
**FUNKTIONALE CHARAKTERISIERUNG
DER KLEINEN RHO-GTPASE RAC1
IM HAARWACHSTUM UND IN DER HAARDIFFERENZIERUNG**

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR
ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT ZU KÖLN

VORGELEGT VON

KRISTINA BEHRENDT
AUS IDAR-OBERSTEIN

Berichterstatter (Gutachter):

Prof. Dr. Dagmar Mörsdorf
Prof. Dr. Matthias Hammerschmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2011

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....I

ZUSAMMENFASSUNG V

ABSTRACT VI

1 EINLEITUNG 1

1.1 AUFBAU UND FUNKTION DER HAUT..... 1

 1.1.1 *Aufbau und Funktion der Epidermis* 2

 1.1.1.1 Terminale Differenzierung der epidermalen Keratinozyten..... 3

 1.1.1.2 Funktion epidermaler Stammzellen in der Regeneration der Epidermis..... 4

 1.1.2 *Auswirkungen von UV-Strahlung auf die Haut* 4

 1.1.2.1 Induktion des Zelltods durch UVB-Strahlung in der Haut 5

1.2 AUFBAU UND FUNKTION DES HAARFOLLIKELS 8

 1.2.1 *Haarmorphogenese* 8

 1.2.2 *Haarfollikel- und Haardifferenzierung* 10

 1.2.2.1 Ausbildung der unterschiedlichen Haartypen während der Morphogenese 12

 1.2.3 *Zyklische Regeneration des Haarfollikels*..... 13

 1.2.3.1 Bedeutung der Stammzellen der Bulge-Region für die Haarfollikelbildung
und Haarfollikelregeneration 15

1.3 MELANOZYTEN UND MELANOZYTENVORLÄUFERZELLEN IN MURINER HAUT..... 16

1.4 STRUKTUR UND FUNKTION VON KLEINEN GTPASEN 17

 1.4.1 *Familie der Rho-GTPasen* 17

 1.4.2 *Struktur von Rho-GTPasen* 18

 1.4.3 *Funktion der Rho-GTPasen*..... 18

 1.4.4 *Zyklische Aktivierung von Rho-GTPasen* 19

1.5 BESCHRIEBENE ISOFORMEN VON RAC 21

 1.5.1 *Rac1* 21

 1.5.1.1 Funktionen von Rac1 in epithelialen Zellen 22

 1.5.1.1.1 Bedeutung von Rac1 für die Ausbildung der Zellmorphologie 22

 1.5.1.1.2 Bedeutung von Rac1 für die Haarfollikelstammzellen..... 24

1.6 MAUSMODELLE MIT MUTATION VON RAC1 25

 1.6.1 *Dominant negative N17Rac1 transgene Mäuse*..... 26

 1.6.2 *Konditionaler Rac1 Knockout* 27

1.7 ZIELSETZUNG 29

2 MATERIAL & METHODEN	31
2.1 MATERIAL	31
2.1.1 <i>Chemikalien und Reagenzien</i>	31
2.1.2 <i>Gebrauchswaren und Zellkulturmaterialien</i>	31
2.1.3 <i>Nährmedien</i>	31
2.1.4 <i>Häufig verwendete Puffer und Gebrauchslösungen</i>	32
2.1.5 <i>Enzyme</i>	33
2.1.6 <i>Antikörper</i>	33
2.1.7 <i>Primer</i>	35
2.1.8 <i>Kits und weitere Materialien</i>	35
2.1.9 <i>Bestrahlungsgerät</i>	36
2.1.10 <i>Mikroskope</i>	36
2.2 METHODEN	37
2.2.1 <i>Zellbiologische Methoden</i>	37
2.2.1.1 Isolation von Keratinozyten aus neugeborenen Mäusen.....	37
2.2.1.2 Kultivierung von murinen Keratinozyten	37
2.2.1.3 Kultivierung von 3T3 („Feeder“) Fibroblasten	38
2.2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen.....	38
2.2.1.5 Koloniebildungsassay zur Bestimmung des proliferativen Potentials.....	38
2.2.1.6 Spreading-Assay zur Analyse der Zellausbreitungsverhaltens.....	38
2.2.1.7 Bestrahlung von primären Keratinozyten mit UVB.....	39
2.2.1.8 Isolation von Epidermis aus Haut von neugeborenen Mäusen.....	39
2.2.2 <i>Molekularbiologische Methoden</i>	40
2.2.2.1 DNA Isolation aus Mausschwanzbiopsien	40
2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	40
2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	41
2.2.3 <i>Biochemische Methoden</i>	41
2.2.3.1 Proteinextraktion aus Zellkulturen.....	41
2.2.3.2 Proteinextraktion aus Gewebe.....	41
2.2.3.3 Rac1 Pull-Down Analyse	42
2.2.3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
2.2.3.5 Western Blot und Immundetektion von Proteinen.....	43
2.2.4 <i>Immunhisto- und cytochemische Methoden</i>	43
2.2.4.1 Immunfärbung von Kryoschnitten	43
2.2.4.1.1 Immunfärbung zum Nachweis des Myc-Tags in L61Rac1 transgenen Mäusen	43
2.2.4.1.2 Immunfärbung von aktiver Caspase 3	44
2.2.4.2 Immunfärbung von Paraffinschnitten	44
2.2.4.2.1 Immunfärbung von epidermalen Differenzierungsmarkern	44
2.2.4.2.2 Immunfärbung von Haarfollikeldifferenzierungsmarkern und Adhäsionsmolekülen	44
2.2.4.2.3 Immunfärbung von BrdU und Keratin 14.....	45
2.2.4.2.4 Immunfärbung von Melanozytenmarkern.....	45
2.2.4.2.5 Färbung von polymerisiertem Aktin mit TRITC-markiertem Phalloidin	45

2.2.4.3	L-DOPA histochemische Färbung von Melanozyten	46
2.2.4.4	Tyramide-basierter Tyrosinase-Aktivitätsassay (TTA-Assay).....	46
2.2.4.5	Detektion von apoptotischen Zellen mittels TUNEL-Assay.....	46
2.2.4.6	Fixierung der Hautproben für die Transmissionselektronenmikroskopie und die Semidünnschnittanalyse	47
2.2.5	<i>Maus in vivo Experimente</i>	47
2.2.5.1	In vivo BrdU Injektion	47
2.2.5.2	In vivo Bestrahlung von Mäusen mit UVB.....	47
2.2.6	<i>Statistische Analyse</i>	47
3	ERGEBNISSE	48
3.1	RAC1 RESCUE MÄUSE ALS MODELL ZUR ANALYSE SUPRABASALER RAC1 FUNKTIONEN.	48
3.2	PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG VON RAC1 RESCUE MÄUSEN	52
3.2.1	<i>Morphologische Veränderungen in der Haarfollikelstruktur von Rac1 Rescue Mäusen</i>	<i>52</i>
3.2.2	<i>Keine Beeinflussung der Differenzierung der IFE in Rac1 Rescue Mäusen</i>	<i>55</i>
3.2.3	<i>Untersuchung epidermaler Stammzellpopulationen in vivo und deren klonalen Eigenschaften in vitro.....</i>	<i>56</i>
3.2.4	<i>Haarphänotypen in Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen.....</i>	<i>60</i>
3.2.5	<i>Verzögerte Haarfollikelmorphogenese in Rac1 Rescue Mäusen</i>	<i>62</i>
3.2.6	<i>Unveränderte Haarfollikeldifferenzierung in Rac1 Rescue Mäusen</i>	<i>64</i>
3.3	CHARAKTERISIERUNG MÖGLICHER URSACHEN FÜR DAS VERÄNDERTE ERSCHEINUNGSBILD DES FELLIS IN RAC1 RESCUE MÄUSEN	67
3.3.1	<i>Untersuchung der Haaroberflächenstruktur von Rac1 Rescue Haaren</i>	<i>67</i>
3.3.2	<i>Veränderungen in der Haarfollikelstruktur als möglicher Auslöser für die gestörte Pigmentierung in Rac1 Rescue Haaren</i>	<i>69</i>
3.3.3	<i>Veränderungen in den Pigmentierungsprozessen als Auslöser für die gestörte Pigmentierung in Rac1 Rescue Haaren</i>	<i>77</i>
3.4	UNTERSUCHUNG MÖGLICHER URSACHEN DER HAARFOLLIKELDEGRADIERUNG IN RAC1 E-KO MÄUSEN.....	83
3.5	UNTERSUCHUNG UVB-INDUZierter APOPTOSE IN RAC1 E-KO MÄUSEN.....	88
4	DISKUSSION	96
4.1	DIE ROLLE VON RAC1 IN DER BASALZELLSCHICHT UND DER ÄUßEREN HAARWURZELSCHIEDEN FÜR DIE INTEGRITÄT VON HAARFOLLIKELN	96
4.2	REGULATION DER HAARMORPHOGENESE UND HAARSTRUKTURBILDUNG DURCH RAC1 ..	97
4.2.1	<i>Die Rolle von Rac1 in der Haarmorphogenese</i>	<i>97</i>

4.2.2	<i>Die Rolle von Rac1 in der frühen Haardifferenzierung</i>	101
4.2.3	<i>Die Rolle von Rac1 in der späten Haardifferenzierung</i>	103
4.3	REGULATION DER HAARSCHAFTSTRUKTUR UND PIGMENTVERTEILUNG IM HAARSCHAFT DURCH RAC1	105
4.3.1	<i>Die Rolle von Rac1 in der Haarschaftstrukturbildung</i>	105
4.3.2	<i>Die Rolle von Rac1 in den Pigmentierungsprozessen der Haare und in der Pigmentzelllokalisierung</i>	110
4.4	DIE ROLLE VON RAC1 IN DER ERHALTUNG DER HAARFOLLIKEL	112
4.5	REGULATION DER UVB-INDUZIERTEN APOPTOSE DURCH RAC1	114
4.6	AUSBLICK	118
5	LITERATURVERZEICHNIS	120
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
	ERKLÄRUNG	XI
	LEBENS LAUF	XII
	DANKSAGUNG	XIII

Zusammenfassung

Die kleine Rho-GTPase Rac1 besitzt wichtige Funktionen in der Regulation des Aktinzytoskeletts, der Proliferation und der Migration von epithelialen Zellen. Aufgrund von Experimenten mit Knockout-Mäusen und transgenen Mäusen wird Rac1 eine wichtige Rolle in der Erhaltung des epidermalen Stammzellpools sowie in der Wundheilung der Haut zugeschrieben.

In den bisher untersuchten Mäusen mit Epidermis-spezifischer Deletion von Rac1 konnten keine differenzierten Untersuchungen zu spezifischen Funktionen von Rac1 in verschiedenen Kompartimenten der Epidermis und ihrer Anhangsgebilde durchgeführt werden, da die Deletion immer im germinativen Kompartiment erfolgte und daher alle daraus hervorgehenden Zellen Rac1 negativ waren. Durch Einkreuzung eines mutierten Rac1 als Transgen in den Knockout-Hintergrund haben wir sogenannte Rac1 Rescue Mäuse erzeugt, in denen die Rac1-Aktivität selektiv im Keratin 14-positiven Kompartiment der Epidermis und der Haarfollikel rekonstituiert wurde.

Rac1 Rescue Mäuse zeigen im Gegensatz zum epidermalen Rac1 Knockout ein Wachstum der Haare sowie erkennbare Haarfollikel. Die infolge des Verlusts von Rac1 beobachteten Störungen der Haarmorphogenese können durch basale Rekonstitution der Rac1-Aktivität vollständig aufgehoben werden. Jedoch sind die Haarfollikel von Rac1 Rescue Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren verkürzt. Ursache hierfür ist offenbar eine verminderte Proliferation von Keratinozyten der Haarmatrix. Weiterhin sind Rac1 Rescue Mäuse durch ein mattes, gräulich erscheinendes Fell gekennzeichnet. Dies geht einher mit einer veränderten Haaroberflächenstruktur und einer gestörten Pigmentverteilung im Haarschaft. Mit dieser gestörten Pigmentverteilung korrelieren Defekte in der regulären Anordnung der Zellen der Haarmedulla sowie eine gestörte Ausbildung von Ausstülpungen des Haarcortex, die für die Adhäsion zwischen Cortex und Medulla verantwortlich sind. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten lassen damit erstmals auf eine spezifische Funktion von Rac1 in der Strukturbildung und Pigmentierung der Haare schließen.

Eine Suche nach Ursachen für die Haarfollikeldegradierung nach Rac1-Deletion führte zu dem Ergebnis, dass diese durch die Induktion von Apoptose in der äußeren Haarwurzelscheide des Haarfollikels mitverursacht sein könnte. Weitergehende funktionelle Untersuchungen zeigten, dass die Apoptose-Resistenz von epidermalen Keratinozyten mit Rac1-Defizienz oder mit gehemmter Rac1-Funktion nach UV-Bestrahlung stark vermindert ist. Dies ist die erste Evidenz für eine direkte Funktion von Rac1 in der Regulation der UV-Licht-induzierten Apoptose. Die molekularen Mechanismen der Beeinflussung der Apoptose-Resistenz durch Rac1 sollen den Gegenstand weiterer Untersuchungen bilden.

Abstract

The small Rho-GTPase Rac1 has important functions in the regulation of the actin cytoskeleton as well as in the proliferation and migration of epithelial cells. Experiments with knockout and Rac1 transgenic mice have shown its important role in the maintenance of the epidermal stem cell pool and in skin wound healing.

In the mice with epidermis specific deletion of Rac1 described so far, detailed investigation of specific functions of Rac1 in the different compartments of the epidermis and its appendages could not be performed. Due to the deletion in the germinative compartment all progeny were negative for Rac1. By introducing a mutated Rac1 as a transgene into the knockout background we have generated mice in which Rac1 activity has been selectively restored in the Keratin 14-positive compartment of the epidermis and hair follicles. These mice are referred to as Rac1 Rescue mice.

In contrast to epidermis specific Rac1 knockout mice, Rac1 Rescue mice show intact hair follicles and growth of hair. The observed retardation in hair morphogenesis caused by the loss of Rac1 can be restored completely by the basal reconstitution of Rac1 activity. However, hair follicles of Rac1 Rescue mice are shorter than those of control mice apparently due to reduced proliferation of the hair matrix keratinocytes. Moreover, the coat of Rac1 Rescue mice is dull and grey instead of black. This appearance of the coat correlates with a disturbed pigment distribution and surface structure of the hair shaft. In addition, we have detected defects in the regular arrangement of the medulla cells as well as an impaired formation of hair cortex protrusions responsible for the adhesion between cortex and medulla. The data shown here suggest, for the first time, a specific function of Rac1 in the formation and pigmentation of hairs.

When searching for possible reasons for the hair follicle degradation in Rac1 E-KO mice we observed an increased frequency of apoptotic keratinocytes in the outer root sheath of the hair follicles. Further functional investigations have demonstrated that resistance to apoptotic cell death of epidermal keratinocytes deficient for Rac1 or of keratinocytes with inhibited Rac1 function is markedly reduced upon UV irradiation. This is the first evidence for a direct function of Rac1 in the regulation of UV-induced apoptosis. The molecular mechanisms by which Rac1 regulates the apoptotic resistance of keratinocytes will be subject of further studies.

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut ist das flächenmäßig größte Organ. Sie bildet den Abschluss des Organismus nach außen und wirkt dadurch als eine effektive Barriere gegen das Eindringen von Pathogenen. Weiterhin übernimmt sie wichtige Schutzfunktionen gegenüber mechanischen, chemischen und thermischen Reizen. So schützt sie beispielsweise den Organismus vor energiereicher Strahlung, wie UV-Strahlung, und sorgt durch die Schweißsekretion für eine Regulation der Körpertemperatur und des Elektrolythaushalts. Durch die in der Haut befindlichen Rezeptoren, die sowohl Druck- als auch Temperaturveränderungen wahrnehmen, besitzt sie außerdem Funktionen eines Sinnesorgans [Junqueira & Carneiro, 2005].

Die Haut, auch Kutis genannt, lässt sich grob in zwei Schichten gliedern: Epidermis und Dermis. Die Dermis beherbergt die Anhangsgebilde der Haut, zu denen die Haarfollikel, die Talgdrüsen sowie die Schweißdrüsen gehören. Der Haarfollikel ist strukturell über die äußere Haarfollikelschicht mit der Oberhaut verbunden und wird daher zum epidermalen Kompartiment gezählt. Die Subkutis zählt im eigentlichen Sinne nicht mehr zur Haut, ist aber funktionell mit ihr verbunden (siehe Abb. 1-1).

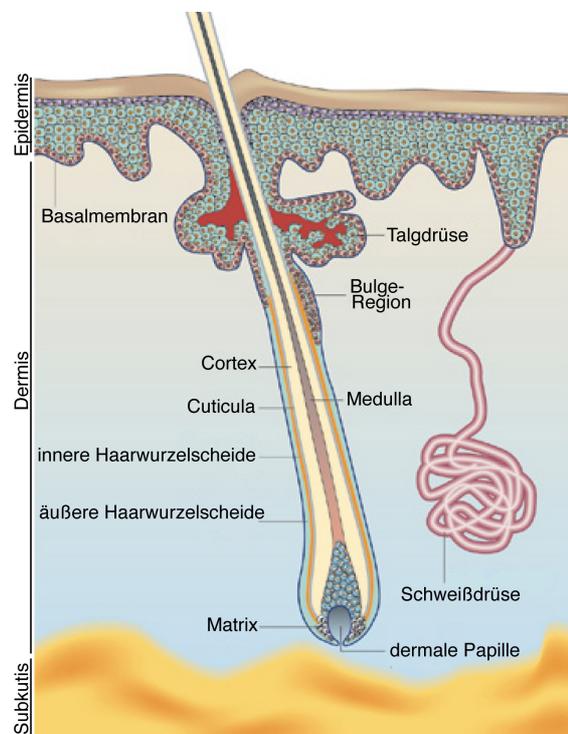


Abbildung 1-1: Aufbau der Haut. Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der Haut mit ihren Anhangsgebilden Haarfollikel, Talgdrüse und Schweißdrüse sowie deren struktureller Aufbau. [Fuchs & Raghavan, 2002 (übersetzt aus dem Englischen)]

Da die Epidermis und der Haarfollikel primär Bestandteile der Untersuchungen waren, wird im Folgenden lediglich näher auf deren Aufbau und Funktion in muriner Haut eingegangen.

1.1.1 Aufbau und Funktion der Epidermis

Physiologisch handelt es sich bei der Epidermis um ein mehrschichtiges, verhornendes (keratinisierendes) Plattenepithelgewebe, welches zu 90% aus epithelialen Keratinozyten besteht. Weiterhin sind dort in geringer Anzahl Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen und T-Lymphozyten zu finden.

An der Grenze zur Epidermis, an der Basalmembran haftend, befindet sich die Basalzellschicht (*stratum basale*). Sie besteht aus kubischen Zellen, die durch einen großen Kern und relativ wenig Zytoplasma gekennzeichnet sind. Diese sind durch Hemidesmosomen an der darunterliegenden Basalmembran verankert. Die Bildung von Desmosomen sorgt weiterhin für eine Verankerung benachbarter Zellen. Darauf folgend befinden sich die Stachelzellschicht (*stratum spinosum*), die Körnerschicht (*stratum granulosum*) und die Hornschicht (*stratum corneum*) (siehe Abb. 1-2a). Die verschiedenen Schichten sind durch einen fortschreitenden Differenzierungsgrad der Keratinozyten gekennzeichnet, die durch die Epidermis hindurch senkrecht zur Ebene der Zellschicht nach außen wandern [Watt, 1998].

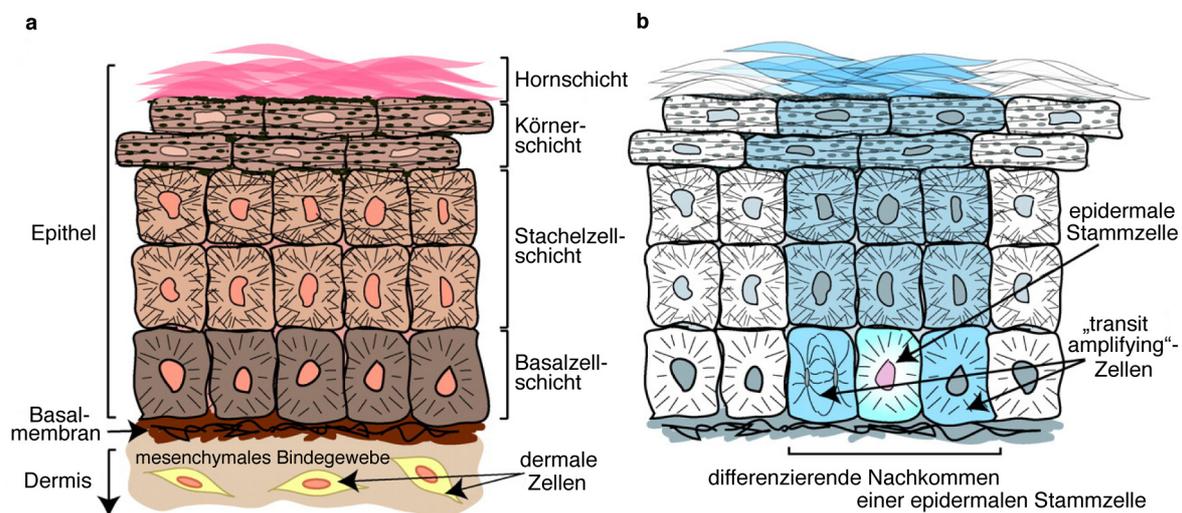


Abbildung 1-2: Aufbau und Regeneration der Epidermis. (a) zeigt den viergliedrigen Aufbau der Epidermis, (b) stellt schematisch die Regeneration der Epidermis durch Stammzellen der IFE dar. [Alonso & Fuchs, 2003 (übersetzt aus dem Englischen)]

Die Keratinozyten der Epidermis werden durch Zell-Zell-Kontakte zusammengehalten, die die auf die Epidermis wirkenden Kräfte gleichmäßig auf das gesamte Gewebe verteilen. Zu diesen gehören: Adhärenzverbindungen, „Tight Junctions“ aber auch Desmosomen.

Desmosomale Proteine besitzen ein spezifisches Expressionsmuster in den verschiedenen Schichten der Epidermis und des Haarfollikels, das teilweise mit dem Differenzierungsgrad der Keratinozyten korreliert.

1.1.1.1 Terminale Differenzierung der epidermalen Keratinozyten

Durch Induktion eines komplexen Differenzierungsprogramms in den basalen Keratinozyten verändern die Keratinozyten sowohl Morphologie als auch Funktion und sorgen dadurch für die Ausbildung der typischen Lagenstruktur. Dieser Prozess wird auch als Verhornung der Haut bezeichnet und kann in Synthese-, Transformations- und Terminalstadium unterteilt werden. Die Differenzierung der Keratinozyten ist gekennzeichnet durch die Expression verschiedener Keratine, die als Marker für den Differenzierungsgrad verwendet werden können [Fuchs & Green, 1980]. Man unterscheidet epitheliale Keratine (weiche Keratine), die unterschiedlich in verschiedenen Epithelgeweben exprimiert werden, und so genannte harte Keratine, die für die Bildung keratinisierter Strukturen wie Nägel verantwortlich sind. Zu diesen gehören auch die Keratine des Haares, auf die in Abschnitt 1.2.2 näher eingegangen wird.

Epitheliale Keratine werden in saure Typ I Keratine (pH 4,8 - 5,7) und neutrale bis basische Typ II Keratine (pH 5,8 - 8) unterteilt, die sich als Heterodimere im Verhältnis 1:1 zu 10 nm-Intermediärfilamenten zusammenlagern und zur Bildung des Zytoskeletts beitragen [Steinert & Liem, 1990; Fuchs & Weber, 1994]. In der Basalzellschicht der Epidermis sind Keratin 5 (Typ II) und Keratin 14 (Typ I) enthalten. Während der Differenzierung der Keratinozyten ändert sich jedoch das Expressionsmuster der Keratine. So wird im *stratum spinosum* die Expression von Keratin 5/14 eingestellt und durch die Expression der differenzierungsspezifischen Keratine Keratin 1 (Typ II) und Keratin 10 (Typ I) ersetzt. Im *stratum granulosum* beginnt die Expression der Strukturproteine Loricrin und Filaggrin, die an der Bildung der für die Verhornung im *stratum corneum* wichtigen dichten Proteinhülle beteiligt sind. Weiterhin fusionieren im *stratum granulosum* zuvor synthetisierte Granula mit der Plasmamembran und entlassen Lipide in die Interzellularräume der Zellen des *stratum granulosum* und *stratum corneum* [Schurer *et al.*, 1991]. Dabei wird die Ablagerung von glutamin- und lysinreichen Proteinen an der Innenseite der Plasmamembran induziert, die durch eine epidermale Transglutaminase [Steven & Steinert, 1994] quervernetzt werden. Diese dichte, schwer lösliche Proteinhülle wird auch als „cornified envelope“ bezeichnet und bildet die eigentliche protektive Barriere gegenüber äußeren Einflüssen.

