

**Aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der
Universität zu Lübeck**

Direktor: Prof. Dr. med. D. Zillikens

**Neue Signalwege:
Das vasoaktive intestinale Peptid beeinflusst
Wachstum und Melanogenese humaner Haarfollikel**

Inauguraldisseratation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von

Marcel Bähr geb. Kuckelkorn

aus Frankfurt (Oder)

Lübeck 2020

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. vet. Jennifer E. Hundt

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Mahdy Ranjbar

Tag der mündlichen Prüfung: 24.08.2021

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 24.08.2021

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

*Aber die auf den HERRN harren, kriegen neue Kraft, dass sie
auffahren mit Flügeln wie Adler, dass sie laufen und nicht matt
werden, dass sie wandeln und nicht müde werden.*

Jesaja 40,31

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis.....	XIII
1 Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Einführung in das Thema	1
1.2 Biologie des humanen Haarfollikels.....	1
1.2.1 Anatomie	1
1.2.2 Haarzyklus.....	3
1.2.3 Kontrolle des Haarzyklus	5
1.2.4 Innervation und Neuropeptide des Haarfollikels	6
1.3 Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP).....	8
1.3.1 Struktur, Signalwege und Analoga	8
1.3.2 Extrakutanes Vorkommen und Funktionen	8
1.3.3 Kutanes Vorkommen und Funktionen.....	9
1.4 Biologie der humanen Melanozyten	11
1.4.1 Melanin und Melanogenese	11
1.4.2 Melanozytenbiologie	12
1.4.3 Anagen-Katagen-Transformation	14
1.5 Ziel dieser Arbeit und spezifische Fragestellungen.....	15
1.6 Experimentelles Design	16
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Materialien.....	17

2.2	Humane Gewebeproben.....	17
2.2.1	Kopfhautresektate	17
2.2.2	Gewebe für Positivkontrollen.....	18
2.3	Isolierung und Kultivierung der Haarfollikel.....	19
2.3.1	Mikrodissektion der Anagen VI Haarfollikel	19
2.3.2	Kultivierung der Haarfollikel	19
2.3.3	Messung des Haarwachstums	21
2.3.4	Fixierung und Einbettung der Haarfollikel.....	21
2.3.5	Vorbereitung der eingebetteten Proben.....	22
2.4	Histochemische Färbung.....	23
2.4.1	Fontana-Masson-Färbung	23
2.5	Immunfluoreszenz- und immunhistochemische Färbungen	24
2.5.1	Primärantikörper und Sekundärantikörper	24
2.5.2	Immunfluoreszenzfärbungen	25
2.5.3	Tyramid Signal Amplifikationsmethode	26
2.5.4	Tyrosinaseaktivität.....	27
2.5.5	Visualisierung von Proliferation und Apoptose.....	27
2.5.6	Immunhistochemische Färbungen	28
2.6	Positiv- und Negativkontrollen	29
2.7	Mikroskopie	30
2.8	Semiquantitative (Immun-) Histomorphometrie.....	30
2.8.1	Prinzipien	30
2.8.2	Bestimmung der Haarzyklusphasen	30
2.8.3	Referenzareale.....	32
2.8.4	Beurteilung der VIP-Rezeptoren.....	35

2.8.5	Beurteilung von Proliferation und Apoptose der Matrixkeratinozyten	36
2.8.6	Beurteilung suprabulbärer keratinozytärer Vorläuferzellen	36
2.8.7	Beurteilung der Melanogenese	37
2.8.8	Beurteilung melanozytärer Zellen	38
2.9	Echtzeit quantitative Polymerase-Kettenreaktion	39
2.10	Statistische Analyse	42
2.10.1	Statistische Methoden	42
2.10.2	Statistische Auswertung	44
3	Ergebnisse	45
3.1	VIP und seine Rezeptoren werden auf Genebene exprimiert	45
3.2	VIP wird von perifollikulären Nervenfasern exprimiert, nicht jedoch vom Haarfollikelepithel	46
3.3	VIP-Rezeptoren 1 und 2 werden vom Haarfollikelepithel auf Proteinebene exprimiert	48
3.3.1	Qualitative Beurteilung des Verteilungsmusters der VIP-Rezeptoren	48
3.3.2	Quantitative Analyse des Verteilungsmuster der VIP-Rezeptoren	50
3.4	Einfluss von VIP auf endogenes VIP und die VIP-Rezeptoren	53
3.4.1	VIP reduziert die Genexpression von VIP und VIP-Rezeptor 1	53
3.4.2	VIP reduziert die Proteinexpression des VIP-Rezeptor 1	54
3.5	Einfluss von VIP auf Haarwachstum und Keratinozyten	56
3.5.1	VIP reduziert die Proliferationsrate von Haarmatrixkeratinozyten	56
3.5.2	VIP erhöht die Expression stammzellassoziierter Zytokeratine	58
3.5.3	VIP fördert die Anagen-Katagen-Transformation	60
3.5.4	VIP verändert das Haarwachstum nicht	61
3.6	Einfluss von VIP auf Melanogenese und Melanozyten	62

3.6.1	VIP erhöht die Anzahl melanozytärer Zellen	62
3.6.2	VIP erhöht die Anzahl differenzierter Melanozyten des Haarbulbus.....	64
3.6.3	VIP erhöht die Anzahl Rezeptortyrosinkinase Kit (c-Kit) positiver Zellen.....	65
3.6.4	VIP erhöht den Anteil melanozytärer Vorläuferzellen	69
3.6.5	VIP erhöht die Proliferationsrate c-Kit positiver Zellen des Haarbulbus.....	70
3.6.6	VIP erhöht die Tyrosinaseaktivität.....	72
3.6.7	VIP verändert den Melaningehalt nicht	73
4	Diskussion	74
4.1	Einleitende Bemerkungen	74
4.2	Verwendete Methoden	75
4.3	Expressionsmuster von VIP und seinen Rezeptoren	78
4.4	Einfluss von VIP auf die VIP-erge Neuroendokrinologie	81
4.5	Einfluss von VIP auf Haarzyklus und Haarwachstum	82
4.6	Einfluss von VIP auf die Haarfollikelpigmentierung.....	85
4.7	Ausblick.....	89
5	Zusammenfassung	91
6	Literaturverzeichnis	92
7	Publikationen aus diesem Projekt	107
7.1	Journalpublikationen.....	107
7.2	Konferenzpublikationen	107
8	Förderung während dieser Dissertation	108
9	Anhang.....	109
9.1	Ethikanträge.....	109

9.1.1	Ethikantrag 06-109 der Universität zu Lübeck	109
9.1.2	Amendments für Ethikantrag 06-109 der Universität zu Lübeck.....	110
9.2	Materialien.....	114
9.2.1	Kopfhautresektate	114
9.2.2	Reagenzien und Chemikalien.....	114
9.2.3	Verbrauchsmaterialien	116
9.2.4	Kits	116
9.2.5	Puffer	117
9.2.6	Geräte und Instrumente	117
9.2.7	Software.....	118
9.2.8	Echtzeit quantitative Polymerase-Kettenreaktion	119
9.3	Ergebnisse	120
9.3.1	Validierung der bulbären Referenzareale für melanozytäre Parameter	120
10	Danksagungen.....	124
11	Lebenslauf.....	126

Abkürzungsverzeichnis

Antigen±Zelle	Zelle <u>positiv</u> für das genannte Antigen
λ	Physikalische Größe der Wellenlänge
ACTB	β -Aktin
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AL	Aubersche Linie
APM	<i>Musculus arrector pilorum</i>
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Bulbus	Haarbulbus
<i>bulge</i>	Wulstregion (englisch <i>bulge</i>)
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNS	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGRP	Peptid des Calcitoningens (englisch <i>calcitonin gene-related peptide</i>)
CK	Zytokeratin (englisch <i>cytokeratin</i>)
c-Kit	Rezeptortyrosinkinase Kit
C _t	Anzahl an PCR-Zyklen, bei denen sich das spezifische Fluoreszenzsignal gerade vom Hintergrundsignal abhebt
ΔC_t	Änderung der PCR-Zyklenzahl (C _t)
$\Delta\Delta C_t$	Änderung der Änderung der PCR-Zyklenzahl (ΔC_t)
CTS	Follikuläre Bindegewebsscheide (englisch <i>connective tissue sheath</i>)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DP	Dermale Papille
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gp100	Glykoprotein 100
HCS	Haarzyklus-Score (englisch <i>hair cycle score</i>)
HF	Haarfollikel
HS	Haarschaft
IF	Immunfluoreszenzfärbung

IR	Immunreaktivität
IRS	Innere Wurzelscheide (englisch <i>inner root sheath</i>)
Matrix	Haarmatrix
mRNS	Botenribonukleinsäure (englisch <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MITF	Mikrophthalmie-assoziiierter Transkriptionsfaktor
One-way ANOVA	Ein-Weg Varianzanalyse (englisch <i>one-way analysis of variances</i>)
ORS	Äußere Wurzelscheide (englisch <i>outer root sheath</i>)
p	Signifikanzwert
PAC1	Rezeptor 1 des hypophysären Adenylatzyklase aktivierende Polypeptids
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (englisch <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch <i>polymerase chain reaction</i>)
PPIA	Peptidyl-Prolyl-Isomerase A
RT	Raumtemperatur (22°C)
RT-qPCR	Echtzeit quantitative Polymerase-Kettenreaktion (englisch <i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (englisch <i>standard error of the mean</i>)
SP	Substanz P
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (englisch <i>tris-buffered saline</i>)
TNT	Tris-Natriumchlorid-Tween Puffer
TSA	Tyramid Signal Amplifikationsmethode
TUNEL	Englisch <i>terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate nick end labelling</i>
TYRP	Tyrosinase zugehöriges Proteinen
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
VPAC1	Rezeptor 1 des vasoaktiven intestinalen Peptids
VPAC2	Rezeptor 2 des vasoaktiven intestinalen Peptids

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Anatomie des Anagen VI Haarfollikels	2
Abbildung 1.2 Phasen des Haarzyklus	4
Abbildung 1.3 Übersicht diffusionsfähiger Einflussfaktoren des Haarzyklus	6
Abbildung 1.4 Anatomie der Haarfollikelinnervation	7
Abbildung 1.5 Melanogenese und Regulationsmechanismen	12
Abbildung 1.6 Melanozytenpopulationen des Haarfollikels	13
Abbildung 2.1 Humane Kopfhautresektate	17
Abbildung 2.2 Stereomikroskopische Qualitätskontrolle mikrodissasierter Haarfollikel ..	19
Abbildung 2.3 Kultivierung mikrodissasierter Haarfollikel	20
Abbildung 2.4 Darstellung des Haarwachstums	21
Abbildung 2.5 Vorgehen bei der Formaldehydfixierung und Paraffineinbettung	22
Abbildung 2.6 Material für Waschschritte und Inkubationsschritte	23
Abbildung 2.7 Vergleich von Anagen VI Phase und früher Katagenphase	31
Abbildung 2.8 Bulbäre Referenzareale	33
Abbildung 2.9 Suprabulbäre Referenzareale	34
Abbildung 2.10 Das mesenchymale Referenzareal	35
Abbildung 2.11 Referenzareale zur Auswertung der Fontana-Masson-Färbung	37
Abbildung 2.12 Der Anteil nicht-melanotischer melanozytärer Vorläuferzellen	39
Abbildung 2.13 Schematische Darstellung einer Amplifikationskurve	40
Abbildung 2.14 Rechenweg der $\Delta\Delta C_t$ -Methode	41
Abbildung 3.1 VIP und seine Rezeptoren werden follikulär exprimiert	45
Abbildung 3.2 VIP wird in kutanen Nervenfasern und Leukozyten exprimiert	47
Abbildung 3.3 VIP-Rezeptor 1 und 2 werden im Haarfollikelepithel exprimiert	49
Abbildung 3.4 Die VIP-Rezeptoren werden im proximalen Haarbulbus mit der höchsten Intensität exprimiert	51
Abbildung 3.5 Vergleich der suprabulbären Expression von VPAC1 und VPAC2	52
Abbildung 3.6 VIP reduziert die Genexpression von VIP und VIP-Rezeptor 1	54
Abbildung 3.7 VIP reduziert die Proteinexpression des VIP-Rezeptor 1	55
Abbildung 3.8 VIP reduziert den Anteil von Ki-67+ Zellen	57

Abbildung 3.9 VIP reduziert die Expression von Zytokeratin 15 und 19 im proximalen Haarbulbus	59
Abbildung 3.10 VIP erhöht den Haarzyklus-Score	60
Abbildung 3.11 VIP beeinflusst das Haarwachstum nicht	61
Abbildung 3.12 VIP erhöht die Anzahl von MITF+ Zellen	63
Abbildung 3.13 VIP erhöht die Anzahl von gp100+ Zellen	64
Abbildung 3.14 VIP erhöht die Anzahl von c-Kit+ Zellen	66
Abbildung 3.15 Im Haarbulbus sind mehrere c-Kit+ Zellpopulationen identifizierbar	67
Abbildung 3.16 Die bulbären c-Kit+ Zellpopulationen sind melanozytärer Herkunft	68
Abbildung 3.17 VIP erhöht den Anteil nicht-melanotischer Melanozyten	69
Abbildung 3.18 VIP erhöht den Anteil von c-Kit+/Ki-67+ Zellen an allen c-Kit+ Zellen	71
Abbildung 3.19 VIP erhöht die Tyrosinaseaktivität	72
Abbildung 3.20 VIP beeinflusst den bulbären Melaningehalt nicht	73
Abbildung 4.1 Vergleich der Bildqualität nach Paraffinierung und Kryofixierung	77
Abbildung 4.2 Vergleich der VIP-Rezeptorexpression	79
Abbildung 4.3 Expression von c-Kit in Haarbulbus und suprabulbärer Region	87
Abbildung 9.1 Die MITF+ Zellzahl ist distal der Auberschen Linie erhöht	120
Abbildung 9.2 Die gp100+ Zellzahl ist distal der Auberschen Linie erhöht	121
Abbildung 9.3 Die c-Kit+ Zellzahl ist distal der Auberschen Linie erhöht	122
Abbildung 9.4 Der Anteil nicht-melanotischer melanozytärer Vorläuferzellen ist proximal der Auberschen Linie erhöht	123

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Übersicht der extrakutanen Effekte des VIP	9
Tabelle 1.2 Übersicht der kutanen Effekte des VIP	10
Tabelle 1.3 Vergleich follikulärer melanozytärer Subpopulationen	14
Tabelle 1.4 Übersicht der verwendeten biochemischen Zielstrukturen	16
Tabelle 2.1 Übersicht der verwendeten Kulturprotokolle	20
Tabelle 2.2 Übersicht der verwendeten Primärantikörper	24
Tabelle 2.3 Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper	24
Tabelle 2.4 Übersicht der verwendeten Immunfluoreszenzfärbungen	25
Tabelle 2.5 Übersicht der verwendeten immunhistochemischen Färbungen	28
Tabelle 2.6 Übersicht der verwendeten Positivkontrollen	29
Tabelle 2.7 Verwendete Kriterien zur Bestimmung der Haarzyklusphasen	31
Tabelle 2.8 Werte des Haarzyklus-Scores	32
Tabelle 9.1 Kopfhaut, die für die Datenerhebung verwendet wurde	114
Tabelle 9.2 Übersicht der verwendeten Reagenzien und Chemikalien	114
Tabelle 9.3 Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien	116
Tabelle 9.4 Übersicht der verwendeten Kits	116
Tabelle 9.5 Übersicht und Zusammensetzung der verwendeten Puffer	117
Tabelle 9.6 Übersicht der verwendeten Geräte und Instrumente	117
Tabelle 9.7 Übersicht der verwendeten Software	118
Tabelle 9.8 Übersicht der verwendeten Materialien für die Echtzeit quantitative Polymerase-Kettenreaktion	119
Tabelle 9.9 Übersicht der verwendeten TaqMan-Primer	119

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Einführung in das Thema

Vom neuronalen Netzwerk des dicht innervierten Haarfollikels werden diverse Neuropeptide ausgeschüttet (Chan *et al.*, 1997; Peters *et al.*, 2001; Roosterman *et al.*, 2006). Auch wenn sie für die Erhaltung des Haarzyklus nicht essentiell sind (Botchkarev, 2003; Krause und Foitzik, 2006), haben sich die Neuropeptide als potente Modulatoren erwiesen (Roosterman *et al.*, 2006). Durch Neuropeptide kann beispielsweise eine Autoimmunität des Haarfollikels ausgelöst (Peters *et al.*, 2007) oder die Integrität des follikulären Immunsystems wiederhergestellt werden (Kinori *et al.*, 2012; Bertolini *et al.*, 2016b). Es ist nur wenig über die Wirkung der Neuropeptide auf die follikuläre Stammzellbiologie sowie die epitheliale und follikuläre Pigmentbildung bekannt.

In dieser Pilotstudie soll der Einfluss des vasoaktiven intestinalen Peptids (**VIP**) auf die Biologie follikulärer Keratinozyten, follikulärer keratinozytärer Stammzellen und follikulärer Melanozyten untersucht werden.

1.2 Biologie des humanen Haarfollikels

1.2.1 Anatomie

Die Haut wird in die Schichten Epidermis, Dermis und Subkutis gegliedert. Sie ist durchsetzt mit Hautanhangsgebilden, zu denen Schweißdrüsen, Talgdrüsen und Haarfollikel (**HF**) gehören. Art und Verteilung von HF variieren zwischen den Hautregionen. Die HF der Kopfhaut haben aufgrund ihrer psychosozialen Relevanz die größte Bedeutung (Stenn und Paus, 2001; Krause und Foitzik, 2006). In der Kopfhaut überwiegen die Terminal-HF. Von diesen befinden sich 90 % in der Anagen VI Phase (Paus und Cotsarelis, 1999; Krause und Foitzik, 2006). Die Anatomie des HF wird daher am pigmentierten Terminal-HF in der Anagen VI Phase erläutert (siehe Abbildung 1.1).

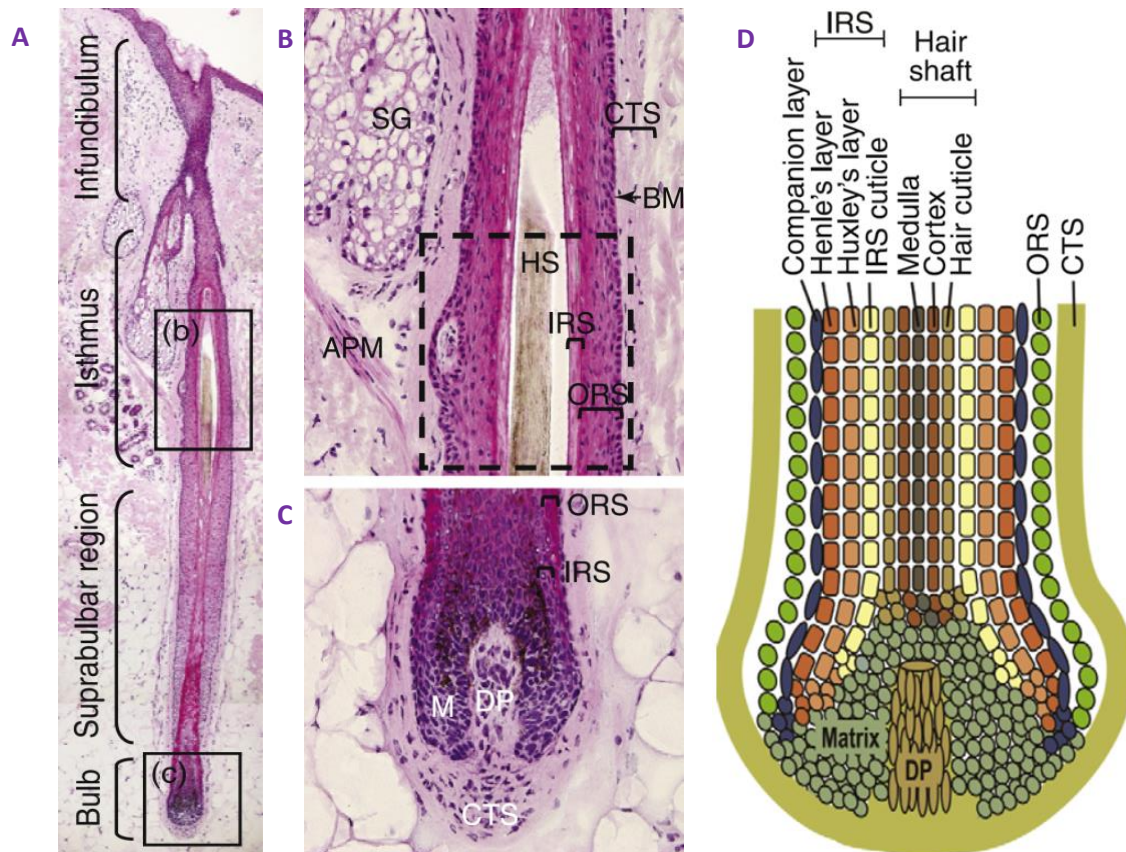


Abbildung 1.1 Anatomie des Anagen VI Haarfollikels.

Der Haarfollikel wird in 4 Abschnitte gegliedert (A). Am Ansatz des *Musculus arrector pilorum* befindet sich die Wulstregion (B). Der ektodermale Haarbulbus umschließt die mesodermale dermale Papille (C). Haarmatrix und innere Wurzelscheide dienen der Haarschaftbildung (D). Hämatoxylin/Eosin-Färbung (A-C). APM: *Musculus arrector pilorum*; BM: Basalmembran; Bulb: Haarbulbus; Cortex: Kortex; CTS: Follikuläre Bindegewebsscheide; DP: Dermale Papille; Hair cuticle: Kutikula; HS, Hair shaft: Haarschaft; IRS: Innere Wurzelscheide; Layer: Schicht; M, Matrix: Haarmatrix; ORS: Äußere Wurzelscheide; SG: Talgdrüse; Suprabulbar region: Suprabulbäre Region. Abbildung aus Schneider *et al.*, 2009 Abbildung 1.

Der HF ist von einer follikulären Bindegewebsscheide (CTS) umgeben und wird von distal nach proximal in die Abschnitte Infundibulum, Isthmus, suprabulbäre Region und Haarbulbus (**Bulbus**) gegliedert (siehe Abbildung 1.1.A). Das Infundibulum bezeichnet den Abschnitt von der oberflächlichen Epitheleinstülpung, dem *Ostium*, bis zur Einmündung des Talgdrüsenausführungsganges (Schneider und Paus, 2014). Proximal davon liegt der Isthmus, der bis zum Ansatz des *Musculus arrector pilorum* (APM) reicht. Am Ansatz des APM ist die äußere Wurzelscheide (ORS) nach peripher gewölbt und wird als Wulstregion (**bulge**) bezeichnet (siehe Abbildung 1.1.B). Sie dient als Hauptreservoir follikulärer

Stammzellen (Tiede *et al.*, 2007; Jaks *et al.*, 2010). Als suprabulbäre Region wird der Abschnitt zwischen Isthmus und Bulbus bezeichnet (siehe Abbildung 1.1.A). Der Bulbus bildet das proximale Ende des HF (siehe Abbildung 1.1.C). Im Folgenden werden anatomischen Details erläutert, die zum Verständnis der Arbeit erforderlich sind.

Der Bulbus beinhaltet stark proliferierende Haarmatrixkeratinozyten, melaninbildende Melanozyten und melanozytäre Vorläuferzellen sowie die proximalen Anteile von innerer Wurzelscheide (**IRS**) und ORS und (siehe Abbildung 1.1.C, D). Der Bulbus umschließt die dermale Papille (**DP**) in den Anagenphasen (siehe Abbildung 1.1.C) und interagiert mit ihr (Morgan, 2014).

Die ORS ist ein keratinozytäres Kompartiment, das *per continuitatem* mit dem epidermalen *Stratum basale* verbunden ist (siehe Abbildung 1.1.A). Sie begrenzt den HF nach peripher und steht über die Basalmembran in Verbindung mit der CTS (Panteleyev *et al.*, 2001; Schneider *et al.*, 2009). In ihren bulbusnahen Anteilen beherbergt die ORS keratinozytäre und melanozytäre Vorläuferzellen (Horikawa *et al.*, 1996; Klatte, 2008).

Die IRS liegt zwischen ORS und Haarschaft (**HS**) (siehe Abbildung 1.1). Sie dient der Bildung des zentral liegenden HS durch Keratinisierung von Haarmatrixkeratinozyten (Schneider *et al.*, 2009).

1.2.2 Haarzyklus

HF durchlaufen wiederkehrende Phasen des Aufbaus (Anagen), der Regression (Katagen) und der relativen Ruhe (Telogen), die Haarzyklus genannt werden (siehe Abbildung 1.2). Die zyklischen Veränderungen betreffen alle follikulären Kompartimente und Zellpopulationen (Peters *et al.*, 2001; Krause und Foitzik, 2006). Allerdings kann der HF in einen permanenten distalen Anteil (Infundibulum, Isthmus und *bulge*) und einen nahezu vollständig reversiblen proximalen Anteil (Bulbus und suprabulbäre Region) gegliedert werden (Oh *et al.*, 2016).

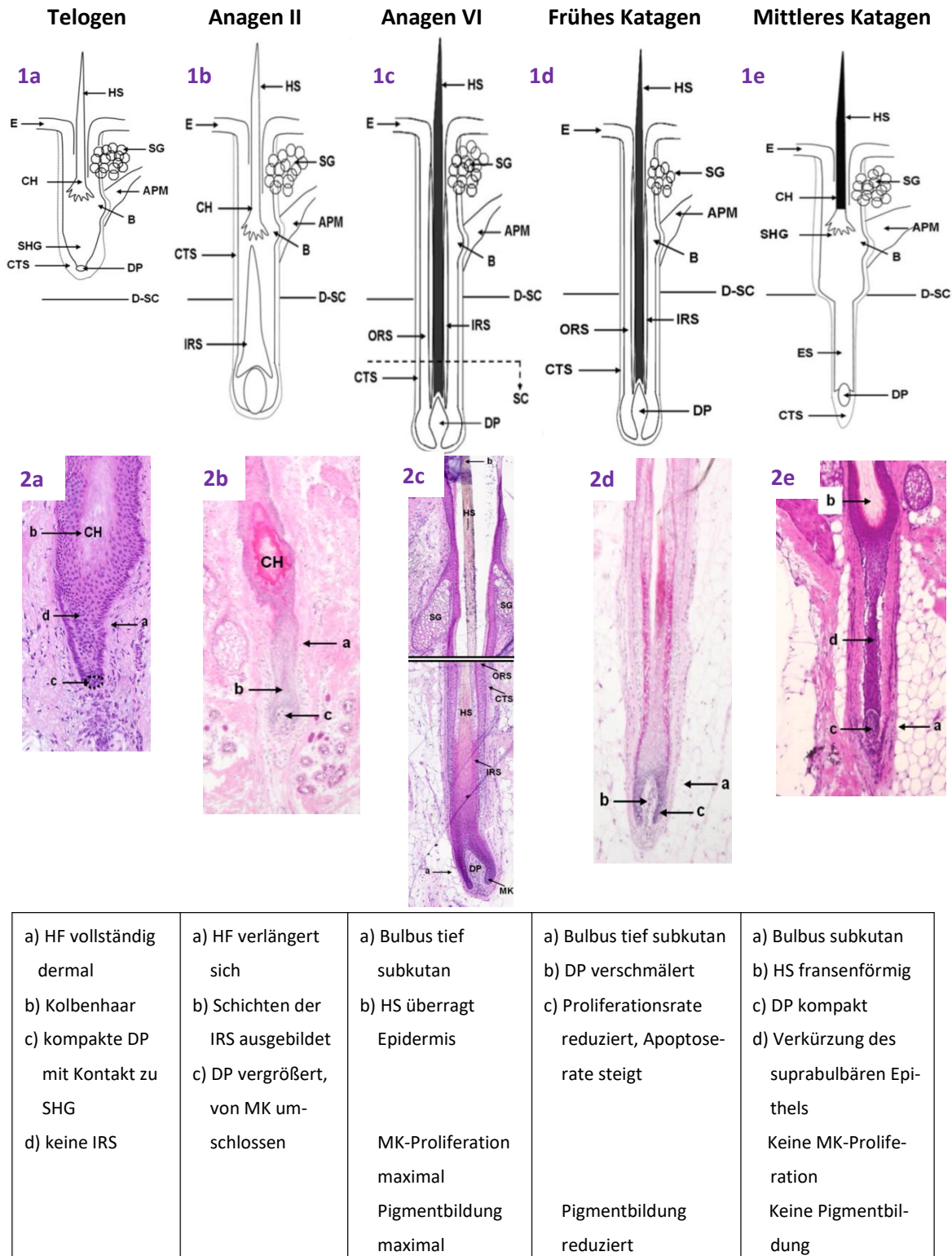


Abbildung 1.2 Phasen des Haarzyklus.

Die morphologischen Veränderungen der Phasen des Haarzyklus werden schematisch (1a-1e) und *in situ* (2a-2e) dargestellt. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (2a-2e). APM: *Musculus arrector pilorum*; B: Wulstregion; CH: Kolbenhaar; CTS: Follikuläre Bindegewebsscheide; DP: Dermale Papille; D-SC: Dermosubkutane Grenze; E: Epidermis; ES: Epithelbrücke; HS: Haarschaft; IRS: Innere Wurzelscheide; MK: Haarmatrixkeratinozyten; ORS: Äußere Wurzelscheide; SC: Tiefe Subkutis; SG: Talgdrüse; SHG: Sekundärer Haarkeim. Abbildung modifiziert aus Klöpper *et al.*, 2013b.

Das Anagen wird in sechs Phasen untergliedert. Das Katagen wird in acht Phasen untergliedert, wobei die Phasen I bis IV als frühes Katagen, V bis VI als mittleres Katagen und VII bis VIII als spätes Katagen bezeichnet werden (Klöpper *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2016). Der Übergang vom Anagen VI in das frühe Katagen wird als Anagen-Katagen-Transformation bezeichnet. Dabei verändert sich die follikuläre Biologie sehr stark (siehe Abbildung 1.2). Erste Zeichen sind die Reduktion der Pigmentbildung (siehe Kapitel 1.4.3) und die Volumenreduktion der DP (Stenn und Paus, 2001). Es folgen die Verringerung der Proliferationsrate und die ersten Apoptosen von Fibroblasten der DP, von Melanozyten sowie von Keratinozyten der Haarmatrix (**Matrix**), IRS und ORS (Stenn und Paus, 2001; Sharov *et al.*, 2005). Die suprabulbäre Region bildet sich zu einer Epithelbrücke zurück (siehe Abbildung 1.2.1e), wodurch sich der HF verkürzt und die DP nach distal aufsteigt. Der HS ist nur noch fransenförmig verankert und wird als Kolbenhaar (englisch *club hair*) bezeichnet (siehe Abbildung 1.2.1e, 2e). Der sekundäre Haarkeim bildet sich aus der *bulge* und initiiert zusammen mit der DP den neuen Haarzyklus (siehe Abbildung 1.2.1a, 2a).

1.2.3 Kontrolle des Haarzyklus

Der Haarzyklus wird durch funktionell gegensätzliche zelluläre (Muneeb *et al.*, 2019) und extrazelluläre Einflüsse (Plikus und Chuong, 2014; Bernard, 2016) reguliert. Es sind bereits zahlreiche Einflussfaktoren wie Zytokine, Aminosäuren und Hormone (Stenn und Paus, 2001; Paus *et al.*, 2014) oder Signalwege (Lee und Tumbar, 2012; Hawkshaw *et al.*, 2019) beschrieben worden (siehe Abbildung 1.3). Neuropeptide gelten als vielversprechende Forschungsobjekte, da sie durch die Beeinflussung mehrerer intrinsischer Faktoren zu einer komplexen Veränderung der Homöostase führen können (Botchkarev, 2003; Krause und Foitzik, 2006).

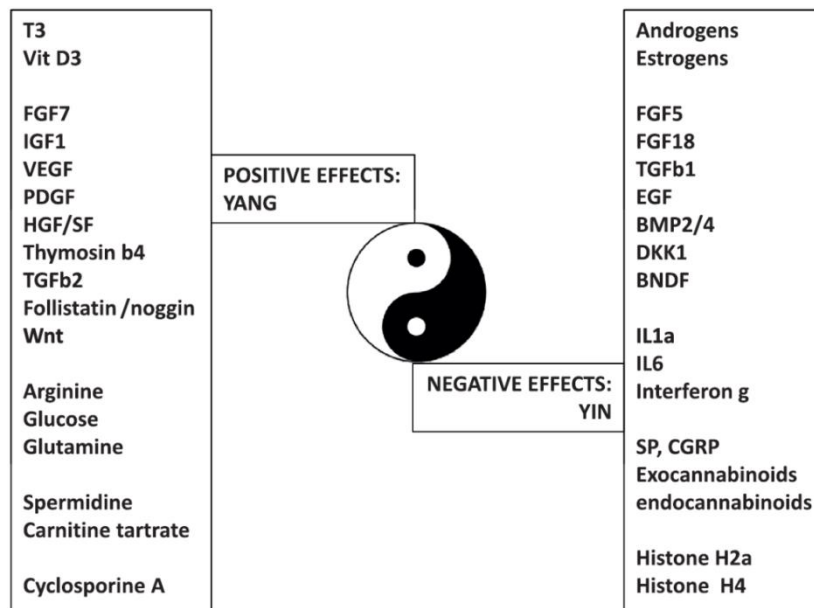


Abbildung 1.3 Übersicht diffusionsfähiger Einflussfaktoren des Haarzyklus.

Bernard beschreibt die Regulation des Haarzyklus als Ying/Yang Situation stimulierender und inhibierender Faktoren. BMP: Morphogenetisches Knochenprotein; BNDF: Aus dem Gehirn stammender neurotrophenischer Faktor; CGRP: Peptid des Calcitoninogens; DKK: Protein des Dickkopfgens; EGF: Epithelialer Wachstumsfaktor; FGF: Fibroblasten Wachstumsfaktor; HGF/SF: Hepatozytenwachstumsfaktor/Streuungsfaktor; IGF: Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor; IL: Interleukin; PDGF: Thrombozytenwachstumsfaktor; SP: Substanz P; T3: Triiodthyronin; TGF: Transformierender Wachstumsfaktor; VEGF: Wachstumsfaktor des Gefäßendothels; VitD3: Vitamin D3. Abbildung aus Bernard, 2016 Abbildung 3.

1.2.4 Innervation und Neuropeptide des Haarfollikels

Die Haut und Hautanhangsgebilde werden mittels horizontal verlaufender Nervenplexus innerviert, die sich subepidermal, tief dermal und subkutan befinden. Haarfollikel sind von einem dichten Netzwerk von Nervenfasern umgeben, das aus dem subepidermalen und subkutanen Nervenplexus gespeist wird (siehe Abbildung 1.4). Das follikuläre Nervengeflecht befindet sich in der CTS, liegt der Basalmembran dicht an, penetriert sie und innerviert die ORS (Hendrix *et al.*, 2008). Die permanenten Regionen des HF (siehe Kapitel 1.2.2) sind dichter innerviert als die reversiblen Regionen (siehe Abbildung 1.4).

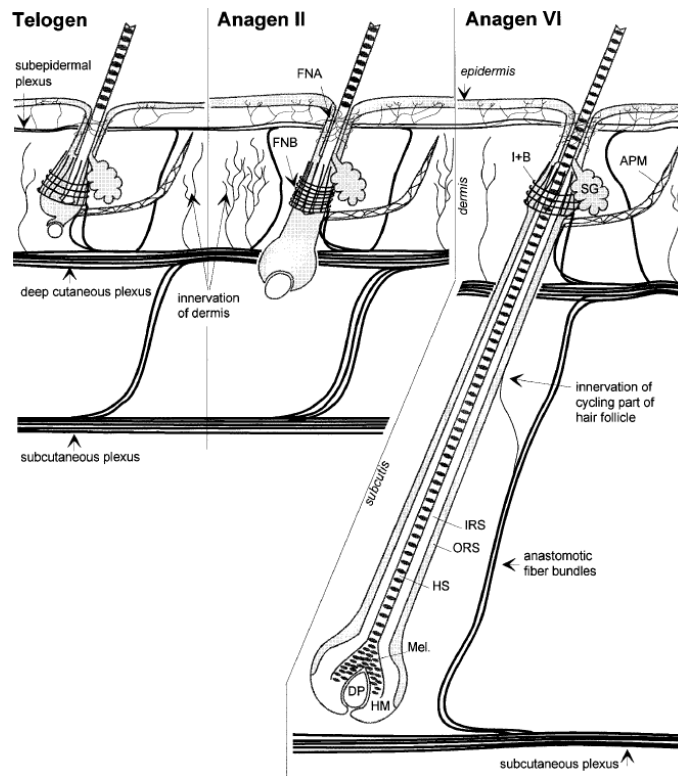


Abbildung 1.4 Anatomie der Haarfollikelinnervation.

Der murine Anagen VI Haarfollikel wird infundibulär durch ein diffuses Nervengeflecht und im Isthmus durch ein geordnetes Geflecht aus longitudinalen und zirkulären Nervenfasern innerviert. APM: *Musculus arrector pilorum*; B: Wulstregion; DP: Dermale Papille; FNA/B: Follikuläres Nervenetz A/B; HM: Haarmatrix; HS: Haarschaft; I: Isthmus; IRS: Innere Wurzelscheide; Mel: Melanozyt; ORS: Äußere Wurzelscheide; plexus: Nervengeflecht; SG: Talgdrüse; Abbildung aus Botchkarev *et al.*, 1997 Abbildung 1.

An murinen HF wurde gezeigt, dass sich die Innervation im Verlauf des Haarzyklus verändert (Paus *et al.*, 1997). Beim Übergang vom späten Anagen zum frühen Katagen reduziert sich die Nervenfaserdichte und beim Übergang vom Telogen zum frühen Anagen erhöht sie sich (siehe Abbildung 1.4).

Neuropeptide werden in Nervenzellkörpern gebildet und in Axonen zum Erfolgsorgan transportiert. Die Freisetzung kann über Varikositäten entlang des Axons erfolgen sowie über die axonalen Endigungen, welche in direktem Kontakt zu Keratinozyten, Melanozyten, Merkelzellen, Langerhanszellen, Mastzellen und Fibroblasten stehen (Hendrix *et al.*, 2008). Neuropeptide wirken autokrin und parakrin und werden nach der Sekretion zügig degradiert (Wallengren, 1997; Hendrix *et al.*, 2008).

1.3 Vasoaktives intestinales Peptid (VIP)

1.3.1 Struktur, Signalwege und Analoga

Das VIP besteht aus 28 Aminosäuren, gehört zur Familie der Sekretine und wurde erstmals 1970 aus dem oberen Gastrointestinaltrakt des Schweines isoliert (Said und Mutt, 1970).

Die Wirkung von VIP wird über die G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Klasse II VIP-Rezeptor 1, VIP-Rezeptor 2 und den Rezeptor 1 des hypophysären Adenylatzyklase aktivierende Polypeptids (**VPAC1**, **VPAC2** und **PAC1**) vermittelt (Harmar *et al.*, 1998). Die Affinität von VPAC1 und VPAC2 zu VIP ist gleich hoch. VPAC1 wird konstitutiv exprimiert, wohingegen VPAC2 induzierbar ist (Moody *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011). Die Affinität des PAC1 zu VIP ist 100-fach geringer als zu seinem Hauptliganden hypophysäres Adenylatzyklase aktivierendes Polypeptid (Fahrenkrug, 2010). Die Signaltransduktion erfolgt bei den drei Rezeptoren hauptsächlich über den Proteinkinase A-Signalweg. Es wurden auch alternative Signalwege nachgewiesen, an deren Signaltransduktion Phospholipase C, MAP-Kinase, Tyrosinkinasen oder aktivierte Kalziumkanäle beteiligt sind (Moody *et al.*, 2011; Moody *et al.*, 2016).

Es ist bekannt, welche strukturellen Merkmale zur Ligandenbindung an die VIP-Rezeptoren notwendig sind, sodass peptiderge Analoga mit unterschiedlicher Selektivität hergestellt wurden (Harmar *et al.*, 2012; Moody *et al.*, 2016). Die Analoga unterscheiden sich ebenfalls in der Aktivitätsdauer im Gewebe, da VIP nach Freisetzung durch die neutrale Endopeptidase und die aus Mastzellen stammenden Enzyme Chymase und Trypsin zügig inaktiviert wird (Groneberg *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2011).

1.3.2 Extrakutanes Vorkommen und Funktionen

Nach seiner Entdeckung im porcinen Intestinum, wurde das VIP in zahlreichen murinen und humanen Geweben isoliert, zu denen Gehirn, Hypophyse, Lunge, Herz, Nebenniere, Pankreas, Lymphknoten und Haut gehören. VIP und seine Rezeptoren werden überexprimiert in Malignomen wie Blase, Brust, Leber, Lunge, Pankreas, Prostata und

Schilddrüse (Moody *et al.*, 2016). VIP ist im zentralen Nervensystem, in sympathischen Ganglien, motorischen Nerven und im autonomen Nervensystem nachweisbar (Fahrenkrug, 1989; Fahrenkrug, 2010). Zellen des angeborenen Immunsystems können VIP exprimieren (Wu *et al.*, 2011; Gorky und Schwaber, 2019). In Tabelle 1.1 sind zelluläre Effekte des VIP und ihre potentielle Relevanz in der Pathogenese oder Therapie humaner Volkskrankheiten zusammengefasst.

Tabelle 1.1 Übersicht der extrakutanen Effekte des VIP.

IL: Interleukin; LPS: Lipopolysaccharid; TNF: Tumornekrosefaktor.

Organsystem/ Organ/ Gewebe	Zelluläre Effekte	Potentielle Relevanz in	Referenz
Gastrointestinaltrakt	Relaxation glatter Muskulatur	Peristaltikstörungen	Ben-Horin und Chowers, 2008
Gefäße	Endothelunabhängige Vasodilatation	Pulmonale arterielle Hypertonie	Wu <i>et al.</i> , 2011
Immunsystem	LPS-induzierte IL-6-Bildung↓ Neutrophileninfiltration↓	Sepsis	Ibrahim <i>et al.</i> , 2012
	Bildung freier Radikale↓ Phagozytoseaktivität↓ Bildung von Zytokine (IL-12, IL-16, TNFα)↓, (IL-10)↑	Asthma, Morbus Crohn, Rheumatoide Arthritis	Gonzalez-Rey <i>et al.</i> , 2007; Jiang <i>et al.</i> , 2016
Lunge	Bronchodilatation, Immundefizienz, Vasodilatation	Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung	Voisin <i>et al.</i> , 2017
Karzinome	Proliferation↑ Angiogenese↑	Karzinome in Blase, Brust, Lunge und Weiteren	Moody <i>et al.</i> , 2016

1.3.3 Kutanes Vorkommen und Funktionen

VIP-erge Nervenfasern haben Kontakt zu allen Schichten der Haut (Hartschuh *et al.*, 1984; Bertolini *et al.*, 2016b). Lymphozyten (Pincelli *et al.*, 1992), Mastzellen (Kulka *et al.*, 2008) und Merkelzellen (Hartschuh *et al.*, 1983a; Tachibana und Nawa, 2005) exprimieren VIP

und können folglich bei erhöhter Zellzahl als extraneuronale VIP-Quelle betrachtet werden, beispielsweise bei einer inflammatorischen Reaktion.

VPAC1 und VPAC2 werden intrakutan von Mastzellen (Kulka *et al.*, 2008), Lymphozyten, glatten Muskelzellen (Fischer *et al.*, 2001; Groneberg *et al.*, 2003) sowie in Epidermis und follikulärer ORS (Fischer *et al.*, 2001; Groneberg *et al.*, 2003) exprimiert. Die Biologie von epidermalen Melanozyten und Langerhanszellen ist durch VIP modulierbar, jedoch ist bisher kein Rezeptorstatus beschrieben worden (Hara *et al.*, 1996; Ding *et al.*, 2007). Für alle Effektorzellen ist ein dichter Kontakt zu VIP-ergen Nervenfasern beschrieben (Hartschuh *et al.*, 1984; Jarvikallio *et al.*, 2003; Kulka *et al.*, 2008). In Tabelle 1.2 sind kutane Effekte des VIP und ihre potentielle Relevanz für die Pathogenese kutaner Erkrankungen zusammengefasst.

Tabelle 1.2 Übersicht der kutanen Effekte des VIP.

HaCaT: Spontan immortalisierte Keratinozytenzelllinie; IL: Interleukin; LPS: Lipopolysaccharide; SCF: Stammzellfaktor; TH: T-Helferzelle; TNF: Tumornekrosefaktor; VEGF: Vaskulärer Endothelwachstumsfaktor.

