während der RXR Agonist CD2425 das Haarwachstum stimuliert.

Wie die Retinoide ist auch TGF- β als multifunktionaler Bioregulator an der Haarfollikelmorphogenese und am Haarzyklus beteiligt.

TGF- β 2 „Knock-out“-Mäuse zeigten eine verzögerte Haarfollikelmorphogenese und eine um 30% reduzierte Anzahl von Haarfollikeln (Foitzik et al., 1999, Snaford et al., 1997).

Untersuchungen von Seiberg et al. (1995) mit Apoptose assoziierten Genen während des adoleszenten, murinen Haarzyklus ergaben ein signifikantes Ansteigen der TGF- β 1 Transkriptionswerte während des Katagens.

Des Weiteren haben TGF- β 1 und 2 die Potenz zur Katageninduktion. Humane Anagenhaarfollikel gingen *in vitro* nach TGF- β 1 oder 2 Zugabe in ein Katagen ähnliches Stadium über. Die Anzahl apoptotischer Zellen im epithelialen Strang, um die dermale Papille und in der äußeren Wurzelscheide stieg bei diesen Follikeln an (Soma et al., 1998, 2001, Philippott et al., 1994). Das Pflanzenextrakt von *Hydrangea macrophylla* suppressierte die TGF- β 2 Effekte am Haarfollikel und verminderte auf diese Weise die Katagenentwicklung *in vivo* (Hibino et al., 2003).

In humanen Anagenhaaren wird TGF- β 2 in der äußeren Wurzelscheide exprimiert. Beim Übergang in das Katagen konnte eine starke TGF- β 2 Immunreaktivität in den Matrixzellen des unteren Haarbulbus und in dem sich bildenden epithelialen Strang nachgewiesen werden (Soma et al., 2001).

Die ähnlichen biologischen Funktionen von Retinoiden und TGF- β 2 in der Haut und den Haarfollikeln lassen einen engen Zusammenhang dieser Substanzen bei der Haarmorphogenese und der Regulation des Haarzyklus vermuten. Die systematische qualitative und quantitative Analyse des Einflusses von Tretinoin (all-trans Retinoic Acid) auf die TGF- β 1 und 2 sowie TGF-RII Expression bei humanen Haarfollikeln *in vitro* stellt einen sinnvollen Ansatz dar, um die Auswirkungen einer Retinoid-Therapie auf molekularer Ebene zu entschlüsseln und diese Signalmoleküle oder ihre Antagonisten evtl. auch therapeutisch nutzbar zu machen.

2.6 Der Haarfollikel und der Haarzyklus

Der Haarfollikel besteht aus einem mesenchymalen Anteil, der dermalen Papille und den in Schichten angeordneten epithelialen Zellen, der inneren und äußeren Wurzelscheide, den Keratinozyten und Melanozyten. Der Haarfollikel ist an seinem Ende zum Haarbulbus verdickt, der von den Gefäßen der bindegewebigen dermalen Papille versorgt wird. Die proximal der dermalen Papille liegenden Matrixzellen sind für die Bildung des Haarschaftes zuständig (**Abb. 8**). Der distale Anteil des Haarfollikels bleibt während des gesamten Haarzyklus konstant (permanente Region). Der proximale Part (transiente Region) dagegen verändert seine Form, Größe und Proliferationsverhalten.

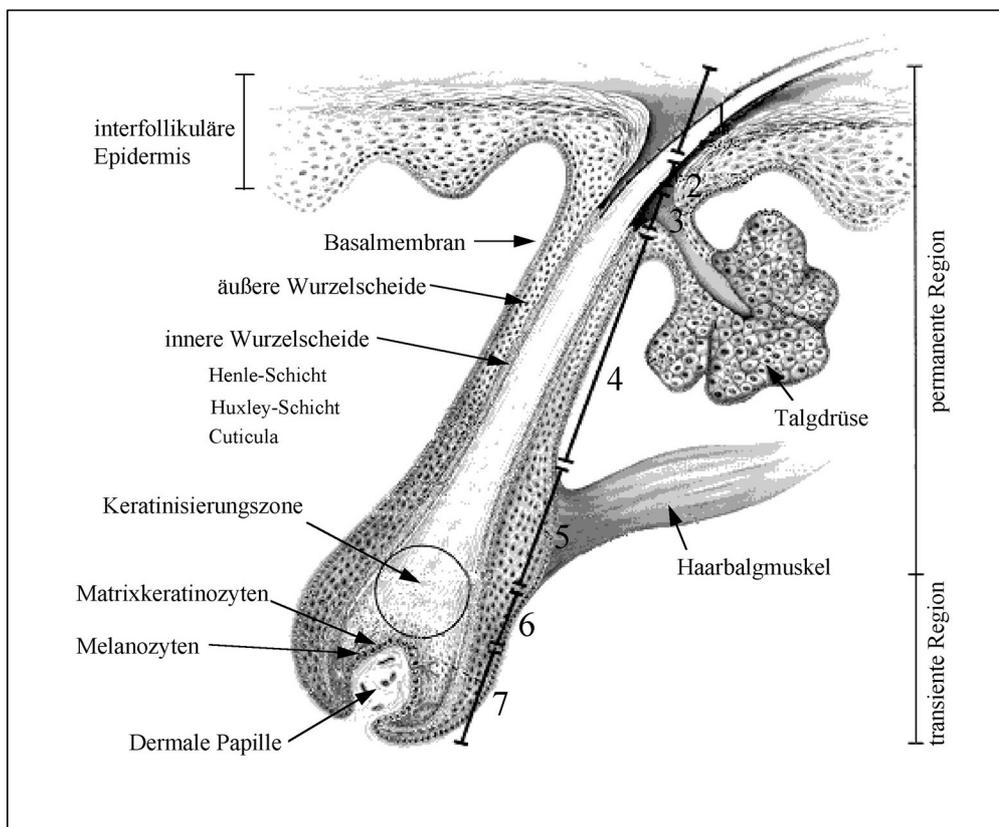


Abb. 8: Aufbau eines Anagenhaarfollikels (modifiziert nach Klein 1993)

1 = Haarkanal, 2 = Infundibulum, 3 = Talgdrüsenmündung, 4 = Isthmus, 5 = Ansatz des Haarbalgmuskels (Wulst), 6 = untere Follikelportion, 7 = Haarbulbus.

Zu den Funktionen des Haarfollikels zählt die Produktion von Haarschaft, welcher der Dekoration, dem Schutz vor äußeren Einflüssen wie Hitze oder Insekten und als eine Art „Antenne“ zur Registrierung der Umgebung dient. Außerdem enthält der Haarfollikel ein Reservoir von Melanozyten, Langerhanszellen und Merkelzellen und produziert Talg zum Schutz der epidermalen Oberfläche.

Der Haarwachstumszyklus ist in drei Phasen unterteilt (**Abb. 9**): Wachstumsphase (Anagen), einer Regressionsphase (Katagen) und einer so genannten „Ruhephase“ (Telogen). Der Haarfollikel ist das einzige Organ, das während der gesamten Lebensdauer des Säugetierorganismus diese langen Perioden massiver epithelialer Zellproliferation, terminaler Differenzierung (Anagen), Organinvolution (Katagen) und Ruhephasen (Telogen) durchläuft (Paus, 1996, 1998). Damit ist er ein definiertes biologisches System, welches viele Herausforderungen der modernen Biologie illustriert: Differenzierung, epithelial - mesenchymale Interaktionen, Stammzellbiologie, Apoptose, Zell- und Organwachstumszyklen und die Pigmentierung (Stenn and Paus, 2001). Dieser Haarwachstumszyklus des adulten Organismus (**Abb. 9**) scheint große Teile der Embryonalentwicklung des Haarfollikels zu wiederholen (Randall et al., 1993).

In der Wachstumsphase, dem Anagen präsentiert sich der Haarbulbus als ein hochproduktives, stoffwechselaktives Miniorgan, welches eine der höchsten Proliferationsraten des Organismus aufweist (Paus et al., 1994, Stenn and Paus 2001). Es ist eine genau abgestimmte Koordination zwischen dem epithelialen Anteil des Follikels und der dermalen Papille erforderlich, um dieses zyklisches Wachstum aufrechtzuerhalten. Zusätzlich spielen wahrscheinlich verschiedene neuroektodermale Faktoren (Melanozyten, Merkelzellen (Moll 1994), Nervenfasern, Schwannsche Zellen) eine wichtige Rolle bei der Haarwachstumskontrolle und bei der hier nicht weiter behandelten aktiven Pigmentierung, der Melanogenese (Moll et al., 1996, Paus et al., 1997, Botchkarew et al., 1997). In einigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte Substanzen, wie z.B. Cycloporin A, Minoxidil, verschiedene Hormone oder einige Wachstumsfaktoren Anagen induzieren können oder an anderen Stellen des Haarzyklus eingreifen und somit das Haarwachstum beeinflussen (**Tabelle 4**, Stenn and Paus 2001, Alonso and Rosenfield 2003).

Während des Katagens bildet sich der Haarfollikel wieder zurück und das Haar wird in Richtung Kopfhaut verschoben. Die Ursache dieser Involution ist hauptsächlich der programmierte Zelltod (Apoptose) und die terminale Differenzierung der Bulbuskeratinozyten (Weedon und Stutton, 1981, Lindner et al., 1997). Die genauen Auslöser zur Katageninduktion sind unbekannt, viele Studien beschäftigen sich daher mit den möglichen Faktoren, die den Haarzyklus beeinflussen (**Tab 5**). Es ist bekannt, dass viele äußere Faktoren, wie z. B. Trauma, Chemikalien oder starker Stress Katagen induzieren können (Stenn and Paus 2001).

In dem darauf folgenden Telogenstadium befindet sich der Haarfollikel in einer Art Ruhephase, in der das Kolbenhaar nur locker in dem Follikel verankert ist (**Abb. 9**). Dabei bildet sich am unteren Pol des Haarschaftes ein Kolben aus verhornenden Zellen. Dieses Kolbenhaar steigt im Follikelkanal bis unterhalb der Talgdrüsenmündung hoch, wo es mit der äußeren Wurzelscheide verankert wird und bis zum Herauslösen des Haares aus der Kopfhaut keine Stoffwechselfvorgänge mehr stattfinden (Meyer 2002).

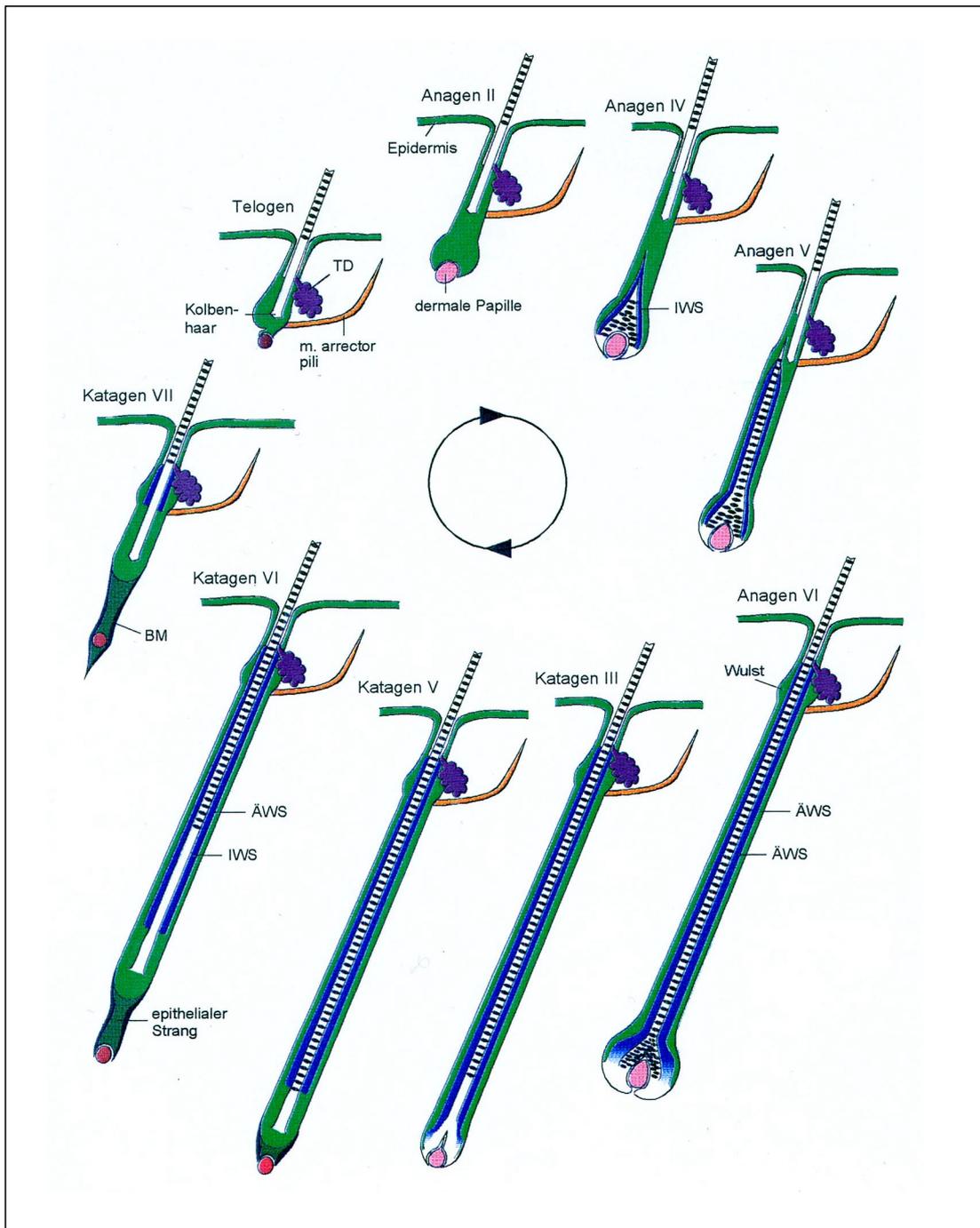


Abb. 9: Schematische Darstellung des Haarzyklus am Beispiel der C57BL/6 Maus
(modifiziert nach Paus, 1996)

Nach der Ruhephase, dem Telogen, durchläuft der Haarfollikel während der Wachstumsphase die Anagenstadien IV. Darauf folgt eine kurze Regressionsphase, das Katagen, und danach tritt der Follikel wieder in das Telogen ein. ÄWS = äußere Wurzelscheide, IWS = innere Wurzelscheide, TD = Talgdrüse, BM = Basalmembran

Tabelle 5. Molekulare Mediatoren des Haarfollikelwachstums

<u>Faktor Familie</u>	<u>Lokation im Follikel</u>	<u>Funktion</u>
FGF5	ÄWS	Terminiert Anagen
FGF7 (KGF)	Papille	Induziert Anagen
Sonic Hedgehog (SHH)	Anagenbulbus, IWS	Initiiert Anagen
TGF-βR I	ÄWS: Anagen/Katagen	Katageninduktion
TGF-βR II	ÄWS: Anagen/Katagen	Katageninduktion, blockiert Anageninduktion
TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3	Werden alle im entwickelnden Follikel exprimiert, im reifen Follikel in IWS, ÄWS und BG	TGF- β 1 und 2: Katageninduktion, stimulieren ÄWS-Proliferation und oppositionieren TGF- β 3 Stimulus
BMP2	Anagenbulbus	Unterdrückt Proliferation, fördert Differenzierung
BMP6	Epithel	Fördert Follikelentwicklung und -wachstum
IGF	Haarbulbus	Essentiell für Follikelwachstum in vitro
EGF		Stimuliert Zellwachstum während Follikelmorphogenese in ÄWS
HGF	dermale Papille	Stimuliert Follikelwachstum in vitro
Interferon alpha		Überexpression führt zu Haarausfall
TNF alpha	ÄWS des entwickelnden Follikels	Überexpression führt zu kurzen Haarfollikeln
Interleukin alpha , beta	Epidermis, IWS, ÄWS, Talgdrüsen, M. arektor pili	Hochregulation führt zu atrophischen Haarfollikeln, Inhibition des Haarwachstums in vitro
Cyclosporin A		Induziert Anagen, blockiert Beginn des Catagens
Retinoidrezeptoren RAR alpha, beta, gamma RXR alpha, beta	Papille und Epithel	RAR Agonisten induzieren Katagen RXR Agonisten stimulieren Haarwachstum
PTHrp	Epitheliale Anteile des Haarfollikels	Induziert Anagen, fördert das Haarwachstum
Prolaktin	Rezeptoren in Papille, Matrix, ÄWS	Stimuliert Beginn von Anagen und Katagen

17β-Östradiol		Blockiert Haarwachstum
Östrogenrezeptoren	Papillenzellen von Telogen-follikeln	Rezeptorantagonisten induzieren Anagen
Androgenrezeptoren	dermale Papillenzellen	

FGF: Follikle Growth Factor, KGF: Keratinocyte Growth Factor, IGF: Insulin Like Growth Factor, EGF: Epidermal Growth Factor, HGF: Hepatocyte Growth Factor, BMP: Bone Morphogenic Protein, PTHrp: Parathyroid Hormonr Related Peptide, ÄWS: Äußere Wurzelscheide, IWS: Innere Wurzelscheide

(modifiziert nach Stenn und Paus, 2001)

Es gibt verschiedene Theorien, die den Mechanismus des Haarzyklus zu beschreiben versuchen.

Chase und seine Anhänger vermuten eine Regulation des Haarzyklus über endogene mitotische Inhibitoren, die in der Anagenhaut vermindert und im Telogen vermehrt exprimiert werden (Inhibitions- Disinhibitions Theorie). Nach der Wulstaktivationshypothese basiert die intrinsische Regulation des Haarzyklus auf der Konstruktion eines neuen Anagenhaarbulbus aus proliferierenden Zellen, die aus den Stammzellen der Wulstregion der distalen äußeren Wurzelscheide hervorgehen (Cotsarelis, 1990). Des Weiteren gibt es die Theorie, dass die Zellen der dermalen Papille über die Expression von Wachstumsmorphogenen den Zyklus steuern oder eine angeborene „Haarzyklusuhr“ die einzelnen Zyklusphasen initiiert (reviewed in Stenn and Paus, 2001).

Aufgrund der Auswirkungen der Retinoide und TGF- β - Mitglieder auf den Haarzyklus und das Haarwachstum (Kapitel 2.4), fungieren diese wahrscheinlich als wichtige Signalmoleküle bei der Regulation des Haarzyklus.

2.7 Die humane Haarfollikelorgankultur

In der Haarforschung sind *in vitro* Kultivierungstechniken von großem Nutzen zur Untersuchung der unterschiedlichen Aspekte der Haarfollikelbiologie. Bei vielen dieser *in vitro* Modelle werden die Möglichkeiten der Haarforschung durch das geringe Wachstum und die kurze Überlebenszeit der Haarfollikel begrenzt.

Das 1994 durch Philpott et al. etablierte humane Haarfollikel *in vitro* Modell ermöglicht es, verschiedenste Substanzen auf ihre Effekte hinsichtlich Wachstum und Differenzierung am Haarfollikel zu testen. Hierzu werden aus humaner okzipitaler Kopfhaut adulte Anagenfollikel mit dermalen Papille und Bindegewebs-scheide isoliert und anschließend kultiviert. Nach dieser Methode können die einzelnen Haarfollikel unter optimalen Bedingungen bis zu 15 Tage im Kulturmedium gehalten werden, was die Beurteilung komplexer Interaktionen zwischen Keratinozyten und Fibroblasten, sowie deren Regulation durch Testsubstanzen erlaubt.

2.8 Das C57BL/6 Mausmodell in der Haarforschung

Da es bis heute noch nicht gelungen ist, einen Haarfollikel *in vitro* einen kompletten Haarzyklus durchlaufen zu lassen, konnte bei der Analyse der TGF- β 2 Expression während des adulten Haarzyklus nicht auf ein *in vivo* Modell verzichtet werden.

Das am besten charakterisierte *in vivo* Modell in der Haarforschung ist die C57BL/6 Maus (Stenn et al., 1993, Paus et al., 1994 a, b, c, Slominski et al., 1991, Seiberg et al., 1995). Durch Depilation der Telogenhaarfollikel können bei 6-8 Wochen alten C57BL/6 Mäusen alle Follikel angeregt werden in die Wachstumsphase, dem Anagen, überzugehen. Dieser folgende Haarzyklus ist hochgradig synchronisiert und dauert den definierten Zeitraum von 25 Tagen (**Abb. 10**).

Abhängig vom Zeitpunkt der Hautentnahme ist es bei diesem Modell möglich, die einzelnen Stadien des Haarzyklus *in situ* zu untersuchen. Vereinfacht wird dies dadurch, dass bei der C57BL/6 Maus die Produktion von Melanin streng an die Anagenphase gekoppelt ist. Schon makroskopisch erscheint die Maushaut im Telogen wegen der hellen Telogen-

follikel rosa farbend, im frühen Anagen färben sich die Follikel grau bis hin zu schwarz im Anagen VI und im Katagen wird die Haut wieder grau bis rosa (Abb. 10).

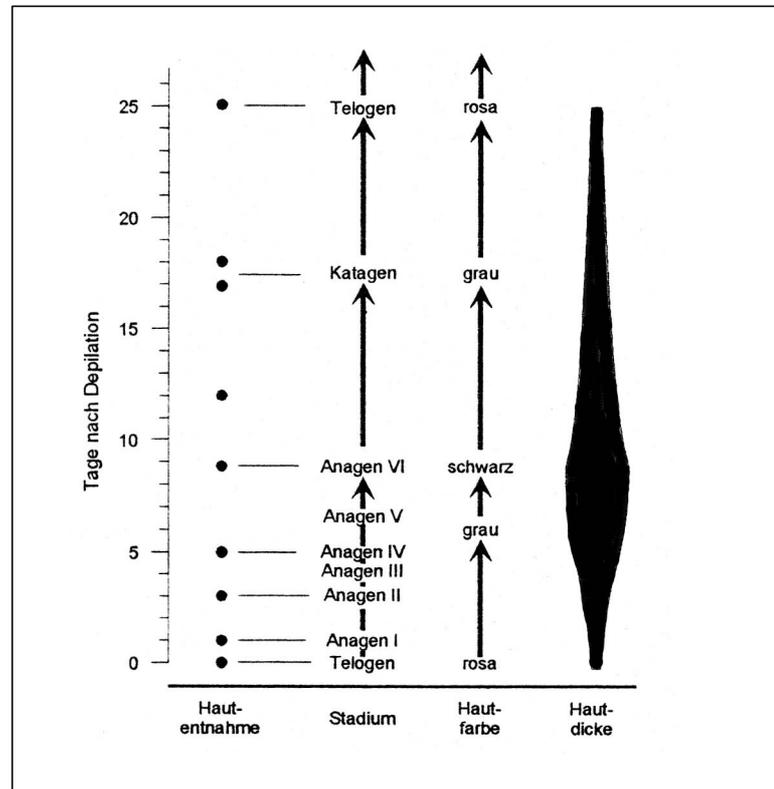


Abb. 10: Haut- und Haarparameterveränderungen während der depilations - induzierten Anagenentwicklung.

Assoziation des Zeitpunktes der Hautentnahme nach Depilation mit dem histologischen Haarfollikelstadium und der äußeren Erscheinung der Haut hinsichtlich Farbe und Durchmesser bei der C57BL/C6 Maus (nach Paus 1996).