1.1.1.2 Funktion epidermaler Stammzellen in der Regeneration der Epidermis

Die während der Differenzierung absterbenden Keratinozyten der äußeren Schichten werden durch proliferierende, undifferenzierte Zellen der Basalzellschicht ersetzt und sorgen dadurch für eine kontinuierliche Regeneration der Epidermis. Da proliferierende Zellen nur eine begrenzte Anzahl an Zellteilungen durchlaufen können, wird angenommen, dass sich Stammzellen in der Epidermis befinden, die für einen kontinuierlichen Ersatz der terminal differenzierenden Keratinozyten der Basalzellschicht verantwortlich sind. Epidermale Stammzellen zeichnen sich durch ein hohes proliferatives Potential aus, d.h. sie besitzen das Vermögen, eine große Anzahl an Zellteilungen zu durchlaufen [Barrandon & Green, 1987; Morris & Potten, 1994]. Ein derzeit gültiges, jedoch kontrovers diskutiertes Modell beschreibt die Lokalisation potentieller Stammzellen in der IFE in der Mitte einer Einheit von basalen Zellen [Potten & Morris, 1988; Mackenzie, 1997]. Diese teilen sich zunächst zu so genannten „transit amplifying“-Zellen, die sich schnell teilen [Potten, 1974; Potten, 1981], jedoch nur eine begrenzte Anzahl an Teilungen durchlaufen können. Sie sind für die kontinuierliche Regeneration der oberen Schichten der Epidermis verantwortlich (vgl. Abb. 1-2b). Eine ähnliche, sich schnell teilende Zellpopulation, die für die Zellbildung während des Wachstums des Haarfollikels verantwortlich ist, befindet sich im Haarbulbus [Potten & Booth, 2002]. Diese Zellen stammen, wie die Vorläuferzellen in der Epidermis, von ruhenden Stammzellen ab, die in der Bulge-Region des Haarfollikels unterhalb der Talgdrüsen lokalisiert sind [Cotsarelis *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 2000] (vgl. Abb.1-1).

1.1.2 Auswirkungen von UV-Strahlung auf die Haut

UV-Strahlung wird anhand ihrer Wellenlänge in UVC- (200-280 nm), UVB- (280-320 nm) und UVA-Strahlung (320-400 nm) unterteilt. UVC-Strahlung wird aufgrund ihrer geringen Wellenlänge von den obersten Luftschichten der Atmosphäre und der Ozonschicht absorbiert und gelangt dadurch nicht bis zur Erdoberfläche. Im Laborversuch wird die Haut durch die Hornschicht nahezu vollständig gegen UVC-Strahlung abgeschirmt. UVB- und UVA-Strahlung dagegen können aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften (Wellenlänge, Energie) tiefer in die Haut eindringen und üben dort ihre spezifischen, schädigenden Effekte auf die Zellen der Haut aus. Die Wirkung der UVB-Strahlung entfaltet sich dabei hauptsächlich in der IFE, wohingegen UVA-Strahlung aufgrund ihrer höheren Wellenlänge tiefer in die Haut eindringen kann [Timares *et al.*, 2008]. Die Eindringtiefe der UV-Strahlung in die Haut wird dabei zusätzlich durch die Dicke der Haut beeinflusst. Da, im Vergleich zur menschlichen Haut mit einer Dicke von 70 bis ca. 150 µm, murine Haut nur eine Dicke von durchschnittlich ca. 27 µm besitzt, kann UV-Strahlung generell tiefer in die Haut von Mäusen eindringen (vgl. Abb. 1-3).

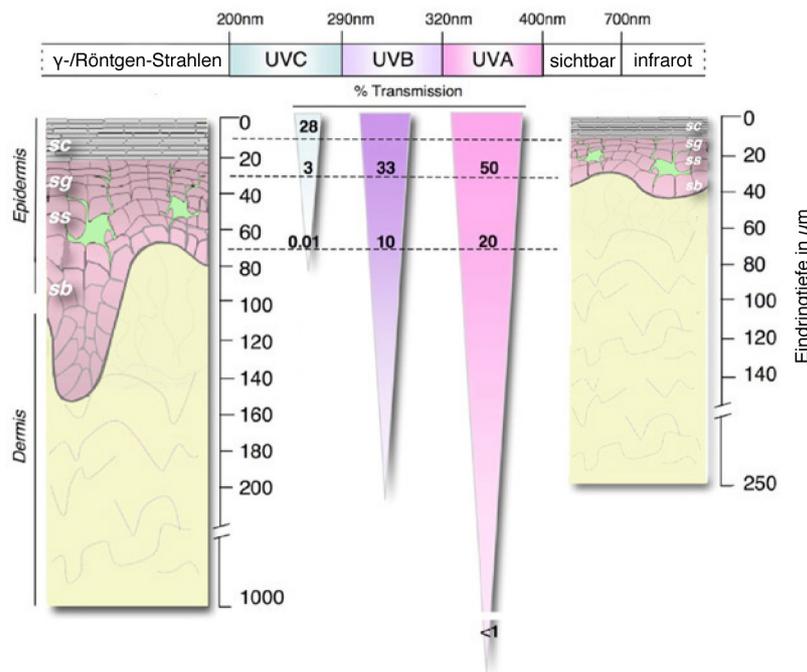


Abbildung 1-3: Eindringtiefe und Transmission der unterschiedlichen UV-Strahlungsarten in die menschliche Haut und in die Maushaut. Aufgrund der unterschiedlichen Hautdicken von Menschen und Mäusen ergeben sich verschiedene Eindringtiefen von UVC-, UVB- und UVA-Strahlung. UVC-Strahlung wird nahezu vollständig absorbiert, wohingegen UVB- und UVA-Strahlung tiefer in die Haut eindringen kann. [Timares *et al.*, 2008 (modifiziert und übersetzt aus dem Englischen)]

Die biologische Wirkung der UV-Strahlung nimmt mit zunehmender Eindringtiefe in die Haut aufgrund von wellenlängeabhängigen Interaktionen ab. Besonders UVB-Strahlung wird von den photosensiblen Bestandteilen der epidermalen Keratinozyten, wie z.B. von der DNA bzw. dem Chromatin, Proteinen und Lipiden absorbiert, die dadurch im Ablauf photophysikalischer und photochemischer Reaktionen verändert werden können und Änderungen in der molekularen und zellulären Struktur von Hautzellen hervorrufen. Aus diesem Grund wird UVB-Strahlung als der Hauptinduktor von Apoptose in den epidermalen Keratinozyten der Haut angesehen [Young, 1987].

1.1.2.1 Induktion des Zelltods durch UVB-Strahlung in der Haut

UVB-Strahlung wird von den Keratinozyten der Epidermis absorbiert. Dies führt zu einer Reihe von zellulären Veränderungen und kann bei starker Schädigung der Zellen, z.B. durch eine zu hohe UV-Dosis, zur Induktion von Apoptose in der Epidermis führen. Die UV-induzierte Apoptose der Keratinozyten sorgt für die Eliminierung geschädigter Zellen, um der Gefahr einer möglichen Entartung der geschädigten Zellen entgegenzuwirken.

Die Induktion von Apoptose durch UVB-Strahlung ist ein komplexer Mechanismus, der durch eine Vielzahl verschiedener Signalwege beeinflusst wird. Zum einen kann eine Apoptose der Keratinozyten durch eine direkte Schädigung der DNA induziert werden, zum anderen

können apoptotische Prozesse durch eine verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies¹ (ROS) oder durch Aktivierung von Todesrezeptoren ausgelöst werden [Kulms *et al.*, 2002]. Die verschiedenen Wege der Induktion apoptotischer Prozesse nach UVB-Bestrahlung in Keratinozyten sind in Abbildung 1-4 zusammengefasst.

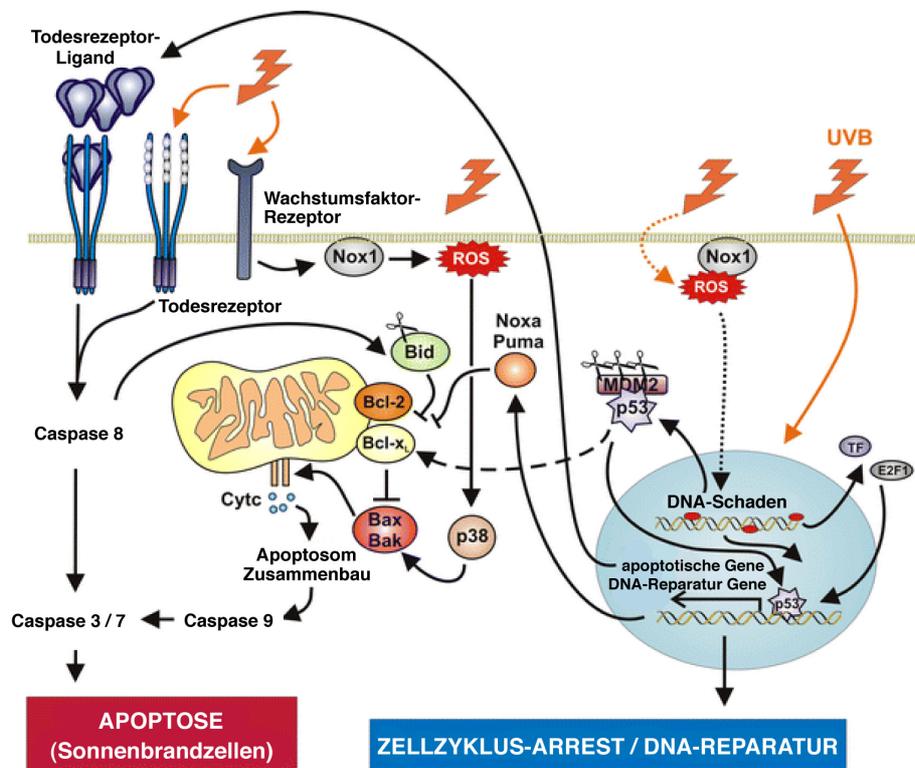


Abbildung 1-4: UVB-abhängige Signalwege zur Induktion apoptotischer Prozesse in Keratinozyten. Obige Abbildung stellt die verschiedenen apoptotischen Signalwege, die durch Bestrahlung mit UVB induziert werden, schematisch dar. [Lippens *et al.*, 2009 (modifiziert und übersetzt aus dem Englischen)]

Durch direkte Wechselwirkung von UVB-Strahlung mit der nukleären DNA entstehen hauptsächlich zwei Arten von Läsionen: Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs) oder (6-4)-Pyrimidin-Pyrimidon-Photoproducten (6-4PP), die durch Dimerbildung zweier benachbarter Pyrimidinbasen (Thymin, Cytosin) entstehen. Unter ihnen stellt die Bildung von CPDs den häufigsten UVB induzierten DNA-Schaden dar [Matsunaga *et al.*, 1991]. Der Großteil dieser Schäden wird durch die DNA-Reparatur-Maschinerie der Zelle in Form der Nukleotid-Exzisions-Reparatur entfernt [Costa *et al.*, 2003; Moser *et al.*, 2005]. Werden die Schäden jedoch nicht ausreichend repariert oder ist die Schädigung der Zelle zu groß, kommt es zu einer Expression pro-apoptotischer Bcl-2-Proteinfamilienmitgliedern wie Bax oder Bak, die durch Membranschädigung für eine Ausschüttung von Cytochrom C durch die Mitochondrien sorgen und so die Bildung des Apoptosoms im Zytoplasma induzieren. Im Anschluss wird

¹ Unter dem Begriff „reaktive Sauerstoff Spezies“ werden freie Radikale (z.B. Hyperoxid-Anion O_2^- , Hydroxyl- OH , Peroxyl- ROO , Alkoxy-Radikal RO) sowie stabile molekulare Oxidantien (z.B. Wasserstoffperoxid H_2O_2 , Hydroperoxid $ROOH$, Singulett-Sauerstoff 1O_2) zusammengefasst.

eine Kaskade an Caspasen² durch Aktivierung von Caspase 9 in Gang gesetzt. Aktivierte Initiator-Caspasen wie Caspase 9 spalten anschließend die *pro*-Form nachgeschalteter Effektor-Caspasen [Sitailo *et al.*, 2002]. Eine wichtige Effektor-Caspase ist Caspase 3, die den Abbau zellulärer Bestandteile initiiert und für die Aktivierung von Endonukleasen, die die nukleäre DNA spalten, verantwortlich ist. Die fragmentierte DNA apoptotischer Zellen kann auch durch TUNEL³-Färbung nachgewiesen werden [Gavrieli *et al.*, 1992; Labat-Moleur *et al.*, 1998], durch die über eine enzymatische Reaktion die freierwerdenden, endständigen Hydroxylgruppen der DNA-Bruchstücke fluoreszenzmarkiert werden. Der beschriebene mitochondriale Signalweg, auch intrinsischer Weg genannt, kann zum einen durch Blockierung der Cytochrom C-Ausschüttung durch anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie wie Bcl-2 oder Bcl-X_L [Hockenbery *et al.*, 1990], zum anderen durch IAPs (Apoptose-inhibitorische Proteine), die eine Spaltung der Caspasen unterbinden [Deveraux *et al.*, 1997], inhibiert werden.

Ein weiterer Weg zur Apoptose-Induktion stellt die Aktivierung von Todesrezeptoren dar (extrinsischer Signalweg). Todesrezeptoren gehören zur TNF-Rezeptor-Superfamilie und umfassen TNFR1, TRAIL-Rezeptoren sowie den Fas-Rezeptor [Leverkus *et al.*, 1997; Kibitel *et al.*, 1998; Qin *et al.*, 2004]. Die UVB-induzierte Expression der rezeptorabhängigen Liganden und deren extrazelluläre Bindung an ihren spezifischen Rezeptor führt zu einer Aktivierung der Caspasen-Kasade über die Spaltung der Initiator-Caspase 8, die wiederum die Effektor-Caspase 3 aktiviert. Für den Fas-Rezeptor wurde gezeigt, dass dieser nach Bestrahlung mit hohen UVB-Dosen Caspase 8 auch über einen Liganden-unabhängigen Mechanismus aktivieren kann [Aragane *et al.*, 1998]. Allerdings zeigen jüngere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, dass Fas für die UV-induzierte Apoptose von Keratinozyten nicht erforderlich ist [Hedrych-Ozimina *et al.*, 2010].

Zusätzlich kann die UVB-abhängige Apoptose durch die exzessive Bildung von ROS aktiviert werden. ROS werden hauptsächlich durch direkte photochemische Reaktionen im Zytoplasma gebildet, können aber auch durch eine UVB-abhängige Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie dem EGFR gebildet werden. Die Bildung der ROS ist dabei vermutlich durch Nox1 reguliert [Wang & Kochevar, 2005]. Zelluläre ROS können zum einen die DNA und zelluläre Proteine direkt schädigen [Farber, 1994], zum anderen sind sie in der Lage, die ASK1-p38 MAPK-Signalkaskade zu aktivieren [Peus *et al.*, 1999]. Eine Aktivierung von p38 führt zu einer Aktivierung und Translokation von Bax in die

² Caspasen sind Cysteinproteasen, die Peptidbindungen an Aspartat-Residuen C-terminal spalten.

³ TdT (terminale Desoxyribonucleotidyl-Transferase)- mediated dUTP-biotin nick end labeling

Mitochondrien [Van Laethem *et al.*, 2004], wo Bax die Ausschüttung von Cytochrom C induziert und damit die Bildung des Apoptosoms einleitet.

Apoptotische Keratinozyten, auch Sonnenbrandzellen (SBZ) genannt, können in H&E-gefärbten Schnitten leicht nachgewiesen werden, da sie histologisch durch einen pyknotischen (verdichteten) Nukleus sowie ein geschrumpftes, eosinophiles Zytoplasma charakterisiert sind [Daniels *et al.*, 1961]. In Maushaut sind bereits 8 h nach Bestrahlung SBZ in der IFE zu finden, wobei das Maximum der SBZ erst nach 24-48 h erreicht wird. Nach ca. 60-72 h können keine SBZ mehr nachgewiesen werden [Woodcock & Magnus, 1976; Murphy *et al.*, 2001].

1.2 Aufbau und Funktion des Haarfollikels

Der Haarfollikel zählt zu den Anhangsgebilden der Haut. Er besteht aus einem oberen, permanenten Abschnitt und einem tiefer gelegenen, nicht-permanenten Abschnitt, in dem die Bildung des Haares erfolgt. Weiterhin wird der Haarfollikel aufgrund seiner Schichtung in äußere Haarwurzelscheide, drei konzentrische Lagen der inneren Haarwurzelscheide und drei konzentrische Lagen haarbildender Zellen aufgeteilt. Die äußere Haarwurzelscheide hängt direkt mit der Basalzellschicht der IFE zusammen und ist ihr aufgrund gemeinsamer Marker biochemisch ähnlich. Am unteren Ende des Haarfollikels, im Haarbulbus, befindet sich eine Population sich schnell teilender Keratinozyten der Haarmatrix, die durch Differenzierung alle Schichten der inneren Haarwurzelscheide und des Haarschafts bilden.

1.2.1 Haarmorphogenese

Haarmorphogenese bezeichnet den Prozess der ersten Bildung und des ersten Haarwachstums während der Embryonalentwicklung. Die Haarbildung wird dabei durch Interaktion von einwandernden mesenchymalen Zellen mit dem darüberliegenden Epithel induziert. Es entstehen die als kleine epidermale Ausläufer in die Dermis ragenden Haarplakoden [Hardy, 1992]. Darauf folgend wachsen diese in die darunterliegende Dermis ein und es kommt zur Bildung des Haarbulbus sowie zu einer Kondensation dermalen Zellen im Bereich des Haarbulbus, die als dermale Papille bezeichnet wird. Im Anschluss folgt ein weiteres Längenwachstum der Haarplakode sowie eine Differenzierung der inneren Zellen der Plakode in die unterschiedlichen Haarfollikelschichten. Anhand von verschiedenen Merkmalen und Prozessen, die während der Morphogenese induziert werden, können die gebildeten Haarfollikel in verschiedene Morphogenesestadien eingeordnet werden [Paus *et al.*, 1999]. Dazu gehören die Haarfollikelstruktur, die Haarschaftdifferenzierung und

Haarschaftpigmentierung sowie die Entwicklung der dermalen Papille (vgl. Abb. 1-5). Die genauen Kennzeichen der einzelnen Stadien werden im Folgenden näher erläutert:

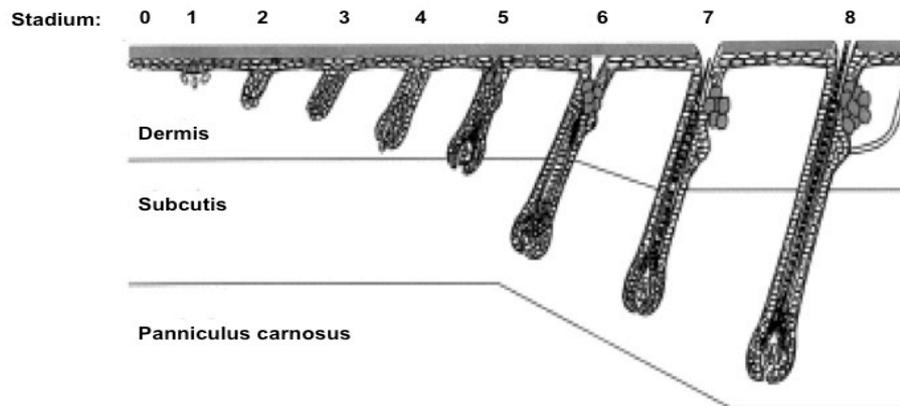


Abbildung 1-5: Stadien der Haarfollikelmorphogenese. Es ist die Entwicklung des Haarfollikels während der Morphogenese mit den in Paus *et al.*, 1999 festgelegten Stadien dargestellt. [Paus *et al.*, 1999 (übersetzt aus dem Englischen)]

Histologisch ist das Stadium 0 lediglich durch eine „Ansammlung von Zellkernen“ gekennzeichnet und daher schwierig zu erkennen. Im Stadium 1 wird der Haarkeim als wulstartige Verdickung epidermaler Zellen sichtbar, und es sammeln sich dermale Fibroblasten unterhalb des Haarkeims, die von einer veränderten Orientierung gekennzeichnet sind. Während des zweiten Stadiums verlängert sich der Haarkeim und weist ein konvexes Ende auf. Auch die dermalen Fibroblasten unterhalb des Keims verdichten sich. Im Stadium 3 zeigt der Haarzapfen nun ein konkaves basales Ende. Die Keratinozyten innerhalb des Zapfens zeigen einen säulenartigen, radial zur follikulären Achse verlaufenden Aufbau. In Haarfollikeln des vierten Stadiums wird der Haarbulbus schließlich als Verdickung am Ende des Haarzapfens sichtbar, und es bildet sich die kegelförmig erscheinende innere Haarwurzelscheide. Die dermale Papille ist zu diesem Zeitpunkt zu 50% von der Haarmatrix umschlossen. In Stadium 5 verlängert sich die innere Haarwurzelscheide nach oben hin, und die Bulge-Region wird erstmals als Verdickung sichtbar. Weiterhin können die ersten Sebozyten nachgewiesen werden. Die dermale Papille ist nahezu vollständig umschlossen und besitzt eine ovale Form. Außerdem sind die ersten Melaningranula im Prä-Cortex zu erkennen. Darauf folgend (Stadium 6) werden die Talgdrüse und der Haarkanal erstmals sichtbar, und die innere Haarwurzelscheide enthält nun den ausgebildeten Haarschaft, in dem erste Melaningranula zu finden sind. Die dermale Papille ist in diesem Stadium vollständig von der Haarmatrix umschlossen. Während des siebten Stadiums verlässt die Spitze des Haarschafts die innere Haarwurzelscheide und tritt in den Haarkanal ein. Die Talgdrüse ist nun seitlich am Haarfollikel lokalisiert. Haarfollikel

des letzten Stadiums (Stadium 8) weisen eine maximale Länge auf und reichen bis zum *Panniculus carnosus*⁴. Der Haarschaft durchbricht die Epidermis.

1.2.2 Haarfollikel- und Haardifferenzierung

Die erste Differenzierung der Haarfollikel und des Haares findet während der Haarmorphogenese statt, wiederholt sich jedoch während jeder Wachstumsphase des Haares erneut. Dabei entsteht die für den inneren Anteil des Haarfollikels typische Schichtung [Kopan *et al.*, 2002; Legue & Nicolas, 2005].

Signale aus der dermalen Papille sorgen für die Induktion der Expression bestimmter Gene und die Differenzierung der proliferierenden Haarmatrixzellen. Im Verlauf der Differenzierung grenzt sich zunächst der „Companion Layer“ (Cp) von der äußeren (ORS) und inneren Haarwurzelscheide (IRS) ab und die innere Haarwurzelscheide sowie die Zellen des Haarschafts differenzieren zu jeweils drei konzentrisch angeordnete Lagen von Zellschichten. Die innere Haarwurzelscheide teilt sich in die Henle'sche (He) und die Huxley'sche Schicht (Hu) sowie die Cuticula der inneren Haarwurzelscheide (Ci). Die haarschaftbildenden Zellen differenzieren zu Haarcuticula (C), Haarcortex (Cx) und Medulla (M) (vgl. Abb. 1-6). Hierdurch ist eine aus sieben konzentrisch angeordneten Schichten bestehende innere Haarfollikelstruktur entstanden, die von Zellen der Haarmatrix abstammen. Während der Differenzierung der Haarmatrixzellen sind sowohl der Transkriptionsfaktor Lef1 als auch β -Catenin (β -Cat) von Bedeutung. Nukleäres β -Catenin, d.h. transkriptionell aktives β -Catenin und Lef1 sind im Haarfollikel vornehmlich in den Zellen der oberen Haarmatrix zu finden [Tsuji *et al.*, 2001], wo sie an der Bildung und Differenzierung des Haarschafts beteiligt sind [DasGupta & Fuchs, 1999; Narhi *et al.*, 2008]. Der Transkriptionsfaktor Foxn1 dagegen wird in postmitotischen Vorläuferzellen des differenzierenden Cortex und der Cuticula exprimiert [Lee *et al.*, 1999] und besitzt eine wichtige Rolle in der Differenzierung des Haarschafts und der Haarmedulla [Johns *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2009]. Auch eine Mutation von Foxn1, die als „Nude-Mutation“ bezeichnet wird, hat einen Verlust des Fells zur Folge, der auf eine Deformation der Haarfollikel und einen daraus resultierenden Penetrationsdefekt der Haarfollikel durch die Epidermis zurückzuführen ist [Mecklenburg, 2001; Mecklenburg *et al.*, 2005]. Ähnlich hierzu haben auch Mutationsstudien des Transkriptionsfaktors Hoxc13 gezeigt, dass eine Veränderung in dessen Expression zu Abnormitäten im Haarschaft führt [Godwin & Capecchi, 1998]. Im Gegensatz dazu spielt der Transkriptionsfaktor „CCAAT displacement“ Protein (CDP), auch Cutl1 genannt, eine wichtige Rolle in der Differenzierung der inneren Haarwurzelscheide, wo

⁴ zusätzliche Muskelschicht, die in muriner Haut innerhalb der Dermis zu finden ist

CDP an der Expressionskontrolle verschiedener IRS-spezifischer Gene beteiligt ist [Ellis, 2001]. Wie CDP besitzt auch Gata-3 eine wichtige Funktion in der Differenzierung der inneren Haarwurzelscheide [Kaufman *et al.*, 2003] (vgl. Abb. 1-6). Weitere, für die Differenzierung der inneren Haarwurzelscheide und des Haarschafts wichtige Signalwege, die in diesem Zusammenhang zu nennen wären, sind der Notch-Signalweg [Pan *et al.*, 2004; Blanpain *et al.*, 2006] sowie den BMP-Signalweg [Ming Kwan *et al.*, 2004], auf deren genaue Funktion jedoch hier nicht näher eingegangen werden soll. Wie eine Vielzahl an Studien gezeigt hat, zieht eine Störung der zuvor genannten Signalwege oftmals eine Veränderung in der Expression der Haarkeratine nach sich. Diese Keratine zeigen ein spezifisches Expressionsmuster, nach dem die unterschiedlichen Schichten des Haarfollikels eindeutig identifiziert werden können [zusammengefasst in Moll *et al.*, 2008]. Man unterscheidet Keratine der inneren Haarwurzelscheide (IRS Keratine) und Haarschaftkeratine (siehe Abb. 1-6). Wie bei den epidermalen Keratinen sind auch unter den Haarfollikelkeratinen sowohl Typ I als auch Typ II Keratine zu finden (siehe Abschnitt 1.1.1.1). Haarkeratine sind die wichtigsten strukturgebenden Proteine des Haarfollikels und im Besonderen des Haarschafts.