Organ/ Zellpopulation	Wirkungen	Potentielle Relevanz in	Referenz
Gefäße	Endothelunabhängige Vasodilatation	Thermoregulationsstörungen	Kellogg <i>et al.</i> , 2010
Keratinozyten (HaCaT, Epidermis)	Proliferation↑, Synthese↑ von IL-6, SCF, VEGF	atopische Dermatitis, Psoriasis, Wundheilung,	Kakurai <i>et al.</i> , 2001; Kakurai <i>et al.</i> , 2002; Kakurai <i>et al.</i> , 2009; Chéret <i>et al.</i> , 2014
Langerhanszellen	Antigenpräsentation↓ LPS-induzierte TNFα-Sekretion↓	Hypersensitivitätsreaktionen, Infektionen	Ding <i>et al.</i> , 2007
Lymphozyten	Bildung von Zytokinen (IL-12, IL-16, TNFα)↓, (IL-10)↑ Neutrophileninfiltration↓ Modulation des TH ₁ /TH ₂ Verhältnisses	atopische Dermatitis, Hypersensitivitätsreaktionen Psoriasis	Chan <i>et al.</i> , 1997; Jarvikallio <i>et al.</i> , 2003; Kulka <i>et al.</i> , 2008; Reich und Szepietowski, 2008
Mastzellen	Chemokinbildung↑, Degranulation↑	atopische Dermatitis, Psoriasis	Jarvikallio <i>et al.</i> , 2003; Kulka <i>et al.</i> , 2008
Merkelzellen	Modulation der	atopische Dermatitis,	Hartschuh <i>et al.</i> , 1983b; Tachibana

	Sensitivität neuraler Endplatten	Prurigo	und Nawa, 2005
Schweißdrüsen	Schweißsekretion ↑	Hyperhidrose	Tainio, 1987

1.4 Biologie der kutanen Melanozyten

1.4.1 Melanin und Melanogenese

Unter dem Begriff Melanin werden alle Pigmente zusammengefasst, die durch Oxidation und Polymerisation von Tyrosin bei Tieren oder von phenolischen Verbindungen bei niederen Lebewesen entstehen (D' Ischia *et al.*, 2013). Das Haarmelanin befindet sich in Kortex und Medulla des HS (siehe Abbildung 1.1.D). Das Hautmelanin befindet sich innerhalb epidermaler Keratinozyten der *Strata basale et spinosum* (D' Mello *et al.*, 2016).

Melanogenese beschreibt die Bildung von Melanin aus L-Tyrosin (siehe Abbildung 1.5). Die Tyrosinase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Melanogenese (Tobin und Paus, 2001). Sie katalysiert allein oder zusammen mit den Tyrosinase zugehörigen Proteinen (**TYRP**) 1 und TYRP2 zahlreiche Reaktionsschritte der Melaninsynthese. Die Melaninbildung kann durch extrinsische und intrinsische Faktoren reguliert werden (D' Mello *et al.*, 2016). Zu den Extrinsischen gehören Alter (Seiberg, 2013), ultraviolette Strahlung (Liu und Fisher, 2010) oder das Epilieren (Li *et al.*, 2017) . Zu den Intrinsischen gehören mehr als 125 bekannten regulierende Gene (Yamaguchi *et al.*, 2007). Die Rezeptortyrosinkinase Kit (**c-Kit**) ist beteiligt an Migration, Differenzierung, Proliferation und Pigmentbildung (Botchkareva *et al.*, 2001). Nach Aktivierung von c-Kit durch seinen Liganden Stammzellfaktor wird der Mikroophthalmie-assoziierte Transkriptionsfaktor (**MITF**) über den Proteinkinase A-Signalweg aktiviert (siehe Abbildung 1.5)

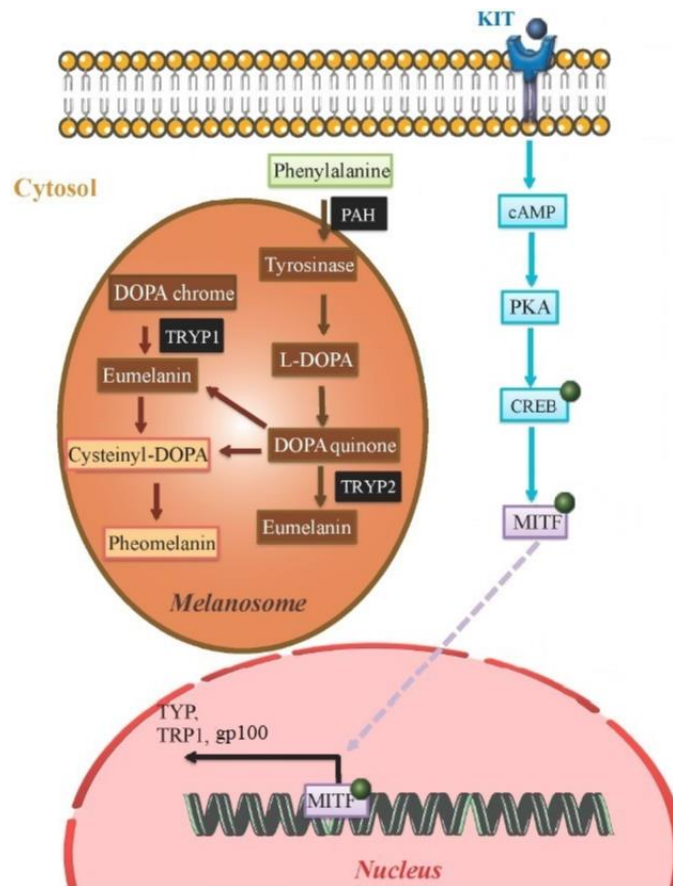


Abbildung 1.5 Melanogenese und Regulationsmechanismen.

Die Transkription zentraler Gene der Melanogenese wird durch den Mikrophthalmie-assoziierten Transkriptionsfaktor reguliert. Der grüne Punkt symbolisiert eine Phosphorylierung. cAMP: Zyklisches Adenosinmonophosphat; CREB: CAMP *response binding element binding protein*; KIT: Rezeptortyrosinkinase Kit; MITF: Mikrophthalmie-assoziiierter Transkriptionsfaktor; PAH: Phenylalaninhydroxylase; PKA: Proteinkinase A; TYP: Gen der Tyrosinase; TRP: Gen des Tyrosinase zugehörigen Proteins; TRYP1/2: Tyrosinase zugehöriges Protein. Abbildung modifiziert aus D' Mello *et al.*, 2016 Abbildung 2.

1.4.2 Melanozytenbiologie

Während der embryonalen Vertebrogenese migrieren Zellen der dorsalen Neuralleiste in die Epidermis. Pluripotenten Vorläuferzellen differenzieren zu bipotenten Vorläuferzellen und schließlich zu Melanoblasten (Thomas und Erickson, 2008). Mit beginnender HF-Morphogenese wandern Melanoblasten des epidermalen *Stratum basale* in den sich bildenden HF (Peters *et al.*, 2002; Tobin, 2011). Sie bilden im Verlauf der follikulären Morphogenese diverse Subpopulationen (siehe Abbildung 1.6 und Tabelle 1.3).

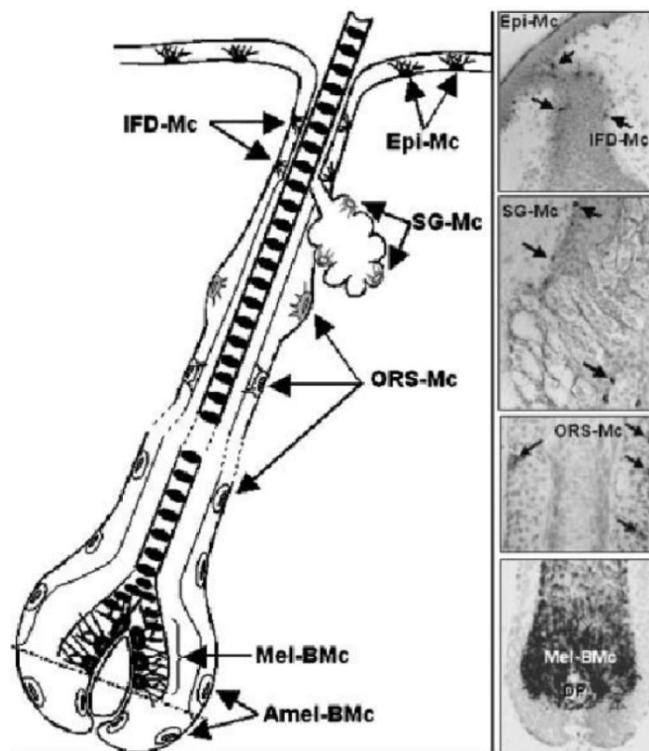


Abbildung 1.6 Melanozytenpopulationen des Haarfollikels.

Melaninbildende Melanozytenpopulationen befinden sich in Epidermis, Infundibulum, zentraler Haarmatrix und Talgdrüsenepithel. Amelanotische Melanozytenpopulationen befinden sich in *bulge*, äußerer Wurzelscheide sowie dem äußeren und proximalen Haarbulbus. Amel-BMc: Amelanotische bulbäre Melanozyten; DP: Dermale Papille; Epi: Epidermis; IFD: Infundibulum; Mc: Melanozyten; Mel-BMc: Melanotische bulbäre Melanozyten; ORS: Äußere Wurzelscheide; SG: Talgdrüse. Abbildung modifiziert aus Slominski *et al.*, 2005 Abbildung 1.

Die melanotischen Melanozytenpopulationen in der Epidermis und der zentralen Matrix bestehen aus großen Zellen, die mit langen Dendriten melaninhaltige Granula in die umgebenden Keratinozyten transferieren. Die melanotischen Melanozyten in den Basalzellschichten der infundibulären ORS und des Talgdrüsenepithels sind kleiner und besitzen nur wenige, kurze Dendriten (Slominski *et al.*, 2005; Tobin, 2011).

Die nicht-melanotischen, gering differenzierten Subpopulationen befinden sich in der *bulge*, der suprabulbären ORS sowie den äußeren und proximalen Anteilen des Bulbus. In der Basalzellschicht der *bulge* befinden sich melanozytäre Vorläuferzellen mit Stammzeleigenschaften. Sie sind phänotypisch undifferenziert, das heißt die Zellen sind klein, rund, pigmentfrei, besitzen keine Dendriten und exprimieren kein c-Kit. Daneben beherbergt die *bulge* auch gering differenzierte, c-Kit exprimierende Melanoblasten

(Peters *et al.*, 2001; Kauser *et al.*, 2005; Tobin, 2011). In Tabelle 1.3 werden die melanozytären Subpopulationen des HF verglichen.

Tabelle 1.3 Vergleich follikulärer melanozytärer Subpopulationen.

Die Daten stammen aus humanen und murinen Haarfollikeln im mittleren und späten Anagen. C-Kit: Rezeptortyrosinkinase Kit; DOPA: Levodopa; ORS: Äußere Wurzelscheide; TRP1/2: Tyrosinase zugehöriges Protein 1/2.

Melanozytäre Subpopulation	Markerproteine					Referenz
	Tyrosinase	TRP1	TRP2	c-Kit	DOPA	
Infundibuläre Melanozyten	Keine Daten				+	Tobin, 2011
Melanoblasten der Wulstregion	-	-	+	+/-	Keine Daten	Peters <i>et al.</i> , 2002; Nishimura, 2011; Tobin, 2011
Vorläuferzellen der suprabulbären und bulbären ORS	-	-	-	+	+/-	Botchkareva <i>et al.</i> , 2001; Peters <i>et al.</i> , 2002
Vorläuferzellen der inneren Haarmatrix	-	Keine Daten		+	+	Botchkareva <i>et al.</i> , 2001; Peters <i>et al.</i> , 2002
Melanozyten der zentralen Haarmatrix	+	+	+	+	+	Botchkareva <i>et al.</i> , 2001; Peters <i>et al.</i> , 2002; Nishimura, 2011; Tobin, 2011

1.4.3 Anagen-Katagen-Transformation

In der Anagen VI Phase sind die Melanozyten der zentralen Matrix groß, pigmentiert und besitzen lange Dendriten. Die Rate der Melaninsynthese ist maximal (siehe Abbildung 1.2). Beim Übergang in die frühe Katagenphase verkürzen sich die Dendriten. Es reduzieren sich Tyrosinaseaktivität, Melanosomenbildung und Melanosomenübertragung (Slominski und Paus, 1993; Sharov *et al.*, 2005). Mit fortschreitender HF-Regression kommt es zur Apoptose der melanotischen Melanozyten (Tobin *et al.*, 1998). Am Ende der Katagenphase enthält der HF keine pigmentierten Melanozyten mehr (siehe Abbildung 1.2). Jedoch beherbergt der sekundäre Haarkeim melanozytäre Vorläuferzellen

aus denen sich im nächsten Haarzyklus die melanozytären Subpopulationen der reversiblen follikulären Anteile regenerieren (Sharov *et al.*, 2005; Tobin, 2011).

1.5 Ziel dieser Arbeit und spezifische Fragestellungen

Das Neuropeptid VIP moduliert die Eigenschaften zahlreicher kutaner Effektoren (siehe Tabelle 1.2) und ist an der Pathogenese von Psoriasis und atopischer Dermatitis beteiligt (Jarvikallio *et al.*, 2003; Umemoto *et al.*, 2003; Reich und Szepletowski, 2008). Über den Einfluss des VIP auf die Physiologie des HF, auf HF-assoziierte Erkrankungen oder auf die follikuläre Pigmentbildung ist wenig bekannt.

Ziel dieser Studie ist die Erforschung des Einflusses von VIP auf die Keratinozyten und Melanozyten der Matrix am Modell kultivierter isolierter HF. Es werden folgende spezifische Fragestellungen formuliert:

- 1) Wo wird VIP follikulär und perifollikulär exprimiert?
- 2) Wie sind die VIP-Rezeptoren follikulär verteilt?
- 3) Wird die endogene Expression von VIP und seinen Rezeptoren durch die Behandlung mit VIP beeinflusst?
- 4) Beeinflusst die Behandlung mit VIP die Proliferation von Matrixkeratinozyten *in situ*?
- 5) Beeinflusst die Behandlung mit VIP die keratinozytären Vorläuferzellen der suprabulbären Region *in situ*?
- 6) Wie wirkt sich die Behandlung mit VIP auf die Anagen-Katagen-Transformation und das Haarwachstum aus?
- 7) Wie wirkt sich die Behandlung mit VIP auf follikuläre Melanozyten und ihre bulbären Vorläuferzellen aus?
- 8) Beeinflusst die Behandlung mit VIP die follikuläre Melanogenese?

1.6 Experimentelles Design

Für die Studienplanung waren detaillierte Kenntnisse über die follikuläre Physiologie des VIP und seiner Rezeptoren notwendig. Dazu wurden an Vollhautbiopsaten gesunder Patientinnen sowohl die Genexpression mittels Echtzeit quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (**RT-qPCR**) als auch die Proteinexpression mittels Immunfluoreszenzfärbungen und immunhistochemischen Färbungen untersucht.

Die biochemischen Veränderungen der HF nach Behandlung mit VIP wurden an mikrodisszierten, kultivierten HF erforscht. Dazu wurden RT-qPCR, Immunfluoreszenzfärbungen und immunhistochemische Färbungen verwendet. Insgesamt sollten drei Zielgene und 11 Zielproteine analysiert werden (siehe Tabelle 1.4). Wenn möglich, sollten Methoden gewählt werden, die eine detaillierte Beurteilung der Zellmorphologie erlauben.

Tabelle 1.4 Übersicht der verwendeten biochemischen Zielstrukturen.

CK15/19: Zytokeratin 15/19; c-Kit: Rezeptortyrosinkinase Kit; MITF: Mikrophthalmie-assoziiierter Transkriptionsfaktor; TUNEL: *terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate nick end labelling*; VIP: Vasoaktives intestinales Peptid; VPAC1/2: VIP-Rezeptor 1/2.

Zielparameter	Markerprotein
Quantitative Transkriptmengenbestimmung	VIP, VPAC1, VPAC2
Ausmaß der Expression von VIP-Rezeptoren	VPAC1, VPAC2
Haarzyklusphase	Ki-67, Melanin
Apoptose von Keratinozyten	TUNEL
Keratinozytendifferenzierung	CK15, CK19
Proliferation von Keratinozyten	Ki-67
Melanozytendifferenzierung und melanozytäre Pigmentbildung	Melanin, c-Kit, gp100, MITF, Tyrosinaseaktivität

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Die Materialien, welche zur Darstellung der Methodik erforderlich gewesen sind, werden im Fließtext genannt und gegebenenfalls erläutert. Eine Auflistung aller verwendeten Materialien befindet sich im Anhang in Kapitel 9.2.

2.2 Humane Gewebeproben

2.2.1 Kopfhautresektate

Gemäß den Prinzipien der Deklaration von Helsinki (*World Medical Association*) wurden alle Experimente an menschlichem Gewebe mit Einverständnis der Ethikkommission der Universität zu Lübeck durchgeführt, Ethikantrag 06-109 vom 18.07.2006 (siehe Kapitel 9.1.1). Die Zusendung von Kopfhautresektaten erfolgte nach Patientenaufklärung und Einverständnis durch den entnehmenden Plastischen Chirurgen (Klöpfer *et al.*, 2015; Bertolini *et al.*, 2016b; Vidali *et al.*, 2016). Es wurde nur klinisch gesunde Kopfhaut von klinisch gesunden Patienten versendet (siehe Abbildung 2.1).



Abbildung 2.1 Humane Kopfhautresektate.

Es wurden Kopfhautresektate aus Face-Lift-Operationen verwendet. Abbildung aus Bertolini, 2014 Abbildung 2.1.

Die Resektate stammten aus den *regiones frontotemporales et occipitales* von Frauen (n=17). Das Alter der Frauen betrug im Durchschnitt 54,6 Jahre und reichte von 42 bis 69 Jahren (siehe Tabelle 9.1). Zur Vermeidung einer raschen Degeneration der HF, war eine hohe Probenqualität erforderlich. Es wurden nur Resektate weiterverarbeitet, die folgende Kriterien erfüllten:

- 1) Ununterbrochener Transport in William's E Medium bei 4 °C,
- 2) Leuchtendrote Farbe des William's E Mediums bei Ankunft im Labor (Der Farbumschlag des enthaltenden pH-Indikators Phenolrot deutet auf eine Degradation des Biomaterials während des Transportes hin.),
- 3) Unversehrtheit der Probe (Hautstruktur makroskopisch intakt),
- 4) Ankunft und Weiterverarbeitung innerhalb von 24 Stunden nach der Operation.

2.2.2 Gewebe für Positivkontrollen

Humane Gewebe von Tonsille, Plazenta, Hypophyse und Dünndarm wurden vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck mit Genehmigung der Ethikkommission der Universität zu Lübeck bereitgestellt, Ethikantrag 06-109 vom 18.07.2006 (siehe Kapitel 9.1.2). Die Proben wurden zur Qualitätskontrolle und Etablierung der Immunfluoreszenzfärbungen verwendet. Für Kontrollproben humaner behaarter Vollhaut wurden die Resektate aus Tabelle 9.1 verwendet.

2.3 Isolierung und Kultivierung der Haarfollikel

2.3.1 Mikrodissektion der Anagen VI Haarfollikel

HF-Mikrodissektion bezeichnet das Herauslösen von HF aus Vollhaut nach horizontaler Durchtrennung der Dermis. Die Methode wurde von Philpott *et al.* erstbeschrieben (Philpott *et al.*, 1990). Der aktuelle Standard wurde von Langan *et al.* publiziert (Langan *et al.*, 2015). Im Anschluss an die Mikrodissektion erfolgte die stereomikroskopische Qualitätskontrolle der isolierten HF (siehe Abbildung 2.2). Für die Kultivierung wurden nur unbeschädigte, pigmentierte HF in der späten Anagenphase (Alam *et al.*, 2018), ohne extrafollikuläre Gewebereste und mit vollständig erhaltener CTS verwendet (siehe Abbildung 2.2.C).

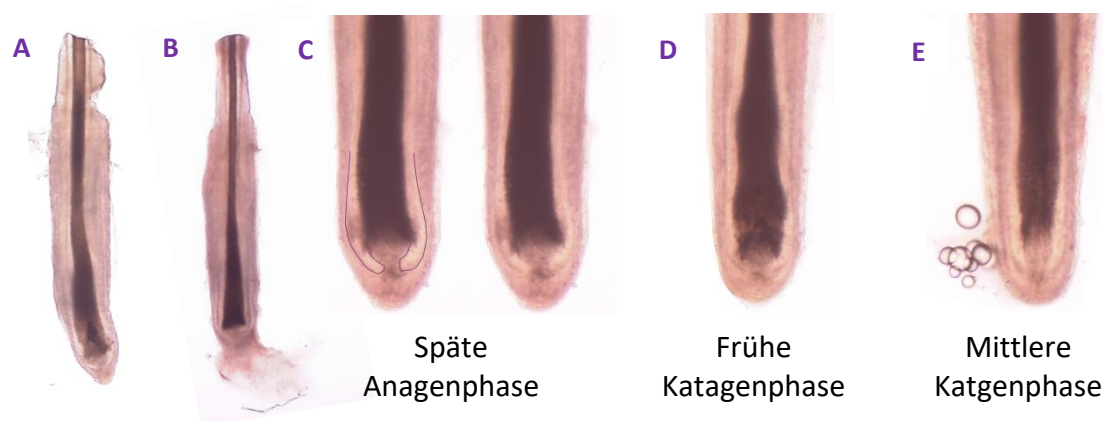


Abbildung 2.2 Stereomikroskopische Qualitätskontrolle mikrodisezierter Haarfollikel.

Die Haarfollikel wurden auf sichtbare Beschädigung (A) und ausreichende Trennung von der Subkutis oder sonstigen Anhangsgeweben geprüft (B). Im Anschluss wurden die Haarfollikel nach ihrer morphologischen Haarzyklusphase selektiert (C-E). In Abbildung C markieren die Hilfslinien die äußere Grenze des bulbären Epithels.

2.3.2 Kultivierung der Haarfollikel

Kultivierung und Inkubation der mikrodisezierten HF (siehe Abbildung 2.3) erfolgte nach den aktuellen wissenschaftlichen Standards (Langan *et al.*, 2015) anhand von drei Protokollen (siehe Tabelle 2.1).

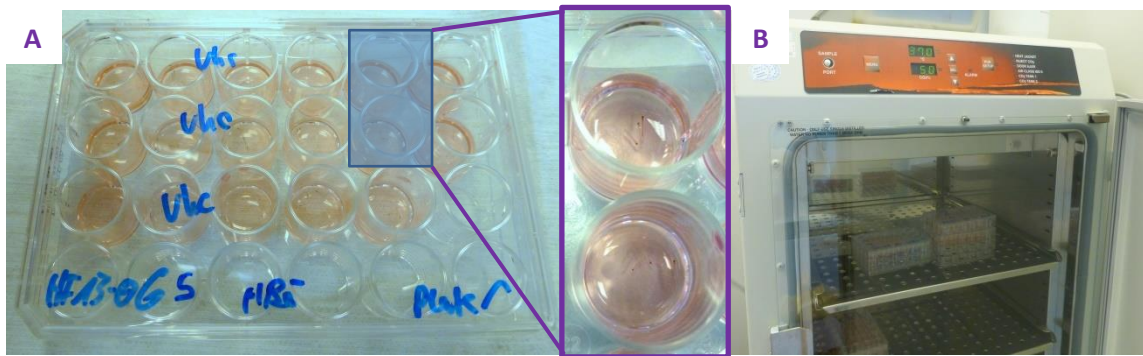


Abbildung 2.3 Kultivierung mikrodissasierter Haarfollikel.

Nach Überführung von 3 Haarfollikeln pro Well in eine 24-Well Titerplatte (A) wurden die Haarfollikel bei 37°C im 5%/95% Kohlenstoffdioxid/Luftgemisch inkubiert (B).

Tabelle 2.1 Übersicht der verwendeten Kulturprotokolle.

Die kultivierten Haarfollikel wurden für die Echtzeit quantitative Polymerase-Kettenreaktion (Protokoll A), Immunfluoreszenzfärbungen (Protokoll B) oder die Untersuchung des Haarwachstums verwendet (Protokoll C). Der Behandlungsgruppe wurde 0,3 $\mu\text{mol/L}$ vasoaktives intestinales Peptid (VIP) über das Kulturmedium zugesetzt. Die Kontrollgruppe wurde dabei mit Kulturmedium inkubiert, dem das Lösungsmittel des VIP zugesetzt war. Länge: Messung der Haarfollikellänge.

A	0 Stunden	6 Stunden
	Mikrodissektion und Behandlung	Einbettung

B	0 Stunden	24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden
	Mikrodissektion und Länge	Länge und Behandlung	Ruhe	Länge und Einbettung

C	0 Stunden	24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden
	Mikrodissektion und Länge	Länge und Behandlung	Ruhe	Länge und Behandlung
	96 Stunden	120 Stunden	144 Stunden	168 Stunden
	Ruhe	Länge und Behandlung	Ruhe	Länge und Einbettung

2.3.3 Messung des Haarwachstums

Haarwachstum beinhaltet die Verlängerung von ORS, IRS und HS (Miranda *et al.*, 2018). Die Messungen erfolgten nach den etablierten Standards (Langan *et al.*, 2015) entsprechend der Protokolle (siehe Abbildung 2.4 und Tabelle 2.1).

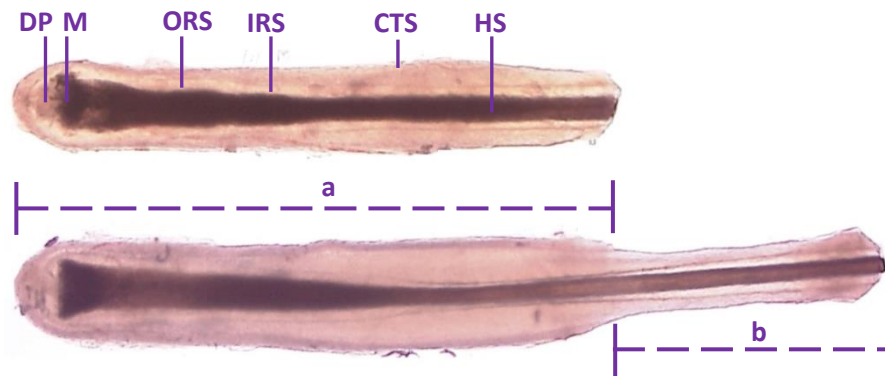


Abbildung 2.4 Darstellung des Haarwachstums.

Die Haarfollikellänge beschreibt den Abstand zwischen dem proximalen Haarbulbus und dem distalen Ende des Haarschaftes (a). Während der Kultivierung verlängerte sich der Haarfollikel (b). Originalvergrößerung 400-fach. CTS: Follikuläre Bindegewebsscheide; DP: Dermale Papille; HS: Haarschaft; IRS: Innere Wurzelscheide; M: Haarmatrix; ORS: Äußere Wurzelscheide.

2.3.4 Fixierung und Einbettung der Haarfollikel

Bei geplanter Einbettung in Paraffin wurden die HF in 4 % Paraformaldehyd in destilliertem Wasser (***Aqua dest.***) überführt und mindestens eine Stunde fixiert (siehe Abbildung 2.5.A-C). Die chemische Einbettung erfolgte maschinell über Nacht durch die dermatohistopathologische Abteilung der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie des UKSH Campus Lübeck (Bertolini, 2014).

Bei der mechanischen Einbettung wurden die Proben in einem stählernen Wännchen ausgerichtet, mit 60 °C heißem Paraffin übergossen, mit der Einbettkassette bedeckt, bei -10 °C ausgehärtet (siehe Abbildung 2.5.D) und bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

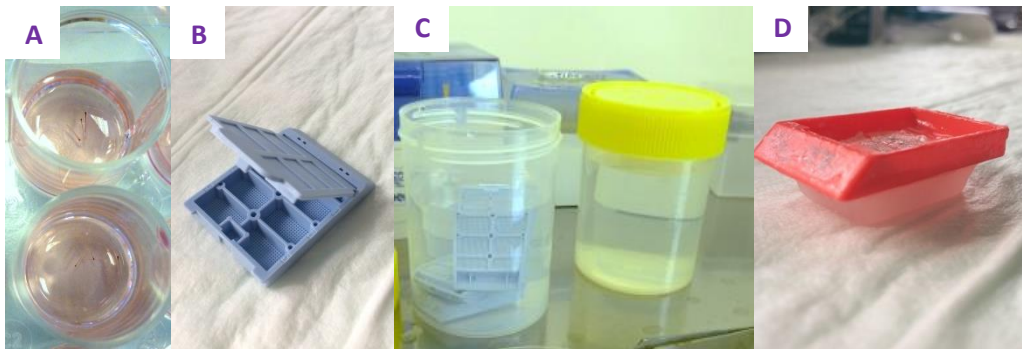


Abbildung 2.5 Methode der Formaldehydfixierung und Paraffineinbettung.

Ein Haarfollikel wurde aus einem Well (A) in eine Einbettungskassette (B) überführt und in 4 % Paraformaldehydlösung fixiert (C). Am Ende der Einbettung befand sich der Haarfollikel in einem Paraffinblock (D).

Bei der Kryofixierung wurden die drei HF eines Wells schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. War eine RT-qPCR geplant, wurden Ribonuklease freie Reaktionsgefäße verwendet (Bertolini, 2014).

2.3.5 Vorbereitung der eingebetteten Proben

Die Paraffinblöcke wurden mit einem handelsüblichen Tiefkühlgerät auf -20°C abgekühlt und mit einem Leica RM 2255 Mikrotom und $4\text{ }\mu\text{m}$ Schnittdicke geschnitten. Die Rehydrierung paraffinierter Gewebeschnitte erfolgte über Xylol und eine absteigende Alkoholreihe. Die Antigendemaskierung erfolgte je nach Protokoll durch Erhitzen in Natriumcitrat-Puffer (pH 6,1) oder Tris-EDTA-Puffer (pH 9,0) über 20 min in einer handelsüblichen Mikrowelle (Bertolini, 2014).

Kryofixierte, in Cryomatrix eingebettete, HF-Triplets wurden mit einem Leica 3500-Kryostat und $7\text{ }\mu\text{m}$ Schnittdicke geschnitten. Nach dem Trocknen der Gewebeschnitte über 10 min bei RT, erfolgte je nach Protokoll die Fixierung in Aceton für 10 min bei -20°C , in Methanol-Aceton-Lösung (1:1) für 10 min bei -20°C oder in 1 % Paraformaldehyd in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) für 10 min bei RT. Auf die Fixierung mit 1 % Paraformaldehyd in PBS folgte eine Postfixierung mit Ethanol-Eisessig-Lösung (2:1) über 5 min bei -20°C .

Für die Waschschritte wurden Tris-gepufferte Salzlösung (**TBS**), PBS oder Tris-Natriumchlorid-Tween Puffer (**TNT**) verwendet. Die Inkubationsschritte fanden in feuchten Objektträgerkammern oder Färbekästen nach Hellendahl und Hecht statt (siehe Abbildung 2.6).

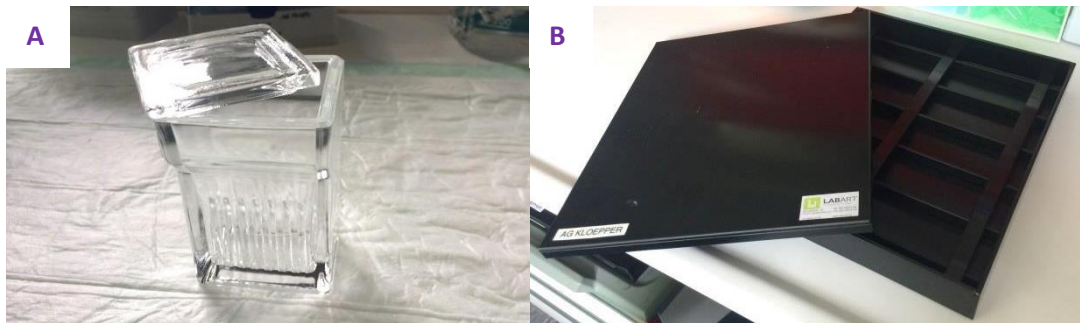


Abbildung 2.6 Material für Waschschritte und Inkubationsschritte.

Feuchte Objektträgerkammern (A) wurden für Wasch- und Inkubationsschritte verwendet. Färbekästen nach Hellendahl und Hecht (B) wurden für die Inkubation verwendet, wenn kleine Volumina auf die Objektträger pipettiert werden mussten.

2.4 Histochemische Färbung

2.4.1 Fontana-Masson-Färbung

Die Fontana-Masson-Färbung stellt argentaaffine Moleküle dar (Barbosa *et al.*, 1984). Sie wurde zur Bestimmung von Melaningehalt und Haarzyklusphase verwendet.

Die Vorbereitung der Gewebeschnitte erfolgte wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben. Für die Rehydratisierung paraffinierter HF wurde Natriumcitrat-Puffer verwendet. Die Fixierung kryofixierter HF-Triplets erfolgte mit 1 % Paraformaldehyd in PBS und Ethanol-Eisessig-Lösung (Bertolini, 2014). Die Inkubation in 10 %iger ammoniakalischer Silbernitratlösung unter Lichtabschluss im Inkubator sättigte die Gewebe mit Silberionen auf. Durch Zugabe von Natriumthiosulfat erfolgten Reduktion und Ausfällung der Silberionen (Klöpper *et al.*, 2010).

2.5 Immunfluoreszenz- und immunhistochemische Färbungen

2.5.1 Primärantikörper und Sekundärantikörper

Tabelle 2.2 Übersicht der verwendeten Primärantikörper.

Hersteller: Abcam (Cambridge, Großbritannien); DAKO (Glostrup, Dänemark); EMD Millipore (Billerica, Vereinigte Staaten von Amerika); Novus Biologicals (Wiesbaden, Deutschland); Progen Biotechnik (Heidelberg, Deutschland); Sanbio Monosan, (Uden, Niederlande). pAb: Polyklonaler Antikörper.

Ziel-antigen	Herkunft	Klon	Verdün-nung	Hersteller	Katalog-nummer	Referenz
CK15	Maus	LHK15	1:100	EMD Millipore	CBL272	Ramot <i>et al.</i> , 2015
CK19	Maus	Ks19.1 (A53-B/A2)	1:200	Progen Biotechnik	61010	Ramot <i>et al.</i> , 2015
c-Kit	Hase	pAb	1:400	DAKO	A4502	Peters <i>et al.</i> , 2007; Bertolini <i>et al.</i> , 2014
gp100	Maus	NKI/beteb	1:200	Sanbio Monosan	MON7006	Hachiya <i>et al.</i> , 2009; Samuelov <i>et al.</i> , 2013
Ki-67	Maus	MIB-1	1:20	DAKO	M7240	Cattoretti <i>et al.</i> , 1992; Langan <i>et al.</i> , 2015
MITF	Maus	D5	1:25	DAKO	M3621	Samuelov <i>et al.</i> , 2013
VIP	Hase	pAb	1:50	Abcam	ab8556	Samarasinghe <i>et al.</i> , 2010; El-Shazly <i>et al.</i> , 2013
VPAC1	Hase	pAb	1:200	Novus Biologicals	NBP1-89640	Keine Referenz vorhanden.
VPAC2	Hase	pAb	1:100	Abcam	ab28624	Kulka <i>et al.</i> , 2008

Tabelle 2.3 Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper.

Hersteller: Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland); Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, Vereinigte Staaten von Amerika); Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland). JIR: Jackson ImmunoResearch Laboratories.

Antikörper	Konjugation	Verdün-nung	Hersteller	Katalog-nummer	Referenz
Ziege anti-Hase	Biotin	1:200	JIR	111-065-045	Peters <i>et al.</i> , 2007
Ziege anti-Hase	Alexa Fluor 488	1:400	Invitrogen	A-11008	Hardman <i>et al.</i> , 2015
Ziege anti-Maus	Alexa Fluor 488	1:400	Invitrogen	A-11001	Mo <i>et al.</i> , 2016; Sun <i>et al.</i> , 2017

Ziege anti-Maus	Alexa Fluor 546	1:400	Invitrogen	A-11030	Murayama <i>et al.</i> , 2015; Sun <i>et al.</i> , 2017
Ziege anti-Maus	Biotin	1:200	Beckmann Coulter	PNIM 0816	Peters <i>et al.</i> , 2007
Ziege anti-Maus	Rhodamin	1:200	JIR	115-295-062	Van Beek, 2010

2.5.2 Immunfluoreszenzfärbungen

Die Antigenvisualisierung erfolgte durch die Methode der indirekten Immunfluoreszenzfärbung (IF) (Bertolini *et al.*, 2014; Langan *et al.*, 2015; Ramot *et al.*, 2015) oder die Tyramid Signal Amplifikationsmethode (TSA) (Samuelov *et al.*, 2013; Bertolini *et al.*, 2016b). Bei geplanter Darstellung von zwei Zielantigenen wurden die Zielantigene auf der gleichen Gewebeprobe nacheinander gefärbt (siehe Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4 Übersicht der verwendeten Immunfluoreszenzfärbungen.

CK: Zytokeratin; c-Kit: Rezeptortyrosinkinase Kit; IF: Immunfluoreszenzfärbung; MITF: Mikroophthalmie-assoziiertes Transkriptionsfaktor; 1 % PFH: 1 % Paraformaldehyd in Phosphat-gepufferter Salzlösung; TSA: Tyramid Signal Amplifikationsmethode; TUNEL: *terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate nick end labelling*; VPAC1/2: VIP-Rezeptor 1/2.

Antigen	Demaskierung/Fixierung	1. Detektionssystem	2. Detektionssystem
CK15/CK19	Tris-EDTA Puffer	TSA	TSA
c-Kit/gp100	Tris-EDTA Puffer	TSA	Indirekte IF (Alexa Fluor 488)
Ki-67/c-Kit	Natrium-Citrat Puffer	Indirekte IF (Alexa Fluor 546)	Indirekte IF (Alexa Fluor 488)
Ki-67/TUNEL	Natrium-Citrat Puffer (paraffiniert) oder 1 % PFH (kryofixiert)	Indirekte IF (Rhodamin)	<i>ApopTag Fluorescein in situ Apoptosis Detection Kit</i>
MITF	Aceton	Indirekte IF (Alexa Fluor 488)	-
Tyrosinase-aktivität	Methanol/Aceton	TSA mit Chromogen Cy3	-
VPAC1/VPAC2	Tris-EDTA Puffer	TSA	Indirekte IF (Alexa Fluor 488)

Die Inkubation der Gewebeproben mit 10 % Ziegennormalserum führt zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die Inkubation mit dem gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichteten Immunglobulin G-Sekundärantikörpers erfolgte über 45 min bei RT (Bertolini, 2014). Die Sekundärantikörper waren gekoppelt mit Rhodamin, Alexa Fluor 488 oder Alexa Fluor 546. In Tabelle 2.2 und Tabelle 2.3 sind alle für die Datenerhebung verwendeten Primärantikörper und Sekundärantikörper aufgelistet.

Nach Applikation des ersten Detektionssystems erfolgten alle weiteren Schritte unter Lichtabschluss. Zur Gegenfärbung wurde 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (**DAPI**) verwendet, das sich in doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (**DNS**) einlagert und nach Anregung blaues Licht emittiert ($\lambda=461$ nm).

2.5.3 Tyramid Signal Amplifikationsmethode

Die TSA wurde mit dem „TSA Fluorescein System“ und dem „TSA Tetramethylrhodamine System“ durchgeführt (Sugawara *et al.*, 2013; Ramot *et al.*, 2015).

Zur Vorbereitung der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die endogenen Peroxidasen durch Inkubation mit 3 % Wasserstoffperoxid aufgesättigt, die endogenen Bindungsstellen für Avidin und Biotin durch Inkubation mit den jeweiligen Substanzen blockiert und unspezifische Proteinbindungen mit 10 % Albumin aus Rinderserum blockiert (Bertolini, 2014).

Auf die Inkubation mit dem Primärantikörper und dem biotinylierten Sekundärantikörper (siehe Kapitel 2.5.2 und Tabelle 2.3) folgte die Applikation des Detektionssystems, einer an Streptavidin gekoppelte Meerrettichperoxidase. Durch die entstehende nicht-kovalente Bindung zwischen Biotin und Streptavidin wurde das Enzym am Sekundärantikörper fixiert. Es folgte die Zugabe des Amplifikationsreagenz. Dieses enthielt Tyramid, das an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte war. Die Meerrettichperoxidase katalysierte die Bildung von Tyamidradikalen. Diese bindeten zusammen mit den gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen kovalent an Tyrosinresten

oberflächlicher Proteine in direkter Umgebung der Meerrettichperoxidase (Wang *et al.*, 1999; Faget und Hnasko, 2015).

2.5.4 Tyrosinaseaktivität

Für die Darstellung der Tyrosinaseaktivität wird die TSA so modifiziert, dass die enzymatische Aktivität der endogenen Tyrosinase den biotinylierten Sekundärantikörper ersetzt (Han *et al.*, 2002; Hardman *et al.*, 2015). Die Tyrosinaseaktivität ist direkt proportional zur Immunreaktivität ihrer angefärbten Reaktionsprodukte. Sie bildet die Pigmentbildung des HF besser ab als die Immunreaktivität der Tyrosinase selbst (Tobin, 2011).

Die Vorbereitung ist identisch mit der TSA (siehe Kapitel 2.5.3). Es werden keine Antikörper benötigt. Die Gewebeproben wurden nach der Vorbereitung mit der biotinylierten TSA-Reagenz des „TSA Tetramethylrhodamine Systems“ inkubiert. Die endogene Tyrosinase katalysiert die Radikalbildung des biotinylierten Tyramids. Die Tyramidradikale bindeten an oberflächliche endogene Proteine in direkter Umgebung der Tyrosinase (Han *et al.*, 2002). Die Visualisierung erfolgt durch Zugabe von Streptavidin-Cy3, welches über das Streptavidin an den Biotinrest des Tyramids bindete. Cy3 ist ein Fluoreszenzfarbstoff.

2.5.5 Visualisierung von Proliferation und Apoptose

Die Darstellung proliferierender und apoptotischer Zellen erfolgte mittels Ki-67/TUNEL IF (Klöpper *et al.*, 2013b; Langan *et al.*, 2015; Oh *et al.*, 2016). Ki-67 ist ein nukleäres Protein, das während der Mitose auf der chromosomalen Oberfläche lokalisiert ist (Scholzen und Gerdes, 2000) und die sichere Darstellung der Wachstumsfraktion einer Zellpopulation erlaubt (Cattoretti *et al.*, 1992; Scholzen und Gerdes, 2000). Die Darstellung von Ki-67 erfolgte mittels IF (siehe Kapitel 2.5.2).

TUNEL steht für *terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate nick end labelling* und wird nachfolgend so abgekürzt. Bei der TUNEL Methode werden mit

Digoxigenin konjugierte Desoxyuridintriphosphatmoleküle durch die *terminal deoxynucleotidyl transferase* an freie 3' OH-Enden von DNS-Bruchstücken gebunden, sodass digoxigenierte DNS entsteht. Für die TUNEL Methode wurde das „ApopTag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit“ verwendet (Klöpper *et al.*, 2010; Langan *et al.*, 2015).

2.5.6 Immunhistochemische Färbungen

Immunhistochemische Färbungen wurden zur Darstellung von Expressionsmustern und zur Etablierung neuer Färbungen eingesetzt (siehe Tabelle 2.5). Es wurde die Avidin-Biotin-Komplex Methode mit Meerrettichperoxidase und den Chromogenen 3,3'-Diaminobenzidin (**DAB**) oder 3-Amino-9-Ethylcarbazol (**AEC**) verwendet (Schacht und Kern, 2015).

Tabelle 2.5 Übersicht der verwendeten immunhistochemischen Färbungen.

AEC: 3-Amino-9-Ethylcarbazol; c-Kit: Rezeptortyrosinkinase Kit; DAB: 3,3'-Diaminobenzidin; VIP: Vasoaktives intestinales Peptid; VPAC1/2: VIP-Rezeptor 1/2.

Antigen	Antigendemaskierung	Detektionssystem	Substrat
c-Kit	Natrium-Citrat Puffer	Avidin-Biotin-Komplex Peroxidase	DAB
VIP	Natrium-Citrat Puffer	Avidin-Biotin-Komplex Peroxidase	AEC
VPAC1	Natrium-Citrat Puffer	Avidin-Biotin-Komplex Peroxidase	DAB
VPAC2	Natrium-Citrat Puffer	Avidin-Biotin-Komplex Peroxidase	DAB

Zur Vorbereitung der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die endogenen Peroxidasen, die endogenen Bindungsstellen für Avidin und Biotin und unspezifische Proteinbindungen aufgesättigt, wie in Kapitel 2.5.3. beschrieben. Der Primärantikörper inkubierte über Nacht bei 4 °C. Der biotinylierte Sekundärantikörper inkubierte über 45 min bei RT. Zur Detektion dienten das „*DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit*“ oder das „*AEC Peroxidase (HRP) Substrate Kit*“. Das Prinzip der Avidin-Biotin-Bindung ist in Kapitel 2.5.3 beschrieben worden. Als chromogene Substrate wurden AEC oder DAB verwendet. Die Farbentwicklung benötigte 3-15 min, wurde unter dem Mikroskop verfolgt und durch einen Waschschrift beendet.

2.6 Positiv- und Negativkontrollen

Positiv- und Negativkontrollen dienten zur Überprüfung der Qualität und Durchführung von Antikörperfärbungen. Als Positivkontrollen dienten Gewebe beziehungsweise Zellpopulationen, welche das Zielantigen exprimierten (siehe Tabelle 2.6). Als Negativkontrolle diente eine separate Gewebeprobe, die nicht mit dem Primärantikörper, sondern nur mit seinem Lösungsmittel inkubiert wurde. Die Kontrolle des Sekundärantikörpers auf unspezifische Bindung erfolgte durch Inkubation eines weiteren Gewebeschnittes mit dem Lösungsmittel des Sekundärantikörpers.