3 Material und Methoden

3.1 Materialien, Reagenzien und Geräte

Haarfollikelorgankultur - Williams E- Medium, Biochrom

- Insulin, L-Glutamin, Hydrokortison, Penizillin, Streptomycin
- TGF- β 2, R&D Systems Deutschland
- Tretinoin (all-trans Retinoic Acid), Pierre Fabre Kosmetik, Frankreich
- Anti-TGF- β _{1,2,3} Antikörper, R&D Systems Deutschland
- 24-Loch-Kulturplatten, Nunc, Dänemark
- Pinzette anatomisch, Aeskulap GmbH, Tuttlingen
- „Watchmaker“-Pinzette, Wironit
- Einmalskalpelle, Braun, Melsungen

Gefrierschnitte

- Kryostat Mod. Leica 3050, Bensheim
- Glasobjektträger "Super Frost Plus", Fa. Menzel Gläser, Ratingen
- OCT - Einbettmedium, Tissue-Tek, Sakura, Niederlande
- Aceton

Färbungen

- Verwendete Primärantikörper:
 - TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β RII aus Kaninchen, Fa. Santa Cruz Biotechnology, Inc.
 - TUNEL Kit -ApopTag, Oncor Appligene, Heidelberg, Deutschland
 - Ki-67, Dianova, Hamburg
- Sekundärantikörper:
 - Ziege gg Kaninchen: Alexa Flour 488 (grün), Molecular Probes, USA
 - Ziege gg Maus: Rhodamin IgG, Jackson Immuno Research
 - Aqua dest., Klinikapitheke UKE. Hamburg
 - Phosphat gepufferte Saline (PBS), pH=7,4
 - Proteinblock, Fa. Immunotech

-
- Normalseren (Ziege, Maus), Jackson Immuno Research
 - DAPI (4,6 Diamidine-2 Phenyindol-Dihydrochlorid), Boehringer, Mannheim
 - Eukitt, Kindler GmbH, Freiburg
 - Diverses: Färbeküvetten, Deckgläser, Mayers Hämalaun
- Depilation
- Äther, Höchst AG, Frankfurt
 - 10%ige Ketaminhydrochlorid Lösung, Ketanest, Parke Davis Berlin
 - Bienenwachs, Aldrich Chemical Comp. Inc., Milwaukee, USA
 - Harz, Sigma Chemie, Deisenhofen
 - Metallspatel, Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe
 - klinische Einmalinjektionsspritzen, 1ml, Einmalnadeln 25 Gx1
- Hauternte
- Kleintierscherapparat, Fa. Eickemeyer, Tuttlingen
 - Präparierschere, Gr. 2, Fa. Aesculap GmbH, Tuttlingen
 - Pinzette anatomisch, Gr. 3, Fa. Aesculap GmbH, Tuttlingen
 - Einmalskalpelle, Braun, Melsungen
 - dünner Karton, aus handelsüblicher Kartei zugeschnitten
 - handelsübliche Aluminiumfolie, eine Rolle
 - Metallöffel, hergestellt aus einem Streifen Stahlblech
 - Einbettmedium für Gefrierhistologie OCT-Medium, Tissue-Tek, Sakura, Niederlande
 - flüssiger Stickstoff
- Auswertung
- Lichtmikroskop, Typ: Zeiss Axioskop, Fa Carl Zeiss, Oberkochen
 - Fotomikroskop, Leitz, Leica Vertrieb GmbH, Bensheim
 - Immunfluoreszenzmikroskop, Carl Zeiss, Oberkochen
 - Digitalkamera: Hamatsu, Japan
 - Dissektionsmikroskop, Carl Zeiss, Oberkochen
 - Farbfilm: Kodak 100 ASA, Schwarz-Weiß-Film: Agfa 50 ASA
- PCR
- RNeasy-RNA Isolationskit (Qiagen), Hilden, Deutschland
 - flüssiger Stickstoff
 - β -Mercaptoethanol

-
- Ethanol (absolut, Merck)
 - Handhomogenisator, Wheaton
 - 1st Strand cDNA-Synthesis Kit, Boehringer Mannheim, Deutschland
 - Custom Primers: Applied Biosystems, Deutschland
 - Real Time Taqman PCR: ABI PRISM 7700 Sequence System, Perkin Elmer Biosystems
 - SYBR Green Master Mix, Perkin Elmer Biosystems
 - dNTP
 - Qiaquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Deutschland
 - pGEMT- easy vector, Promega
 - Taq Polymerase, Quiagen, Deutschland
 - T4 DNA Polymerase, Roche
 - Automatischer thermaler Cyclor, Perkin Elmer
 - Agarose (Amresco)
 - Sequensanalyse: ABI 377 Autosequencer
 - Sonstiges: Eppendorf-GefäÙe, Elektrophorese Kammer (Biometra), Zentrifuge (Beckman)

3.2 Tiere

Für den depilations- induzierten Haarzyklus wurden adoleszente, 6-8 Wochen alte, weibliche, syngene C57 BL/6 Mäuse (15-20g schwer) benutzt.

Die Mäuse befanden sich in Gemeinschaftskäfigen in Gruppen von maximal fünf Tieren im Versuchstierhaus des Universitätsklinikums Eppendorf bei Licht-/Dunkelperioden von 12 Stunden und erhielten eine Alleindiät für Mäuse und Wasser ad libitum. Die Tierversuche wurden vom Amt für Gesundheit mit der Versuchsnummer 12/2000 genehmigt.

Damit sich die Haarfollikel der Versuchstiere im ruhenden Stadium des Haarzyklus zwischen G2 und G3 nach Dry (Dry, 1926) befanden, wurden nur adulte Mäuse im Telogen nach einem vollständig abgelaufenen, zweiten postnatalen Haarzyklus für die Studie zugelassen.

Wie schon in Kapitel 2.7. beschrieben, produzieren die Haarfollikel- Melanozyten der C57BL/6 Mäuse ausschließlich während des Anagens Pigmente. Daher kann der Ablauf des Haarzyklus bereits makroskopisch an der Farbänderung der Haut abgelesen werden. Siehe auch Abbildung 10 zur Visualisierung der makroskopischen Veränderungen und ihre Assoziation mit dem Ablauf der Stadien des Haarzyklus bei C57BL/6 Mäusen.

3.2.1 *Mechanische Anageninduktion durch Depilation*

Die Versuchstiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 0,5 ml 10% igen Ketamin- Hydrochloridlösung (Ketanest) kurzzeitig anästhesiert. Ketanest wurde wegen seiner relativ großen therapeutischen Breite, der sicheren und einfachen Anwendungstechnik, fehlender atemdepressorischer Wirkung und nur sehr selten auftretender allergischer Reaktionen verwendet.

Es wurde ein Gemisch aus Bienenwachs und Harz zu gleichen Anteilen (1:1) hergestellt und bei 45°C geschmolzen. Nach leichtem Abkühlen wurde die Masse von kranial nach kaudal gleichmäßig auf die Rückenhaut der anästhesierten Tiere mit einem erwärmten Glasspatel aufgetragen. Bei der empfindlichen Nacken und Schwanzregion wurde besonders darauf geachtet, keine Verbrennungen zu setzen. Nach Erkalten wurde die Harz-

Wachs Mischung samt der darin fest haftenden Haarschäfte manuell entfernt. Unter Verwendung dieser Technik sind bei sorgfältiger Durchführung keine äußerlichen Entzündungszeichen feststellbar und die Depilation bewirkt eine genau berechenbare Induktion der Anagenphase des Haarzyklus (Chase, 1953, Straile et al., 1961, Paus et al., 1990). Nach ca. 17 Tagen setzt spontan und synchronisiert die Katagenentwicklung ein.

3.2.2 *Hautentnahmetechnik und Fixation*

Bei den so vorbereiteten Mäusen wurde die Gewebeentnahme auf Tage festgelegt, die die definierten Stadien Telogen, Anagen IV, Anagen VI und Katagen VII erfassen. Die Auswahl von jeweils fünf Mäusen war rein zufällig. Für Tag 0 (Telogen) wurde die Haut von fünf unbehandelten, d.h. nicht depilierten Tieren, geerntet.

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Nachdem die Rückenhaut mit einer Präparierschere entfernt wurde, wurde sie auf einen Karton aufgespannt. Ca. 1 cm über dem Schwanzansatz in der Vertebrallinie der Körperlängsachse wurde ein 0,5 x 1cm großes Hautstück entnommen. Die Oberseite wurde mit GSV Medium bestrichen, sandwichartig umgeklappt (Paus et al., 1994 a + b) und sofort in flüssigem Stickstoff eingebettet. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Kryoblöcke bei -80°C gelagert.

3.3 Die humane Haarfollikel Organkultur

3.3.1 Isolation humaner Kopfhauthaarfollikel

Hautstücke aus okzipitaler Kopfhaut von männlichen Probanden zwischen 25 und 55 Jahren wurden nach Entnahme gekühlt (4 C°) und in Williams E Medium ohne Zusätze max. 24h gelagert. Es handelte sich hierbei um überschüssige Hautstücke nach Haartransplantationen der Firma MeditraGmbH, Gräfelfing.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Stücke unter sterilen Bedingungen in Quadrate von ca. 1,50 x 0,5 cm Kantenlänge (epidermissseitig) zugeschnitten (**Abb. 11**).

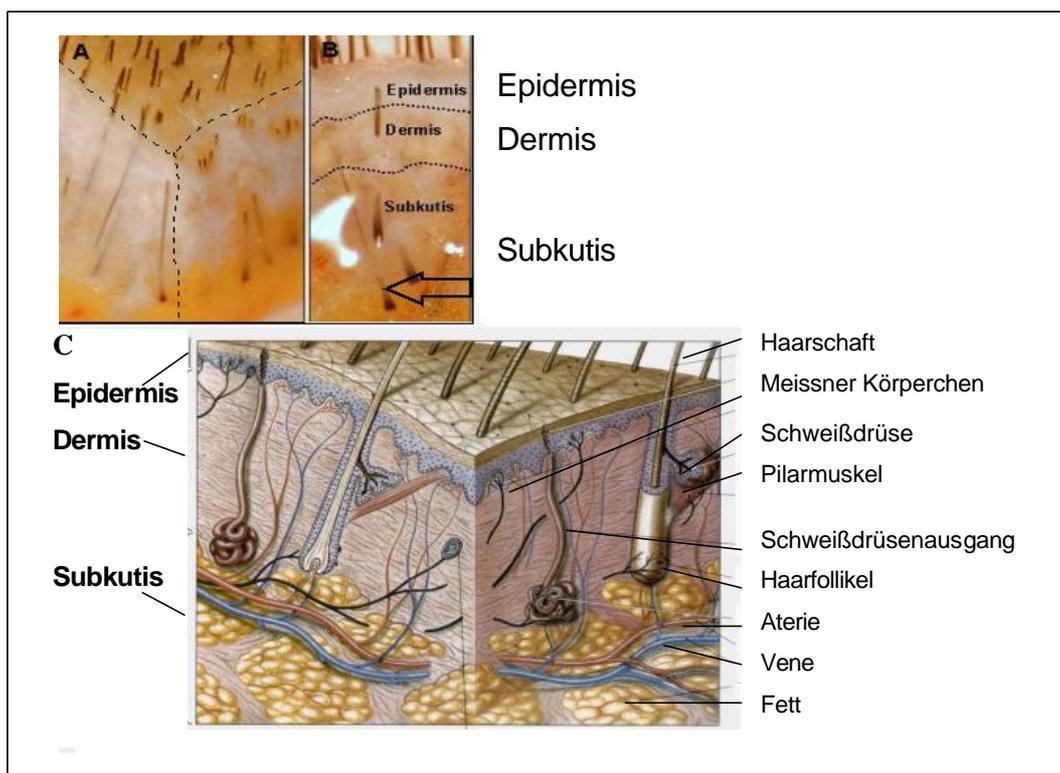


Abb. 11 A: Vollhautbiopsie aus der humanen Kopfschwarte unter dem Dissektionsmikroskop

A: Ansicht eines ca. 1,50 x 0,5 cm großen Hautwürfels von der Ecke und **B:** Ansicht von der Seite. **C:** Schematische Darstellung der anatomischen Situation in A und B (aus Weitz 1998, Atlas der Anatomie).

Als nächster Schritt wurde die Epidermis und Teile der Dermis unter einem Dissektionsmikroskop chirurgisch von der Subkutis abgetrennt.

Dann wurde das Hautstück mit einer Pinzette seitlich sanft zusammengedrückt, so dass die Haarfollikel leicht aus der sie umschließenden restlichen Dermis und Subkutis herausgedrückt wurden. Auf diese Art konnten die Haarfollikel samt zarter Wurzelscheide mit einer „Watchmaker“ Pinzette distal vorsichtig umfasst und herausgezogen werden (**Abb. 12**).

Die isolierten Haarfollikel wurden in frisches Williams E Medium überführt und darin mehrfach unter sterilen Bedingungen gewaschen. Abschließend wurden die zerstörten Haarfollikel aussortiert und nur gerade, mindestens 3 mm lange Anagenfollikel für die Kultur weiterverwendet.

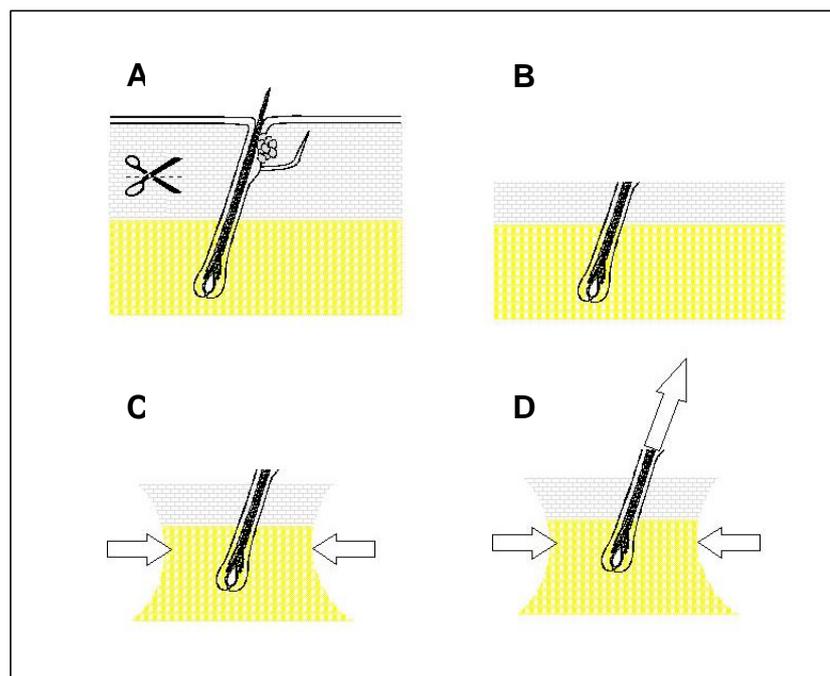


Abb. 12: Haarfollikelisolation modifiziert nach Philpott (1994)

A+B: Teile der Dermis werden mit einem Skalpell entfernt. **C:** Die verbleibenden Stücke werden seitlich leicht mit einer Pinzette zusammengedrückt. **D:** Das herausragende distale Haarfollikelende wird vorsichtig mit einer Watchmaker-Pinzette entfernt.

3.3.2 *Kultivierung humaner Haarfollikel*

Je drei Haarfollikel wurden randomisiert in ein Well einer 24-Well Platte mit 500 μ l Williams E Medium gegeben, welches mit 2 mM L-Glutamin, 10 ng/ml Hydrokortison, 10 μ g/ml Insulin, 100 units/ml Penizillin und 100 μ g/ml Streptomycin supplementiert wurde (Basalmedium).

Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ über 4 bis 6 Tage.

Den Testgruppen wurden folgende Substanzen in verschiedenen Konzentrationen ins Kulturmedium hinzugefügt:

- TGF- β 2 (10ng/ml und 25ng/ml)
- all-trans Retinoic Acid (Tretinoin) ($*10^{-6}$ M, $*10^{-8}$ M und $*10^{-11}$ M)
- all-trans Retinoic Acid (Tretinoin) plus TGF- $\beta_{1,2,3}$ neutralisierenden Antikörper (10 μ g/ml)

Die Kontrollgruppen wurden in dem oben beschriebenen Basalmedium ohne Zusätze kultiviert. Das Medium inklusive Testsubstanzen wurde jeden 2. Tag gewechselt, der TGF- $\beta_{1,2,3}$ neutralisierende Antikörper wurde jeden Tag auf die entsprechende Testgruppe pipettiert.

Am 4. Tag wurde für eine RNA Extraktion die Kultur beendet oder am 6. Tag für histologische Untersuchungen. Nach dem Entfernen der Haarfollikel aus den Wells wurden diese 3 x in sterilem PBS gewaschen. Dann wurden für die PCR jeweils 10 Haare in Eppendorf-Tubes zur RNA Extraktion bei – 80°C eingefroren. Für das Anfertigen von Kryoschnitten wurden jeweils 3 Haare in einem Block mit OCT- Medium bedeckt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren (-80°C).

3.3.3 *Fotodokumentation und Statistische Auswertung*

Die Länge der Haarschäfte wurde an Tag 0, 2, 4 und 6 mit Hilfe eines Messokulares am Dissektionsmikroskop gemessen und dokumentiert. Außerdem wurde am Inversen Mikroskop jeder Follikel fotografiert und das Haarzyklusstadium sowie andere morphologische Auffälligkeiten, z.B. Zeichen der Dystrophie dokumentiert.

Auf diese Art konnte das Wachstum der Haarschäfte in mm pro Tag für jeden Haarfollikel berechnet werden. Alle Follikel einer Gruppe wurden gepoolt und es wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung mit Hilfe eines Softwareprogrammes (SPSS) zur statistischen Berechnung erhoben. Signifikante Unterschiede zwischen Test- und Kontrollgruppen wurden für die einzelnen Tage mit dem Mann-Whitney U Test berechnet.

3.3.4 Die Haarzyklusberechnung

Zur Analyse und Visualisierung der Haarzyklusstadien in einem Graphen wurde der von Maurer et al. (1997) beschriebene Hair Cycle Score (HCS) benutzt.

Jeder Haarfollikel wird an Tag 0, 2, 4 und 6 nach morphologischen Kriterien einem Haarzyklusstadium zugeordnet: das Stadium Anagen erhält den Wert = 100, frühes Katagen = 200 und spätes Katagen = 300. In einem Graphen zeigt so die Größe des Zahlenwertes in der y-Achse das Haarzyklusstadium und die x-Achse die Tage in der Organkultur an. Mit dieser Zahlenzuordnung ist es beim HCS nun möglich Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie signifikante Unterschiede mit dem Mann-Whitney U Test zu berechnen.

3.4 Färbungen

3.4.1 Herstellung der Kryostatschnitte

Die Gefrierschnitte wurden an einem Kryostaten (Leica CM 3050) im immunhistologischen Labor der Hautklinik des Universitätsklinikums Eppendorf bei einer Verarbeitungstemperatur von ca. -25 °C aus den Kryoblöcken angefertigt.

Bei einem longitudinalen Anschnitt der Haarfollikel ist die Differenzierung der einzelnen Stadien des Haarzyklus und die Zuordnung der zu untersuchenden Antigen-Antikörper Komplexe zu den verschiedenen Strukturen des Haarfollikels am besten möglich. Daher

musste bei dem Aufblocken der Hautproben und der einzelnen Haarfollikel vor allem auf die Schnittebene des Messers geachtet werden, damit die Follikel im Längsschnitt dargestellt werden konnten. Als Glasobjektträger wurden beschichtete Super-Frost Plus (Menzel) benutzt. Die 6-7 μ m dicken Schnitte wurden bei Raumtemperatur zehn Minuten luftgetrocknet und bis zur Färbung bei -80°C gelagert.

3.4.2 TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF-RII Immunfluoreszenz- Färbung

Da TGF- β im Verlaufe der Evolution sehr hoch konserviert wurde, sind seine humanen und murinen Aminosäuresequenzen so ähnlich, dass seine Antikörper sowohl an humanem als auch an murinem Gewebe verwendet werden kann.

Zur Darstellung der TGF- β 1-, TGF- β 2- und TGF-RII- Expression im Haarfollikel wurde die Methode der Immunfluoreszenz- Markierung gewählt (**Abb. 13**).

Das Prinzip dieser Färbung besteht darin, dass der Primärantikörper an das spezifische Antigen im Gewebeschnitt bindet (**1**). Ein sekundärer, immunfluoreszenz- markierter Antikörper wiederum bindet an den Primärantikörper (**2**). Im Fluoreszenzlicht beginnt dieser Farbstoff zu leuchten, so dass die gesuchten Antigen-Antikörper-Komplexe unter einem Fluoreszenzmikroskop dargestellt und lokalisiert werden können.

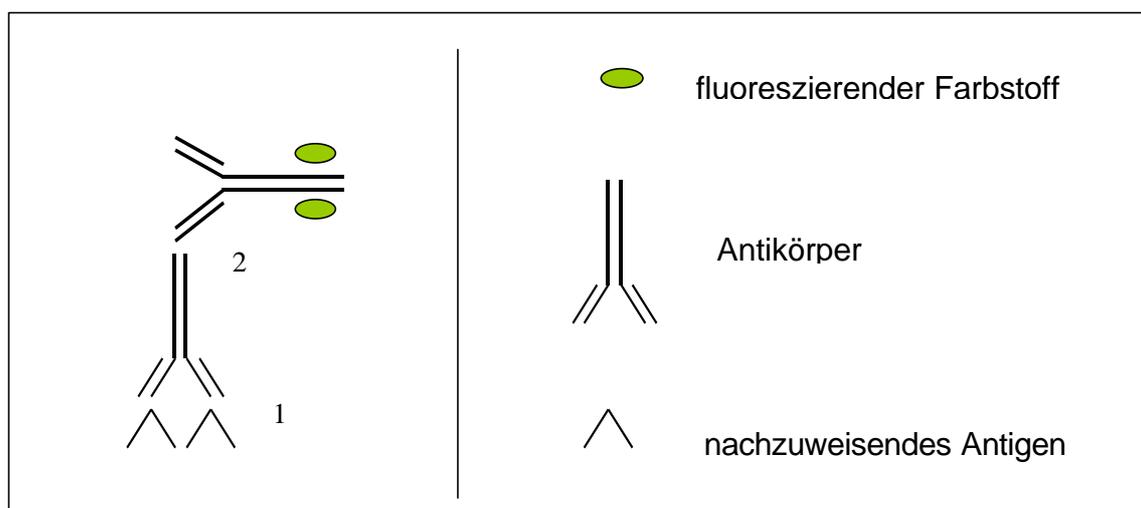


Abb. 13: Methode der Immunfluoreszenz-Markierung (modifiziert nach Santa Cruz Biotechnology)

Die Kryoschnitte wurden nach Entnahme aus der Gefriertruhe zuerst 15 min luftgetrocknet, dann 10 min bei -20°C in Aceton fixiert und 3 x 5 min in PBS gewaschen.

Um ein Verlaufen der Lösungen zu verhindern, wurden die Gewebeschnitte vor Beginn der Behandlung mit einem Pap- Pen umrandet. Während der gesamten Färbung wurde außerdem darauf geachtet, dass die Gewebeschnitte nicht austrocknen.

Auf die vorbereiteten Schnitte wurde nun 10% iges Ziegennormalserum in PBS pipettiert und für 20 min Raumtemperatur inkubiert, um spätere unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers zu unterdrücken.

Nach 3 maligem Waschen in PBS konnten die Primärantikörper TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β RII (gereinigter Kaninchen Antikörper gegen Maus, Ratte und Mensch, Santa Cruz) aufgetragen werden. TGF- β 1 und TGF- β 2 Primärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:50 und TGF- β RII Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 plus jeweils 2% Ziegennormalserum als Blockade unspezifischer Bindungen verwendet und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Danach wurden die Objektträger gründlich gewaschen (3x5 min in PBS). Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Ziege gegen Kaninchen (Alexa Flour 488, Molecular Probes) mit einer Verdünnung von 1:200 in PBS plus 2% Ziegennormalserum für 50 min bei Raumtemperatur. Bei den Mausgewebeschnitten wurde bei diesem Schritt zusätzlich 4% Mausserum hinzugefügt, um unspezifische Bindungen noch weiter zu unterdrücken.

Am Ende wurde nach 3 maligem Waschen eine Gegenfärbung mit DAPI 1/5000 (Boehringer, Mannheim) durchgeführt, welche die Zellkerne im Fluoreszenzlicht blau darstellt. Zum Schluss wurden die Gewebeschnitte wieder gewaschen (3x5min) und in Elvanol eingedeckt.

Die immunfluoreszenz- markierten Schnitte wurden bei -20°C in Dunkelheit aufbewahrt, da sie sonst ausbleichen und an Intensität verlieren.

Kontrollen:

Negativkontrollen wurden mit 10% Ziegennormalserum in PBS anstelle des Primärantikörpers durchgeführt. Als Postivkontrolle diente die Haut selbst, da Immunreaktivität für TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β RII in der Haut bereits nachgewiesen war (Schmid et al., 1993, Wollina et al., 1996, Frank et al., 1996)

3.4.3 *Ki 67/-TUNEL Immunfluoreszenz-Doppelfärbung*

Um die apoptotischen Zellen zu bestimmen, wurde ein etablierter, kommerziell erhaltbarer TUNEL Kit (ApopTag, Intergen) verwendet. Bei dieser Methode werden spezifisch apoptotische Zellen ausfindig gemacht und von nekrotischen Zellen unterschieden. Die bei Apoptose entstehenden DNA Fragmente werden durch das Enzym Terminale Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) und zugegebene Fluoreszein markierte Nukleotid-Triphosphate wieder verbunden und so im Fluoreszenzlicht dargestellt.

Zur Feststellung der proliferierenden Zellen wurde die Ki-67 Methode verwendet. Dieses Kernprotein findet man in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2- und M-Phasen), aber nicht in ruhenden Zellen (G0-Phase).

Um in einem Schnitt sowohl Apoptose als auch Proliferation beurteilen zu können, wurden beide Immunfluoreszenzfärbungen (siehe auch Abb. 13) kombiniert.

Begonnen wurde mit dem Protokoll der TUNEL Färbung. Dazu wurden die Gefrierschnitte zuerst 10min luftgetrocknet und 10 min in 1% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Nach 2 X 5 min Waschen in PBS folgte eine Postfixierung in Ethanol : Eisessig (CH₃COOH) im Verhältnis 2:1 für 5 min bei -20°C. Dann wurden die Schnitte wieder 2 x 5 min in PBS gewaschen und der Äquilibrationpuffer für 1-4 min aufgetragen. Dieser wurde danach vorsichtig abgeschlagen und mit einem Reaktionsgemisch von 30% TdT-Enzym und 70% Reaktionspuffer für 60 min bei 37°C inkubiert. Ein 10 min Ruhen in einem Stop-Wasch-Puffer beendete diesen Vorgang. Nun wurden die Objektträger wieder 3 x 3 min in PBS gewaschen bevor der Sekundärantikörper Anti Digoxigenin-Fluoreszein (47%) und Blocking Solution (53%) aufpipetiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Mit einem 3 maligen Waschen von 5 Minuten Dauer in PBS wurde die TUNEL Färbung abgeschlossen.