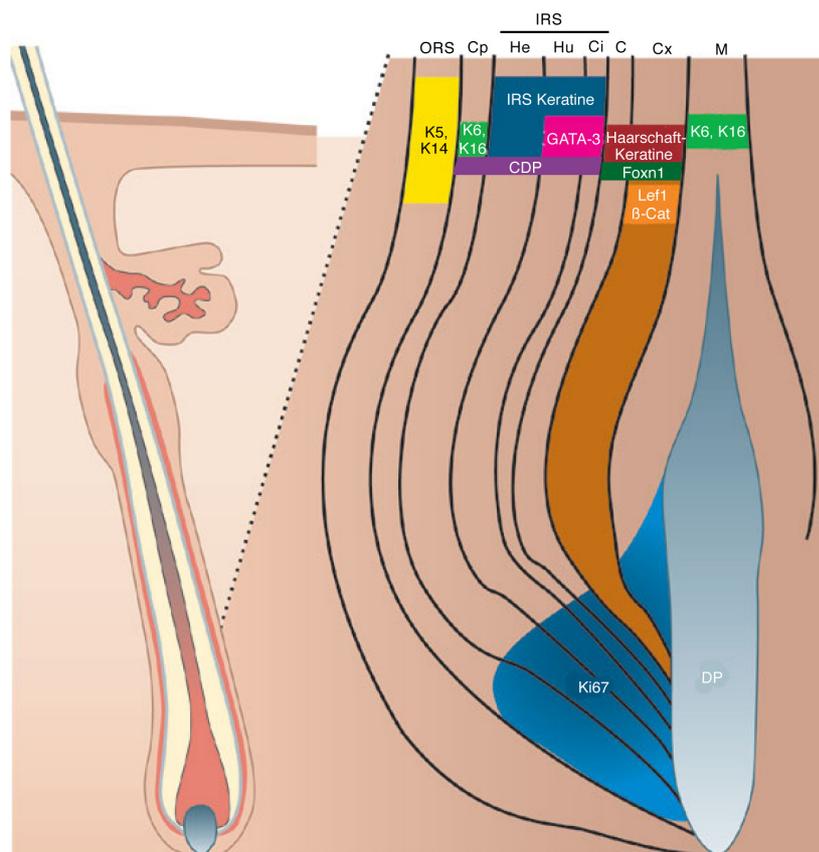


Abbildung 1-6: Schichtung des Haarfollikels und Expressionsmuster wichtiger Signalmoleküle und Keratine. Die proliferierenden Matrixzellen (blau, Ki67 positiv) sorgen für die Bildung der unterschiedlichen Haarfollikelschichten. Diese sind durch die spezifische Expression wichtiger Signalmoleküle und Keratine während der Differenzierung gekennzeichnet. β -Cat: β -Catenin, C: Cuticula, CDP: „CCAAT displacement“ Protein, Ci: Cuticula der inneren Haarwurzelscheide, Cx: Cortex, Cp: „Companion Layer“, DP: dermale Papille, He: Henle'sche Schicht, Hu: Huxley'sche Schicht, IRS: innere Haarwurzelscheide, M: Medulla, ORS: äußere Haarwurzelscheide [Fuchs, 2007 (modifiziert und übersetzt aus dem Englischen)]

Der Haarschaft von Mäusen besitzt einen leiterartigen Aufbau. Durch transmissions-elektronenmikroskopische Studien konnte gezeigt werden, dass mit Beginn der Differenzierung zunächst eine Vielzahl an Pseudopodien um die Oberfläche der Medullazellen entstehen, welche diese in einer ringförmigen Struktur umrahmen. Zur gleichen Zeit werden Mechanismen in Gang gesetzt, die für eine Ausdehnung dieser Strukturen in die Medulla sorgen und so zu einer Einschnürung der Medullazellen führen. Diese Bereiche werden anschließend durch Haarcortexkeratine aufgefüllt, um die Strukturen zu festigen. Zur gleichen Zeit entstehen Lücken an den Grenzen der benachbarten Medullazellen. Schließlich induzieren die Medullazellen den Zelltod und hinterlassen die typische leiterähnliche Struktur in der Medulla [Morioka, 2005; Morioka, 2009] (siehe Abb. 1-7). Informationen über mögliche Signalwege und Mechanismen, die die Ausbildung dieser Strukturen beeinflussen könnten, fehlen jedoch bisher.

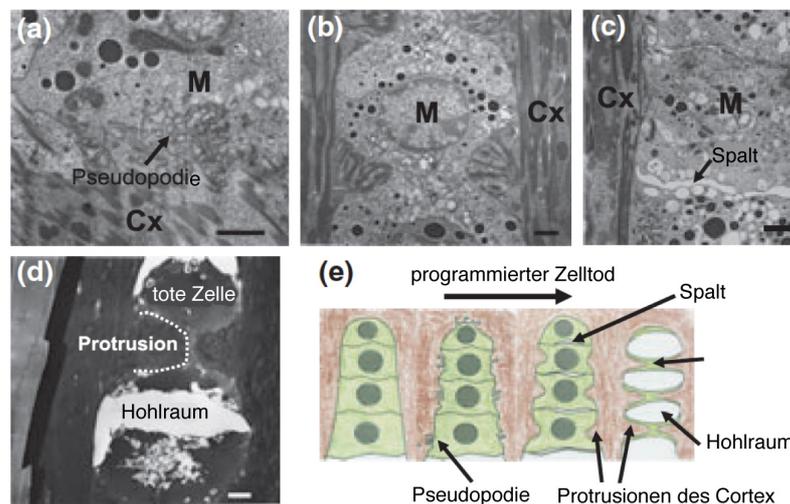


Abbildung 1-7: Strukturbildung des Haarschafts nach Morioka, 2009. Die Abbildung zeigt die fortschreitenden Stadien der Haarschaftstrukturbildung unter dem TEM (a-d, Skalierungsbalken: 1 µm) sowie eine schematische Zusammenfassung der Abläufe (e). M: Medulla, Cx: Cortex. [Morioka, 2009 (übersetzt aus dem Englischen)]

1.2.2.1 Ausbildung der unterschiedlichen Haartypen während der Morphogenese

Neben spezialisierten Haartypen, wie Tasthaaren und den Haaren im Bereich des Schwanzes von Mäusen, findet man im Körperfell vier verschiedene Haartypen: Guard-, Awl-, Auchene- und Zigzag-Haare. Sie unterscheiden sich durch den Zeitpunkt der Bildung der Haarfollikelanlagen sowie durch Länge und Struktur, wie Krümmungen des Haarschafts und Anzahl der entstandenen Medullasäulen [Sundberg, 1994]. Die Charakteristika der verschiedenen Haartypen sowie beispielhafte Darstellungen der Haare und typischer Haarschaftstrukturen wurden zur besseren Übersicht in Abbildung 1-8 zusammengefasst. Sie können zur Analyse möglicher Unterschiede in der Zusammensetzung der verschiedenen Haartypen herangezogen werden.

Die Struktur der verschiedenen Haartypen wird durch eine Reihe von Proteinen beeinflusst. Besonders gut charakterisiert sind hierbei die Proteine, die für die Krümmungen in den Zigzag-Haaren, das so genannte Haarschaft-„Bending“, verantwortlich sind. Zu diesen zählen die Proteine des IGF-Signalwegs IGF-1 und IGFBP5 [Schlake, 2005b; Weger & Schlake, 2005] sowie FGFR2-IIIb des FGF-Signalwegs [Petiot *et al.*, 2003; Schlake, 2005a] und der Transkriptionsfaktor Krox20, welcher vermutlich die Expression von IGFBP5 reguliert [Schlake, 2006]. Wie in Raveh *et al.*, 2006 dargestellt, zeigen Knockout-Mäuse des Runx1 Transkriptionsfaktors eine Störung der „Bending“-Strukturen. Auch Runx3 Knockout-Mäuse weisen Veränderungen in der Haarschaftstruktur auf [Raveh *et al.*, 2005]. Weiterhin beeinflusst die asymmetrische Expression von Shh, die Expression des Wnt-Antagonisten Dkk1 [Hammerschmidt & Schlake, 2007] sowie des Myc-bindenden Transkriptionsfaktors Miz1 die Ausbildung der Haarschaftstrukturen [Gebhardt *et al.*, 2007].

a	Guard (G)	Awl (Aw)	Auchene (Au)	Zigzag (Z)
	primäre Haaranlagen	sekundäre Haaranlagen		tertiäre Haaranlagen
Zeitpunkt der Induktion	Embryonaltag 14	Embryonaltag 16-17		Embryonaltag 18-Tag 1 p.p.
Länge (relativ zu Guard-Haaren)	1 (ca.1 cm)	1/2 bis 2/3		
Anzahl der Medullasäulen	2	2-4		1
Haarschaftkrümmungen („Bends“)	0	0	1	3-4
Frequenz	1-3%	30%	0,1%	65-70%

b

Abbildung 1-8: Charakteristika der verschiedenen Haartypen in Mäusen. (a) fasst tabellarisch die Charakteristika der verschiedenen Haartypen nach Sundberg, 1994 zusammen, (b) zeigt beispielhaft die Struktur von Guard-, Awl-, Zigzag- und Auchene-Haaren, wie sie sich unter dem Lichtmikroskop ergibt, sowie den strukturellen Aufbau der Medulla [Schlake, 2005a].

1.2.3 Zyklische Regeneration des Haarfollikels

Sowohl in menschlicher als auch in muriner Haut durchlaufen die Haarfollikel einen wiederkehrenden Prozess, der die Regeneration der Haarfollikel sowie die Bildung neuer Haarschäfte gewährleistet.

Im Anschluss an die Morphogenese beginnt in Mäusen ca. zwei Wochen nach der Geburt der erste Haarzyklus mit dem synchronen Eintritt in die Regressionsphase (Katagen).

Während dieser Phase erfolgt der graduelle Abbau des nicht-permanenten Teils des Haarfollikels. Dieser Prozess, bestehend aus Differenzierung und Apoptose, beinhaltet das Einstellen des Zellwachstums und der Pigmentbildung, das Entlassen der Zellen der dermalen Papille aus dem Haarbulbus, den Verlust der lagenartigen Differenzierung sowie den Abbau des inneren Teils des Follikels durch Induktion apoptotischer Prozesse [Lindner *et al.*, 1997; Stenn & Paus, 1999]. In der anschließenden Ruhephase (Telogen), die im ersten Haarzyklus bis ca. Tag 21 p.p. andauert, befinden sich die Haarfollikel im oberen bis mittleren Teil der Dermis. Die Keratinozyten der unteren Region des Telogen-Haarfollikels sind von ruhender Natur. Sie zeigen kaum DNA- oder RNA-Syntheseaktivität [Silver & Chase, 1970] und synthetisieren keine Proteine, wie Trichohyalin und Haarcortexkeratine [Bowden *et al.*, 1998]. Mit Einsetzen der nächsten Wachstumsphase (Anagen) beginnen die Zellen des verbleibenden Haarkeims erneut zu proliferieren und wachsen in die Dermis ein, um die dermale Papille zu umschließen [Müller-Röver *et al.*, 2001]. Die einzelnen Schritte des Haarzyklus sind in Abbildung 1-9 zusammengefasst.

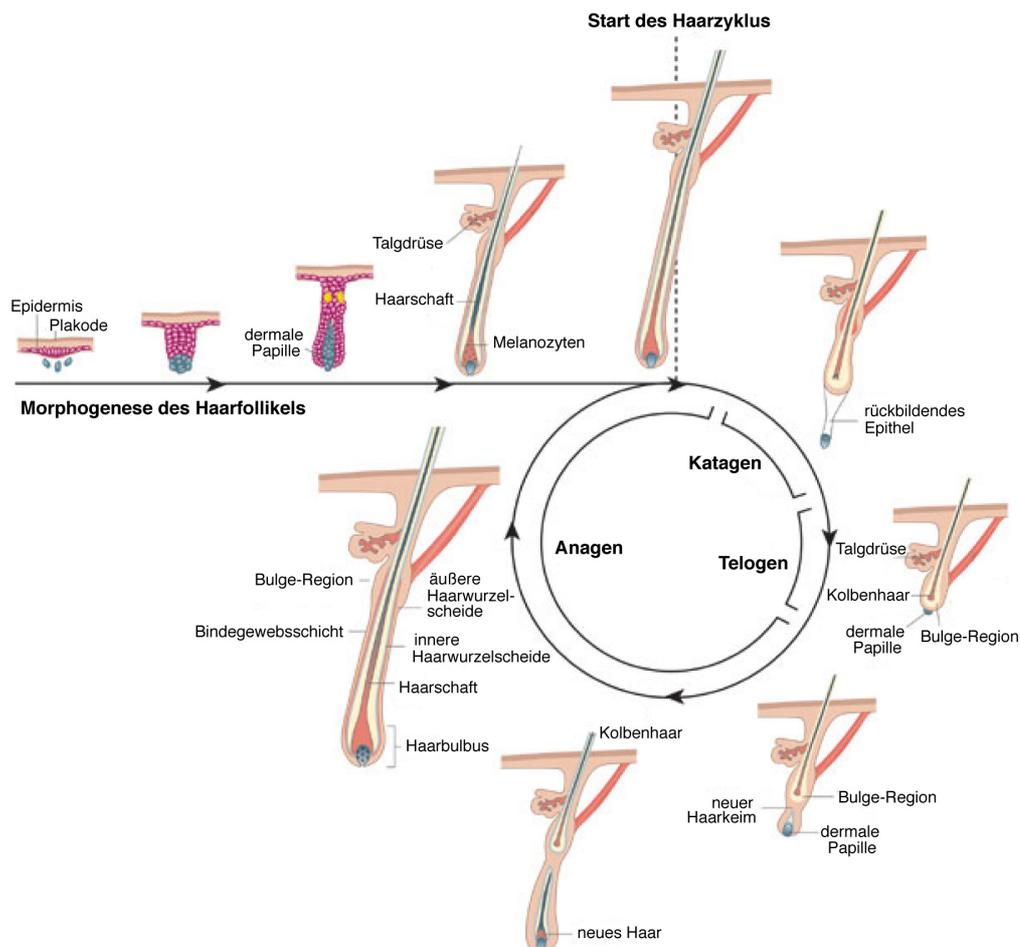


Abbildung 1-9: Phasen der zyklischen Regeneration der Haarfollikel. Im Anschluss an die Haarmorphogenese beginnt der erste postnatale Haarzyklus nach Ausbildung der Anagen-Haarfollikel mit dem synchronen Eintritt in die Katagenphase. Nach der folgenden Telogenphase treten die Haarfollikel dann erneut in die Anagenphase ein. [Fuchs, 2007 (modifiziert und übersetzt aus dem Englischen)]

Weist ein Haarfollikel irreversible Veränderungen auf, tritt dieser aus dem Haarzyklus aus. Der Haarfollikel wird dabei durch einen Angriff von inflammatorischen Zellen abgebaut. Die Eliminierung des Haarfollikels wird von Eichmüller *et al.*, 1998 mit dem Ausdruck „programmed organ deletion“ beschrieben.

1.2.3.1 Bedeutung der Stammzellen der Bulge-Region für die Haarfollikelbildung und Haarfollikelregeneration

„Label Retaining“⁵ Studien, die bereits in den 1990er Jahren durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass sich der größte Teil der „Label“-erhaltenden Zellen im Bereich der Bulge-Region befinden. Die Bulge-Region ist Teil der äußeren Haarwurzelscheide des Haarfollikels und ist im unteren Bereich des permanenten Teils des Haarfollikels unterhalb der Talgdrüsen lokalisiert [Cotsarelis *et al.*, 1990] (vgl. Abb. 1-9). Keratinozyten, die aus diesem Bereich des Haarfollikels isoliert und *in vitro* kultiviert worden sind, zeigen ein hohes proliferatives Potential [Morris & Potten, 1994]. Es wird daher angenommen, dass es sich bei dieser Population um Stammzellen des Haarfollikels handelt. Sie werden als multipotent angesehen, da sie in der Lage sind, nicht nur den Haarfollikel zu regenerieren, sondern auch Epidermis und Talgdrüsen zu bilden [Taylor *et al.*, 2000; Oshima *et al.*, 2001]. Während des Haarzyklus gewährleisten diese die Regeneration des nicht-permanenten Teils des Haarfollikels. Ein Mechanismus zur Regeneration des Haarfollikels wird durch die Bulge-Aktivierungshypothese beschrieben. Diese besagt, dass ein Teil der Bulge-Stammzellen zu Beginn einer Anagenphase durch Signale des mesenchymalen Anteils des Haarfollikels in der dermalen Papille aktiviert wird und sich zu teilen beginnt [Cotsarelis *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1994; Tumber *et al.*, 2004]. Es wird angenommen, dass diese bzw. ihre Tochterzellen entlang der äußeren Schicht des sich bildenden Haarfollikels in den Haarbulbus einwandern [Oshima *et al.*, 2001]. Sie bilden die Zellen der Haarmatrix, die sich schnell teilen und so für die Elongation des Haarfollikels verantwortlich sind [Cotsarelis *et al.*, 1990; Sun *et al.*, 1991]. Durch Differenzierung sorgen sie außerdem für eine Bildung der verschiedenen Haarfollikelzellschichten [Legue & Nicolas, 2005]. Ein weiteres Modell, welches basierend auf verschiedenen Studien von Panteleyev *et al.*, 2001 postuliert wurde, die so genannte Haar-Prädeterminationshypothese, schlägt einen Mechanismus vor, in dem durch die dermale Papille zunächst die Zellen des Haarkeims aktiviert werden, die ihrerseits für eine Aktivierung der Bulge-Zellen sorgen. Die Aktivierung des Haarkeims induziert daraufhin die Bildung der inneren Schichten des Haarfollikels, wohingegen die proliferierenden Zellen der Bulge-Region für die Bildung der äußeren Haarwurzelscheide verantwortlich sind.

⁵Epitheliale Zellen werden mit [³H]-gebundenem Thymidin markiert. Proliferierende Zellen verlieren durch Zellteilung die Markierung. Nur langsam teilende Zellen, von denen angenommen wird, dass diese Stammzellen sind, behalten die Markierung auch nach längerer Beobachtungszeit.

1.3 Melanozyten und Melanozytenvorläuferzellen in muriner Haut

Die aus der Neuralleiste stammenden Melanoblasten (Melanozytenvorläuferzellen) sind erstmals um Tag 8,5 bis 12 der Embryonalentwicklung bei Mäusen im Ektoderm und Mesoderm nachzuweisen. Die Einwanderung der Melanoblasten in die Haut erfolgt über den später die Dermis bildenden Teil des Mesoderms [Rawles, 1947]. Während Tag 12,5 bis 13,5 der Embryonalentwicklung überwinden die Melanoblasten die Basalmembran und wandern aus der Dermis in die Epidermis ein [Mayer, 1973; Hirobe, 1992; Kunisada *et al.*, 1998]. Ungefähr zur gleichen Zeit beginnen sie mit der Synthese erster Melanosomen. An Tag 16 der Embryonalentwicklung differenzieren sie schließlich zu reifen Melanozyten [Hirobe, 1984]. Sobald sich um Tag 15 der Embryonalentwicklung die ersten Haarkeime bilden, wandern die Melanoblasten der Epidermis in die wachsenden Haarfollikel hinein [Hirobe, 1984], wobei nur wenige Melanoblasten und Melanozyten in der Epidermis verbleiben [Reynolds, 1954]. Die follikulären Melanoblasten lokalisieren sich schließlich in der Haarmatrix und beginnen dort um Tag 16 in reife Melanozyten zu differenzieren [Yoshida *et al.*, 1996; Nishimura *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 2002; Botchkareva *et al.*, 2003]. In den letzten Jahren wurde durch Kunisada *et al.*, 1998 und Nishimura *et al.*, 2002 jedoch gezeigt, dass die Lokalisation der Melanozyten reversibel ist und sie unter bestimmten Voraussetzungen in der Lage sind, wieder in andere vorhandene „leerstehende“ Nischen wie die Epidermis einzuwandern.

In einem voll ausgebildeten Anagen-Haarfollikel befinden sich reife Melanozyten hauptsächlich in der Haarmatrix, wo sie in der Nähe der dermalen Papille lokalisiert sind [Hirobe, 1995]. Die aktive Melanogenese ist stark vom Haarzyklus abhängig. So synthetisieren die reifen Melanozyten des Haarbulbus ausschließlich während dieser Phase Melaningranula [Slominski *et al.*, 1991; Slominski & Paus, 1993], die sie über ihre Dendriten an die umgebenden Keratinozyten abgeben und so für eine Pigmentierung des Haarschafts sorgen. Die Melanogenese findet in speziellen Lysosom-ähnlichen Zellorganellen, den Melanosomen, statt. Man unterscheidet Melanosomen, die Eumelanin (bräunlich-schwarz) bilden, und solche, die Phäomelanin (gelblich-rötlich) synthetisieren [Ito, 1993]. Die Synthese des Melanins erfolgt durch eine Tyrosinase-abhängige enzymatische Oxidation der Aminosäure L-Tyrosin zunächst zu L-DOPA und Dopachinon, welches in einem späteren Schritt über verschiedene Reaktionen für Eu- und Phäomelanin zu Melanin polymerisiert [Land & Riley, 2000]. Mit Ende der Anagenphase stoppt die Melaninproduktion, und die Melanozyten verlieren ihre Dendriten. Mit Eintreten in die Katagenphase sterben die Melanozyten in der Haarmatrix durch Induktion apoptotischer Prozesse ab [Tobin *et al.*, 1998]. In der Katagenphase können keine Melanozyten im Haarfollikel nachgewiesen

werden [Tobin *et al.*, 1998], wohingegen in der anschließenden Telogenphase unpigmentierte Melanozytenvorläuferzellen wieder im Bereich der dermalen Papille detektiert werden können [Silver *et al.*, 1969]. Es wird angenommen, dass es sich bei dieser Zellpopulation, die im unteren Bereich des permanenten Teils des Telogen-Haarfollikels lokalisiert ist, um Melanozytenstammzellen handelt [Nishimura *et al.*, 2002]. Nach Induktion der nächsten Anagenphase beginnen sie zu proliferieren und wandern zur dermalen Papille und in die Haarmatrix ein, wo sie sich weiter teilen und zu reifen Pigment-produzierenden Melanozyten differenzieren [Nishimura *et al.*, 2002]. Ein Verlust dieser Melanozytenstammzellpopulation in der Bulge-Region resultiert in einem Ergrauen der Haare in den folgenden Haarzyklen [Nishimura *et al.*, 2005], was die Wichtigkeit dieser Zellen für die Regenerierung der Melanozytenpopulationen im Haarbulbus und die Pigmentierung des Haares demonstriert.

1.4 Struktur und Funktion von kleinen GTPasen

Die Superfamilie der kleinen GTP-bindenden Proteine (G-Proteine) umfasst in Eukaryonten mehr als 100 Mitglieder, die aufgrund struktureller und funktioneller Unterschiede in fünf verschiedene Familien unterteilt werden: Ras, Rho, Sar1/Arf, Ran und Rab GTPasen [Bourne *et al.*, 1990]. Die Ras-Familie reguliert hauptsächlich die Genexpression, wohingegen die Mitglieder der Rho-Familie vorwiegend eine Funktion in der Reorganisation des Zytoskeletts übernehmen. Die Mitglieder der Rab und Sar1/Arf Unterfamilien regulieren den interzellulären Vesikeltransport, die GTPasen der Ran-Familie, den nukleozytoplasmatischen Transport und die Mikrotubuli-Organisation während des Zellzyklus [Takai *et al.*, 2001].

1.4.1 Familie der Rho-GTPasen

Zur Familie der Rho-GTPasen in Säugetieren zählen mindestens 22 verschiedene Mitglieder, die aufgrund ihrer Aminosäure-Sequenzidentität, Struktur und biologischer Funktion in sechs Untergruppen unterteilt werden: RhoA-ähnliche, Rac-ähnliche, Cdc42-ähnliche GTPasen sowie die Rnd-, RhoBTB -und Miro-Unterfamilien.

Zu den RhoA-ähnlichen Mitgliedern gehören RhoA, RhoB und Rho, zu der Familie der Cdc42-ähnlichen GTPasen zählen Cdc42 (inklusive der gehirnspezifischen Spleißvariante G25K), TC10, TCL, Chp/Wrch-2 sowie Wrch-1. Die Rnd-Unterfamilie umfasst Rnd1, Rnd2 und RhoE/Rnd3, die RhoBTB-Unterfamilie die Mitglieder RhoBTB-1 bis -3 sowie die erst 2004 beschriebene Miro-Unterfamilie Miro-1 und -2. Zur Rac-ähnlichen Unterfamilie zählen

Rac1 (mit seiner Spleißvariante Rac1b), Rac2, Rac3 und RhoG. Des Weiteren existieren Mitglieder der Rho-GTPasen, die nicht den beschriebenen Unterfamilien zugeordnet werden, wie RhoD, Rif und TTF/RhoH [Wennerberg & Der, 2004].

1.4.2 Struktur von Rho-GTPasen

Mitglieder der Familie der Rho-GTPasen zeigen bis auf wenige Ausnahmen einen ähnlichen Aufbau (siehe Abb. 1-10). Generell umfassen sie nur 190 bis 250 Aminosäuren (AS), jedoch können bestimmte atypische Mitglieder, wie RhoBTB- oder Miro-Proteine, zusätzliche Domänen aufweisen, die für eine Länge von mehr als 700 Aminosäuren verantwortlich sind.

Alle Rho-GTPasen sind charakterisiert durch eine Rho-Insert-Domäne [Valencia *et al.*, 1991]. Weiterhin besitzen sie zwei Domänen, die an der GTP-GDP-Bindung und der GTP-Hydrolyse-Reaktion beteiligt sind, Switch I und II genannt [Vetter & Wittinghofer, 2001]. Diese umrahmen die Effektorbindedomäne. C-terminal folgend besitzen sie eine hypervariable Region, die bei den unterschiedlichen Mitgliedern stark variiert, sowie eine CAAX-Box, die posttranslational modifiziert wird. Dabei wird nach proteolytischer Entfernung der AAX Residuen der C-terminalen CAAX Domäne (C = Cystein, A = aliphatische AS, X = beliebige AS) und anschließender Carboxymethylierung ein hydrophober Lipidrest hinzugefügt, um eine Verankerung in der Zellmembran zu ermöglichen [Glomset & Farnsworth, 1994]. Die posttranslationale Modifikation des C-Terminus ist außerdem wichtig für die Aktivierung und subzelluläre Lokalisation der Rho-GTPasen (siehe Abschnitt 1.4.4).