Tabelle 2.6 Übersicht der verwendeten Positivkontrollen.

CTS: Follikuläre Bindegewebsscheide; Kryo: Kryofixiert.

Antigen	Einbettung/Fixierung	Positivkontrolle	Referenz
CK15	Paraffin	Epidermale und follikuläre Keratinozyten	Moll <i>et al.</i> , 2008; Ramot <i>et al.</i> , 2015
CK19	Paraffin	Epidermale und follikuläre Keratinozyten	Moll <i>et al.</i> , 2008; Ramot <i>et al.</i> , 2015
c-Kit	Paraffin	Epidermale und follikuläre Melanozyten	Samuelov <i>et al.</i> , 2013
gp100	Paraffin	Epidermale und follikuläre melanotische Melanozyten	Gáspár <i>et al.</i> , 2011
Ki-67	Kryo, Paraffin	Epidermale Keratinozyten	Cattoretti <i>et al.</i> , 1992; Langan <i>et al.</i> , 2015
Melanin	Kryo, Paraffin	Epidermale und follikuläre melanotische Melanozyten	Samuelov <i>et al.</i> , 2013
MITF	Kryo	Epidermale und follikuläre Melanozyten	Nishimura <i>et al.</i> , 2005; Gáspár <i>et al.</i> , 2011
TUNEL	Kryo, Paraffin	Follikuläre Keratinozyten und Fibroblasten der CTS	Klöpper <i>et al.</i> , 2010; Ramot <i>et al.</i> , 2015
Tyrosinase-aktivität	Kryo	Epidermale und follikuläre Melanozyten	Han <i>et al.</i> , 2002
VIP	Paraffin	Rachenmandel	Odum <i>et al.</i> , 1998; Bronzetti <i>et al.</i> , 2006
VPAC1	Paraffin	Jejunale Mukosa und myenterische Ganglienzellen	Schulz <i>et al.</i> , 2004
VPAC2	Paraffin	Jejunale mukosale neuroendokrine Zellen und glatte Gefäßmuskulatur	Fischer <i>et al.</i> , 2001; Schulz <i>et al.</i> , 2004

2.7 Mikroskopie

Das Stereomikroskop mit Messokular (+/- 50 µm) Zeiss Stemi 2000-C wurde zur HF-Isolierung und zur Messung des Haarwachstums verwendet. Mit einem Krüss Monokularmikroskop wurde die Farbentwicklung der Chromogene während der immunhistochemischen Färbung beobachtet. Das Mikroskop Keyence Biozero-8000 mit der Software „Biozero Image Observer“ und „Biozero Image Analyzer“, jeweils Version 2.5, wurde für die Lichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie verwendet.

2.8 Semiquantitative (Immun-) Histomorphometrie

2.8.1 Prinzipien

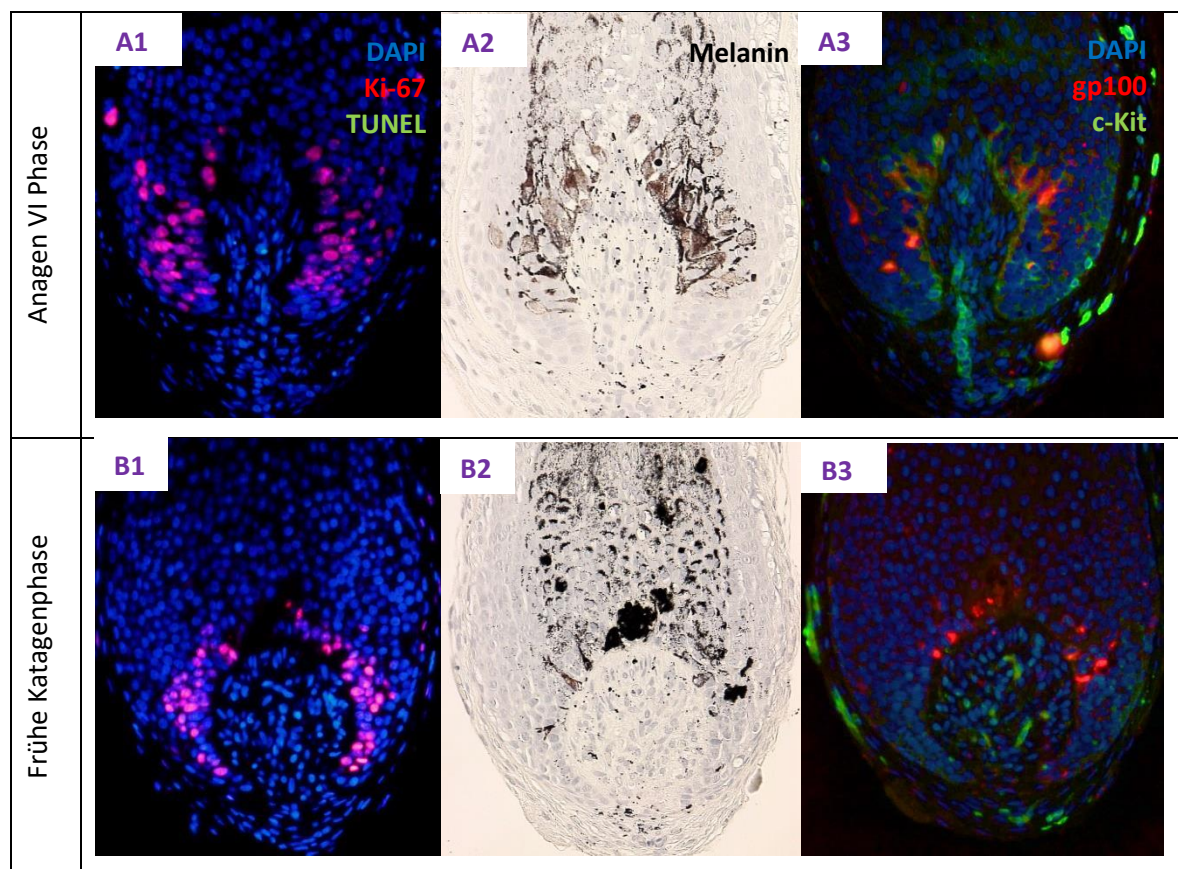
Die Auswertung erfolgte an Aufnahmen mit 200-facher Vergrößerung. Die semiquantitative (Immun-) Histomorphometrie wurde mit ImageJ 1.40 g durchgeführt. Bei der Messung der Immunreaktivität (**IR**) wurden RGB-Werte bestimmt, deren Einheit RGB-Wert/px² ist. Bei vorwiegend disseminiertem Expressionsmuster wurde die IR gemessen und bei Expression in Einzelzellen wurde die absolute Zellzahl bestimmt. Die statistischen Berechnungen wurden mit Microsoft Excel 2010 und GraphPad PRISM 4.02 durchgeführt (Bertolini *et al.*, 2016b; Alam *et al.*, 2019).

2.8.2 Bestimmung der Haarzyklusphasen

Die Haarzyklusphasen wurden anhand morphologischer und histochemischer Merkmale bestimmt (Klöpper *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2016). Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 2.7 aufgelistet und in Abbildung 2.7 visualisiert.

Tabelle 2.7 Verwendete Kriterien zur Bestimmung der Haarzyklusphasen.DAPI: 4',6-Diamidin-2-Phenylindol. Modifiziert aus Klöpper *et al.*, 2010 Tabelle 1.

	Marker	Anagen VI Phase	Frühe Katagenphase	Abbildung
1. Qualitative morphologische Parameter				
1.1	Dermale Papille	Zwiebelförmig	Ovaler	A1, B1
1.2	Haarmatrix	Großer Durchmesser, Zelldichte hoch	Schmäler, gestreckter, Zelldichte geringer	A1, B1
1.3	Haarmatrix	Melaningehalt hoch, Melanin auch proximal der Außerschen Linie, keine Melaninklumpen	Melaningehalt geringer, Betonung der präkortalen Matrix, Melaninklumpen	A1, B1
2. Quantitative morphometrische Parameter				
2.1	Anteil der Ki-67+ Zellen	Hoch	Niedriger	A1, B1
2.2	Melaningehalt der Haarmatrix	Hoch	Niedriger	A2, B2
2.3	Anzahl der gp100+ Zellen	Hoch	Niedriger	A3, B3

**Abbildung 2.7 Vergleich von Anagen VI Phase und früher Katagenphase.**

Repräsentative Aufnahmen. Originalvergrößerung 200-fach. C-Kit: Rezeptortyrosinkinase Kit; DAPI: 4', 6-Diamidin-2-Phenylindol; TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate nick end labelling*.

Zur quantitativen Auswertung der Haarzyklusphasen wurde der etablierte Haarzyklus-Score (**HCS**) verwendet (Müller-Röver *et al.*, 2001; Klöpper *et al.*, 2013b; Langan *et al.*, 2013; Oh *et al.*, 2016). Dabei wird jeder Haarzyklusphase ein Wert der Menge Z zugeordnet ($Z \in 100, 200, 300, 400$).

Tabelle 2.8 Werte des Haarzyklus-Scores.

Haarzyklusphase	Wert des Haarzyklus-Scores Z
Späte Anagenphase	100
Frühe Katagenphase	200
Mittlere Katagenphase	300
Späte Katagenphase	400

2.8.3 Referenzareale

2.8.3.1 Bulbäre Referenzareale

Die zur Beantwortung der spezifischen Fragestellungen relevanten bulbären Zellpopulationen waren Matrixkeratinozyten, melanotische Melanozyten, melanozytäre Vorläuferzellen und mesenchymalen Zellen der DP. Als proximale Grenze des Bulbus wurde die fünfte Zelllinie proximal der DP definiert. Die Aubersche Linie (**AL**) ist der weiteste Transversaldurchmesser des Bulbus in der zweidimensionalen Abbildung (Stenn und Paus, 2001). Proximal der AL befindet sich der größte Anteil proliferierender Matrixkeratinozyten (siehe Abbildung 2.8.A), weshalb dieses Referenzareal zur Evaluation der matrixkeratinozytären Parameter verwendet wurde (Klöpper *et al.*, 2013a; Langan *et al.*, 2013).

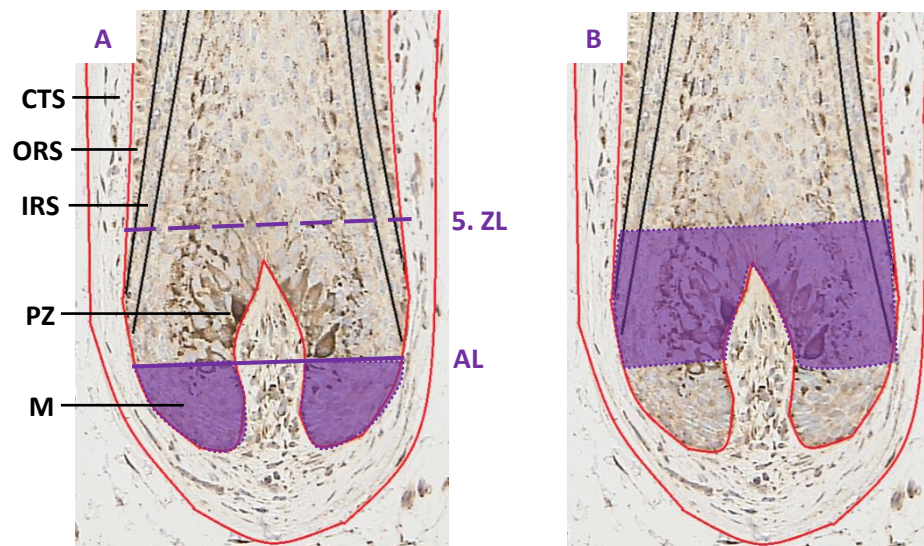


Abbildung 2.8 Bulbäre Referenzareale.

Anhand der Auberschen Linie wird der Haarbulbus in ein proximales (A) und distales Referenzareal (B) unterteilt. Fontana-Masson-Färbung. Originalvergrößerung 400-fach. AL: Aubersche Linie; CTS: Follikuläre Bindegewebsscheide; IRS: Innere Wurzelscheide; M: Haarmatrix; PZ: Pigmentbildende Zone; ORS: Äußere Wurzelscheide; ZL: Zelllinie.

Die pigmentbildende Zone beherbergt differenzierte, melanotische Melanozyten und befindet sich distal der AL (siehe Abbildung 2.8.B). Die publizierten Referenzareale zur Evaluation der pigmentbildenden Zone unterscheiden sich in Form oder Größe (Gáspár *et al.*, 2011; Samuelov *et al.*, 2013; Hardman *et al.*, 2015). Melanozytäre Vorläuferzellen befinden sich im proximalen Bulbus und in der bulbären ORS (siehe Abbildung 1.6). Seit der Erstbeschreibung melanozytärer Subpopulationen im proximalen HF (Horikawa *et al.*, 1996; Tobin und Bystry, 1996), wurden nur qualitative Expressionsanalysen zur Charakterisierung dieser Zellen durchgeführt (Kausar *et al.*, 2004; Kausar *et al.*, 2005; Kausar *et al.*, 2006). In dieser Studie erfolgte erstmals die quantitative Evaluation der bulbären melanozytären Subpopulationen *in situ*. Dazu wurde der Bulbus wie bei der Auswertung der Matrixkeratinozyten unterteilt (siehe Abbildung 2.8). Das Referenzareal proximal der AL sollte die melanozytären Vorläuferzellen repräsentieren und das Referenzareal distal der AL die differenzierten Melanozyten.

2.8.3.2 Referenzareale des suprabulbären Haarfollikels

Die publizierten Referenzareale der suprabulbären ORS und IRS unterscheiden sich in ihrer Größe und Form (Van Beek *et al.*, 2008; Ramot *et al.*, 2013; Fischer *et al.*, 2014). Das verwendete Referenzareal der suprabulbären ORS (siehe Abbildung 2.9.A) repräsentierte keratinozytäre Vorläufzellen. Im verwendeten Referenzareal der suprabulbären IRS (siehe Abbildung 2.9.B) befinden sich terminal differenzierte, nicht proliferierende Keratinozyten.

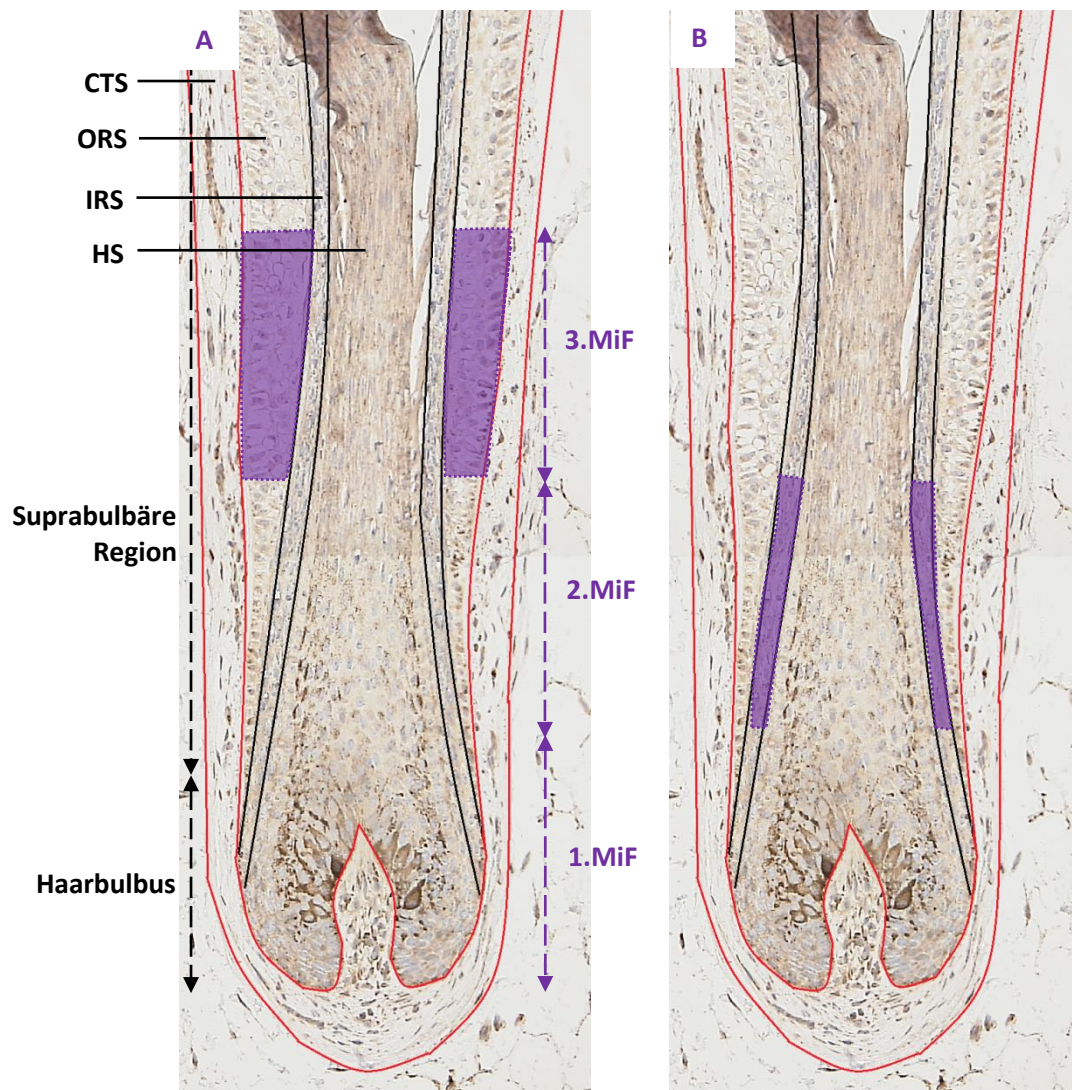


Abbildung 2.9 Suprabulbäre Referenzareale.

Im suprabulbären Haarfollikel wurden die äußere und innere Wurzelscheide evaluiert. Die Referenzareale beinhalten jeweils beide Seiten des Haarfollikels und wurden an die individuelle Anatomie angepasst. Die Abbildungen wurden aus je 4 Einzelaufnahmen zusammengesetzt. Fontana-Masson-Färbung. Originalvergrößerung 400-fach. CTS: Follikuläre Bindegewebsscheide; HS: Haarschaft; IRS: Innere Wurzelscheide; MiF: Mikroskopisches Feld; ORS: Äußere Wurzelscheide.

2.8.3.3 Mesenchymale Referenzareale

Die DP ist wie die CTS mesenchymalen Ursprungs. Sie spielt eine zentrale Rolle in der Steuerung von Wachstum und Differenzierung des Haarfollikels (Morgan, 2014; Plikus und Chuong, 2014). (siehe Abbildung 2.10).

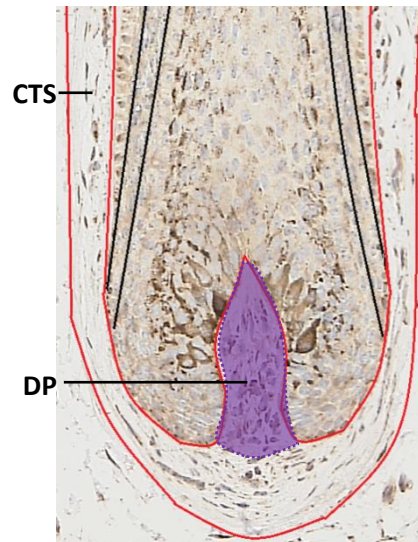


Abbildung 2.10 Das mesenchymale Referenzareal.

Das Referenzareal wurde an die individuelle Anatomie der dermalen Papille angepasst. Fontana-Masson-Färbung. Originalvergrößerung 400-fach. CTS: Follikuläre Bindegewebs-scheide; DP: Dermale Papille.

2.8.4 Beurteilung der VIP-Rezeptoren

Die kutane Signaltransduktion des VIP erfolgt über die VIP-Rezeptoren 1 und 2 (Fischer *et al.*, 2001; Kakurai *et al.*, 2001). Aufgrund der deutlich geringeren Affinität von VIP zu PAC1 (siehe Kapitel 1.3.1), wurde auf die Analyse des PAC1 verzichtet. Das Expressionsmuster der VIP-Rezeptoren wurde in qualitativ (siehe Abbildung 3.3) und quantitativ in allen Referenzarealen (siehe Abbildung 3.4) ausgewertet. Der direkte Vergleich der VIP-Rezeptoren erfolgte mittels Normierung zum Referenzareal mit der höchsten IR (siehe Abbildung 3.5).

2.8.5 Beurteilung von Proliferation und Apoptose

Die Beurteilung von Proliferation und Apoptose der Matrixkeratinozyten erfolgte mittels Ki-67/TUNEL Doppel-IF, entsprechend den publizierten Standards (Langan *et al.*, 2015; Alam *et al.*, 2019). Proliferationsrate und Apoptoserate wurden nur innerhalb der Anagen VI Phase bestimmt, da die Unterschiede zwischen den Haarzyklusphasen hinreichend bekannt sind (Langan *et al.*, 2015; Oh *et al.*, 2016). Proliferationsrate und Apoptoserate wurden als Anteil von Ki-67+ Zellen beziehungsweise TUNEL+ Zellen an der Gesamtzahl der Zellen (DAPI+ Zellen) definiert. Die Zellzahlen wurden im Referenzareal proximal der AL ermittelt (siehe Abbildung 2.8.A) und bei Detektion von TUNEL+ Zellen auch auf das Referenzareal distal der AL ausgeweitet (siehe Abbildung 2.8.B). Anzumerken ist, dass durch die Ki-67 IF auch proliferierende Melanozyten markiert wurden. Die Anzahl derselbigen ist jedoch im Vergleich zur Anzahl der proliferierenden Matrixkeratinozyten sehr gering, sodass sie bei der Auswertung vernachlässigt wurden.

2.8.6 Beurteilung suprabulbärer keratinozytärer Vorläuferzellen

Zur Visualisierung der keratinozytären Vorläuferzellen in der suprabulbären ORS wurden die Zytokeratine (CK) 15 und 19 verwendet. CK sind Intermediärfilamente, die sich im Zellplasma befinden, Bestandteil des epithelialen Zellgerüsts sind und beispielsweise intrazelluläre Signalwege oder Zelldifferenzierung regulieren (Moll *et al.*, 2008). Die Verteilung CK15 und CK19 ist bekannt, die markierten Zellen haben Stammzeleigenschaften (Commo *et al.*, 2000; Ohyama *et al.*, 2006; Tiede *et al.*, 2007) und ihre Verwendung zur Evaluation von Stammzellen beziehungsweise Vorläuferzellen ist etabliert (Ramot *et al.*, 2011; Ramot *et al.*, 2013; Fischer *et al.*, 2014). Zur Quantifizierung wurde die IR in den Referenzarealen des Bulbus und der suprabulbären ORS bestimmt (siehe Abbildung 2.8 und Abbildung 2.9.A).

2.8.7 Beurteilung der Melanogenese

Zur Evaluation der follikulären Melanogenese wurden die folgenden Parameter verwendet (Gáspár *et al.*, 2011; Samuelov *et al.*, 2013; Hardman *et al.*, 2015):

- der Melaniningehalt, dem Endprodukt der Melanogenese,
- die Aktivität der Tyrosinase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Melanogenese
- das Glykoprotein 100 (**gp100**), ein prämelanosomales Strukturprotein, das in melanotischen Melanozyten exprimiert wird (Marks und Seabra, 2001; Singh *et al.*, 2008)
- und der zentrale Transkriptionsfaktor MITF, als Regulator zentraler Gene.

Der Melaniningehalt wurde nach den aktuellen Standards bestimmt (Klöpfer *et al.*, 2010; Hardman *et al.*, 2015). In acht bit schwarz-weiß Aufnahmen der Fontana-Masson-Färbung wurde die Färbungsintensität in rechteckigen Referenzarealen bestimmt, welche die DP distal der AL tangieren. In den Katagenphasen wurde ein drittes Referenzareal ergänzt, welches sich senkrecht zur follikulären Längsachse am distalen Ende der DP befand (siehe Abbildung 2.11).

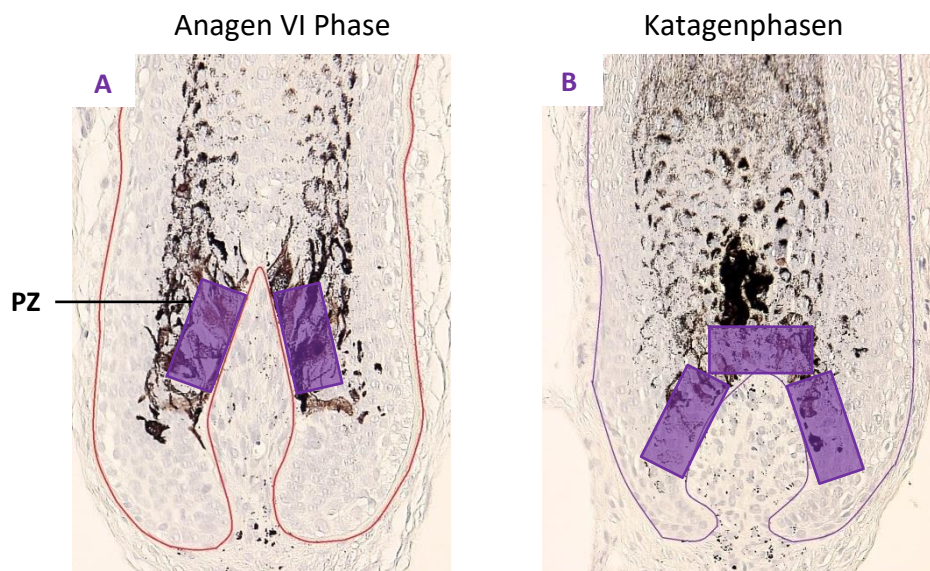


Abbildung 2.11 Referenzareale zur Auswertung der Fontana-Masson-Färbung.

Die Färbungsintensität wurde in der Anagen VI Phase in 2 (A) und in einer Katagenphase in 3 (B) rechteckigen Referenzarealen bestimmt. Fontana-Masson-Färbung. Originalvergrößerung 400-fach. PZ: Pigmentbildende Zone.

Tyrosinase exprimierende Zellen befinden sich nicht ausschließlich distal der AL, sondern vereinzelt auch proximal. Es wurden Referenzareale verschiedener Größe publiziert, die meist nur einen Teil der melanotischen Melanozyten einbeziehen (Gáspár *et al.*, 2011; Hardman *et al.*, 2015). In dieser Studie lag der Fokus auf allen bulbären melanozytären Zellen, sodass die Immunreaktivität der Tyrosinaseaktivität im gesamten Bulbus bestimmt wurde. Die Unterteilung entlang der AL wurde nicht durchgeführt, da die Tyrosinase ausschließlich in melanotischen Melanozyten exprimiert wird (siehe Tabelle 1.3).

Für die Evaluation von gp100 und MITF existieren keine etablierten Standards. Publiziert wurden sowohl die Bestimmung der Immunreaktivität als auch der Zellzahl (Gáspár *et al.*, 2011; Samuelov *et al.*, 2013; Hardman *et al.*, 2015). Aufgrund des fokalen Expressionsmuster und der relativ geringen Anzahl positiver Zellen, wurde die Bestimmung der Zellzahl in den bulbären Referenzarealen verwendet (siehe Abbildung 2.8). Zur Validierung der Güte des Referenzareals wurde überprüft, ob der ermittelte Unterschied zwischen den Referenzarealen proximal der AL und distal der AL in den Kontrollgruppen der erwarteten physiologischen Verteilung entsprach (siehe Abbildung 9.1 und Abbildung 9.2)

2.8.8 Beurteilung melanozytärer Zellen

Ziel der Studie war es den Einfluss von VIP auf die Biologie follikulärer Melanozyten zu erforschen. Dazu sollte nicht nur auf die Eigenschaft der Melanogenese eingegangen werden, sondern ebenso auf die zellulären Veränderungen der melanozytären Zellpopulationen. Die Rezeptortyrosinkinase c-Kit wird bereits in nicht-melanotischen melanozytären Vorläuferzellen exprimiert und geht auch mit fortschreitender Differenzierung nicht verloren (siehe Tabelle 1.3). Daher ist jede gp100+ Zelle auch c-Kit+.

Die Identifikation der melanozytären Subpopulationen erfolgte mittels c-Kit/gp100 Doppel-IF. Zur Quantifizierung wurden die Anzahl der gp100+ Zellen und c-Kit+ Zellen in den bulbären Referenzarealen bestimmt (siehe Abbildung 2.8). Die Güte der

verwendeten Referenzareale wurde validiert wie in Kapitel 2.8.7 beschrieben (siehe Abbildung 9.3). Zur Bestimmung des Anteils melanotischer Melanozyten wurde die Anzahl von c-Kit+/gp100+ Zellen mit der Anzahl der c-Kit+ Zellen ins Verhältnis gesetzt. Melanozytäre Zellen sind entweder melanotisch oder nicht-melanotisch, sodass die jeweiligen Anteile als Gegenereignisse berechnet wurden (siehe Abbildung 2.12). Die Güte der verwendeten Referenzareale wurde validiert wie in Kapitel 2.8.7 beschrieben (siehe Abbildung 9.4).

A *Anteil(melanotische Melanozyten)*

$$= 1 - (\text{Anteil}(\text{nicht melanotische melanozytäre Zellen}))$$

B *Anteil(c – Kit +/gp100 +) = 1 – (Anteil(c – Kit +/gp100–))*

Abbildung 2.12 Der Anteil nicht-melanotischer melanozytärer Vorläuferzellen.

Der Anteil nicht-melanotischer melanozytärer Vorläuferzellen wurde als Gegenereignis des Anteils melanotischer Melanozyten berechnet. C-Kit: Rezeptortyrosinkinase Kit.

Die melanozytäre Proliferationsrate wurde anhand der c-Kit/Ki-67 Doppel-IF ermittelt. In den bulbären Referenzarealen (siehe Abbildung 2.8) wurde die Anzahl der c-Kit+/Ki-67+ Zellen bestimmt und mit der c-Kit+ Zellzahl ins Verhältnis gesetzt. Dieser Quotient wurde als Proliferationsrate nicht-melanotischer melanozytärer Vorläuferzellen bewertet. Der Quotient umfasst prinzipiell alle melanozytären Zellen. Differenzierte melanotische Melanozyten besitzen jedoch eine sehr geringe Proliferationsrate, genau wie alle terminal differenzierten Zellen. Folglich konnte diese Proliferationsfraktion vernachlässigt werden und eine c-Kit/gp100/Ki-67 Dreifach-IF war nicht notwendig.

2.9 Echtzeit quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Alle in dieser Dissertationsschrift aufgeführten RT-qPCR wurden extern unter Leitung von Prof. Dr. T. Bíró im DE-MTA „Lendület“ Cellular Physiology Gruppe, Abteilung für Physiologie der Universität Debrecen aus Debrecen in Ungarn durchgeführt.

Ziel der RT-qPCR war die Quantifizierung der Expression der Botenribonukleinsäure (**mRNS**) definierter Zielgene. Dazu wurden mikrodissizierte HF kultiviert (siehe Tabelle 2.1), kryofixiert (siehe Kapitel 2.3.4) und auf Trockeneis über Nacht an die DE-MTA „Lendület“ *Cellular Physiology* Gruppe versandt.

Die Methode der RT-qPCR ist gut etabliert (Lisztes *et al.*, 2019). Sie umfasst die Aufreinigung der Ribonukleinsäuren in der Probe mittels Degradation von Zellmembranen, Proteinen und DNS. Es folgt die reverse Transkription bei der eine spezifische Ribonukleinsäuresequenz in komplementäre DNS (**cDNS**) revers transkribiert wird. Die Polymerase-Kettenreaktion (**PCR**) bezeichnet die Vervielfältigung (Amplifikation) der cDNS. Bei der quantitativen Echtzeit-PCR (englisch *real-time quantitative PCR*) entsteht durch Zugabe einer Oligonukleotidsonde ein Fluoreszenzsignal, dass direkt proportional zur Menge des Amplifikationsproduktes ist. Durch Auftragen des Fluoreszenzsignals gegen die Anzahl der PCR-Zyklen resultiert die Amplifikationskurve (siehe Abbildung 2.13). Die Transkripte der Gene von β -Aktin (**ACTB**), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (**GAPDH**) und Peptidyl-prolyl-Isomerase A (**PPIA**) fungierten als Referenzgene (bekannt als *housekeeping genes*), da eine Regulation durch die Behandlung mit VIP nicht bekannt war (Kakurai *et al.*, 2009; Riemer *et al.*, 2012).

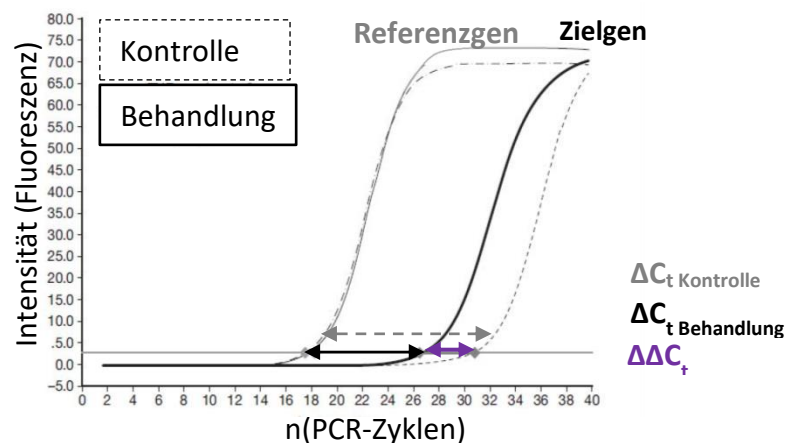


Abbildung 2.13 Schematische Darstellung einer Amplifikationskurve.

ΔC_t : ΔC_t -Wert; $\Delta\Delta C_t$: $\Delta\Delta C_t$ -Wert; n: Anzahl; PCR: Polymerase-Kettenreaktion. Abbildung modifiziert aus Tripathi, 2018 Folie 18.

Die Auswertung erfolgte mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (siehe Abbildung 2.14). Sie diente zum quantitativen Vergleich der mRNA-Expression von Behandlungs- und Kontrollgruppe. Der C_t -Wert (C_t) beschreibt die Anzahl an PCR-Zyklen, bei denen das spezifische Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal gerade übersteigt. C_t ist folglich indirekt proportional zum cDNA-Gehalt der getesteten Probe. Das bedeutet je kleiner C_t ist und je früher das spezifische Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal übersteigt, desto mehr cDNA war in der Probe enthalten (Pfaffl, 2004).

Bei der $\Delta\Delta C_t$ -Methode wird von jedem Messwert der ΔC_t -Wert bestimmt. Der ΔC_t -Wert (ΔC_t) gibt die Änderung der PCR-Zyklenzahl zu dem Referenzgen an, dessen C_t sich am geringsten ändert (siehe Abbildung 2.14.A). Es folgte die Berechnung des $\Delta\Delta C_t$ -Wertes ($\Delta\Delta C_t$), der die Anzahl an PCR-Zyklen angibt, um die sich das Überschreiten des Hintergrundsignals zwischen den Messwerten von Behandlungs- und Kontrollgruppe unterschied (siehe Abbildung 2.14.B). Die Menge an cDNA wurde durch Auflösung der logarithmischen Beziehung zwischen dem Fluoreszenzsignal und der Anzahl der PCR-Zyklen berechnet (siehe Abbildung 2.14.C). Zielparameter der Auswertung ist das Verhältnis der cDNA-Mengen von Behandlungs- und Kontrollgruppe. Dieses Verhältnis wurde als Veränderungskoeffizient definiert (siehe Abbildung 2.14.D).

$$\text{A} \quad \Delta C_{t \text{ Zielgen}} = C_{t \text{ Zielgen}} - C_{t \text{ Referenzgen}}$$

$$\text{B} \quad \Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ Behandlung}} - \Delta C_{t \text{ Kontrolle}}$$

$$\text{C} \quad n(\text{cDNA}) = 2^{-\Delta C_t}$$

$$\text{D} \quad V = 2^{-\Delta\Delta C_t} = \frac{n(\text{cDNA}_{\text{Behandlung}})}{n(\text{cDNA}_{\text{Kontrolle}})}$$

Abbildung 2.14 Rechenweg der $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

Zielgröße der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ist der Veränderungskoeffizient (V). Er beschreibt das Verhältnis zwischen den Mengen komplementärer Desoxyribonukleinsäure von Behandlungs- und Kontrollgruppe. C_t : C_t -Wert; ΔC_t : ΔC_t -Wert; $\Delta\Delta C_t$: $\Delta\Delta C_t$ -Wert; cDNA: Komplementäre Desoxyribonukleinsäure; n: Anzahl; V: Veränderungskoeffizient.

2.10 Statistische Analyse

2.10.1 Statistische Methoden

Es werden die statistischen Methoden erläutert, die zur Beantwortung der Fragestellungen aus Kapitel 1.5 verwendet worden sind. Die Ergebnisse sind als statistisch signifikant betrachtet worden, wenn der p-Wert kleiner als die Irrtumswahrscheinlichkeit gewesen ist. Der Signifikanzwert (**p**) beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass sich die Daten wie beobachtet unter der Nullhypothese ergeben. Je kleiner die Irrtumswahrscheinlichkeit ist, desto weniger sind die Daten durch die Nullhypothese erklärbar. Dies gilt folglich als Evidenz für die Richtigkeit der Alternativhypothese.

Der t-Test für unverbundene Stichproben vergleicht die Erwartungswerte zweier Gruppen. Folgende Voraussetzungen müssen erfüllt sein (Genschel und Becker, 2005):

- Die Daten sind metrisch skaliert.
- Die Beobachtungen sind unabhängig voneinander.
- Die Gruppen sind nicht miteinander verbunden.
- Die Daten sind normalverteilt.
- Die Varianzen der Stichproben sind gleich.

Die Beobachtungen sind unabhängig voneinander, wenn diese sich nicht gegenseitig beeinflussen. Die Gruppen sind unverbunden, wenn einzelne Daten oder Individuen nicht Teil anderer Gruppen sind (Kuckelkorn *et al.*, 2015). Der D'Agostino-Pearson omnibus K^2 -Test prüft, ob die Daten aus einer normalverteilten Stichprobe stammen. Die Nullhypothese, dass kein Unterschied zwischen der Stichprobenverteilung und der Normalverteilung besteht, ist abzulehnen, wenn die berechnete Wahrscheinlichkeit kleiner als das definierte Signifikanzniveau ist. Der F-Test prüft, ob sich die Varianzen zweier Gruppen signifikant voneinander unterscheiden (Kuckelkorn *et al.*, 2015). Ist mit dem F-Test die Nullhypothese der Varianzgleichheit abzulehnen, ist der Welch-Test als Modifikation des t-Tests zu verwenden (Bonett und Price, 2002).

Der Mann-Whitney-U-Test testet, ob die Daten zweier Stichproben zur gleichen Grundgesamtheit gehören. Es gelten folgende Voraussetzungen (Fay und Proschan, 2010):

- Die Daten haben das Niveau einer Ordinal-, Intervall- oder Verhältnisskala.

- Die Beobachtungen sind voneinander unabhängig.
- Die Gruppen sind nicht miteinander verbunden.

Die Ein-Weg Varianzanalyse (bekannt als *one-way analysis of variances*, **one-way ANOVA**) kann für den Vergleich eines Merkmals zwischen mehr als zwei Stichproben verwendet werden. Dabei wird die Varianz der Mittelwerte der Stichproben mit der Varianz der einzelnen Stichproben verglichen. Die Daten mussten folgende Voraussetzungen erfüllen (Kao und Green, 2008):

- Die Daten sind metrisch skaliert.
- Die Daten sind normalverteilt.
- Die Beobachtungen sind voneinander unabhängig.
- Die Gruppen sind nicht miteinander verbunden.

Die Nullhypothese ist, dass die Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen, sodass kein Unterschied zwischen den Mittelwerten der Stichproben besteht. Ist die Nullhypothese abzulehnen, stammt mindestens eine Gruppe nicht aus der gleichen Grundgesamtheit. Mit der one-way ANOVA ist in diesem Fall keine Aussage darüber möglich wieviele und welche Gruppen sich voneinander unterscheiden. Dazu ist Bonferronis Post-Hoc-Test zu verwenden. Dieser vergleicht die Mittelwerte der überprüften Gruppen paarweise miteinander und bestimmt welche Gruppen sich unter Einhaltung des Signifikanzniveaus unterscheiden (Kao und Green, 2008).

Der Kruskal-Wallis-Test vergleicht die zentralen Tendenzen der getesteten Stichproben durch Bildung von Rangsummen. Es gelten folgende Voraussetzungen (Dinno, 2015):

- Die Daten haben das Niveau einer Ordinal-, Intervall- oder Verhältnisskala.
- Die Beobachtungen sind voneinander unabhängig.
- Die Gruppen sind nicht miteinander verbunden.

Es ist nicht notwendig, dass die Daten normalverteilt sind. Die Nullhypothese ist, dass sich die Rangsummen der getesteten Stichproben nicht unterscheiden (Vargha und Delaney, 1998). Ist die Nullhypothese abzulehnen, ist Dunns Post-Hoc-Test zu verwenden. Dieser vergleicht die Gruppen paarweise miteinander und bestimmt welche Gruppen sich unter Einhaltung des Signifikanzniveaus unterscheiden (Dinno, 2015).

2.10.2 Statistische Auswertung

Statistische Auswertung und graphische Darstellung wurden mit GraphPad Prism Version 4.02 durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde datenunabhängig auf 0,05 festgelegt. Demnach war ein Testergebnis signifikant, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war. Ergebnisse wurden als Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes (**SEM**) dargestellt (Hardman *et al.*, 2015; Ramot *et al.*, 2015; Bertolini *et al.*, 2016b; Vidali *et al.*, 2016).

Die einzelnen HF wurden als Individuen betrachtet, sodass die Stichprobengröße (**n**) als die Summe der HF definiert war. Dies war möglich, da die Patientenstichprobe homogen war (siehe Tabelle 9.1). Die Annahme der HF als einzelne Individuen der Stichprobe entspricht der gängigen Praxis (Hardman *et al.*, 2015; Ramot *et al.*, 2015; Bertolini *et al.*, 2016b), da die devaskularisierten und denervierten HF maßgeblich und in erster Linie durch die Kulturbedingungen beeinflusst werden. Der Einfluss des individuellen genetischen Hintergrundes kann daher bei einer homogenen Patientenauswahl vernachlässigt werden (Philpott *et al.*, 1994; Müller-Röver *et al.*, 2001; Stenn und Paus, 2001; Langan *et al.*, 2015).

Für den Vergleich der (immun-) histomorphometrischen Ergebnisse wurden die in Kapitel 2.10.1 aufgeführten statistischen Tests verwendet. Alle getesteten Gruppen waren unverbunden und deren Beobachtungen unabhängig. Mit dem D'Agostino-Pearson omnibus K^2 -Test wurden die Daten auf Normalverteilung getestet. Der ungepaarte t-Test für unverbundene Stichproben wurde gewählt, wenn zwei normalverteilte Stichproben miteinander verglichen wurden. Mit dem F-Test wurde die Varianzgleichheit überprüft. Bei Verschiedenheit der Varianzen wurde der Welch-Test verwendet. Der Mann-Whitney-U-Test wurde verwendet, wenn zwei Stichproben verglichen wurden, die nicht normalverteilt waren sowie zur Überprüfung des ordinal skalierten Haarzyklus-Score (siehe Abbildung 3.10).

Für den Vergleich von mehr als zwei Stichproben wurde bei normalverteilten Daten die one-way ANOVA mit Bonferronis Post-Hoc-Test oder bei nicht normalverteilten Daten der Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-Hoc-Test verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 VIP und seine Rezeptoren werden auf Genebene exprimiert

Es wurde gezeigt, dass VIP auf die Haut wirkt (Kellogg *et al.*, 2010). Daher stellte sich die Frage, wo VIP in der Umgebung des HF ausgeschüttet wird und wie seine Rezeptoren follikulär verteilt sind. Die physiologischen mRNA-Expressionslevel von VIP und den VIP-Rezeptoren VPAC1 und VPAC2 wurden an kultivierten mikrodisszierten HF mittels RT-qPCR und $\Delta\Delta C_t$ -Methode untersucht (siehe Abbildung 3.1).

Es wurden nur sehr geringe Transkriptmengen von VIP nachgewiesen. VPAC1-mRNA wurde signifikant stärker exprimiert als die VPAC2-mRNA (siehe Abbildung 3.1).

Es wurde gezeigt, dass VIP und seine Rezeptoren auf Genebene exprimiert werden. VPAC1 ist auf Genebene der vorherrschende follikuläre VIP-Rezeptor. Diese Ergebnisse lassen die Fragen offen, wie VIP und seine Rezeptoren im HF verteilt sind, und ob die Dominanz des VPAC1 auch auf Proteinebene besteht.