An den gleichen Schnitten wurde nun die Ki-67 Färbung durchgeführt, wobei bei möglichst wenig Licht gearbeitet wurde, damit die TUNEL- Färbung nicht ausbleicht. Zuerst wurde mit 10% Ziegennormalserum in PBS für 20 min, dann mit Proteinblock für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen zu unterdrücken. Danach wurde der Primärantikörper Ki-67 (Maus gegen Mensch) mit einer Verdünnung von 1/20 und 2% Ziegennormalserum in PBS aufgetragen und in einer dunklen, feuchten Kammer bei 4°C über Nacht inkubiert. Nachdem die Schnitte am nächsten Morgen 3 x 7 min gewa-

schen wurden, konnte der Sekundärantikörper (Ziege gegen Maus, Rhodamine) mit einer Verdünnung von 1/200 und 2% Ziegennormalserum aufpipettiert werden. Nach 40 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Objektträger wieder gewaschen (3 x 5 min in PBS) und mit DAPI 1/5000 gegengefärbt, bevor sie mit Elvanol eingedeckt wurden.

3.4.4 Hämalaun - Eosin Färbung

Zur histologischen Darstellung der kultivierten humanen Haarfollikel und zur morphologischen Beurteilung des Haarzyklusstadiums wurde jeweils ein Anschnitt der Haarfollikel H&E gefärbt.

Die aus der Gefriertruhe entnommenen Kryoschnitte wurden zuerst 15 min an der Luft getrocknet. Die Fixierung erfolgte 10 min bei -20°C in Aceton. Nach 3 x 2 min Waschen in Aqua dest. kamen die Objektträger für 15 min in Hämalaun (nach Mayer), welches die Zellkerne blau anfärbt. Dann wurden sie für 10 min in Leitungswasser gebläut, bevor sie für 2 min in eine 1:3 verdünnte Eosin Stammlösung mit 3 Tropfen Eisessig gegeben wurden, welches dem Zytoplasma eine rötliche Farbe verleiht. Es folgte 3 x 1 min Waschen in Aqua dest. und eine Dehydrierung über Ethanol (50%, 70%, 96%, 99%) und Xylol, um die Schnitte abschließend mit Eukitt einzudecken.

3.4.5 Histologische Auswertungstechnik

Die lichtmikroskopische Analyse erfolgte an einem Zeiss Axioskop (Carl Zeiss, Oberkochen) mit Fotoaufsatz. Die H&E gefärbten humanen Haarfollikeln wurden bei 100-400 facher Vergrößerung nach morphologischen Kriterien in Anagen, frühes Katagen und spätes Katagen eingeteilt und fotodokumentiert.

Die immunfluoreszenz- gefärbten Gewebeschnitte wurden unter einem Immunfluoreszenzmikroskop untersucht und mit einer Digitalkamera fotodokumentiert.

Die TGF- β 2 Expression während des murinen Haarzyklus wurde an fünf verschiedenen Mäusen pro Stadium an jeweils mindestens 20 Follikeln pro Schnitt überprüft, und die am eindeutigsten reproduzierbaren Immunreaktivitätsergebnisse wurden in schematisierten Haarzyklusgraphiken (vgl. **Abb. 9**) protokolliert.

Bei den Ki-67/TUNEL gefärbten humanen Haarfollikeln wurden pro Gruppe bei mindestens 30 Haarfollikeln die apoptotischen und proliferierenden Zellen im Haarbulbus blind ausgezählt und repräsentative Follikel wurden fotografiert.

Die dokumentierten Ergebnisse wurden in Statistikprogramme eingegeben, um Mittelwerte und Standardabweichungen zu berechnen und mit Hilfe des Mann-Whitney- U Testes signifikante Unterschiede zu ermitteln.

3.5 Polymerasekettenreaktion

3.5.1 RNA Extraktion

Zur Isolation der gesamten RNA aus humanen Haarfollikeln wurde das RNeasy- RNA-Mini Isolationskit (Qiagen) benutzt. Alle Schritte des Versuchsprotokolls wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und es wurden RNase freie Materialien und Lösungen verwendet. Auf RNase freies Arbeiten wurde geachtet (sterile Handschuhe, spezieller Arbeitsplatz). Die humanen Haarfollikel wurden 4 Tage wie oben beschrieben kultiviert, in sterilem PBS 3 x gewaschen und in flüssigem Stickstoff auf -80°C gefroren und bei dieser Temperatur gelagert. Jeweils 10 Haarfollikel pro Gruppe wurden in einen konischen Handhomogenisator (Wheaton) in 600 μl Buffer RLT (Kit) und 6 μl β -Mercaptoethanol mit 10 Umdrehungen homogenisiert, bis keine intakten Haarstrukturen mehr zu sehen waren.

Das Zell-Lysat wurde in einer Tischzentrifuge für 3 min. bei 13000 rpm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert. Der Überstand und 600 μl 70% ige Ethanol wurden in ein frisches Zentrifugenröhrchen gefüllt und durch Pipettieren gut vermischt. 600 μl wurden davon nacheinander in ein spezielles RNeasy spin column Zentrifugensäulchen abgenommen und bei 13000 rpm für 15 sek zentrifugiert. Das Filtrat wurde anschließend

verworfen und die Säule zweimal mit 700µl RPE Puffer (Kit) für 15 sek und mit weiteren 500µl RPE-Puffer noch mal für 2 min. bei 13000 rpm gewaschen. Dann wurde die an dem Silikagel in der Säule gebundene RNA mit 30 µl RNase freiem Aqua dest. eluiert (1 min bei 13000 rpm).

Es wurden RNA-Proben von jeweils drei Patienten aus unabhängigen Ansätzen analysiert.

3.5.2 *Reverse Transkription*

Da für die Polymerasekettenreaktion DNA benötigt wird, wurde die gereinigte Gesamt-RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. (1st Strand cDNA-Synthesis Kit (AMV), Boehringer Mannheim). Dieser Vorgang geschieht mit Hilfe der Reversen Transkriptase, welche eine virale RNA-gesteuerte DNA-Polymerase ist.

Folgende Komponenten wurden zu einer Lösung zusammengefügt:

- 2,0µl Reaktionspuffer
- 4,0µl 25mM MgCl₂
- 2,0µl Deoxynucleotide Mix
- 2,0µl Oligo-p(dT)₁₅Primer
- 1,0µl RNase-Inhibitor
- 0,8µl AMV Reverse Transcriptase
- 8,2µl der vorher gewonnenen RNA

Für eine gleichmäßige Anlagerung der RNA wurde die RNA-Lösung bei 25°C im Wasserbad für 10 min erwärmt und anschließend bei 42°C für 60 min revers transkribiert. Zur RNA/cDNA-Hybriddenaturierung und um die vorhandenen Enzyme zu inaktivieren, wurden die Proben für 5 min auf 99°C erhitzt und anschließend bei -20°C gelagert.

3.5.3 *Real Time (TaqMan) Polymerase Kettenreaktion*

Die Mitte der Achtziger Jahre entwickelte Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine schnelle und sensitive Methode der DNA - Analytik. Es handelt sich dabei um eine durch spezifische Primer- definierte enzymatische *in vitro* Replikation, bei der durch sich wiederholende Zyklen eine annähernd exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht wird. Die Real Time TaqMan PCR ist eine optimierte, sensitivere Form der konventionellen PCR, bei der Amplifikation und Nachweis des PCR Produktes simultan in einem Reaktionsgefäß ermöglicht werden.

Mit Hilfe des Enzymes DNA Polymerase wird komplementäre DNA von einer spezifischen Region der revers transkribierten DNA synthetisiert. Als Ansatzstelle für den Start dieser Reaktion dienen komplementär zu den begrenzenden Sequenzen synthetisierte Oligonukleotid-Primer (Applied Biosystems; Germany).

Der erste Schritt der Polymerasekettenreaktion ist die Separation der doppelsträngigen DNA durch Erhitzen. Daraufhin lagern sich die beiden Oligonukleotidprimer an ihre komplementäre DNA Sequenz am 3` Ende von jedem Strang an. Dabei dienen beide DNA Stränge als Vorlage zur Neusynthese einer DNA Sequenz. Durch erneutes Erhitzen werden originale DNA und neusynthetisierte DNA separiert, welche dann für weitere Zyklen zur Verfügung steht. Auf diese Art synthetisiert die DNA Polymerase neue, mit der Zielsequenz identische doppelsträngige DNA Fragmente.

Die Oligonukleotidprimer wurden aus einer Datenbank (GeneBank, Internetzugang: NCBI) entnommen und mit einem PC-Programm (Primer Express) optimiert.

Folgende Primer wurden benutzt. Jeder Primer war auf einem unterschiedlichen Exon lokalisiert, so dass die Möglichkeit einer Amplifikation von kontaminierter humaner DNA ausgeschlossen werden konnte (**Abb. 14**).

human TGF- β 2 forward	5'-AAA GTG GAC GTA GGC AGC AAT TA-3'
human TGF- β 2 revers	5'-GAC CAA CCG GCG GAA GA-3'

human GAPDH forward 5'-TGG GTG TGA ACC ATG AGA AG-3'
 human GAPDH revers 5'-GCT AAG CAG TTG GTG GTG C-3'

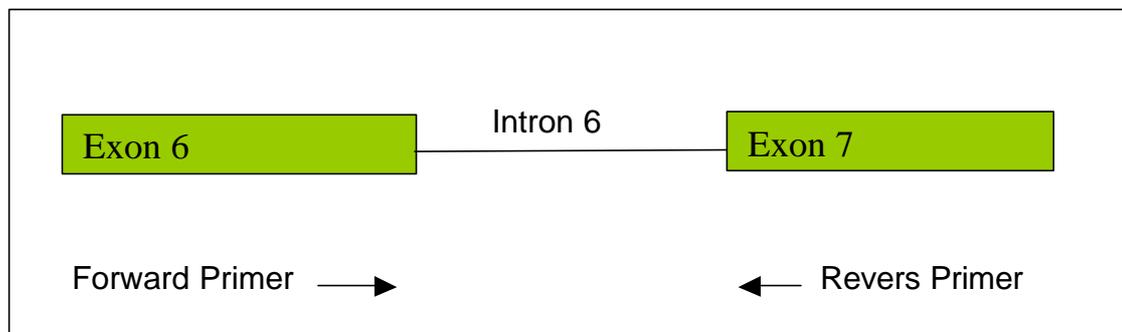


Abb. 14: Humanes TGF-β2

Das benutzte PCR-Gerät "ABI Prism 7700 Sequence System" ermittelt die PCR Produkte mit Hilfe des SYBR Green Master Mixes (Perkin Elmer Biosystems), welcher die Polymerase, SYBR Green Fluorescence, Reaktionspuffer und dNTP enthält.

Der Nachweis des PCR-Produktes verläuft bei der TaqMan PCR simultan zur Amplifikation mittels einer dem Reaktionsgemisches zugefügten fluoreszenz-markierten (SYBR Green) Sonde, deren Emissionstärke mit der Anzahl der PCR-Produkte korreliert und welche im Reaktionsgefäß des TaqMan Gerätes gemessen wird.

Um die möglichen Schwankungen der isolierten RNA Menge bei der quantitativen Bestimmung der TGF-β2 Expression in den Kontrollhaarfollikeln und den RA*10⁻⁸ M behandelten Haarfollikeln zu berücksichtigen, wurden die beiden Transkripte jeweils mit der vorher genau definierten GAPDH Expression aus demselben Reaktionsansatz verglichen.

Auf diese Art wurden drei cDNA Proben von Kontrollhaarfollikeln und Retinoid-behandelten Haarfollikeln aus unabhängigen Ansätzen analysiert.

Die Optimierung der Primer Konzentrationen für humanes TGF-β2 ergab: Forward Primer 300 nM, Reverse Primer 300 nM und für GAPDH: Forward Primer 50 nM, Reverse Primer 300 nM.

TGF- β 2 : Denaturation bei 95°C für 15 sek, Anlagerung und Amplifikation bei 60°C für 1 min über 40 Zyklen

GAPDH : Denaturation bei 95°C für 15 sek, Anlagerung und Amplifikation bei 60°C für 1 min über 40 Zyklen.

Als Positivkontrolle wurde Plasmid DNA mit TGF- β 2 Fragment verwendet.

Das PCR Produkt wurde durch eine Sequenzanalyse nach der PCR Reaktion verifiziert.

3.5.4 Herstellung der Positivkontrolle

Zur Herstellung der Positivkontrolle wurde zuerst die hTGF- β 2 Sequenz in einer konventionellen PCR amplifiziert und über folgende Schritte an einen Vektor gebunden in E.coli transformiert.

1. PCR-Amplifikation:

5 μ l PCR Puffer

2 μ l dNTP

1 μ l cDNA (humane Haarfollikel)

1 μ l hTGF β 2-F Primer (50pmol) (Sequenz: 5'-CCC TGC TGT GCT GAG TGT C-3')

1 μ l hTGF β 2-R Primer (50pmol) (Sequenz: 5'-CCT GCT GCA CTT TTG TAC CA-3')

0,5 μ l Taq Polymerase (Qiagen)

39,5 μ l Aqua. Dest.

Denaturation der Matrizen DNA 5 min bei 94°C, dann 94°C (30 sec), 57°C (1 min), 72°C (1 min) über 40 Zyklen, abschließend 10 min bei 72°C .

2. Purifikation des PCR-Produktes

Nachdem die PCR in 1,2 % Agarose Gel (Fa. Sigma) gelaufen war, wurde die TGF- β 2 Bande der erwarteten Größe (400 Basenpaare) mit einem Skalpell herausgeschnitten und

mit dem Qiaquick Gel Extraktion Kit (Fa. Qiagen) gemäß dem vom Hersteller angegebenen Protokoll gereinigt.

3. Bindung des PCR Produktes an einen pGEMT-easy vector (Fa. Promega)

Dazu wurden folgende Reagenzien vermischt

7µl	PCR Produkt
1µl	10x Puffer
1µl	pGMT-easy vector (enthält Ampicillin Resistenz)
1µl	T4 DNA Polymerase (Roche)

und 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

4. Transformation von E.coli

1µl des an den pGMT-easy vector gebundene PCR Produktes wurde mit 100µl DH5alpha E.coli Zellen (Stratagene) vermischt und 30 min auf Eis, 45sec. in ein 42°C warmes Wasserbad und dann wieder 5 min auf Eis gelegt. Nachdem 1 ml LB Medium hinzugefügt wurde, wurde das Gemisch in ständiger Bewegung bei 37°C für 60 min inkubiert. Die E.coli wurden dann über Nacht auf einer Ampicillin LB Agar Platte mit IPTG und X-gal (Fa. Sigma) ausgestrichen und kultiviert.

5. Amplifikation und Isolation der Plasmid DNA

Die weißen Kolonien der Agar Platte wurden aufgenommen und in 3ml LB Medium mit Ampicillinin bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde das gesamte Medium in einem 2ml Zentrifugenröhrchen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Plasmid-DNA der verbleibenden Bakterien wurde mit Hilfe eines Plasmid Mini Kits (QIAGEN) gemäß des Protokolls des Herstellers isoliert.

Um sicherzustellen, dass sich wirklich die humane TGF-β2 Sequenz in der Plasmid DNA befindet, wurde abschließend eine Sequenzanalyse im Institut für Zellbiochemie, Universitätsklinikum Eppendorf, durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Haarzyklusabhängige Verteilung von TGF- β 2 während des adoleszenten murinen Haarzyklus

Während des gesamten depilations- induzierten Haarzyklus zeigte sich TGF- β 2 Immunreaktivität in der Epidermis und den Talgdrüsen. Im Gegensatz dazu konnte in der dermalen Papille, der Dermis und der inneren Wurzelscheide im Verlauf des murinen Haarzyklus keine TGF- β 2 Expression nachgewiesen werden (**Abb. 15**).

Am Tag 0 des depilations- induzierten Haarzyklus, an dem sich die Haarfollikel noch im Telogen, dem Ruhestadium befanden, zeigten die Keratinozyten der äußeren Wurzelscheide entlang des Haarschaftes und einzelne Keratinozyten um das Kolbenhaar herum deutliche TGF- β 2 Immunreaktivität (**Abb. 15. a**).

Im Verlaufe des Anagens III-IV (**Abb. 15. b**) konnte eine Zunahme der TGF- β 2 Expression in den suprabasalen Keratinozyten der äußeren Wurzelscheide nachgewiesen werden, welche mit dem Wachstum der sich darunter entwickelnden inneren Wurzelscheide und des Haarschaftes korrelierte. Der Haarbulbus mit seinen Anteilen der äußeren Wurzelscheide war TGF- β 2 negativ.

Im Anagen VI durchbrach der Haarschaft die Oberfläche der Epidermis. In diesem Stadium zeigten neben der Epidermis und den Talgdrüsen nur noch die Keratinozyten der proximalen äußeren Wurzelscheide eine starke TGF- β 2 Immunreaktivität (**Abb. 15. c**).

Während der Haarfollikelregression (Katagen I-VIII nach Straile et al., 1961) war eine TGF- β 2 Färbung in den Keratinozyten entlang der sich bildenden Germinativkapsel erkennbar. Außerdem wurde TGF- β 2 im epitheliale Strang der Katagen VII-VIII Haarfollikel exprimiert (**Abb. 15. d**). Im darauf folgenden Telogen zeigte sich erneut eine TGF- β 2 Expression in der äußeren Wurzelscheide der infundibularen Region und um das Kolbenhaar, sowie in der Epidermis und der Talgdrüse.

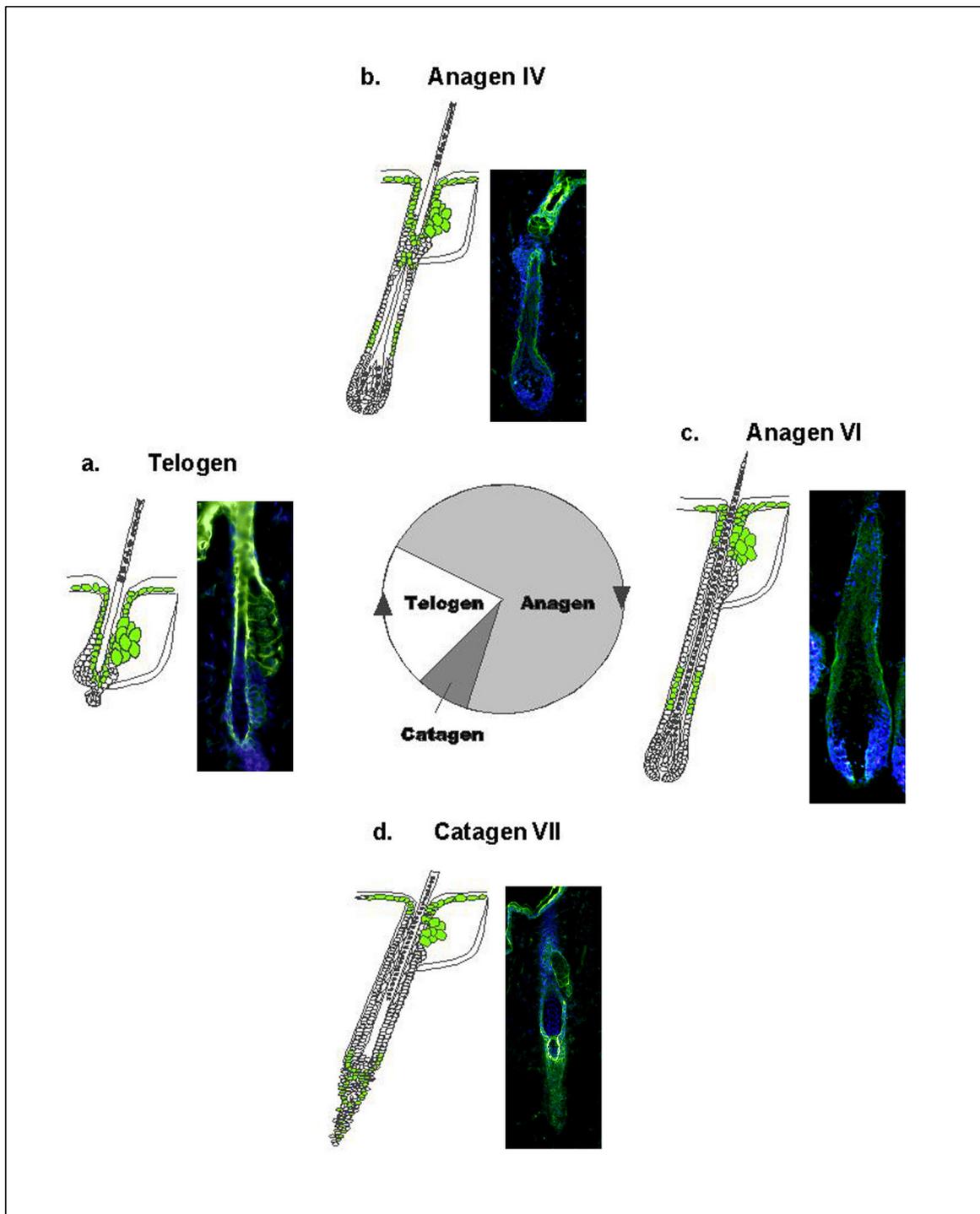


Abb. 15: TGF-β2 Immunfluoreszenzfärbung während verschiedener Stadien des murinen Haarzyklus

Bei den mittels Immunfluoreszenz gefärbten murinen Haarfollikeln ist die TGF-β2 Expression grün und die Zellkerne sind blau dargestellt. Den fotografierten humanen Haarfollikeln ist eine schematische Darstellung des entsprechenden Haarzyklusstadiums zugeordnet, um das TGF-β2 Expressionsmuster zu verdeutlichen.

4.2 Effekte von TGF- β 2 und Tretinoin auf humane Haarfollikel *in vitro*

4.2.1 TGF- β 2 induziert Katagen und vermindert das Haarfollikellängenwachstum *in vitro*

Wie bereits von Philpott et al. 1994 beschrieben, können humane Haarfollikel bis zu 10 Tagen bei anhaltender Haarschaftverlängerung in Organkultur gehalten werden.

Die über 6 Tage in Basalmedium kultivierten Kontrollhaarfollikel wiesen ein durchschnittliches Haarschaftlängenwachstum von 0,3 mm pro Tag auf (**Abb. 17/ Abb. 22**). Nach 6 Tagen in Kultur war ein Anteil von 65% der Follikel dieser Kontrollgruppe weiterhin im Anagen (**Abb. 16**).

Die TGF- β 2 (25 ng/ml) behandelten Haarfollikel dagegen gingen meist schon nach 3 Tagen in ein Katagen- ähnliches Stadium über, so dass nach 6 Tagen in Kultur bei diesen Follikeln vor allem späte Katagenstadien zu beobachten waren (70%) und keines der Follikel mehr histologisch dem Anagen zuzuordnen war (**Abb. 16 + 22**). Interessanterweise wiesen die TGF- β 2 behandelten Katagenhaarfollikel morphologisch eine außergewöhnliche Abknickung über dem Haarbulbus auf (**Abb. 22**), die bei den in das Katagen übergegangenen Kontrollhaarfollikeln nicht so ausgeprägt war.

Weiterhin wirkte sich TGF- β 2 inhibierend auf das Haarfollikellängenwachstum aus (**Abb. 17**). Schon in den ersten beiden Kulturtagen zeichnete sich ein vermindertes Wachstum der TGF- β 2 Haarfollikel von nur ca. 0,22 mm im Vergleich zu 0,32 mm in der Kontrollgruppe ab und an Tag 5 wuchsen die TGF- β 2 Follikel nur noch durchschnittlich 0,02 mm/Tag im Vergleich zu 0,3 mm bei der Kontrollgruppe.