Abbildung 1-10: Domänenstruktur der Rho-GTPasen. Der Großteil der Rho-GTPasen besteht aus zwei Domänen, die an der GTP-GDP-Bindung beteiligt sind, Switch I und II (grün), einer Effektorbindedomäne (blau), einer Rho-Insert-Domäne (violett) sowie einer C-terminalen hypervariablen Region (orange) und einer CAAX-Box (rot). [nach Vega & Ridley, 2008]

1.4.3 Funktion der Rho-GTPasen

Die Funktionen der Rho-GTPasen sind in verschiedenen Organismen von Hefen und Pflanzen bis hin zu Würmern und Säugetieren evolutionär konserviert. Sie sind an einer Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Prozesse beteiligt, die sich aus der Bindung an verschiedenste nachgeschaltete Effektorproteine ergeben. Am besten charakterisiert sind deren Effekte auf das Aktinzytoskelett. Sie sind jedoch ebenfalls an der Regulation der Zelladhäsion, der Zellpolarität, des Mikrotubulizytoskeletts, des Membrantransports oder der

Aktivität von Transkriptionsfaktoren beteiligt. Zudem spielen sie eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus und der ROS-Produktion. Außerdem sind sie an einer Reihe von pathologischen Prozessen, wie der Migration von Krebszellen, Invasion, Metastasierung, Entzündungsreaktionen und der Wundheilung beteiligt [zusammengefasst in Etienne-Manneville & Hall, 2002; Heasman & Ridley, 2008]. Auf spezielle Funktionen der kleinen Rho-GTPase Rac1 wird in Abschnitt 1.5.1.1 eingegangen.

1.4.4 Zyklische Aktivierung von Rho-GTPasen

Rho-GTPasen fungieren als molekulare Schalter in komplexen Signalkaskaden. Abhängig von der Bindung von GTP oder GDP ändern sie ihre Konformation und wechseln zyklisch zwischen ihrer aktiven und inaktiven Form [Takai *et al.*, 2001]. Liegt die GTPase in der GTP-gebundenen Form vor, spricht man von der aktiven Form, bei der GDP-gebundenen von der inaktiven. Die einzelnen Schritte der Aktivierung der GTPasen sind in Abbildung 1-11 schematisch dargestellt.

Der Austausch von GTP bzw. GDP wird durch Regulatoren der kleinen GTPasen wie GEFs („guanine nucleotide exchange factors“) und GAPs („GTPase-activating proteins“) beeinflusst. Eine Aktivierung der kleinen GTPasen erfolgt vornehmlich durch Interaktion der Switch I- und II-Region mit GEFs, die für eine Konformationsänderung der GTPase sorgen, die die Bindung des energiereichen GTP begünstigt und das energieärmere GDP aus der Bindung entlässt [Van Aelst & D'Souza-Schorey, 1997; Kjoller & Hall, 1999]. Die so aktivierte GTPase durchläuft eine Veränderung der Effektorbindedomäne, so dass sie in der Lage ist, an nachgeschaltete Targetproteine zu binden und diese zu aktivieren. Eine Inaktivierung der GTPase erfolgt durch die intrinsische Hydrolyse-Aktivität der GTPasen. Da diese jedoch schwach ist, wird sie durch GAPs verstärkt, die den Übergangszustand der Hydrolysereaktion stabilisieren, und dadurch die Hydrolyserate enorm erhöhen [Lamarche & Hall, 1994; Ahmadian *et al.*, 1997 Moon & Zheng, 2003]. Für Mitglieder der Rho- und Rab-Unterfamilien ist die Regulation durch zytosolische GDIs („guanine nucleotide dissociation inhibitors“) zusätzlich von Bedeutung. GDIs blockieren die Aktivierung der GTPasen, indem eine Interaktion mit GEFs und Effektorproteinen unterbunden und die GDP-gebundene GTPase von der Zellmembran weg ins Zytoplasma transloziert wird [Olofsson, 1999]. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden in Säugetieren über 70 Rho-GEFs, 60 Rho-GAPs und 3 Rho-GDIs identifiziert, die die Aktivität der Rho-GTPasen regulieren.

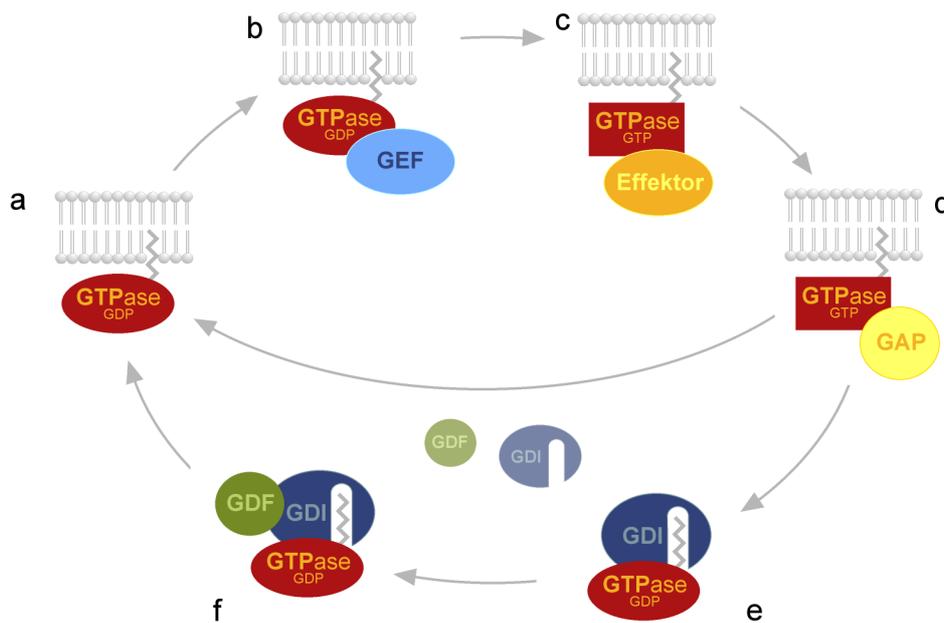


Abbildung 1-11: Zyklische Regulation der Aktivität kleiner Rho-GTPasen. Die inaktive Membran lokalisierte GTPase (a) bindet an einen GEF (b), der für den Austausch von GDP gegen GTP sorgt. Die aktivierte GTPase (c) kann spezifische Effektormoleküle binden und eine bestimmte zelluläre Antwort auslösen. Die Inaktivierung der GTPase erfolgt über Bindung an ein GAP-Molekül (d). Im GDP-gebundenen Zustand kann ein GDI an die GTPase binden und diese zytosolisch lokalisieren (e). Die Dissoziation dieses Komplexes wird durch GDI-Dissoziationsfaktoren (GDF) katalysiert (f). [Quelle: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/bb/Ral_-_GTPase_cycle.png]

Zusätzlich kann die Aktivierung kleiner GTPasen auch durch Regulation der subzellulären Lokalisation erfolgen, welche von besonderer Wichtigkeit für Prozesse ist, die den Aufbau einer Zellpolarität erfordern, wie Migration und Zellteilung. Durch posttranslationale Modifikation der C-terminalen CAAX Domäne wird ein hydrophober Lipidrest (bei Rac1 Geranylgeranyl-Rest) hinzugefügt, um eine Verankerung in der Zellmembran zu ermöglichen. Diese Modifikation dient des Weiteren zur Bindung an die GDI. Beide Mechanismen arbeiten zusammen, um eine gezielte Aktivierung und Lokalisation der GTPasen zu gewährleisten.

Konstitutiv aktive Mutanten, wie zum Beispiel RasV12, Cdc42V12, RacL61 und RhoV14, besitzen eine Konformation, die einem permanent GTP-gebundenen Zustand entspricht. Dominant negative Mutanten, wie zum Beispiel RasN17, Cdc42N17 und RacN17, weisen eine niedrige Affinität zu GTP, jedoch eine hohe Affinität zu GEF-Proteinen auf und hemmen dadurch die Signalkaskaden der endogenen Proteine [Ridley *et al.*, 1992].

1.5 Beschriebene Isoformen von Rac

Die Bezeichnung Rac, „ras-related C3 botulinum toxin substrate“, wurde ursprünglich von dessen Vermögen zur Bindung an das Exoenzym C3 von *Clostridium botulinum* abgeleitet. Bisher sind drei verschiedenen Isoformen von Rac in der Literatur beschrieben worden, die mit Rac1 bis 3 bezeichnet werden. Sie unterscheiden sich durch ihre individuellen Expressionsmuster: Rac1 wird ubiquitär exprimiert [Didsbury *et al.*, 1989], wohingegen die Expression von Rac2 auf das hämatopoetische System [Shirsat *et al.*, 1990] und die von Rac3 vornehmlich auf das Nervensystem beschränkt sind [Haataja *et al.*, 1997]. Trotz der unterschiedlichen Expressionsmuster besitzen sie eine Sequenzidentität von 88% auf der Aminosäureebene, wobei Abweichungen hauptsächlich im Bereich der letzten 15 Aminosäuren des C-Terminus zu finden sind.

Im Jahr 2000 wurde eine zusätzliche Variante von Rac1 beschrieben, deren Expression hauptsächlich mit verschiedenen Krebsformen der Brust und des Kolons assoziiert ist [Jordan *et al.*, 1999; Schnelzer *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2004]. Durch ein verändertes Spleißen besitzt Rac1b 19 zusätzliche Aminosäuren, die im Anschluss an die Switch II-Region eingeschoben wurden. Diese ist sowohl für die Konformationsänderungen während des GTP/GDP-Zyklus als auch für die Bindung von regulatorischen Molekülen und Effektormolekülen von Bedeutung [Vetter & Wittinghofer, 2001]. Durch den Aminosäure-Einschub in diesem Bereich entsteht ein Protein mit Eigenschaften, die einem konstitutiv aktiven Protein ähneln, wie eine gesteigerte intrinsische Guanin-Nukleotid-Austauschrate, eine verminderte intrinsische GTPase-Aktivität [Fiegen *et al.*, 2004] sowie eine Blockierung der GDI-Bindung [Matos *et al.*, 2003]. Die Funktion von Rac1b unter homöostatischen Bedingungen ist bisher nur wenig untersucht. Matos & Jordan, 2005 haben jedoch gezeigt, dass Rac1b in Mausfibroblasten über einen NF κ B-abhängigen Mechanismus die G1/S-Zellzyklusprogression vorantreibt und für ein erhöhtes Zellüberleben verantwortlich ist.

1.5.1 Rac1

Die ubiquitär exprimierte Rho-GTPase Rac1 wurde erstmals von Didsbury *et al.*, 1989 im Jahr 1989 beschrieben. Das murine *rac1* Gen, auf dem der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt, ist auf Chromosom 5 lokalisiert und besteht aus sechs kodierenden Exons, wobei das Startcodon in Exon 1 liegt. Das murine *rac1* Gen erstreckt sich über eine Länge von 22,55 kbp. Das resultierende Rac1 Protein besitzt eine Größe von 21 kDa und zeigt die in Abbildung 1-10 dargestellte klassische Proteinstruktur von Rho-GTPasen.

Durch Interaktion mit verschiedenen Effektormolekülen übt Rac1 eine essentielle Rolle in einer Vielzahl verschiedenster physiologischer Prozesse aus. Neben der Regulation der

Aktinzytoskelett-Organisation [Ridley *et al.*, 1992] spielt Rac1 auch eine Rolle in der Progression des Zellzyklus [Olson *et al.*, 1995], der Aktivierung der JNK- und p38-MAPK-Signalwege [Coso *et al.*, 1995; Minden *et al.*, 1995], der Regulation der NADPH-Oxidase-Aktivität [Diekmann *et al.*, 1994], die für die Superoxidproduktion verantwortlich ist, und der Aktivierung von NF κ B [Perona *et al.*, 1997]. Zusätzlich sind Rac1-abhängige Signale an der Regulation von „Tight Junctions“ [Jou *et al.*, 1998; Mertens *et al.*, 2005], Cadherin-abhängigen Zell-Zell-Kontakten [Braga *et al.*, 1997; Takaishi *et al.*, 1997; Braga *et al.*, 1999; Braga *et al.*, 2000], Integrin-abhängiger Zell-Matrix-Adhäsion [Hotchin & Hall, 1995; Price *et al.*, 1998] und der Ausbildung der Zellpolarität [O'Brien *et al.*, 2001] verantwortlich.

1.5.1.1 Funktionen von Rac1 in epithelialen Zellen

1.5.1.1.1 Bedeutung von Rac1 für die Ausbildung der Zellmorphologie

Die am besten charakterisierte Funktion von Rac1 ist die Regulation des Aktinzytoskeletts, wodurch die Morphologie der Zellen, also die Zellform, maßgeblich beeinflusst werden kann. Rac1 besitzt einen entscheidenden Einfluss auf die Dynamik des Zytoskeletts, indem es mit WAVE-Proteinen interagiert und dadurch den Arp2/3-Komplex aktiviert. Die Aktivierung dieses Komplexes induziert im Anschluss die Aktin-Polymerisation [Ten Klooster *et al.*, 2006]. Dadurch wird die Bildung neuer Aktin-Abzweigungen induziert. Rac1 aktiviert die WAVE-Proteine über einen indirekten Mechanismus, der über die Interaktion mit dem WAVE-Multiprotein-Komplex erfolgt [Suetsugu *et al.*, 2006]. Rac1 reguliert weiterhin die Aktivität der LIM-Kinase über seinen Effektor PAK1, wodurch die Polymerisation von Aktin und die korrekte Ausbildung eines Aktin-Netzwerks vorangetrieben wird [Arber *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998]. Die Rho-GTPasen-vermittelte Nukleation und Polymerisation von Aktin ist an der Ausbildung von Protrusionen der Plasmamembran beteiligt. Rac1 induziert dabei vornehmlich die Bildung von Lamellipodien und „Ruffles“ [Ridley *et al.*, 1992; Nobes & Hall, 1995b; Kaibuchi *et al.*, 1999], die sich während der Migration von Zellen an der Vorderseite der sich bewegenden Zellen bilden. In diesem Bereich kann auch die größte Menge an aktiviertem, GTP-gebundenem Rac1 nachgewiesen werden [Kraynov *et al.*, 2000], was wiederum die Wichtigkeit der Aktivität von Rac1 für die Ausbildung dieser Strukturen verdeutlicht.

Epitheliale Zellen sind über spezialisierte adhäsive Strukturen miteinander verbunden, die mit Intermediärfilamenten (Desmosomen) oder Mikrofilamenten (Adhärenzverbindungen oder „Tight Junctions“) verknüpft sind. Die Verbindung mit dem Zytoskelett ermöglicht eine stabile Zelladhäsion und eine Beeinflussung der Zellmorphologie. Durch Analyse von Mauskeratinozyten konnte gezeigt werden, dass während der Ausbildung von Zell-Zell-

Kontakten Zellfortsätze von benachbarten Zellen ausgebildet werden, welche die treibende Kraft für die Ausbildung stabiler Zellkontakte zu sein scheinen [Vasioukhin *et al.*, 2000]. Die Ausbildung der Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kontakte wird dabei vermutlich durch die Penetration von benachbarten Zellen mit Rac1-regulierten Lamellipodien reguliert [Betson *et al.*, 2002; Malliri *et al.*, 2004] und wird primär über die Interaktion mit dem Effektorprotein IQGAP1 ausgeübt [Fukata *et al.*, 1999]. In verschiedenen epithelialen Zelltypen wurde in *in vitro* Analysen gezeigt, dass eine Aktivierung von Rac1 in einer Akkumulation von polymerisiertem Aktin und E-Cadherin an Bereichen von Zell-Zell-Kontakten resultiert [Eaton *et al.*, 1995; Hordijk *et al.*, 1997; Takaishi *et al.*, 1997]. Eine Hemmung der Rac1-Aktivität *in vitro* führt zu einer Hemmung der Ausbildung von Adhärenzverbindungen [Braga *et al.*, 1997; Takaishi *et al.*, 1997].

Lindqvist *et al.*, 2010 konnten außerdem zeigen, dass Vang-like 2 die Verteilung von Rac1 in epithelialen Zellen bei Bildung von Adhärenzverbindungen durch Reorganisation des Aktinzytoskeletts reguliert. Weiterhin wurde durch verschiedene Arbeiten gezeigt, dass ein „Clustering“ von E-Cadherin zu einer Aktivierung von Rac1 führt [Nakagawa *et al.*, 2001; Noren *et al.*, 2001; Betson *et al.*, 2002], wodurch eine Art Feedback-Mechanismus bei der Regulation der Adhärenzverbindungen wahrscheinlich ist. Ein Verlust der Zelladhäsion kann eine Induktion apoptotischer Prozesse in den Zellen zur Folge haben. Dies wurde bereits für MEFs gezeigt, die nach Rac1-Deletion vermehrt in Apoptose gingen [Guo *et al.*, 2006]. Auch eine Inhibierung von Cadherin-Interaktionen in Brustepithelzellen führte zu einem Anstieg der Apoptose in diesen Zellen [Arulanandam *et al.*, 2009]. Wie He *et al.*, 2010 gezeigt haben, ist eine Expression von Rac1 außerdem essentiell, um ein Überleben von Epiblasten, die an der Basalmembran haften, zu gewährleisten. Dabei spielen Integrin-vermittelte Mechanismen sowie eine Aktivierung der PI3K eine Rolle. Rac1 ist außerdem für die Formation Laminin-vermittelter basolateraler Kontakte in Epithelien von Bedeutung [O'Brien *et al.*, 2001].

Auch die Bildung von „Tight Junction“-Kontakten ist abhängig von Rac1, denn wie Jou *et al.*, 1998 und Bruewer *et al.*, 2004 gezeigt haben, führt eine Hemmung oder Aktivierung von Rac1 zu einer Störung der Kontakte durch Veränderungen der basalen und apikalen F-Aktin-Strukturen und einer Umverteilung von „Tight Junction“-Proteinen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein exaktes Ausbalancieren der Rac1-Aktivität für den Erhalt der zellulären Barrieren von Bedeutung ist. Der Aufbau dieser Zellverbindungen ist in Keratinozyten von der Assoziation mit und der Aktivierung des Par3-Par6-aPKC-Polaritätskomplexes abhängig [Mertens *et al.*, 2005].

Die Ausbildung von Asymmetrien stellt einen wichtigen Schritt in der Ausbildung der Zellgestalt in einer Vielzahl von tierischen Zellen dar. Dies wird besonders in der Entwicklung

und dem Wachstum von Neuronen deutlich. Rac1 reguliert dort den Aufbau von Aktinfilamenten in den Membranausstülpungen und das polarisierte Wachstum der Neuriten [Luo, 2000; Ozdinler & Erzurumlu, 2001]. Es wird angenommen, dass Rac1 durch Interaktion mit der Basalmembran über β 1-Integrin die Ausbildung der Zellpolarität in epithelialen Zellen reguliert [Yu *et al.*, 2005] und so die Ausbildung einer komplexen gewebsabhängigen Polarität („planar cell polarity“) beeinflusst [Munoz-Descalzo *et al.*, 2007]. Durch seinen Einfluss auf Laminin-vermittelte basolaterale Kontakte ist Rac1 weiterhin an der Ausbildung der apikalen Polarität von Epithelien beteiligt [O'Brien *et al.*, 2001]. In epithelialen Zellen ist zudem der Par3-Par6-aPKC-Polaritätskomplex durch dessen spezifische apikale Lokalisation an der Ausbildung der Zellpolarität (Bildung einer apikalen und basolateralen Domäne) beteiligt [Gibson & Perrimon, 2003], die einen entscheidenden Einfluss auf die Zellmorphologie besitzt. Es wurde gezeigt, dass der Rac-Aktivator Tiam1 sowohl die Bildung der „Tight Junctions“ reguliert als auch die Zellpolarität beeinflusst [Mertens *et al.*, 2005; Mertens *et al.*, 2006]. Der Par3-Par6-aPKC-Polaritätskomplex ist außerdem für die asymmetrische Zellteilung von Bedeutung, von der angenommen wird, dass sie wichtig für die Teilung von Stammzellen in differenzierte Tochterzellen ist [Lechler & Fuchs, 2005]. Es wäre interessant, zu überprüfen, ob eine Beeinflussung des Par3-Par6-aPKC-Komplexes durch Rac1 während der asymmetrischen Zellteilung einen Einfluss auf den in 1.5.1.1.2 beschriebenen Stammzellphänotyp der Rac1 E-KO Mäuse hat. Möglicherweise könnten jedoch auch Veränderungen im Zellzyklus der Stammzellen den Phänotyp ausgelöst haben. Es ist beschrieben, dass die Expression von Rac1 in ruhenden Fibroblasten einen Eintritt in die G1-Phase des Zellzyklus und eine Zellzyklus-Progression in die S-Phase forciert, wohingegen eine Inhibierung von Rac1 ein Fortschreiten des Zellzyklus nach Serumzugabe unterbindet [Olson *et al.*, 1995].

1.5.1.1.2 Bedeutung von Rac1 für die Haarfollikelstammzellen

Im Haarfollikel sind in der Bulge-Region Stammzellen lokalisiert, die für eine kontinuierliche Regeneration des nicht-permanenten Teils des Haarfollikels verantwortlich sind. Eine epitheliale Depletion von Rac1 konnte durch verschiedene Studien mit einem Verlust des Bulge-Stammzellkompartiments assoziiert werden. Benitah *et al.*, 2005 und Benitah & Watt, 2007 haben gezeigt, dass eine Deletion von Rac1 in der Epidermis und dem Haarfollikel zu einer Stimulation der Zellteilung und einer vorzeitigen Differenzierung der Stammzellen führt. Sie postulieren einen Mechanismus, in dem Rac1 durch Phosphorylierung von PAK2 eine negative Regulation auf c-Myc ausübt und so für den Erhalt der epidermalen und Haarfollikelstammzellen sorgt. Im Gegensatz zu Benitah *et al.*, 2005, die eine Funktion von Rac1 in der Aufrechterhaltung der Haarfollikel, der IFE und der Talgdrüsen beschrieben

haben, haben Castilho *et al.*, 2007 wie auch Chrostek *et al.*, 2006, gezeigt, dass Rac1 keine Bedeutung für die Stammzellfunktion in der IFE besitzt und die Deletion von Rac1 keine Veränderungen in der Bildung und Differenzierung der IFE nach sich zieht. Die Diskrepanz in der Funktion von Rac1 in der Epidermis kann auf die verschiedenen Mausmodelle zurückgeführt werden, die verwendet wurden. Analysen meiner Arbeitsgruppe und anderer haben jedoch gezeigt, dass Stammzellen der IFE primär während Regenerationsprozessen der Haut, wie z.B. der Wundheilung, eine Funktion zukommt und sie eher eine untergeordnete Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase spielen. So zeigten Verwundungsexperimente nach Epidermis-spezifischer Deletion von Rac1 oder Hemmung der Rac1-Funktion eine Verzögerung in der epidermalen Wundheilung *in vivo* und in Wundheilungsassays *in vitro* [Tschardt *et al.*, 2007; Castilho *et al.*, 2010].

1.6 Mausmodelle mit Mutation von Rac1

In der Literatur sind bisher einige gentechnisch veränderte Rac1 Mausmodelle charakterisiert worden. Diese wurden von Wang & Zheng, 2007 zusammengefasst. Ein kompletter Rac1-Knockout resultiert in embryonaler Letalität, bedingt durch die Induktion apoptotischer Prozesse in den Epiblasten sowie durch Defekte in der Zelladhäsion [Sugihara *et al.*, 1998]. Des Weiteren existieren Mausmodelle, in denen die Funktion von Rac1 vor allem in Immunzellen durch Nutzung von LysM-Cre für Makrophagen und Granulozyten oder CD19-Cre für B-Lymphozyten untersucht wurde [Glogauer *et al.*, 2003; Walmsley *et al.*, 2003]. In den letzten Jahren wurden zudem mehrere Mausmodelle charakterisiert, in denen Rac1 in der Haut unter der Kontrolle von sowohl konstitutiven als auch induzierbaren K14-Cre und K5-Cre-Konstrukten deletiert wurde [Benitah *et al.*, 2005; Benitah & Watt, 2007; Castilho *et al.*, 2007]. In all diesen Mausmodellen resultiert die Deletion von Rac1 in der Epidermis in einer Depletion der Stammzellen des Haarfollikels. Die Rolle von Rac1 für die Stammzellen der IFE wird jedoch kontrovers diskutiert [Benitah & Watt, 2007; Castilho *et al.*, 2007] (vgl. Abschnitt 1.5.1.1.2).

Im Folgenden soll nun lediglich auf die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mausmodelle eingegangen werden. In Abschnitt 1.6.1 wird die in unserer Arbeitsgruppe generierte N17Rac1 transgene Maus, welche durch eine K14-Promotor-vermittelte Expression eines dominant negativen Rac1 gekennzeichnet ist, vorgestellt und in Abschnitt 1.6.2 werden die phänotypischen Veränderungen der von Chrostek *et al.*, 2006 beschriebenen Rac1 E-KO Mäuse näher beschrieben, da deren Rac1 geflochten Mäuse in den hier beschriebenen Untersuchungen Verwendung fanden.

1.6.1 Dominant negative N17Rac1 transgene Mäuse

Dominant negative N17Rac1 transgene Mäuse wurden bereits in Tschardt *et al.*, 2007 beschrieben. Dort wurde besonders die Funktion von einem dominant negativen Rac1 in der epithelialen Wundheilung untersucht. Die dargestellten Analysen zeigen eine verzögerte Re-Epithelialisierung der Wunden nach epidermaler Deletion von Rac1, welche sowohl auf einen Proliferationsdefekt der Keratinozyten an den Wundrändern als auch auf einen Migrationsdefekt der neo-epidermalen Keratinozyten zurückgeführt werden kann.