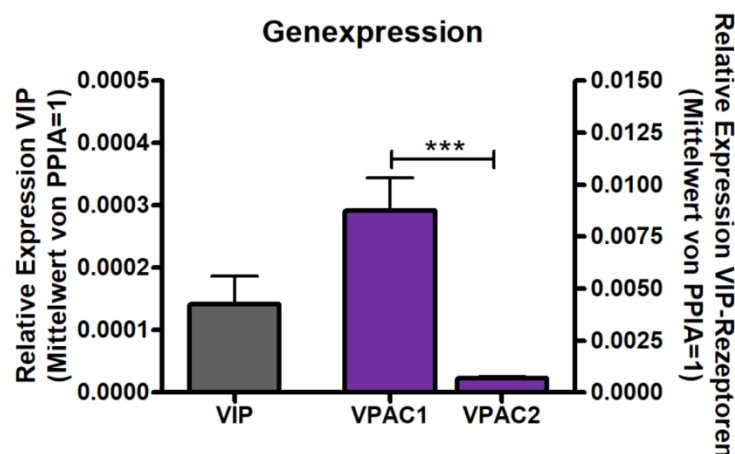


Abbildung 3.1 VIP und seine Rezeptoren werden follikulär exprimiert.

Die Bestimmung der Transkriptmengen erfolgte mittels Echtzeit quantitativer Polymerase-Kettenreaktion. Die Botenribonukleinsäure des vasoaktiven intestinalen Peptids war in Einzelmessungen bei 3 Patientinnen nicht nachweisbar. N=90 Haarfollikel von 5 Patientinnen. Mittelwert $\pm$ SEM. *** $p < 0,001$. P wurde mit dem zweiseitigen t-Test mit Welchs-Korrektur berechnet. Die Signifikanzwerte wurden nur innerhalb der Rezeptorgruppen dargestellt. n: Anzahl; p: Signifikanzwert; PPIA: Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase; SEM: Standardfehler des Mittelwertes; VIP: Vasoaktives intestinales Peptid; VPAC1/2: VIP-Rezeptor 1/2.

3.2 VIP wird auf Proteinebene exprimiert

Es wurde gezeigt, dass VIP follikulär exprimiert wird. Es stellte sich die Frage, wie die VIP-Expression verteilt ist. Dazu wurde VIP in gesunder Kopfhaut mittels immunhistochemischer Färbung und IF angefärbt.

Es wurden zahlreiche VIP-erge Nervenfasern detektiert (siehe Abbildung 3.2). Sie befanden sich in den Bindegewebsscheiden von Schweißdrüsen (siehe Abbildung 3.2.A) und in der CTS (siehe Abbildung 3.2.B, F). Weiterhin wurde VIP-IR im Zytoplasma leukozytärer mononukleärer Zellen nachgewiesen (siehe Abbildung 3.2.C), die anhand der Zellmorphologie als Lymphozyten und Mastzellen identifiziert wurden. In neutrophilen Granulozyten, dem Talgdrüsenepithel, der Talgdrüsenbindegewebsscheide und im HF-Epithel wurde keine VIP-IR detektiert (siehe Abbildung 3.2.C-F).

Unsere Ergebnisse bestätigen die publizierten Verteilungsmuster der VIP-Expression und ergänzen detaillierte Abbildungen der kutanen und follikulären Anatomie (Hartschuh *et al.*, 1983a; Hartschuh *et al.*, 1984; Tainio, 1987; Naukkarinen *et al.*, 1993; Fischer *et al.*, 2002). Es wurde gezeigt, dass VIP in Nervenfasern, Lymphozyten und Mastzellen exprimiert wird. VIP kann folglich endokrin (Nervenfaser) und parakrin (Mastzellen und Lymphozyten) auf das HF-Epithel wirken. Bei nachgewiesener mRNS-Expression der VIP-Rezeptoren (siehe Abbildung 3.1) stellte sich die Frage, wo die VIP-Rezeptoren im HF exprimiert werden.

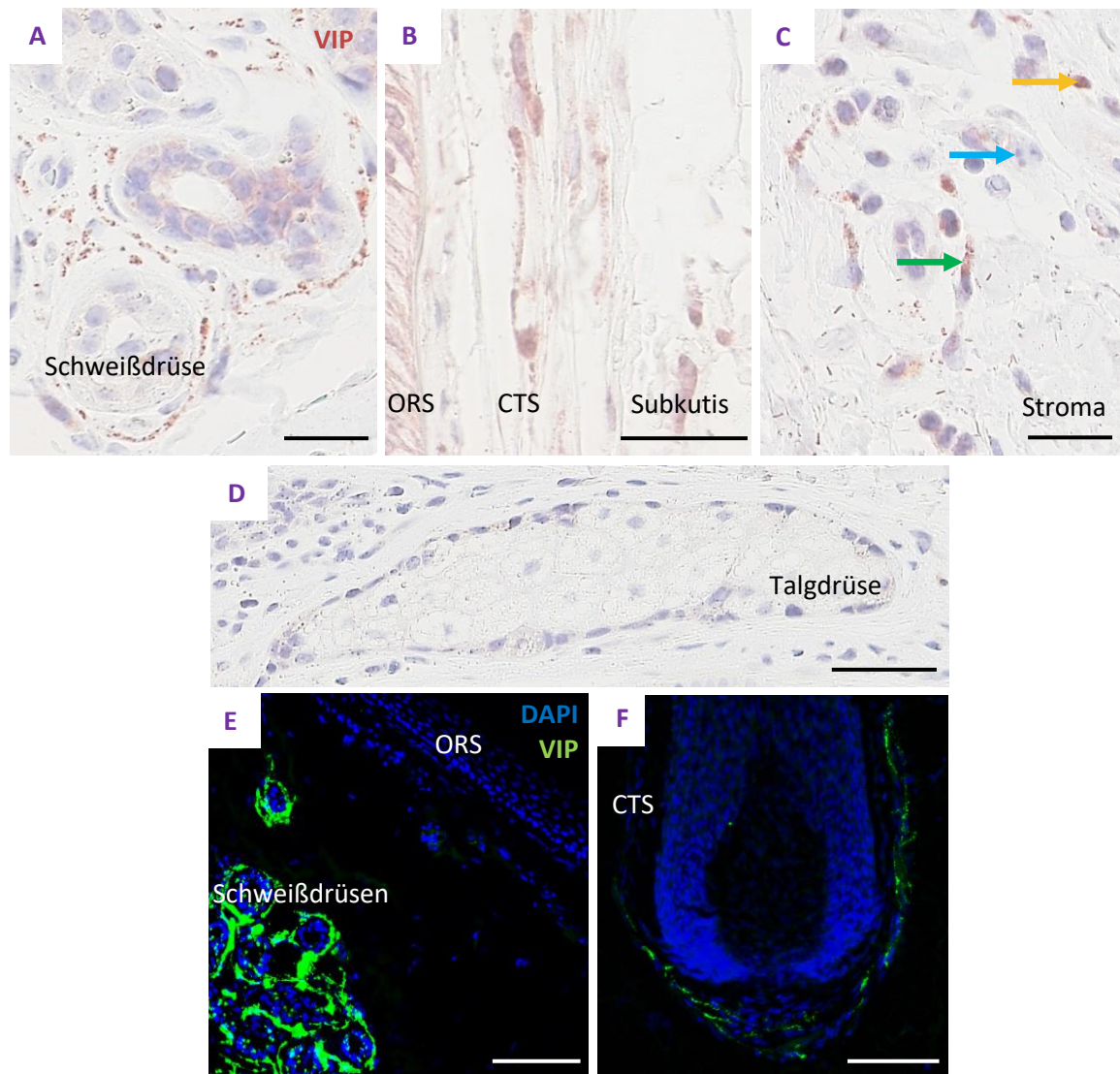


Abbildung 3.2 VIP wird in kutanen Nervenfasern und Leukozyten exprimiert.

Repräsentative Aufnahmen von immunhistochemischen Färbungen (A-D) und Immunfluoreszenzfärbungen (E-G) in Kopfhaut. Die Schnittdicke betrug 4 µm (A-D) und 25 µm (E-G). Die Pfeilspitzen markieren Lymphozyten (gelb), Mastzellen (grün) und neutrophile Granulozyten (blau). Balken 20 µm (A-C), 50 µm (D-F). CTS: Follikuläre Bindegewebsscheide; DAPI: 4',6-Diamidin-2-Phenylindol; ORS: Äußere Wurzelscheide; VIP: Vasoaktives intestinales Peptid. Abbildung E, F aus (Bertolini *et al.*, 2016b).

3.3 VIP-Rezeptoren werden follikulär auf Proteinebene exprimiert

3.3.1 Qualitative Beurteilung des Verteilungsmusters der VIP-Rezeptoren

Es wurde gezeigt, dass VIP in der Haut wirkt (Kellogg *et al.*, 2010), dass VIP-Transkript im HF exprimiert wird (siehe Abbildung 3.1) und dass VIP in der CTS exprimiert wird (siehe Abbildung 3.2). Es stellte sich die Frage nach dem follikulären Verteilungsmuster der VIP-Rezeptoren. Dazu wurde VPAC1 und VPAC2 in Kopfhaut mittels IF angefärbt.

Die höchsten VPAC1-IR wurden im Bulbus, in der Kutikula der IRS, in der proximalen suprabulbären ORS und im Infundibulum nachgewiesen (siehe Abbildung 3.3.B). Im Bulbus zeigte der proximale Bulbus die höchste IR (siehe Abbildung 3.3.D). In der proximalen suprabulbären Region war die IRS stärker immunreaktiv als die ORS (siehe Abbildung 3.3.E). Im mittleren Teil der suprabulbären Region war die VPAC1-IR geringer als proximal (siehe Abbildung 3.3.H). Im Infundibulum glich die VPAC1-IR erneut der des Bulbus (siehe Abbildung 3.3.B, D, I)

Die höchste VPAC2-IR wurde im Bulbus, in der Kutikula der IRS, in der Basalzellschicht der ORS und im Infundibulum nachgewiesen (siehe Abbildung 3.3.C). Innerhalb der ORS zeigte die Basalzellschicht die höchste IR (siehe Abbildung 3.3.F, G, K, L), wobei infundibulär alle Zellschichten der ORS stark immunreaktiv waren (siehe Abbildung 3.3.L). Innerhalb der IRS bestand eine höhere IR in der Kutikula (siehe Abbildung 3.3.G). Analog zu VPAC1, war die VPAC2-IR im Abschnitt zwischen proximaler suprabulbärer Region und Wulstregion geringer (siehe Abbildung 3.3.K).

Die Ergebnisse ergänzen eine detaillierte Erstbeschreibung der follikulären Proteinexpression von VPAC1 und VPAC2. Die Betonung der VPAC2-Expression in der Basalzellschicht passt zur VIP-Expression innerhalb der CTS (siehe Abbildung 3.2), sodass eine endokrine Wirkung aus Nervenfasern der CTS oder eine parakrine Wirkung aus Mastzellen oder Lymphozyten plausibel ist. Es stellte sich die Frage, ob sich die qualitative Beurteilung quantitativ bestätigen lässt.

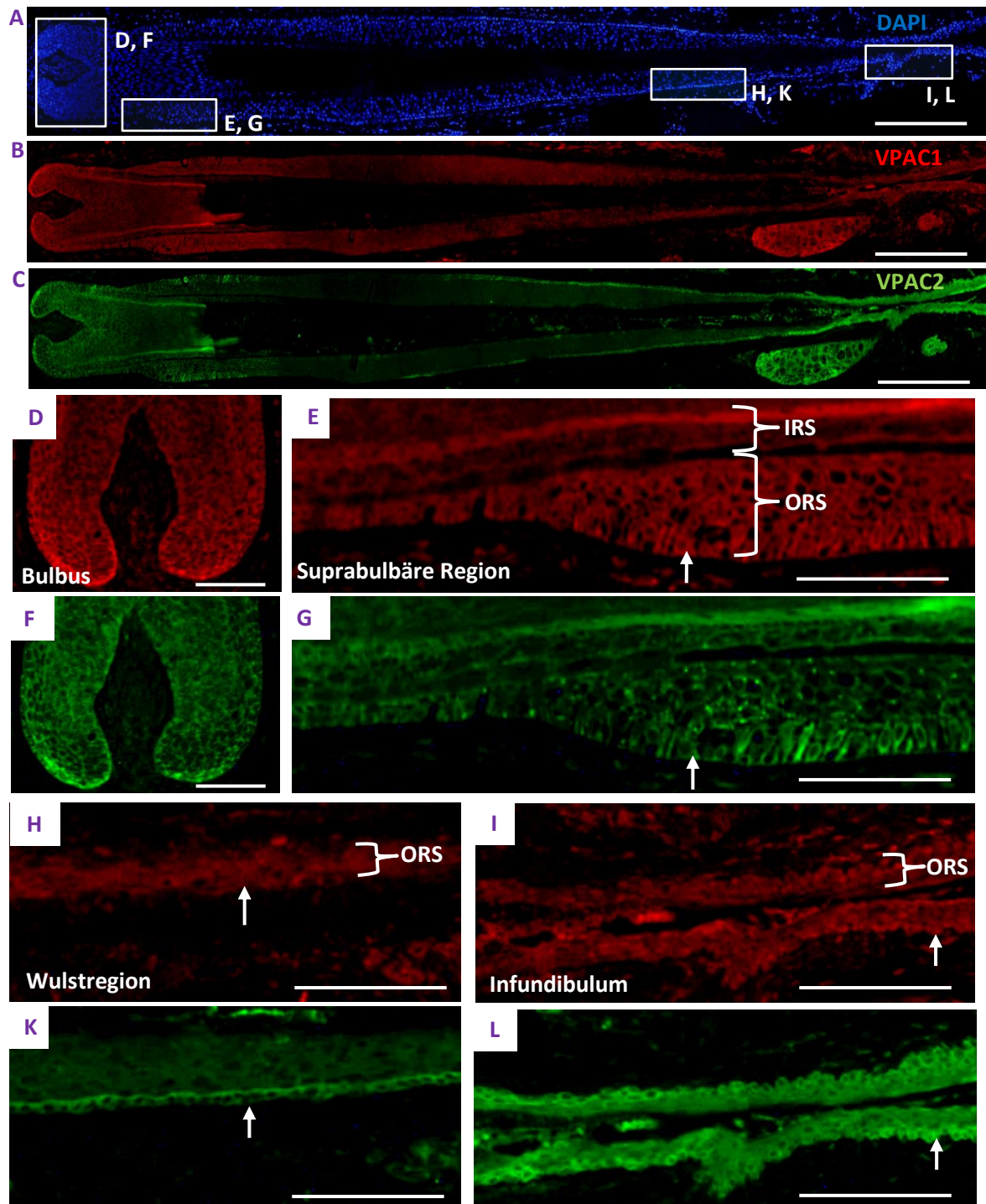


Abbildung 3.3 VIP-Rezeptor 1 und 2 werden im Haarfollikelepithel exprimiert.

Repräsentative Aufnahmen der Doppel-Immunfluoreszenzfärbung VPAC1/VPAC2. Abbildungen A-C sind aus 22 Einzelaufnahmen zusammengesetzt. Abbildungen D-L sind Ausschnitte der Abbildungen B und C. Balken 200 µm (A-C), 50 µm (D-L). Die Pfeilspitzen zeigen auf die Basalzellschicht. DAPI: 4',6-Diamidin-2-Phenylindol; IRS: Innere Wurzelscheide; ORS: Äußere Wurzelscheide; VPAC1/2: VIP-Rezeptor 1/2.

3.3.2 Quantitative Analyse des Verteilungsmuster der VIP-Rezeptoren

Es wurde gezeigt, dass die VIP-Rezeptoren im HF exprimiert werden und ein spezifisches Verteilungsmuster besteht. Zur quantitativen Analyse der qualitativen Beurteilung wurden mikrodissizierte HF kultiviert und mit VIP behandelt. Die Proteinexpression wurde mittels VPAC1/VPAC2 Doppel-IF dargestellt und in fünf Referenzarealen ausgewertet (siehe Abbildung 3.4).

Die Intensität der Proteinexpression von VPAC1 und VPAC2 war jeweils im proximalen Bulbus signifikant höher als in den anderen Referenzarealen (siehe Abbildung 3.4). Die geringste IR wurde in der suprabulbären ORS (VPAC1) und der DP (VPAC2) bestimmt. Die Intensität der Expression von VPAC1 ist höher als von VPAC2 ($p < 0,001$; Vergleich der Daten aus Abbildung 3.4.A und B).

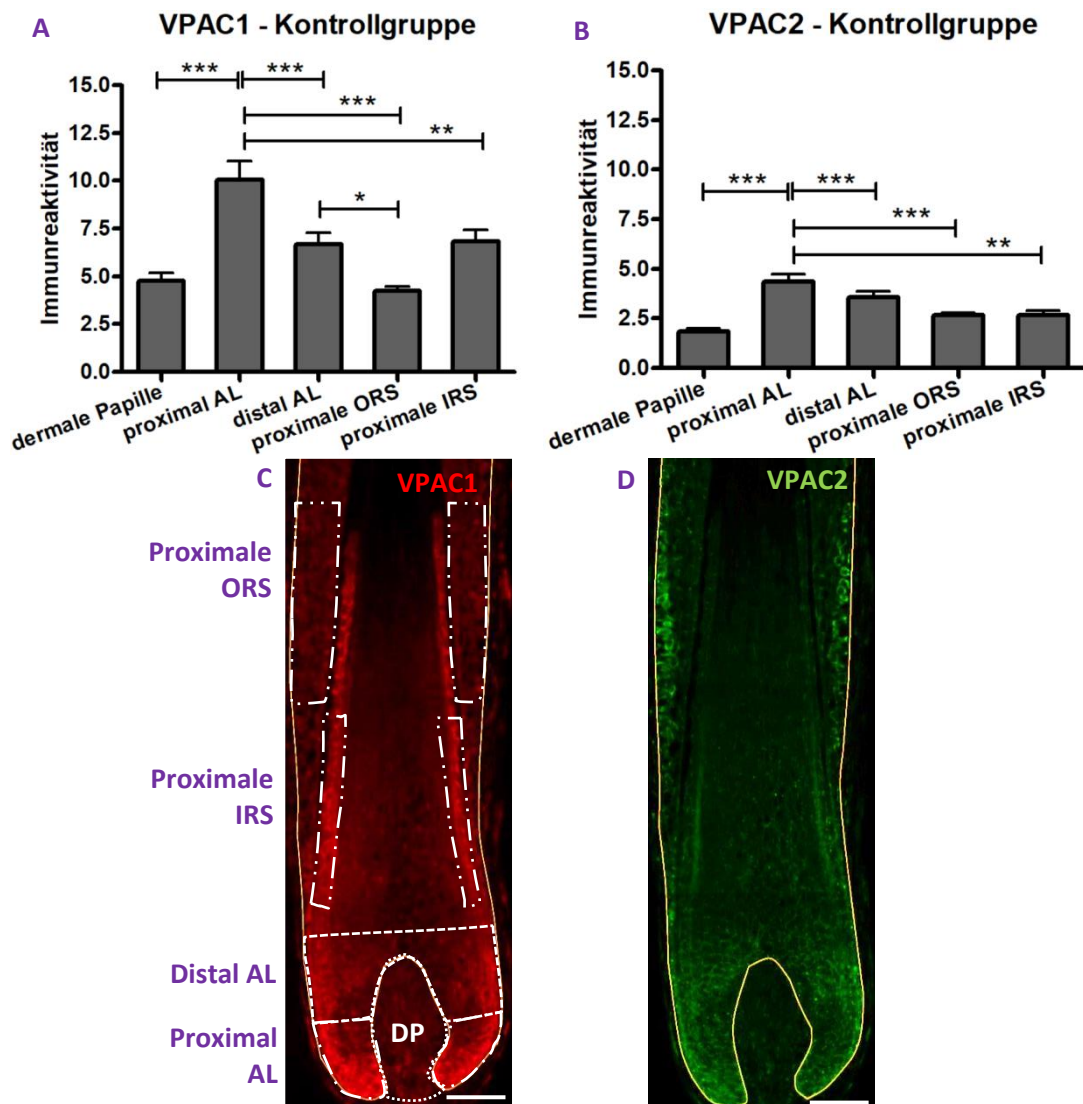


Abbildung 3.4 Die VIP-Rezeptoren werden im proximalen Haarbulbus mit der höchsten Intensität exprimiert.

Mikrodissezierte Haarfollikel wurden kultiviert, mit vasoaktivem intestinalen Peptid behandelt, mittels VPAC1/2 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung gefärbt und ausgewertet. Repräsentative Aufnahmen, die jeweils aus 3 Einzelaufnahmen zusammengesetzt sind (C, D). Balken 50 μ m. N=25-39 Haarfollikel von 3 Patientinnen. Mittelwert $\pm$ SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. P wurde mit der Ein-Weg Varianzanalyse mit Bonferronis Post-Hoc-Test berechnet. AL: Aubersche Linie; DP: Dermale Papille; IRS: Suprabulbäre innere Wurzelscheide; n: Anzahl; ORS: Suprabulbäre äußere Wurzelscheide; p: Signifikanzwert; SEM: Standardfehler des Mittelwertes; VPAC1/2: VIP-Rezeptor 1/2.

Die Daten der quantitativen Untersuchung ergänzen die qualitative Beurteilung der Verteilungsmuster von VPAC1 und VPAC2 (siehe Kapitel 3.3.1). Es bestätigte sich, dass beide VIP-Rezeptoren im proximalen Bulbus mit der höchsten Intensität exprimiert werden. Interessanterweise ist nur bei VPAC1 die suprabulbäre IRS stärker immunreaktiv

als die ORS (siehe Abbildung 3.4). Beim qualitativen Vergleich der VIP-Rezeptoren schien VPAC1 vorwiegend in der suprabulbären IRS und VPAC2 vorwiegend in der Basalzellschicht der suprabulbären ORS exprimiert zu werden. Die direkte Gegenüberstellung der Proteinexpressionen von VPAC1 und VPAC2 ist nicht sinnvoll, da das Expressionsniveau von VPAC1 in allen Referenzarealen höher war als das von VPAC2 (siehe Abbildung 3.4.A, B). Die VIP-Rezeptoren wurden proximal der AL am stärksten exprimiert (VPAC1 = 10,1; VPAC2 = 4,3) und der Anteil des Referenzareals mit der geringsten IR war bei beiden gleich (VPAC1_{ORS} = 42 %; VPAC2_{DP} = 42 %). Es erfolgte die Gegenüberstellung der VIP-Rezeptoren mittels Normalisierung zum Referenzareal mit der höchsten IR (siehe Abbildung 3.5).

Die Gegenüberstellung der VIP-Rezeptoren zeigte, dass VPAC1 in der suprabulbären IRS mit höherer Intensität exprimiert wurde als VPAC2. Wiederum wurde VPAC2 in der suprabulbären ORS mit höherer Intensität exprimiert. In den weiteren Referenzarealen unterschied sich die Intensität der Proteinexpressionen von VPAC1 und VPAC2 nicht signifikant (siehe Abbildung 3.5).

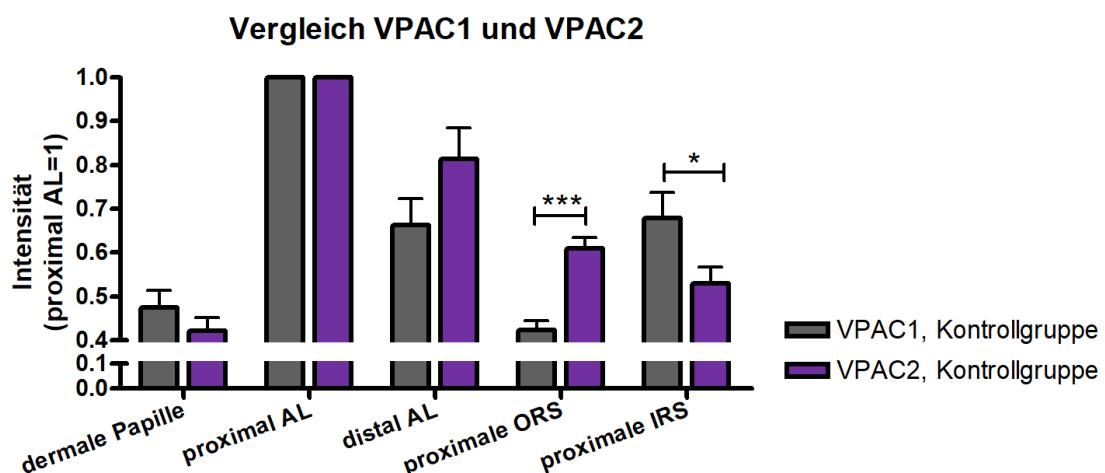


Abbildung 3.5 Vergleich der suprabulbären Expression von VIP-Rezeptor 1 und 2.

Die Daten von VPAC1 und VPAC2 aus Abbildung 3.4 wurden zum Referenzareal proximal der Auberschen Linie normalisiert und verglichen. N=25-39 Haarfollikel von 3 Patientinnen. Mittelwert $\pm$ SEM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. P wurde mit dem zweiseitigen t-Test mit Welchs-Korrektur berechnet. Es wurden nur die Signifikanzwerte innerhalb einer Region dargestellt. AL: Aubersche Linie; IRS: Suprabulbäre innere Wurzelscheide; n: Anzahl; ORS: Suprabulbäre äußere Wurzelscheide; p: Signifikanzwert; SEM: Standardfehler des Mittelwertes; VPAC1/2: VIP-Rezeptor 1/2.

In der Zusammenschau wird deutlich, dass VPAC1 auf Genebene und Proteinebene der vorherrschend exprimierte VIP-Rezeptor ist (siehe Abbildung 3.1 und Abbildung 3.4). In den ausgewerteten Kompartimenten besteht eine rezeptorspezifische Verteilung der VIP-Rezeptoren (siehe Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5). Die Proteinexpression der VIP-Rezeptoren war im proximalen Bulbus am größten, dem Referenzareal der stark proliferierenden Matrixkeratinozyten. In der suprabulbären IRS, dem Referenzareal der terminal differenzierten Keratinozyten, bestand im Vergleich zu VPAC2 eine höhere Intensität der VPAC1-Expression. In der proximalen suprabulbären ORS, dem Referenzareal der epithelialen Vorläuferzellen, bestand im Vergleich zu VPAC1 eine höhere Intensität der VPAC2-Expression. In der DP, wurden VPAC1 und VPAC2 gering exprimiert.

Die charakteristische Verteilung von VPAC1 und VPAC2 könnte eine differenzierte Beeinflussung der follikulären Biologie durch VIP ermöglichen. Folglich wurde untersucht, ob die Behandlung mit VIP zu relevanten Veränderungen der Signalwege von VIP, Keratinozyten und Melanozyten führt (siehe Kapitel 3.4 bis Kapitel 3.6).

3.4 Einfluss von VIP auf endogenes VIP und die VIP-Rezeptoren

3.4.1 VIP reduziert die Genexpression von VIP und VIP-Rezeptor 1

Die Analyse der Physiologie des VIP und seiner Rezeptoren zeigte, dass die Ausschüttung von VIP die Biologie des HF über die VIP-Rezeptoren beeinflussen kann (siehe Kapitel 3.3). Folglich wurde der Einfluss von exogen zugeführtem VIP auf die Genexpression von endogenem VIP und den VIP-Rezeptoren untersucht. Dazu wurden mikrodissizierte HF kultiviert und mit VIP behandelt. Die Transkriptmengen von VIP, VPAC1 und VPAC2 wurden mittels RT-qPCR und $\Delta\Delta C_t$ -Methode untersucht.

Die Behandlung mit VIP führte zu einer Reduktion der Transkriptmenge von VIP und VPAC1 (siehe Abbildung 3.6.A, B). Die Transkriptmenge von VPAC2 wurde nicht signifikant verändert (siehe Abbildung 3.6.C).

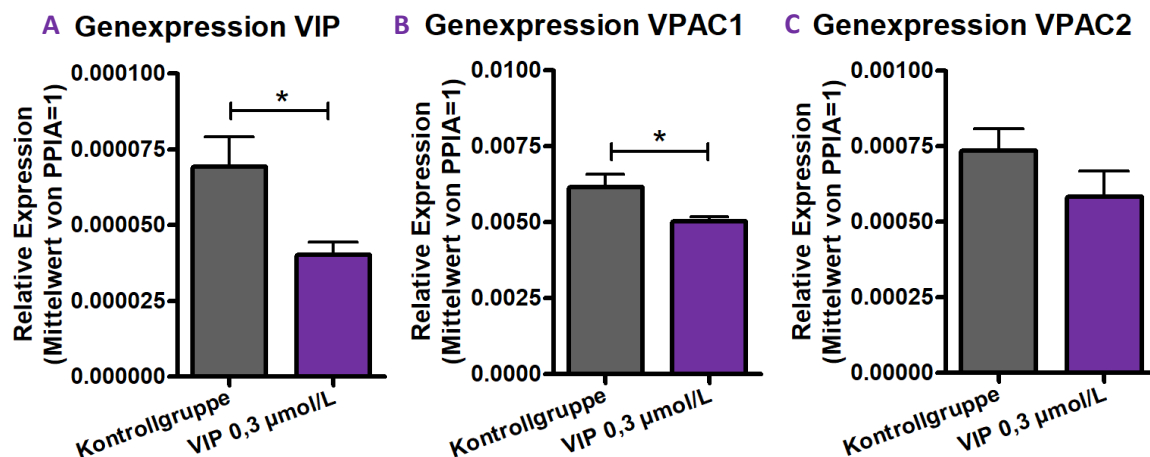


Abbildung 3.6 VIP reduziert die Genexpression von VIP und VIP-Rezeptor 1.

Die Bestimmung der Transkriptmengen erfolgte mittels Echtzeit quantitativer Polymerase-Kettenreaktion. N=72 Haarfollikel von 4 Patientinnen. Mittelwert $\pm$ SEM. * $p < 0,05$. P wurde mit dem zweiseitigen t-Test mit Welchs-Korrektur berechnet. n: Anzahl; p: Signifikanzwert; PPIA: Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase; SEM: Standardfehler des Mittelwertes; VIP: Vasoaktives intestinales Peptid.

Die Behandlung mit VIP führte zur Reduktion der Synthese von VIP-mRNS und VPAC1-mRNS. Dies lässt schlussfolgern, dass die endogene VIP-Synthese und die mRNS-Expression von VPAC1 nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung reguliert werden. Die mRNS-Expression von VPAC2 scheint von der negativen Rückkopplung ausgenommen. Es stellte sich die Frage, ob die VIP-Rezeptoren auf Proteinebene negativ reguliert werden.

3.4.2 VIP reduziert die Proteinexpression des VIP-Rezeptor 1

Exogen zugeführtes VIP führte zu einer verringerten mRNS-Transkription von VPAC1. Es sollte überprüft werden, ob die Proteinexpression der VIP-Rezeptoren negativ reguliert wird. Mikrodissizierte HF wurden kultiviert und mit VIP behandelt. Die Proteinexpression wurde mittels VPAC1/VPAC2 Doppel-IF dargestellt und in fünf Referenzarealen ausgewertet (siehe Abbildung 3.7).

Die Behandlung mit VIP führte zur Reduktion der Proteinexpression von VPAC1 in der proximalen suprabulbären IRS (siehe Abbildung 3.7.A). Die Proteinexpression von VPAC2 wurde durch VIP in keinem Referenzareal signifikant verändert (siehe Abbildung 3.7.B).

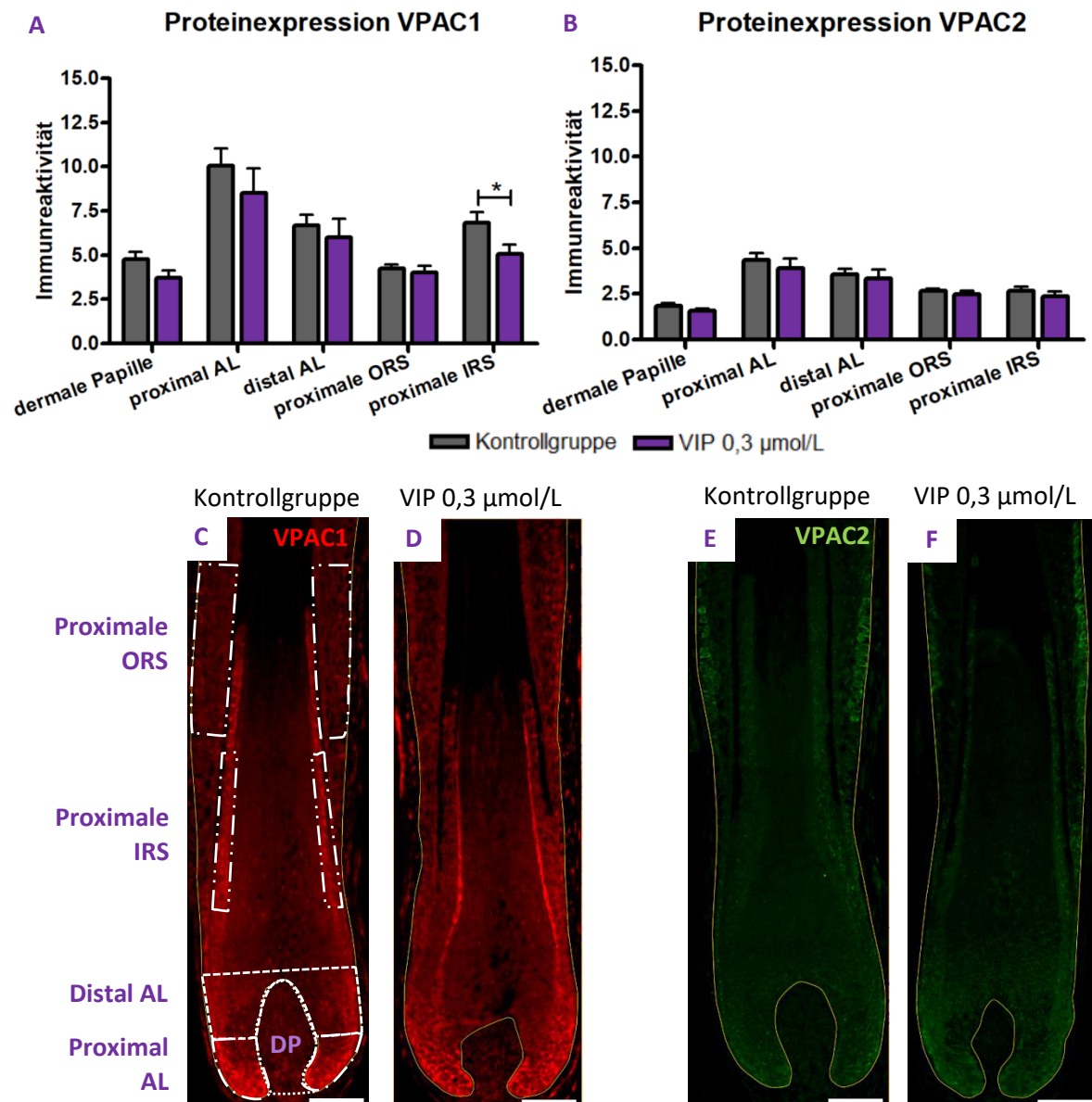


Abbildung 3.7 VIP reduziert die Proteinexpression des VIP-Rezeptor 1.

Mikrodissezierte Haarfollikel wurden kultiviert, mit vasoaktivem intestinalen Peptid behandelt, mittels VPAC1/2 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung gefärbt. Repräsentative Aufnahmen, die jeweils aus 3 Einzelaufnahmen zusammengesetzt sind (C-F). Balken 50 µm. N=25-39 Haarfollikel von 3 Patientinnen. Mittelwert $\pm$ SEM. * $p < 0,05$. P wurde mit dem zweiseitigen t-Test mit Welchs-Korrektur berechnet. Es wurden nur die Signifikanzwerte innerhalb einer Behandlungsgruppe dargestellt. AL: Aubersche Linie; DP: Dermale Papille; IRS: Suprabulbäre innere Wurzelscheide; n: Anzahl; ORS: Suprabulbäre äußere Wurzelscheide; p: Signifikanzwert; SEM Standardfehler des Mittelwertes; VIP: Vasoaktives intestinales Peptid; VPAC1/2: VIP-Rezeptor 1/2.

Die Zusammenschau der Ergebnisse aus Genexpression (siehe Abbildung 3.6) und Proteinexpression (siehe Abbildung 3.7) zeigt, dass die exogene Zufuhr von VIP zur negativen Regulation der endogenen VIP-Synthese und der VPAC1-Expression in der suprabulbären IRS führt. Die Expression von VPAC2 wird durch die Behandlung mit VIP nicht signifikant verändert.

3.5 Einfluss von VIP auf Haarwachstum und Keratinozyten

3.5.1 VIP reduziert die Proliferationsrate von Haarmatrixkeratinozyten

Es wurde gezeigt, dass VIP aufgrund seiner lokalen Verfügbarkeit und dem Verteilungsmuster seiner Rezeptoren VPAC1 und VPAC2 die keratinozytäre Biologie beeinflussen kann (siehe Kapitel 3.3).

Um den Einfluss des VIP auf Proliferation und Apoptose von Matrixkeratinozyten zu untersuchen, wurden mikrodissizierte HF kultiviert und mit VIP behandelt. Der Proliferationsmarker Ki-67 wurde mittels indirekter IF und apoptotische Zellen mittels TUNEL-Methode (siehe Kapitel 2.5.5) detektiert. DAPI diente zur Darstellung von Zellkernen. Die Auswertung erfolgte nach Klöpper *et al.* (siehe Kapitel 2.8.5).

Die Behandlung mit VIP führte zur Reduktion der Proliferationsrate in der Anagen VI Phase, wobei hier erwartungsgemäß keine TUNEL+ Zellen nachweisbar waren (siehe Abbildung 3.8.A-C). In den Katagenphasen führte die Behandlung mit VIP zu keiner signifikanten Änderung von Proliferationsrate oder Apoptoserate (siehe Abbildung 3.8.A).

Die beobachtete Verringerung der Proliferationsrate der Matrixkeratinozyten durch die Behandlung mit VIP steht im Gegensatz zur Förderung der Proliferationsrate epidermaler Keratinozyten (siehe Tabelle 1.2). Es wurde vermutet, dass die verringerte Proliferationsrate der Matrixkeratinozyten durch eine Beschleunigung der Differenzierung bedingt ist. Weiter wurde vermutet, dass VIP in diesem Falle die Differenzierung keratinozytärer Vorläuferzellen ebenfalls beschleunigt (siehe Kapitel 3.5.2) und die Anagen-Katagen-Transformation fördert (siehe Kapitel 3.5.3).

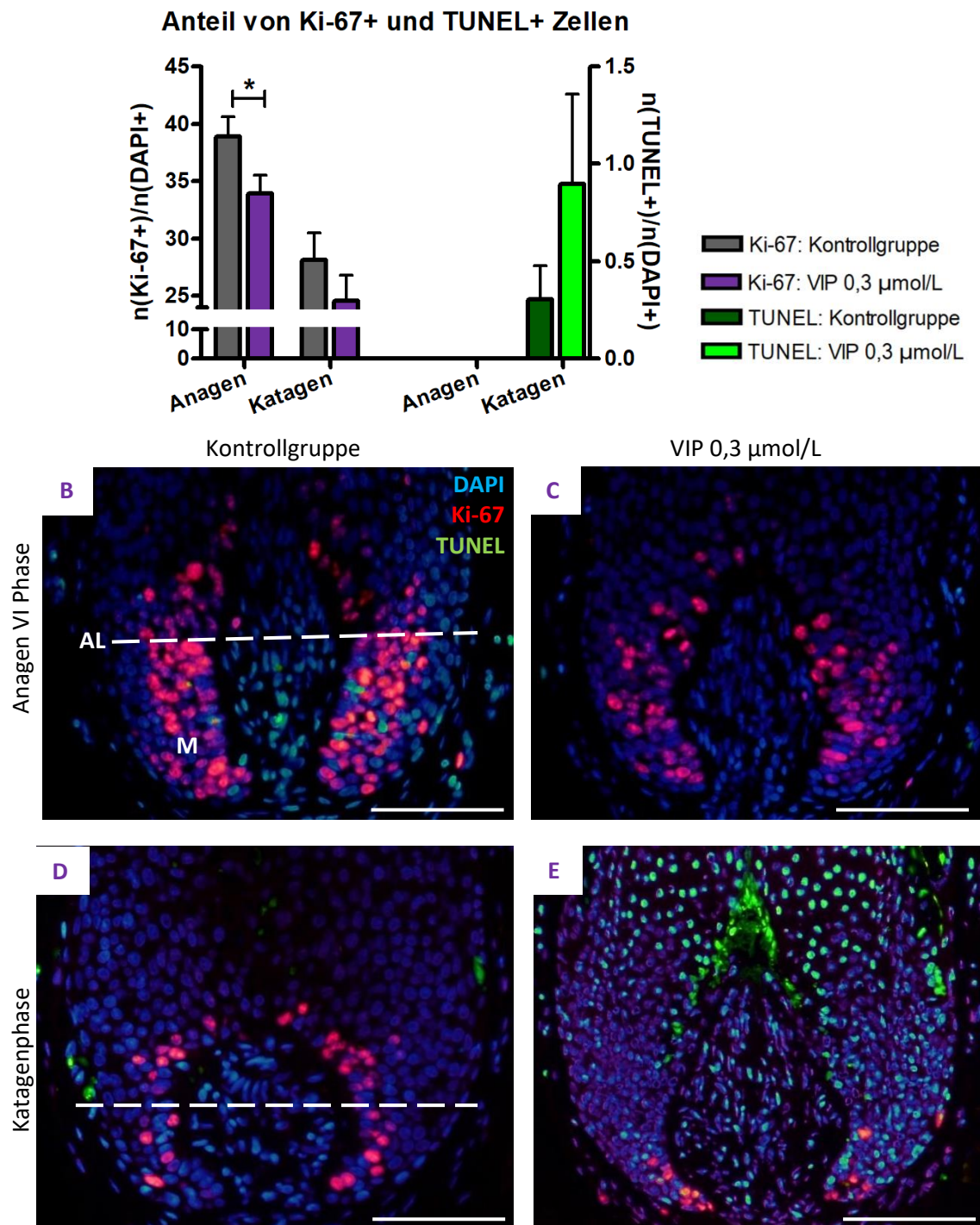


Abbildung 3.8 VIP reduziert den Anteil von Ki-67+ Zellen.

Mikrodissezierte Haarfollikel wurden kultiviert, mit vasoaktivem intestinalen Peptid behandelt, mit Ki-67/TUNEL Doppel-Immunfluoreszenzfärbung gefärbt und ausgewertet. Repräsentative Aufnahmen. Balken 50 µm. N=55-67 Haarfollikel von 5 Patientinnen. Mittelwert ± SEM. *p<0,05. P wurde mit dem zweiseitigen t-test mit Welchs-Korrektur berechnet. Es wurden nur die Signifikanzwerte innerhalb einer Haarzyklusphase dargestellt. AL: Aubersche Linie; DAPI: 4',6-Diamidin-2-Phenylindol; M: Haarmatrix; n: Anzahl; p: Signifikanzwert; SEM: Standardfehler des Mittelwertes; TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate nick end labelling*; VIP: Vasoaktives intestinales Peptid.

3.5.2 VIP erhöht die Expression stammzellassoziierter Zytokeratine

Es wurde gezeigt, dass die Behandlung mit VIP die Proliferationsrate von Matrixkeratinozyten reduziert. Es wurde vermutet, dass dies in einer beschleunigten Differenzierung der Matrixkeratinozyten und der suprabulbären keratinozytären Vorläuferzellen begründet ist. Es wurde untersucht, ob die Differenzierung keratinozytärer Vorläuferzellen beschleunigt wird. Dazu wurden mikrodissseziert HF kultiviert, mit VIP behandelt, mit CK15/CK19 Doppel-IF gefärbt und in drei Referenzarealen immunhistomorphometrisch ausgewertet (siehe Abbildung 3.9).

Die Behandlung mit VIP führte zu einer Erhöhung der IR von CK15 (siehe Abbildung 3.9.A) und CK19 (siehe Abbildung 3.9.B) jeweils im proximalen Bulbus.

Zusammengefasst ergänzen unsere Ergebnisse detaillierte Aufnahmen paraffinierter mikrodisssezierter HF zu den bestehenden Beschreibungen der CK15- und CK19-Expressionsmuster (Klöpfer *et al.*, 2008; Moll *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2010). Weiterhin wurde gezeigt, dass VIP die keratinozytären Vorläuferzellen im proximalen Bulbus stimuliert. Es stellte sich die Frage, wie sich die zellulären Effekte auf den Haarzyklus und das Haarwachstum auswirken.