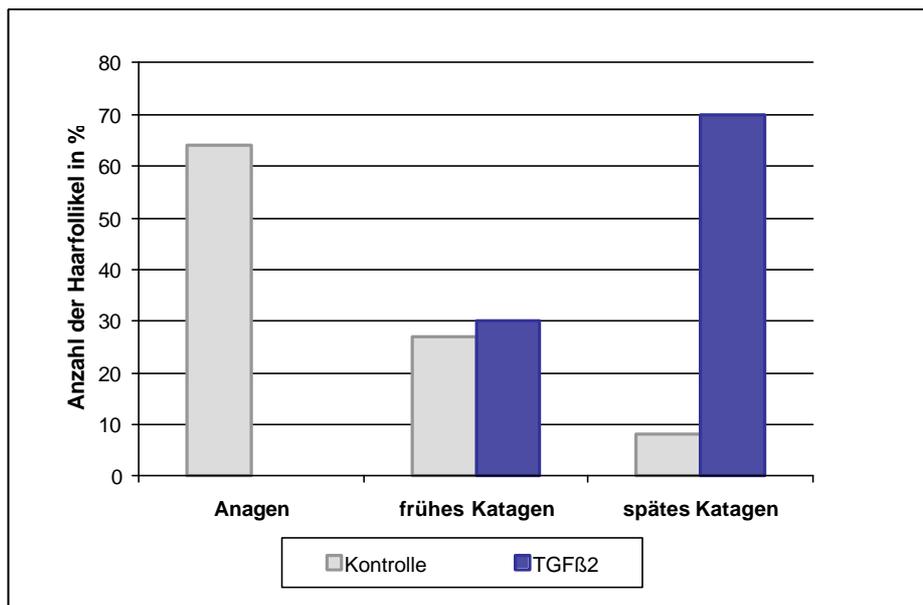


Abb. 16: Anagen - / Katagenverteilung von TGF-β2-Haarfollikeln

Nach 6 Tagen TGF-β2 Kultivierung zeigten die Follikel alle morphologisch frühe oder späte Katagenstadien, während sich die meisten Kontrollfollikel im Anagen (65%) befanden. (n=35 Haarfollikel pro Gruppe)

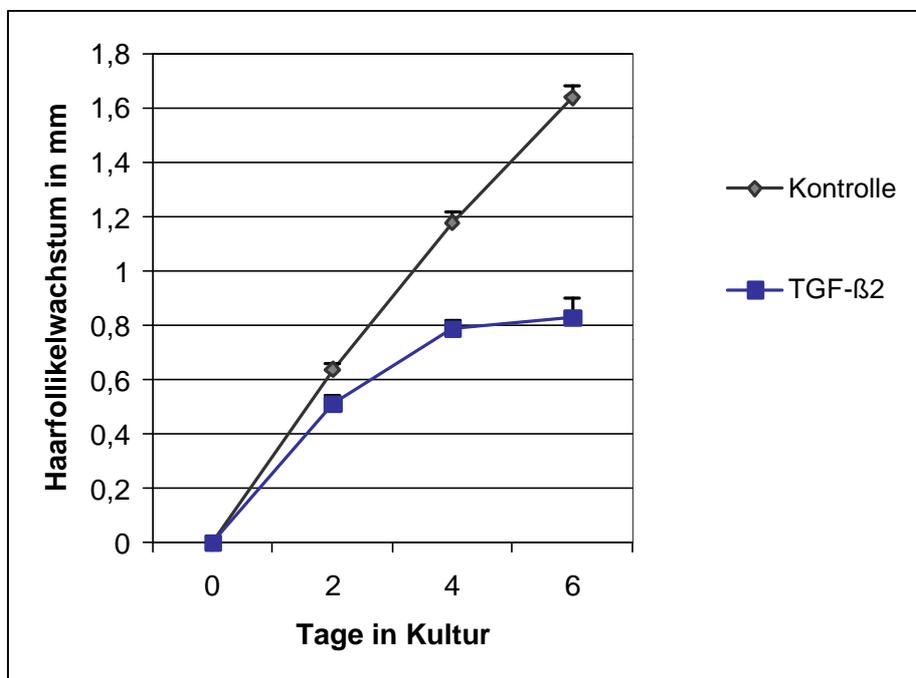


Abb.17: Vermindertes Haarschaftlängenwachstum in TGF-β2 Kultur

Die TGF-β2 behandelten Haarfollikel wuchsen nur ca. 0,22 mm an Tag 1, ca. 0,12 mm an Tag 3 und kaum messbar war die Haarschaftverlängerung an Tag 5 + 6. Im Vergleich dazu wuchsen die Kontrollfollikel ca. 0,3 mm/Tag.

4.2.2 *Tretinoin induziert Katagen und reduziert das Haarfollikellängenwachstum in vitro*

Tretinoin (all-trans Retinoic Acid) verminderte das Haarschaftlängenwachstum in der Organkultur konzentrationsabhängig (**Abb. 18 + 22**). Die geringste getestete Tretinoin (TR) Dosis von $TR \cdot 10^{-11}$ M reduzierte das Haarwachstum signifikant auf ca. 0,2 mm pro Tag und $TR \cdot 10^{-8}$ M zeigte eine noch potentere Wachstumsinhibition im Vergleich zum Kontrollhaarfollikelwachstum, welches ca. 0,3 mm/Tag betrug. Die höchste Applikation von $TR \cdot 10^{-6}$ M unterdrückte das Follikelwachstum schon zu Beginn der Kultivierung an Tag 2 auf weniger als 0,1 mm/Tag und an Tag 5 und 6 war kaum noch eine Haarschaftverlängerung zu messen.

Des Weiteren war zu beobachten, dass der überwiegende Anteil der mit Tretinoin behandelten Haarfollikel während der Kultivierung in ein Katagen ähnliches Stadium überging (**Abb. 19+21**). Die stärkste Katageninduktion zeigte $TR \cdot 10^{-6}$ M, wobei bei dieser Konzentration auch dystrophische Haarfollikel auftraten und es sich hier evtl. schon um toxische Dosen von Tretinoin handelt. $TR \cdot 10^{-11}$ M und $TR \cdot 10^{-8}$ M waren ebenfalls effektive Katageninduktoren, allerdings unterschieden sich diese Konzentrationen untereinander nicht signifikant in ihrer Potenz zur Katageninduktion. Bei diesen Konzentrationen ($TR \cdot 10^{-11}$ M und $TR \cdot 10^{-8}$ M) sind nach 6 Tagen in Organkultur ca. 80% der Haarfollikel in ein Katagen ähnliches Stadium übergegangen, während in der Kontrollgruppe nur 30% der Follikel morphologisch dem Katagen entsprachen.

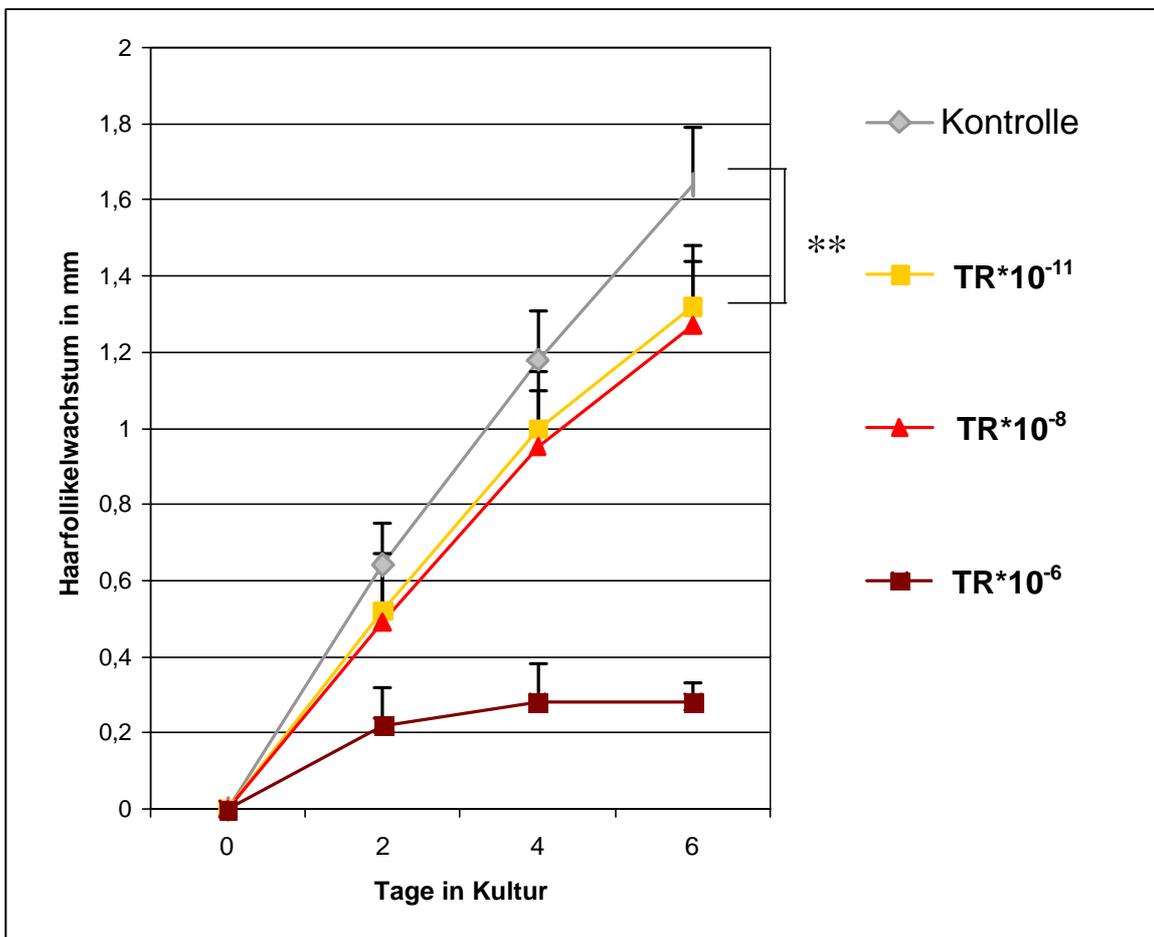


Abb. 18: Verminderte Haarschaftverlängerung der mit Tretinoin (TR) kultivierten Follikel

TR inhibierte das Haarlängenwachstum konzentrationsabhängig (n = 30 HF pro Gruppe). TR*10⁻¹¹ M reduzierte das Wachstum auf ca. 0,2 mm/Tag, davon hob sich TR*10⁻⁸ M nur leicht ab mit ca. 0,18 mm/Tag. TR*10⁻⁶ M inhibierte das Follikelwachstum mit 0,1 mm an Tag 1 und 0 mm an Tag 6 am stärksten. *p-value*:**<0,001

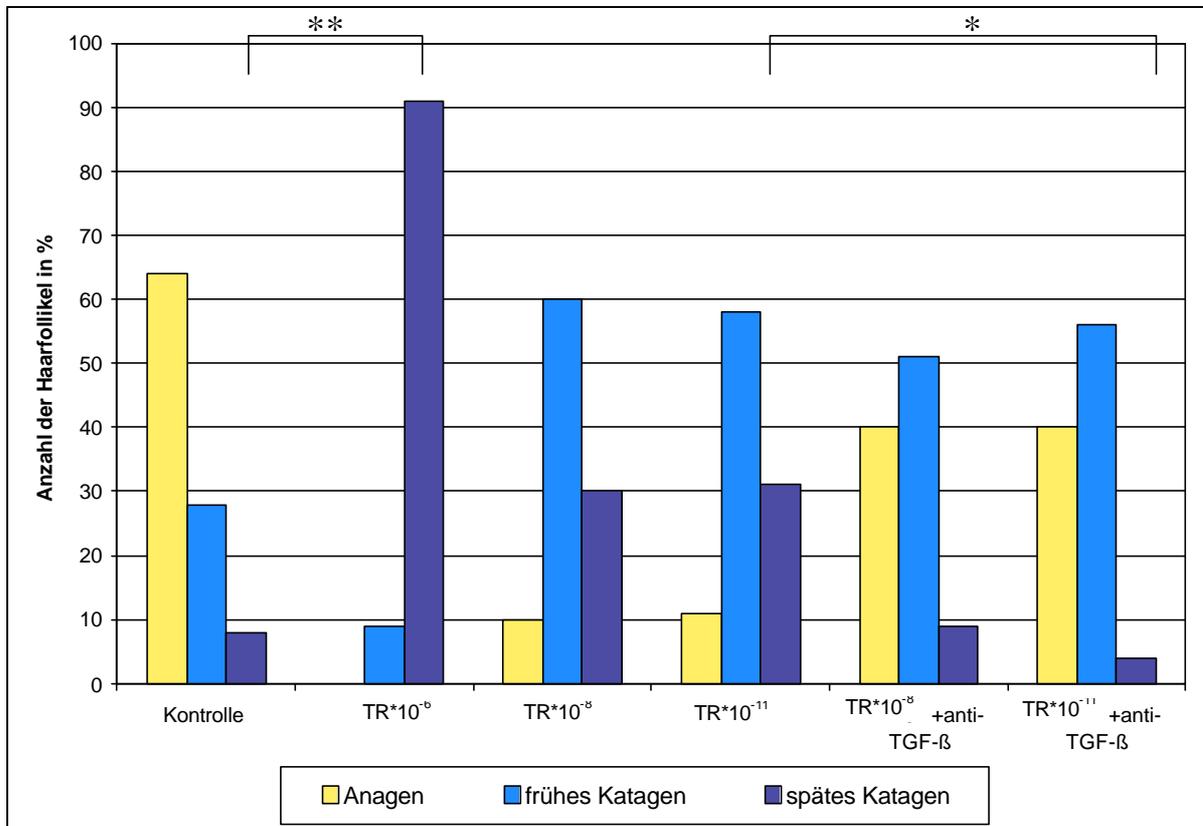


Abb. 19: Katageninduktion durch Tretinoin

Übersicht der Anagen-/Katagenverteilung (n=30 HF pro Gruppe) der mit Tretinoin (TR) und Tretinoin (TR) + TGF- $\beta_{1,2,3}$ neutralisierenden Antikörper (anti-TGF- β) behandelten Haarfollikel. Den höchsten Prozentsatz an späten Katagenfollikeln und keinen Anagenfollikel zeigte TR*10⁻⁶ M. Nach 6 Tagen in Kultur induzierte TR *10⁻⁸ M und TR *10⁻¹¹ M vor allem frühe Katagenstadien (ca. 60%) und ca. 30% späte Katagenformen. Anti-TGF- β verminderte diese Tretinoin- Effekte signifikant, so dass in diesen Testgruppen weniger als 10% späte Katagenstadien und damit die 4 fache Anzahl von Anagenfollikeln im Vergleich zur Tretinoin- Kultur vorzufinden waren. *p-value*: *<0,01, *p-value*: **<0,001

4.2.2 Tretinoin Effekte werden in Kultur durch einen neutralisierenden TGF- $\beta_{1,2,3}$ - Antikörper signifikant reduziert

Aufgrund von Hinweisen in der Literatur über TGF- β als möglichen Mediator von Tretinoin Wirkungen (Glick et al.1989, Kurie et al. 1997 u. a.), wurden den TR $\cdot 10^{-8}$ M und TR $\cdot 10^{-11}$ M Testgruppen zusätzlich ein TGF- $\beta_{1,2,3}$ -neutralisierender Antikörper zugefügt. Nach 6 Tagen Kultivierung zeigten die mit Tretinoin (TR) + TGF- $\beta_{1,2,3}$ -neutralisierendem Antikörper behandelten Follikel eine signifikant vermehrte Haarschaftverlängerung im Vergleich zu den ausschließlich mit TR behandelten Haarfollikeln (**Abb. 20**).

Die Fähigkeit von TR zur Katageninduktion wurde nach Zugabe des Anti-TGF- $\beta_{1,2,3}$ Antikörpers ebenfalls teilweise neutralisiert. Während 80 % der Tretinoin behandelten Haarfollikel in Katagen ähnliche Stadien übergegangen waren, stellten sich bei den Follikeln mit Tretinoin plus TGF- $\beta_{1,2,3}$ -neutralisierenden Antikörper nur 60% Katagenstadien dar. Diese Neutralisation der Katageninduktion war signifikant, allerdings nicht vollständig, da bei den unbehandelten Kontrollhaarfollikel nach 6 Tagen im Vergleich lediglich 33% morphologisch dem Katagen entsprachen (**Abb. 19+22**). Zur besseren Visualisierung und zur statistischen Berechnung wurden die Haarzyklustadien der unterschiedlichen Testgruppen im Hair Cycle Score dargestellt (**Abb. 21**).

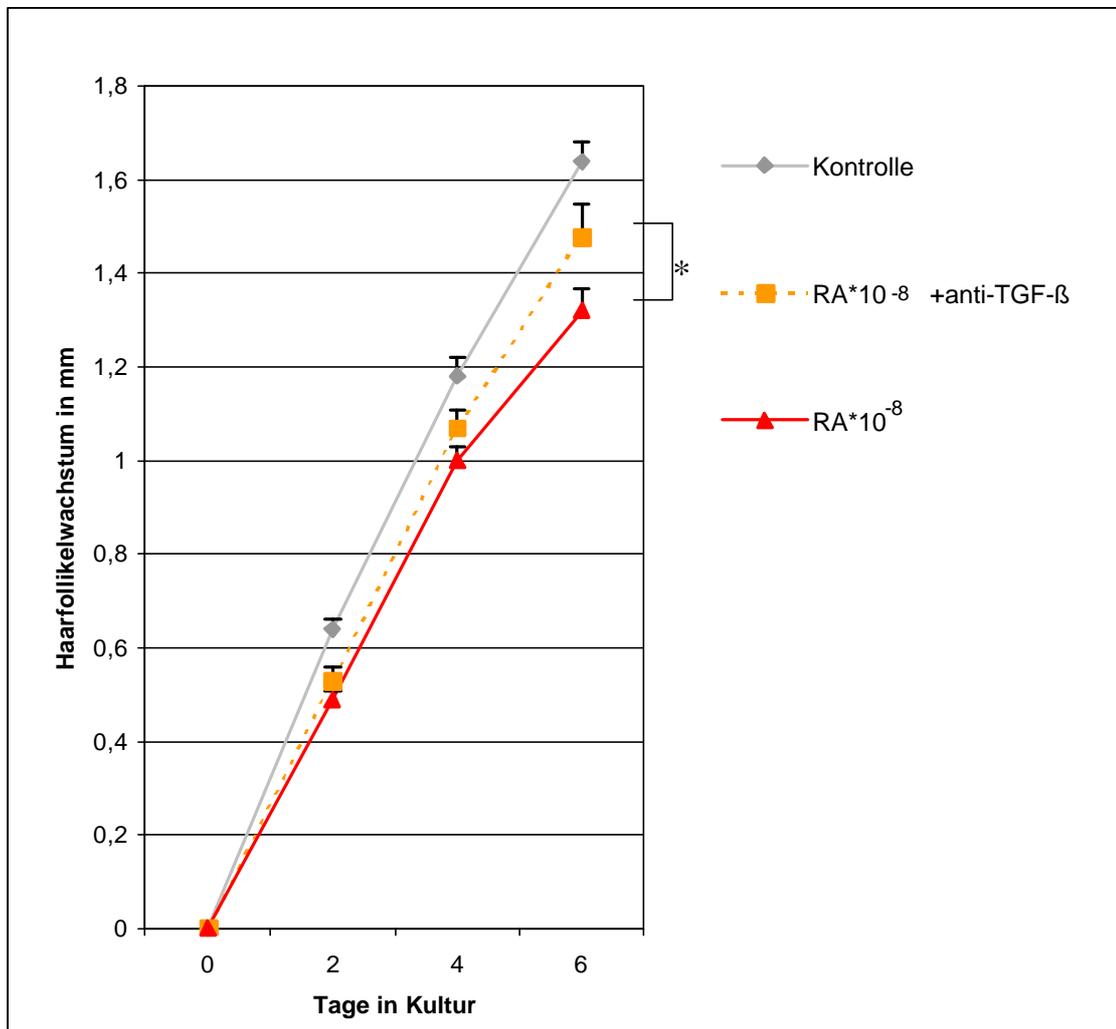


Abb. 20: Haarschaftwachstum in Tretinoin (TR) und Anti-TGF-β Antikörper-Kultivierung

Der Vergleich des Haarschaftwachstums der Tretinoin (TR) Follikel mit der Gruppe der Tretinoin + Anti-TGF-β_{1,2,3} Antikörper (anti-TGF-β) behandelten Follikel zeigt, dass durch eine Neutralisation mit dem anti-TGF-β Antikörper eine signifikante Wachstumssteigerung der Tretinoin-Follikel erzielt werden konnte. Diese Haarfollikel wuchsen nach 6 Tagen ca. 1,49 mm, während die ausschließlich mit Tretinoin kultivierten Haarschäfte an Tag 6 nur eine durchschnittliche Länge von 1,32 maßen. *p-value*: *<0,04

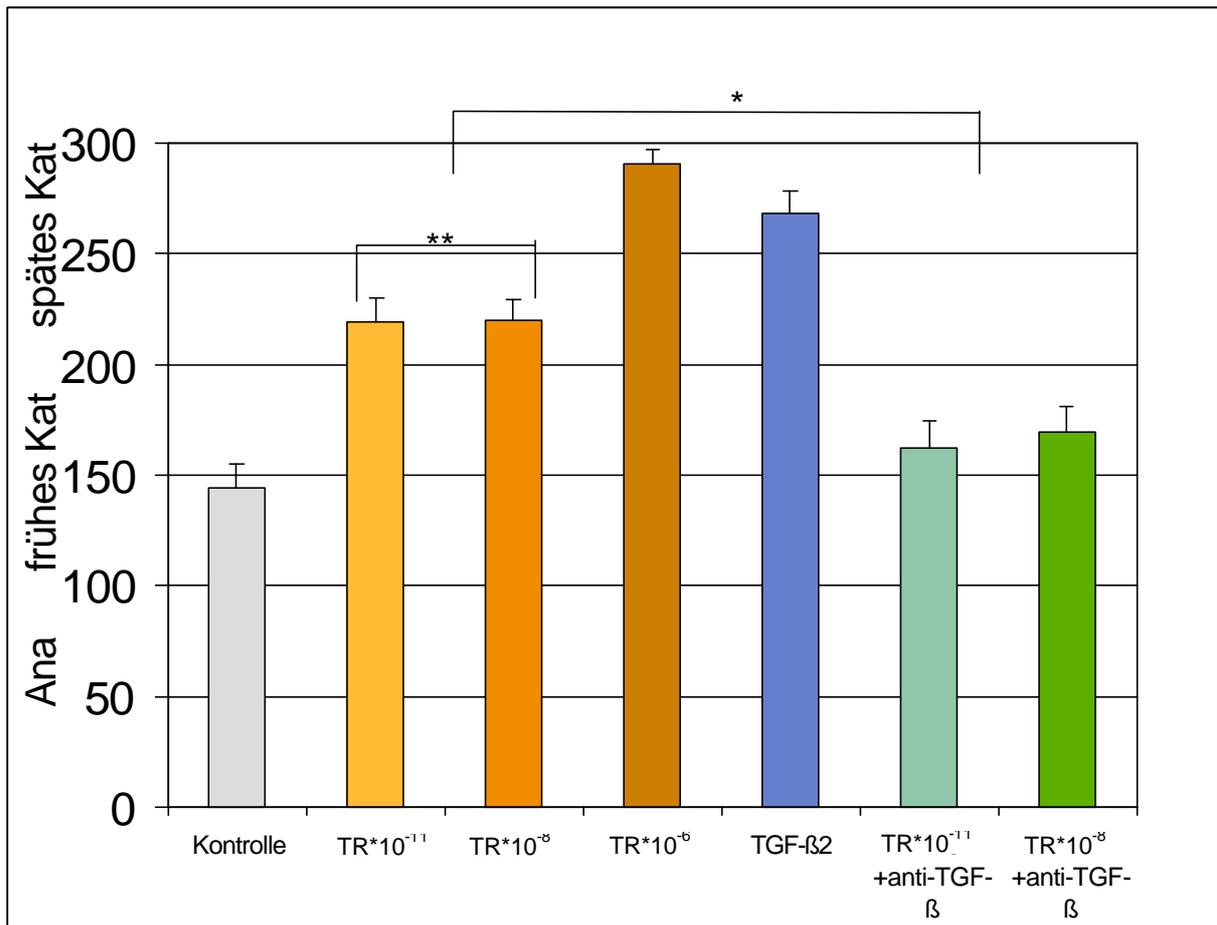


Abb. 21: Hair Cycle Score

Der Hair Cycle Score zeigt das Mittel der Stadien aller Haarfollikel pro Gruppe. Nachdem alle Follikel morphologisch einem Stadium zugeordnet werden, erhält jedes Stadium einen Wert: Anagen = 100, frühes Katagen = 200, spätes Katagen = 300. Die TR *10⁻⁶ M und TGF-β2 kultivierten Haarfollikel zeigten den höchsten Wert und wiesen damit die meisten Katagenstadien auf. Auch die TR *10⁻⁸ M und TR *10⁻¹¹ M behandelten Haare zeigten nach 6 Tagen in Kultur einen signifikant höheren Anteil an Katagenfollikeln als die Kontrolle. Der TGF-β neutralisierende Antikörper (anti-TGF-β) konnte diese Tretinoin Effekte signifikant reduzieren. Die TR + anti-TGF-β Gruppe unterschied sich mit einem Hair Cycle Score Wert von 160 deutlich von den ausschließlich mit TR kultivierten HF, die einen Hair Cycle Score Wert von 225 maßen und damit signifikant mehr Katagenstadien aufwiesen. *p-value*: *<0,01, *p-value*: **<0,001