Die Punktmutante N17Rac1 wurde durch Ersatz der Aminosäure Serin gegen Asparagin an der Stelle 17 generiert, wodurch ein Protein entsteht, welches Eigenschaften einer dominant negativen Mutante aufweist. Diese Punktmutante wurde in eine Keratin 14-Expressionskassette eingeführt. Das resultierende N17Rac1 Transgen (TG) besitzt den in Abbildung 1-12a dargestellten Aufbau. Es besteht aus einem trunkierten humanen K14-Cre Promotor, dem mutierten Rac1 mit vorgelagerter Kozak-Sequenz und einem Myc-Tag sowie einer folgenden SV40 Poly-A-Sequenz. Der mittlere N17Rac1 enthaltende Teil kann durch Verdauung mit XbaI und ClaI aus der Expressionskassette isoliert werden.

Die Expression des N17Rac1 TGs auf genomischer Ebene wurde durch PCR nach Schwanzspitzenbiopsie als auch durch eine Analyse der DNA im Southern Blot nachgewiesen (Abb. 1-12b), wobei die in Abbildung 1-12a markierten Bereiche detektiert wurden. Der Nachweis der Expression des Konstrukts auf Proteinebene durch Detektion des enthaltenen Myc-Tags in primären Keratinozyten im Western Blot zeigte eine Expression des Konstrukts in den transgenen Keratinozyten, wohingegen in den Kontrollzellen das Konstrukt nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 1-12d). Die Lokalisation des Konstrukts *in vivo* durch Fluoreszenzfärbung des enthaltenen Myc-Tags zeigte eine membranöse und zytoplasmatische Expression von N17Rac1 in der Basalzellschicht der Epidermis in transgenen Mäusen, wohingegen in den Kontrollen keine spezifische Färbung detektiert werden konnte (Abb. 1-12c). Es konnte keine kernständige Färbung in den transgenen Mäusen nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass das TG keinen Einfluss auf die Expression von endogenem c-Myc besitzt, denn eine Überexpression des endogenen c-Myc Proteins würde zu einer Lokalisation von c-Myc im Nukleus führen [Kato & Dang, 1992].

N17Rac1 transgene Mäuse zeigen makroskopisch keinen Phänotyp. Sie zeigen keine gesundheitlichen Beeinträchtigungen sowie weder Größenunterschiede noch Veränderungen in der Haut und den Haaren. In H&E-Färbungen konnten keine mikroskopischen Unterschiede in der Kompartimentierung und Struktur von N17Rac1 transgener Haut festgestellt werden. Weiterhin konnten keine Veränderungen in der

Expression wichtiger epidermaler Differenzierungsmarker und Basalmembranmarker sowie in Markern für die Integrität von Zellkontakten nachgewiesen werden [Tscharnitke *et al.*, 2007].

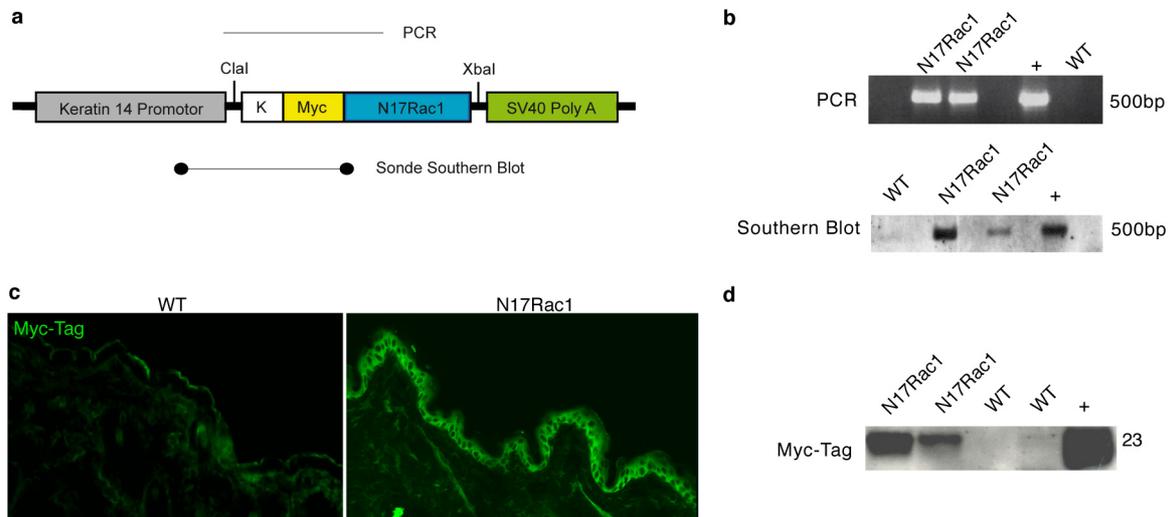


Abbildung 1-12: Dominant negative N17Rac1 Rac1 Mutante. (a) Schematische Darstellung des K14 N17Rac1 Konstrukts mit den jeweiligen Hybridisierungsstellen für PCR-Primer und die DNA-Sonde des Southern Blots sowie der umgebenden Restriktionsstellen (K: Kozak-Sequenz, Myc: Myc-Tag) (b) Nachweis der Integration des TGs in das Mausgenom durch PCR (oben) und Southern Blot (unten). (+: Positivkontrolle, -: Negativkontrolle) (c) Nachweis der *in vivo* Expression des TGs in der Basalzellschicht der Epidermis. Skalierungsbalken: 10 µm. (d) Nachweis der Expression des N17Rac1 Konstrukts in primären Keratinozyten im Western Blot durch einen Anti-Myc-Tag Antikörper.

Im Zuge der Generierung der dominant negativen N17Rac1 Mutante, die in Tscharnitke *et al.*, 2007 beschrieben wurde, ist auch eine konstitutiv aktive L61Rac1 Mutante entwickelt worden, die Bestandteil der in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen war. Diese wurde bisher noch nicht ausführlich in der Literatur beschrieben, jedoch sind bereits Studien veröffentlicht worden, in denen L61Rac1 TG Mäuse bzw. Haut- und/oder Epidermisproben der Mäuse verwendet wurden [Stachelscheid *et al.*, 2008; Petermann *et al.*, 2009].

1.6.2 Konditionaler Rac1 Knockout

Die in Chrostek *et al.*, 2006 beschriebenen Rac1 *lox*-Mäuse wurden durch Flankieren von Exon 3 (AS 37-75) mit *loxP*-Seiten, wie in Abbildung 1-13 dargestellt, generiert. In diesem geflochten Bereich sind die für die Funktion von Rac1 wichtige Effektorbindedomäne sowie die Switch II-Region lokalisiert. Ein Ausschneiden dieses Bereichs durch die von ihnen verwendete K5-Cre Rekombinase [Ramirez *et al.*, 2004] würde theoretischen Überlegungen zufolge zu einer Verschiebung des Leserasters („Frameshift“) während der Transkription und einem vorzeitigen Abbruch der Translation führen, wodurch ein verkürztes, nicht funktionelles Rac1 Protein entstehen würde.

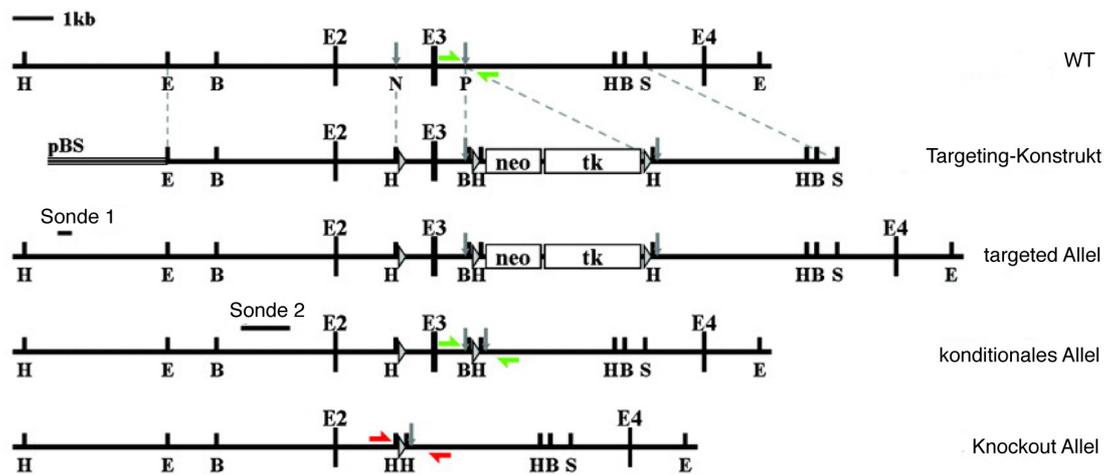


Abbildung 1-13: Verwendete Strategie zur Generierung der Rac1 flox Mäuse nach Chrostek et al., 2006. Die homologe Rekombination des Targeting-Konstrukts mit dem *rac1* Gen von ES Zellen an *LoxP*-Stellen (Dreiecke), die upstream von Exon 3 (E3) und downstream von der geflochten Neo-Kassette liegen, resultiert im targeted Allel. Entfernen der Neo-Kassette durch Cre-Transfektion hinterlässt ein gefloxtes Exon 3 (konditionales Allel). Rekombination durch Cre (hier K5-Cre) führt zu einer Deletion von Exon 3 (Knockout Allel). (H: HindIII, E: EcoRI, B: BamHI, S: Sall, N: NotI, P: SpeI, pBS: BlueScript Plasmid, Sonde 1 und Sonde 2: externe und interne Hybridisierungsstellen zur Southern Blot Analyse, grüne Pfeile: Rac1 PCR-Primer; rote Pfeile: Knockout PCR-Primer. [Chrostek et al., 2006 (übersetzt aus dem Englischen)]

Die durch Einkreuzung eines K5-Cre Konstrukts generierten Rac1 E-KO Mäuse zeigten bereits in der ersten Woche nach der Geburt ein verringertes Haarwachstum und zudem einen fortschreitenden Haarverlust, so dass im Alter von zwei Monaten kaum Haare vorhanden waren. Diese wuchsen auch im Verlauf des Lebens nicht wieder nach. Der Haarverlust in Rac1 E-KO Mäusen ist in Abbildung 1-14 beispielhaft für Tag 14 p.p. dargestellt.

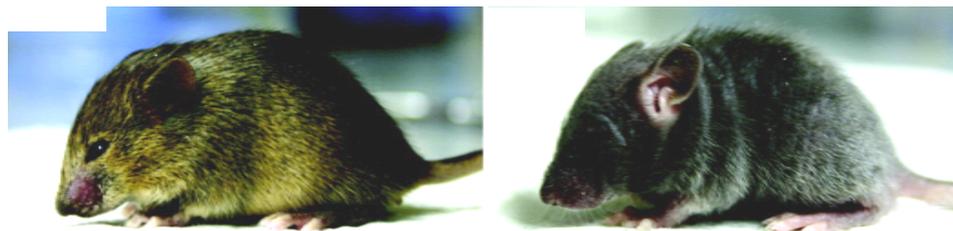


Abbildung 1-14: Phänotyp der in Chrostek et al., 2006 beschriebenen K5-Cre Rac1 E-KO an Tag 14 p.p. Rac1 E-KO Mäuse zeigen bereits deutlich eine verringerte Dichte der Fellhaare. [Chrostek et al., 2006 (modifiziert)]

Mikroskopisch zeigten die Tiere zu diesem Zeitpunkt, wie in Abbildung 1-15 dargestellt, in H&E-gefärbten Schnitten im Vergleich zu den untersuchten Kontrollen starke pathologische Veränderungen der Haarfollikel in Rac1 E-KO Mäusen. So resultierte eine epidermale Deletion von Rac1 in einer Zerstörung des unteren, nicht-permanenten Teils des Haarfollikels. Weitere Untersuchungen zeigten, dass diese Zerstörung vornehmlich durch einen Abbau des unteren Teils des Haarfollikels durch Makrophagen bedingt ist. Der Abbau der Haarfollikelkeratinozyten ist jedoch ihren Analysen zufolge nicht durch eine Apoptose

dieser Zellen bedingt. Weiterhin zeigten Rac1 E-KO Mäuse Veränderungen in der Pigmentierung des Haarschafts und Pigmentablagerungen in der Dermis und Subkutis, die auf die Haarfollikelzerstörung zurückzuführen sind, sowie einen Verlust der Expression von haarfollikelspezifischen Differenzierungsmarkern. Im Gegensatz dazu konnten Chrostek *et al.*, 2006 keine Veränderungen in der Differenzierung, der Proliferation und der Ausbildung von Zellkontakten in der IFE feststellen.

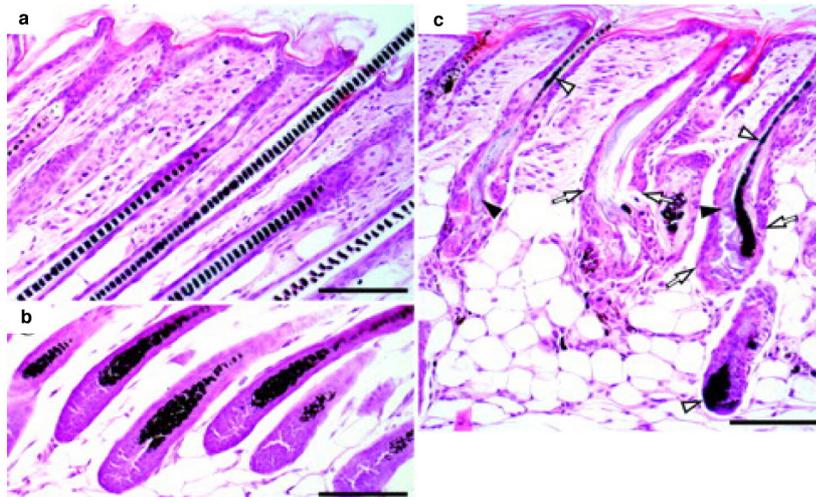


Abbildung 1-15: Zerstörung der Haarfollikelmorphologie nach epidermaler Deletion von Rac1. Darstellung der Haarmorphologie durch H&E-Färbung in Kontrollmäusen (a, b) und Rac1 E-KO Mäusen (c) an Tag 14 p.p.. Pfeile in Abbildungsteil c markieren Veränderungen im Haarschaft (weiße Pfeilspitzen), Zerstörung der äußeren Haarwurzelscheide (weiße Pfeile) und Misslokalisierung anderer Zelltypen in der äußeren Haarwurzelscheide (schwarze Pfeilspitzen). Skalierungsbalken: 100 μ m. [Chrostek *et al.*, 2006 (modifiziert)]

Die gefundenen Veränderungen konnten jedoch nicht auf eine Störung der c-Myc-Expression oder der Aktivierung von Rac1-regulierten Signalwegen (NF κ B, JNK, p38 und Akt) in der Epidermis zurückgeführt werden. Auch eine Kompensation durch nah verwandte Mitglieder der Familie der Rho-GTPasen konnte ausgeschlossen werden. Chrostek *et al.*, 2006 kommen daher zu dem Schluss, dass Rac1 eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung der Haarfollikelstruktur besitzt, jedoch weniger wichtig ist für die Struktur und Funktion der Epidermis. Eine genaue Aussage über die Funktion von Rac1 in der Strukturbildung des Haarfollikels und des Haares war jedoch aufgrund der starken Haarfollikeldegradierung mit diesem Mausmodell nicht möglich.

1.7 Zielsetzung

In der Literatur sind bereits wichtige Funktionen der kleinen Rho-GTPase Rac1 in der Regulation des Aktinzytoskeletts, der Proliferation und der Migration von Zellen belegt. Durch epidermale Deletion von Rac1 konnten weiterhin wichtige Funktionen von Rac1 in der

Proliferation und Migration von Keratinozyten während der Wundheilung [Tschardt et al., 2007; Castilho et al., 2010] sowie dem Erhalt der Haarfollikelmorphologie und der Haarfollikelstammzellen demonstriert werden [Benitah et al., 2005; Chrostek et al., 2006; Castilho et al., 2007]. Weitere Funktionen von Rac1 in der Epidermis und im Haarfollikel, besonders in den suprabasalen Schichten, sind jedoch bisher nur unzureichend untersucht.

Die in Chrostek et al., 2006 beschriebenen Rac1 *flax*-Mäuse wurden im Zuge dieser Arbeit zunächst mit K14-Cre transgenen Mäusen gekreuzt, um eine Deletion von Rac1 in allen Schichten der Epidermis und des Haarfollikels zu erreichen. Der Einsatz dieses Promotors, statt des von Chrostek et al., 2006 verwendeten K5-Cre Promotors, hat in ersten Analysen einen stärker ausgeprägten Haarverlust in K14-Cre Rac1 E-KO Mäusen erzeugt. Außerdem war im Gegensatz zu K5-Cre Rac1 E-KO Mäusen bereits wenige Tage nach der Geburt ein reduziertes Haarwachstum sichtbar. Durch Kreuzung dieser Mäuse mit L61Rac1 transgenen Tieren, die ein konstitutiv aktives Rac1 TG in der Basalzellschicht der Epidermis exprimieren, entstehen Tiere, in denen lediglich die basale Funktion von Rac1 wiederhergestellt ist, wodurch der funktionale Rac1 Knockout auf die suprabasalen Schichten der Epidermis und die differenzierten Anteile des Haarfollikels beschränkt ist (siehe Abb. 1-16). Durch Generierung dieses Mausmodells sollte überprüft werden, ob eine basale Expression von Rac1 ausreichend ist, um die Haarfollikelmorphologie wiederherzustellen. Des Weiteren war es ein Ziel der Arbeit, durch Generierung solcher L61Rac1 Rac1 E-KO Mäuse⁶, in denen die funktionale Rac1-Deletion auf die suprabasalen Schichten beschränkt ist, spezifisch mögliche Funktionen von Rac1 *in vivo* in den differenzierten Anteilen der Epidermis und des Haarfollikels zu untersuchen. Außerdem sollte der Mechanismus, durch den der Verlust von Rac1 zum Untergang der Haarfollikel in Rac1 E-KO Mäusen führt, näher beleuchtet werden.

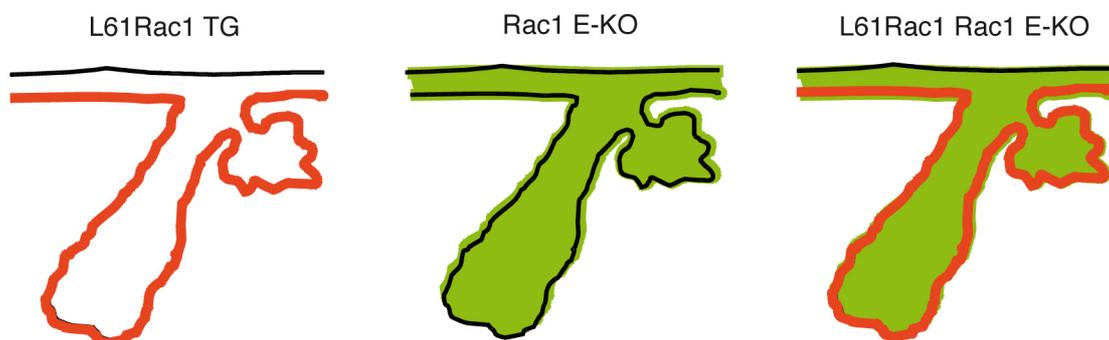


Abbildung 1-16: Modell zur Untersuchung von spezifischen Funktionen von Rac1 in den differenzierteren Anteilen der Epidermis und des Haarfollikels. L61Rac1 transgene Mäuse (L61Rac1 TG) sind charakterisiert durch die Expression eines konstitutiv aktiven Rac1 in der Basalzellschicht der Epidermis und des Haarfollikels. In Rac1 E-KO Mäusen dagegen wurde endogenes Rac1 in allen Schichten der Epidermis und der Haarfollikel deletiert. Durch Kreuzung beider Modelle wurde eine Maus generiert, in der spezifisch die basale Rac1 Expression rekonstituiert wurde und somit die Rac1 Deletion nur auf die suprabasalen Schichten der Epidermis und des Haarfollikels beschränkt ist (L61Rac1 Rac1 E-KO).

⁶ aufgrund der besseren Lesbarkeit im Folgenden nur noch als Rac1 Rescue Mäuse bezeichnet

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Falls nicht anders angegeben, wurden die allgemein verwendeten Chemikalien und Reagenzien mit analytischem Reinheitsgrad von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) oder Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) bezogen.

Spezielle Chemikalien und Reagenzien sind im Folgenden aufgelistet:

	<i>Hersteller</i>	<i>Artikelnummer</i>
L-DOPA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	D9628-56
Chelex 100 Resin	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	142-2842
Ketavet (100 mg/ml)	Pharmacia & Upjohn, Erlangen	43903
PAK-CRIB-Peptid (2 mg/ml)	Gabe von Prof. C. Niessen	-
Proteaseinhibitor-Mix	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	P2714
Rompun (2%)	Bayer HealthCare AG, Leverkusen	PZN 1320422
Streptavidin-gekoppelte Agarose	Novagen über Merck KGaA, Darmstadt	69203-3
TRITC-markiertes Phalloidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	P1951

2.1.2 Gebrauchswaren und Zellkulturmaterialien

Die verwendeten Gebrauchswaren und Zellkulturmaterialien, wie Zentrifugierröhrchen, Pipetten, Petrischalen etc., wurden von den Firmen Becton Dickinson GmbH (Heidelberg), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) und TPP - TechnoPlasticProducts AG (Trasadingen, Schweiz) bezogen.

Materialien zum Einbetten der Hautproben stammten von Sakura Finetek Europe B.V. (Alphen an den Rijn, Niederlande) und Whatman GmbH (Dassel).

2.1.3 Nährmedien

Nährmedien und Zusätze für die Kultur der Keratinozyten und Fibroblasten stammten, soweit nicht anders vermerkt, von Biochrom AG (Berlin), PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) und Gibco (über Invitrogen Ltd., Paisley, UK).

MES/MOPS-Puffer	NuPAGE-Konzentrat (20x; Invitrogen Ltd, Paisley, UK)
Rac1 Pull-Down Lysispuffer	50mM Tris-HCl, pH 7,4; 100mM NaCl; 10mM MgCl ₂
Ripa ⁺ (pH 8,0)	150mM NaCl; 50mM Tris, pH 7,4; 4mM EDTA; 1% Nonidet P-40 v/v; 0,5% Natrium-Desoxycholat v/v; 1% Triton X-100; sowie zusätzlich Proteaseinhibitoren 20mM Leupeptin; 1 g/ml p-Nitrophenylphosphat; 100 mg/ml Sojabohnen-Trypsininhibitor; 100mM Orthovanadat
TAE-Puffer	40mM Tris; 2mM EDTA, pH 8,0
TBST	20mM Tris; 137mM NaCl; 0,1% Tween 20 v/v, pH 7,6
Trypsin/EDTA	0,1% Trypsin w/v; 0,02% EDTA w/v

2.1.5 Enzyme

<i>Enzym</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Artikelnummer</i>
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen	P4850
Taq DNA Polymerase (5000 U/ml)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	M0267
Trypsin (2,5%)	Gibco über Invitrogen Ltd., Paisley (UK)	15090046

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper (Western Blot)

<i>Antikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>V</i>	<i>Bezugsquelle</i>	<i>Art.-Nr.</i>
Anti-Human β -Aktin	Maus	1:5000	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich	69100
Anti-Maus Myc-Tag (HRP-konjugiert)	Kaninchen	1:1000	Abcam plc, Cambridge (UK)	1326-100
Anti-Human Rac1 (Klon 23A8)	Maus	1:500	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen	R2650

Primärantikörper (Immunfluoreszenz)

Antikörper	Spezies	V	Bezugsquelle	Art.-Nr.
Anti-Maus BrdU (Klon B44)	Maus (IgG ₁)	1:10	BD Biosciences, Heidelberg	347580
Anti-Maus β -Catenin (Klon 14)	Maus (IgG ₁)	1:250	BD Biosciences, Heidelberg	610154
Anti-Maus aktive Caspase 3	Kaninchen	1:200	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (MA, USA)	9664
Anti-Maus CDP	Kaninchen	1:100	Gabe von	-
Anti-Maus Desmocollin 2	Ziege	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (CA, USA)	SC-34308
Anti-Human Desmoglein 1+2	Maus (IgG ₁)	1:50	Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg	61002
Anti-Human Desmoglein 4 (Klon 18G8)	Maus	1:10	Gabe von A.M. Christiano	-
Anti-Maus F4/80	Maus	1:50	AbD Serotec, Planegg	MCA-492
Anti-Maus Foxn1	Ziege	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (CA, USA)	SC-23566
Anti-Maus Haarkeratin 81	Meerschwein	1:100	Gabe von L. Langbein, Heidelberg	-
Anti-Maus Haarkeratin 82	Meerschwein	1:100	Gabe von L. Langbein, Heidelberg	-
Anti-Maus Keratin 10	Kaninchen	1:100	Covance Inc., Princeton (NJ, USA)	PRB-159P
Anti-Maus Keratin 14	Kaninchen	1:1000, 1:2000 (BrdU)	Covance Inc., Princeton (NJ, USA)	PRB-155P
Anti-Maus Keratin 15	Huhn	1:7000	Covance Inc., Princeton (NJ, USA) Covance	PCK-153P
Anti-Maus Lef1	Kaninchen	1:100	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (MA, USA)	2230
Anti-Maus MHCII (FITC-gekoppelt)	Ratte (IgG _{2b})	1:10	MACS von Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach	M5/114.15 .2
Anti-Maus Myc-Tag (Klon 9B11)	Maus (IgG _{2a})	1:250	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (MA, USA)	2276
Anti-Maus Typ I Haarkeratine (AE13)	Maus (IgG ₁)	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (CA, USA)	SC-57012
Anti-Human Plakoglobin	Maus (IgG _{2b})	1:10	Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg	61005
Anti-Maus Trp2	Ziege	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (CA, USA)	SC-10451
Anti-Maus Tyrp1	Kaninchen	1:2000	Gabe von V.J. Hearing	-

Sekundärantikörper

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Sekundärantikörper für die Immunfärbungen in einer 1:500 Verdünnung eingesetzt. Für Western Blot Analysen wurde eine Verdünnung von 1:5000 gewählt.