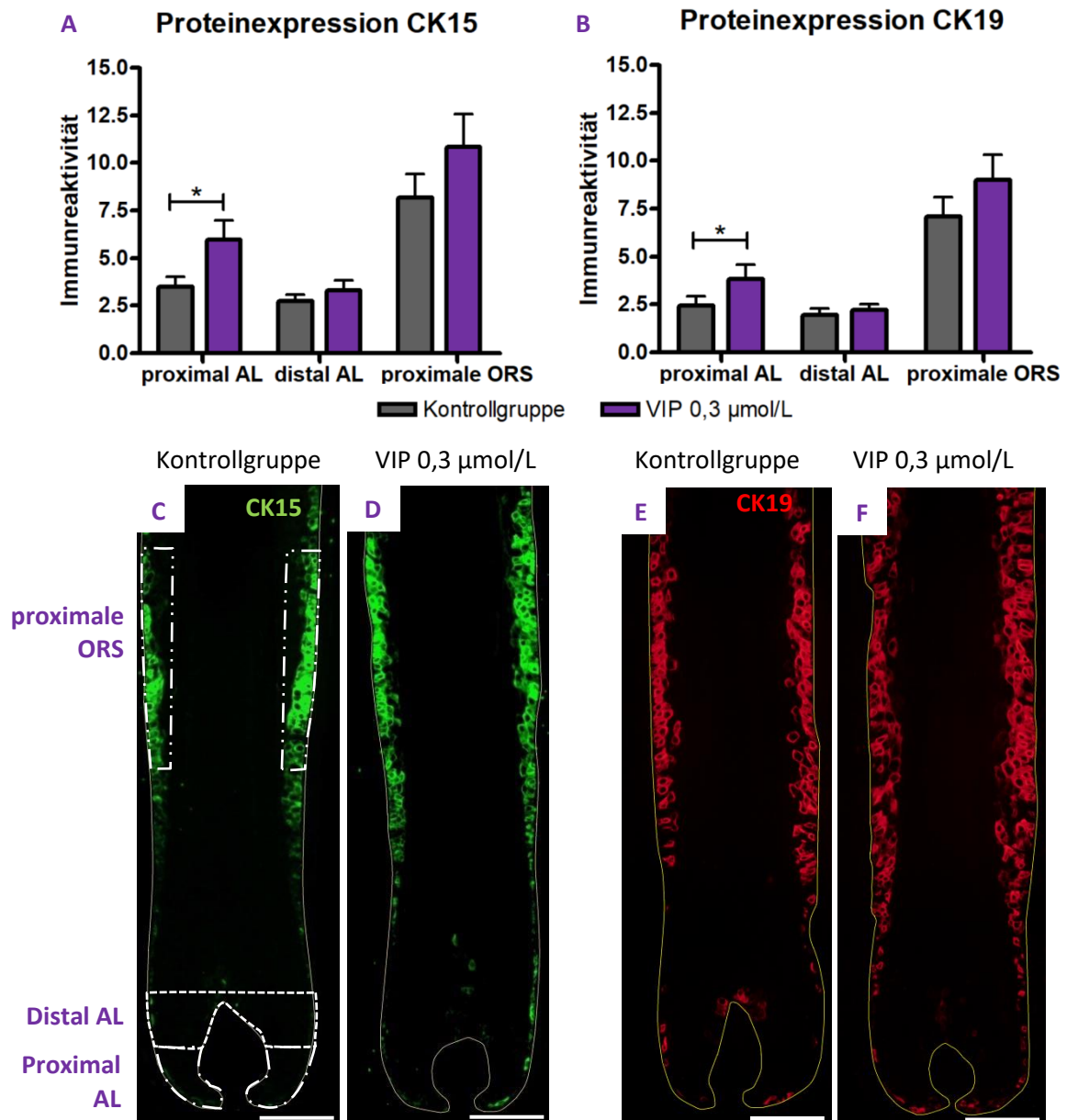


Abbildung 3.9 VIP erhöht die Expression der Zytokeratine 15 und 19 im proximalen Haarbulbus.

Mikrodissezierte Haarfollikel wurden kultiviert, mit vasoaktivem intestinalen Peptid behandelt, mittels CK15/CK19 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung gefärbt und ausgewertet. Repräsentative Aufnahmen, die jeweils aus 3 Einzelaufnahmen zusammengesetzt sind (C, D). Balken 50 μm . N=35-51 Haarfollikel von 4 Patientinnen. Mittelwert $\pm$ SEM. * $p < 0,05$. P wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test (proximal AL und distal AL) und dem zweiseitigen t-Test mit Welchs-Korrektur (proximale ORS) berechnet. Es wurden nur die Signifikanzwerte innerhalb einer Region dargestellt. AL: Aubersche Linie; CK: Zytokeratin; n: Anzahl; p: Signifikanzwert; ORS: Suprabulbäre äußere Wurzelscheide; SEM: Standardfehler des Mittelwertes; VIP: Vasoaktives intestinales Peptid.

3.5.3 VIP fördert die Anagen-Katagen-Transformation

Es wurde gezeigt, dass VIP die Proliferationsrate von Matrixkeratinozyten reduziert. Daher wurde vermutet, dass VIP die Anagen-Katagen-Transformation fördert. Mikrodissezierte HF wurden kultiviert, mit VIP behandelt und sowohl mit der Fontana-Masson-Färbung, als auch mit der Ki-67/TUNEL Doppel-IF gefärbt. Die Auswertung der Haarzyklusphase erfolgte nach Klöpper *et al.* (siehe Kapitel 2.8.5).

Die Behandlung mit VIP erhöhte den HCS (siehe Abbildung 3.10.A). Der Anteil der Anagen VI HF wurde negativ beeinflusst (siehe Abbildung 3.10.B), wobei das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde ($p = 0,28$).

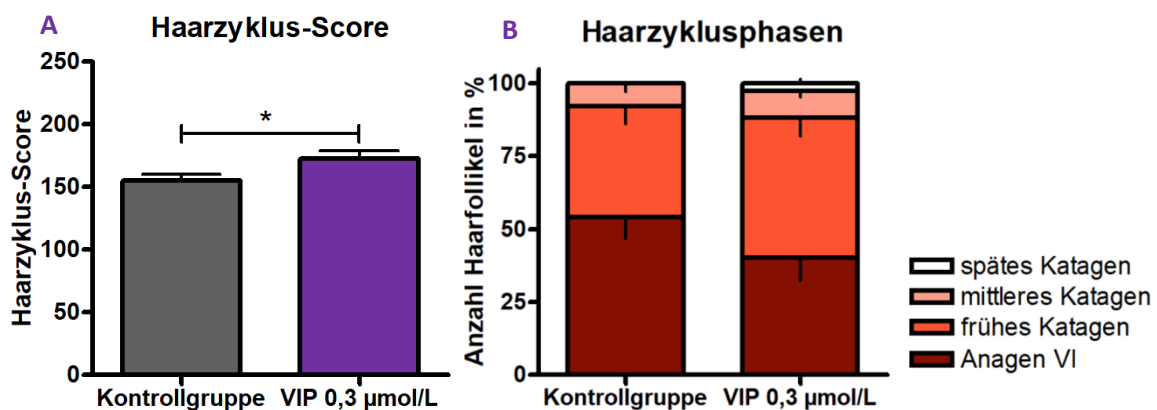


Abbildung 3.10 VIP erhöht den Haarzyklus-Score.

Bei mikrodissezierten, kultivierten, mit vasoaktivem intestinalen Peptid behandelten Haarfollikeln wurden die Haarzyklusphasen bestimmt. N=142-143 Haarfollikel von 5 Patientinnen. Mittelwert $\pm$ SEM. * $p < 0,05$. P wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test (A) oder dem zweiseitigen t-Test (B) berechnet. Es wurden nur die Signifikanzwerte innerhalb einer Haarzyklusphase dargestellt. N: Anzahl; p: Signifikanzwert; SEM: Standardfehler des Mittelwertes; VIP: Vasoaktives intestinales Peptid.

Die Ergebnisse zeigen, dass die erhöhte Verfügbarkeit von VIP die Anagen-Katagen-Transformation fördert. Es wurde vermutet, dass VIP das Haarwachstum inhibiert.

3.5.4 VIP verändert das Haarwachstum nicht

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass VIP die Proliferation von Matrixkeratinozyten inhibiert, die keratinozytären Vorläuferzellen im proximalen Bulbus stimulierte und die Anagen-Katagen-Transformation fördert. Es wurde vermutet, dass VIP das Haarwachstum hemmt. Mikrodissezierte HF wurden über sechs Tage alle 48 Stunden mit VIP behandelt.

Die Behandlung mit VIP führte zu keiner signifikanten Veränderung der kumulativen HF-Verlängerung (siehe Abbildung 3.11).

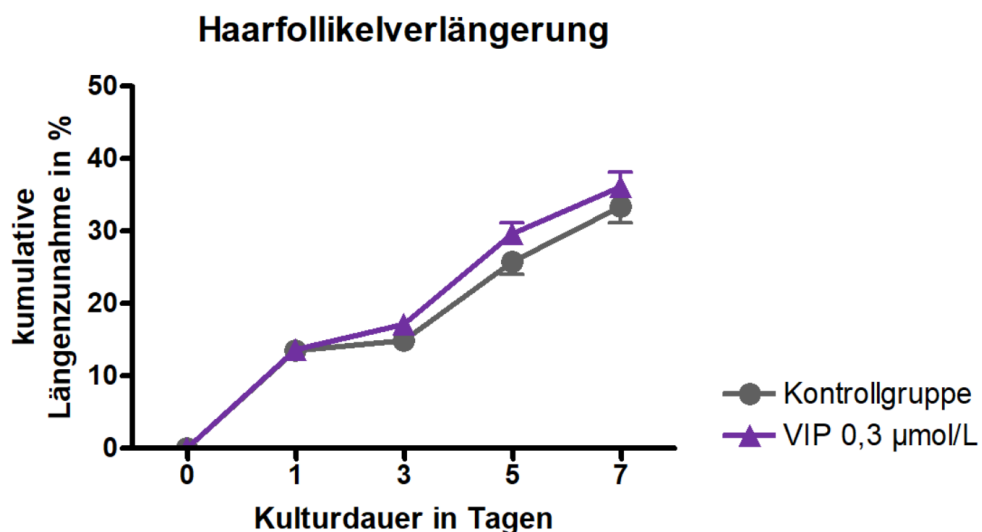


Abbildung 3.11 VIP beeinflusst das Haarwachstum nicht.

Mikrodissezierte Haarfollikel wurden kultiviert und mit vasoaktivem intestinalen Peptid behandelt. N=47-50 Haarfollikel von 3 Patientinnen. Mittelwert $\pm$ SEM. * $p < 0,05$. P wurde mit dem zweiseitigen t-Test mit Welchs-Korrektur berechnet. Es wurden nur die Signifikanzwerte innerhalb eines Zeitpunktes dargestellt. n: Anzahl; p: Signifikanzwert; SEM: Standardfehler des Mittelwertes; VIP: Vasoaktives intestinales Peptid.

Entgegen der Vermutung, veränderte die Behandlung mit VIP die Verlängerung kultivierter HF nicht. Folglich bleibt das Haarwachstum unter Kulturbedingungen von der Behandlung mit VIP entweder unbeeinflusst oder es heben sich wachstumsstimulierende und wachstumsinhibierende Einflüsse auf.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit VIP ein Milieu schafft in dem die Proliferation der Matrixkeratinozyten reduziert wird (siehe Abbildung 3.8), keratinozytäre Vorläuferzellen im proximal Bulbus stimuliert werden (siehe Abbildung 3.9) und der Übergang von der Anagen VI Phase in die Katagenphase induziert wird (siehe Abbildung 3.10). Diese Prozesse hatten nach einer Kulturdauer von sieben Tagen keinen signifikanten Einfluss auf das Haarwachstum (siehe Abbildung 3.11).

3.6 Einfluss von VIP auf Melanogenese und Melanozyten

3.6.1 VIP erhöht die Anzahl melanozytärer Zellen

Es wurde gezeigt, dass exogen zugeführtes VIP die keratinozytäre Biologie beeinflusst (siehe Kapitel 3.5). Daher sollte die Modulation der melanozytären Biologie ebenfalls erforscht werden.

Um einen Überblick über den Einfluss von VIP auf die follikuläre Pigmentbildung zu erhalten, sollte der zentrale Transkriptionsfaktor MITF untersucht werden. Mikrodissezierte HF wurden kultiviert, mit VIP behandelt, mit MITF IF gefärbt und immunhistomorphometrisch ausgewertet (siehe Abbildung 3.12).

Die Behandlung mit VIP führte zur Erhöhung der Anzahl von MITF+ Zellen distal der AL (siehe Abbildung 3.12.A). Proximal der AL bestand eine positive Beeinflussung, wobei das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde ($p = 0,08$).

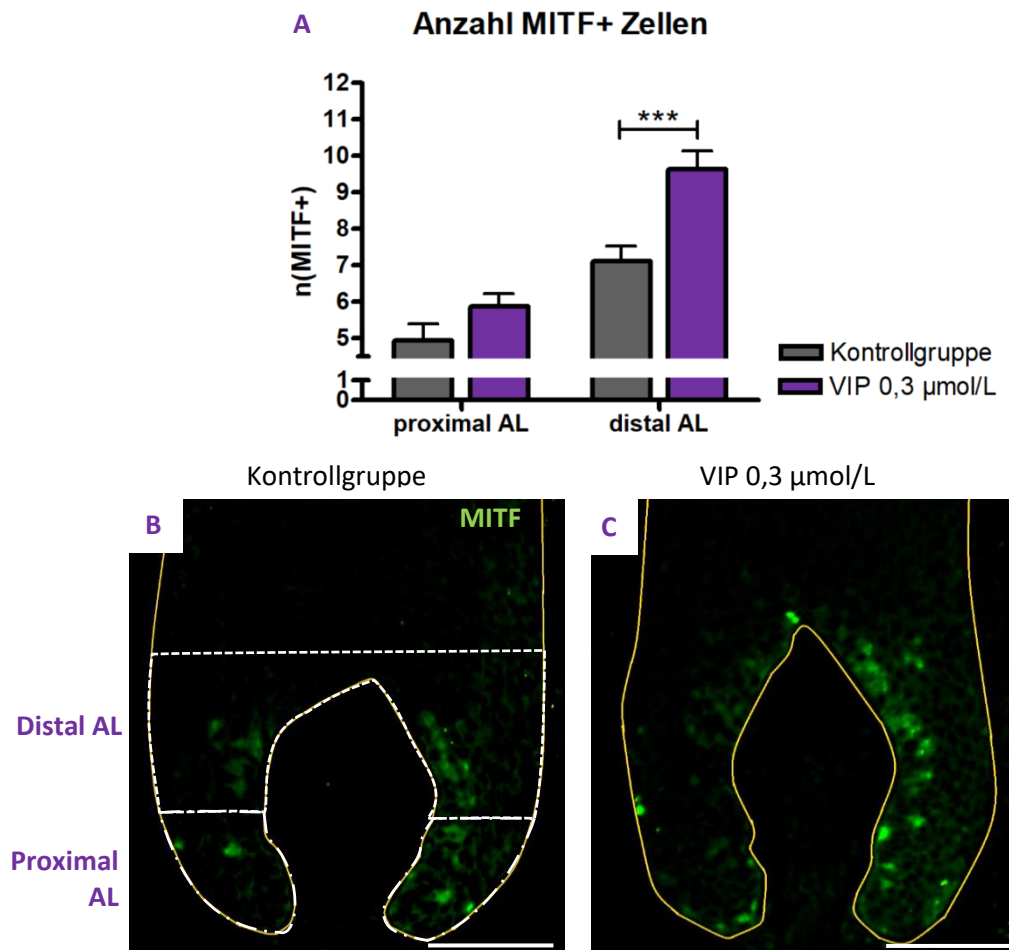


Abbildung 3.12 VIP erhöht die Anzahl von MITF+ Zellen.

Mikrodissezierte Haarfollikel wurden kultiviert, mit vasoaktivem intestinalen Peptid behandelt, mit MITF Immunfluoreszenzfärbung gefärbt und ausgewertet. Repräsentative Aufnahmen. Balken 50 µm. N=33-38 Haarfollikel von 3 Patientinnen Mittelwert ± SEM. ***p<0,001. P wurde mit dem zweiseitigen t-Test berechnet. Es wurden nur Signifikanzwerte innerhalb einer Region dargestellt. AL: Aubersche Linie; MITF: Mikrophthalmie-assoziiertes Transkriptionsfaktor; n: Anzahl; p: Signifikanzwert; SEM: Standardfehler des Mittelwertes; VIP: Vasoaktives intestinales Peptid.

Aus der Erhöhung der MITF+ Zellzahl wurde geschlossen, dass VIP die follikuläre Melanogenese fördert. Daher wurde der Einfluss von VIP auf die Schlüsselproteine der Melanogenese weiter untersucht.

3.6.2 VIP erhöht die Anzahl differenzierter Melanozyten des Haarbulbus

Es wurde gezeigt, dass VIP die Anzahl melanozytärer Zellen erhöht. Folglich wurde der Einfluss von VIP auf melanotische Melanozyten untersucht. Mikrodissezierte HF wurden kultiviert, mit VIP behandelt, mit c-Kit/gp100 Doppel-IF gefärbt und immunhistomorphometrisch ausgewertet (siehe Abbildung 3.13).

Die Behandlung mit VIP erhöhte die Anzahl von gp100+ Zellen distal der AL. Proximal der AL wurde die Anzahl von gp100+ Zellen nicht signifikant verändert (siehe Abbildung 3.13).

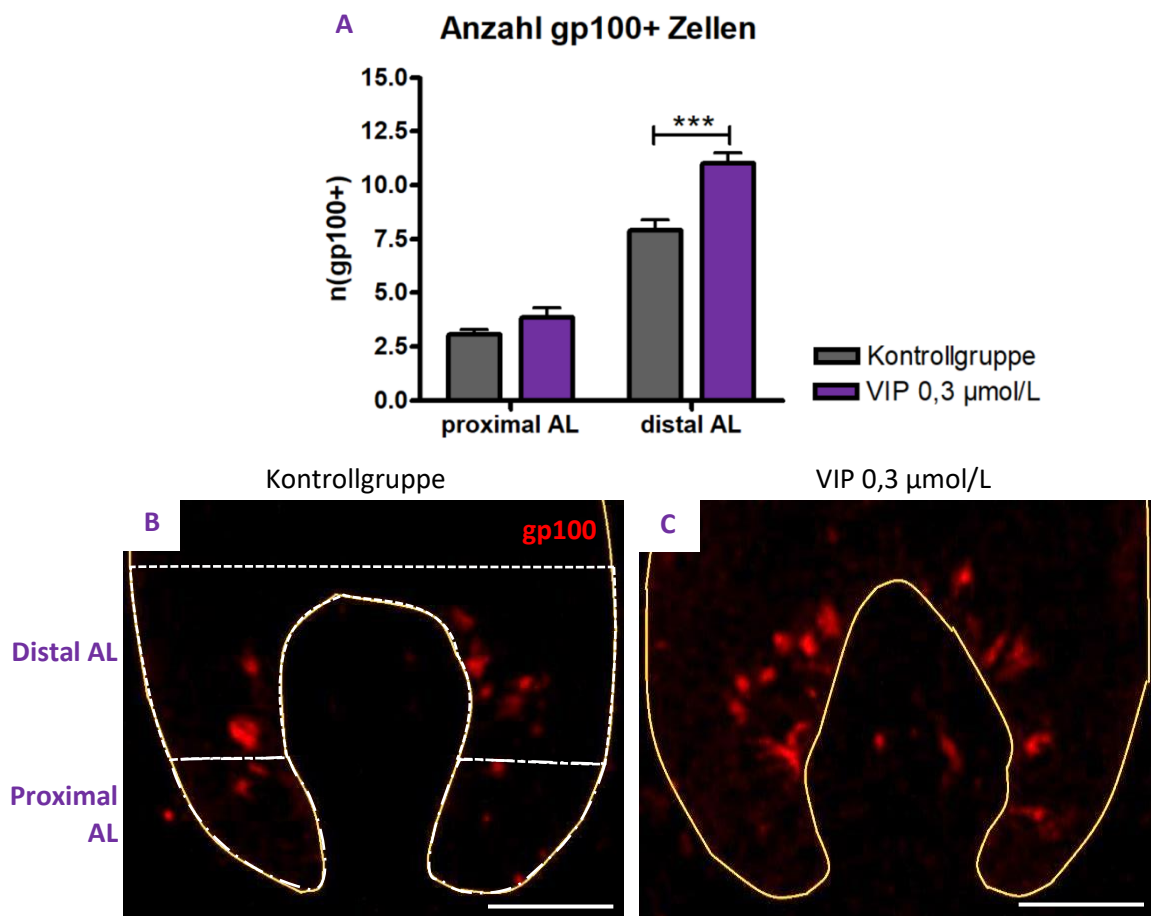


Abbildung 3.13 VIP erhöht die Anzahl von gp100+ Zellen.

Mikrodissezierte HF wurden kultiviert, mit vasoaktivem intestinalen Peptid behandelt, mit c-Kit/gp100 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung gefärbt und ausgewertet. Repräsentative Aufnahmen. Balken 50 µm. N=44-55 Haarfollikel von 4 Patientinnen. Mittelwert ± SEM. ***p<0,01. P wurde mit dem zweiseitigen t-Test berechnet. Es wurden nur die Signifikanzwerte innerhalb einer Region dargestellt. AL: Aubersche Linie; c-Kit: Rezeptortyrosinkinase Kit; n: Anzahl; p: Signifikanzwert; SEM: Standardfehler des Mittelwertes; VIP: Vasoaktives intestinales Peptid.

Zusammengefasst führte VIP zu einer erhöhten Anzahl melanotischer Melanozyten in der pigmentbildenden Zone. Im Folgenden sollte der Einfluss auf die melanozytären Vorläuferzellen untersucht werden.

3.6.3 VIP erhöht die Anzahl Rezeptortyrosinkinase Kit (c-Kit) positiver Zellen

Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung mit VIP die Anzahl melanozytärer Zellen und die Anzahl melanotischer Melanozyten erhöht. Es wurde vermutet, dass VIP ebenfalls die melanozytären Vorläuferzellen beeinflusst. Mikrodissezierte HF wurden kultiviert, mit VIP behandelt, mit c-Kit/gp100 Doppel-IF angefärbt und immunhistomorphometrisch ausgewertet (siehe Abbildung 3.14).

c-Kit wurde in Zellen der bulbären ORS sowie der zentralen, inneren und proximalen Matrix exprimiert. Die Behandlung mit VIP führte zu einer Erhöhung der Anzahl von c-Kit+ Zellen sowohl proximal, als auch distal der AL (siehe Abbildung 3.14.A). Der Effekt war relativ betrachtet proximal der AL ausgeprägter (relative Steigerung proximal um 163 %, distal um 146 %).

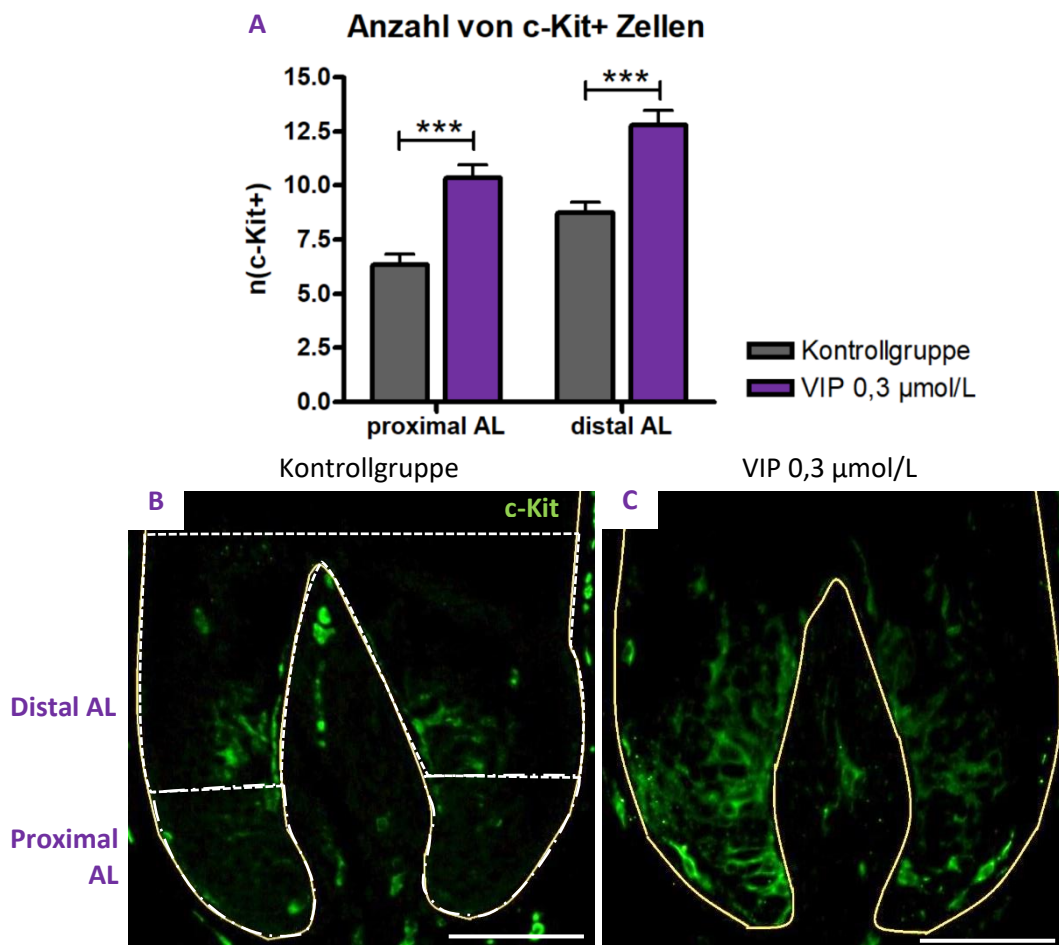


Abbildung 3.14 VIP erhöht die Anzahl von c-Kit+ Zellen.

Mikrodissezierte Haarfollikel wurden kultiviert, mit vasoaktivem intestinalen Peptid behandelt, mit c-Kit/gp100 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung gefärbt und ausgewertet. Repräsentative Aufnahmen. Balken 50 µm. N=43-55 Haarfollikel von 4 Patientinnen. Mittelwert ± SEM. ***p<0,001. P wurde mit dem zweiseitigen t-Test berechnet. Es wurden nur die Signifikanzwerte innerhalb einer Region dargestellt. AL: Aubersche Linie; c-Kit: Rezeptortyrosinkinase Kit; n: Anzahl; p: Signifikanzwert; SEM: Standardfehler des Mittelwertes; VIP: Vasoaktives intestinales Peptid.

Im Bulbus wurden drei morphologisch verschiedene c-Kit+ Zellpopulationen identifiziert (siehe Abbildung 3.15.A). Die erste Population von c-Kit+ Zellen (1) bestand aus großen Zellen mit langen Dendriten, die sich in der zentralen Matrix befanden (siehe Abbildung 3.15.B). Die zweite Population von c-Kit+ Zellen (2) bestand aus kleinen ovalen Zellen mit fehlenden oder sehr kurzen Dendriten, die sich in der bulbären ORS und dem proximalsten Teil der Matrix befanden (siehe Abbildung 3.15.C). Die dritte Population von c-Kit+ Zellen (3) bestand aus kleinen bis mittelgroßen Zellen mit kurzen Dendriten, die

sich in der inneren Matrix und in der proximalen Matrix befanden (siehe Abbildung 3.15.D).

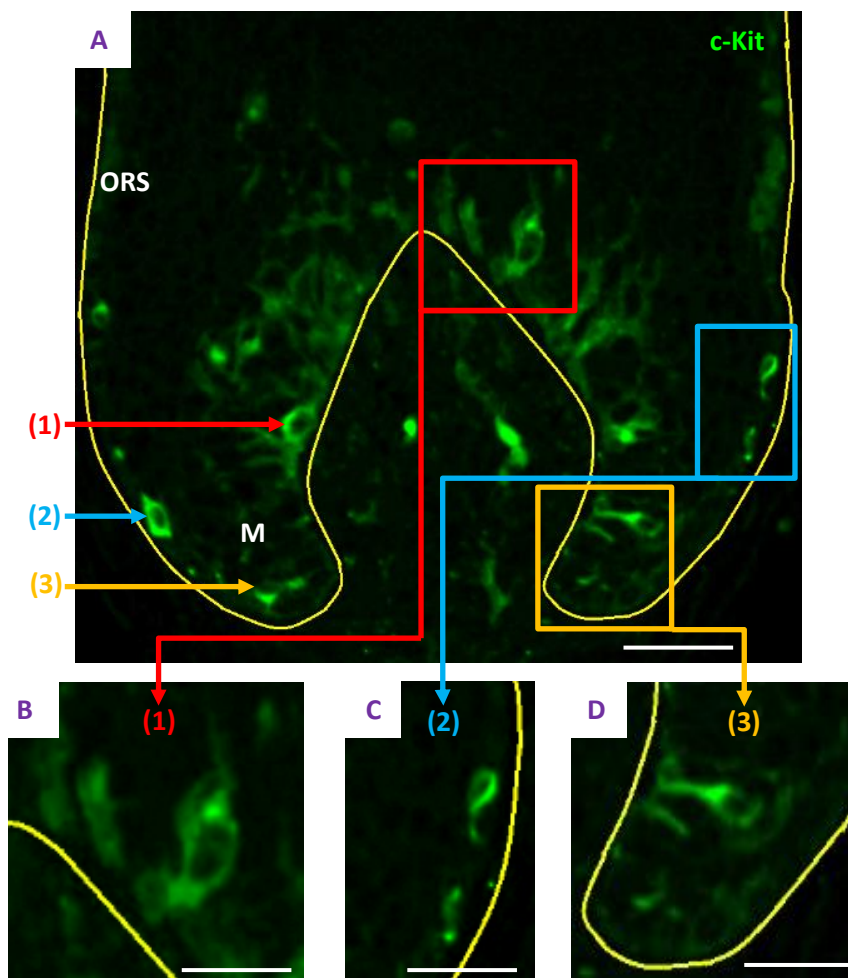


Abbildung 3.15 Im Haarbulbus sind mehrere c-Kit+ Zellpopulationen identifizierbar.

An paraffinierten mikrodisssezierten kultivierten Haarfollikel wurden in der c-Kit Immunfluoreszenzfärbung 3 Zellpopulationen identifiziert. Repräsentative Aufnahmen. Die Abbildungen B-D sind Ausschnitte der Abbildung A. Balken 25 µm. Die Pfeile weisen auf je eine c-Kit+ Zellpopulation: rot, große dendritische Zellen; blau, kleine kaum-dendritische Zellen und gelb, mittelgroße gering-dendritische Zellen. C-Kit: Rezeptortyrosinkinase Kit; M: Haarmatrix; ORS: Bulbäre äußere Wurzelscheide.

Die Identifizierung und Quantifizierung der melaninbildenden c-Kit+ Zellen erfolgten anhand der c-Kit/gp100 Doppel-IF (siehe Abbildung 3.16). Die dendritische Zellpopulation der zentralen Matrix (1) bestand fast ausschließlich aus c-Kit+/gp100+ Zellen. Die kaum-dendritische Zellpopulation der proximalen ORS (2) bestand nur aus c-Kit+/gp100- Zellen. Die gering-dendritische Zellpopulation (3) der inneren und proximalen Matrix bestand aus c-Kit+/gp100+ und c-Kit+/gp100- Zellen.

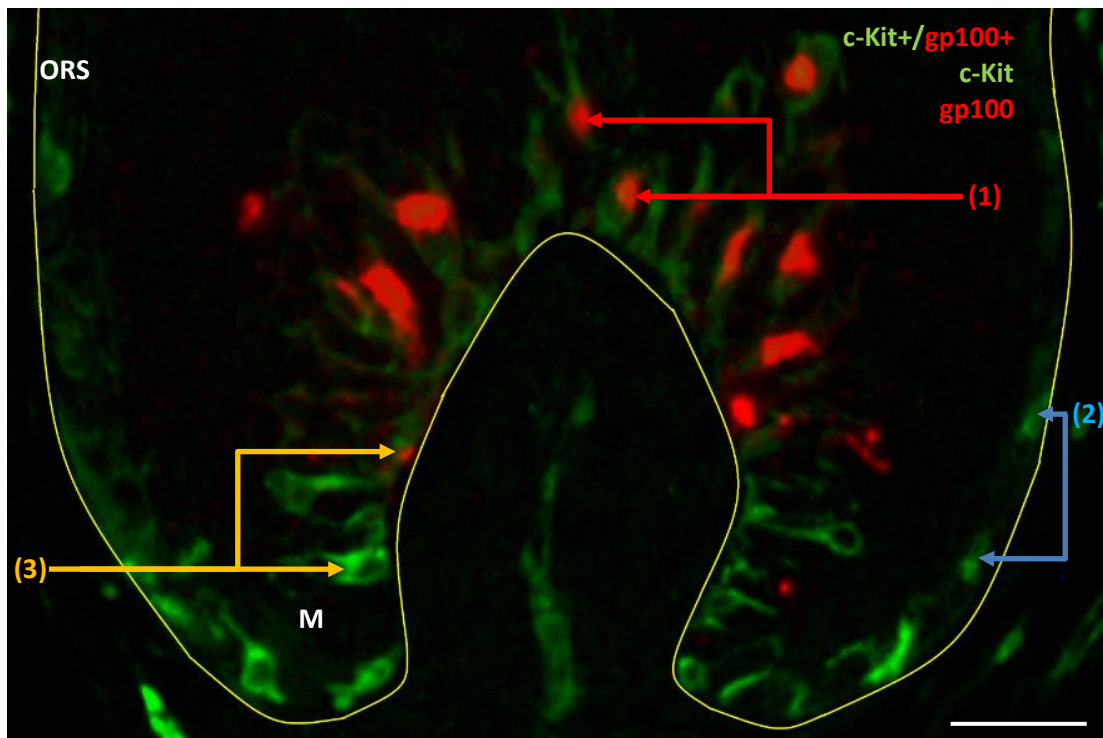


Abbildung 3.16 Die bulbären c-Kit+ Zellpopulationen sind melanozytärer Herkunft.

An paraffinierten mikrodisszierten kultivierten HF wurden in der c-Kit/gp100 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung die Expressionsmuster der drei c-Kit+ Zellpopulationen aus Abbildung 3.15 analysiert. Repräsentative Aufnahme. Balken 25 μ m. Die Pfeile weisen auf die c-Kit+ Zellpopulationen: rot, c-Kit+/gp100+ dendritische Melanozyten; blau, kaum-dendritische ausschließlich c-Kit+ Zellen melanozytäre Vorläuferzellen und gelb, mittelgroße gering-dendritische c-Kit+/gp100- und c-Kit+/gp100+ melanozytäre Vorläuferzellen. C-Kit: Rezeptortyrosinkinase Kit; M: Haarmatrix; ORS: Bulbäre äußere Wurzelscheide.

Die qualitative Auswertung von Morphologie und Antigenexpression ergab, dass die c-Kit+ Zellpopulation (1) aus melanotischen Melanozyten und die Zellpopulation (2) ausschließlich aus nicht-melanotischen melanozytären Vorläuferzellen besteht. Die Zellpopulation (3) umfasste eine Transitpopulation aus melanotischen Melanozyten und nicht-melanotische melanozytäre Vorläuferzellen.

Zusammengefasst identifizierte die Untersuchung die bulbären Melanozytenpopulationen (siehe Abbildung 1.6). Die bisher publizierten Untersuchungen zu diesen Zellpopulationen beschränken sich auf die Beschreibung der groben Morphologie und der Expressionsprofile einzelner Antigene (Kausar *et al.*, 2004; Kausar *et al.*, 2005; Tobin und Kausar, 2005; Kausar *et al.*, 2006).

3.6.4 VIP erhöht den Anteil melanozytärer Vorläuferzellen

Im Rahmen der qualitativen Analyse der c-Kit/gp100 Doppel-IF stellte sich Frage, ob die Behandlung mit VIP den Anteil der nicht-melanotischen melanozytären Vorläuferzellen beeinflusst. In den Gewebeproben aus Kapitel 3.6.3 erfolgte die Quantifizierung der c-Kit+/gp100- Zellen (siehe Kapitel 2.8.8 und Abbildung 3.17).

Die Behandlung mit VIP führte zu einer Erhöhung des Anteil der c-Kit+/gp100- Zellen proximal und distal der AL (siehe Abbildung 3.17.A).

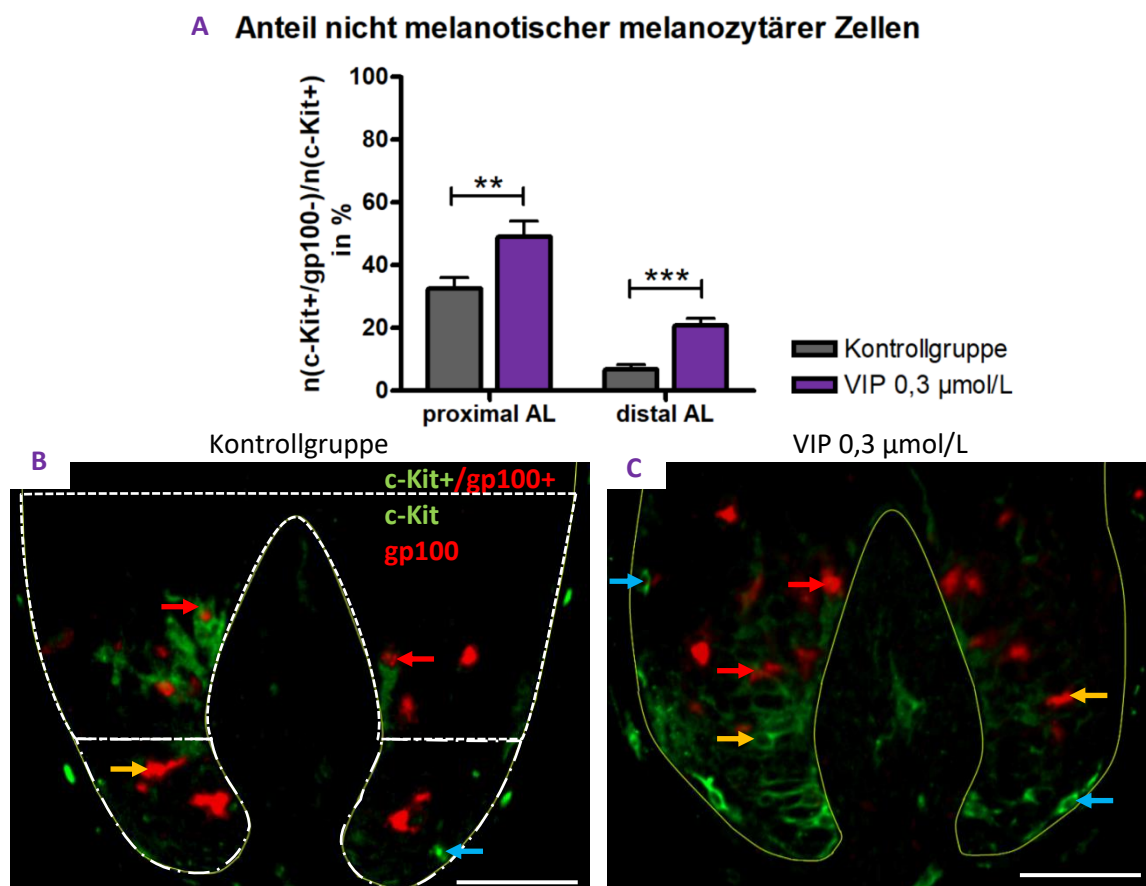


Abbildung 3.17 VIP erhöht den Anteil nicht-melanotischer Melanozyten.

Mikrodissezierte Haarfollikel wurden kultiviert, mit vasoaktivem intestinalen Peptid behandelt, mit c-Kit/gp100 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung gefärbt und ausgewertet. Repräsentative Aufnahmen. Die Pfeile deuten auf: rot, dendritische, melanotische Melanozyten; blau, kaum-dendritische melanotische Vorläuferzellen; gelb, Transitpopulation mit melanotischen und nicht-melanotischen Vorläuferzellen. Balken 50 µm. N=28-43 Haarfollikel von 3 Patientinnen. Mittelwert ± SEM; **p<0,01, ***p<0,001. P wurde mit dem zweiseitigen t-Test (proximal AL) und mit dem Mann-Whitney-U-Test (distal AL) berechnet. Es wurden nur die Signifikanzwerte innerhalb einer Behandlungsgruppe dargestellt. AL: Aubersche Linie; c-Kit: Rezeptortyrosinkinase Kit; n: Anzahl; p: Signifikanzwert; SEM: Standardfehler des Mittelwertes; VIP: Vasoaktives intestinales Peptid.

Die Ergebnisse ergänzen die detaillierte Beschreibung von Morphologie und Verteilung der melanozytären Zellen im Bulbus (siehe Kapitel 3.6.3.). Es wurde gezeigt, dass die Behandlung mit VIP zur Erhöhung der Anzahl bulbärer melanozytärer Zellen führt (siehe Abbildung 3.12 und Abbildung 3.14). Die differenzierten Betrachtungen der melanozytären Subpopulationen zeigten, dass sich sowohl die Zahl melanotischer Melanozyten (siehe Abbildung 3.13), als auch nicht-melanotischer melanozytärer Vorläuferzellen (siehe Abbildung 3.17) steigerte. Es wurde geschlussfolgert, dass VIP die Proliferation und Differenzierung nicht-melanotischer melanozytärer Vorläuferzellen stimuliert.

3.6.5 VIP erhöht die Proliferationsrate c-Kit positiver Zellen des Haarbubus

Die Behandlung mit VIP erhöhte die Anzahl bulbärer melanotischer und nicht-melanotischer melanozytärer Zellen. Es wurde geschlussfolgert, dass die erhöhte Zellzahl durch eine erhöhte Proliferationsrate der nicht-melanotischen melanozytären Vorläuferzellen bedingt ist. Mikrodissizierte HF wurden kultiviert, mit VIP behandelt, mit c-Kit/Ki-67 Doppel-IF gefärbt und immunhistomorphometrisch ausgewertet (Abbildung 3.18).

Die Behandlung mit VIP führte zu einer Erhöhung des prozentualen Anteils der c-Kit+/Ki-67+ Zellen proximal und distal der AL (siehe Abbildung 3.18.A)

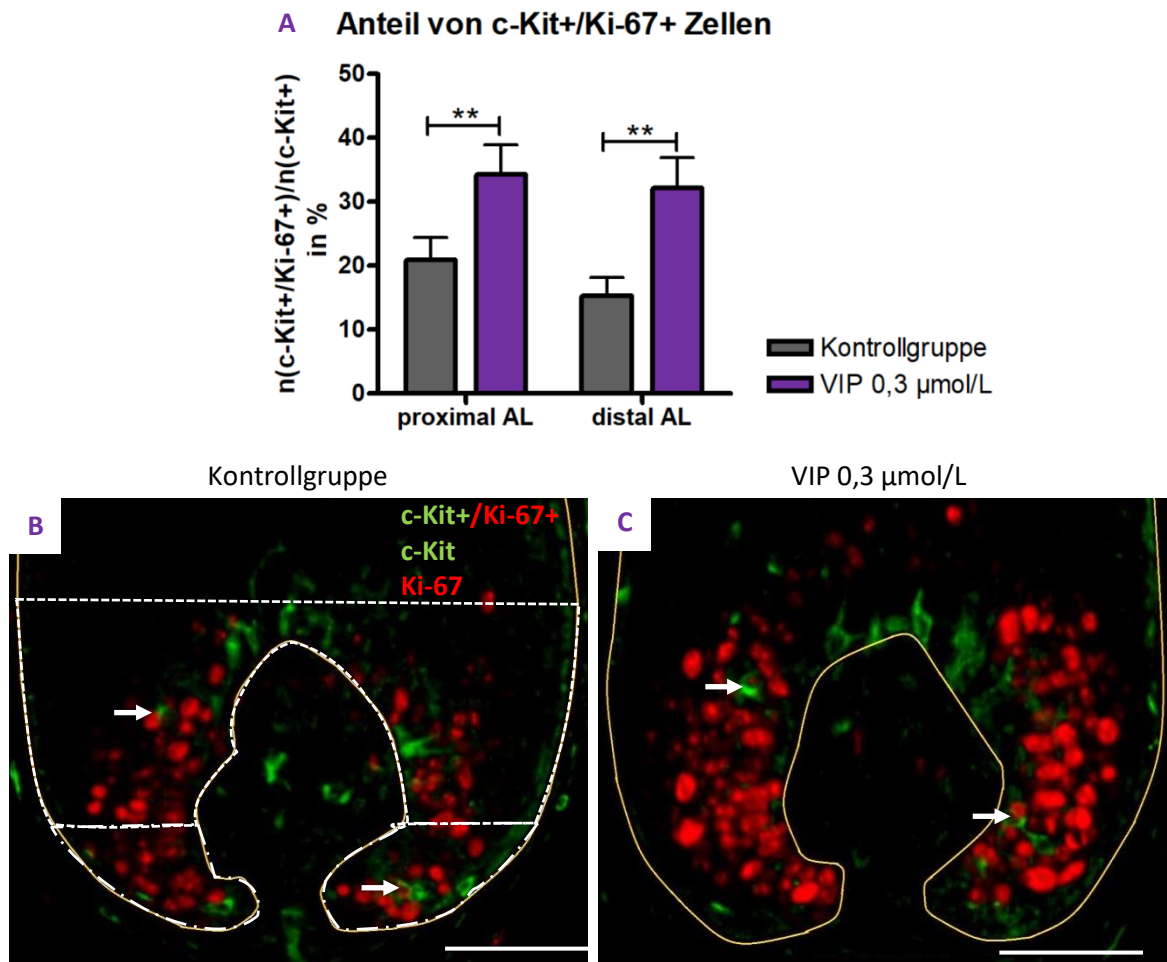


Abbildung 3.18 VIP erhöht den Anteil von c-Kit+/Ki-67+ Zellen an allen c-Kit+ Zellen.