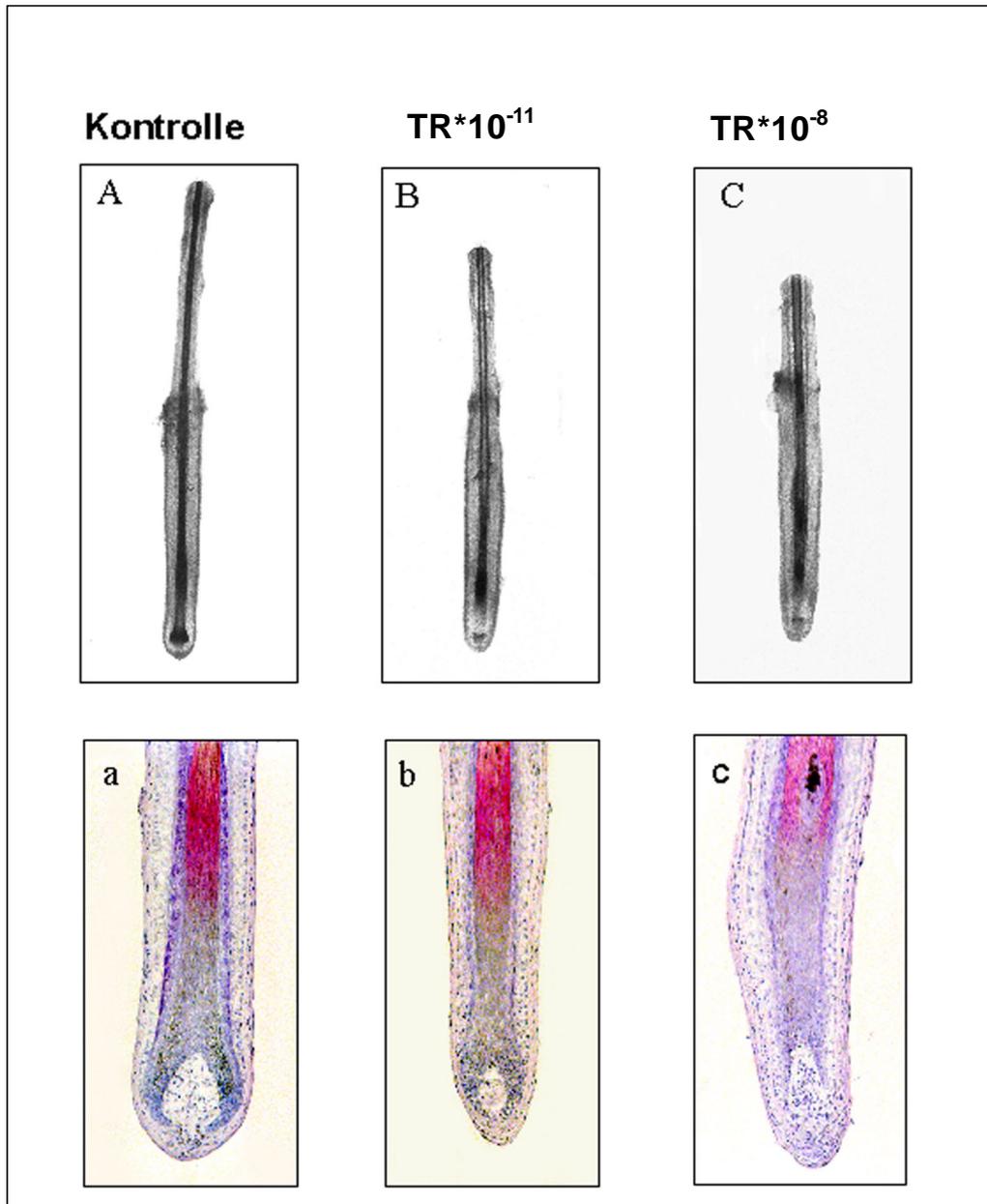


Abb. 22: Mikroskopisches (A-C) und histologisches (a-c) Aussehen humaner Haarfollikel nach 6 Tagen in Tretinoin- Organkultur

A-C: Lichtmikroskopische Fotografie von Kontrollhaarfollikeln und mit Tretinoin (TR) kultivierten Haarfollikeln. Die Haarschaftlänge der Kontrollfollikel hat sich nach 6 Tagen fast verdoppelt, dargestellt anhand der schmalen nachgewachsenen Wurzelscheide im oberen Anteil des Follikels. Trotz gleicher Ausgangslänge sind die TR- kultivierten Haarfollikel an Tag 6 deutlich kürzer im Vergleich zur Kontrolle und sie sind in frühe Katagenstadien eingetreten. **a-c:** Eine H&E Färbung der gleichen Follikel verdeutlicht histologisch, dass sich die Kontrolle im Anagen befindet, während der TR*10⁻¹¹ Follikel ins frühe Katagen III und der TR*10⁻⁸ Follikel ins Katagen V eingetreten ist.

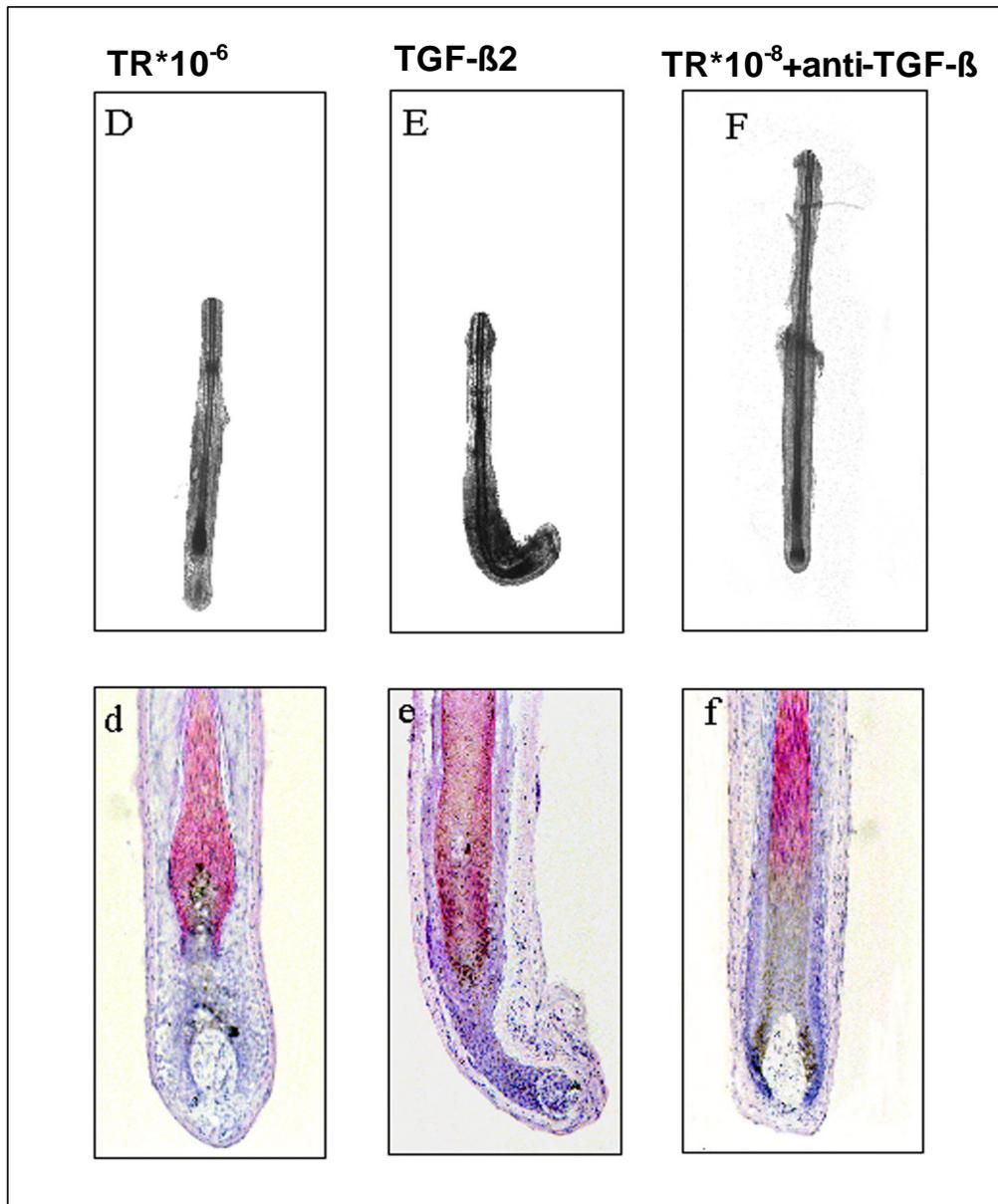


Abb. 22: Mikroskopisches (D-F) und histologisches (d-f) Aussehen humaner Haarfollikel nach 6 Tagen in Retinoin (TR) und TGF- β 2 Organkultur

D-f: Lichtmikroskopische Fotografien von Haarfollikeln nach 6 Tagen Kultivierung in $TR*10^{-6}M$, TGF- β 2 und $TR*10^{-8}M$ +TGF- $\beta_{1,2,3}$ -neutralisierender Antikörper. **D+d:** Lichtmikroskopisch ist bei $TR*10^{-6}$ nur geringes Haarschaftwachstum zu beobachten und histologisch zeigen sich Katagenstadien, die teilweise Dystrophien aufweisen. **E+e:** TGF- β 2 kultivierte Haarfollikel zeigen lichtmikroskopisch eine auffällige Abknickung über dem Haarbulbus, histologisch sind späte Katagenstadien zu sehen. **F+f:** Bei Zugabe eines Anti- TGF- $\beta_{1,2,3}$ -Antikörpers (anti-TGF- β) zu Retinoin konnte die Haarschaftverlängerung deutlich verbessert werden im Vergleich zur Retinoin-Kultur und histologisch sind Haarzyklusstadien des Anagens / frühen Katagens vorzufinden.

4.3 Tretinoin Behandlung steigert die Apoptoserate und vermindert die Proliferation

Um zu testen, ob die Katageninduktion in der Tretinoin- Kultur von einer hochregulierten Apoptose und einer verminderten Proliferation begleitet wird, wurde eine Ki-67 / TUNEL Doppelfärbung an den kultivierten Haarfollikeln durchgeführt. Anschließend wurden Ki-67 und TUNEL positive Zellen an mindestens 20 Haarbulbi pro Gruppe blind ausgezählt.

Die Auszählung der proliferierenden (Ki-67 positiven) und apoptotischen (TUNEL positiven) Zellen ergab bei den Tretinoin kultivierten Haarfollikeln sowohl eine signifikante Herunterregulation der proliferierenden Zellen um ca. 40%, als auch eine Steigerung der Apoptose um ca. 50% (**Abb. 23 + 24**). Bei den Kontrollhaarfollikeln war vor allem um die dermale Papille herum eine große Anzahl Ki-67 positiver Matrixzellen vorzufinden, diese proliferierenden Zellen waren bei den Tretinoin behandelten Haarfollikeln herunterreguliert. Während in der Kontrollgruppe durchschnittlich 4 TUNEL positive Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop zu sehen waren, zeigten die Follikel nach Tretinoin- Kultivierung doppelt so viele apoptotische Nuklei in der dermalen Papille und den umgebenden Matrix-Keratinocyten (**Abb. 24**).

Die Zugabe des TGF- $\beta_{1,2,3}$ -neutralisierenden Antikörpers konnte diese Effekte von Tretinoin signifikant reduzieren. Der Anti-TGF- β -Antikörper steigerte die Anzahl der proliferierenden Zellen in der Tretinoin Gruppe um ca. 30% und die Apoptoserate konnte in der TR $\cdot 10^{-11}$ M + anti-TGF- β Gruppe sogar auf die Hälfte reduziert werden im Vergleich zu den ausschließlich mit TR $\cdot 10^{-11}$ M behandelten Follikeln (**Abb. 23**).

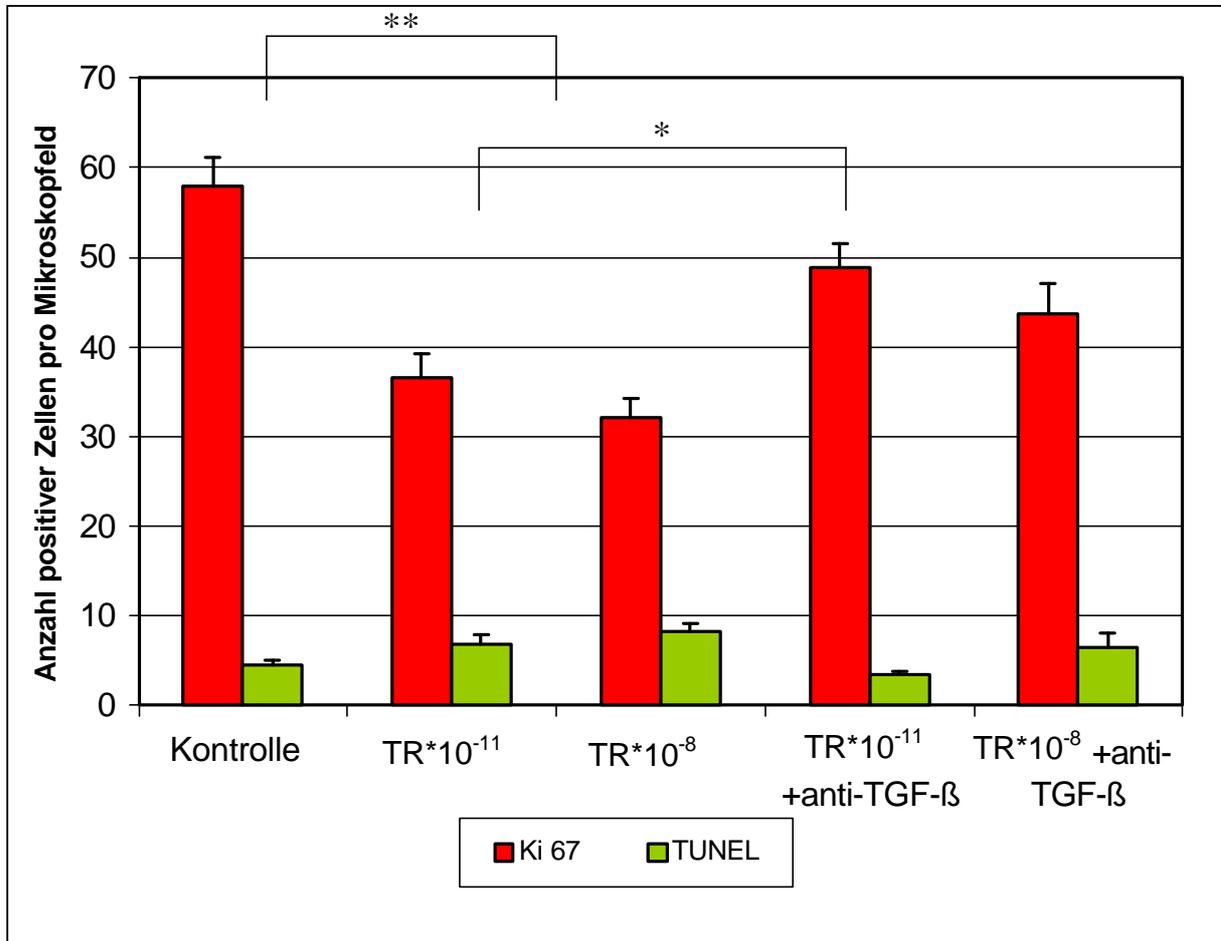


Abb. 23: Verminderung der Proliferation und Steigerung der Apoptose in Tretinoin Kultur

Vergleich der durchschnittlichen Anzahl von proliferierenden Zellen (Ki-67) und apoptotischen Zellen (TUNEL) pro Haarfollikel nach 6 Tagen in Kultur (n=20 pro Gruppe). Die mit Tretinoin behandelten Follikel zeigen eine signifikante Herunterregulation der Proliferation auf fast die Hälfte und eine Verdoppelung der apoptotischen Zellen verglichen mit der Kontrollgruppe. Der TGF-β_{1,2,3}-neutralisierende Antikörper (anti-TGF-β) reduzierte diese Effekte signifikant. *p-value*:*<0,04, *p-value*:**<0,01

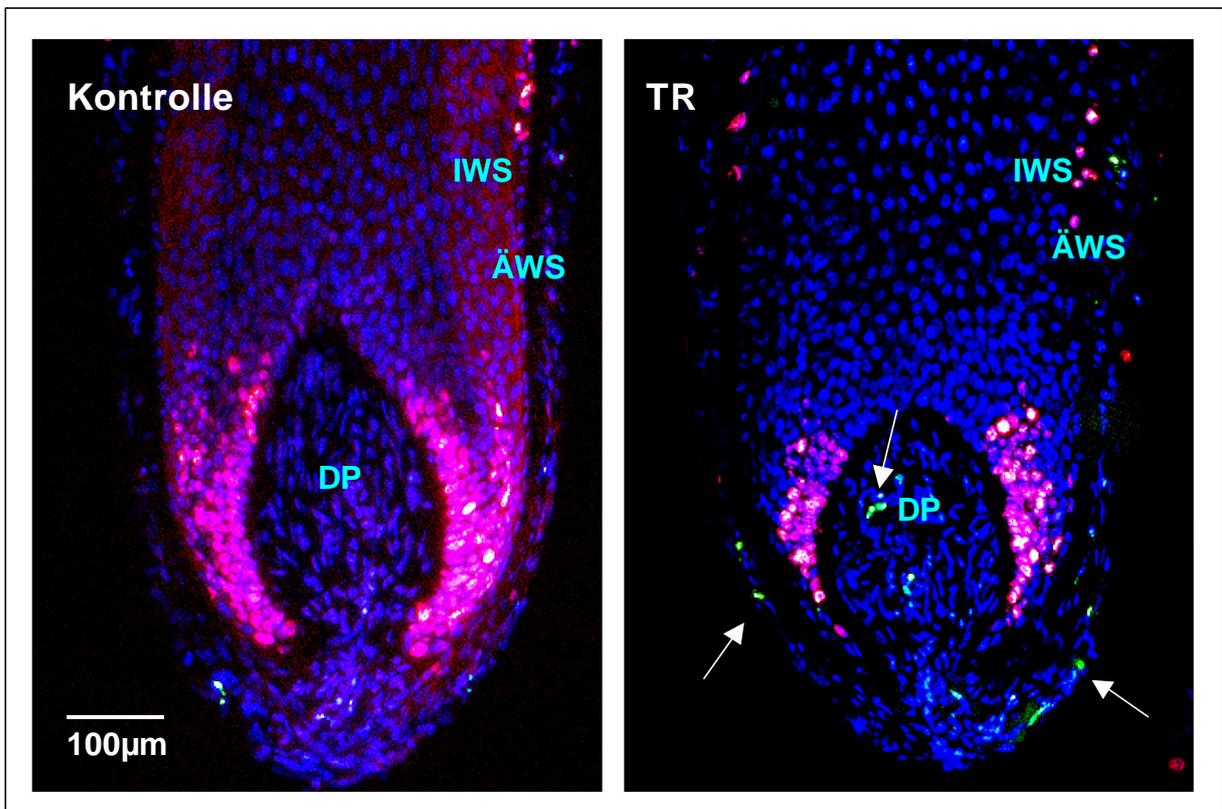


Abb. 24 : Reduktion der proliferierenden Zellen und Steigerung der Apoptose bei Tretinoin behandelten Haarfollikeln

Die Abbildung zeigt humane Anagenhaarfollikel nach 6 Tagen in Organkultur. Die Ki-67 positiven Zellen (Proliferation) sind rot- fluoreszierend und die TUNEL positiven Zellen (Apoptose) sind grün markiert dargestellt. In der Kontrollgruppe konnten in den Matrixzellen um die dermale Papille (DP) viele proliferierende Zellen gezählt werden. Diese KI-67 positiven Zellen waren bei den Tretinoin (TR) behandelten Haarfollikeln deutlich herunterreguliert. Während bei den Kontrollfollikeln nur wenig TUNEL positive Zellen zu finden waren, konnten bei den TR- Follikeln vor allem in der dermalen Papille, in der äußeren Wurzelscheide (ÄWS) und anhängendem Gewebe apoptotische Zellen gesehen werden (Pfeile).

4.4 Einfluss von Tretinoin auf die Expression von TGF- β

Da Mitglieder der TGF- β Familie in die Katageninduktion verwickelt zu sein scheinen und Tretinoin Effekte möglicherweise über TGF- β vermittelt werden (Philpott et al., 1994, Soma et al., 1999, Glick et al., 1989), wurden die mit Tretinoin behandelten Haarfollikel mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen hinsichtlich ihres Expressionsmusters von TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 und TGF- β Rezeptor II untersucht.

4.4.1 Hochregulation von TGF- β 2 Immunreaktivität bei Tretinoin behandelten Haarfollikeln

Eine TGF- β 2 Immunreaktivität konnte bei den unbehandelten humanen Anagen VI Kopfhaarfollikeln der Kontrollgruppe in der äußeren Wurzelscheide nachgewiesen werden. Der distale Anteil des Haarfollikels und die dermale Papille waren TGF- β 2 negativ (**Abb. 25**). In unbehandelten Katagenfollikeln wurde TGF- β 2 zusätzlich im epithelialem Strang exprimiert. Nach 4 Tagen Tretinoin- Kultivierung konnte eine Induktion von TGF- β 2 in den Fibroblasten der dermalen Papille und der dermalen Scheide von humanen Anagenfollikeln festgestellt werden (**Abb. 25**).

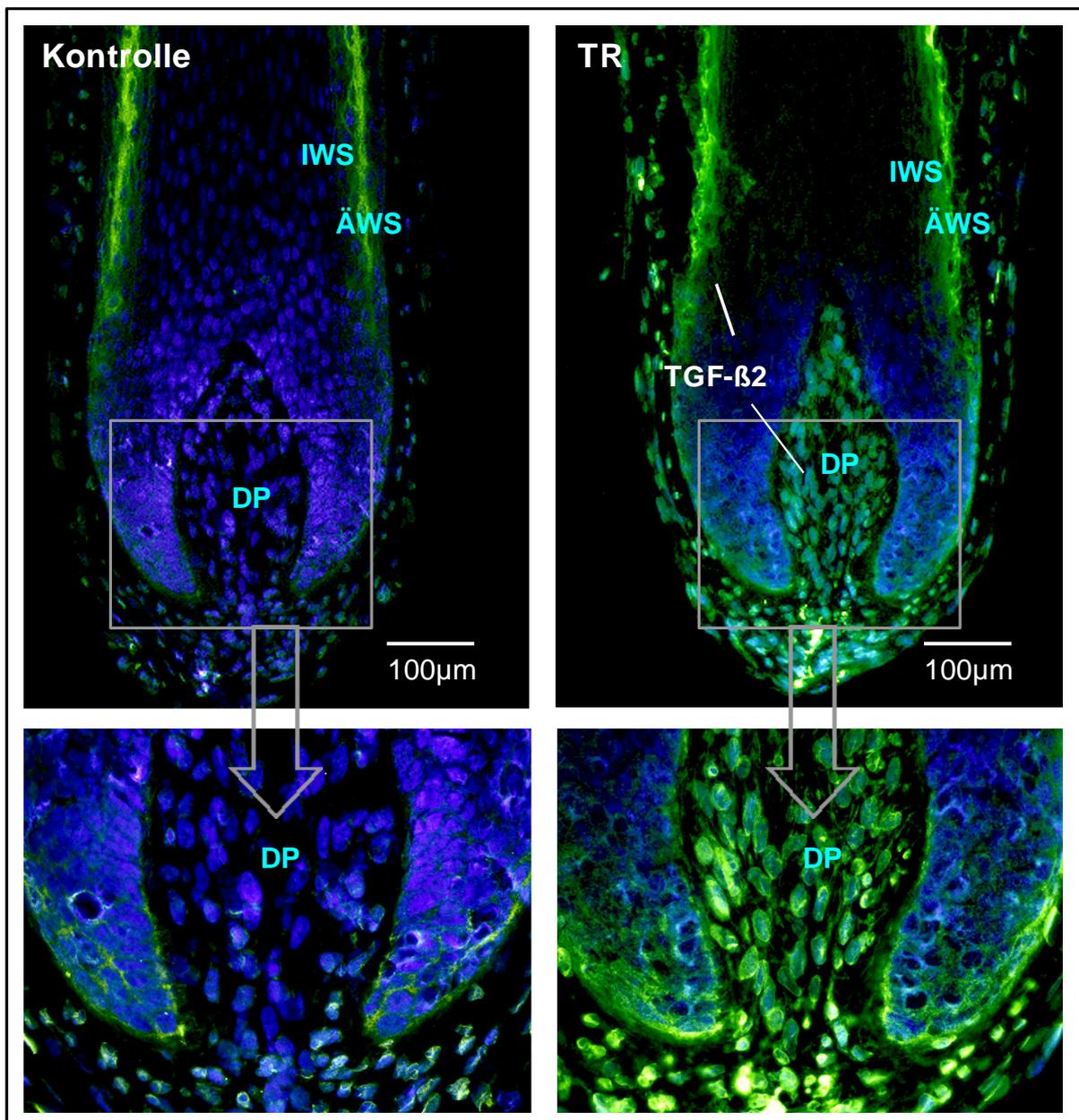


Abb. 25 : TGF-β2 Immunfluoreszenzfärbung nach 4 Tagen in Kultur

TGF-β2 (grün) Expression in humanen Haarfollikeln nach 4 Tagen in Kultur. Links: In den Kontrollfollikeln färbt sich die äußere Wurzelscheide (ÄWS) oberhalb des Haarbulbus TGF-β2 positiv. Der proximale Anteil des Haarfollikels samt dermalen Papille (DP) zeigt keine TGF-β2 Expression.