Antikörper	Spezies	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
Anti-Huhn IgG (H+L) Alexa 488	Esel	Invitrogen Ltd., Paisley (UK)	A11055
Anti-Kaninchen IgG (H+L) Alexa 488/555/594	Ziege	Invitrogen Ltd., Paisley (UK)	A11034/ A21428/ A11012
Anti-Maus IgG ₁ Alexa 488/ 546	Ziege	Invitrogen Ltd., Paisley (UK)	A21121/-3
Anti-Maus IgG _{2a} Alexa 488	Ziege	Invitrogen Ltd., Paisley (UK)	A21131
Anti-Maus IgG _{2b} Alexa 488	Ziege	Invitrogen Ltd., Paisley (UK)	A21141
Anti-Meerschwein IgG (H+L) Alexa 488	Ziege	Invitrogen Ltd., Paisley (UK)	A11073
Streptavidin Alexa 488	-	Invitrogen Ltd., Paisley (UK)	S32354
Anti-Ziege IgG (H+L) Alexa 488	Esel	Invitrogen Ltd., Paisley (UK)	A11055
Anti-Maus HRP	Kaninchen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	A2304

2.1.7 Primer

Alle verwendeten Primer wurden als Oligonukleotide von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

Primername	PCR	Reinheit	Sequenz (5'-3')
SF3	RacCre	>80% HPLC	TTG GTT GTG TAA CTG ATC AGT AGG C
SF5			TGG AGA GCT AGC AGG AAA CTA GG
MG1	RacKO		GTC TTG AGT TAC ATC TCT GG
MG2			CTG ACG CCA ACA ACT ATG C
SC1	K14-Cre		GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA C
SC3			CTG TCA CTT GGT CGT GGC AGC

2.1.8 Kits und weitere Materialien

BCA Protein Assay (23227)	Thermo Scientific (Pierce), Rockford, IL (USA)
Chemiluminiszenz Plus Kit (NEL105001EA)	Perkin Elmer, Rodgau
Dako Antibody Diluent Solution (S3022)	Dako, Hamburg
Dako Pen (S2002)	Dako, Hamburg
Dako REAL Target Retrieval, pH 6 (S2031)	Dako, Hamburg
Dako Target Retrieval, pH 9 (S2367)	Dako, Hamburg
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (G3250)	Promega, Mannheim
Hyperfilm ECL (28-9068)	Amersham Biosciences, Braunschweig
O'GeneRuler Plus 1kb Leiter (SM1334)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
PageRuler Plus (SM0671)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

SuperSignal West Femto (34077)	Thermo Scientific (Pierce), Rockford, IL (USA)
Tissue Tek O.C.T. Compound (4583)	Sakura Finetek Europe B.V. (Alphen an den Rijn, Niederlande)
TSA Kit (NEL701A001KT)	Perkin Elmer, Waltham, MA (USA)

2.1.9 Bestrahlungsgerät

Zur Bestrahlung von Mäusen und auch Zellkulturen wurde ein Teilkörper UV-Therapiesystem TP-4 mit Waldmann UV-6 Breitband-UVB-Röhren (Herbert Waldmann GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen) eingesetzt. Das Emissionsmaximum der gewählten Lampen liegt bei ca. 320 nm (siehe Abb. 2-1). Nach Erwerb des Bestrahlungsgeräts wurde die spezifische Bestrahlungsstärke des Geräts mit Hilfe eines UVB-Messgeräts bei 311 nm bestimmt und die gemessene Bestrahlungsstärke ($3,6 \text{ mW/cm}^2$) in die Steuereinheit des Geräts einprogrammiert, was eine Bestrahlung über die Eingabe der gewünschten Dosis ermöglicht.

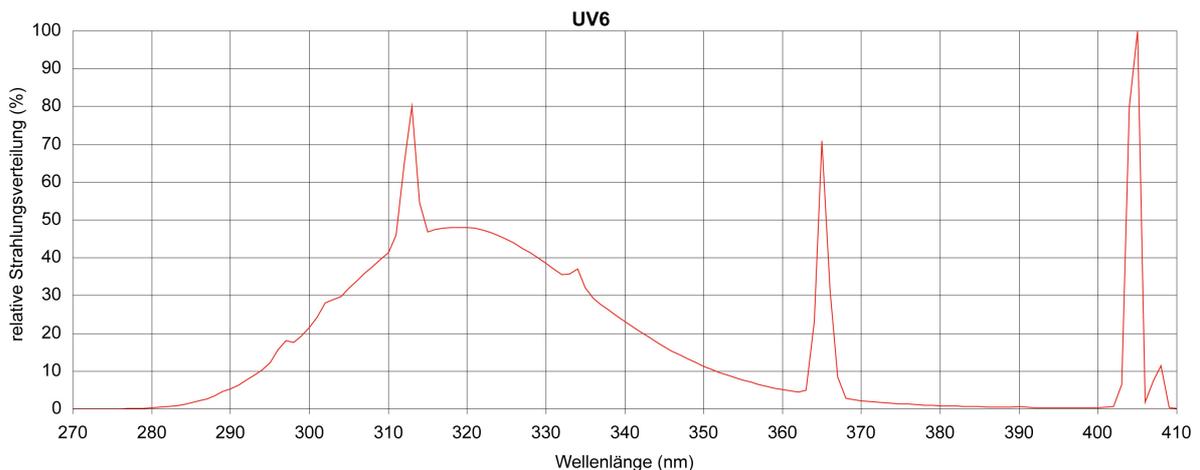


Abbildung 2-1: Spektrale Strahlungsverteilung der UV-6 UVB-Strahlungsquellen, die zur *in vivo* und *in vitro* Bestrahlung eingesetzt wurden. Die verwendeten Lampen besitzen ein Bestrahlungsmaximum bei 320 nm. [Waldmann GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen]

2.1.10 Mikroskope

Die Aufnahme der Bilder der Fluoreszenzfärbungen erfolgte an einem DeltaVision Mikroskop-System, ausgestattet mit einer CoolSnap hQ2 Kamera, über die Aufnahme-Software softWoRx-Suite (Applied Precision, Inc. Issaquah, WA (USA)). Die Aufnahme der lichtmikroskopischen Bilder wurde an einem Leica DM4000B Mikroskop (Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar) durchgeführt. Dieses Mikroskop war ausgestattet mit einer KY-F75U Digital-Kamera (JVC Professional Europe Ltd., Frankfurt) sowie der Aufnahme-Software Diskus (Carl H. Hilgers, Technisches Büro, Königswinter).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 *Isolation von Keratinozyten aus neugeborenen Mäusen*

Neugeborene Mäuse im Alter von ein bis drei Tagen wurden durch Decapitation getötet und eine Stunde auf Eis gekühlt, um ein leichteres Ablösen der Haut zu ermöglichen. Unter der Sterilwerkbank erfolgte die Desinfektion der Maustorsi durch Eintauchen in 50% Beta Isodona/50% PBS für eine Minute, in PBS für einige Sekunden, in 70% Ethanol für eine Minute sowie abschließend in PBS für einige Sekunden. Im Anschluss wurden Schwanz und Gliedmaßen entfernt und die Haut vom Torso abgetrennt. Die so isolierte Maushaut wurde mit der dermalen Seite nach unten ausgerichtet auf einer sterilen Petrischale ausgebreitet und mit Trypsin/EDTA-Lösung unterspült, so dass die epidermale Seite keinen Kontakt mit der Lösung hatte. Die Schalen wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Epidermis von der Dermis abgelöst und mit zwei Skalpellern zerkleinert. Die Hautstücke wurden in FAD low Ca²⁺-Medium für eine Stunde bei RT geschüttelt, um die Keratinozyten herauszulösen und anschließend die Mischung auf einen zuvor in Kollagen I beschichteten 6-Well-Schalen ausgesäten „Feeder“-Rasen verteilt. Die so gewonnenen Keratinozytenkulturen wurden bei 32 °C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.1.2 *Kultivierung von murinen Keratinozyten*

Zur Subkultivierung der Mauskeratinozyten wurde das verbrauchte Medium entfernt und die Kultur nach einmaligem Waschen für 5 min mit PBS/EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro 6 cm-Schale wurden diese für 7 bis 10 min bei 37 °C inkubiert und im Anschluss die Keratinozyten abgeklopft. Durch Zugabe von frischem Medium wurde die Wirkung des Trypsins abgestoppt und durch Zentrifugieren das Trypsin-haltige Medium entfernt. Nach Auffüllen mit frischem Medium konnten die Keratinozyten in der gewünschten Zelldichte auf Kollagen I-beschichtete Schalen verteilt werden.

Für die Kultivierung der Mauskeratinozyten wurden nach Neuisolation sowie für die ersten Passagen kommerziell erhältliche Kollagen I-beschichtete Zellkulturgefäße (Biocoat, BD Biosciences) verwendet. Für spätere Passagen wurden Zellkulturgefäße im Labor mit Kollagen I beschichtet. Hierfür wurde eine Kollagen I-Lösung (30 µg/ml) in die zu beschichtenden Gefäße gegeben und diese über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die beschichteten Gefäße zweimal mit PBS gewaschen und bis zur Verwendung mit PBS bedeckt bei 4 °C gelagert.

2.2.1.3 Kultivierung von 3T3 („Feeder“) Fibroblasten

Zur Subkultivierung der 3T3 Fibroblasten wurde das Medium entfernt und die Kultur nach einmaligem Waschen für 5 min mit PBS/EDTA-Lösung inkubiert. Nach Absaugen der Flüssigkeit wurde eine geringe Menge an Trypsin/EDTA-Lösung auf der Schale verteilt und diese für circa eine Minute bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss konnten die Fibroblasten abgeklopft werden und auf neue, für die Zellkultur behandelte Schalen verteilt werden.

Für die Verwendung der 3T3 Fibroblasten als „Feeder“-Zellen wurden diese zuvor für 2 h mit Mitomycin C (4 µg/ml) behandelt, um eine Inhibierung der Proliferation zu erreichen. Nach kurzem Waschen mit PBS wurden die Zellen abgelöst und in FAD low Ca²⁺-Medium auf die entsprechenden Schalen verteilt.

2.2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen

Zum Einfrieren von Keratinozyten- und Fibroblastenkulturen wurden diese nach dem Ablösen in FCS + 10% DMSO aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden bei -80 °C sehr langsam eingefroren (ca. 1 °C/min) und anschließend in Flüssigstickstoff überführt. Zum Auftauen von Keratinozyten- und Fibroblastenkulturen wurden diese nach Herausnehmen aus dem Stickstofftank auf Trockeneis gelagert, bis die Kryoröhrchen direkt ins Wasserbad bei 37 °C überführt werden konnten. Die aufgetauten Kulturen wurden mit 5 ml frischem Medium in ein 15 ml-Röhrchen überführt und zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellen in der gewünschten Zelldichte ausplattiert.

2.2.1.5 Koloniebildungsassay zur Bestimmung des proliferativen Potentials

Zur Bestimmung des proliferativen Potentials *in vitro* wurden zunächst 3000 Zellen in Triplikaten je Zelllinie in 6-Well-Platten ausgesät und diese unter normalen Kulturbedingungen für drei Wochen kultiviert bis sich deutlich Kolonien in den Kontrollen gebildet hatten. Im Anschluss wurden die Zellen zunächst mit einer 4%igen PFA/PBS-Lösung für 15 min fixiert, mit PBS gewaschen, bevor die Zellen mit einer 0,1%igen Kristallviolett-Lösung für 1 min gefärbt wurden. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Platten bei RT getrocknet und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

2.2.1.6 Spreading-Assay zur Analyse der Zellausbreitungsverhaltens

Zur Analyse des Zellausbreitungsverhaltens wurde ein Spreading-Assay eingesetzt. Dieser wurde, wie in Haase *et al.*, 2003 beschrieben, durchgeführt. Zunächst wurden hierzu Objektträger mit 10 µg/ml Kollagen I/PBS oder 20 µg/ml Polylysin/PBS über Nacht bei 4 °C

beschichtet. Zusätzlich wurde je Zelllinie eine 6,5 cm Kulturschale mit poly-HEMA (0,4% poly-HEMA in 50% Aceton/50% Ethanol) 1 min bei RT beschichtet. Am Tag des Versuchs wurden die Zellkulturen zunächst von vorhandenen „Feeder“-Zellen befreit und anschließend die Keratinozyten abgelöst und in 6 ml Methylcellulose-Medium (3,5 g Methylcellulose in 180 ml FAD low Ca²⁺ (60 °C) für 30 min bei RT und 18 h bei 4 °C rühren, 20 ml Serum zugeben und 30 min bei 9500 rpm abzentrifugieren, bei -20 °C lagern) aufgenommen. Nach Inkubation der Zellen auf poly-HEMA-beschichteten Schalen für 4 h bei 32 °C, wurden die Zellen durch Verdünnung des Mediums mit PBS/EDTA (1:10) und Zentrifugation (2000 rpm, 10 min) vom Methylcellulose-Medium befreit und nach zweimaligem Waschen mit DMEM-Grundmedium (ohne Zusätze) auf 2-kammrige, vorgewärmte Objektträger ausplattiert (2x10⁴ Zellen pro Kammer). Die Zellen wurden im Anschluss bei 32 °C für 40 min in DMEM-Grundmedium inkubiert und anschließend mit 4% PFA/PBS fixiert und mit 0,4% Triton X-100/PBS für 5 min bei RT permeabilisiert. Die Proben wurden mit 50% FCS/PBS für 30 min bei 37 °C blockiert, bevor die Zellen mit einem Anti-Myctag (9B11) in Blockierlösung zur Detektion transgener Zellen sowie mit TRITC-markiertem Phalloidin (1:100) zur Markierung von polymerisiertem Aktin angefärbt wurden. Zur Auswertung des Spreading-Assays wurde die Zellfläche, die eine einzelne Zelle einnimmt, in digitalen Bildern bestimmt und die Zellfläche aller ausgewerteten Zellen in einem Histogramm dargestellt.

2.2.1.7 Bestrahlung von primären Keratinozyten mit UVB

Zur Bestrahlung der primären Keratinozyten wurden diese auf Objektträgern ausplattiert und bei einer Konfluenz von ca. 80% nach zweimaligem Waschen mit PBS mit PBS bedeckt, um ein Austrocknen während der Bestrahlung zu verhindern. Die Zellen wurden ohne Deckel mit einer Breitband-UVB-Lampe (UV-Therapiesystem TP-4 mit Waldmann UV-6 Breitband-UVB-Röhren, Waldmann Herbert Waldmann GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen) mit einer Dosis von 1000 mJ/cm² bestrahlt. Um Effekte durch eine Aufheizung der Zellen zu vermeiden, wurden die Kulturschalen mit Eis umgeben, um diese während der Bestrahlungszeit zu kühlen. Im Anschluss an die Bestrahlung wurde frisches FAD low Ca²⁺ Medium zugegeben und die Kulturgefäße für 12 h im Brutschrank inkubiert, bevor apoptotische Zellen mit Hilfe des TUNEL-Assays (2.2.4.5) detektiert wurden.

2.2.1.8 Isolation von Epidermis aus Haut von neugeborenen Mäusen

Zur Isolation von Epidermis aus neugeborenen Mäusen wurden diese zunächst durch Decapitation getötet und eine Stunde auf Eis gekühlt. Nach Abtrennen der Gliedmaßen und des Schwanzes wurden die Mäuse gehäutet und die Haut auf einer Ammoniumthiozyanat Lösung auf Eis für ca. 40 min gefloatet, so dass nur die dermale Seite mit der Lösung in

Berührung kam. Anschließend wurde die Hautprobe dreimal in PBS gewaschen und die Epidermis mit Hilfe von Pinzetten von der Dermis getrennt. Die gewonnene Epidermis wurde direkt weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff weggefroren.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 DNA Isolation aus Mausschwanzbiopsien

Von den zu typisierenden Mäusen wurden Schwanzbiopsien (ca. 0,5 cm) genommen und diese in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 500 µl Lysepuffer und 4 µl Proteinase K über Nacht bei 55 °C unter Schütteln lysiert. Am Folgetag wurde nach Zentrifugation der Probe für 5 min bei 13.200 rpm in einer Tischzentrifuge durch Überführen des Überstands in ein mit 500 µl Isopropanol gefülltes Eppendorfgefäß und leichtes Schütteln die DNA gefällt. Durch erneute Zentrifugation für 10 min bei 13.200 rpm wurde die DNA pelletiert und mit 500 µl 70%iger Ethanollösung gewaschen. Nachdem das Pellet bei RT vollständig getrocknet war, wurden 125 µl 10 mM Tris, pH 8,0 zugegeben und die DNA unter Schütteln bei 40 °C über Nacht gelöst.

2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Genotypisierung der verschiedenen Mauslinien wurde die jeweils passende Polymerase-Kettenreaktion mit den unter 2.1.7 aufgelisteten Primern in T3 Thermocyclern (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

PCR Ansätze (Angaben in µl):

	<i>RacCre</i>	<i>Rac KO</i>	<i>K14-Cre</i>
<i>Puffer</i>	4	2	3
<i>MgCl₂</i>	-	0,4	-
<i>dNTPs (2,5 mM)</i>	1,2	0,4 (10 mM)	1,25
<i>Primer fw</i>	1,2 (SF3)	0,2 (MG1)	1 (SC1)
<i>Primer rev</i>	1,2 (SF5)	0,2 (MG2)	1 (SC3)
<i>DNA Taq Polymerase</i>	0,5	0,1	0,5
<i>ddH₂O</i>	30,4	14,7	23,25
Gesamt	38,5	18	30
<i>DNA Zugabe</i>	1,5	2	2

PCR Programme (Angaben in Sekunden):

	RacCre	Rac KO	K14-Cre
<i>Schritt 1</i>	94 °C, 3 min	94 °C, 30 sec (10x) 63 °C, 30 sec (nach 53 °C, -1 °C pro Zyklus) 72 °C, 30 sec	94 °C, 3 min
<i>Schritt 2</i>	94 °C, 30 sec (39x) 58 °C, 30 sec 72 °C, 30 sec	94 °C, 30 sec (35x) 58 °C, 30 sec 72 °C, 30 sec	94 °C, 30 sec (30x) 58 °C, 30 sec 72 °C, 30 sec
<i>Schritt 3</i>	72 °C, 5 min	-	72 °C, 3 min
<i>Schritt 4</i>	4 °C, Pause	4 °C, Pause	4 °C, Pause
<i>Produkt</i>	ca. 530 bp	WT Allel 200 bp floxed Allel 280 bp	ca. 350 bp

2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die vervielfältigten PCR-Proben wurden zur Analyse auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und bei ca. 120 V aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Ergebnisse der PCR Analyse mit Hilfe eines Geldokumentationssystems (Biometra, Göttingen) dokumentiert.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinextraktion aus Zellkulturen

Zu den zu analysierenden konfluenten Keratinozytenkulturen wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS Ripa⁺ sowie PMSF (2 µl/100 µl) zugegeben und die Zellen auf Eis mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturschale abgelöst. Diese Suspension wurde zusätzlich für 30 sec mit Ultraschall behandelt, um den vollständigen Aufschluss aller Zellen zu gewährleisten. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13.200 rpm und 4 °C, wurde der Gesamtproteingehalt mittels eines kommerziellen BCA-Assays laut Anleitung bestimmt. Im Anschluss wurde die Probe mit Ladebuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgekocht, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren.

2.2.3.2 Proteinextraktion aus Gewebe

Zu den zu analysierenden Hautproben wurde Ripa⁺ sowie PMSF (2 µl/ 100 µl) zugegeben und das Gewebe in einer Schwingmühle (Retsch, Haan) für 3 min bei einer Frequenz von 30/sec zerkleinert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13.200 rpm und 4 °C wurde der Gesamtproteingehalt mittels eines kommerziellen BCA-Assays (Thermo Scientific (Pierce), Rockford, IL (USA)) laut Anleitung bestimmt. Im Anschluss wurde die Probe mit Ladebuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgekocht, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren.

2.2.3.3 Rac1 Pull-Down Analyse

Der Rac1 Pull-Down Assay zur Bestimmung des Anteils an aktivem, d.h. GTP gebundenem Rac1, wurde von John Collard (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam) übernommen und geringfügig verändert. Der Assay kann sowohl mit Zellkulturen als auch mit Vollhautproben sowie isolierter Epidermis durchgeführt werden. Die Durchführung des Assays erfolgte auf Eis mit gekühlten Lösungen oder im Kühlraum. Hochkonfluente 6-cm Schalen wurden einmal mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 700 µl Lysispuffer mit 1% Nonidet P-40 sowie PMSF (1:100) und eines speziellen Proteaseinhibitor-Mixes (1:100) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) die Zellen mittels eines Zellschabers von der Kulturschale abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 3 µl PAK-CRIB-Peptid zugegeben. Nach Isolation der Epidermisproben wurden diese in 350 µl Lysispuffer mit PMSF und einem speziellen Proteaseinhibitor-Mix (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) aufgenommen und 5 µl PAK-CRIB-Peptid zugegeben. Anschließend wurde das Gewebe, wie zuvor beschrieben, homogenisiert und 350 µl des Lysispuffers mit 2% Nonidet P-40 zugegeben.

Die Proben wurden zur vollständigen Lyse für 45 min bei 4 °C auf einem Vertikalrotator bewegt und anschließend 15 min bei 13.200 rpm und 4 °C zentrifugiert. 50 µl des Überstands wurden als Totallysat abgenommen und der restliche Überstand für weitere 45 min bei 4 °C rotiert. Anschließend wurden 30 µl Streptavidin-gekoppelter Agarose zugegeben und die Probe für 30 min bei 4 °C weiterrotiert, damit die Agarosepartikel an das Biotin-Motiv der PAK-CRIB-Peptids binden und so die aktiven Rac1 Proteine festhalten konnten. Nach Zentrifugation für 10 sec bei 6.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand abgenommen. Die Beads wurden dreimal mit je 1 ml Lysispuffer gewaschen, mit einer Hamiltonspritze trocken gesaugt und mit 20 µl Probenpuffer versetzt. Nach Bestimmung der Proteinmenge im Totallysat wurde die aufzutragende Menge für die Pull-Down Probe verhältnismäßig normalisiert und die Proben von Totallysat und Pull-Down für die Analyse im Western Blot vorbereitet.

2.2.3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Analyse der Proteinproben im Western Blot wurde auf das kommerzielle NuPAGE-System der Firma Invitrogen zurückgegriffen. Es wurden hierzu 4-12%ige Bis/Tris NuPAGE Gradientengele verwendet und als Laufpuffer NuPAGE MES- oder MOPS-Puffer eingesetzt. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte bei weniger als 0,125 Ampere für ca. 60 min.

2.2.3.5 Western Blot und Immundetektion von Proteinen

Die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte durch Einsatz des NuPAGE Tankblot-Systems der Firma Invitrogen. Nach Aufbau der Tankblot-Kammer, wie in der Anleitung beschrieben, wurden die Proteine bei 30 Volt für ca. 60 min auf die Membran übertragen. Nach Blockierung der Membran in 5%iger Milchlösung in TBST für zwei Stunden wurde die Membran kurz mit TBST gewaschen und anschließend die Membran mit dem Erstantikörper in 5% Milch/TBST inkubiert. Nach kurzem Waschen wurde der Zweitantikörper zugegeben und die Membran mit diesem für ca. eine Stunde bei RT inkubiert. Nach weiterem Waschen für 3-mal 10 min wurde die Membran zur Detektion der Banden mit ECL Lösung behandelt und im Anschluss auf einem Röntgenfilm entwickelt.

2.2.4 Immunhisto- und cytochemische Methoden

Zur Durchführung der immunhistologischen Untersuchungen wurden sowohl Schnitte von Hautbiopsien, die zuvor nach einem Standardprotokoll in Paraffin eingebettet wurden (Dicke 6-8 μm), als auch Schnitte von Hautbiopsien, die zum Anfertigen von Kryoschnitten in Tissue Tek O.C.T. eingebettet wurden (Dicke ca. 8 μm), eingesetzt.

Histologische Färbungen (H&E-Färbung, Giemsa-Färbung) wurden nach Standardprotokollen im Histologielabor des Dermatologischen Instituts der Uniklinik Köln durchgeführt.

2.2.4.1 Immunfärbung von Kryoschnitten

2.2.4.1.1 Immunfärbung zum Nachweis des Myc-Tags in L61Rac1 transgenen Mäusen

Die Detektion des Myc-Tags erfolgte auf Kryoschnitten. Hierzu wurden die Schnitte zunächst mit 4% PFA/PBS für 10 min bei RT fixiert und nach kurzem Waschen in PBS mit 0,3% Triton X100/PBS bei RT zusätzlich permeabilisiert. Nach einmaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte in 10% Ziegenserum für zwei Stunden bei RT blockiert. Im Anschluss wurden die Schnitte in PBS+Ca²⁺/Mg²⁺ (0,1% CaCl₂ w/v, 0,1% MgCl₂ w/v) für 5 min gewaschen und der Anti-Myc-tag Antikörper in 3% BSA/TBS über Nacht bei 4 °C appliziert. Am darauf folgenden Tag wurden die Schnitte für 10 min in TBS gewaschen und mit einem mit Alexa 488 gekoppeltem Anti-Maus IgG_{2b} in 3% BSA/TBS und Dapi für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 15 min in PBS wurden die Schnitte mit 1% PFA Lösung nachfixiert und mit Gelvatol eingebettet.

2.2.4.1.2 Immunfärbung von aktiver Caspase 3

Die Detektion der aktiven Caspase 3 erfolgte durch Färbung des durch proteolytische Prozessierung entstandenen Fragments von 17 kDa. Die Färbung wurde laut dem von Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (MA, USA) angegebenen Standardprotokoll zur Färbung auf Kryoschnitten durchgeführt. Im Anschluss an die Färbung wurden die Schnitte mit 1% PFA/PBS nachfixiert und mit Gelvatol eingebettet.