Mikrodissezierte Haarfollikel wurden kultiviert, mit vasoaktivem intestinalen Peptid behandelt, mit c-Kit/Ki-67 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung gefärbt und ausgewertet. Repräsentative Aufnahmen. Balken 50 µm. Die Pfeile deuten auf c-Kit+/Ki-67+ Zellen. N=27-41 Haarfollikel von 3 Patientinnen. **p<0,01. Mittelwert ± SEM. P wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Es wurden nur die Signifikanzwerte innerhalb einer Region dargestellt. AL: Aubersche Linie; c-Kit: Rezeptortyrosinkinase Kit; n: Zellzahl; p: Signifikanzwert; SEM: Standardfehler des Mittelwertes; VIP: Vasoaktives intestinales Peptid.

Zusammengefasst führte die erhöhte Verfügbarkeit von VIP zu einer vermehrten Proliferationsrate melanozytärer Zellen sowohl proximal als auch distal der AL. Die proliferative Aktivität melanotischer Melanozyten ist aufgrund ihrer fortgeschrittenen Differenzierung sehr gering (Tobin, 2011). Daher wurde auf die immunhistochemische Identifikation proliferierender melanotischer Melanozyten (c-Kit+/gp100+/Ki67+) verzichtet und geschlussfolgert, dass sich die erhöhte Proliferationsrate auf die Subpopulation der nicht-melanotischen melanozytären Vorläuferzellen bezieht.

3.6.6 VIP erhöht die Tyrosinaseaktivität

Es wurde gezeigt, dass die Behandlung mit VIP zu einer erhöhten Anzahl melanotischer Melanozyten führte. Es wurde vermutet, dass die Melanogenese durch VIP gefördert wird. HF wurden mit VIP behandelt, die Tyrosinaseaktivität wurde visualisiert und immunhistomorphometrisch ausgewertet (siehe Abbildung 3.19).

Die Behandlung mit VIP führte zu einer erhöhten Tyrosinaseaktivität im Bulbus (siehe Abbildung 3.19.A). Demnach wird die folliculäre Melanogenese durch die Behandlung mit VIP stimuliert.

Es wurde geschlussfolgert, dass VIP den bulbären Melaningehalt erhöht.

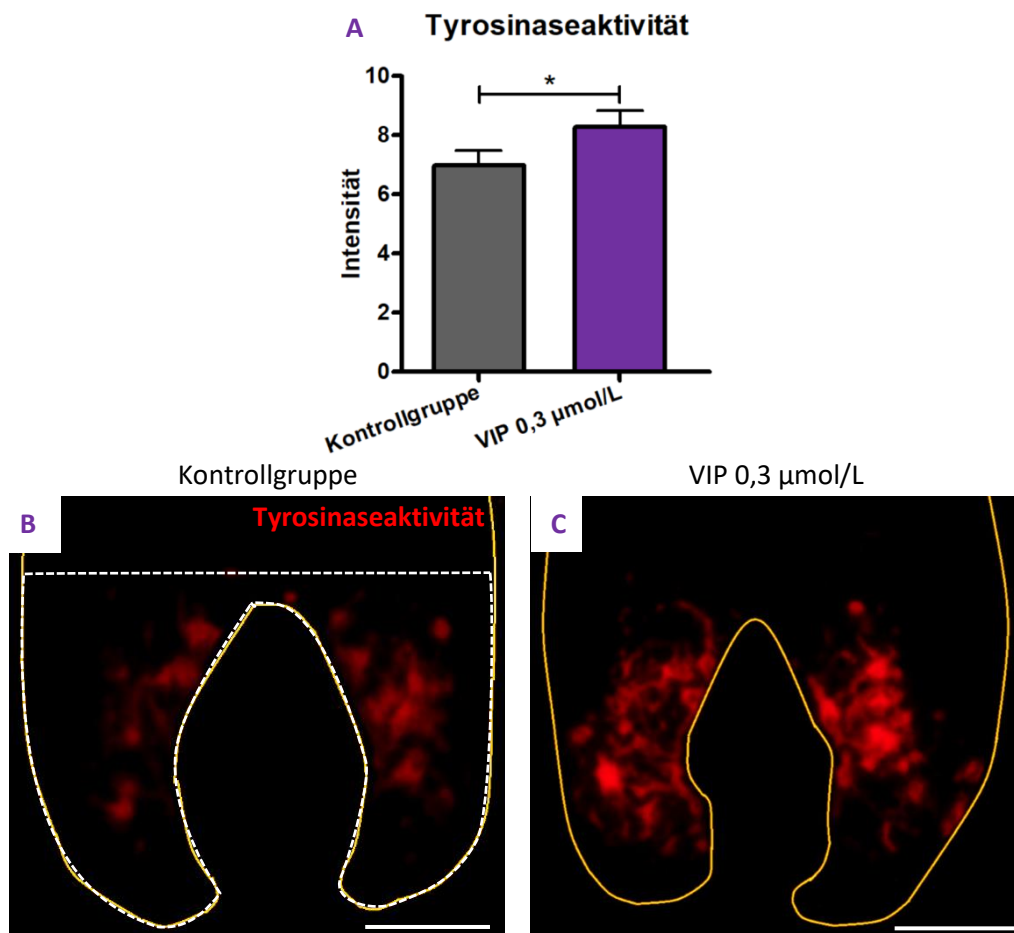


Abbildung 3.19 VIP erhöht die Tyrosinaseaktivität.

In mikrodisszierten, kultivierten, mit vasoaktivem intestinalen Peptid behandelten Haarfollikeln wurde die Tyrosinaseaktivität mittels Tyramid Signal Amplifikationsmethode dargestellt und ausgewertet. Repräsentative Aufnahmen. Balken 50 µm. N=35-36 Haarfollikel von 3 Patientinnen. Mittelwert ± SEM. *p<0,05. P wurde mit dem zweiseitigen t-Test berechnet. VIP: Vasoaktives intestinales Peptid.

3.6.7 VIP verändert den Melaningehalt nicht

Die Behandlung mit VIP führte zu einer erhöhten Anzahl melanotischer Melanozyten (siehe Abbildung 3.13) und zu einer gesteigerten Tyrosinaseaktivität (siehe Abbildung 3.19). Es wurde vermutet, dass der bulbäre Melaningehalt erhöht ist. Mikrodissezierte HF wurden kultiviert, mit VIP behandelt, mittels Fontana-Masson-Färbung gefärbt und histomorphometrisch ausgewertet (siehe Abbildung 3.20).

Die Behandlung mit VIP führte zu keiner signifikanten Änderung der Melaninintensität (siehe Abbildung 3.20.A).

Die Ergebnisse zeigten, dass der Melaningehalt trotz stimulierter Melanogenese nach einer Therapiedauer von zwei Tagen nicht erhöht war.

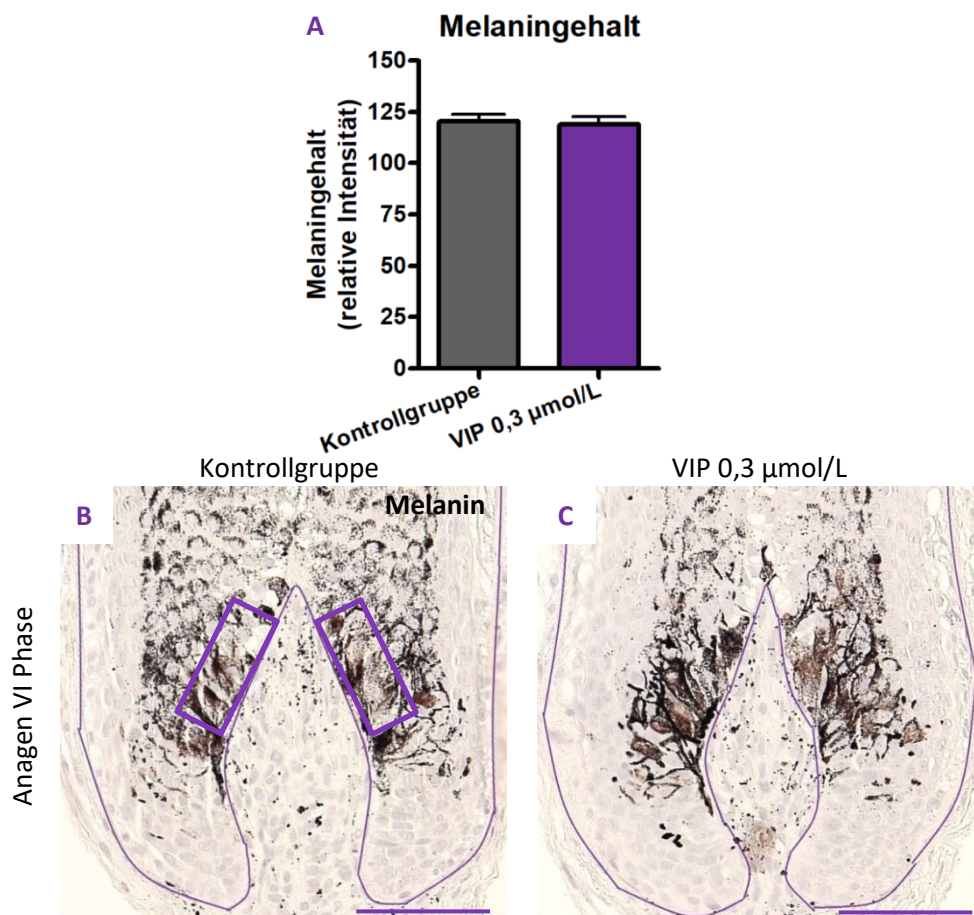


Abbildung 3.20 VIP beeinflusst den bulbären Melaningehalt nicht.

Mikrodissezierte Haarfollikel wurden kultiviert, mit vasoaktivem intestinalen Peptid behandelt, mit Fontana-Masson-Färbung gefärbt und ausgewertet. Repräsentative Aufnahmen. Balken 50 µm. N=58-75 Haarfollikel von 5 Patientinnen. Mittelwert ± SEM. *p<0,05. P wurde mit dem zweiseitigen t-Test berechnet. P: Signifikanzwert; SEM: Standardfehler des Mittelwertes; VIP: Vasoaktives intestinales Peptid.

4 Diskussion

4.1 Einleitende Bemerkungen

Perifollikuläre Nervenfasern schütten zahlreiche Neuropeptide aus (Peters *et al.*, 2001; Roosterman *et al.*, 2006), die sich als Modulatoren der follikulären Biologie erwiesen haben (Peters *et al.*, 2007; Samuelov *et al.*, 2012a). Ziel dieser Studie ist es gewesen, die Biomodulation follikulärer Melanozyten und Keratinozyten durch das Neuropeptid VIP zu beschreiben und neue, klinisch relevante Therapieansätze aufzudecken.

Die spezifischen Fragestellungen dieser Arbeit aus Kapitel 1.5 können nun beantwortet werden.

- 1) VIP wird in perifollikulären Nervenfasern, Mastzellen und Lymphozyten exprimiert. Das follikuläre Epithel zeigt keine VIP-Proteinexpression (siehe Abbildung 3.2).
- 2) Die VIP-Rezeptoren VPAC1 und VPAC2 werden in den Kompartimenten Bulbus, *bulge* und Infundibulum am stärksten exprimiert. Die Intensität der VPAC1-Expression ist im proximalen Bulbus und der suprabulbären IRS am höchsten. Die Intensität der VPAC2-Expression ist im proximalen Bulbus und der Basalzellschicht der ORS am höchsten (siehe Abbildung 3.3). VPAC1 ist der vorherrschende follikuläre Rezeptor. Dies gilt nicht für die suprabulbäre ORS. Hier ist im direkten Vergleich VPAC2 der vorherrschende VIP-Rezeptor (siehe Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5).
- 3) Die Behandlung mit VIP reduziert die endogene Expression von VIP und VPAC1 nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung. VPAC2 unterliegt keiner negativen Regulation durch exogen zugeführtes VIP (siehe Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7).
- 4) VIP reduziert die Proliferationsrate von Matrixkeratinozyten in der Anagen VI Phase des HF (siehe Abbildung 3.8).
- 5) VIP erhöht die Expression der keratinozytären Stammzellmarker CK15 und CK19 in der proximalen suprabulbären ORS (siehe Abbildung 3.9).
- 6) VIP fördert die Anagen-Katagen-Transformation. Allerdings führt die Behandlung mit VIP im verwendeten Kulturzeitraum zu keiner signifikanten Veränderung des Haarwachstums (siehe Abbildung 3.10 und Abbildung 3.11).

- 7) VIP erhöht sowohl die Anzahl melanotischer Melanozyten als auch nicht-melanotischer melanozytärer Vorläuferzellen (siehe Abbildung 3.13 und Abbildung 3.17). Die Proliferation der melanozytären Vorläuferzellen wird durch VIP stimuliert (siehe Abbildung 3.18).
- 8) Die VIP stimuliert die Tyrosinaseaktivität und erhöht die Anzahl der Zellen, welche Schlüsselproteine der follikulären Melanogenese exprimieren (c-Kit, gp100 und MITF). Im verwendeten Kulturzeitraum führte die Behandlung mit VIP zu keiner signifikanten Veränderung des Melaningehaltes (siehe Abbildung 3.12 bis Abbildung 3.14 sowie Abbildung 3.19 und Abbildung 3.20).

4.2 Verwendete Methoden

In der vorliegenden Studie sind Proben temporaler und okzipitaler Kopfhaut von insgesamt 17 Frauen mit einem Alter von 42-69 Jahren verwendet worden. Die Frauen sind klinisch gesund und anamnestisch ohne Vormedikation gewesen. Pro Zielparameter sind drei bis fünf Kulturen mit jeweils 25-75 HF ausgewertet worden. Mit dieser über dem Standard liegenden Menge von HF (Langan *et al.*, 2015) sind valide Ergebnisse generiert worden, trotz physiologisch vorhandener interindividueller Unterschiede. Nichtsdestotrotz ist nur eine eingeschränkte Generalisierbarkeit der Ergebnisse auf Kopfhaarfollikel mittelter und älterer Frauen vertretbar. Vor klinischer Anwendung ist daher eine vergleichende Studie mit Donoren im krankheitsrelevanten und therapie relevanten Alter zwingend erforderlich. Idealerweise würden HF von Männern bei Folgeversuchen integriert und als Subgruppe analysiert werden.

Die spezifischen Fragen beziehen sich insbesondere auf den proximalen Teil des HF, sodass mikrodissizierte HF für die Versuche verwendet worden sind. Die HF-Kultivierung ist nach den aktuellen Standards erfolgt (Langan *et al.*, 2015), die auf den Prinzipien von Philpott *et al.* basieren (Philpott *et al.*, 1994). In dieser Studie ist die Behandlung der HF mit einer VIP-Konzentration von 0,3 µmol/L VIP erfolgt. Es ist nur eine VIP-Dosis verwendet worden, da das Studienziel darin bestanden hatte die Wirkung von VIP auf die Biologie follikulärer Keratinozyten und Melanozyten zu erforschen. Die Dosisabhängigkeit

der Auswirkungen von VIP und anderen Neuropeptiden ist bekannt und wird sich auch auf die in dieser Studie entdeckten Wechselwirkungen erstrecken (Chéret *et al.*, 2014; Bertolini *et al.*, 2016b).

Die VIP-Konzentration von 0,3 $\mu\text{mol/L}$ ($0,3 \mu\text{mol/L} = 3 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$) ist gewählt worden, da sie in publizierten Studien (Lundeberg *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 2007; Chéret *et al.*, 2014) und laboreigenen Vorversuchen (Bertolini *et al.*, 2016b) gute Wirkungen gezeigt hatte. Sie liegt über der physiologischen VIP-Serumkonzentration von 10^{-12} bis 10^{-11} mol/L (Lundberg *et al.*, 1981; Hernanz *et al.*, 1989) und entspricht der VIP-Konzentration an intestinalen (10^{-7} mol/L) Nervenendigungen (Gaginella *et al.*, 1978).

Für die Untersuchung der keratinozytären und melanozytären Zielparameter ist eine eher kurze Kulturdauer von insgesamt 72 Stunden mit 48 Stunden Behandlungszeit nach 24 Stunden Anpassungszeit gewählt worden. Zum einen werden in Neuropeptidstudien regelhaft kurze Kulturdauern verwendet (Sung *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 2007), zum anderen reduziert eine kurze Kulturdauer die Überlagerung der therapeutischen Effekte mit den Auswirkungen kulturbedingter HF-Degeneration (Langan *et al.*, 2015). Weiterhin steigt die Rate der Anagen-Katagen-Transformation mit der Kulturdauer, sodass eine kürzere Kulturdauer zu einer höheren Ausbeute von HF in der Anagen VI Phase führt (Langan *et al.*, 2015). Der Nachteil einer kürzeren Kulturdauer ist, dass Auswirkungen auf komplex regulierte, übergeordnete Prozesse nur bei sehr starker Beeinflussung erfasst werden. Effekte kleineren Ausmaßes würden erst bei längerer Kulturdauer zu signifikanten Unterschieden führen.

In der vorliegenden Studie sollten Expressionsmuster von Zielproteinen untersucht und die Morphologie von Einzelzellen beurteilt werden. Daher sind die HF bevorzugt in Paraffin eingebettet worden. Die Paraffinierung ermöglicht eine Schnittdicke von 4 μm , die im Vergleich zu den 6 μm starken Schnitten kryofixierter Gewebe entscheidende Vorteile aufweist. Durch die geringere Schnittdicke sind mehr Gewebeschnitte gewonnen worden, die alle follikulären Kompartimente enthalten haben. Weiterhin hat eine geringere Schnittdicke eine bessere mikroskopische Beurteilbarkeit der Morphologie von Einzelzellen ermöglicht (siehe Abbildung 4.1). Nachteilig an der Einbettung in Paraffin ist ein deutlich größerer materieller und zeitlicher Aufwand (siehe Kapitel 2.3.4). Zusätzlich hat die Mehrheit der immunhistochemischen und histochemischen Färbungen für

paraffinierte HF separat etabliert werden müssen. Bei der Tyrosinaseaktivität ist dies nicht gelungen, sodass kryofixierte HF mit einer Schnittdicke von 6 µm verwendet worden sind (vergleiche Han *et al.* 2002).

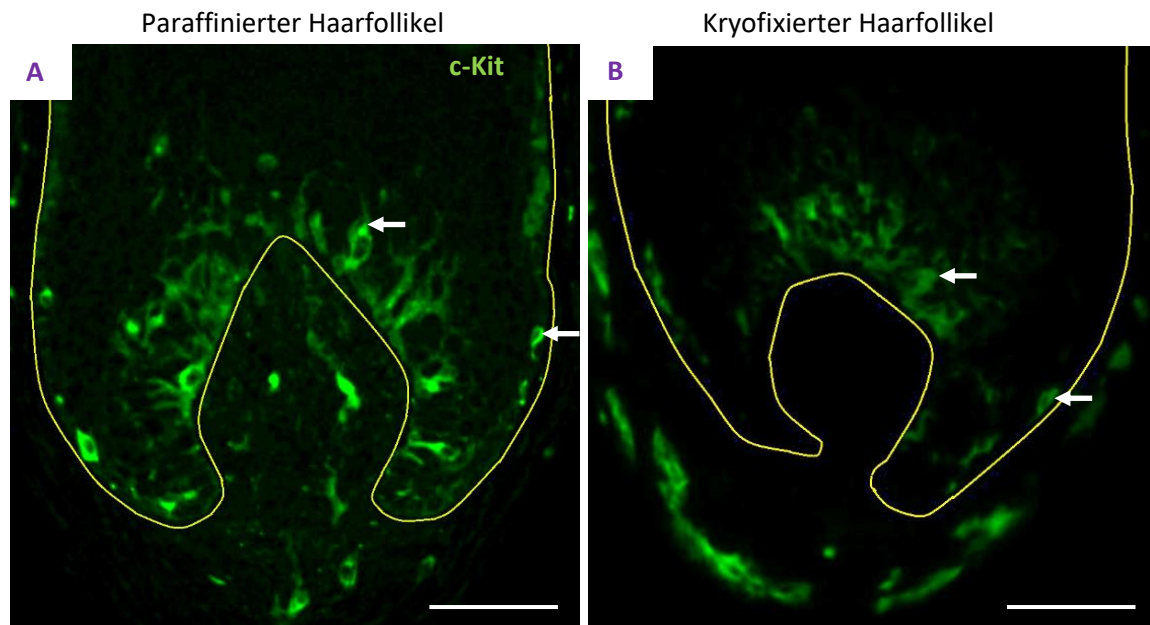


Abbildung 4.1 Vergleich der Bildqualität nach Paraffinierung und Kryofixierung.

Die Einbettung in Paraffin (A) ermöglicht eine bessere Darstellung filigraner zellulärer Strukturen als die Kryofixierung (B). Mikrodissezierte, kultivierte Haarfollikel wurden mit c-Kit-Immunfluoreszenz gefärbt. Repräsentative Aufnahmen. Die Pfeile deuten auf dendritische Melanozyten und melanozytäre Vorläuferzellen. Balken 50 µm. c-Kit: Rezeptortyrosinkinase Kit.

Wenn möglich, sind für die histomorphometrischen und immunhistomorphometrischen und Auswertungen sind, publizierte Richtlinien oder wiederholt publizierte Methoden verwendet worden. Solche „Standards“ existieren für die Haarzyklusphasen, das Haarwachstum, die Ki-67/TUNEL Doppel-IF, den Melaningehalt und die Tyrosinaseaktivität (Klöpper *et al.*, 2013b; Hardman *et al.*, 2015; Langan *et al.*, 2015).

In der suprabulbären ORS orientieren sich die publizierten Referenzareale an anatomischen Leitstrukturen und den mikroskopischen Feldern. Allerdings unterscheiden sich Größe und Lage der Referenzareale zwischen den Publikationen. Weiterhin sind Rechtecke als Begrenzung der Referenzareale verwendet worden, sodass Teile anderer Zellkompartimente wie CTS oder IRS innerhalb der Messbereiche lagen (Ramot *et al.*, 2010; Ramot *et al.*, 2013; Fischer *et al.*, 2014). Die publizierten Referenzareale der IRS

sind den gleichen Prinzipien gefolgt (Samuelov *et al.*, 2012b). In dieser Studie ist ein standardisiertes, möglichst großes Referenzareal verwendet worden, das flexibel an die Anatomie der jeweiligen HF angepasst worden ist (siehe Abbildung 2.9).

Die Auswertung der bulbären Zielstrukturen ist in zwei klar definierten Referenzarealen erfolgt (siehe Abbildung 2.8). Allerdings orientierte sich die äußere Grenze flexibel an der individuellen anatomischen Begrenzung des Bulbus. In Summe haben beide Referenzareale die gesamte Fläche des Bulbus einbezogen (siehe Abbildung 1.6). Diese neue Methode ist wegen der Verteilung der melanozytären Vorläuferzellen in der Basalzellschicht der bulbären ORS notwendig gewesen. Sie hat sich deutlich von den publizierten rechteckigen Referenzarealen unterschieden (Gáspár *et al.*, 2011; Langan *et al.*, 2013). Zur Validierung der neu definierten bulbären Referenzareale ist die Übereinstimmung der Kontrollgruppe mit der physiologischen Verteilung überprüft worden (siehe Abbildung 9.1 bis Abbildung 9.4).

Das Referenzareal der DP ist entlang der individuellen anatomischen Grenze definiert worden, entsprechend der gängigen Praxis (Samuelov *et al.*, 2012b).

Vor Auswertung der Färbungen ist anhand des Expressionsmusters der jeweiligen Zielantigene definiert worden, ob die IR oder die Zellzahl bestimmt werden sollte (siehe Kapitel 2.8.1).

4.3 Expressionsmuster von VIP und seinen Rezeptoren

Es ist bekannt, dass HF von einem dichten Netz von Nervenfasern umgeben sind (siehe Abbildung 1.4). VIP wird von kutanen Nervenfasern (Fahrenkrug, 1989; Pincelli *et al.*, 1990), Leukozyten und Mastzellen exprimiert (Pincelli *et al.*, 1992; Kulka *et al.*, 2008). Bei den bis dato veröffentlichten Studien ist nie der HF im Fokus gewesen, sodass wir das Expressionsmuster von VIP erneut untersucht haben. In gesunder Kopfhaut ist gezeigt worden, dass sich in der CTS VIP-erge Nervenfasern und VIP-exprimierende Mastzellen befinden (siehe Abbildung 3.2). Perifollikuläre Lymphozyten exprimieren ebenfalls VIP, hingegen wird im follikulären Epithel kein VIP exprimiert. Daraus ist geschlussfolgert

worden, dass eine direkte Beeinflussung der follikulären Biologie durch VIP endokrin aus Nervenfasern und parakrin aus Zellen der CTS möglich ist.

Die kutane Verteilung der VIP-Rezeptoren wurde bisher bei VPAC1 auf Proteinebene in unbehaarter Haut (Seeliger *et al.*, 2010) und bei VPAC2 in behaarter Haut auf mRNS-Ebene (Fischer *et al.*, 2001) untersucht. Noch nie ist das follikuläre Expressionsmuster von VPAC1 und VPAC2 auf Proteinebene beschrieben worden. Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass VPAC1 auf Genebene und Proteinebene der vorherrschende follikuläre VIP-Rezeptor ist (siehe Abbildung 3.1 und Abbildung 3.4). Darin besteht Übereinstimmung mit Publikationen, die sich auf die Epidermis (Kakurai *et al.*, 2001) oder unbehaarte Haut (Seeliger *et al.*, 2010) beziehen. Im direkten Vergleich der VIP-Rezeptoren wurde gezeigt, dass VPAC2 in der suprabulbären ORS relativ überexprimiert wird, wohingegen VPAC1 in der suprabulbären IRS relativ überexprimiert wird (siehe Abbildung 4.2).

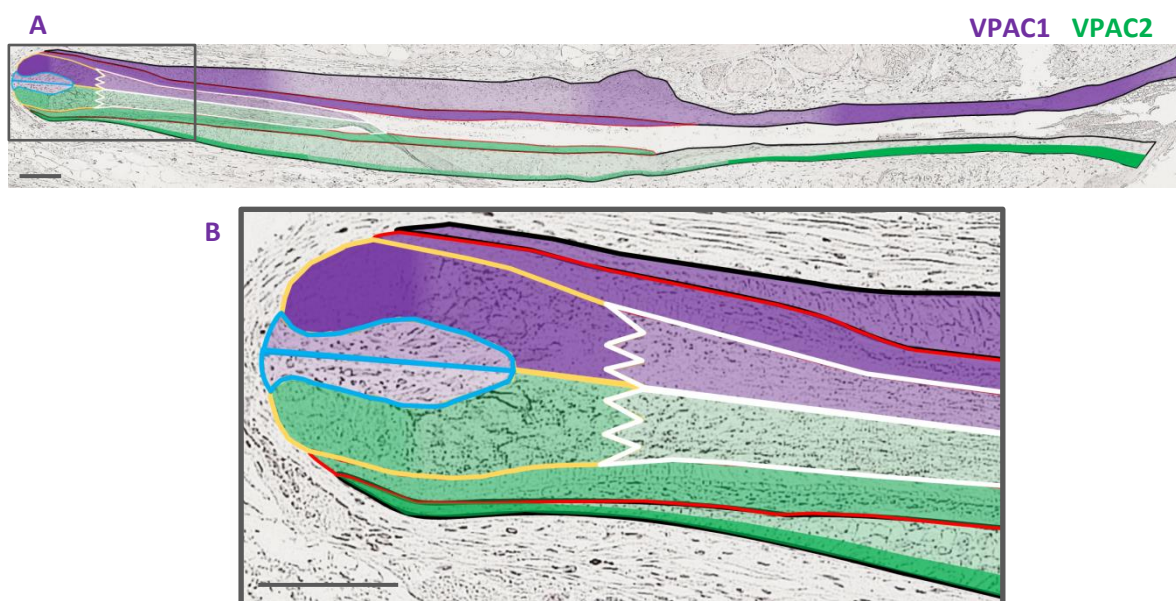


Abbildung 4.2 Vergleich der VIP-Rezeptorexpression.

Schematische Darstellung. Abbildung A ist aus 6 Einzelaufnahmen zusammengesetzt. Abbildung B ist ein Ausschnitt aus Abbildung A. Balken 50 µm. Die Farbintensität ist ein Maß für die Expression der Rezeptoren 1 und 2 des vasoaktiven intestinalen Peptids. Schwarz: Äußere Wurzelscheide, Rot: Innere Wurzelscheide; Weiß: Haarschaft; Gelb: Haarbulbus; Blau: Dermale Papille. VPAC1/2: VIP-Rezeptor 1/2.

Die höhere Intensität der VIP-Rezeptorexpression in den äußeren follikulären Kompartimenten (siehe Abbildung 4.2) und die fehlende VIP-Expression des follikulären

Epithels passen zur Beeinflussung durch eine perifollikuläre VIP-Quelle. Folglich hat die Erhöhung der dermalen VIP-Konzentration therapeutische Relevanz. Denkbar wäre die intravenöse oder topische Applikation von VIP.

Die physiologische Relevanz der erhöhten Intensität der Expression von VPAC1 in der suprabulbären IRS ist unklar. Sie ist möglicherweise eine Folge der physiologischen Zellverdichtung im Rahmen der HS-Keratinisierung. Demnach wäre die VPAC1-Überexpression in der suprabulbären IRS kein funktionell relevanter Teil der Signalwege des VIP.

Die beschriebenen Verteilungsmuster passen zur Biochemie der transmembranösen VIP-Rezeptoren. VPAC1 wird konstitutiv und in zahlreichen humanen Geweben exprimiert. So wird VPAC1 auch follikulär in allen Kompartimenten exprimiert. VPAC2 hingegen ist induzierbar (Laburthe et al., 2002, Moody et al., 2011) und wird follikulär eher selektiv exprimiert. Pharmakologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Signaltransduktion von VPAC1 und VPAC2 über die Signalwege der Proteinkinase A und der Phospholipase C erfolgt (Laburthe et al., 2002). Somit gibt es zwischen VPAC1 und VPAC2 keinen relevanten Unterschied in der postrezeptorischen Signaltransduktion. Es ist biochemisch schlüssig, dass die Wirkung von VIP in erster Linie über den konstitutiv exprimierten VPAC1 erfolgt. Die zusätzliche Expression von VPAC2 führt demnach zu einer Überstimulation der Signalwege, die durch VPAC1 bereits stimuliert sind. Zusammengefasst zeigt die Expression von VPAC2 Kompartimente an, die eine besonders hohe VIP-Sensitivität aufweisen. Am Beispiel des HF bedeutet diese Folgerung, dass die Wirkung von VIP im Allgemeinen über den vorherrschend exprimierten VPAC1 erfolgt. Allerdings erhöht die Expression von VPAC2 die VIP-Sensitivität in den follikulären Kompartimenten, die entweder in räumlicher Nähe zur perifollikulären Nervenfasern liegen oder möglicherweise funktionell besonders relevante Effektoren sind.

Diese These zu bestätigen ist nicht Teil der vorliegenden Studie gewesen. Mit einem selektiven VPAC1-Antagonisten wie PG97-269 könnte, bei gleichzeitiger Behandlung mit VIP, zwischen den über VPAC1 und VPAC2 vermittelt Effekten unterschieden werden (Harmar *et al.*, 2012).

4.4 Einfluss von VIP auf die VIP-erge Neuroendokrinologie

Das Ausmaß der kutanen Innervation ist modulierbar und hat klinische Relevanz. So steigt die Anzahl VIP-erger kutaner Nervenfasern im Alter (Pilkington und Barron, 2018) oder führt die Behandlung neugeborener Ratten mit Capsaicin zu einer Rarefizierung und Verkürzung kutaner Nervenfasern (Martínez-Martínez *et al.*, 2012). Dyshidrose und Wundheilungsstörungen sind kutane Manifestationen des Morbus Parkinson (eine neurodegenerative Erkrankung). Sie sind in Teilen durch eine verminderte Dichte kutaner Nervenfasern und eine reduzierte Expression von VIP bedingt (Kawada *et al.*, 2009; Beitz, 2013). Folglich scheint die Substitution von Neuropeptiden eine pathophysiologisch relevante Therapiestrategie zu sein (Chéret *et al.*, 2014; Verma *et al.*, 2017).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung mit VIP zu einer negativen Feedback-Regulation der endogenen VIP-Synthese und der Expression von VPAC1 führt. VPAC2 ist von der Regulation ausgenommen (siehe Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7). Interessanterweise ist in pharmakologischen Studien an Geweben von Nagetieren oder humanen Karzinomzelllinien gezeigt worden, dass die Behandlung mit VIP zu einer Desensitivierung und Internalisierung von VPAC1 führt (Laburthe und Couvineau, 2002). Für VPAC2 hat es nach Angaben des Autors nur eine Publikation gegeben, die eine Desensitivierung gezeigt hätte (Laburthe und Couvineau, 2002). Unsere Ergebnisse passen zu den pharmakologischen Studien und bestätigen, dass im humanen mikrodisssezierten kultivierten HF eine negative Feedback-Regulation von VPAC1 besteht.

Diese Daten stehen im scheinbaren Gegensatz zu Ergebnissen von Kakurai *et al.*, die an Keratinozyten der Plattenepithelkarzinom-Zelllinie DJM-1 gezeigt haben, dass die Behandlung mit VIP zu einer Erhöhung der Genexpression von VPAC1 führt (Kakurai *et al.*, 2001). Die Autoren haben die Vergleichbarkeit ihrer Ergebnisse jedoch selbst eingeschränkt. So zeigen die potentiell klinisch relevanten, kultivierten epidermalen Keratinozyten im Vergleich zu den kultivierten DJM-1 Zellen eine verringerte Genexpression der VIP-Rezeptoren und ein abweichendes VIP-Rezeptorprofil.

Bei der Autoimmunerkrankung Alopecia areata ist die follikuläre Expression von VPAC1 und VPAC2 vermindert, wobei die Biologie der HF dennoch durch VIP beeinflussbar ist (Bertolini *et al.*, 2016b). Es ist geschlussfolgert worden, dass sich VIP oder stabilere VPAC-Agonisten als potentielle Therapeutika eignen. Wir möchten anhand der vorliegenden

Ergebnisse ergänzen, dass bei Studien mit VIP oder VIP-Analoga die Pharmakodynamik Beachtung verdient. Aufgrund der negativen Feedback-Regulation von VIP und VPAC1 könnte sich die Wirkung bei einer Dauertherapie vermindern. Interessanterweise könnten bereits kurze wirkstofffreie Intervalle könnten die negative Feedback-Regulation mindern oder aufheben. So führen nach Wirkabschwächung nitrathaltiger Medikamente bei einer Dauertherapie bereits wirkstofffreie Intervalle von 12 Stunden zur Wiederherstellung der vollen Wirkstärke (Elkayam *et al.*, 1991).

4.5 Einfluss von VIP auf Haarzyklus und Haarwachstum

Die Rolle von VIP bei neuroinflammatorischen Erkrankungen wie allergisches Asthma bronchiale (Verma *et al.*, 2017), atopische Dermatitis (Voisin *et al.*, 2017) oder Psoriasis (Choi und Di Nardo, 2018) ist in zahlreichen Studien untersucht worden. Beispielweise ist nachgewiesen, dass VIP die Proliferation epidermaler Keratinozyten fördert (Kakurai *et al.*, 2001; Chéret *et al.*, 2014), zur Degranulation epidermaler Mastzellen führt (Kulka *et al.*, 2008) sowie die Differenzierung von Th1-Zellen hemmt und Th2-Zellen stimuliert (Delgado und Ganea, 2013). Bisher ist nicht untersucht worden, ob diese Effekte auch in den Hautanhangsgebilden hervorgerufen werden.

Die Behandlung mit VIP führt zu einer verminderten Proliferationsrate der Matrixkeratinozyten (siehe Abbildung 3.8) und zu einer Förderung der Anagen-Katagen-Transformation (siehe Abbildung 3.10), wobei sich das Haarwachstum nach sieben Kulturtagen nicht von der Kontrollgruppe unterschieden hat (siehe Abbildung 3.11).

Die Ergebnisse passen zu den bisher bekannten Auswirkungen, die Neuropeptide auf HF haben. Sowohl Substanz P (**SP**) (Peters *et al.*, 2007), als auch das Peptid des Calcitoningens (**CGRP**) (Samuelov *et al.*, 2012a) fördern die Anagen-Katagen-Transformation. Im Vergleich scheint das Ausmaß der Katageninduktion bei VIP am geringsten, denn anders als SP hat VIP nicht zur Inhibition des Haarwachstums geführt (Peters *et al.*, 2007). Bei Therapie mit CGRP hat ein HCS von etwa 200 bestanden (Samuelov *et al.*, 2012a), wobei er nach Behandlung mit VIP bei etwa 170 gelegen hat (siehe Abbildung 3.10.A).

Beim Vergleich der genannten Studien ist zu beachten, dass in Peters *et al.* die Inhibition des Haarwachstums bereits bei einer Kulturdauer von drei Tagen bestanden hat (Peters *et al.*, 2007). In Samuelov *et al.* ist der HCS nach den gleichen Standards ausgewertet worden wie in dieser Arbeit, jedoch bleibt unklar, ob die Daten sich auf eine Kulturdauer von fünf Tagen oder sieben Tagen beziehen (Samuelov *et al.*, 2012a). Die Bestimmung der Proliferationsrate mittels Ki-67/TUNEL Doppel-IF ist sowohl bei Peters *et al.* als auch bei Samuelov *et al.* zur Unterscheidung der Haarzyklusphasen verwendet worden. Es wurden HF aller Haarzyklusphasen in die Auswertung einbezogen. Die nachgewiesene Reduktion der Proliferationsrate bezieht sich demnach auf die physiologischen zellulären Prozesse der Anagen-Katagen-Transformation (siehe Kapitel 1.2.2). In der vorliegenden Studie sind ausschließlich HF in der Anagen VI Phase ausgewertet worden. Die nachgewiesene Reduktion der Proliferationsrate (siehe Abbildung 3.8) beschreibt daher die Wirkung von VIP und ist unbeeinflusst von der Physiologie der Anagen-Katagen-Transformation. Interessanterweise steht die durch VIP hervorgerufene Inhibition der Proliferationsrate von Matrixkeratinozyten im Gegensatz zu der nachgewiesenen Stimulation der Proliferationsrate epidermaler Keratinozyten (Chéret *et al.*, 2014).

Die Ergebnisse beweisen, dass sich die Regulationsmechanismen epidermaler und follikulärer Keratinozyten, trotz gemeinsamen ontogenetischen Ursprungs, unterscheiden. Es ist vermutet worden, dass VIP wie in der Epidermis stimulierend auf follikuläre Keratinozyten wirkt, wobei gleichzeitig ein Milieu geschaffen wird, das Prozesse der Anagen-Katagen-Transformation initiiert und dadurch in Summe zur Inhibition der Matrixkeratinozyten führt. Es ist gezeigt worden, dass VIP die keratinozytäre Sekretion proinflammatorischer Zytokine stimuliert (Kakurai *et al.*, 2001), die ihrerseits die Anagen-Katagen-Transformation fördern (siehe Abbildung 1.3).

Die These der stimulierenden Wirkung von VIP auf follikuläre Keratinozyten wird gestützt durch die nachgewiesene Stimulation der keratinozytären Vorläuferzellen in der suprabulbären Region (siehe Abbildung 3.9). Zur differenzierten Überprüfung dieser These könnte in weiterführenden Experimenten die Proliferationsrate der CK15+ und CK19+ Zellen in der suprabulbären ORS bestimmt werden. Weiterhin sollten die Auswirkungen von VIP ohne den Einfluss des zellulären Immunsystems untersucht werden, um den Einfluss des proinflammatorischen Milieus zu minimieren. Dazu könnten

isolierte keratinozytären Vorläuferzellen der suprabulbären ORS (Aasen und Izpisua Belmonte, 2010) oder isolierte Matrixkeratinozyten (Al-Tameemi *et al.*, 2014) verwendet werden.

Trotz einer ausgeprägten zellulären Modulation der Keratinozytenbiologie, ist das Haarwachstum unter Kulturbedingungen unbeeinflusst geblieben (siehe Abbildung 3.11). Der fehlende Nachweis eines reduzierten Haarwachstums, trotz reduzierter Proliferationsrate der Matrixkeratinozyten und Förderung der Anagen-Katagen-Transformation, könnte die oben genannte These der maskierten Stimulation follikulärer Keratinozyten durch VIP stützen. Weiterhin könnte die eher kurze Kulturdauer von sieben Tagen verantwortlich sein, dass die bestehenden Unterschiede noch nicht deutlich genug sind, um das Signifikanzniveau zu erreichen (siehe Kapitel 4.2).

Das Modell der kultivierten mikrodisszierten HF ist seit mehr als 25 Jahren etabliert (Westgate *et al.*, 1993) und liefert valide Ergebnisse. Nichtsdestotrotz unterscheiden sich die Kulturbedingungen *in vitro* deutlich von den Wachstumsbedingungen *in vivo* (Langan *et al.*, 2015). Starke Modulatoren, wie SP, führen bereits unter Kulturbedingungen zu signifikanten Veränderungen der zellulären follikulären Biologie und des Haarwachstums. Andere vermeintlich weniger potente Modulatoren führen zu signifikanten zellulären Veränderungen, jedoch bleibt der klinische relevante Parameter des Haarwachstums unbeeinflusst. So ist bekannt, dass anhaltende Veränderungen des Schilddrüsenhormonspiegels im Blut zu klinisch sichtbaren Veränderungen der Haarfollikel führen (Lause *et al.*, 2017). Unter Kulturbedingungen ist gezeigt worden, dass Veränderungen des Schilddrüsenhormonspiegels zur signifikanten Beeinflussung der Proliferationsrate von Matrixkeratinozyten und der Rate der Anagen-Katagen-Transformation führen. Allerdings ist das Haarwachstum, selbst im Vergleich zur absolut hypothyreoten Kontrollgruppe, nicht signifikant verändert gewesen (Van Beek *et al.*, 2008). Für die vorliegenden Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass eine klinisch relevante Modulation der keratinozytären Biologie durch VIP bestehen kann, auch wenn unter Kulturbedingungen die deutlichen zellulären Veränderungen nicht zu einer signifikanten Modulation des Haarwachstums geführt haben.

4.6 Einfluss von VIP auf die Haarfollikelpigmentierung

In Zellkulturen ist nachgewiesen worden, dass Neuropeptide wie SP die Melanogenese beeinflussen (Park *et al.*, 2015). Abgesehen von der Physiologie des Haarzyklus (Peters *et al.*, 2007; Samuelov *et al.*, 2012a), ist in humanen HF der Einfluss von Neuropeptiden auf die Melanogenese bisher nicht untersucht worden. In Vorversuchen ist eine Verstärkung der follikulären c-Kit-Expression durch VIP beobachtet worden, sodass nicht nur der Einfluss von VIP auf die Melanogenese, sondern auch auf die Biologie follikulärer Melanozyten untersucht werden sollte.

Zur standardisierten Betrachtung der follikulären Melanogenese ist die Analyse folgender Zielstrukturen etabliert: des zentralen melanozytären Transkriptionsfaktors MITF, des prämelanosomalen Proteins gp100, des Schlüsselenzyms der Melanogenese Tyrosinase und des Stoffwechselendproduktes Melanin (Gáspár *et al.*, 2011; Samuelov *et al.*, 2013; Hardman *et al.*, 2015). Zur detaillierten Beschreibung melanozytärer Vorläuferzellen ist die Rezeptortyrosinkinase c-Kit ergänzt worden (siehe Kapitel 2.8.8).

Die Behandlung mit VIP stimuliert die zellulären Prozesse der Melanogenese. Die Anzahl von MITF+ Zellen (siehe Abbildung 3.12), gp100+ Zellen (siehe Abbildung 3.13) und die Tyrosinaseaktivität (siehe Abbildung 3.19) sind erhöht, wobei der Melaniningehalt nicht beeinflusst worden ist (siehe Abbildung 3.20). Es ist vermutet worden, dass die relativ kurze Therapiedauer von zwei Tagen nicht ausgereicht hat, um eine signifikante Steigerung der komplex regulierten Melaninbildung zu bewirken. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass auch die Behandlung des potenten SP erst nach fünf Kulturtagen zu einer signifikanten Steigerung der Melanogenese geführt hat (Park *et al.*, 2015). Die in dieser Arbeit verwendete Therapiedauer ist gut geeignet gewesen um Veränderungen auf Genebene und Proteinebene zu betrachten (Kakurai *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2016), jedoch weniger um den Effekt auf komplex regulierte übergeordnete Prozesse zu evaluieren (Diskussion siehe Kapitel 4.2).