Rechts: In TR $\cdot 10^{-8}$ M behandelten humanen HF ist eine deutliche Hochregulation von TGF-β2 in der dermalen Papille und den anhängenden Fibroblasten der dermalen Scheide zu beobachten. Außerdem ist die äußere Wurzelscheide wie bei den Kontrollhaarfollikeln oberhalb des Bulbus TGF-β2 positiv.

4.4.2 Real Time (TaqMan) PCR: bei den Tretinoin behandelten Haarbulbi wird das TGF- β 2 Transkript hochreguliert

Um diese qualitative Hochregulation von TGF- β 2 auch quantitativ auf Transkriptionsebene von TGF- β 2 mRNA zu untersuchen, wurde an den mit Tretinoin kultivierten Haarfollikeln eine PCR durchgeführt. Dabei wurden die Haarbulbi und der distale Anteil der Haarfollikel geteilt und getrennt voneinander untersucht, da anhand der Immunfluoreszenz- Ergebnisse nur in der dermalen Papille eine Veränderung der TGF- β 2 Expression vermutet wurde. Es wurde die sehr sensitive Real Time (TaqMan) PCR ausgewählt (Kapitel 3.5), weil sich aus den Haarfollikeln nur geringe RNA Mengen isolieren lassen.

Die Real Time- PCR ergab eine signifikante Hochregulation des TGF- β 2 Transkriptes in den mit Tretinoin (TR) behandelten Haarbulbi um das 13 fache im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Tretinoin behandelten Haarschäfte zeigten keine Veränderung der TGF- β 2 Expression verglichen mit den Kontrollhaarschäften. Des Weiteren unterschied sich die TGF- β 2 mRNA Expression in den Haarbulbi der Kontrollen nicht von der TGF- β 2 mRNA Expression in den Kontroll- und TR- Haarschäften (**Abb. 26**).

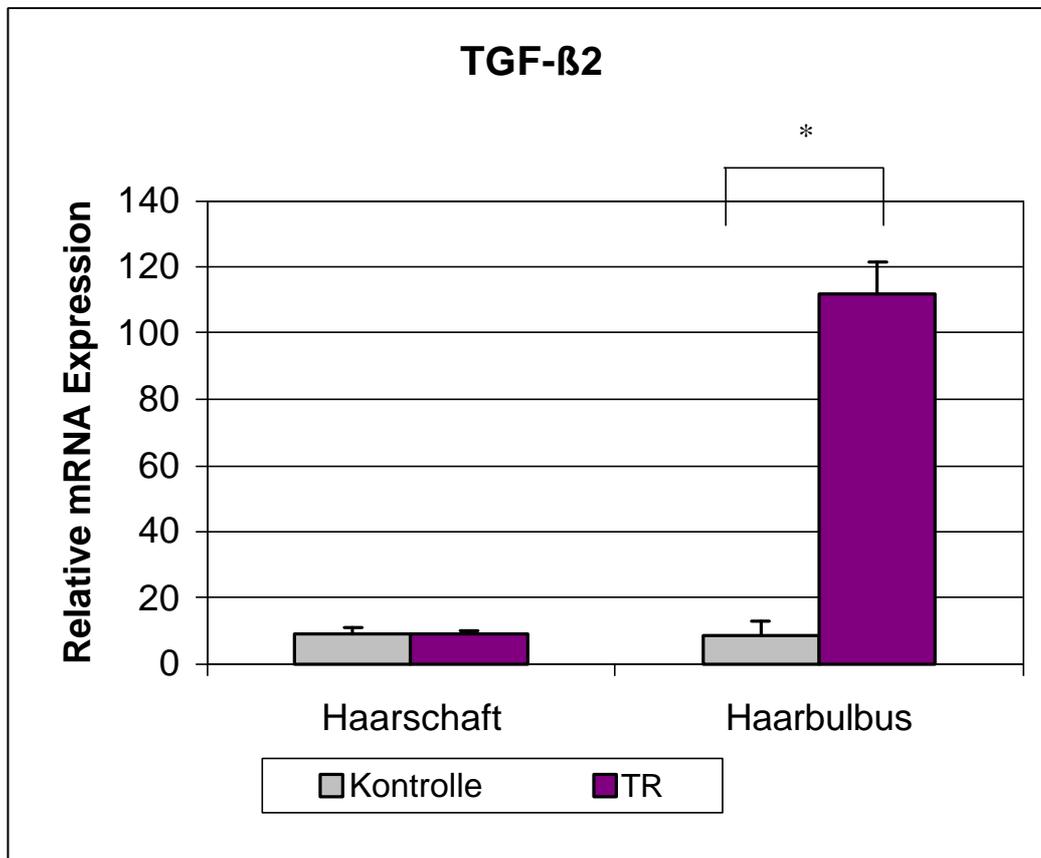


Abb. 26: TGF-β2 Real Time (TaqMan) PCR nach 4 Kulturtagen in Tretinoin

Nach 4 Tagen in TR $\cdot 10^{-8}$ M Kultur wurde an den proximalen Haarbulbi und dem distalen Haaranteil (Haarschaft) eine Real Time (TaqMan) PCR durchgeführt. Bei den mit Tretinoin (TR) behandelten Haarbulbi zeigte sich eine signifikante TGF-β2 Hochregulation um das 13 fache im Vergleich zur Kontrolle, während in den Haarschäften beider Gruppen und den Kontroll-Haarbulbi die gleiche TGF-β2 Transkription zu sehen war. *p-value* $< 0,0006$

4.4.3 Keine qualitativen Veränderungen der TGF- β 1, TGF- β 3 und TGF- β R II Immunreaktivität bei Tretinoin behandelten Haarfollikeln

Die Untersuchung der Tretinoin (TR) behandelten humanen Haarfollikel hinsichtlich der TGF- β 1, TGF- β 3 und TGF- β R II Expression mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen ergab keine qualitativen Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. TGF- β 1 und TGF- β R II wurden in den Kontrollhaarfollikeln und in der TR- Gruppe in der äußeren Wurzelscheide (ÄWS) oberhalb des Haarbubus exprimiert, der Bulbus selbst inklusive der dermalen Papille blieb TGF- β 1 und TGF- β R II negativ. Allerdings konnte eine stärkere Immunreaktivität der Tretinoin- Haarfollikel für TGF- β 1 und TGF- β R II in der äußeren Wurzelscheide beobachtet werden (Abb. 27 + 28).

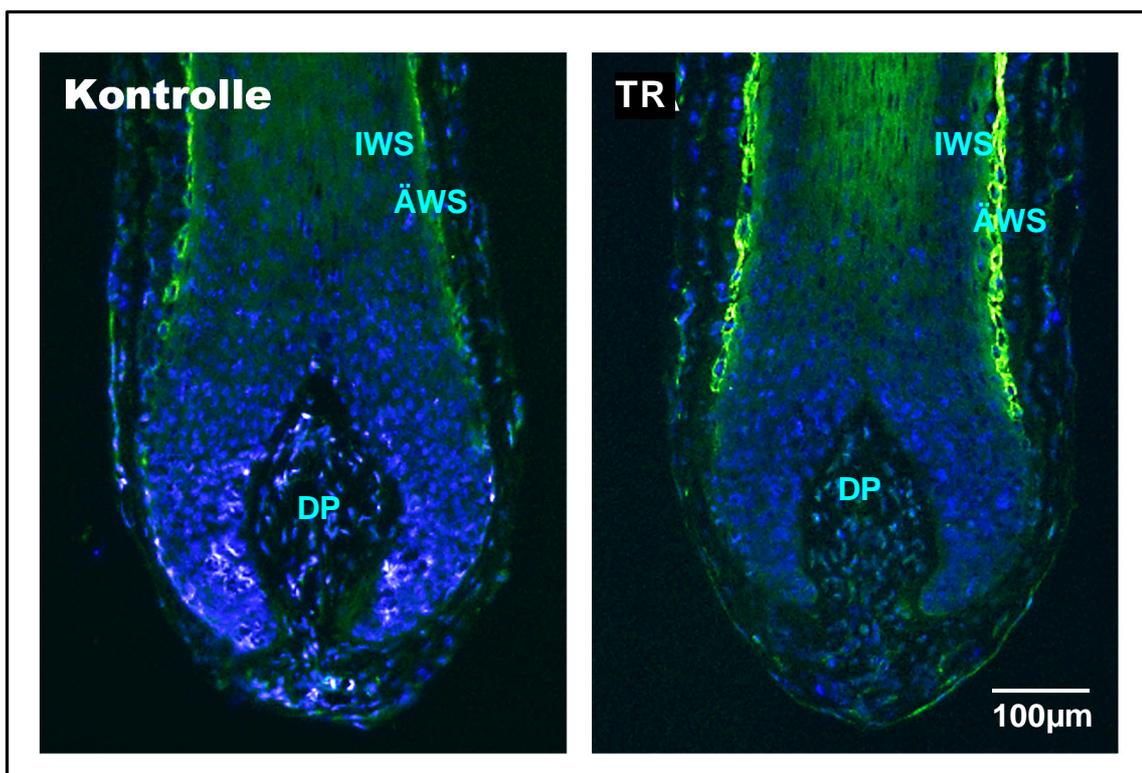


Abb. 27: TGF- β 1 Immunfluoreszenzfärbung nach 4 Tagen in Tretinoin- Kultur

Links: TGF- β 1 wird im humanen Anagenhaarfollikel nach 4 Tagen in Organkultur hauptsächlich in der äußeren Wurzelscheide (ÄWS) exprimiert.

Rechts: Nach 4 Tagen in TR- Kultur wird TGF- β 1 ebenfalls in der ÄWS dargestellt, die TGF- β 1 Immunreaktivität ist im Vergleich zur Kontrolle jedoch wesentlich intensiver.

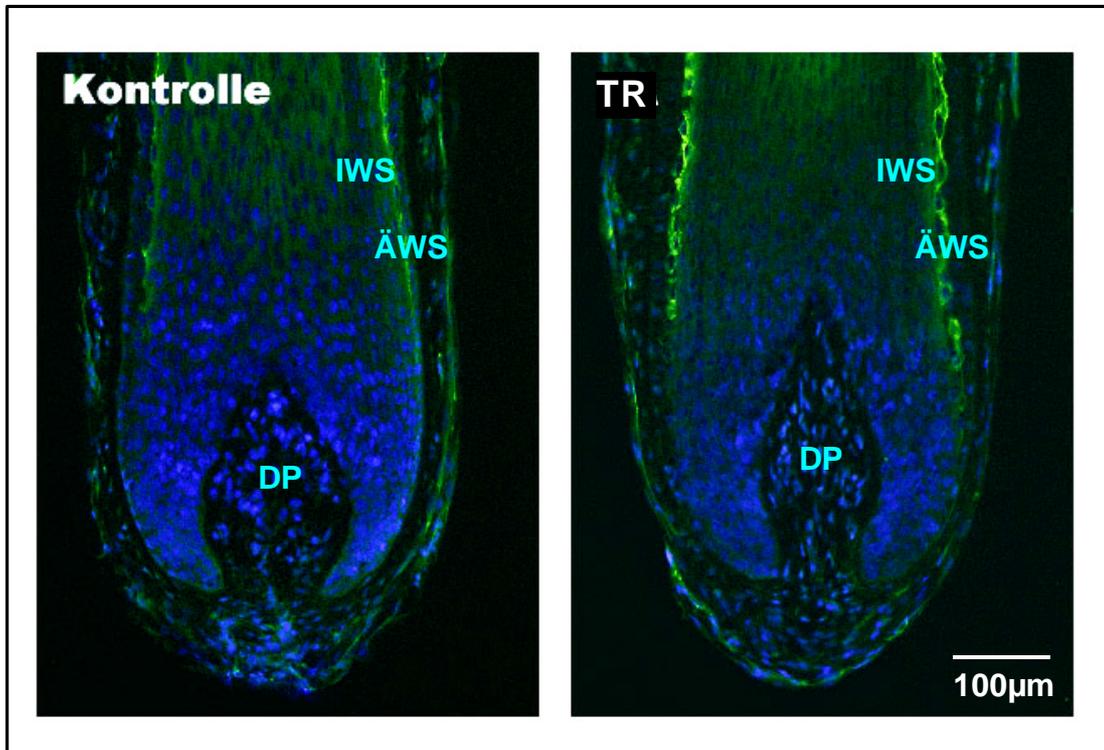


Abb. 28: TGF- β R II Immunfluoreszenzfärbung nach 4 Tagen in Tretinoin- Kultur

Links: Nach 4 Tagen Organkultur konnte im Immunfluoreszenzmikroskop in der äußeren Wurzelscheide (ÄWS) der humanen Haarfollikel TGF- β R II Immunreaktivität dargestellt werden.

Rechts: Bei den 4 Tage in Tretinoin (TR) kultivierten Haarfollikeln färbte sich die äußere Wurzelscheide im Vergleich zur Kontrolle stärker TGF- β RII positiv.

5 Diskussion

In dieser Studie wurde erstmalig gezeigt, dass Retinoide *in vitro* zur Reduktion der Haarschaftverlängerung führen und dass durch Retinoid-Behandlung in den Fibroblasten der dermalen Papille von humanen Haarfollikeln TGF- β 2 hochreguliert wird. Es konnte nachgewiesen werden, dass die negativen Effekte der Retinoide auf das Haarwachstum zum einen auf der Inhibition der Haarschaftverlängerung im Anagen (**Abb.18**) und zum anderen auf der Induktion eines frühzeitigen Katagens (**Abb. 19**) basieren, einhergehend mit vermehrter Apoptose und verminderter Keratinozytenproliferation. Außerdem wurde der Nachweis erbracht, dass diese negativen Wirkungen der Retinoide auf Haarfollikel mit Hilfe eines neutralisierenden Anti-TGF- β Antikörpers signifikant reduziert werden können (**Abb.20**).

Bei Haarfollikeln, welche über 4 Tage mit dem Retinoid Tretinoin (TR) in einer Organkultur behandelt wurden, stellte sich mittels einer Immunfluoreszenzfärbung qualitativ eine TGF- β 2 Protein Hochregulation in der dermalen Papille dar, die sich bei den Kontrollfollikeln TGF- β 2 negativ färbte (**Abb. 25**). Mit Hilfe einer hochsensitiven Real Time PCR (TaqMan) konnte dieser Effekt auch quantitativ auf RNA Ebene bestätigt werden. Bei den mit Tretinoin kultivierten Haarfollikeln konnte auf diese Weise im Haarbulbus eine 13-fache TGF- β 2 RNA Hochregulation im Vergleich zu den Kontrollfollikeln nachgewiesen werden (**Abb. 26**).

Die Tatsache, dass in der dermalen Papille der Retinoid-behandelten Haarfollikel TGF- β 2 RNA und Protein hochreguliert wird und dass ein TGF- β neutralisierender Antikörper die Retinoideffekte auf die Haarfollikel teilweise aufheben konnte, lässt darauf schließen, dass TGF- β 2 zumindest partiell die Retinoidwirkungen am Haarfollikel vermittelt.

Diese Arbeit liefert somit erste eindeutige Hinweise über die Pathogenese des bis jetzt unklaren klinischen Phänomens des Retinoid induzierten Haarausfalles, bietet therapeutische Behandlungsansätze der Retinoidnebenwirkungen und deckt neue Grundlagen der Retinoidwirkungen in der Haut auf.

Das in dieser Arbeit verwendete Modell der Organkultur imitiert eine systemische Retinoid Applikation. Vor dem gleichen Hintergrund und mit ähnlichem Versuchsaufbau untersuchte Billoni et al. 1997 die Auswirkungen von RAR (Retinoic Acid Receptor)- und RXR (Retinoic X Receptor)- Agonisten auf kultivierte humane Haarfollikel. Die RAR- und RXR- Agonisten aktivieren über eine Rezeptorbindung die entsprechenden Retinoidrezeptoren. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie konnte auch Billoni eine Verminderung des Haarlängenwachstums und einen Übergang in ein Katagen- ähnliches Stadium bei den Haarfollikeln nach Behandlung mit RAR Agonisten feststellen. Im Gegensatz zu dem negativen Einfluss der RAR Agonisten hatten in den Untersuchungen von Billoni RXR Agonisten interessanterweise einen stimulierenden Effekt auf das Follikelwachstum.

Wie in Kapitel 2.2.2 erläutert, bindet Tretinoin (all-trans Retinoic Acid) mit hoher Affinität an die Rezeptoren der RAR Isotypen. Da nach Billonis Studie eine Behandlung mit RAR Agonisten den gleichen Effekt hat wie eine Behandlung mit Tretinoin, wird vermutlich auch die in dieser Arbeit dargestellte TGF- β 2 Hochregulation und Katageninduktion über die RAR α , β , γ Rezeptoren vermittelt. Ein weiterer interessanter Versuchsansatz wäre daher die Untersuchung der mit selektiven RAR Agonisten inkubierten Haarfollikel in Bezug auf ihre TGF- β 2 Expression. Eine TGF- β 2 Hochregulation bei diesen Follikeln würde auf eine TGF- β 2 vermittelte Wirkung der Retinoide via RAR Rezeptoren hinweisen und die Verwendung selektiver RAR Rezeptoren würde zeigen, ob TGF- β 2 über RAR α , β oder RAR γ transduziert wird.

Reichrath et al. (1997) untersuchte humane Haarfollikel hinsichtlich ihrer Retinoid Rezeptoren Expression. Von den einzelnen Rezeptoren konnte RAR alpha und gamma in den Haarfollikelkeratinozyten der äußeren Wurzelscheide immunhistologisch dargestellt werden. In dermalen Papillenzellen wird vor allem RAR beta exprimiert (Billoni et al., 1997). Dies könnte darauf schließen lassen, dass Tretinoin seinen Effekt der TGF- β 2 Hochregulation in der dermalen Papille via RAR beta vermittelt. Gegen diese These sprechen allerdings die Versuchsergebnisse von Gil- Ro et al., der 1997 humane bronchiale Epithelzellen *in vitro* nach Tretinoin Exposition untersuchte. Die behandelten Zellen wiesen eine vermehrte TGF- β 2 Expression auf und interessanterweise konnte die Zugabe eines RAR alpha Antagonisten in das Medium diese TGF- β 2 Hochregulation außer Kraft setzen, was eher auf eine TGF- β Hochregulation via RAR hindeutet.

Um daher genau zwischen den einzelnen RA Rezeptoren differenzieren zu können, sind in einer Anschlussstudie weitere Versuchsreihen mit den spezifischen RAR Agonisten RAR alpha (Am 580), RAR beta (CD 2019) und RAR gamma (CD 437) geplant. Ein weiterer Schritt zur Aufdeckung des Retinoid Gen Pathways könnte die Prüfung sein, welcher dieser Rezeptoren die Fähigkeit besitzt, *in vitro* Katagen zu induzieren.

Zusätzlich sollte analysiert werden, welcher der RAR Antagonisten in der Lage ist, die Tretinoin Wirkungen hinsichtlich der Haarfollikelregression zu verhindern. Diese RAR Antagonisten wären ein möglicher therapeutischer Ansatz zur Unterdrückung des Retinoid- induzierten Haarausfalles.

Die Entdeckung von Billoni et al., dass der RXR Agonist (CD 2425) *in vitro* die Anagenphase verlängert und das Haarwachstum stimuliert, legt ebenfalls weitere Untersuchungen nahe. Interessant wäre die Frage, ob bei den mit RXR Agonisten behandelten Follikeln mit verlängerter Anagenphase die TGF- β 2 Expression vermindert ist oder andere positiv auf das Haarwachstum wirkende Zytokine wie IGF und HGF hochreguliert sind.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Billoni ordnet auch die Arbeit von Metzger et al. (2001) RXR eine Schlüsselrolle bei der Anageninduktion zu. In dieser Studie entwickelten genmutierte RXR alpha null Mäuse eine Alopezie begleitet von einer Keratinozytenhyperproliferation und inflammatorischen Hautreaktionen.

Der Zusammenhang zwischen Retinoiden und TGF- β ist einer der zentralen Untersuchungsansätze der vorliegenden Arbeit. Bei kultivierten, humanen Haarfollikeln zeigte sich nach Retinoid Behandlung eine TGF- β Hochregulation in den Fibroblasten der dermalen Papille. Durch einen Anti-TGF- β Antikörper konnten die Effekte der Retinoide auf die Haarfollikel signifikant vermindert werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Wirkungen von Retinoiden auf Zelldifferenzierung und Zellwachstum über eine TGF- β 2-Aktivierung vermittelt werden.

Hinweise für derartige Interaktionen zwischen Retinoiden und TGF- β 2 lieferten bereits Studien über den Einfluss von Retinoiden und TGF- β auf das Wachstum verschiedener Zellen *in vitro* wie z. B. bronchiale Epithelzellen (Gil-Ro et al. 1997), Fibroblasten (Hosseini et al., 1988), Brustkrebszellen (Valette and Botanch 1990) oder Lungenkrebszellen

(Moody 2000). Auch in humanen Pankreastumorzellen induzierte Retinoic Acid via TGF- β 2 eine MUC4 mucin Expression (Choudhury et al., 2000).

Die enge Verknüpfung der Effekte von Retinoiden und TGF- β 2 wird ebenfalls durch die Versuchsergebnisse von Glick et al. (1989) bestätigt. Er entdeckte, dass Tretinoin (all-trans Retinoic Acid) *in vitro* bei isolierten murinen Keratinozyten die Sekretion von aktivem TGF- β 2 induziert. Auch seine *in vivo*- Versuche zeigten, dass die kutane Applikation von RA die Immunreaktivität von TGF- β 2 in der Epidermis hochreguliert.

Eine weitere interessante Entdeckung machten Glick et al. bei Vitamin- A defizienten Ratten, bei denen keine basale Expression von TGF- β 2 in der Epidermis nachgewiesen werden konnte. Erst die kutane Applikation von Retinoic Acid induzierte eine TGF- β 2 Ausschüttung in der Haut dieser Ratten. Dies legt die Vermutung nahe, dass Retinoic Acid anscheinend nicht nur die TGF- β 2 Expression steigert, sondern in der Haut sogar eine notwendige Voraussetzung ist, um eine basale Expression von TGF- β 2 messen zu können (Glick et al., 1991).

In dieser Arbeit wurden die mit Tretinoin behandelten humanen Haarfollikel auch hinsichtlich ihrer TGF- β 1, 3 und TGF-RII Immunfluoreszenz- Expression untersucht. Dabei konnte bei der TGF- β 1 und TGF-RII Immunfluoreszenzfärbung eine stärkere Leuchtkraft dieser Antikörper in der äußeren Wurzelscheide im Vergleich zu den Kontrollfollikeln festgestellt werden (Abb. 27 + 28). Es scheinen also nicht nur Interaktionen zwischen Tretinoin und TGF- β 2 zu existieren, sondern es sind möglicherweise noch weitere Mitglieder der Wachstumshormone in den Wirkmechanismus der Retinoide involviert. Die verwendete Immunfluoreszenz Methode ist allerdings als Nachweis für eine quantitative TGF- β 1 und TGF-RII Hochregulation in diesem Falle nicht ausreichend. Um genauere quantifizierbare Aussagen über die Expression von TGF- β 1 und TGF-RII machen zu können, ist ebenfalls eine PCR Untersuchung der Retinoid- behandelten Haarfollikel hinsichtlich dieser Faktoren nötig.

Die Vermutung, dass möglicherweise auch andere TGF- β Isoformen bei den Retinoid behandelten Haarfollikeln hochreguliert werden, korreliert mit den Versuchen von Roberts, Sporn und Wakefield (1992). Sie behandelten Zellen mit Faktoren der Retinoid Rezeptor

Familie und zeigten eine Hochregulation der Typ 1 Isoform von TGF- β . Jakowlew et al. (2000) wies ebenfalls eine vermehrte TGF- β 2 Expression und eine TGF- β 3 Herunterregulation nach RA- Behandlung in Lungenkrebszellen nach.

Wicke et al. (2000) verglich das Wundsekret von mit Retinoiden und Steroiden behandelten Wunden. Während im Wundsekret der mit Steroiden behandelten Wunden TGF- β und IGF vermindert exprimiert wurde, war bei den mit Retinoiden behandelten Wunden TGF- β hochreguliert. Steroide und Retinoide scheinen folglich antagonistische Effekte auf Wachstumsfaktoren zu besitzen. Diese entgegengesetzten Wirkungen könnten möglicherweise bei der Therapie mit Retinoiden zur Reduzierung der Nebenwirkungen genutzt werden.