2.2.4.2 Immunfärbung von Paraffinschnitten

Zur Färbung von Antigenen auf Paraffinschnitten wurden die Schnitte zunächst durch Inkubation in Xylol entwacht und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Nach Inkubation in PBS für 5 min wurde die Antigen-Demaskierung durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte entweder in Citratpuffer (Dako REAL, Dako) oder EDTA-Puffer (Target Retrieval pH9, Dako) für 20 min gekocht oder die Antigene durch enzymatischen Aufschluss mit einer 1% Trypsinlösung für 10 min bei 37 °C demaskiert. In Anschluss wurden die Schnitte kurz in PBS gewaschen und für eine Stunde mit dem entsprechenden 10% Serum bei RT blockiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte meist über Nacht bei 4 °C in der entsprechenden Verdünnungslösung in der Feuchtkammer. Nach mehrmaligem Waschen der Schnitte mit PBS wurde der Zweitantikörper zusammen mit der Kernfärbelösung für eine Stunde bei RT zugegeben. Nach Waschen der Schnitte in PBS wurden diese mit 1% PFA Lösung nachfixiert und mit Gelvatol eingedeckt.

2.2.4.2.1 Immunfärbung von epidermalen Differenzierungsmarkern

Die Färbung von epidermalen Differenzierungsmarkern wie Keratin 14, Keratin 10, Loricrin und Fillagrin sowie des epidermalen Stammzellmarkers Keratin 15 erfolgte nach dem unter 2.2.4.2 beschriebenen Standardprotokoll auf Paraffinschnitten. Zur Antigen-Demaskierung wurde der enzymatische Anverdau mit Trypsin eingesetzt (außer Keratin 14 und 15) und mit 10% Ziegenserum blockiert. Die Antikörper wurden in 0,2% FSG/PBS verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf den Schnitten inkubiert.

2.2.4.2.2 Immunfärbung von Haarfollikeldifferenzierungsmarkern und Adhäsionsmolekülen

Die Färbung von Haarfollikeldifferenzierungsmarkern wie CDP, Foxn1, Lef1 und β -Catenin sowie für Typ I Haarkeratine (AE13) und die Adhäsionskomponenten Dsg1+2, Dsg4, Dsc2 und Plakoglobin wurde, wie in 2.2.4.2 beschrieben, auf Paraffinschnitten durchgeführt. Die Antigen-Demaskierung erfolgte mit Ausnahme von Foxn1 und Lef1 durch Kochen in EDTA-Puffer (Target Retrieval pH 9, Dako). Foxn1 wurde durch Trypsinanverdau, Lef1 durch Kochen in Citratpuffer (Dako REAL, Dako) demaskiert. Die Blockierung der CDP- und Lef1-

Färbung erfolgte durch 10% Ziegenserum, die der Foxn1 mit 10% Eselserum. Zur Färbung aller anderen Antigene, auch die der Dsc2-AE13-Doppelfärbung, wurden die Schnitte mit 1% Milch/1% BSA/10% Ziegenserum in PBS für 1 bis 2 h blockiert. Die Verdünnung der Antikörper für die CDP- und Foxn1-Färbungen erfolgte in ADS, die der Lef1-Färbung in 10% Ziegenserum. Alle weiteren Antikörper (inklusive AE13 und Dsc2) wurden in 1% Milch/1% BSA/10% Ziegenserum in PBS verdünnt. Die Inkubation aller Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C, die Inkubation der Sekundärantikörper für 1 h bei RT.

2.2.4.2.3 Immunfärbung von BrdU und Keratin 14

Zur Färbung von BrdU inkorporierenden Zellen wurden Paraffinschnitte von zuvor injizierten Mäusen zunächst entparaffinisiert und anschließend in PBS 5 min rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte in Citratpuffer (Dako REAL, Dako) zur Antigen-Demaskierung 20 min gekocht, 30 min abkühlen gelassen und 5 min in PBS gewaschen. Nach Blocken mit 10% Ziegenserum/PBS für 1 h wurde der Anti-BrdU Antikörper in ADS appliziert und die Schnitte über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde nach dreimaligem Waschen mit PBS der Sekundärantikörper Anti-Maus IgG₁ Alexa 488 sowie ein Anti-Keratin 14 Antikörper in ADS für 1,5 h bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde im Anschluss ein Anti-Kaninchen Alexa 555 zusammen mit DAPI zur Kernfärbung für eine Stunde bei RT zugegeben. Nach nochmaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte im Anschluss mit 1% PFA für 5 min nachfixiert und mit Gelvatol eingedeckt.

2.2.4.2.4 Immunfärbung von Melanozytenmarkern

Zur Detektion von Melanozyten in der Haut wurden Färbungen für die Melanozytenmarker Tyrp1, welcher reife Melanozyten markiert, und Trp2, welcher Melanozytenvorläuferzellen markiert, etabliert. Die Färbung beider Marker in einer Doppelfärbung wurde, wie in Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben, auf Paraffinschnitten durchgeführt. Die Demaskierung der Antigene erfolgte durch Kochen in EDTA-Puffer (Target Retrieval pH 9, Dako) bevor anschließend die Schnitte mit 10% Eselserum blockiert wurden. Da beide Erstantikörper aus unterschiedlichen Spezies stammten, konnte die Inkubation mit den Antikörpern gegen Tyrp1 und Trp2 in einem Schritt durchgeführt werden. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in ADS. Als Zweitantikörper wurden Antikörper gewählt, die in derselben Spezies generiert wurden, um Kreuzreaktionen zu vermeiden.

2.2.4.2.5 Färbung von polymerisiertem Aktin mit TRITC-markiertem Phalloidin

Zur Visualisierung von polymerisiertem Aktin wurden Paraffinschnitte nach Entparaffinisierung kurz mit PBS gewaschen und diese mit TRITC-markiertem Phalloidin

(1:200) und DAPI in PBS für ca. 10 min bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit 1% PFA für 5 min nachfixiert und mit Gelvatol eingedeckt.

2.2.4.3 L-DOPA histochemische Färbung von Melanozyten

Zur Färbung von Melanozyten kann diese einfache histochemische Färbung eingesetzt werden. Hierzu werden Kryoschnitte in einer Lösung von L-DOPA inkubiert. Das aufgenommene L-DOPA wird von dem in den Schnitten vorhandenen Enzym Tyrosinase umgesetzt und es entsteht eine bräunliche Färbung in den Bereichen, in denen Tyrosinase-Aktivität besteht [Laidlaw & Blackberg, 1932]. Durch eine Färbung mit L-DOPA kann somit eine Aussage über die *in vivo* Aktivität von Tyrosinase getroffen werden.

Nachdem Kryoschnitte mit 4% PFA/PBS für zwei Stunden fixiert wurden, wurden diese nach kurzem Waschen in ddH₂O für 45 min in einer L-DOPA-Lösung (1 mg/ml) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung gegen frische L-DOPA-Lösung ersetzt und die Schnitte für weitere drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach kurzem Waschen in Leitungswasser wurde eine H&E-Gegenfärbung nach einem Standardprotokoll durchgeführt und die Schnitte in Entellan eingebettet.

2.2.4.4 Tyramide-basierter Tyrosinase-Aktivitätsassay (TTA-Assay)

Der TTA-Assay stellt eine weitere Methode dar, die von Han *et al.*, 2002 beschrieben wurde und zur Bestimmung der Tyrosinase-Aktivität herangezogen werden kann. Sie basiert auf einer Fluoreszenzdetektion der Tyrosinase-Aktivität mit Hilfe des kommerziellen *TSA Kits* von Perkin Elmer, Waltham (MA, USA). Die Durchführung des Assays auf Kryoschnitten erfolgte laut dem in Han *et al.*, 2002 beschriebenen Protokoll.

2.2.4.5 Detektion von apoptotischen Zellen mittels TUNEL-Assay

Um apoptotische Zellen zu detektieren, wurde ein Fluoreszenz-basierter Assay eingesetzt, der auf einer enzymatischen Fluoreszenzmarkierung offener DNA Enden beruht. Diese entstehen während des Apoptoseprozesses im Zellkern. Zur Detektion dieser offenen DNA-Enden wurde das kommerzielle Kit *DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System* der Firma Promega, Mannheim eingesetzt. Der Assay wurde laut der beiliegenden Vorschriften für die Durchführung auf Paraffinschnitten oder auf Zellkulturen ausgeführt.

2.2.4.6 Fixierung der Hautproben für die Transmissionselektronenmikroskopie und die Semidünnschnittanalyse

Die entnommenen Hautproben wurden im direkten Anschluss an die Biopsie in die Fixierlösung (2% PFA/PBS, pH7,4 und 2% Glutardialdehyd in 0,1M Cacodylatpuffer, pH 7,4; erhalten von AG Bloch) gegeben und für ca. 8 h bei RT fixiert und anschließend nach Standardprotokollen der Arbeitsgruppe von Prof. W. Bloch (Köln) an der Sporthochschule Köln eingebettet, geschnitten und für die transmissionselektronenmikroskopische Analyse oder die Analyse in Semidünnschnitten angefärbt.

2.2.5 Maus *in vivo* Experimente

2.2.5.1 *In vivo* BrdU Injektion

Für den *in vivo* Nachweis von proliferierenden Zellen durch Einbau von BrdU während der Zellteilung wurden 100 µl BrdU-Lösung (3,2 mg/200 µl in PBS) intraperitoneal in Jungtiere injiziert. Nach zwei Stunden wurden die behandelten Tiere getötet und Hautproben für die Analyse in Paraffinschnitten entnommen.

2.2.5.2 *In vivo* Bestrahlung von Mäusen mit UVB

Zur Bestrahlung der Mäuse mit UVB wurde die Rückenhaut zunächst durch Rasieren von Haaren befreit, die Tiere durch intraperitoneale Injektion von ca. 200 µl Narkoselösung (10 mg/ml Ketavet, 0,1% Rompun in 0,9% NaCl) betäubt. Anschließend wurde der zu bestrahlende Bereich (2 cm x 2 cm) durch Auflegen einer angefertigten Schablone aus Aluminiumfolie markiert und die Tiere mit einer Breitband-UVB-Lampe (Teilkörper UV-Therapiesystem TP-4 mit Waldmann UV-6 UVB-Röhren, Herbert Waldmann GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen) mit einer Dosis von 1000 mJ/cm² bestrahlt, wobei der nicht zu bestrahlende Bereich mit der Schablone aus Aluminiumfolie abgedeckt wurde. Während der Zeit der Narkose wurden die Augen der Tiere mit Augensalbe (Bayer HealthCare AG, Leverkusen) gegen Austrocknung geschützt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung wurden die Tiere getötet und sowohl Hautproben aus dem bestrahlten und einem benachbarten unbestrahlten Areal entnommen und für die Analyse in Paraffin- und Kryoschnitten eingebettet.

2.2.6 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse der erhobenen Daten wurde das Programm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla (CA, USA)) eingesetzt. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe eines Student's T-Test oder eines Mann-Whitney-U-Test.

3 Ergebnisse

3.1 Rac1 Rescue Mäuse als Modell zur Analyse suprabasaler Rac1 Funktionen

Zur Analyse der Auswirkungen der Defizienz von Rac1 in den differenzierten Anteilen der Epidermis und der Haarfollikel wurde die Rac1-Aktivität in der Basalzellschicht von Rac1 E-KO Mäusen durch den Einsatz L61Rac1 transgener Mäuse wiederhergestellt. L61Rac1 transgene Mäuse wurden bereits im Rahmen einer vorangegangenen Doktorarbeit generiert und exprimieren unter der Kontrolle eines trunkierten humanen K14-Cre Promotors eine Punktmutante von Rac1 mit konstitutiv aktiven Eigenschaften. Diese wurde durch einen Ersatz der Aminosäure Glutamin durch Leucin an Position 61 hergestellt. Der Rac1-Mutante ist in der Expressionskassette zusätzlich eine Kozak-Sequenz und sowie ein Myc-Tag zum einfachen Nachweis des TGs voranglagert. Nachgeschaltet befindet sich außerdem eine SV40 Poly-A-Sequenz, die für die Expression im eukaryontischen System notwendig ist. Der mittlere L61Rac1 enthaltende Teil kann durch Verdau mit XbaI und ClaI aus der Expressionskassette isoliert werden (siehe Abb. 3-1a). Durch eine konstruktsspezifische PCR konnte das TG bereits eindeutig auf genomischer Ebene nachgewiesen werden (Abb. 3-1b). L61Rac1 transgene Mäuse zeigen sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch keine phänotypischen Veränderungen. Sie zeigen weder gesundheitliche Beeinträchtigungen noch Größenunterschiede oder Veränderungen in Haut und Haaren sowie keine Unterschiede in der Kompartimentierung und Struktur von L61Rac1 transgener Haut und Haaren.

Um die Lokalisation und die Aktivität des Konstrukts nachzuweisen, wurde zunächst damit begonnen, die L61Rac1 transgene Tiere genauer zu charakterisieren. Fluoreszenzfärbung des enthaltenden Myc-Tags zeigte eine Expression des Konstrukts in der Basalzellschicht der Epidermis (Abb. 3-1c). Aufgrund der Struktur der Haarfollikel war es jedoch nicht möglich, die basale Expression des TGs in der äußeren Haarwurzelscheide nachzuweisen. Die Expression in der IFE lässt jedoch vermuten, dass die Expression des TGs im Haarfollikel auf die äußere Haarwurzelscheide beschränkt ist. Die Funktionalität und Aktivität des Konstrukts wurde auf Proteinebene in Epidermisproben neugeborener Mäuse durch einen Rac1 Pull-Down Assay analysiert, der spezifisch aktives, d.h. GTP gebundenes, Rac1 nachweist (Abb. 3-1d, oben). In der Pull-Down Fraktion war in L61Rac1 transgenen Epidermisproben eine starke TG-Bande bei ca. 23 kDa zu erkennen, die in der Kontrolle nicht nachgewiesen werden konnte. Außerdem zeigte sich im Vergleich zu der untersuchten Kontrolle eine starke Anreicherung des aktiven Rac1 in den transgenen Epidermisproben, die die Funktionalität des Konstrukts bestätigt. Auch *in vitro* konnte die Expression und Funktionalität des L61Rac1-Konstrukts in primären Keratinozyten durch Anwendung eines Rac1 Pull-Down Assays nachgewiesen werden (siehe Abb. 3-1d, unten).

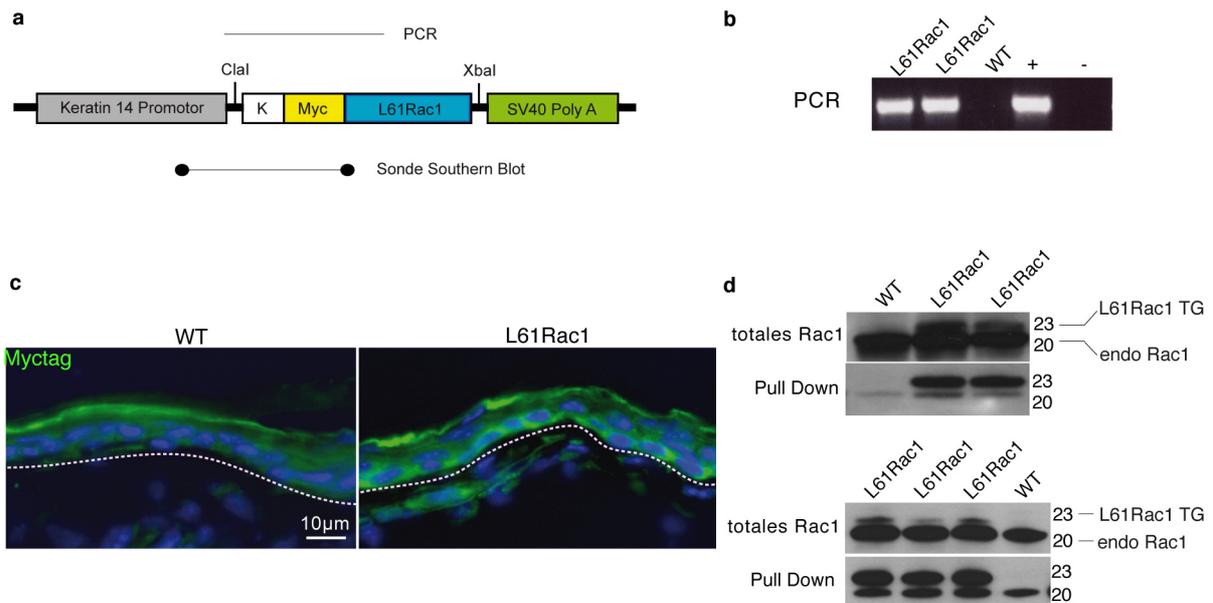


Abbildung 3-1: Charakterisierung der konstitutiv aktiven L61Rac1 Mutante. (a) Schematische Darstellung des K14-L61Rac1-Konstrukts mit den jeweiligen Hybridisierungsstellen für PCR-Primer und die DNA-Sonde des Southern Blots sowie der umgebenden Restriktionsstellen (K: Kozak-Sequenz, Myc: Myctag) (b) Nachweis der Integration des TGs in das Mausgenom durch PCR. (+: Positivkontrolle, -: Negativkontrolle) (c) Nachweis der *in vivo* Expression des TGs in der Basalzellschicht der Epidermis. Skalierungsbalken: 10 µm. (d) Nachweis der Expression und Funktionalität des L61Rac1-Konstrukts in Epidermisproben (oben) und primären Keratinozyten (unten) durch Rac1 Pull-Down Analyse.

Konstitutiv aktive L61Rac1 transgene Mäuse wurden mit Mäusen mit einer Epidermis-spezifischen Deletion von Rac1 (Rac1 E-KO), die durch einen Verlust des Fells gekennzeichnet sind, gekreuzt, um in diesen spezifisch die basale Expression von Rac1 in der IFE und dem Haarfollikel wiederherzustellen. Hierzu wurden die von Chrostek *et al.*, 2006 beschriebenen Rac1-*flox* Mäuse verwendet (siehe Kapitel 1.6.2). Statt der von ihnen verwendeten Cre-Rekombinase, die an einen trunkierten Keratin 5-Promotor gekoppelt ist, wurde von uns ein K14-Cre Rekombinase-Konstrukt eingesetzt, um eine Deletion von *rac1* in allen Schichten der Epidermis und des Haarfollikels zu erreichen. Der Einsatz von K14-Cre hat in ersten Analysen zu einem stärkeren Phänotyp der Rac1 E-KO Mäuse geführt (vgl. Abb. 3-2a) als der Einsatz des K5-Cre-Konstrukts.

Um der Fragestellung nachzugehen, ob das Haarwachstum durch die Expression von L61Rac1 im basalen Kompartiment der Epidermis wiederhergestellt werden kann, wurden Rac1 E-KO Mäuse mit L61Rac1 transgenen Mäusen gekreuzt. Dadurch wurde die nach *rac1*-Deletion verlorene Aktivität von Rac1 in den Basalzellen der Epidermis und in der äußeren Haarwurzelscheide der Haarfollikel wiederhergestellt. Der Phänotyp der aus dieser Kreuzung resultierenden Rac1 Rescue Mäuse (L61Rac1 Rac1 E-KO) zeigte, dass durch basale Expression des konstitutiv aktiven L61Rac1 TGs in Rac1 Rescue Mäusen der Verlust des Fells aufgehoben werden kann. Bereits im Alter von 10 Tagen p.p. war in Rac1 Rescue

Mäusen makroskopisch ein Wachstum der Haare erkennbar, wohingegen in Rac1 E-KO Mäusen kein Wachstum der Haare festzustellen war (siehe Abb. 3-2a). Zum Nachweis der TG-Expression in Rac1 Rescue Mäusen sowie der vollständigen Deletion von endogenem Rac1 wurde deren Expression und Aktivität in einem Rac1 Pull-Down Assay untersucht. Die Analyse des L61Rac1 TGs zeigt eine starke Anreicherung des TGs in der aktiven Rac1 Fraktion in L61Rac1 transgenen Kontrollen sowie in Rac1 Rescue Mäusen an Tag 5 p.p. (siehe Abb. 3-2b). In Rac1 Rescue Mäusen konnte außerdem eine Reduktion von endogenem Rac1 in der Pull-Down Fraktion nachgewiesen werden, was die Deletion von Rac1 in Rac1 Rescue Mäusen bestätigt. In Rac1 E-KO Mäusen konnte an Tag 2 p.p. kein aktives Rac1 nachgewiesen werden, wohingegen totales Rac1 erst an Tag 10 p.p. nicht mehr nachweisbar war (vgl. Abb. 3-2b). An Tag 28 p.p. wiesen Rac1 Rescue Mäuse im Vergleich zu Rac1 E-KO Mäusen, die zu diesem Zeitpunkt durch einen fast vollständigen Verlust des Fells bis auf ein paar wenige Haare gekennzeichnet sind, ein komplettes Fellkleid. Dieses weist jedoch interessanterweise ein im Vergleich zu den Kontrollen verändertes Erscheinungsbild auf, das an Tag 28 p.p. besonders deutlich zu erkennen war (vgl. Abb. 3-2a).

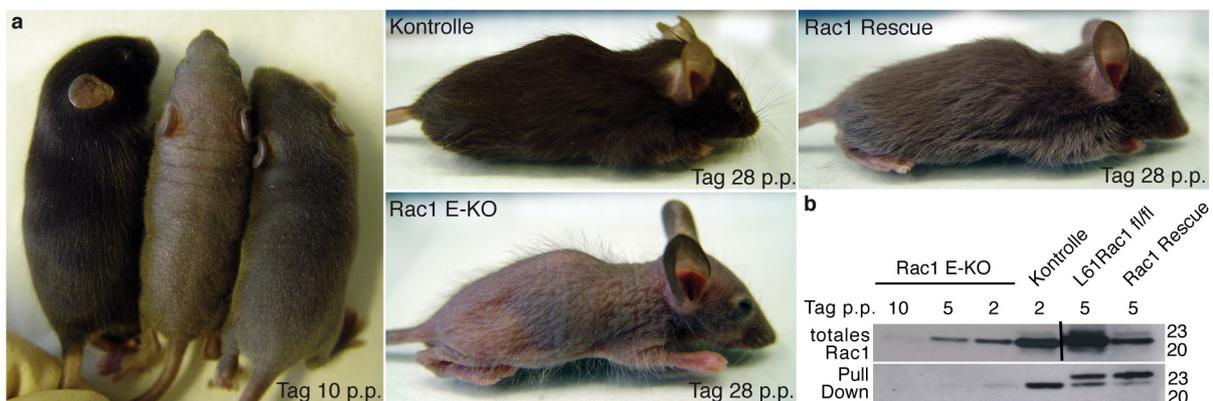


Abbildung 3-2: Wiederherstellung des Haarwachstums in Rac1 Rescue Mäusen. (a) Makroskopischer Phänotyp von Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren im Alter von 10 Tagen p.p. (links) und 28 Tagen p.p. (rechts) in einem gemischten genetischen Hintergrund. (b) Rac1 Pull-Down Analyse zum Nachweis der Deletion von totalem und aktivem endogenem Rac1 sowie der Transgenexpression zu verschiedenen postnatalen Zeitpunkten sowohl in Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen als auch in Kontroll- und L61Rac1 transgenen Tieren.

Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse wurden an Tieren, die aus einem gemischten Hintergrund aus C57Bl/6 und C3H/He Mäusen stammten, durchgeführt. Um auszuschließen, dass die beobachteten Veränderungen im Erscheinungsbild des Fells eine Folge des gemischten Hintergrunds darstellen, wurden die genetisch veränderten Mausmodelle über mehrere Generationen in einen reinen C57Bl/6 Hintergrund zurückgekreuzt. Diese Rac1 Rescue Tiere weisen einen vergleichbaren Phänotyp wie die analysierten Tiere in einem

gemischten Hintergrund auf (siehe Abb. 3-3a). Deshalb ist ein Einfluss des genetischen Hintergrunds auf den beobachteten Phänotyp ausgeschlossen.

Eine Veränderung des Rac1-abhängigen Signalwegs durch Expression des L61Rac1 TGs könnte auch Effekte auf Signalwege anderer Rho-GTPasen besitzen, denn wie verschiedene Studien gezeigt haben, können GTPasen der Rho-Familie ihre Aktivierung bzw. Inaktivierung untereinander beeinflussen [Nobes & Hall, 1995a; Sander *et al.*, 1999]. Um auszuschließen, dass das Wachstum der Haare in Rac1 Rescue Mäusen einen unspezifischen Effekt der Expression des konstitutiv aktiven L61Rac1 TGs durch Beeinflussung anderer Rho-GTPasen darstellt, wurden zusätzlich Rac1 E-KO Mäuse mit in unserem Labor verfügbaren dominant negativen N17Rac1 transgenen Mäusen gekreuzt. Diese Tiere zeigen einen Phänotyp, der makroskopisch mit Rac1 E-KO Mäusen vergleichbar ist (siehe Abb. 3-3b). Der makroskopische Phänotyp von N17Rac1 Rac1 E-KO Mäusen weist darauf hin, dass das Wachstum der Haare in Rac1 Rescue Mäusen keinen unspezifischen Effekt des L61Rac1 TGs darstellt und dass eine funktionale Aktivität von Rac1 erforderlich ist, um den Phänotyp der Rac1 Rescue Mäuse zu erhalten.