Die Stimulation der Melanogenese humaner HF durch das Neuropeptid VIP beschreibt einen neuen Signalweg. Es ist bekannt, dass die Stimulation der Melanogenese epidermal und follikulär insbesondere über den Proteinkinase A-Signalweg erfolgt und zur

Modulation von Regulatorproteinen wie MITF führt (siehe Abbildung 1.5). Für die Wirkung von SP ist dieser Signalweg in der Epidermis bestätigt worden (Park *et al.*, 2015). Die VIP-Rezeptoren transduzieren über verschiedene Signalwege, von denen der Proteinkinase A-Signalweg der häufigste ist (Laburthe *et al.*, 2002; Groneberg *et al.*, 2006; Delgado und Ganea, 2013). In Zellkulturen der Plattenepithelkarzinomzelllinie DJM-1 ist gezeigt worden, dass sich der Spiegel des zyklischen Adenosinmonophosphats (**cAMP**) nach VIP-Rezeptoraktivierung erhöht, und dass dies durch VIP-Rezeptorantagonisten inhibierbar ist (Kakurai *et al.*, 2001). Die darauf begründete Annahme, dass der follikuläre Effekt von VIP über den Proteinkinase A-Signalweg vermittelt wird, hat unsere Arbeitsgruppe in weiterführenden Experimenten bestätigt (Bertolini *et al.*, 2016a).

Auch wenn eine direkte VIP/VIP-Rezeptor-Interaktion auf follikulären Melanozyten plausibel erscheint, exprimieren weder melanotische Melanozyten noch melanozytäre Vorläuferzellen *in vitro* VIP oder einen der VIP-Rezeptoren (siehe Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3). Bulbäre und suprabulbäre Keratinozyten zeigen eine hohe Intensität der Expression von VPAC1 und VPAC2 (siehe Abbildung 3.4), sodass ein parakrin vermittelter Signalweg wahrscheinlich ist. Keratinozyten sezernieren die Zytokine Interleukin-6 und Interleukin-8 (Kakurai *et al.*, 2001), den Neurotransmitter Acetylcholin (Grando *et al.*, 1993) und den c-Kit Liganden Stammzellfaktor (Belleudi *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2017). Die vielfältige exokrine Funktion der Keratinozyten stützt die These vom parakrin vermittelten Signalweg, erschwert jedoch die Identifikation des Mediators.

Im epithelialen Teil des HF wird c-Kit nur von Zellen melanozytärer Herkunft exprimiert. In der CTS wird c-Kit von Mastzellen und dem kapillären Endothel exprimiert (siehe Abbildung 4.3). Mastzellen synthetisieren VIP, exprimieren VIP-Rezeptoren, degranulieren nach VIP-Stimulation (Kulka *et al.*, 2008; Delgado und Ganea, 2013) und befinden sich in räumlicher Nähe zu den VPAC2 exprimierenden Keratinozyten in der Basalzellschicht der ORS. Mastzellen beeinflussen über sezernierte Mediatoren zahlreiche Parameter der follikulären Biologie (Jarvikallio *et al.*, 2003; Grace *et al.*, 2017; Muneeb *et al.*, 2019). Dass die follikuläre Pigmentbildung durch Mastzellen moduliert wird, ist bisher nicht gezeigt worden und scheint aufgrund der räumlichen Entfernung unwahrscheinlich. Denkbar ist jedoch, dass die Stimulation der keratinozytären VIP-Rezeptoren zur keratinozytären Sekretion von des c-Kit Liganden Stammzellfaktor führt. Dies würde zu einer parakrin

vermittelten Stimulation der c-Kit-exprimierenden follikulären Melanozyten und perifollikulären Mastzellen führen. Die nachgewiesene Expression von VIP-Rezeptoren auf Mastzellen sowie die Sekretion von VIP durch Mastzellen würden in diesem Modell eine komplexe Regulation ermöglichen.

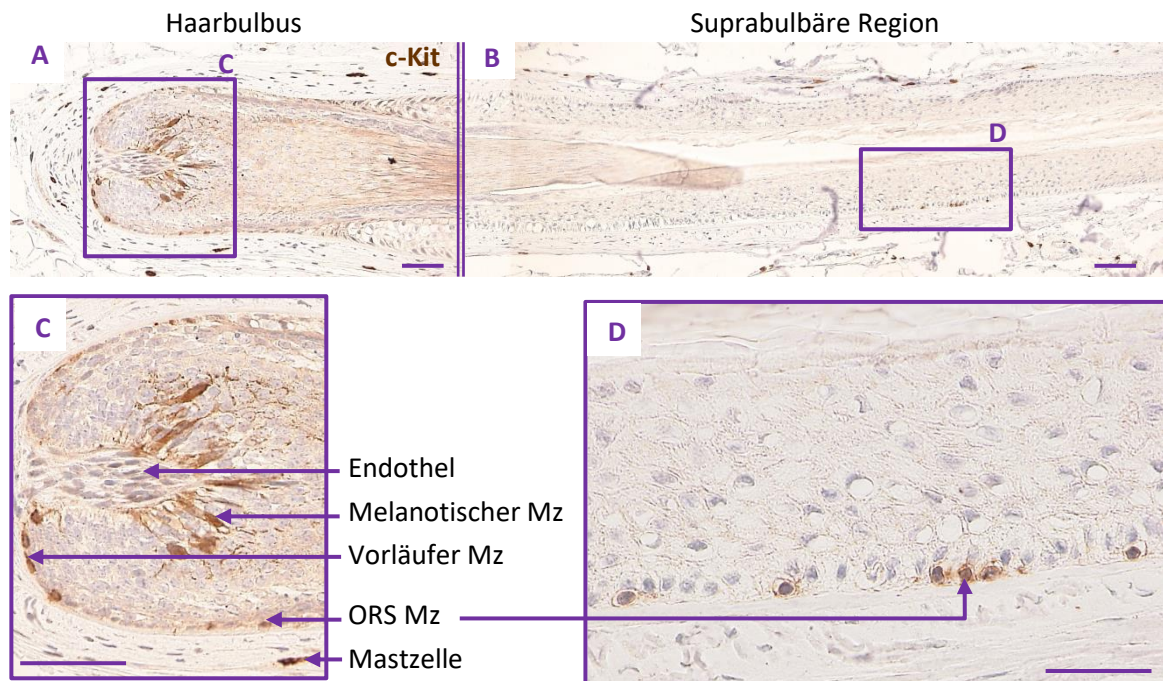


Abbildung 4.3 Expression von c-Kit in Haarbulbus und suprabulbärer Region.

Die Rezeptortyrosinkinase Kit wird follikulär in melanozytären Zellen, Mastzellen und im Endothel exprimiert. Repräsentative Aufnahmen. Balken 50 µm. Abbildungen A und B zeigen verschiedene Haarfollikel. Abbildung B ist aus 3 Einzelaufnahmen zusammengesetzt. Die Abbildungen C und D sind Vergrößerungen der Abbildungen A und B. C-Kit: Rezeptortyrosinkinase Kit; Mz: Melanozyt; ORS: Äußere Wurzelscheide.

Wir waren die erste Arbeitsgruppe, welche im HF bulbäre melanotische Melanozyten und nicht-melanotische melanozytären Vorläuferzellen quantitativ analysiert hat. Die Ergebnisse zeigen, dass VIP die Anzahl melanotischer Melanozyten (c-Kit+/gp100+) in der pigmentbildenden Zone erhöht (siehe Abbildung 3.13). Weiterhin wird im proximalen Bulbus die Anzahl nicht-melanotischer melanozytärer Vorläuferzellen (c-Kit+/gp100-) erhöht. Dies ist geschlussfolgert worden, da die Anzahl der c-Kit+ Zellen erhöht ist, die Anzahl der gp100+ Zellen im proximalen Bulbus sich jedoch nicht relevant verändert hatte (siehe Abbildung 3.13 und Abbildung 3.14). In der pigmentbildenden Zone kann die erhöhte Anzahl von c-Kit+ Zellen nicht eindeutig einer melanozytären Subpopulation

zugeordnet werden, da hier sowohl die Anzahl der c-Kit+ Zellen als auch die Anzahl der gp100+ Zellen erhöht sind.

Zur Differenzierung der bulbären melanozytären Subpopulationen ist der Anteil nicht-melanotischer melanozytärer Vorläuferzellen (c-Kit+/gp100-) an allen melanotischen Zellen (c-Kit+) bestimmt worden. Es hat sich gezeigt, dass VIP den Anteil nicht-melanotischer melanozytärer Vorläuferzellen in allen Teilen des Bulbus erhöht (siehe Abbildung 3.17). Demnach steigert VIP in der pigmentbildenden Zone sowohl die Anzahl melanotischer Melanozyten als auch nicht-melanotischer melanozytärer Vorläuferzellen.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass VIP die Proliferation und Differenzierung nicht-melanotischer melanozytärer Vorläuferzellen stimuliert. Zur Unterstützung dieser These ist die Proliferationsrate melanozytärer Vorläuferzellen bestimmt worden. Erwartungsgemäß hat die Behandlung mit VIP die Proliferationsrate nicht-melanotischer melanozytärer Vorläuferzellen gesteigert (siehe Abbildung 3.18).

Dass die Behandlung mit VIP zur Rekrutierung und Differenzierung melanozytärer Vorläuferzellen führt ist ein hoch brisantes Ergebnis. Die klinische Anwendbarkeit könnte sich dabei auf kutane Erkrankungen erstrecken bei denen eine Hypopigmentierung durch eine reduzierte Melanozytenzahl im Vordergrund steht sowie auf Erkrankungen durch gering differenzierte melanotische Zellen, speziell maligne Melanome.

Beim altersbedingten Ergrauen reduziert sich die Anzahl follikulärer melanozytärer Stammzellen (Nishimura *et al.*, 2005). Bei der Autoimmunerkrankung Vitiligo resultiert die Depigmentierung aus einem Verlust differenzierter Melanozyten in Epidermis und HF (Paus, 2013; Mort *et al.*, 2015). Bei beiden Entitäten persistieren nicht-melanotische melanozytäre Vorläuferzellen in der *bulge* und der suprabulbären ORS. An depigmentierter Haut von Vitiligo-Patienten ist gezeigt worden, dass nicht-melanotische melanozytäre Vorläuferzellen der suprabulbären ORS, proliferieren, differenzieren, in die Epidermis migrieren und dort die Pigmentierung wiederherstellen können (Cui *et al.*, 1991; Paus, 2013).

VIP scheint ein vielversprechendes neues Therapeutikum dieser Erkrankungen zu sein, da es die Proliferation und Differenzierung insbesondere der follikulären melanozytären Vorläuferzellen stimuliert. Bei beginnendem Ergrauen von HF könnte VIP eingesetzt

werden, um den Krankheitsprozess zu verlangsamen und eine Repigmentierung anzuregen. In Vitiligo scheint die Verwendung von VIP noch erfolgsversprechender. So könnte VIP nicht nur residente nicht-melanotische melanozytäre Vorläuferzellen aktivieren, sondern ebenfalls der ursächlichen Inflammation durch seine zahlreichen immunmodulierenden Eigenschaften entgegenwirken (siehe Tabelle 1.2). Rork *et al.* haben geschlussfolgert, dass sich die autoimmunen Prozesse in Vitiligo und Alopecia areata sehr ähnlich sind (Rork *et al.*, 2016). So unterstützen unsere Ergebnisse zur Wiederherstellung des follikulären Immunprivilegs durch VIP (Bertolini *et al.*, 2016b) den Anspruch des VIP als potentes Therapeutikum der Vitiligo.

Die Beeinflussung der Biologie humaner maligner Melanome durch VIP ist hochwahrscheinlich. So werden VIP-Rezeptoren in diversen Malignomen exprimiert (Schulz *et al.*, 2004). In humanen Melanomzelllinien führt VIP zu einer deutlichen Erhöhung des cAMP-Spiegels (Martin *et al.*, 1989) und in der murinen Melanomzelllinie B16F10 fördert VIP die Melanogenese (Yuan *et al.*, 2016). Sollte die proliferationssteigernde Wirkung von VIP auf follikuläre melanozytäre Vorläuferzellen auch bei gering differenzierten malignen Melanomen bestehen, bleibt spannend, ob VIP nur als externer Induktor wirken kann oder sogar an der Homöostase des malignen Melanoms beteiligt ist. Bei Überexpression der VIP-Rezeptoren könnten sich spezifische Antagonisten der VIP-Rezeptoren als wertvolle Therapeutika erweisen.

4.7 Ausblick

Die in dieser Pilotstudie erstbeschriebene Förderung der follikulären Melanogenese mit Stimulierung melanozytärer Vorläuferzellen durch das Neuropeptid VIP, eröffnet ein weites Spektrum klinischer Anwendbarkeit. Diskutiert worden ist die Eignung von VIP als Therapeutikum beim altersbedingten Ergrauen der Haare oder zur Repigmentierung läsionaler Haut bei der Vitiligo. Weitere Forschung verdient der Einfluss von VIP und seiner VIP-Rezeptoren in der Biologie und Therapie humaner maligner Melanome.

Bis zur Anwendung am Patienten verbleiben ungeklärte Fragen. So sind in dieser Studie ausschließlich HF gesunder mittelalter und alter Frauen untersucht worden. Für eine

Generalisierbarkeit bedarf es weiterführender Untersuchungen an erkrankter Haut männlicher und weiblicher Probanden im krankheitsrelevanten Alter. Dabei würden die Antagonisierbarkeit der Effekte sowie Subgruppenanalysen zum Einfluss auf epidermale Melanozyten und melanozytäre Vorläuferzellen der *bulge* integriert werden.

Beim Studiendesign sollten die Applikationsintervalle zur Vermeidung einer Wirkabschwächung durch eine negative Feedback-Regulation ebenso beachtet werden wie die Applikationsform. Intravenös appliziertes VIP führt regelhaft zu systemischen Nebenwirkungen, die mit vasodilatierenden und histamin-freisetzenden Eigenschaften des VIP assoziiert sind (Morice *et al.*, 1983). Die topische Applikation von VIP scheint bei follikulären Erkrankungen vielversprechend, ist jedoch bisher unerforscht. Topisch applizierte Wirkstoffe erreichen auf behaarter Haut höhere Wirkspiegel als in unbehaarter Haut, da HF die Hautoberfläche vergrößern und als Wirkstoffreservoir fungieren (Illel *et al.*, 1991; Blume-Peytavi und Vogt, 2011). Ein aktuelles Forschungsfeld ist die topisch Applikation von mit Wirkstoff beladenen Nanopartikeln. Damit kann ein Wirkstoff gezielt in ein follikuläres Kompartiment oder zu einer spezifischen Zellpopulation transportiert werden (Papakostas *et al.*, 2011; Vogt *et al.*, 2016).

5 Zusammenfassung

Das Neuropeptid vasoaktives intestinales Peptid (VIP) ist beteiligt an der Pathogenese neuroinflammatorischer kutaner Erkrankungen. Unklar ist bisher gewesen, welchen Einfluss VIP auf die Pigmentbildung und das Wachstum von Haarfollikeln (HF) hat. HF gesunder Frauen zwischen 42 und 69 Jahren sind mikrodissiziert, unter serumfreien Bedingungen kultiviert, mit VIP behandelt und mittels Echtzeit quantitative Polymerase-Kettenreaktion, histochemischen und immunhistochemischen Färbungen analysiert worden.

Die VIP-Rezeptoren werden insbesondere in den äußeren epithelialen Zellschichten des HF exprimiert. Die endogene VIP-Synthese und die Expression des VIP-Rezeptors 1 unterlagen einer negativen Feedback-Regulation. Die Behandlung mit VIP führt zu einer reduzierten Proliferationsrate der Haarmatrixkeratinozyten und zu einer erhöhten Expression der Stammzellmarker Zytokeratin 15 und 19. VIP fördert die Anagen-Katagen-Transformation, wobei sich das Haarwachstum im Kulturzeitraum nicht signifikant verändert hat. Die Behandlung mit VIP stimuliert Schlüsselproteine der Melanogenese: Mikrophthalmie-assoziiierter Transkriptionsfaktor, Glykoprotein 100 (gp100), Rezeptor-tyrosinkinase Kit (c-Kit) und Tyrosinase. Die Quantifizierung von Zielgrößen bulbärer melanozytärer Subpopulationen hat ergeben, dass VIP die Proliferationsrate der bulbären melanozytären Zellen steigert sowie die Anzahl melanotischer Melanozyten (c-Kit+/gp100+) und nicht-melanotischer Melanozyten (c-Kit+/gp100-) erhöht.

Obwohl VIP stimulierend auf follikuläre Keratinozyten wirkt, bleibt das Haarwachstum unverändert, was in der Förderung der Anagen-Katagen-Transformation begründet sein kann. Mit der erstmals durchgeführten Quantifizierung von Zielgrößen bulbärer melanozytärer Subpopulationen ist gezeigt worden, dass VIP die Melanogenese durch Stimulation differenzierter Melanozyten sowie melanozytärer Vorläuferzellen fördert. Es ergibt sich die Anwendbarkeit von VIP bei Erkrankungen a) mit reduzierter Anzahl melanozytärer Vorläuferzellen wie beim altersbedingten Ergrauen, b) mit Verlust von melanotischen Melanozyten und Persistenz melanozytärer Vorläuferzellen wie bei der Vitiligo und c) mit gering differenzierten melanozytären Zellen wie beim malignen Melanom.

6 Literaturverzeichnis

- Aasen T und Izpisua Belmonte JC (2010) Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 5, 371-382.
- Al-Tameemi W, Dunnill C, Hussain O, Komen MM, Van Den Hurk CJ, Collett A und Georgopoulos NT (2014) Use of in vitro human keratinocyte models to study the effect of cooling on chemotherapy drug-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro*, 28, 1366-1376.
- Alam M, Below DA, Chéret J, Langan EA, Bertolini M, Jimenez F und Paus R (2019) Growth hormone operates as a neuroendocrine regulator of human hair growth ex vivo. *J Invest Dermatol*, 139, 1593-1596.
- Alam M, Hernandez I, Paus R und Jimenez F (2018) Image gallery: intravital visualization of the dynamic changes in human hair follicle cycling. *Br J Dermatol*, 178, e396.
- Barbosa AJ, Castro LP, Margarida A und Nogueira MF (1984) A simple and economical modification of the Masson-Fontana method for staining melanin granules and enterochromaffin cells. *Stain Technol*, 59, 193-196.
- Beitz JM (2013) Skin and wound issues in patients with Parkinson's disease: an overview of common disorders. *Ostomy Wound Manage*, 59, 26-36.
- Belleudi F, Cardinali G, Kovacs D, Picardo M und Torrisi MR (2010) KGF promotes paracrine activation of the SCF/c-Kit axis from human keratinocytes to melanoma cells. *Transl Oncol*, 3, 80-90.
- Ben-Horin S und Chowers Y (2008) Neuroimmunology of the gut: physiology, pathology and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*, 8, 490-495.
- Bernard BA (2016) Advances in understanding hair growth. *F1000Res*, 5, 1-8.
- Bertolini M (2014) Abnormal interactions between perifollicular mast cells and CD8+ T-cells may contribute to the pathogenesis of alopecia areata. *Nat. Diss., Universität zu Lübeck*. Lübeck.
- Bertolini M, Bähr M, Sulk M, Ponce L, Hardman JA, Bíró T, Tobin DJ und Paus R (2016a) 664 Vasoactive intestinal peptide (VIP) regulates human melanocyte biology and hair follicle pigmentation. *J Invest Dermatol*, 136, S117.
- Bertolini M, Pretzlaff M, Sulk M, Bähr M, Gherardini J, Uchida Y, Reibelt M, Kinori M, Rossi A, Bíró T und Paus R (2016b) Vasoactive intestinal peptide, whose receptor-mediated signalling may be defective in alopecia areata, provides protection from hair follicle immune privilege collapse. *Br J Dermatol*, 175, 531-541.

- Bertolini M, Zilio F, Rossi A, Kleditzsch P, Emelianov VE, Gilhar A, Keren A, Meyer KC, Wang E, Funk W, Mc Elwee K und Paus R (2014) Abnormal interactions between perifollicular mast cells and CD8+ T-cells may contribute to the pathogenesis of alopecia areata. *PLoS One*, 9, 1-16.
- Blume-Peytavi U und Vogt A (2011) Human hair follicle: reservoir function and selective targeting. *Br J Dermatol*, 165 Suppl 2, 13-17.
- Bonett DG und Price RM (2002) Statistical inference for a linear function of medians: confidence intervals, hypothesis testing, and sample size requirements. *Psychol Methods*, 7, 370-383.
- Botchkarev VA (2003) Stress and the hair follicle: exploring the connections. *Am J Pathol*, 162, 709-712.
- Botchkarev VA, Eichmüller S, Johansson O und Paus R (1997) Hair cycle-dependent plasticity of skin and hair follicle innervation in normal murine skin. *J Comp Neurol*, 386, 379-395.
- Botchkareva NV, Khlgatian M, Longley BJ, Botchkarev VA und Gilchrist BA (2001) SCF/c-Kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit. *FASEB J*, 15, 645-658.
- Bronzetti E, Artico M, Pompili E, Felici LM, Stringaro A, Bosco S, Magliulo G, Colone M, Arancia G, Vitale M und Fumagalli L (2006) Neurotrophins and neurotransmitters in human palatine tonsils: an immunohistochemical and RT-PCR analysis. *Int J Mol Med*, 18, 49-58.
- Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J und Gerdes J (1992) Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*, 168, 357-363.
- Chan J, Smoller BR, Raychauduri SP, Jiang WY und Farber EM (1997) Intraepidermal nerve fiber expression of calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal peptide and substance P in psoriasis. *Arch Dermatol Res*, 289, 611-616.
- Chéret J, Lebonvallet N, Buhe V, Carre JL, Misery L und Le Gall-Ianotto C (2014) Influence of sensory neuropeptides on human cutaneous wound healing process. *J Dermatol Sci*, 74, 193-203.
- Cho KA, Park M, Kim YH und Woo SY (2017) Th17 cell-mediated immune responses promote mast cell proliferation by triggering stem cell factor in keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 487, 856-861.
- Choi JE und Di Nardo A (2018) Skin neurogenic inflammation. *Semin Immunopathol*, 40, 249-259.
- Commo S, Gaillard O und Bernard BA (2000) The human hair follicle contains two distinct K19 positive compartments in the outer root sheath: a unifying hypothesis for stem cell reservoir? *Differentiation*, 66, 157-164.

- Cui J, Shen LY und Wang GC (1991) Role of hair follicles in the repigmentation of vitiligo. *J Invest Dermatol*, 97, 410-416.
- D' Ischia M, Wakamatsu K, Napolitano A, Briganti S, Garcia-Borrón JC, Kovacs D, Meredith P, Pezzella A, Picardo M, Sarna T, Simon JD und Ito S (2013) Melanins and melanogenesis: methods, standards, protocols. *Pigment Cell Melanoma Res*, 26, 616-633.
- D' Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC und Askarian-Amiri ME (2016) Signaling pathways in melanogenesis. *Int J Mol Sci*, 17, 1-18.
- Delgado M und Ganea D (2013) Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions. *Amino Acids*, 45, 25-39.
- Ding W, Wagner JA und Granstein RD (2007) CGRP, PACAP and VIP modulate Langerhans cell function by inhibiting NF-kappaB activation. *J Invest Dermatol*, 127, 2357-2367.
- Dinno A (2015) Nonparametric pairwise multiple comparisons in independent groups using Dunn's Test. *Stata Journal*, 15, 292-300.
- El-Shazly AE, Begon DY, Kustermans G, Arafa M, Dortu E, Henket M, Lefebvre PP, Louis R und Delvenne P (2013) Novel association between vasoactive intestinal peptide and CRTH2 receptor in recruiting eosinophils: a possible biochemical mechanism for allergic eosinophilic inflammation of the airways. *J Biol Chem*, 288, 1374-1384.
- Elkayam U, Roth A, Mehra A, Ostrzega E, Shotan A, Kulick D, Jamison M, Johnston JV und Rahimtoola SH (1991) Randomized study to evaluate the relation between oral isosorbide dinitrate dosing interval and the development of early tolerance to its effect on left ventricular filling pressure in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 84, 2040-2048.
- Faget L und Hnasko TS (2015) Tyramide signal amplification for immunofluorescent enhancement. *Methods Mol Biol*, 1318, 161-172.
- Fahrenkrug J (1989) VIP and autonomic neurotransmission. *Pharmacol Ther*, 41, 515-534.
- Fahrenkrug J (2010) VIP and PACAP. *Results Probl Cell Differ*, 50, 221-234.
- Fay MP und Proschan MA (2010) Wilcoxon-Mann-Whitney or t-test? On assumptions for hypothesis tests and multiple interpretations of decision rules. *Stat Surv*, 4, 1-39.
- Fischer TC, Dinh QT, Peiser C, Loser C, Fischer A und Groneberg DA (2002) Simultaneous detection of receptor mRNA and ligand protein in human skin tissues. *J Cutan Pathol*, 29, 65-71.
- Fischer TC, Hartmann P und Groneberg DA (2001) Abundant expression of vasoactive intestinal polypeptide receptor VPAC2 mRNA in human skin. *J Invest Dermatol*, 117, 754 -756.
- Fischer TW, Herczeg-Lisztes E, Funk W, Zillikens D, Bíró T und Paus R (2014) Differential effects of caffeine on hair shaft elongation, matrix and outer root sheath keratinocyte proliferation, and transforming growth factor-beta2/insulin-like growth factor-1-mediated regulation of

- the hair cycle in male and female human hair follicles in vitro. *Br J Dermatol*, 171, 1031-1043.
- Gaginella TS, Mekhjian HS und O'dorisio TM (1978) Vasoactive intestinal peptide: quantification by radioimmunoassay in isolated cells, mucosa, and muscle of the hamster intestine. *Gastroenterology*, 74, 718-721.
- Gáspár E, Nguyen-Thi KT, Hardenbicker C, Tiede S, Plate C, Bodó E, Knuever J, Funk W, Bíró T und Paus R (2011) Thyrotropin-releasing hormone selectively stimulates human hair follicle pigmentation. *J Invest Dermatol*, 131, 2368-2377.
- Genschel U und Becker C (2005). Schließende Statistik - Grundlegende Methoden. In: Kamps U (Hrsg.): *EMIL@A-stat*. 1. Aufl., Kapitel 5.2, 236-259. Springer, Heidelberg.
- Gonzalez-Rey E, Chorny A und Delgado M (2007) Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat Rev Immunol*, 7, 52-63.
- Gorky J und Schwaber J (2019) Conceptualization of a parasympathetic endocrine system. *Front Neurosci*, 13, 1008.
- Grace SA, Sutton AM, Abraham N, Armbrrecht ES und Vidal CI (2017) Presence of mast cells and mast cell degranulation in scalp biopsies of telogen effluvium. *Int J Trichology*, 9, 25-29.
- Grando SA, Kist DA, Qi M und Dahl MV (1993) Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. *J Invest Dermatol*, 101, 32-36.
- Groneberg DA, Rabe KF und Fischer A (2006) Novel concepts of neuropeptide-based drug therapy: vasoactive intestinal polypeptide and its receptors. *Eur J Pharmacol*, 533, 182-194.
- Groneberg DA, Welker P, Fischer TC, Dinh QT, Grutzkau A, Peiser C, Wahn U, Henz BM und Fischer A (2003) Downregulation of vasoactive intestinal polypeptide receptor expression in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 111, 1099-1105.
- Hachiya A, Sriwiriyanont P, Kobayashi T, Nagasawa A, Yoshida H, Ohuchi A, Kitahara T, Visscher MO, Takema Y, Tsuboi R und Boissy RE (2009) Stem cell factor-Kit signalling plays a pivotal role in regulating pigmentation in mammalian hair. *J Pathol*, 218, 30-39.
- Han R, Baden HP, Brissette JL und Weiner L (2002) Redefining the skin's pigmentary system with a novel tyrosinase assay. *Pigment Cell Res*, 15, 290-297.
- Hara M, Toyoda M, Yaar M, Bhawan J, Avila EM, Penner IR und Gilchrist BA (1996) Innervation of melanocytes in human skin. *J Exp Med*, 184, 1385-1395.
- Hardman JA, Tobin DJ, Haslam IS, Farjo N, Farjo B, Al-Nuaimi Y, Grimaldi B und Paus R (2015) The peripheral clock regulates human pigmentation. *J Invest Dermatol*, 135, 1053-1064.
- Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, Sreedharan SP, Wank SA und Waschek JA (1998) International Union of Pharmacology.

- XVIII. nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol Rev*, 50, 265-270.
- Harmar AJ, Fahrenkrug J, Gozes I, Laburthe M, May V, Pisegna JR, Vaudry D, Vaudry H, Waschek JA und Said SI (2012) Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1. *Br J Pharmacol*, 166, 4-17.
- Hartschuh W, Reinecke M, Weihe E und Yanaihara N (1984) VIP-immunoreactivity in the skin of various mammals: immunohistochemical, radioimmunological and experimental evidence for a dual localization in cutaneous nerves and Merkel cells. *Peptides*, 5, 239-245.
- Hartschuh W, Weihe E und Reinecke M (1983a) Peptidergic (neurotensin, VIP, substance P) nerve fibres in the skin. Immunohistochemical evidence of an involvement of neuropeptides in nociception, pruritus and inflammation. *Br J Dermatol*, 109 Suppl 25, 14-17.
- Hartschuh W, Weihe E, Yanaihara N und Reinecke M (1983b) Immunohistochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in Merkel cells of various mammals: evidence for a neuromodulator function of the Merkel cell. *J Invest Dermatol*, 81, 361-364.
- Hawkshaw NJ, Hardman JA, Alam M, Jimenez F und Paus R (2019) Deciphering the molecular morphology of the human hair cycle: Wnt signalling during the telogen-anagen transformation. *Br J Dermatol*, veröffentlicht Online vor dem Druck (12.07.2019), 1-10.
- Hendrix S, Picker B, Liezmann C und Peters EM (2008) Skin and hair follicle innervation in experimental models: a guide for the exact and reproducible evaluation of neuronal plasticity. *Exp Dermatol*, 17, 214-227.
- Hernanz A, Muelas G und Borbujo J (1989) Plasma neuropeptide pattern in acute idiopathic urticaria. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 90, 198-200.
- Horikawa T, Norris DA, Johnson TW, Zekman T, Dunscomb N, Bennion SD, Jackson RL und Morelli JG (1996) DOPA-negative melanocytes in the outer root sheath of human hair follicles express premelanosomal antigens but not a melanosomal antigen or the melanosome-associated glycoproteins tyrosinase, TRP-1, and TRP-2. *J Invest Dermatol*, 106, 28-35.
- Ibrahim H, Barrow P und Foster N (2012) VIP as a potential therapeutic agent in gram negative sepsis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 12, 308-315.
- Illel B, Schaefer H, Wepierre J und Doucet O (1991) Follicles play an important role in percutaneous absorption. *J Pharm Sci*, 80, 424-427.
- Jaks V, Kasper M und Toftgard R (2010) The hair follicle-a stem cell zoo. *Exp Cell Res*, 316, 1422-1428.
- Jarvikallio A, Harvima IT und Naukkarinen A (2003) Mast cells, nerves and neuropeptides in atopic dermatitis and nummular eczema. *Arch Dermatol Res*, 295, 2-7.

- Jiang S, Zhao L, Purandare B und Hantash BM (2010) Differential expression of stem cell markers in human follicular bulge and interfollicular epidermal compartments. *Histochem Cell Biol*, 133, 455-465.
- Jiang W, Wang H, Li YS und Luo W (2016) Role of vasoactive intestinal peptide in osteoarthritis. *J Biomed Sci*, 23, 1-6.
- Kakurai M, Demitsu T, Umemoto N, Kobayashi Y, Inoue-Narita T, Fujita N, Ohtsuki M und Furukawa Y (2009) Vasoactive intestinal peptide and inflammatory cytokines enhance vascular endothelial growth factor production from epidermal keratinocytes. *Br J Dermatol*, 161, 1232-1238.
- Kakurai M, Fujita N, Kiyosawa T, Inoue T, Ishibashi S, Furukawa Y, Demitsu T und Nakagawa H (2002) Vasoactive intestinal peptide and cytokines enhance stem cell factor production from epidermal keratinocytes DJM-1. *J Invest Dermatol*, 119, 1183-1188.
- Kakurai M, Fujita N, Murata S, Furukawa Y, Demitsu T und Nakagawa H (2001) Vasoactive intestinal peptide regulates its receptor expression and functions of human keratinocytes via type I vasoactive intestinal peptide receptors. *J Invest Dermatol*, 116, 743-749.
- Kao LS und Green CE (2008) Analysis of variance: Is there a difference in means and what does it mean? *J Surg Res*, 144, 158-170.
- Kauser S, Slominski A, Wei ET und Tobin DJ (2006) Modulation of the human hair follicle pigmentary unit by corticotropin-releasing hormone and urocortin peptides. *FASEB J*, 20, 882-895.
- Kauser S, Thody AJ, Schallreuter KU, Gummer CL und Tobin DJ (2004) Beta-endorphin as a regulator of human hair follicle melanocyte biology. *J Invest Dermatol*, 123, 184-195.
- Kauser S, Thody AJ, Schallreuter KU, Gummer CL und Tobin DJ (2005) A fully functional proopiomelanocortin/melanocortin-1 receptor system regulates the differentiation of human scalp hair follicle melanocytes. *Endocrinology*, 146, 532-543.
- Kawada M, Tamada Y, Simizu H, Yanagishita T, Yamashita N, Ishida N, Watanabe D, Yoshida M, Ibi T, Sahashi K, Hashizume Y und Matsumoto Y (2009) Reduction in QSART and vasoactive intestinal polypeptide expression in the skin of Parkinson's disease patients and its relation to dyshidrosis. *J Cutan Pathol*, 36, 517-521.
- Kellogg DL, Jr., Zhao JL, Wu Y und Johnson JM (2010) VIP/PACAP receptor mediation of cutaneous active vasodilation during heat stress in humans. *J Appl Physiol (1985)*, 109, 95-100.
- Kinori M, Bertolini M, Funk W, Samuelov L, Meyer KC, Emelianov VU, Hasse S und Paus R (2012) Calcitonin gene-related peptide (CGRP) may award relative protection from interferon-gamma-induced collapse of human hair follicle immune privilege. *Exp Dermatol*, 21, 223-226.

- Klatte JE (2008) Characterization of the epithelial stem cell niche of the human hair follicle. *Vet. Med. Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover*. Hannover.
- Klöpper JE, Baris OR, Reuter K, Kobayashi K, Weiland D, Vidali S, Tobin DJ, Niemann C, Wiesner RJ und Paus R (2015) Mitochondrial function in murine skin epithelium is crucial for hair follicle morphogenesis and epithelial-mesenchymal interactions. *J Invest Dermatol*, 135, 679-689.
- Klöpper JE, Kawai K, Bertolini M, Kanekura T und Paus R (2013a) Loss of gamma delta T-cells results in hair cycling defects. *J Invest Dermatol*, 133, 1666-1669.
- Klöpper JE, Seykora JT, Whiting DA, Sugawara K, Doerwald N, Langan D, Rose C, Cotsarelis G und Paus R. (2013b) The human hair follicle cycle: a guide. *J Invest Dermatol*. 133 Suppl, S84. In: *International Investigative Dermatology* Mai, 2013. Edinburgh, Schottland, Großbritannien [Poster].
- Klöpper JE, Sugawara K, Al-Nuaimi Y, Gáspár E, Van Beek N und Paus R (2010) Methods in hair research: how to objectively distinguish between anagen and catagen in human hair follicle organ culture. *Exp Dermatol*, 19, 305-312.
- Klöpper JE, Tiede S, Brinckmann J, Reinhardt DP, Meyer W, Faessler R und Paus R (2008) Immunophenotyping of the human bulge region: the quest to define useful in situ markers for human epithelial hair follicle stem cells and their niche. *Exp Dermatol*, 17, 592-609.
- Krause K und Foitzik K (2006) Biology of the hair follicle: The basics. *Semin Cutan Med Surg*, 25, 2-10.
- Kuckelkorn T, Lan Nguyen Q, Wenig E und Lysakowski P (2015). Vergleich zweier Verteilungen anhand echter und gefälschter Schweizer-Franken-Banknoten. In: Rahmenführer J (Leiter): *Fallstudien*. 1, Fakultät Statistik, TU Dortmund. Dortmund.
- Kulka M, Sheen CH, Tancowny BP, Grammer LC und Schleimer RP (2008) Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology*, 123, 398-410.
- Laburthe M und Couvineau A (2002) Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP. *Regul Pept*, 108, 165-173.
- Laburthe M, Couvineau A und Marie JC (2002) VPAC receptors for VIP and PACAP. *Receptors Channels*, 8, 137-153.
- Langan EA, Lisztes E, Bíró T, Funk W, Klöpper JE, Griffiths CE und Paus R (2013) Dopamine is a novel, direct inducer of catagen in human scalp hair follicles in vitro. *Br J Dermatol*, 168, 520-525.
- Langan EA, Philpott MP, Klöpper JE und Paus R (2015) Human hair follicle organ culture: theory, application and perspectives. *Exp Dermatol*, 24, 903-911.
- Lause M, Kamboj A und Fernandez Faith E (2017) Dermatologic manifestations of endocrine disorders. *Transl Pediatr*, 6, 300-312.

- Lee J und Tumbar T (2012) Hairy tale of signaling in hair follicle development and cycling. *Semin Cell Dev Biol*, 23, 906-916.
- Li H, Fan L, Zhu S, Shin MK, Lu F, Qu J und Hou L (2017) Epilation induces hair and skin pigmentation through an EDN3/EDNRB-dependent regenerative response of melanocyte stem cells. *Sci Rep*, 7, 7272.
- Lisztes E, Tóth BI, Bertolini M, Szabó IL, Zákány N, Oláh A, Szöllősi AG, Paus R und Bíró T (2019) Adenosine promotes human hair growth and inhibits catagen transition in vitro: role of the outer root sheath keratinocytes. *J Invest Dermatol*, veröffentlicht Online vor dem Druck (12.11.2019), S1-15.
- Liu JJ und Fisher DE (2010) Lighting a path to pigmentation: mechanisms of MITF induction by UV. *Pigment Cell Melanoma Res*, 23, 741-745.
- Lundberg JM, Fahrenkrug J und Brimijoin S (1981) Characteristics of the axonal transport of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in nerves of the cat. *Acta Physiol Scand*, 112, 427-436.
- Lundeberg L, Mutt V und Nordlind K (1999) Inhibitory effect of vasoactive intestinal peptide on the challenge phase of allergic contact dermatitis in humans. *Acta Derm Venereol*, 79, 178-182.
- Marks MS und Seabra MC (2001) The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 738-748.
- Martin JM, Luis J, Marvaldi J, Pichon J und Pic P (1989) A human melanoma-derived cell line (IGR39) with a very high number of vasoactive-intestinal-peptide (VIP) receptors. *Eur J Biochem*, 180, 435-439.
- Martínez-Martínez E, Galván-Hernández CI, Toscano-Márquez B und Gutiérrez-Ospina G (2012) Modulatory role of sensory innervation on hair follicle stem cell progeny during wound healing of the rat skin. *PLoS One*, 7, 1-17.
- Miranda BH, Charlesworth MR, Tobin DJ, Sharpe DT und Randall VA (2018) Androgens trigger different growth responses in genetically identical human hair follicles in organ culture that reflect their epigenetic diversity in life. *FASEB J*, 32, 795-806.
- Mo A, Jackson S, Varma K, Carpino A, Giardina C, Devers TJ und Rosenberg DW (2016) Distinct transcriptional changes and epithelial-stromal interactions are altered in early-stage colon cancer development. *Mol Cancer Res*, 14, 795-804.
- Moll R, Divo M und Langbein L (2008) The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*, 129, 705-733.

- Moody TW, Ito T, Osefo N und Jensen RT (2011) VIP and PACAP: recent insights into their functions/roles in physiology and disease from molecular and genetic studies. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 18, 61-67.
- Moody TW, Nuche-Berenguer B und Jensen RT (2016) Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, and their receptors and cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 23, 38-47.
- Morgan BA (2014) The dermal papilla: an instructive niche for epithelial stem and progenitor cells in development and regeneration of the hair follicle. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4, 1-14.
- Morice A, Unwin RJ und Sever PS (1983) Vasoactive intestinal peptide causes bronchodilatation and protects against histamine-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Lancet*, 322, 1225-1227.
- Mort RL, Jackson IJ und Patton EE (2015) The melanocyte lineage in development and disease. *Development*, 142, 620-632.
- Müller-Röver S, Handjiski B, Van Der Veen C, Eichmüller S, Foitzik K, Mc Kay IA, Stenn KS und Paus R (2001) A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol*, 117, 3-15.
- Muneeb F, Hardman JA und Paus R (2019) Hair growth control by innate immunocytes: perifollicular macrophages revisited. *Exp Dermatol*, 28, 425-431.
- Murayama MA, Kakuta S, Inoue A, Umeda N, Yonezawa T, Maruhashi T, Tateishi K, Ishigame H, Yabe R, Ikeda S, Seno A, Chi HH, Hashiguchi Y, Kurata R, Tada T, Kubo S, Sato N, Liu Y, Hattori M, Saijo S, Matsushita M, Fujita T, Sumida T und Iwakura Y (2015) CTRP6 is an endogenous complement regulator that can effectively treat induced arthritis. *Nat Commun*, 6, 1-12.
- Naukkarinen A, Harvima I, Paukkonen K, Aalto ML und Horsmanheimo M (1993) Immunohistochemical analysis of sensory nerves and neuropeptides, and their contacts with mast cells in developing and mature psoriatic lesions. *Arch Dermatol Res*, 285, 341-346.
- Nishimura EK (2011) Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res*, 24, 401-410.
- Nishimura EK, Granter SR und Fisher DE (2005) Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science*, 307, 720-724.
- Odum L, Petersen LJ, Skov PS und Ebskov LB (1998) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is localized in human dermal neurons and causes histamine release from skin mast cells. *Inflamm Res*, 47, 488-492.

- Oh JW, Klöpper JE, Langan EA, Kim Y, Yeo J, Kim MJ, Hsi TC, Rose C, Yoon GS, Lee SJ, Seykora JT, Kim JC, Sung YK, Kim M, Paus R und Plikus MV (2016) A guide to studying human hair follicle cycling In vivo. *J Invest Dermatol*, 136, 34-44.
- Ohyama M, Terunuma A, Tock CL, Radonovich MF, Pise-Masison CA, Hopping SB, Brady JN, Udey MC und Vogel JC (2006) Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. *J Clin Invest*, 116, 249-260.
- Panteleyev AA, Jahoda CA und Christiano AM (2001) Hair follicle predetermination. *J Cell Sci*, 114, 3419-3431.
- Papakostas D, Rancan F, Sterry W, Blume-Peytavi U und Vogt A (2011) Nanoparticles in dermatology. *Arch Dermatol Res*, 303, 533-550.
- Park PJ, Lee TR und Cho EG (2015) Substance P stimulates endothelin 1 secretion via endothelin-converting enzyme 1 and promotes melanogenesis in human melanocytes. *J Invest Dermatol*, 135, 551-559.
- Paus R (2013) Migrating melanocyte stem cells: masters of disaster? *Nat Med*, 19, 818-819.
- Paus R und Cotsarelis G (1999) The biology of hair follicles. *N Engl J Med*, 341, 491-497.
- Paus R, Langan EA, Vidali S, Ramot Y und Andersen B (2014) Neuroendocrinology of the hair follicle: principles and clinical perspectives. *Trends Mol Med*, 20, 559-570.
- Paus R, Peters EM, Eichmüller S und Botchkarev VA (1997) Neural mechanisms of hair growth control. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2, 61-68.
- Peters EM, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Tobin DJ und Paus R (2001) Hair-cycle-associated remodeling of the peptidergic innervation of murine skin, and hair growth modulation by neuropeptides. *J Invest Dermatol*, 116, 236-245.
- Peters EM, Liotiri S, Bodó E, Hagen E, Bíró T, Arck PC und Paus R (2007) Probing the effects of stress mediators on the human hair follicle: substance P holds central position. *Am J Pathol*, 171, 1872-1886.
- Peters EM, Tobin DJ, Botchkareva NV, Maurer M und Paus R (2002) Migration of melanoblasts into the developing murine hair follicle is accompanied by transient c-Kit expression. *J Histochem Cytochem*, 50, 751-766.
- Pfaffl MW (2004) Real-time RT-PCR: neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOSpektrum*, 10, 92-95.
- Philpott MP, Green MR und Kealey T (1990) Human hair growth in vitro. *J Cell Sci*, 97, 463-471.
- Philpott MP, Sanders D, Westgate GE und Kealey T (1994) Human hair growth in vitro: a model for the study of hair follicle biology. *J Dermatol Sci*, 7 Suppl, S55-72.