Mehrere Studien (Foitzik et al., 2000, Paus et. al., 1997, Philpott et al., 1994, Soma et al. 1998, 2001) weisen TGF- β 2 eine Schlüsselrolle bei der Katageninduktion während des Haarzyklus zu. Die vorliegenden Ergebnisse der Dissertation unterstützen diese Hypothese. Zum einen konnte bestätigt werden, dass TGF- β 2 *in vitro* bei humanen Haarfollikeln einen Übergang in eine Katagen- ähnliches Stadium auslöst und diese Follikel ein vermindertes Haarwachstum aufweisen (Kapitel 4.2.1). Zum anderen konnte eine TGF- β 2 Hochregulation in der dermalen Papille bei den Retinoid- behandelten Follikeln gezeigt werden, kurz bevor sie ins Katagen übergehen (Kapitel 4.4). Dies legt die Vermutung nahe, dass TGF- β 2 eine zentrale Bedeutung bei der Haarfollikelregression durch Retinoide hat. Die Hochregulation von TGF- β 2 im späten Anagen bei den Tretinoin- behandelten Haarfollikeln ist somit höchstwahrscheinlich der entscheidende Faktor für die Wachstumsinhibition und Katageninduktion durch Tretinoin.

Auch die in dieser Arbeit aufgezeigte Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion nach RA- Behandlung (Kapitel 4.3) sind wahrscheinlich Konsequenzen der beschriebenen TGF- β 2 Hochregulation. Untersuchungen von Soma et al. (1998) zeigen, dass TGF- β 2 ein potenter Apoptoseinduktor ist. Außerdem reduziert TGF- β 2 das Wachstum und die Proliferation epithelialer Zellen (Hocevar und Howe, 1998, Govinden und Bhoola 2003).

Die zusätzlich durchgeführten Versuche an den Tretinoin- kultivierten Haarfollikeln in Verbindung mit einem TGF- β neutralisierenden Antikörper bestätigen die Bedeutung von TGF- β für die Retinoidwirkungen. Die Neutralisierung von TGF- β konnte sowohl die Katageninduktion und Wachstumsinhibition, als auch die Apoptoseinduktion durch Tretinoin signifikant reduzieren (Kapitel 4.2.3). Damit konnte gezeigt werden, dass es sich nicht um eine unspezifische TGF- β Hochregulation bei den Retinoid- kultivierten Haarfollikeln handelt, sondern diese TGF- β Hochregulation für die spezifischen Effekte der Retinoide ausschlaggebend ist.

Deswegen lassen diese Ergebnisse die Spekulation zu, dass bei einer Retinoid- Therapie eine Neutralisation der TGF- β Aktionen am Haarfollikel die Anagenphase verlängern und somit die Nebenwirkungen reduzieren könnte.

Nach der Tretinoin- Behandlung der Haarfollikel konnte speziell in der dermalen Papille eine vermehrte TGF- β Expression beobachtet wurde. Diese Tatsache unterstützt die wichtige Funktion der dermalen Papille als Regulator des Haarzyklus. Interaktionen zwischen der dermalen Papille und dem darüber liegenden Matrixkeratinozyten sind wahrscheinlich verantwortlich für die Katageninduktion (Hardy 1992).

Die Ergebnisse dieser Arbeit rechtfertigen diese Hypothese, da auf die vermehrte TGF- β Expression in der dermalen Papille die beschriebene Apoptosesteigerung und Proliferationsinhibition im Haarbulbus folgte (Kapitel 4.3). Als morphologische Konsequenz konnte bei diesen Follikeln der Übergang in ein Katagenstadium beobachtet werden.

Es ist also vorstellbar, dass TGF- β durch seine Eigenschaften zur Apoptoseinduktion und Proliferationsinhibition die Haarfollikelregression von der dermalen Papille aus steuert.

Die Resultate dieser Arbeit, dass Tretinoin durch eine TGF- β Aktivierung eine Haarfollikelregression induziert, korrelieren sehr gut mit dem klinischen Bild der Nebenwirkungen von Retinoiden. Eine systemische Retinoid- Therapie wird häufig von Haarausfall begleitet, dessen Ursache in einem Telogeneffluvium begründet ist. Diese Effekte von Retinoiden auf die Haut sind dosisabhängig und reversibel (Teelmann et al. 1981).

Der Haarausfall während der Retinoid- Therapie wird vermutlich ebenfalls durch eine Retinoid- induzierte TGF- β Hochregulation in der dermalen Papille vermittelt. Daraus resultiert in diesem Bereich eine verfrüht einsetzende Apoptose- und Katageninduktion

mit anschließender weiterer Haarfollikelregression. Dies endet klinisch bei den Patienten mit dem beschriebenen Telogeneffluvium.

Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, die *in vitro* eine systemische Retinoidbehandlung imitiert, konnte bei Studien mit topischer Tretinoin Applikation ein positiver Effekt auf das Haarwachstum ausgelöst werden.

Bazzano et al. (1993) beschreibt nach äußerlicher Applikation von all-trans RA eine verlängerte Anagenphase und eine verkürzte Telogenphase bei dem C3H Mausmodell. Die Inkubation von isolierten dermalen Papillenzellen mit Tretinoin hatte bei seinen Experimenten keine Auswirkungen auf die Proliferation dieser Zellen. Der Widerspruch von Bazzanos Ergebnissen im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit könnte möglicherweise in der unterschiedlichen Applikation von Tretinoin liegen. Eine weitere, jedoch unwahrscheinliche Erklärung hierfür ist der eventuell unterschiedliche Effekt von Retinoiden auf murine und humane Haarfollikel.

Ebenfalls widersprüchlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit beschreibt Bergfeld et al. 1998 beim Menschen mit androgenetischer Alopezie eine prolongierte Anagenphase nach Retinoid- Applikation plus Minoxidil, wobei hier die positive Wirkung wahrscheinlich auf den positiven, Haarwachstum fördernden Effekt von Minoxidil zurückzuführen ist und Retinoide die Penetration von Minoxidil zu fördern scheinen.

Wollina et al. haben 1996 das Expressionsmuster der Transforming Growth Factor β Isoformen während der murinen Haarzyklusstadien untersucht. Dabei zeigte sich eine TGF- β 1 Immunreaktivität während des Anagens bis zum frühen Katagen in der äußeren Wurzelscheide und nur während des Anagen- / Katagenüberganges in der inneren Wurzelscheide. TGF- β 3 dagegen konnte über den gesamten Zyklus hinweg im perifollikulären dermalen Bindegewebe nachgewiesen werden, allerdings nicht im Haarfollikel selbst. Bei dieser immunhistochemischen Untersuchung wurde die TGF- β 2 Expression während des Haarzyklus vernachlässigt. Da TGF- β 2 aber, wie oben beschrieben, eine Schlüsselrolle bei der Katageninduktion besitzt, war ein Ziel dieser Arbeit, an einem geeigneten Mausmodell die exakte Lokalisation und Verteilung von TGF- β 2 während der einzelnen Haarzyklusstadien zu charakterisieren.

An diesem C57BL/6 Mausmodell konnte während des Anagens eine TGF- β 2 Expression in den suprabasalen Keratinozyten der äußeren Wurzelscheide gezeigt werden. Im Verlaufe des Katagens wurde eine TGF- β 2 Immunreaktivität der Keratinozyten entlang der sich bildenden Germinativkapsel und im epithelialen Strang erkennbar. Während des darauf folgenden Telogens stellten sich vor allem Zellen in der äußeren Wurzelscheide entlang des Haarschaftes und einzelne Keratinozyten um das Kolbenhaar TGF- β 2 positiv dar. Im Gegensatz dazu konnte in der dermalen Papille, der Dermis und der inneren Wurzelscheide im Verlaufe des murinen Haarzyklus keine TGF- β 2 Expression nachgewiesen werden (**Abb. 15**).

Anders als bei den Tretinoin- behandelten Haarfollikeln wurde also während des murinen Haarzyklus im Anagen- / Katagenübergang keine TGF- β 2 Immunreaktivität in der dermalen Papille gefunden. Möglicherweise findet bei dem murinen Haarzyklus nur eine kurze, minimale und nicht mittels Immunfluoreszenz darstellbare TGF- β 2 Hochregulation statt. Vielleicht unterscheidet sich der murine Haarzyklus jedoch auch von dem humanen bezüglich seiner TGF- β 2 Expression in der dermalen Papille. Eine interessante Anschlussstudie wäre die Überprüfung, ob nach einer Retinoid- Behandlung von Maushaut eine TGF- β 2 Hochregulation, verbunden mit einer Katageninduktion im murinen Haarzyklus zu beobachten ist.

Soma et al. (2001) untersuchte isolierte humane Anagen- und Katagenhaarfollikel bezüglich ihrer TGF- β 2 Expression. Somas Untersuchungen stimmen hinsichtlich der TGF- β 2 Expression im Haarfollikel im Wesentlichen mit dieser Arbeit überein. Er beschreibt bei humanen Haarfollikeln im frühen Katagen im Interzellularraum der dermalen Papille eine leichte Hochregulation von TGF- β 2, sowie in den germinativen Matrixzellen. Tretinoin (all-trans RA) scheint daher in der vorliegenden Arbeit eine vorzeitige Expression von TGF- β 2 in der dermalen Papille der humanen Anagenhaarfollikel zu induzieren. Diese Ergebnisse lassen somit ebenfalls die Spekulation zu, dass TGF- β 2 mit seinen Eigenschaften zur Apoptoseinduktion während des Anagen- / Katagenüberganges in der dermalen Papille und den germinativen Matrixzellen eine Schlüsselrolle bei der Haarfollikelregression einnimmt.

Zusammenfassend lassen die Resultate dieser Arbeit darauf schließen, dass die Effekte der Retinoide wahrscheinlich über eine vermehrte TGF- β 2 Expression vermittelt werden.

Beim Haarfollikel im speziellen ist diese TGF- β 2 Hochregulation in der dermalen Papille lokalisiert. Dies ist ein weiterer Schritt zur Entschlüsselung der komplizierten Interaktionen der Retinoidwirkungen.

Außerdem zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchung die hohe Potenz von Tretinoin und TGF- β 2 zur Katageninduktion. Dies unterstützt die Hypothese, dass TGF- β 2 eine Schlüsselfunktion bei der Katageninduktion einnimmt und bietet einen Ansatz zur Aufklärung des Retinoid induzierten Telogeneffluviums.

Aus diesen Gründen liefert diese Arbeit mehrere Konzepte für die Behandlung des von Retinoiden induzierten Haarausfalls. Die Therapie könnte zukünftig aus einer lokalen Applikation von TGF- β 2 Antagonisten bestehen, die durch eine TGF- β 2 Bindung die Haarfollikelregression verhindern. Auch TGF- β Rezeptor Antagonisten könnten die Katagen induzierenden TGF- β Wirkungen reduzieren. Des Weiteren könnten synthetische Antagonisten der RA- Rezeptoren eingesetzt werden, welche die Expression von TGF- β 2 vermitteln, um auf diese Art den TGF- β 2 Spiegel zu reduzieren.

6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der *in vitro* Untersuchung der Effekte von Tretinoin auf humane Haarfollikel hinsichtlich des Haarzyklus, des Haarfollikelwachstums und der Expression von TGF- β 2 als möglicher Mediator dieser Effekte.

Grundlage für die durchgeführten Experimente bildete eine Literaturrecherche, die z. T. konträre Wirkungen von Retinoiden auf das Haarwachstum aufzeigte und Hinweise für Interaktionen zwischen Retinoiden und TGF- β lieferte.

Die vorweg durchgeführte Analyse der TGF- β 2 Expression während des murinen Haarzyklus wies eine zyklusabhängige Verteilung von TGF- β 2 auf, die aufgrund der allgemeinen Funktionen von TGF- β 2 eine Beteiligung an der Haarzyklusregulation und Katageninduktion vermuten lässt.

Im Rahmen der experimentellen Untersuchungen konnte bei der Kultivierung von isolierten humanen Haarfollikeln mit Tretinoin (all-trans Retinoic Acid) und TGF- β 2 eine signifikante Verminderung des Haarwachstums und eine vermehrte Katageninduktion im Vergleich zu den Kontrollfollikeln gezeigt werden. Dazu korrelierend wies die immunhistochemische Untersuchung der mit Tretinoin behandelten Haarfollikel eine Hochregulation der Apoptose und Verminderung der proliferierenden Zellen auf.

Des Weiteren konnte bei den Tretinoin behandelten Haarfollikeln in der dermalen Papille qualitativ mittels Immunfluoreszenz und quantitativ durch eine Real Time PCR eine Hochregulation von TGF- β 2 -RNA und -Protein nachgewiesen werden.

Die Zugabe eines TGF- β neutralisierenden Antikörpers in die Tretinoin Kultur verminderte die wachstumsinhibierenden Effekte der Retinoide auf die Haarfollikel signifikant.

Als zentrales Ergebnis liefern die durchgeführten Experimente hinreichend Hinweise dafür, dass die aufgezeigten negativen Effekte der Retinoide auf das Haarwachstum über eine TGF- β 2 Hochregulation in den Fibroblasten der dermalen Papille vermittelt werden. Die vorliegende Studie trägt damit zur Entschlüsselung der Retinoidwirkungen am Haarfollikel bei und liefert neue Erkenntnisse über die Pathogenese und die Therapiemöglichkeiten des klinischen Phänomens des Retinoid induzierten Haarausfalles.

7 Literaturverzeichnis

- Alonso LC, Rosenfield RL (2003): Molecular genetic and endocrine mechanisms of hair growth. *Horm Res.* 2003;60(1):1-13
- Anthony J, Miller L, Dinehart SM, (1991): Topical tretinoin decreases healing times of electroepilation-induced wounds. *Dermatologica.* 1991; 183(2): 129-31
- Akhurst RJ (2002): TGF-antagonists: Why suppress a tumor suppressor? *J Clin Invest.* 2002 June 15;109(12): 1533-1536
- Ashton RE, Connor MJ, Lowe NJ. (1984): Histologic changes in skin of the rhino mouse induced by retinoids. *J. Invest. Dermatol.* 1984 Jun.; 82(6): 632-5
- Axel DI, Frigge A, Dittmann J, Runge H, Spyridopoulos I, Riessen R, Viebahn R, Karsch KR (2001) All-trans retinoic acid regulates proliferation, migration, differentiation and extracellular matrix turnover of human arterial smooth muscle cells. *Cardio-vasc Res.* Vol49/4 pp 851-62
- Bartsch D, Boye B, Baust C, zur Hausen H, Schwartz E (1992): Retinoic acid mediated repression of human papillomavirus 18 transcription and different ligand regulation of retinoic acid receptor β gene in non tumorigenic HeLa hybrid cells. *EMBO J.* 11:2283-2291
- Bauer R, Gollnick H, Retinoide in der Praxis (1984), *Grosse Verlag Berlin*
- Bazzano G.S, Terezakis N, Galen W, (1986): Topical tretinoin for hair growth promotion. *J Am Acad Dermatol.* 15/4 : 880-3, 890-3
- Bazzano G, Terezakis N, Attia H, Bazzano A, Dover R, Fenton D, Mandir N, Celletto-L, Tamburro M, Jaconi-S; (1993): Effect of retinoids on follicular cells. *J. Invest. Dermatol.* 101/1 SUPPL. (138S-142S)
- Bergfeld WF, (1998): Retinoids and hair growth. *J. Am. Acad. Dermatol.* ,1998 Aug, 39 (2 Pt 3):S 86-9
- Bernard BA, Bernadon JM, Delescluse C, Martin B, Lenoir MC, Maignan J, Charpentier B, Pilgrim WR, Reichert U, Shroot B; (1992) : Identification of synthetic reti-

- retinoids with selectivity for human nuclear retinoic acid receptor gamma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992 Jul 31 ; 186(2) : 977-83
- Berth-Jones J, Shuttleworth D, Hutschinson PE, (1990): A study of etretinate alopecia. *Br. J. Dermatol.* 122: 751-755
 - Billoni N, Gautier B, Mahe YF, Bernard-BA; (1997): Expression of retinoid nuclear receptor superfamily members in human hair follicles and its implication in hair growth. *Acta. Derm. Venerol.* 1997, 77(5):350-5
 - Bisalski K, (1989): Comparative assessment of the toxicology of vitamin A and retinoids in man, *Toxicology.* 1989, 57/2(117-161)
 - Blumenberg M, Connolly DM, and Freeberg, IM, (1992): Regulation of keratin gene expression: the role of nuclear receptors for retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D3. *J. Invest. Dermatol.* 98: 42S-49S
 - Bollaq W. (1972): Prophylaxis of clinically induced benign and malignant epithelial tumors by retinoic acid. *Eur. J. Cancer* 1972;8:689-94
 - Böttinger EP, Letterio JJ, Roberts AB (1997): Biology of TGF- β knockout and transgenic mouse models. *Kidney Int* 51:1355-1360.
 - Brahmawari J, Serafini A, Serralta V, Mertz PM, Eaglstein WH (2000): The effects of topical transforming growth factor-beta2 and anti-transforming growth factor-beta2,3 on scarring in pigs. *J Cutan Med Surg* 2000 Jul;4(3):126-31
 - Brtko J, Thalhamer J (2003) : Renaissance of the biologically active vitamin A derivatives: established and novel directed therapies for cancer and chemoprevention. *Curr. Pharm Des.* 2003; 9(25): 2067-77
 - Chambon, P, (1996), A decade of molecular biology of retinoic acid receptors, *Faseb J* 10/9 (940-54.)
 - Choudhury A, Sigh RK, Moniaux N, El-Metwally TH, Aubert JP, Batra SK (2000): Retinoic acid-dependent transforming growth factor-beta 2-mediated induction of MUC4 mucin expression in human pancreatic tumor cells follows retinoic acid receptor-alpha signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 2000 Oct 27; 275(43): 33929-36

- Chytil F, Newcomer ME, Ong DE (1994) : Cellular retinoid-binding proteins. *The Retinoids*, edited by Roberts M, Sporn A and Goodman DS. pp 283-317. *Academic Press, New York*
- Chytil F and Ong DE (1987) : Intrazellulär vit.-A binding proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 7:321-335
- Clark-SD, Kobayashi-DK, Welgus-HG (1987): Regulation of the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase and collagenase by retinoids and glucocorticoids in human fibroblast. *J. Clin. Invest.* 80:1280-1288
- Clark RAF, McCoy GA, Folkford JM, McPherson JM (1997): Tgf- β 1 stimulates cultured human fibroblasts to proliferate and produce tissue-like fibroplasia: a fibronectin matrix-dependent event. *J Cell Physiol* 170:69-80.
- Connor-MJ, Ashton-RE, Lowe-NJ; (1986) : A Comparative Study of the Induction of Epidermal Hyperplasia by Natural and Synthetic Retinoids, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1986, Vol.237, No.1, 31-35
- Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM (1990): Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61: 1329-1337.
- Cui W, Fowles DJ, Bryson S, Duffie E, Ireland H, Balmain A, Akhurst RJ (1996): TGF- β 1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle cell carcinomas in transgenic mice. *Cell* 86:531-542.
- DeLarco JE, Todaro GJ (1978): Growth factors from murine sarcoma virus transformed cells. *Proc Natl Acad Sci (Wash.)* 75:4001-4006.
- de Visser, K. E. and W. M. Kast (1999). "Effects of TGF-beta on the immune system: implications for cancer immunotherapy." *Leukemia* 13(8): 1188-99.
- Derynck R, Jarret JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV (1985): Human transforming growth factor- β cDNA sequence and expression in tumor cell lines. *Nature* 316:701-705.

- Dickson-MC, Martin-JS, Cousins-FM, Kulkarni-AB, Karlson-SK, Akhurst-RJ (1995): Defective haematopoiesis and vasculogenesis in TGF- β 1 knock out mice. *Development* 121: 1845-1854
- Dry FW (1926): The coat of the mouse (*mus musculus*). *J Gen* 16: 187-340.
- Dubertret, L., Lebreton, C., and Touraine, R. (1982) : Inhibition of neutrophil migration by tretinoin and its main metabolite. *Br. J. Dermatol.* 107: 681-685.
- Eller-MS, Harkness-DE, Bhawan-J, Gichrest-BA, (1994) : Epidermal differentiation enhances CRABP II expression in human skin, *J. Invest. Dermatol.* 1994; 103/6 (785-790)
- Engle SJ, Hoying JB, Boivin GP, Ormsby I, Gartside PS, Doetschmann T (1999): Transforming Growth Factor β 1 Suppresses Nonmetastatic Colon Cancer at an Early Stage of Tumorigenesis. *Cancer Research* 59, 3379-3386, July 15, 1999
- Falanga V, Gerhardt CO, Dasch JR, Takehara K, Ksander GA (1992): Skin distribution and differential expression of transforming growth factor beta 1 and beta 2. *J Dermatol Sci* 1992 May;3(3):131-6
- Fell HB, Mellanby E (1953): Metaplasia produced in cultures of chick ectoderm by high vitamin A. *J. Physiol.* 119: 470-488.
- Feng X, Peng ZH, Di W, Li XY, Rochette-Egly C, Chambon P, Voorhees JJ, Xiao JH; (1997): Suprabasal expression of dominant-negative RXR alpha mutant in transgenic mouse epidermis impairs regulation of gene transcription and basal keratinocyte proliferation by RAR-selective retinoids, *Genes Dev.* 1997 Jan 1; 11(1) : 59-71
- Finzi-E, Blake-MJ, Celano-P, Skouge-J, Diwan-R; (1992) : Cellular localisation of retinoic acid receptor-gamma expression in normal and neoplastic skin. *Am. J. Pathol.* 1992 Jun; 140(6): 1463-71
- Fisher-GJ, Tavakkoli-A, Griffiths-CEM, Elder-JT, Zhang-QY, Fink-L, Danielpour-D, Glick-AB, Highley-H, Ellingsworth-L, Voorhees-JJ, (1992) : Differential Modulation of Transforming Growth Factor- β 1 Expression and Mucin Deposition by RA and Sodium Lauryl Sulfate in Human Skin, *J. Invest. Dermatol.* 1992, 98:102-108
- Fritsch P, (1981) : Oral Retinoids in Dermatology. *Int. J. Dermatol.* 20: 314-329

- Frolic CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Sporn MB (1983): Purification and initial characterization of a type β transforming growth factor from human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:3676-3680.
- Gadjusek CM, Luo Z, Mayberg MR (1993): Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor 1: synergistic mediators of angiogenesis in vitro. *J Cell Physiol* 157, 133-144
- Geelen JAG, (1979) Hypervitaminosis A induces teratogenesis. *Crit. Rev. Toxicol.* 6: 351-375
- Giguere V, Ong ES, Seigi P, Evans RM (1987) Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330:624-629
- Glick-AB, Flanders-KC, Danielpour-D, Yuspa-SH, Sporn-MB (1989) : Retinoic acid induces transforming growth factor-beta 2 in cultured keratinocytes and mouse epidermis. *Cell Regulation* 1:89-97, 1989,
- Glick AB, Danielpour D, Morgan D, Sporn MB, Yuspa SH (1990): Induction and Autocrine Receptor Binding of Transforming Growth Factor- β 2 during Terminal Differentiation of primary Mouse Keratinocytes. *Mol. Endo.* 4:1 46-52
- Glick AB, McCune BK, Abdulkarem N, Flanders KC, Lumadue JA, Smith JM, Sporn MB (1991): Complex regulation of TGF β expression by retinoic acid in the vitamin A-deficient rat. *Development* 1991; 111(4):1081-6
- Gold LI, Sung JJ, Siebert JW, Longaker M (1997): Type I (RI) and type II (RII) receptors for transforming growth factor- β isoforms are expressed subsequent to transforming growth factor- β ligands during incisional wound repair. *Am J Pathol* 150:209-222.
- Gold, L. I. (1999). "The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer." *Crit Rev Oncog* 10(4): 303-60.
- Gollnick HP, Krautheim A (2003) Topical treatment in acne: current status and future aspects. *Dermatology* Vol 206/1 29-36

- Goodman DS, Smith JE, Hembry RM, Dingle JT (1974) Comparison of the effects of vitamin A and its analogs upon rabbit ear cartilage in organ culture and upon growths of the vitamin A deficient rat. *J. Lipid Res.* 15:406-414
- Goodman DS (1984) Plasma Retinol binding protein. In: *The Retinoids Vol 2*, edited by Roberts AB, Sporn MB and Goodman DS. pp41-48. *Academic Press, Orlando FL*
- Govinden R, Bhoola KD (2003): Genealogy, expression and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther* 2003 May,98(2):257-65
- Griffiths CE, Elder JT, Bernard BA, Rossio P, Cromie MA, Finkel Lj, Shroot B, Voorhees JJ, (1993) : Comparison of CD271 (adalapene) and all-trans retinoic acid in human skin: dissociation of epidermal effects and CRABP-II mRNA expression. *J. Invest. Dermatol.* 1993 Sep; 101 (3) : 325-8
- Hamada K, Gleason SL, Levi BZ, Hirschfeld S, Apella E, Ozato K (1989) : H-2RIIBP, a member of the nuclear hormone receptor superfamily that binds to both the regulatory element of major histocompatibility class genes and the estrogen response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8289-8293
- Hardy MH. (1992) The secret life of the hair follicle. *Trends Genet.* 1992, 8:55-51
- Hembree JR, Harmon CS, Nevins TD, Eckert RL, (1996) : Regulation of human dermal papilla cell production of Insulin like growth factor binding protein-3 by retinoic acid, glucocorticoids and insulin-like growth factor-1. *J. Cell-Physiol.* 1996 Jun, 167(3):556-61
- Hocevar, B. A. and P. H. Howe (1998). "Mechanisms of TGF-beta-induced cell cycle arrest." *Miner Electrolyte Metab* 24(2-3): 131-5.
- Hofmann C, Eichele G, (1994) Retinoids in Development. In : Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (eds) *THE RETINOIDS: Biology; Chemistry, and Medicine.* 2nd edn. *Raven, New York*, p387
- Hoosein NM, Brattain DE, McKnight MK, Brattain MG (1988): Comparison of the effects of transforming growth factor beta, N,N-dimethylformamide and retinoic acid on transformed and nontransformed fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* 175:125-135