- Pilkington SM und Barron MJ (2018) Aged human skin accumulates mast cells with altered functionality that localize to macrophages and vasoactive intestinal peptide-positive nerve fibres. *Br J Dermatol*, 180, 849-858.
- Pincelli C, Fantini F, Massimi P, Girolomoni G, Seidenari S und Giannetti A (1990) Neuropeptides in skin from patients with atopic dermatitis: an immunohistochemical study. *Br J Dermatol*, 122, 745-750.
- Pincelli C, Fantini F, Romualdi P, Sevignani C, Lesa G, Benassi L und Giannetti A (1992) Substance P is diminished and vasoactive intestinal peptide is augmented in psoriatic lesions and these peptides exert disparate effects on the proliferation of cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 98, 421-427.
- Plikus MV und Chuong CM (2014) Macroenvironmental regulation of hair cycling and collective regenerative behavior. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4, 1-14.
- Ramot Y, Bíró T, Tiede S, Toth BI, Langan EA, Sugawara K, Foitzik K, Ingber A, Goffin V, Langbein L und Paus R (2010) Prolactin-a novel neuroendocrine regulator of human keratin expression in situ. *FASEB J*, 24, 1768-1779.
- Ramot Y, Marzani B, Pinto D, Klöpper JE und Paus R (2015) N(1)-methylspermidine, a stable spermidine analog, prolongs anagen and regulates epithelial stem cell functions in human hair follicles. *Arch Dermatol Res*, 307, 841-847.
- Ramot Y, Zhang G, Bíró T, Langbein L und Paus R (2013) Is thyrotropin-releasing hormone a novel neuroendocrine modulator of keratin expression in human skin? *Br J Dermatol*, 169, 146-151.
- Ramot Y, Zhang G, Bíró T, Lisztes E, Funk W, Ingber A, Langbein L und Paus R (2011) TSH is a novel neuroendocrine regulator of selected keratins in the human hair follicle. *J Dermatol Sci*, 64, 67-70.
- Reich A und Szepietowski JC (2008) Vasoactive peptides in the pathogenesis of psoriasis. *G Ital Dermatol Venereol*, 143, 289-298.
- Riemer AB, Keskin DB und Reinherz EL (2012) Identification and validation of reference genes for expression studies in human keratinocyte cell lines treated with and without interferon-gamma - a method for qRT-PCR reference gene determination. *Exp Dermatol*, 21, 625-629.
- Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW und Steinhoff M (2006) Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev*, 86, 1309-1379.
- Rork JF, Rashighi M und Harris JE (2016) Understanding autoimmunity of vitiligo and alopecia areata. *Curr Opin Pediatr*, 28, 463-469.
- Said SI und Mutt V (1970) Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science*, 169, 1217-1218.

- Samarasinghe AE, Hoselton SA und Schuh JM (2010) Spatio-temporal localization of vasoactive intestinal peptide and neutral endopeptidase in allergic murine lungs. *Regul Pept*, 164, 151-157.
- Samuelov L, Kinori M, Bertolini M und Paus R (2012a) Neural controls of human hair growth: calcitonin gene-related peptide (CGRP) induces catagen. *J Dermatol Sci*, 67, 153-155.
- Samuelov L, Sprecher E, Sugawara K, Singh SK, Tobin DJ, Tsuruta D, Bíró T, Klöpper JE und Paus R (2013) Topobiology of human pigmentation: P-cadherin selectively stimulates hair follicle melanogenesis. *J Invest Dermatol*, 133, 1591-1600.
- Samuelov L, Sprecher E, Tsuruta D, Bíró T, Klöpper JE und Paus R (2012b) P-cadherin regulates human hair growth and cycling via canonical Wnt signaling and transforming growth factor-beta2. *J Invest Dermatol*, 132, 2332-2341.
- Schacht V und Kern JS (2015) Basics of immunohistochemistry. *J Invest Dermatol*, 135, 1-4.
- Schneider MR und Paus R (2014) Deciphering the functions of the hair follicle infundibulum in skin physiology and disease. *Cell Tissue Res*, 358, 697-704.
- Schneider MR, Schmidt-Ullrich R und Paus R (2009) The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr Biol*, 19, R132-142.
- Scholzen T und Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182, 311-322.
- Schulz S, Röcken C, Mawrin C, Weise W, Holtt V und Schulz S (2004) Immunocytochemical identification of VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptors in normal and neoplastic human tissues with subtype-specific antibodies. *Clin Cancer Res*, 10, 8235-8242.
- Seeliger S, Buddenkotte J, Schmidt-Choudhury A, Rosignoli C, Shpacovitch V, Von Arnim U, Metze D, Rukwied R, Schmelz M, Paus R, Voegel JJ, Schmidt WE und Steinhoff M (2010) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: an important vascular regulator in human skin in vivo. *Am J Pathol*, 177, 2563-2575.
- Seiberg M (2013) Age-induced hair greying - the multiple effects of oxidative stress. *Int J Cosmet Sci*, 35, 532-538.
- Sharov A, Tobin DJ, Sharova TY, Atoyan R und Botchkarev VA (2005) Changes in different melanocyte populations during hair follicle involution (catagen). *J Invest Dermatol*, 125, 1259-1267.
- Singh SK, Nizard C, Kurfurst R, Bonte F, Schnebert S und Tobin DJ (2008) The silver locus product (Silv/gp100/Pmel17) as a new tool for the analysis of melanosome transfer in human melanocyte-keratinocyte co-culture. *Exp Dermatol*, 17, 418-426.

- Slominski A und Paus R (1993) Melanogenesis is coupled to murine anagen: toward new concepts for the role of melanocytes and the regulation of melanogenesis in hair growth. *J Invest Dermatol*, 101, 905-975.
- Slominski A, Wortsman J, Plonka PM, Schallreuter KU, Paus R und Tobin DJ (2005) Hair follicle pigmentation. *J Invest Dermatol*, 124, 13-21.
- Stenn KS und Paus R (2001) Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev*, 81, 449-494.
- Sugawara K, Zakany N, Hundt T, Emelianov V, Tsuruta D, Schafer C, Klöpper JE, Bíró T und Paus R (2013) Cannabinoid receptor 1 controls human mucosal-type mast cell degranulation and maturation in situ. *J Allergy Clin Immunol*, 132, 182-193.
- Sun H, Song J, Weng C, Xu J, Huang M, Huang Q, Sun R, Xiao W und Sun C (2017) Association of decreased expression of the macrophage scavenger receptor MARCO with tumor progression and poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 32, 1107-1114.
- Sung KJ, Chang SE, Paik EM, Lee MW und Choi JH (1999) Vasoactive intestinal polypeptide stimulates the proliferation of HaCaT cell via TGF- α . *Neuropeptides*, 33, 435-446.
- Tachibana T und Nawa T (2005) Immunohistochemical reactions of receptors to met-enkephalin, VIP, substance P and CGRP located on Merkel cells in the rat sinus hair follicle. *Arch Histol Cytol*, 68, 383-391.
- Tainio H (1987) Cytochemical localization of VIP-stimulated adenylate cyclase activity in human sweat glands. *Br J Dermatol*, 116, 323-328.
- Thomas AJ und Erickson CA (2008) The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell Melanoma Res*, 21, 598-610.
- Tiede S, Klöpper JE, Whiting DA und Paus R (2007) The 'follicular trochanter': an epithelial compartment of the human hair follicle bulge region in need of further characterization. *Br J Dermatol*, 157, 1013-1016.
- Tobin DJ (2011) The cell biology of human hair follicle pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res*, 24, 75-88.
- Tobin DJ und Bystryń JC (1996) Different populations of melanocytes are present in hair follicles and epidermis. *Pigment Cell Res*, 9, 304-310.
- Tobin DJ, Hagen E, Botchkarev VA und Paus R (1998) Do hair bulb melanocytes undergo apoptosis during hair follicle regression (catagen)? *J Invest Dermatol*, 111, 941-947.
- Tobin DJ und Kauser S (2005) Hair melanocytes as neuroendocrine sensors - Pigments for our imagination. *Mol Cell Endocrinol*, 243, 1-11.
- Tobin DJ und Paus R (2001) Graying: gerontobiology of the hair follicle pigmentary unit. *Exp Gerontol*, 36, 29-54.

- Tripathi V (2018). Introduction to Real-Time PCR (qPCR). In: *Webinars*, 1-57. SABiosciences a QIAGEN Company, Hilden.
- Umemoto N, Kakurai M, Okazaki H, Kiyosawa T, Demitsu T und Nakagawa H (2003) Serum levels of vasoactive intestinal peptide are elevated in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*, 31, 161-164.
- Van Beek N (2010) Thyroid hormones are direct modulators of human hair follicle growth and pigmentation. *Med. Diss, Universität zu Lübeck*. Lübeck.
- Van Beek N, Bodó E, Kromminga A, Gáspár E, Meyer K, Zmijewski MA, Slominski A, Wenzel BE und Paus R (2008) Thyroid hormones directly alter human hair follicle functions: anagen prolongation and stimulation of both hair matrix keratinocyte proliferation and hair pigmentation. *J Clin Endocrinol Metab*, 93, 4381-4388.
- Vargha A und Delaney HD (1998) The Kruskal-Wallis Test and stochastic homogeneity. *J Educ Behav Stat*, 23, 170-192.
- Verma AK, Manohar M, Venkateshaiah US und Mishra A (2017) Neuroendocrine cells derived chemokine vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in allergic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 38, 37-48.
- Vidali S, Chéret J, Giesen M, Haeger S, Alam M, Watson RE, Langton AK, Klinger M, Knuever J, Funk W, Kofler B und Paus R (2016) Thyroid hormones enhance mitochondrial function in human epidermis. *J Invest Dermatol*, 136, 2003-2012.
- Vogt A, Wischke C, Neffe AT, Ma N, Alexiev U und Lendlein A (2016) Nanocarriers for drug delivery into and through the skin - Do existing technologies match clinical challenges? *J Control Release*, 242, 3-15.
- Voisin T, Bouvier A und Chiu IM (2017) Neuro-immune interactions in allergic diseases: novel targets for therapeutics. *Int Immunol*, 29, 247-261.
- Wallengren J (1997) Vasoactive peptides in the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 2, 49-55.
- Wang G, Achim CL, Hamilton RL, Wiley CA und Soontornniyomkij V (1999) Tyramide signal amplification method in multiple-label immunofluorescence confocal microscopy. *Methods*, 18, 459-464.
- Westgate GE, Gibson WT, Kealey T und Philpott MP (1993) Prolonged maintenance of human hair follicles in vitro in a serum-free medium. *Br J Dermatol*, 129, 372-379.
- Wu D, Lee D und Sung YK (2011) Prospect of vasoactive intestinal peptide therapy for COPD/PAH and asthma: a review. *Respir Res*, 12, 1-8.
- Yamaguchi Y, Brenner M und Hearing VJ (2007) The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem*, 282, 27557-27561.

- Yuan XH, Yao C, Oh JH, Park CH, Tian YD, Han M, Kim JE, Chung JH, Jin ZH und Lee DH (2016)
Vasoactive intestinal peptide stimulates melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells
via CREB/MITF/tyrosinase signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 477, 336-342.

7 Publikationen aus diesem Projekt

7.1 Journalpublikationen

Bertolini M, **Bähr M**, Sulk M, Ponce L, Hardman JA, Bíró T, Tobin DJ, Paus R (2016). 664 Vasoactive intestinal peptide (VIP) regulates human melanocyte biology and hair follicle pigmentation. *J Investig Dermatol*, 136, S117.

Bertolini M, Pretzlaff M, Sulk M, **Bähr M**, Gherardini J, Uchida Y, Reibelt M, Kinori M, Rossi A, Bíró T, Paus R (2016). VIP, whose receptor-mediated signalling may be defective in alopecia areata, provides protection from hair follicle immune privilege collapse. *Br J Dermatol*, 175, 531-541.

7.2 Konferenzpublikationen - Poster

Bertolini M, **Bähr M**, Sulk M, Pretzlaff M, Uchida Y, Reibelt M, Zilio F, Bíró T, Paus R (2015). Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a novel, complex neuroendocrine regulator of human HF melanocyte biology in situ. *Exp Dermatol*. E13-13. In: 42nd Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft-Dermatologische Forschung. März, 2015; Ulm, Deutschland.

Bertolini M, **Bähr M**, Sulk M, Pretzlaff M, Reibelt M, Zilio F, Bíró T, Paus R (2014). A novel neuroendocrine control of a key signalling pathway in human skin: Vasoactive intestinal peptide (VIP) upregulates intrafollicular c-Kit expression. In: 44th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research. September, 2014; Kopenhagen, Dänemark.

Bähr M, Bertolini M, Pretzlaff M, Zilio F, Lisztes E, Bíró T, Paus R (2014). A novel neuro-regulation of a key signalling pathway in human skin: VIP regulates intrafollicular c-Kit expression. *Exp Dermatol*. E17-17. In: 41st Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft-Dermatologische Forschung. März, 2014; Köln, Deutschland.

Bähr M, Pretzlaff M, Bertolini M, Paus R (2013). Does VIP increase c-Kit expression in human anagen hair follicles? In: *Universität zu Lübeck*. In: Uni im Dialog: 7. Lübecker Doktorandentag; Mai, 2013; Lübeck, Deutschland.

8 Förderung während dieser Dissertation

Studienstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes e.V., von April 2010 bis Dezember 2017.

9 Anhang

9.1 Ethikanträge

9.1.1 Ethikantrag 06-109 der Universität zu Lübeck



Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Herrn
Dr. med. Fischer
Klinik für Dermatologie und Venerologie

Bearbeiter: Frau Erdmann
Telefon: (0451) 500- 4639
Fax: (0451) 500- 3026
email: erdmann@zuv.uni-luebeck.de

im Hause

Datum: 28.11.06
Aktenzeichen:
(immer angeben!) 06-109

nachrichtlich:
Herrn Prof. Zillikens, Direktor der
Klinik für Dermatologie und Venerologie

Sitzung der Ethik-Kommission am 18. Juli 2006

Antragsteller: Herr Dr. Fischer / Herr Prof. Zillikens

Titel: In-vitro-Untersuchung der Biologie des humanen Haarfollikels in bezug auf Wachstumseigenschaften, Apoptose, Wachstumsregulation, Pigmentierung und Immunprivileg im Haarorgankulturmodell
Ihr Schreiben vom 15. November 2006

Sehr geehrter Herr Dr. Fischer,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat keine Bedenken.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und den besten Wünschen für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich

Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder:

Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)
 Prof. Dr. F. Hohagen
(Psychiatrie)
Prof. Dr. Dendorfer
(Pharmakologie)

Frau H. Müller
(Pflege)
 Prof. Wessel
(Kinderchirurgie, Stellv. Vorsitzender der EK)
Herr Dr. Fieber
(Richter am Landgericht Lübeck)
Prof. Schwinger
(Humangenetik)

Herr Prof. Dr. Schunkert
(Medizinische Klinik I)
 Frau Prof. Dr. M. Schrader
(Plastische Chirurgie)
Herr Dr. Schultz
(Pädiatrie)
 Herr D. Stojan
(Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)

9.1.2 Amendments für Ethikantrag 06-109 der Universität zu Lübeck



Universität zu Lübeck

Experimentelle Dermatologie

Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie - Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Prof. Dr. med. Ralf Paus
- Experimentelle Dermatologie -
Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie
Ratzeburger Allee 160

Lübeck, 08.12.2008

23538 Lübeck

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender der
- Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck -

Amendment für Ethikantrag Aktenzeichen 06-109

Sehr geehrter Professor Raspe,

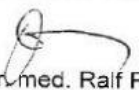
hiermit reichen wir ein Amendment zum Ethikantrag "In vitro-Untersuchung der Biologie des humanen Haarfollikels in Bezug auf Wachstumseigenschaften, Apoptose, Wachstumsregulation, Pigmentierung und Immunprivileg im Haarorgankulturmodell" (Aktenzeichen 06-109) ein.

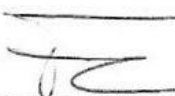
Für den weiteren Progress unserer Forschung ist es notwendig, in den Versuchen Positivkontrollen mit humanem Gewebe mitzuführen. Da diese nicht explizit im ursprünglichen Ethikantrag mit eingeschlossen sind, wurde uns durch das Institut für Pathologie angeraten, dieses Amendment einzureichen. Selbiges Institut wäre bereit, uns nach der positiven Beurteilung durch die Ethikkommission Bestandsmaterial zu überlassen.

Wir würden daher die Hohe Ethikkommission der Medizinischen Fakultät zu Lübeck bitten, dieses Amendment in Betracht zu ziehen und hoffen auf ein positives Votum.

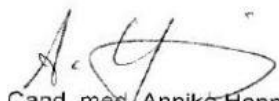
Herzlichen Dank für Ihre Mühe im Voraus.

Mit freundlichen Grüßen,


Prof. Dr. med. Ralf Paus


Dr. med. Tobias Fischer


Dr. rer. nat. Burkhard Poeggeler


Cand. med. Annika Hanning

Ethikantrag: Aktenzeichen 06-109

Amendement für die Verwendung von humanem Gewebe zum Zwecke von Positivkontrollen

Hintergrund

Im ursprünglichen Ethikantrag "In vitro-Untersuchung der Biologie des humanen Haarfollikels in Bezug auf Wachstumseigenschaften, Apoptose, Wachstumsregulation, Pigmentierung und Immunprivileg im Haarorgankulturmodell" (Aktenzeichen 06-109) wurde die Mitführung von anderen humanen Geweben als Positivkontrollen nicht explizit mit eingeschlossen.

Um belegen zu können, dass die immunhistochemischen Färbungen und Immunfluoreszenzfärbungen der Haut und Haarfollikel in unseren Experimenten auch tatsächlich das Antigen markieren, welches durch Färbung bzw. Immunfluoreszenz detektiert werden soll, müssen Kontrollen von anderen humanen Geweben, die bereits positiv für das Antigen getestet wurden, in jeder Färbung zur Qualitätskontrolle mitgeführt werden.

In Absprache mit dem Institut für Pathologie wäre es möglich, dass bereits in der Pathologie bestehendes humanes Gewebe von unserem Labor für die genannten Untersuchungen als Positivkontrolle verwendet werden kann.

Im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen soll kein neues Gewebe gewonnen werden.

Das uns zur Verfügung gestellte Gewebe wird für unsere Zwecke anonymisiert. Das Geschlecht des Patienten wird wegen Unterschieden in der geschlechtsspezifischen Ausprägung von untersuchten Parametern mitgeteilt.

Bearbeitung des Gewebes

Für die Versuche in unserem Labor werden entweder formalin-fixierte und paraffin-eingebettete oder bei -80°C unfixiert in Form von Kryoschnitten aufbewahrte Gewebeproben verwendet. Das unfixierte Kryogewebe wird anschließend z.B. mit Aceton oder Ethanol nachfixiert.

Für den weiteren Verlauf werden die Positivkontrollen parallel zu den untersuchten Proben der gleichen Behandlung unterzogen, d.h. sie werden je nach Fragestellung mit verschiedenen primären Antikörpern inkubiert und mittels sekundärem Antikörper und Detektionskit immunhistochemisch oder durch Immunfluoreszenz dargestellt.

Gewebearten

Für unsere Versuche notwendige Gewebearten:

- | | |
|---|--|
| • Mamma (normales humanes Brustgewebe und dessen maligne Entartung) | • Discus intervertebralis (Nucl. pulposus) |
| • Hypophyse | • Glandula pinealis |
| • Ovar | • Pankreas |
| • Uterus | • Tonsille |
| • Hoden | • Niere |
| • Hypothalamus | • Nebennierenrinde |
| • Thymus | • Schilddrüse |
| | • Leber |

Potentielle ethische Probleme

Das zu untersuchende Material stammt von bereits länger zurückliegenden Entnahmen von Gewebe von Patienten, deren Einverständnis für die speziellen, in diesem Amendement genannten Untersuchungen nicht eingeholt werden konnte. Das Einverständnis der Patienten kann somit aufgrund der Aufrechterhaltung des Anonymisierungsprozesses nicht eingeholt werden.



Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Klinik für Dermatologie, Allergologie
und Venerologie
Herrn Prof. Dr. med. Ralf Paus
- Experimentelle Dermatologie –
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Prof. Dr. Dr. Heiner Raspe
Telefon: (0451) 7 99 25 20
Fax: (0451) 7 99 25 22
email: Heiner.Raspe@uk-sh.de

Aktenzeichen:
(immer angeben !) 11.12.08
Ra-gr
AZ 06-109

Amendment für Ethikantrag

Hochverehrter Herr Kollege Paus,

als Vorsitzender der von Ihnen mit Schreiben vom 08.12.2008 adressierten „Hohen“ Ethikkommission gebe ich mir die Ehre, Ihr Amendment zu Ihrem Ethikantrag 06-109 ohne Anrufung der Gesamtkommission positiv zu bescheiden.

Hochachtungsvoll und mit allen guten Wünschen für einen positiven Verlauf Ihrer Forschung bleibe ich

Ihr sehr ergebener

Prof. Dr. med. Dr. phil. Hans-Heinrich Raspe

P. S.: Ich danke der Pathologie, Sie auf die aus Sicht der Kommission gegebenen Notwendigkeit des Amendments aufmerksam gemacht zu haben.

Nachrichtlich: Frau J. Erdmann, Dekanat
Frau Dr. A. Hüppe, IIS



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
PD Dr. med. Tobias Fischer
Klinik für Dermatologie und Venerologie

im Hause

Ethik-Kommission

Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. F. Gieseler
Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 500 4639
Fax: +49 451 500 3026
janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 06-109

Datum: 15. März 2012

In-vitro-Untersuchung der Biologie des humanen Haarfollikels in Bezug auf Wachstumseigenschaften, Apoptose, Wachstumsregulation, Pigmentierung und Immunprivileg im Haarorgankulturmodell
Hier: Amendment 2 –Ihr Schreiben vom 13. März 2012

Sehr geehrter Herr Dr. Fischer,

das Amendment bezüglich der Nutzung von Haut aus anderen behaarten Arealen mit den folgenden Unterlagen habe ich zustimmend zur Kenntnis genommen:

- Aufklärung und Einwilligung sowie
- Studienprotokoll.

Es bedarf keiner weiteren Begutachtung durch die Kommission.

Bitte beachten Sie folgenden Hinweis: Die Haarproben können nur vernichtet werden, wenn diese in pseudonymisierter Form vorliegen.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und besten Wünschen
für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich
Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

9.2 Materialien

9.2.1 Kopfhautresektate

Tabelle 9.1 Kopfhaut, die für die Datenerhebung verwendet wurde.

Das Alter der Frauen betrug durchschnittlich 54,6 Jahre.

Patienten-nummer	Geschlecht	Alter	Verwendung
01	Weiblich	50	Analyse von Expressionsmustern
02	Weiblich	64	Analyse von Expressionsmustern
03	Weiblich	51	Analyse von Expressionsmustern
04	Weiblich	62	Haarfollikelkultur
05	Weiblich	52	Haarfollikelkultur
06	Weiblich	56	Haarfollikelkultur
07	Weiblich	50	Haarfollikelkultur
08	Weiblich	52	Haarfollikelkultur
09	Weiblich	56	Haarfollikelkultur
10	Weiblich	42	Haarfollikelkultur
11	Weiblich	50	Haarfollikelkultur
12	Weiblich	68	Haarfollikelkultur
13	Weiblich	42	Haarfollikelkultur
14	Weiblich	64	Haarfollikelkultur
15	Weiblich	47	Haarfollikelkultur
16	Weiblich	69	Haarfollikelkultur
17	Weiblich	54	Haarfollikelkultur

9.2.2 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 9.2 Übersicht der verwendeten Reagenzien und Chemikalien.

Deutschland (D), Vereinigte Staaten von Amerika (USA).

Reagenz oder Chemikalie	Hersteller
Albumin aus Rinderserum	Carl Roth, Karlsruhe, D
Antikörper Diluent	DAKO, Glostrup, Dänemark
Antikörperdiluent für automatisierte Färbungsgeräte	Genemed Biotechnologies, San Francisco, USA
Cryomatrix	Thermo Shandon, Runcorn, Großbritannien
4',6-Diamidin-2-Phenylindol	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, D

Dispase	Invitrogen, Karlsruhe, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
EUKITT	Kindler GmbH, Freiburg, D
Faramount	DAKO, Glostrup, Dänemark
Fluoromount-G	Southern Biotechnologies, Birmingham, USA
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, D
Gibco Antibiotic-Antimycotic (100x)	Gibco, Karlsruhe, D
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Hydrokortison	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Insulin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Mayers Hämlaunlösung	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Penicillin G/ Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, D
RNase-freie DNase 1	Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien
Silbernitrat	Merck, Darmstadt, D
Streptavidin-Cy3	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, D
TRIZMA base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Trockeneis	Apotheke UKSH Campus Lübeck, Lübeck, D
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, D
Vasoaktives intestinales Peptid	Bachem, Bubendorf, Schweiz
William's E Medium	Biochrom KG, Cambridge, Großbritannien

9.2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9.3 Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Deutschland (D), Vereinigte Staaten von Amerika (USA).

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser	Thermo Scientific, Waltham, USA
Einwegskalpell	Novus Dahle, Lingen, D
Färbekasten nach Hellendahl	Carl Roth, Karlsruhe, D
Färbekasten nach Hecht	Carl Roth, Karlsruhe, D
Feuchte Kammer	LABART, Waldbüttelbrunn, D
Kryoröhrchen (englisch <i>cryo-tubes</i>)	Nunc, Wiesbaden, D
24-Well Mikrotiterplatte	Greiner Bio One, Wemmel, Belgien
Objektträger	Thermo Scientific, Waltham, USA
Petrischale, 35 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Sarstedt, D
RNase freie Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Sarstedt, D
SuperFrost Plus Objektträger	Menzel, Braunschweig, D

9.2.4 Kits

Tabelle 9.4 Übersicht der verwendeten Kits.

Vereinigte Staaten von Amerika (USA).

Kit	Hersteller
AEC Peroxidase (HRP) Substrate Kit, 3-Amino-9-Ethylcarbazol	Vector Laboratories, Burlingame, USA
ApopTag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit	Intergen, Purchase, New York, USA
DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit, 3,3'-Diaminobenzidin	Vector Laboratories, Burlingame, USA
TSA Fluorescein System	Perkin-Elmer, Boston, USA
TSA Tetramethylrhodamine System	Perkin-Elmer, Boston, USA
VECTASTAIN Elite ABC-HRP Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

9.2.5 Puffer

Tabelle 9.5 Übersicht und Zusammensetzung der verwendeten Puffer.

Menge	Reagenz
Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,2 [#]	
1,8 g	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O
8 g	NaCl
auf 1000 mL auffüllen	Destilliertes Wasser
Tris-gepufferte Salzlösung, pH 7,6 [#]	
6,1 g	Tris-Base
8,8 g	NaCl
auf 1000 mL auffüllen	Destilliertes Wasser
Tris-Natriumchlorid-Tween Puffer, pH 7,5 [#]	
15,76 g	Tris-HCl
8,766 g	NaCl
500 µL	Tween 20
auf 1000 mL auffüllen	Destilliertes Wasser
<i># Natriumhydroxid und Salzsäure wurden zur Justierung des pH-Wertes verwendet.</i>	

9.2.6 Geräte und Instrumente

Tabelle 9.6 Übersicht der verwendeten Geräte und Instrumente.

Deutschland (D), Vereinigte Staaten von Amerika (USA).

Gerät oder Instrument	Hersteller
Biozero Keyence 8000 Mikroskop	Keyence Deutschland, Neu-Isenburg, D
Heraeus Zellinkubator	Artisan Scientific Corporation, Champaign, USA
Leica 3500-Kryostat	Leica Biosystems, Nussloch, D
Leica RM 2255 Mikrotom	Leica Biosystems, Nussloch, D
Mikrowelle Europa Style	Clatronic International, Kempen, D
Monokularmikroskop	A. Krüss Optronic, Hamburg, D
pH-Meter	Knick (Calimatic), Berlin, D

Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Präzisionswaage	Kern EW, Balingen, D
Stereomikroskop mit Messokular Zeiss Stemi 2000-C	Carl Zeiss MicroImaging, Oberkochen, D
Sicherheitswerkbank	ScanLaf, Lynge, Dänemark
Tiefkühlgerät (-80 °C)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Bruchsal, D
Zellkulturinkubator Autoflow	NuAire, Plymouth, USA
Zentrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg, D

9.2.7 Software

Tabelle 9.7 Übersicht der verwendeten Software.

Deutschland (D), Vereinigte Staaten von Amerika (USA).

Software	Hersteller
Biozero Image Analyzer, Version 2.5	Keyence Deutschland, Neu-Isenburg, D
Biozero Image Observer, Version 2.5	Keyence Deutschland, Neu-Isenburg, D
GraphPad PRISM 4.02	Graphpad Software, San Diego, USA
ImageJ 1.40g	Wayne Rasband, National Institute of Health, USA
Microsoft Office 2007, 2010	Microsoft, Redmond, USA

9.2.8 Echtzeit quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Tabelle 9.8 Übersicht der verwendeten Materialien für die Echtzeit quantitative Polymerase-Kettenreaktion.

Alle Echtzeit quantitative Polymerase-Kettenreaktionen wurden extern unter Leitung von Prof. Dr. T. Bíró im DE-MTA „Lendület“ *Cellular Physiology* Gruppe, Abteilung für Physiologie der Universität Debrecen aus Debrecen in Ungarn durchgeführt. Deutschland (D), Vereinigte Staaten von Amerika (USA).

Material	Hersteller
High Capacity cDNA Kit	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
5' Nuclease Assay	Integrated DNA Technologies, Coralville, USA
RNase freie DNase 1	Applied Biosystems, Foster City, USA
Stratagene Mx3005P QPCR System	Agilent Technologies, Waldbronn, D
TaqMan universaler PCR Mastermix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Trizol	Life Technologies, Carlsbad, USA

Tabelle 9.9 Übersicht der verwendeten TaqMan-Primer.

Alle Echtzeit quantitative Polymerase-Kettenreaktionen wurden extern unter Leitung von Prof. Dr. T. Bíró im DE-MTA „Lendület“ *Cellular Physiology* Gruppe, Abteilung für Physiologie der Universität Debrecen aus Debrecen in Ungarn durchgeführt.

TaqMan Primer	Assay
ACTB	Hs99999903_m1
GAPDH	Hs99999905_m1
PPIA	Hs99999904_m1
VIP	Hs00175021_m1
VPAC1	Hs00270351_m1
VPAC2	Hs 00173643_m1

9.3 Ergebnisse

9.3.1 Validierung der bulbären Referenzareale für melanozytäre Parameter

9.3.1.1 Die MITF+ Zellzahl folgt der physiologischen Melanozytenverteilung

Die Aussagekraft der MITF+ Zellzahl in den neu entwickelten Referenzarealen (siehe Abbildung 2.8) wurde an mikrodisszierten, kultivierten HF getestet, die mit MITF IF gefärbt und immunhistomorphometrisch ausgewertet wurden. Die Anzahl von MITF+ Zellen distal der AL war höher als proximal (siehe Abbildung 9.1). Die physiologische Verteilung melanozytärer Zellen wurde abgebildet und der Parameter „Anzahl von MITF+ Zellen“ war zur Auswertung geeignet.

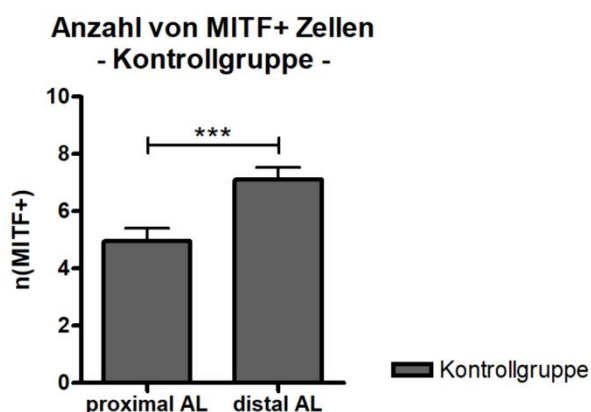


Abbildung 9.1 Die MITF+ Zellzahl ist distal der Auberschen Linie erhöht.

Mikrodisszierte Haarfollikel wurden kultiviert, mit vasoaktivem intestinalen Peptid behandelt, mit MITF-Immunfluoreszenzfärbung angefärbt und ausgewertet. N=32-38 Haarfollikel von 3 Patientinnen. Mittelwert $\pm$ SEM. *** $p < 0,01$. P wurde mit dem zweiseitigen t-Test berechnet. AL: Aubersche Linie; MITF: Mikrophthalmie-assoziiierter Transkriptionsfaktor; n: Zellzahl; p: Signifikanzwert; SEM: Standardfehler des Mittelwertes.

9.3.1.2 Die gp100+ Zellzahl folgt der physiologischen Melanozytenverteilung

Die Aussagekraft der gp100+ Zellzahl in den neu entwickelten Referenzarealen (siehe Abbildung 2.8) wurde an mikrodisssezierten, kultivierten HF getestet, die mit c-Kit/gp100 Doppel-IF gefärbt und immunhistomorphometrisch ausgewertet wurden. Die Anzahl von gp100+ Zellen war distal der AL höher als proximal (siehe Abbildung 9.2). Die physiologische Verteilung melanotischer Melanozyten wurde abgebildet und der Parameter „Anzahl von gp100+ Zellen“ war zur Auswertung geeignet.

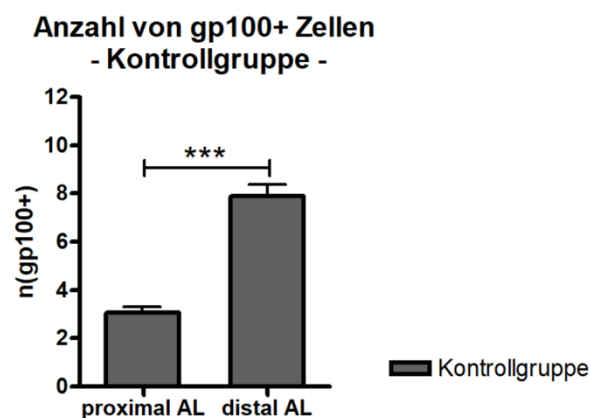


Abbildung 9.2 Die gp100+ Zellzahl ist distal der Auberschen Linie erhöht.

Mikrodisssezierte Haarfollikel wurden kultiviert, mit vasoaktivem intestinalen Peptid behandelt, mit c-Kit/gp100 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung angefärbt und ausgewertet. N=33-38 Haarfollikel von 3 Patientinnen. Mittelwert $\pm$ SEM. ***p<0,01. P wurde mit dem zweiseitigen t-Test berechnet. AL: Aubersche Linie; n: Zellzahl; p: Signifikanzwert; SEM: Standardfehler des Mittelwertes.

9.3.1.3 Die c-Kit+ Zellzahl folgt der physiologischen Melanozytenverteilung

Die Aussagekraft der c-Kit+ Zellzahl in den neu entwickelten Referenzarealen (siehe Abbildung 2.8) wurde an mikrodisssezierten, kultivierten HF getestet, die mit c-Kit/gp100 Doppel-IF gefärbt und immunhistomorphometrisch ausgewertet wurden. Die Anzahl von c-Kit+ Zellen war distal der AL höher als proximal (siehe Abbildung 9.3). Die physiologische Verteilung melanozytärer Zellen wurde abgebildet und der Parameter „Anzahl von c-Kit+ Zellen“ war zur Auswertung geeignet.

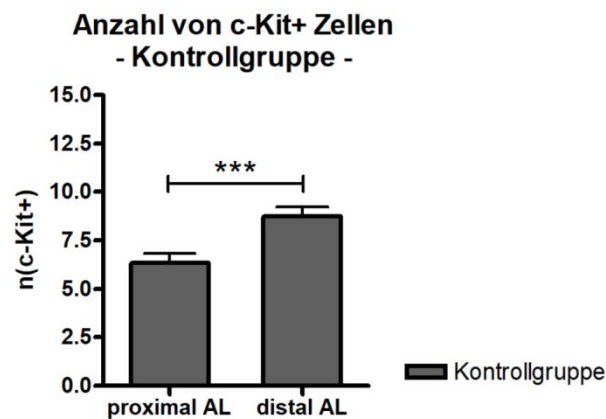


Abbildung 9.3 Die c-Kit+ Zellzahl ist distal der Auberschen Linie erhöht.

Mikrodissezierte Haarfollikel wurden kultiviert, mit vasoaktivem intestinalen Peptid behandelt, mit c-Kit/gp100 Doppel-Immunfluoreszenz angefärbt und ausgewertet. N=54-55 Haarfollikel von 3 Patientinnen. Mittelwert $\pm$ SEM. *** $p < 0,01$. P wurde mit dem zweiseitigen t-Test berechnet. AL: Aubersche Linie; c-Kit: Rezeptortyrosinkinase Kit; n: Zellzahl; p: Signifikanzwert; SEM: Standardfehler des Mittelwertes.

9.3.1.4 Die c-Kit+/gp100- Zellzahl folgt der physiologischen Melanozytenverteilung

Die Aussagekraft der c-Kit+/gp100- Zellzahl in den neu entwickelten Referenzarealen (siehe Abbildung 2.8) wurde an mikrodissezierten, kultivierten HF getestet, die mit c-Kit/gp100 Doppel-IF gefärbt und immunhistomorphometrisch ausgewertet wurden. Die Anzahl von c-Kit+/gp100- Zellen war proximal der AL höher als distal (siehe Abbildung 9.4). Die physiologische Verteilung wurde abgebildet und der Parameter „Anzahl von c-Kit+/gp100- Zellen“ war zur Auswertung geeignet.

**Anteil nicht melanotischer melanozytärer Zellen
- Kontrollgruppe -**

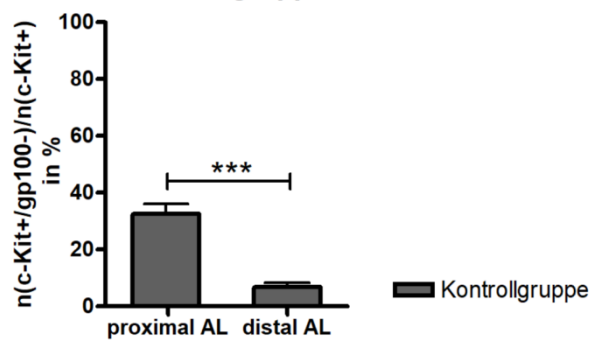


Abbildung 9.4 Der Anteil nicht-melanotischer melanozytärer Vorläuferzellen ist proximal der Auberschen Linie erhöht.

Mikrodissezierte Haarfollikel wurden kultiviert, mit vasoaktivem intestinalen Peptid behandelt, mit c-Kit/gp100 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung gefärbt und ausgewertet. Repräsentative Aufnahmen. N=43-47 Haarfollikel von 3 Patientinnen. Mittelwert $\pm$ SEM; *** $p < 0,001$. P wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. AL: Aubersche Linie; c-Kit: Rezeptortyrosinkinase Kit; n: Anzahl; p: Signifikanzwert; SEM: Standardfehler des Mittelwertes.

10 Danksagungen

In primis möchte ich meinen Mentoren danken Herr Prof. Dr. Ralf Paus, Frau Prof. Dr. Jennifer E. Hundt und Frau Dr. Marta Bertolini.

Herr Professor Paus, Sie haben mich in Ihrem einzigartig eingerichteten Lübecker Arbeitszimmer innerhalb weniger Minuten in den Bann der Haarfollikel gezogen. Ihre Gedanken, Impulse, Motivation und Leitung haben dieses Projekt und mich nachhaltig geformt.

Jenny, du hast meine Dissertation gerettet. Nachdem das Labor weggezogen gewesen war und meine Daten zwei Jahre lang im Stillen gereift waren, hattest du mich in deine Betreuung aufgenommen. Ich bewundere deine Liebe zur Wissenschaft und deine Opferbereitschaft für deine Schützlinge. Ich erinnere mich gerne an die zahlreichen Stunden, in denen wir über der Arbeit sinniert haben und bedanke mich dafür, dass du diesen Weg mit mir zusammen gegangen bist.

Nach unserer ersten Unterhaltung hatte mir Herr Prof. Paus eröffnet, dass meine Betreuerin eine energiegeladene, englisch-sprachige Italienerin sein wird. Marta, wir haben perfekt zusammen gepasst. Die Zeit im Labor ist einzigartig gewesen. Ich bin jeden Tag gerne zur Arbeit gegangen und habe mich von deinem fröhlichen, enthusiastischen und perfektionistischem Wesen anstecken lassen. Ich danke dir, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest, dass du mich ernst genommen hast, für deine Leitung, Kritik, Beharrlichkeit und Motivation: für deine Unterstützung.

Nach einem Jahr intensiver Laborarbeit habe ich dich zugeteilt bekommen, Mark. Es war das erste Mal für mich, dass ich jemanden betreuen durfte. Im Rückblick ist mir aufgefallen, dass es Gottes Wille gewesen ist, der dich auf deinem unkonventionellen Lebensweg nach Lübeck geführt hat, zu unser beider Entwicklung. Danke für deine Aufopferungsbereitschaft, Impulse, Genauigkeit und Geduld. Du bist mir eine sehr große Hilfe gewesen.

Nach dem Umzug in das Labor in Münster ist die Entfernung zur Laborrunde für mich zu groß geworden, um am intensiven Austausch über die weiteren Wege des VIP-Projektes teilzunehmen. Mathias Sulk hat meine Rolle dabei übernommen. Auch wenn wir uns

persönlich nie getroffen haben, so gelang es uns die Veröffentlichung für die 44. Jahrestagung der ESDR vorzubereiten. Danke, dass du mein Projekt weitergeführt hast, dass du dich in die Irrungen und Wirrungen meiner Unterlagen eingearbeitet hast und mich trotz der Entfernung einbezogen hast.

Einen besonderen Dank möchte ich Maik Pretzlaff übermitteln. Er ist der erste Doktorand unseres Labors gewesen, der den Einfluss von VIP auf Haarfollikel untersucht hat. Seiner aufmerksamen Arbeit ist es zu verdanken, dass die Beeinflussung der Pigmentbildung vermutet worden ist. Maik, vielen Dank für die Einweisung in die Laborarbeit. Danke für deine offene, freundliche Art und viel Erfolg auf deinem Weg in der Neurologie.

Ein außerordentlicher Dank gilt den Mitarbeitern des dermatohistopathologischen Labors und den weiteren Mitgliedern der Lübecker AG Paus: Ewan, Nancy, Jérémy, Jen, Lydia, Hannah, Antje, Elvira, Claudia und Sylva. Ich danke Gott für das gute Arbeitsklima und die persönlichen Gespräche mit jedem Einzelnen von euch. Ihr alle seid der Grund gewesen, dass ich gerne zur Arbeit gegangen bin und die Laborzeit genossen habe.

Mein herzlichster Dank geht an meine Korrespondenten Herr Prof. Dr. Desmond J. Tobin, Herr Prof. Dr. Lutz Langbein, Herr Dr. Koji Sugawara, Frau Dr. Liat Samuelov und Frau Dr. Erika Herczeg-Lisztes aus dem Labor von Herr Prof. Dr. Tamás Bíró. Danke für die präzisen, ausführlichen und prompten Antworten auf meine Fragen und Problemstellungen. Danke, dass Sie Ihre Zeit investiert haben, ohne dass wir uns persönlich kennen, einfach um zu helfen.

Meine Lissy, mein Fels, meine Liebe. Von Allen, hast du unter dieser Dissertation am meisten leiden müssen und dennoch hast du mich immer weiter bestärkt und motiviert dabei zu bleiben. Danke, dass du dich um alles gekümmert hast, was ich nicht geschafft habe. Danke, dass du an meiner Seite bist.

Familie und Freunde sind die Stützpfeiler jeden Erfolges. Ich bin Gott dankbar für die starken Pfeiler auf die er mein Fundament gebaut hat. Mein herzlichster Dank geht an meine Kinder Ida, Evi und Jonne, meine lieben Eltern, meinen besten Bruder Tony, meine großzügigen Schwiegereltern und meine Freunde Frauke, Flo, Rena und Stefan.

11 Lebenslauf

Name Bähr geb. Kuckelkorn, Marcel
 Alter 30 Jahre
 Familienstand Verheiratet, 3 Kinder



Dissertation

in der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck

01/2017	Wechsel der Betreuung von Herr Prof. Dr. Paus zu Frau Prof. Dr. Hundt im beiderseitigen Einverständnis
2015	Schließung des Labors von Herr Prof. Dr. Paus am Universitätsklinikum Münster und Gründung von „Monasterium Laboratory Skin and Hair research Solutions GmbH“ in Münster
02/2014	Umzug des Labors von Herr Prof. Dr. Paus an die Klinik für Hautkrankheiten, Universitätsklinikum Münster
02/2013-02/2014	Experimentelle Arbeit: Arbeitsgruppe Herr Prof. Dr. Paus
07/2012-02/2013	Studentische Hilfskraft in der Arbeitsgruppe Herr Prof. Dr. Paus

Ausbildung

ab 12/2017	Arzt in Weiterbildung in der Nuklearmedizin des MVZ des Klinikum Frankfurt (Oder) und dem Klinikum Frankfurt (Oder)
03/2016 - 03/2017	Praktisches Jahr: Akutgeriatrie (DRK-Krankenhaus Middelburg), Dermatologie (UKSH Lübeck) und Chirurgie (Sana Klinikum Lübeck)
01/2010 - 2013	Nebenberuflich Pflegehilfskraft in der ambulanten Pflege
Wahlfächer	EKG, Dermatohistopathologie, Nahtkurse in Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie und Plastischer Chirurgie
10/2009 - 11/2017	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck, gefördert durch die Studienstiftung des deutschen Volkes e.V.
07/2009	Abitur am C.-F. Gauß Gymnasium Frankfurt (Oder), MINT-Exzellenz sowie naturwissenschaftliche Spezialschule

Frankfurt (Oder), 25.08.2021