- Hosokawa R, Nonaka K, Morifuji M, Shum L, Ohishi M (2003): TGF- β Decreases Type I Collagen and Scarring after Labioplasty. *J Dent Res* 82(7): 558-564, (2003)
- Hotta M, Baird A (1987): The inhibition of low density lipoprotein metabolism by transforming growth factor- β mediates its effects on steroidogenesis in bovine adrenocortical cells in vitro. *Endocrinology* 12: 150-159
- Howat WJ, Holgate ST, Lackie PM (2002): TGF- β Isoform release and activation during in vitro bronchial epithelial wound repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282, L115-23
- Huang X, Lee C (2003) : From TGF- β to cancer Therapy. *Curr DrugTargets* 2003 Apr;4(3):243-50
- Jakowlew S B, Zakowicz H, Moody T W (2000) Retinoic acid down-regulates VPAC(1) receptors and TGF-beta 3 but up-regulates TGF-beta 2 in lung cancer cells. *Peptides Vol 21/12: 1831-7*
- Johnson AN, Newfeld SJ (2002) : The TGF- Family: Signaling Pathways, Developmental Roles and Tumor Suppressor Activities. *Scientific World Journal* 2002 Apr. 5;2(4): 892-925
- Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Heisterkamp, Groffen J (1995) : Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- β 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nature Genetics* 11: 415-421
- Kamm JJ, (1982) : Toxicology, carcinogenicity, and teratogenicity of some orally administered retinoids. *J. Am. Acad. Dermatol.* 6:652-659.
- Kang S, Li XY, Voorhees JJ, (1996) : Pharmacology and molecular action of retinoids and vitamin D in skin. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc. Apr;(1) : 15-21*
- Katz HI, Waalen J, Leach EE, (1999): Acitretin in psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1999 Sep; 41:S7-S12
- Karrer P, Morf R, Schopp K. Zur Kenntnis des Vit. A aus Fischtranin. *Helv Chim Acta* 1931;14:1036-41

- Chung EJ, Choi SH, Shim JH, Bang YJ, Hur KC, Kim CW. (2000): Transforming growth factor- beta induces apoptosis in activated murine T cells through the activation of caspase 1 – like protease. *Cell Immunol.* 2000 Aug 25; 204(1):46-54
- Kingsley DM (1994): The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8: 133-146.
- Klaholz, B. P., A. Mitschler, et al. (2000). “Structural basis for isotype selectivity of the human retinoic acid nuclear receptor.” *J Mol Biol* 302(1): 155-70.
- Klaholz B. P, Mitschler A et al. (2000). “Enantiomer discrimination illustrated by high-resolution crystal structures of the human nuclear receptor hRARgamma.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12): 6322-7.
- Kligman AM; (1998) : The growing Importance of topical retinoids in clinical dermatology : a retrospective and prospective analysis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1998, 39: S2-7
- Kochhar DM, Jang H, Penner JD, Johnson AT; Chandraratna-RA; (1998) : The use of a retinoid rezeptor antagonist in a new model to study vitamin A- dependent developmental events, *Int. J. Dev. Biol.* 1998 May; 42(4):601-8
- Kraemer, K.H., DiGiovanna, J.J., Moshell, A.N., Tarone, R.E., and Peck, G.L. (1990) : Oral isotretionin prevention of skin cancer in xeroderma pigmentosum: individual variation in dose response. *J. Invest. Dermatol.* 94:544
- Kurie-J.M., Han-G.R., Dohi-D.F., Lee-H.J., Rajah-R., Walsh-G.L., Hong-W.K., Kohen-P, (1997), All.trans-Retinoic Acid Increases Transforming Growth Factor- β 2 and Insulin-Like Binding Protein-3 Expression through a Retinoic Acid Receptor-alpha-dependent Signaling Pathway, *J. Biolog. Chem.* 272(21):13711-13716, 1997
- La-Veccia-C, Tavani-a, Garattini-S, (1996) : Adverse effects of preventive therapy in humans, *IARC-Sci-Pupl.* 1996(139):135-42
- Lee TY, Chin GS, Kim WJ, Chau D, Gittes GK, Longaker MT.(1999) Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids.*Ann Plast Surg* 1999 Aug;43(2):179-84

- Leid M, Kastner P, Chambon P; (1992) : Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem. Sci.* 1992 Oct; 17(10): 427-33
- Lenoir- Viale MC, Galup C, Darmon M, Bernard BA; (1993) : Epidermis reconstructed from the outer root sheath of human hair follicle. Effect of retinoic acid. *Arch. Dermatol. Res.* 1993; 285 (4) : 197-204
- Letterio-JJ, Geiser-AG, Kulkarni-AB, Roche-NS, Sporn-MB, Roberts-AB (1994): Maternal Rescue of transforming growth factor β 1 null mice. *Science* 264:1936-1938
- Letterio JJ, Roberts AB (1998): Regulation of immun responses by TGF- β . *Annu Rev Immunol.* 1998; 16:137-61
- Lewenberg-A, (1996) : Minoxidil-tretinoin combination for hair regrowth : Effects of frequency , dosage, and mode of application, *Advances in Therapy.* 1996, 13/5 (274-283)
- Li M, Indra AK, Warot X, Brocard J, Messaddeq N, Kato S, Metzger D, Chambon P, (2000): Skin abnormalities generated by temporally controlled RXR alpha mutations in mouse epidermis. *Nature* 2000 Oct 5; 407 (6804) : 633-6
- Li M, Chiba H, Warrot X, Messaddeq N, Gerard C, Chambon P, Metzger D (2001): RXR alpha ablation in skin keratinocytes results in alopecia and epidermal alterations. *Development* (2002)128, 675-688
- Lippman SM, Kessler JF, Meyskens FL Jr. (1987) Retinoids as preventive and therapeutic anticancer agents. *Cancer Treat. Rep.* 71:391-405
- Lohnes D, Dierich A, Ghyselinck N, Kastner P, Lampron C, LeMeur M, Lukkin T, Mendelsohn C, Nakshatri H, Chambon P; (1992) : Retinoid receptors and binding proteins. *J. Cell Sci. Suppl.* 1992; 16: 69-76
- Lopez-Cassilas F, Wrana JL, Massague JL (1993): β -glycan presents ligand to the tgf- β signaling receptor. *Cell* 73:1435-1444.
- Love JM, Gudas LJ (1994) : Vitamin A, Differentiation and Cancer. *Current Opin Cell Biol* 6:825-831

- Maden M (2000): The role of retinoic acid in embryonic and post-embryonic development. *Proc Nutr Soc. 2000 Feb; 59(1):65-73*
- Maden M, Hind M (2003) : Retinoic acid, a regeneration inducing molecule. *Dev. Dyn. 2003 Feb; 226(2): 237-44*
- Mangelsdorf DJ, Dyck JA Evans RM (1990) : Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature 345: 224-229*
- Mangelsdorf DJ, Umesono ES, Kliewer S Borgmeyer U, Ong ES, Evans RM (1991) A direct repeat in the cellular retinol binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell 66: 555-561*
- MarillJ, Idres N, Capron CC, Nguyen E, Chabot GG (2003): Retinoic acid metabolism of action: a review. *Curr Drug Metab. 2003 Feb;4(1):1-10*
- Martin P.Hopkinson-Woolley J, McCluskey J, (1992): Growth factors and cutaneous wound repair. *Prog Growth Factor Res. 4/1 p25-44*
- Martin B, Bernadon JM, Cavey MT, Bernard B, Carlavan I, Charpentier B, Pilgrim WR, Shroot B, Reichert U; (1992) : Selective synthetic ligands for human nuclear retinoic acid receptors. *Skin Pharmacol. 1992; 5 (1): 57-65*
- Massagué-J (1990): The transforming growth factor- β family. *Ann Rev Cell Biol 6: 597-641.*
- Massagué-J: Receptors for the TGF- β family (1992): *Cell 69: 1067-1070.*
- Massagué-J (1996): TGF- β signaling: receptors, transducers, and mad proteins. *Cell 85: 947-950.*
- Massagué-J (1998) TGF- β signal transduktion. *Annu Rev. Biochem. 67:753-791*
- Massagué-J, Hata A, Liu F (1997): TGF- β signalling through the Smad pathway. *trends in Cell Biol 7:187-197.*
- Mauch C, Eckes B, Hunzelmann N, Oono T, Kozłowska E, Krieg T (1993): Control of fibrosis in systemic scleroderma. *J Invest Dermatol 100:92S-96S.*

- Meyer J, (2002) Research Report: Neue Erkenntnisse bei Haarwuchsstörungen. (HRSB : Rudolf Happel), Ostebrink Verlag GmbH, S 29-31
- Moses HL and Serra R (1996): Regulation of differentiation by $\text{tgf-}\beta$. *Curr Op Gen Dev* 6:581-586.
- Miyazono, K. (2000). "TGF-beta signaling by Smad proteins." *Cytokine Growth Factor Rev* 11(1-2): 15-22.
- Moll L (1994): Merkel cell distribution in human hair follicles of the fetal and adult scalp. *Cell Tissue Res.* 1994 Jul;277(1):131-8
- Moody-T (2000): Retinoic acid down-regulates VPAC(1) receptors and TGF-beta 3 but up-regulates TGF-beta 2 in lung cancer cells. *Peptides*, Vol1/12, pp 1831-37
- Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I, Rifkin DB (1997): Latent transforming growth factor- β : structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int* 51: 1376-1382.
- Noji-S, Yamaai-T, Koyama-E, Nohno-T, Fujimoto-W, Arata-J, Taniguchi-S; (Expression of retinoic acid receptor genes in keratinizing front of skin. *FEBS LETTERS*, Vol.259, N1,86-90
- Oberhammer FA, Pavelka M, Sharman S, Tiefenbacher R, Purchio A, Bursch W, Schulte-Herrmann R (1992): Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 89: 5408-5412, 1992
- Ohta S, Yanagihara K, Nagata K, (1997): Mechanism of apoptotic cell death of human gastric carcinoma cells mediated by transforming growth factor beta. *Biochem. J.* 324:777-782, 1997
- Orfanos CE (1980): Oral Retinoids-present status. *Br. J. Dermatol.* 103: 473-481
- Oshima M, Oshima H, Taketo MM (1996): TGF- β Receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol* 179(1): 297-302
- Paus R (1996): Control of the hair cycle and hair diseases as cycling disorders. *Curr Opin Dermatol* 3: 248-258.

- Paus R (1998) Principles of Hair Cycle Control. *J Dermatol* 1998, Dec 25(12):793-802
- Paus R, Cotsarelis G (1999): The biology of hair follicles. *N Engl J Med.* 1999 Aug 12;341(7):491-7.
- Paus R, Stenn KS, Link RE (1989): The induction of anagen hair growth in telogen mouse skin by Cyclosporin A administration. *Lab Invest* 60: 365-369.
- Paus R, Stenn KS, Link RE (1990): Telogen skin contains an inhibitor of hair growth. *Br J Dermatol* 122: 777-784.
- Paus R, Hofmann U, Eichmüller S, Czarnetzki BM (1994a): Distribution and changing density of gamma-delta T cells in murine skin during the induced hair cycle. *Br J Dermatol* 130: 281-289.
- Paus R, Eichmüller S, Hofmann U, Czarnetzki BM, Robinson P(1994b): Expression of classical and non-classical MHC class I antigens in murine hair follicles. *Br J Dermatol* 131: 177-183.
- Paus R, Handjiski B, Czarnetzki BM, Eichmüller S (1994c): A murine model for inducing and manipulating hair follicle regression (catagen). *J Invest Dermatol* 103: 143-147.
- Paus R, Krejci-Papa N, Li L, Czarnetzki BM, Hofman R (1994d): Correlation of proteolytic activities of organ cultured intact mouse skin with defined hair cycle stages. *J Dermatol Sci* 7: 202-209.
- Paus R, Handjiski B, Czarnetzki BM, Eichmüller S (1994e): Biologie des Haarfollikels. *Hautarzt* 45:808-825.
- Paus R, Böttge JA, Czarnetzki BM, Maurer M (1996): Hair growth modulation by immunophilin ligands. *Arch Dermatol Res* 288: 408-410.
- Pemrick, S. M. Lucas, D. A. Grippo, J. F., (1994), The Retinoid Receptors, *Leukemia*, 8/11 (1797-806.)

- Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P (1987) : Human retinoic acid receptor belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330: 444-450
- Piazza-GA, Ritter-JL, Baracka-CH; (1995) : Lysophosphatidic Acid Induction of Transforming Growth Factor alpha and beta: Modulation of Proliferation and Differentiation in Cultured Human Keratinozytes and Mouse Skin. *Exp. Cell Research* 216, 51-64
- Plewig-G; Schill-WB, Hofman, (1997) : Oral treatment with tretionin: andrological, trichological, ophtalmological findings and effects on acne. *Arch. Dermatol. Research* 1997 May 29; 265(1):37-47
- Querfeld C, Eckes B, Huerkamp C, Krieg T, Sollberg S (1999): Expression of TGF- β -1, - β 2 and - β 3 in localized and systemic scleroderma. *J. Dermatol. Science* 21: 13-22
- Randall-VA, Thornton-MJ, Redfern-CP, (1991) : Dermal papilla cells from human hair follicles express mRNA for RA receptors in culture, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1991 Dec 26, 642:457-8
- Ralhan R, Knauer J (2003): Retinoids as chemopreventive agents. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2003 Jan, 17(1):66-91
- Reichrath-J, Munssinger-T, Kerber-A, Rochette-Egly-C, Chambon-P, Bahmer-FA, Baum-HP, (1995): In situ detection of retinoid-X-receptor expression in normal and psoriatic human skin, *Br. J. Dermatol.* , 1995 Aug, 133(2):168-75
- Reichrath-J, Mittman-M, Kamradt-J, Muller-SM, (1997): Expression of retinoid-X-receptors (-alpha, -beta, -gamma) and retinoic acid receptors (-alpha, -beta, -gamma) in normal human skin: An immunohistological evaluation, *Histochem. J.* 1997; 29/2(127-133)
- Renner U, Lohrer P, Schaaf L, Feirer M, Schmitt K, Onofri C, Arzt E, Stalla G (2002) Transforming growth factor-beta stimulates vascular endothelial growth factor production by folliculostellate pituitary cells. *Endocrinology* 2002 Vol 143/10 pp3759-65

- Roberts AB, Sporn MB (1991): Interactions of retinoids and transforming growth factor-beta in regulation of cell differentiation and proliferation, *Mol Endocrinol* 1991 Vol 5/1/3-7
- Roberts AB, Sporn MB (1992): Mechanistic interrelationships between two super-families: the steroid/retinoid receptors and transforming growth factor-beta. *Cancer Surv* 1992, Vol 14/205-20
- Roberts AB, Sporn MB: The transforming growth factor-βs (1990) In "Peptide growth factors and their receptors": I (M. B. Sporn and A. B. Roberts, Eds), pp. 419-472. Springer Verlag, New York.
- Roberts AB, Sporn MB: Transforming growth factor-β (1995). In *The Molecular and Cellular Biology of Woundrepair* (R.A.F. Clark, ed) Plenum, New York, 275-308.
- Rowe, A (1997), Retinoid X receptors, *Int J Biochem Cell Biol*, 29/2 (275-8.)
- Saari JC (1994) Retinoids in Photosensitive System. *The Retinoids 2nd Edition*, Sporn MB, Roberts AB and Goodman. Raven Press, NY 1994
- Schuster N, Kriegelstein K (2002) Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res.*(2002) Vol 307/1 pp1-14
- Snaford-LP, Ormsby-I, Gitterburger-de Groot-AC, Sariola-H, Friedman-R, Boivin-GP, Gardell-EL, Doetshman-T (1997): TGF-β2 knock out mice have multiple developmental defects that are non overlapping with other TGF-β knockout phenotype. *Development* 124: 2659-2670, 1997
- Soma T, Ogo M, Suzuki J, Takahasi T, Hibino T (1998): Analysis of apoptotic cell death in human hair follicles. *J Invest Dermatol* 112: 518-526, 1998
- Soma-T, Tsuji-Y, Hibino-T (2001): Involvement of Transforming Growth Factor β2 in catageninduction during the human hair cycle. *J Invest Derm*
- Tsuji Y, Denda S, Soma T, Raftery L, Momoi T, Hibino T (2003): A potential suppressor of TGF-β delays catagen progression in hair follicles. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2003 Jun, 8 (1):65-8

- Sporn –MB, Roberts-AB, Goodman-DS, The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine, 2 nd edition, *Raven Press, Ltd., NY*, 1994
- Stenn-KS and Paus-R (2001), Controls of hair follicle cycling. *Physiol. Review, Vol 81 Jan 2001: 449-494*
- Studor-A, (1950) : Zur Wirkung großer Dosen von Vitamin A im Tierexperiment. *Schweiz. Z. Allgem. Pathol. 13: 799-802*
- Sucov HM, Evans RM, (1995): Retinoic acid and retinoic acid receptors in development. *Mol. Neurobiol. 1995 Apr-Jun; 10 (2-3): 169-84*
- Sun SY, Lotan R, (2002) Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol Vol 41/1 41-55*
- Schwartzman-RM, Kligman-AM, Duclos-DD. (1996) : The Mexican hairless dog as a model for assessing the comedolytic and morphogenic activity of retinoids. *Br. J. Dermatol. 1996 Jan; 134(1):64-70*
- Teelmann-K, (1989) : Retinoids: Toxicology and teratogenicity to date. *Pharmacol. Ther. 40: 29-43*
- Terezakis NK, Bazzano GS, (1988): Retinoids: compounds important to hair growth. *Clin. Dermatol. 6/4: 129-31.*
- Thompson-KL, Rosner-MR (1989): Regulation of epidermal growth factor receptor gene expression by retinoic acid and epidermal growth factor. *J. Biol. Chem. 264:3230-3234*
- Tong-P:S., Horowitz-N., Wheeler-LA; (1990) : Trans Retinoic Acid Enhances the Growth response of Epidermal Keratinocytes to Epidermal Growth Factor and Transforming Grpwth Factor Beta, *J. Invest. Dermatol. 94:126-131, 1990*
- Tsou-HC, SI-SP, Gonzales-Serva-A, Peacocke-M, (1994) : A beta 2 RARE-LacZ transgene identifies retinoic acid-mediated transcriptional activation in distinct cutaneous sites, *Exp. Cell. Research. 1994; 214/1 (27-34)*

- Valette A, Botanch C (1990): Transforming growth factor beta potentiates the inhibitory effect of retinoic acid on human breast carcinoma cell proliferation. *Growth Factors* 2: 283-287
- Varani-J, Gendimenico-GJ, Shah-B, Gibbs-D, Capetola RJ, Mezick-JA, Voorhees-JJ; (1991) : A direct comparison of pharmacologic effects of retinoids on skin cells in vitro and in vivo; *Skin. Pharmacol.*1991, 4(4): 254-61
- Virtanen M, Torma H M, Vahlquist A (2000) Keratin 4 upregulation by retinoic acid in vivo: a sensitive marker for retinoid bioactivity in human epidermis. *J Invest Dermatol. Vol 114/3* 487-93
- Wahl, S. M. (1992). "Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure." *J Clin Immunol* 12(2): 61-74.
- Wahl M: Transforming Growth Factor β (1994): The Good, the Bad, and the Ugly. *J Exp Med* 180: 1587-1590.
- Wakefield, LM and Sporn MB (1990): Suppression of carcinogenesis: a role for TGF β and related molecules in prevention of cancer. *Tumor suppressor genes*, edited by G.Klein. pp 217-243. *Marcel Dekker, New York*
- Wei LN: Retinoid receptors and their coregulators. (2002) : *Annu Rev. Pharmacol Toxicol* 2003, 44:47-72
- Weiss JS, Ellis-CN, Headington-JT, Tincoff-T, Hamilton-TS, Voorhees-JJ, (1988) : Topical Tretinoin Improves Photoaged Skin. *JAMA, Jan 22/29, 1988; 259:527-532*
- Williams ML, and Elias PM, (1981): Nature of skin fragility in patients receiving retinoids for systemic effect. *Arch. Dermatol.* 117:611-619
- Wigland UE, Chou RC, (1998) : Pharmacokinetics of oral Isotretinoin. *J. Am. Acad. Derm.* 1998;39:8-12
- Wolf JE (2002) : Potential anti-inflammatory effects of topical retinoids and retinoid analogues. *Adv. Ther.* 2002 May,19(3):109-18

-
- Wollina U, Lange D, Funa K, Paus R. (1996) Expression of transforming growth factor β isoforms and their receptors during hair growth phases in mice. *Histol. Histo-path (1996) 11: 431-436*
 - Woodley DT, Zelickson AS, Briggaman RA, Hamilton TA, Weiss JS, Ellis CN, Voorhees JJ, (1990): Treatment of Photoaged Skin with Topical Tretinoin Increases Epidermal-Dermal Anchoring Fibrils. *JAMA. 1990; 236:3057-3059*
 - Zouboulis CC, Xia L, Korge B, Gollnick H, and Orfanos CE (1991): Cultivation of human sebozytes *in vitro*: cell characterisation and influence of synthetic retinoids. In: *Retinoids: 10 years on*, edited by J.H. Saurat. P. 254-273. Karger, Basel, New York

8 Danksagung

Nachfolgend möchte mich bei allen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen haben.

Ganz besonders herzlich bei:

Prof. Dr. Ralf Paus (Stellvertretender Klinikdirektor der Hautklinik des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Leiter der AG Haarforschung) für die Überlassung dieses Themas und die Bereitstellung der technischen und finanziellen Mittel, sowie für die immer gern gegebenen Anregungen, welche mich zum selbständigen Arbeiten und weiterführendem Denken motiviert haben.

Dr. Kerstin Foitzik für die ausgezeichnete Begleitung in allen Phasen dieser Dissertation. Mit ihrer Erfahrung, ihren innovativen Ideen und manchmal auch der notwendigen Gelassenheit stand sie mir sämtlichen Problemlösungen bei und unterstützte mich auch bei der schriftlichen Umsetzung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Ingrid Moll (Direktorin der Hautklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf), die mir diese Arbeit unter ihrer Schirmherrschaft und in ihren Laboren ermöglicht hat.

Dr. Lars Mecklenburg für seine kompetente Unterstützung bei Laborangelegenheiten und Computerproblemen.

Dr. Dr. Moto Makamura für seine freundliche Hilfe und sein großes Wissen im Bereich der Genetik und PCR.

Allen anderen Mitgliedern der AG Paus, v. a. *Karoline Krause*, mit der ich alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit überstanden habe.

Philip Bockshammer für sein offenes Ohr und seine geduldige Unterstützung bei Computerfragen.

Meiner Familie und besonders meinen Eltern für ihre finanzielle und ganz entscheidende seelische Unterstützung während dieser Zeit.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Tanja Spexard
Anschrift: Schwenckestr. 78
20255 Hamburg
☎ 0171-4262563
e-mail: t.spexard@gmx.de

Geburt: 19.10.74, Reinbek

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1981 - 1985 Grundschule Neuschönningstedt, Reinbek
1985 - 1994 Sachsenwaldgymnasium Reinbek, Leistungskurse: Biologie, Mathematik, Jun. 1994 Abitur

Hochschulbildung:

Ärztliche Prüfungen

September 97 Physikum
März 99 1. Staatsexamen
September 01 2. Staatsexamen
Dezember 02 3. Staatsexamen, Gesamtnote: gut

Famulaturen

August 98	Famulatur im Krankenhaus St. Adolf-Stift, Fachbereich Gynäkologie, Reinbek
Aug - Sep 99	Auslandsfamulatur in Südindien, Fachbereich Innere Medizin / Ambulanz, Meenakhshi Mission Hospital, Madurai
Okt - Nov 01	Auslandsfamulatur in Australien, Fachbereich Dermatologie, Royal North Shore Hospital, Sydney

Praktisches Jahr

Jan - Feb 02	Viszerale und Transplantationschirurgie, Inselspital, Universität Bern, Schweiz
März - April 02	Chirurgische Klinik, Krankenhaus St. Adolf - Stift, Reinbek
April - Jun 02	Innere Medizin, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg
Jun - Aug 02	Innere Medizin, St. Michaels Hospital, Dublin, Irland
Aug - Dez 02	Hautklinik, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg

Sonstige Auslandsaufenthalte:

Aug 94 - Feb 95	Vertiefung der englischen Sprachkenntnisse in einer Gastfamilie in New Jersey, USA
Feb 95 - Jul 95	Betreuung von Turnierpferden, Fairground Farm, West Palm Beach, Florida, USA

10 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht an einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung beworben habe.