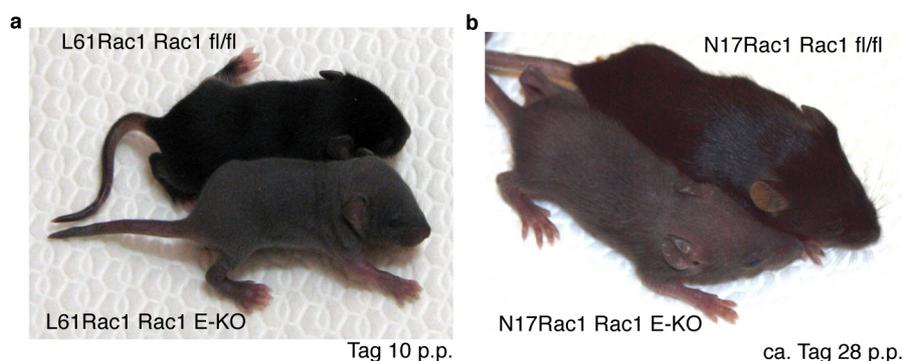


Abbildung 3-3: Makroskopischer Phänotyp von Rac1 Rescue Mäusen in einem C57Bl/6 Hintergrund (a) und N17Rac1 Rac1 E-KO Mäusen (b). Abbildungsteil a zeigt den Phänotyp einer 10 Tage alten Rac1 Rescue Maus im Vergleich zu einer K14-Cre-negativen Kontrollmaus in einem C57Bl/6 Hintergrund; Abbildungsteil b den Phänotyp einer N17Rac1 transgenen Rac1 E-KO Maus im Vergleich zu einer K14-Cre-negativen Kontrolle ungefähr an Tag 28 p.p..

Das durch die basale Expression von L61Rac1 induzierte Haarwachstum und das veränderte Erscheinungsbild des Fells in Rac1 Rescue Mäusen wirft eine Reihe von Fragen auf, die mit Hilfe der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen beantwortet werden sollen:

1. Ist die basale Expression von L61Rac1 ausreichend, um die Bildung normaler, vollständig differenzierter Haare zu induzieren? Wenn nicht, welche Abnormitäten weisen die Haare von Rac1 Rescue Mäusen auf?

2. Ist das Wachstum der Haare in Rac1 Rescue Mäusen normal?
3. Beeinflusst der Verlust der Rac1-Expression selektiv bestimmte Haartypen?
4. Führt der Verlust von endogenem Rac1 in den suprabasalen Anteilen der Epidermis der Rac1 Rescue Mäuse zu Veränderungen in der Differenzierung der IFE?
5. Welchen Einfluss besitzt der suprabasale Verlust von Rac1 auf die Stammzeleigenschaften *in vivo* und *in vitro*?
6. Ist die Haarmorphogenese in Rac1 Rescue Mäusen beeinflusst?
7. Sind die Veränderungen in dem Erscheinungsbild des Fells in Rac1 Rescue Mäusen auf Veränderungen in der Haarstruktur und/oder der Pigmentierung zurückzuführen?
8. Wie wurde der Verlust des Fells in Rac1 E-KO Mäusen ausgelöst?

3.2 Phänotypische Charakterisierung von Rac1 Rescue Mäusen

3.2.1 Morphologische Veränderungen in der Haarfollikelstruktur von Rac1 Rescue Mäusen

Zur Beantwortung der Frage, ob die makroskopischen Veränderungen im Fell von Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen auf Veränderungen in der Haarfollikelstruktur zurückzuführen sind, wurden Hautproben von 10 Tage alten Mäusen nach Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) histologisch untersucht (siehe Abb. 3-4).

Im Vergleich zu Kontroll- und L61Rac1 transgenen Tieren, die voll ausgebildete Anagen-Haarfollikel aufwiesen, waren in Rac1 E-KO Mäusen an Tag 10 p.p. keine intakten Haarfollikel zu erkennen. Fast alle Haarfollikel waren zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig degradiert. Durch die TG-vermittelte Expression der konstitutiv aktiven Rac1-Mutante in der Basalzellschicht von Rac1 Rescue Mäusen konnte, wie in Abbildung 3-4 zu erkennen ist, die Haarfollikelstruktur wiederhergestellt werden bzw. eine Degradierung der Haarfollikel, wie sie in Rac1 E-KO Mäusen zu finden ist, unterbunden werden. Jedoch zeigten die Haarfollikel von Rac1 Rescue Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine veränderte Struktur. Die Haarbulbi der Rac1 Rescue Mäuse schienen schmaler zu sein und auch die typische angewinkelte Struktur im unteren Bereich des Haarfollikels, die in Kontroll- und L61Rac1 transgenen Mäusen zu erkennen ist, schien in Rac1 Rescue Mäusen verloren. Außerdem schien auch die Länge der Haarfollikel im Vergleich zu den gleichaltrigen Kontrolltieren und L61Rac1 transgenen Tieren reduziert zu sein.

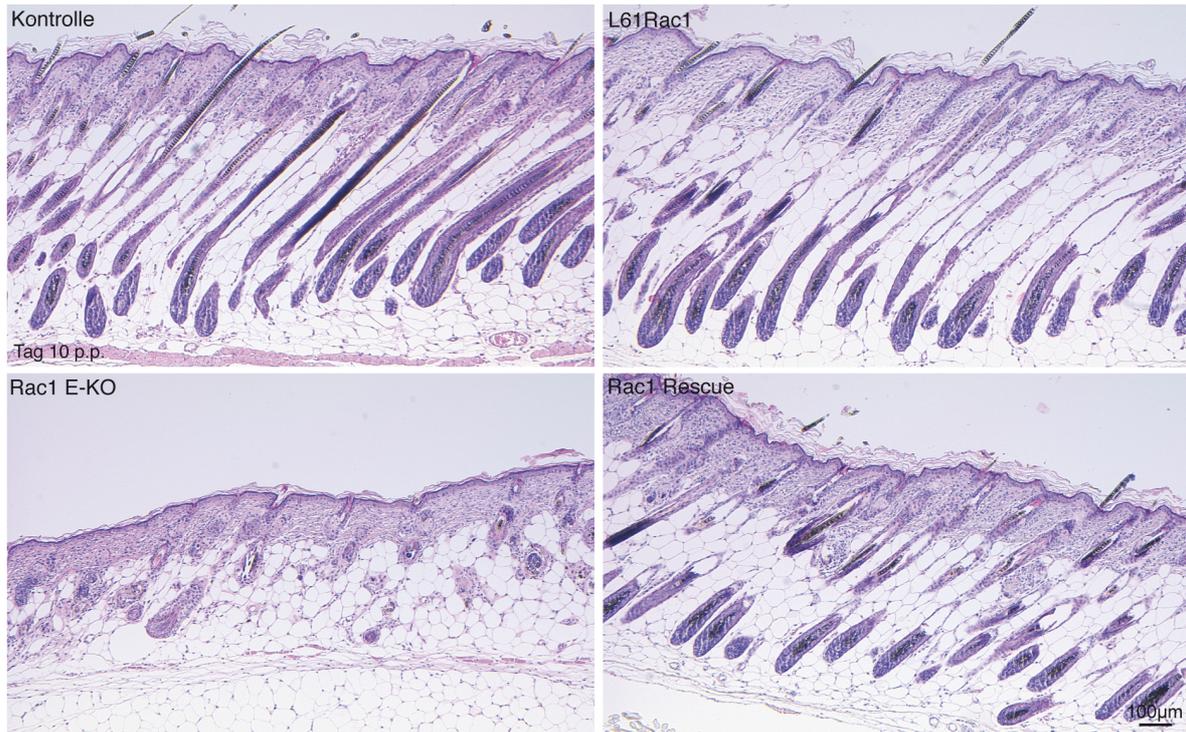


Abbildung 3-4: Histologische Darstellung der Haarfollikelstruktur an 10 Tage alten Mäusen. Die Haarfollikelstruktur wurde an H&E-gefärbten Paraffinschnitten von gleich alten Kontroll- und L61Rac1 transgenen Tieren sowie von Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen untersucht. Skalierungsbalken: 100 µm.

Um die beschriebenen Veränderungen der Haarfollikel zu quantifizieren, wurden die Parameter Haarfollikellänge und die Dichte der Haarfollikel untersucht. Die Quantifizierung der Haarfollikeldichte ergab keine Unterschiede zwischen Rac1 Rescue Mäusen und den untersuchten L61Rac1 transgenen sowie den homozygot geflochten Kontrolltieren, was darauf hindeutet, dass durch basale Expression von konstitutiv aktivem Rac1 die Degradierung der Haarfollikel vollständig verhindert werden kann und die Expression des TGs nicht zu einer *de novo*-Anlage von Haarfollikeln führt. Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass Rac1 eine Funktion in der Induktion der Haarfollikelplakoden während der Morphogenese übernimmt. Lediglich in Rac1 E-KO Mäusen konnte eine signifikante Reduktion der Haarfollikeldichte gemessen werden (vgl. Abb. 3-5a), die vermutlich auf die bereits stark fortgeschrittene Zerstörung der Haarfollikel zurückzuführen ist. Eine Untersuchung der Haarfollikeldichte an Tag 1 p.p. ergab keine Unterschiede zwischen Rac1 E-KO, Rac1 Rescue und den untersuchten Kontrollmäusen (nicht dargestellt).

Aufgrund der starken Zerstörung der Haarfollikel in Rac1 E-KO Mäusen wurde bei der Analyse der Haarfollikellänge auf eine Quantifizierung dieser Tiere verzichtet. Die Quantifizierung der Rac1 Rescue Haarfollikel zeigte jedoch eine statistisch signifikante Reduktion der Haarfollikellänge (siehe Abb. 3-5b). Da die Längenentwicklung der Anagen-

Haarfollikel entscheidend durch die Proliferationsaktivität der Matrixkeratinozyten im Haarbulbus beeinflusst wird [Stenn & Paus, 1999; Magerl *et al.*, 2001; Legue & Nicolas, 2005], könnte eine verringerte Proliferation im Haarbulbus die Reduktion der Haarfollikellänge ausgelöst haben.

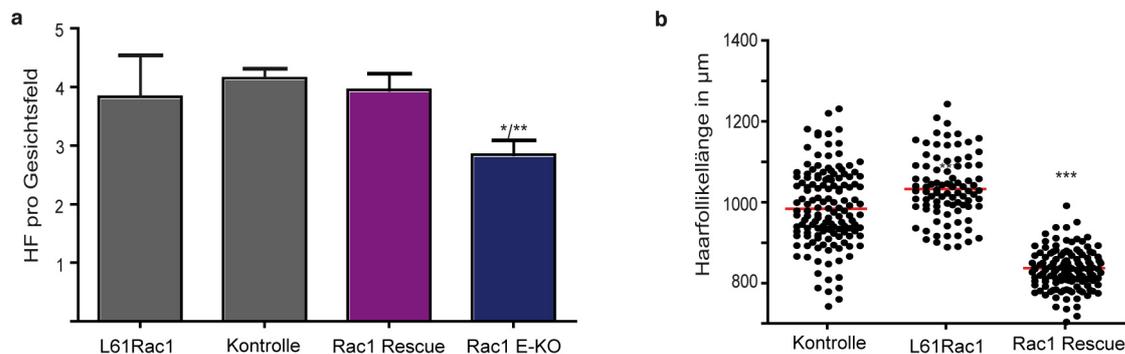


Abbildung 3-5: Untersuchung der Haarfollikelcharakteristika Haarfollikeldichte (a) und Haarfollikellänge (b) an Tag 10 p.p. (a) Analyse der Haarfollikeldichte in Rac1 E-KO, Rac1 Rescue, L61Rac1 und Kontrollmäusen pro Gesichtsfeld bei 100-facher Vergrößerung in 10 Gesichtsfeldern je Maus (n= 3-7). Zur Analyse wurden nur Haarfollikel herangezogen, die im jeweiligen Anschnitt in der Epidermis enden. (b) Bestimmung der Haarfollikellänge erfolgte bei 50-facher Vergrößerung in Kontroll-, L61Rac1 transgenen sowie Rac1 Rescue Mäusen. Dargestellt ist die Länge aller gemessenen Haarfollikel inklusive des ermittelten Mittelwerts (roter Balken) (n= 89-139 Haarfollikel, 5-9 Mäuse). Mittelwert (b) \pm SEM (a), statistische Analyse mittels Mann Whitney Test (a), * $p < 0,05$ (Kontrolle vs. Rac1 E-KO), ** $p < 0,01$ (Rac1 Rescue vs. Rac1 E-KO) bzw. Student's t-Test (b), *** $p < 0,001$ (Kontrolle, L61Rac1 vs. Rac1 Rescue).

Aus diesem Grund wurde einen Tag früher, an Tag 9 p.p., die BrdU-Inkorporation in die Keratinozyten der Haarbulbi nach zweistündiger Inkubationszeit als Maß für die Proliferationsaktivität untersucht (vgl. Abb. 3-6). Bereits die Fluoreszenzaufnahmen der Haarbulbi ließen vermuten, dass die Anzahl der BrdU-positiven Keratinozyten im Haarbulbus reduziert ist. Daher wurde eine Quantifizierung der BrdU-positiven Zellkerne in den Haarbulbi vorgenommen. Auf eine Quantifizierung von Rac1 E-KO Bulbi wurde verzichtet, da eine solche Untersuchung aufgrund der massiven Haarfollikeldegradierung kein eindeutiges Ergebnis geliefert hätte (siehe Abb. 3-6). Die Quantifizierung der BrdU-positiven Kerne in den Haarbulbi von Kontroll-, L61Rac1 transgenen sowie Rac1 Rescue Mäusen zeigte eine hoch signifikante Reduktion in der mittleren Anzahl an BrdU-positiven Kerne pro Bulbus (siehe Abb. 3-6, rechts). Daher könnte die reduzierte Proliferation in den Rac1 Rescue Haarbulbi an Tag 9 p.p. für die reduzierte Haarfollikellänge an Tag 10 p.p. verantwortlich sein.

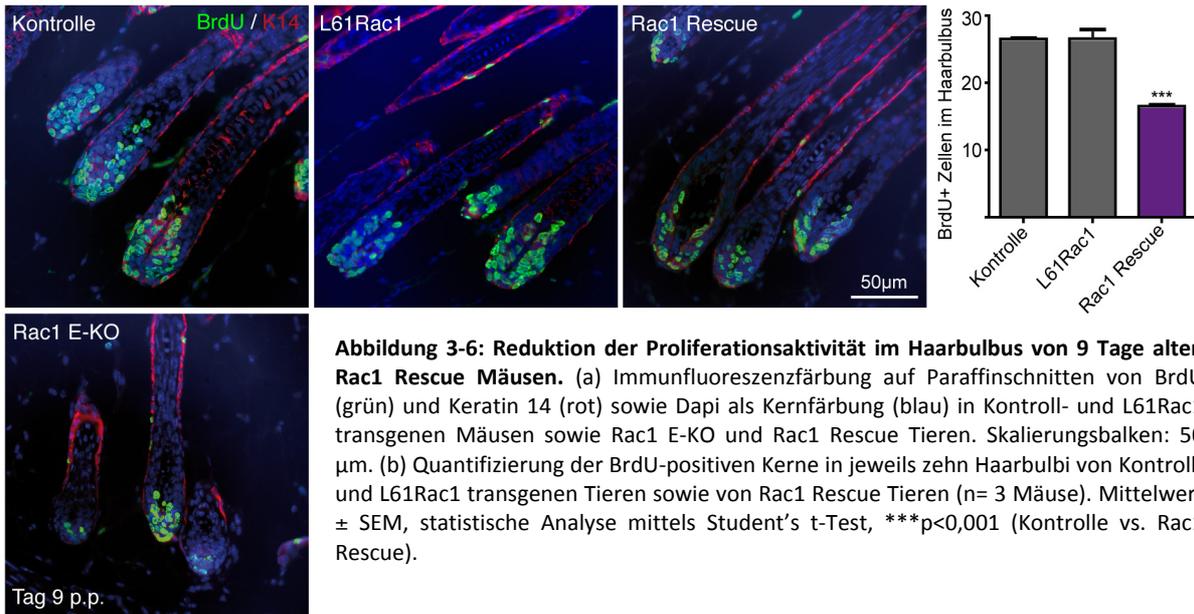


Abbildung 3-6: Reduktion der Proliferationsaktivität im Haarbulbus von 9 Tage alten Rac1 Rescue Mäusen. (a) Immunfluoreszenzfärbung auf Paraffinschnitten von BrdU (grün) und Keratin 14 (rot) sowie Dapi als Kernfärbung (blau) in Kontroll- und L61Rac1 transgenen Mäusen sowie Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Tieren. Skalierungsbalken: 50 µm. (b) Quantifizierung der BrdU-positiven Kerne in jeweils zehn Haarbulbi von Kontroll- und L61Rac1 transgenen Tieren sowie von Rac1 Rescue Tieren (n= 3 Mäuse). Mittelwert ± SEM, statistische Analyse mittels Student's t-Test, ***p<0,001 (Kontrolle vs. Rac1 Rescue).

Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Expression von Rac1 in den suprabasalen Schichten des Haarfollikels einen entscheidenden Einfluss auf die Haarfollikelmorphologie besitzt. Ich konnte zeigen, dass die Expression von Rac1 in den differenzierten Anteilen des Haarfollikels dessen Elongation durch Regulation der Proliferation der Keratinozyten des Haarbulbus beeinflusst.

3.2.2 Keine Beeinflussung der Differenzierung der IFE in Rac1 Rescue Mäusen

Zur Charakterisierung möglicher Veränderungen in der epidermalen Differenzierung wurde die Expression von Keratin 14 als Marker für basale Keratinozyten sowie Keratin 10 für suprabasale Zellen der IFE analysiert [Fuchs & Green, 1980; Tseng *et al.*, 1982]. Die Untersuchung der Marker wurde an Tag 10 p.p. durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt endogenes Rac1 in Rac1 E-KO Mäusen nicht mehr nachweisbar ist und der Phänotyp von Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen bereits deutlich makroskopisch zu erkennen ist.

Die Untersuchung der Expression beider Marker zeigte keine Veränderung in der Expression oder Lokalisation von Keratin 14 (siehe Abb. 3-7, oben) und Keratin 10 (siehe Abb. 3-7, unten). Dies stimmt mit den in Chrostek *et al.*, 2006 beschriebenen Ergebnissen überein, die nach der Epidermis-spezifischen Deletion von Rac1 durch Keratin 5-Cre keine Veränderungen in der Differenzierung der IFE feststellen konnten. Die Analyse in Keratin 14-Cre deletierten Rac1 E-KO sowie Rac1 Rescue Mäusen bestätigt, dass die Expression von Rac1 für die Differenzierung der IFE von untergeordneter Rolle ist.

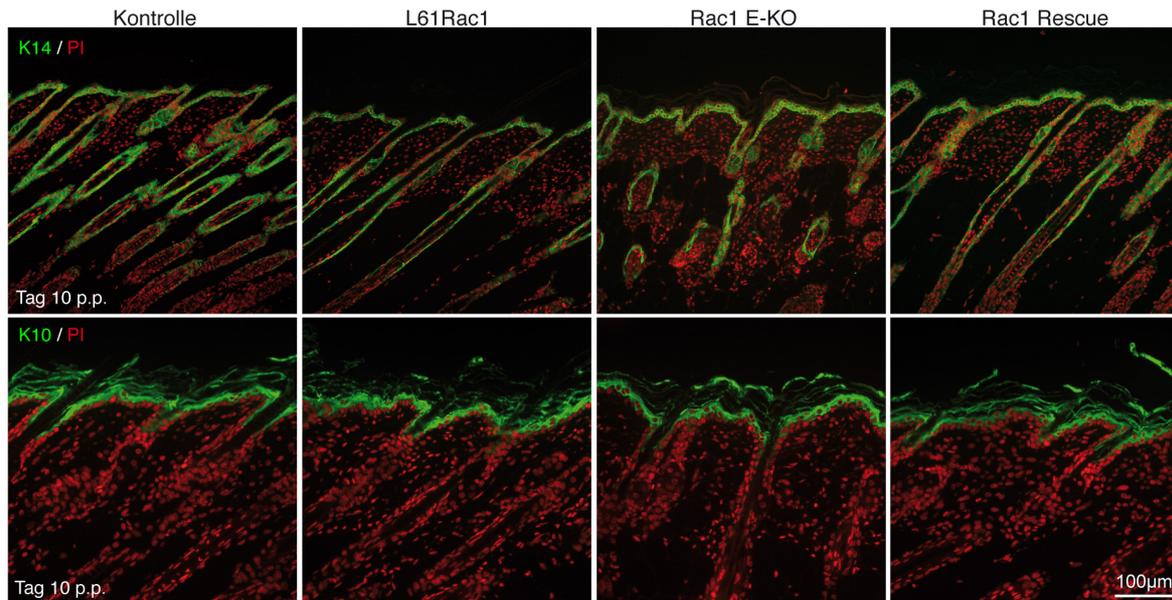


Abbildung 3-7: Untersuchung der epidermalen Differenzierung an Tag 10 p.p. in Kontroll-, L61Rac1 transgenen Mäusen sowie Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen. Die Abbildung zeigt die Expression des Basalzellschichtmarkers Keratin 14 (grün) (obere Reihe) und die Expression von Keratin 10 als Marker für differenziertere suprabasale Schichten (grün) (untere Reihe) sowie eine Kernfärbung mit PJ (rot). Skalierungsbalken: 100 µm.

3.2.3 Untersuchung epidermaler Stammzellpopulationen *in vivo* und deren klonalen Eigenschaften *in vitro*

Nach dem derzeit gültigen Modell wird angenommen, dass sich die Stammzellen des Haarfollikels hauptsächlich in der Bulge-Region befinden [Cotsarelis *et al.*, 1990]. Dort ist durch Expression von verschiedenen Molekülen eine optimale Nische für diese Zellpopulationen geschaffen, die einen Erhalt der Stammzeleigenschaften begünstigt und eine Differenzierung dieser Zellen unterdrückt [Taylor *et al.*, 2000; Ezhkova *et al.*, 2009]. In der Literatur sind mittlerweile verschiedene Proteine beschrieben, die als Marker für diese Region herangezogen werden können. Zu den bis heute am besten charakterisierten Markern gehören Keratin 15 [Lyle *et al.*, 1998; Lyle *et al.*, 1999], dessen Expression jedoch in frühen Entwicklungsstadien nicht auf die Bulge-Region beschränkt ist, und CD34 [Trempeus *et al.*, 2003], der bisher als genauester Marker für die Bulge-Region angesehen wird.

In den letzten Jahren wurde in mehreren Publikationen die wichtige Funktion von Rac1 in der Aufrechterhaltung der Stammzellpopulationen bzw. dessen Wichtigkeit für den Erhalt der Stammzeleigenschaften im Haarfollikel demonstriert [Benitah, 2005; Benitah & Watt, 2007; Castilho *et al.*, 2007].

Aus diesem Grund wurde überprüft, ob die Aktivität von Rac1 im Keratin 14-exprimierenden Kompartiment ausreichend ist, um einen Erhalt der Stammzellen zu ermöglichen. Da an Tag

10 p.p. jedoch keine spezifischen Marker für die Bulge-Region existieren, wurde die Analyse der Haarfollikelstammzellen an Tag 28 p.p. durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Haarfollikel im Telogen-Stadium, in dem die Bulge-Region gut zu erkennen ist. In den untersuchten Kontrolltieren und L61Rac1 transgenen Tieren (nicht dargestellt) war die Expression von sowohl Keratin 15 als auch CD34 deutlich zu erkennen (siehe Abb. 3-8a). Im Gegensatz dazu war die Expression dieser beiden Bulge-Marker in Rac1 E-KO Mäusen stark reduziert (Abb. 3-8a). Durch basale Expression des L61Rac1 TGs wurde die Expression beider Marker in der Bulge-Region wieder erhöht. Für den Marker Keratin 15 zeigte sich, dass in Rac1 Rescue Mäusen nur die Expression in der Bulge-Region wiederhergestellt werden kann, jedoch nicht die in den Kontrollen an Tag 28 p.p. noch in der IFE vorhandene Expression von Keratin 15 (siehe Abb. 3-8a). Eine Expression von Keratin 15 in der IFE wurde bisher jedoch nicht primär mit den Vorläuferzellen der IFE assoziiert, sondern vielmehr mit denen der Bulge-Region [Liu *et al.*, 2003; Stachelscheid *et al.*, 2008]. Eine direkte Zerstörung der Bulge-Stammzellen im Zuge der beobachteten Haarfollikel-degradierung kann ausgeschlossen werden, da, wie von Chrostek *et al.*, 2006 beschrieben, nur der nicht-permanente Teil des Haarfollikels in Rac1 E-KO Mäusen zerstört wird, die Bulge-Region jedoch im permanenten Teil des Haarfollikels lokalisiert ist.

Um zu überprüfen, ob Stammzellen nach epidermaler Rac1-Deletion verloren gehen oder lediglich die Expression der spezifischen Bulge-Marker durch Rac1 beeinflusst wird, wurden die klonalen Eigenschaften primärer Keratinocyten im Koloniebildungsassay *in vitro* untersucht. Hierzu wurde eine definierte Anzahl an Zellen je Zelllinie ausplattiert und nach einer ausreichenden Wachstumszeit der Parameter Koloniefläche analysiert, der Aufschluss über das Potential möglicher Zellteilungen dieser Zellen zulässt [Jensen *et al.*, 2010]. Epidermale Stammzellen besitzen ein hohes Klonogenitätspotential, da diese eine große Anzahl an Zellteilungen durchlaufen müssen, um eine kontinuierliche Erneuerung des Gewebes zu gewährleisten [Jones & Watt, 1993; Rochat *et al.*, 1994]. Sie bilden im Koloniebildungsassay besonders große Kolonien. Da die Kolonien, die in einem solchen Assay gebildet werden, möglicherweise von den Stammzellen der Haarfollikel abstammen und nicht von Vorläuferzellen der IFE gebildet werden [Langton *et al.*, 2008], ist dieser Assay geeignet, um einen direkten Einfluss von Rac1 auf die Stammzeleigenschaften der Bulge-Region zu untersuchen.

Zur Auswertung der Koloniebildungsassays wurden, wie in Abbildung 3-8b und c dargestellt, zwei Auswertemethoden herangezogen. Zunächst wurde ein Größenverteilungsprofil⁷ der

⁷ Zur Erstellung eines Größenverteilungsprofils wurden die einzelnen Kolonien zunächst ihrer Größe nach sortiert, durchnummeriert und deren Rang (n) innerhalb der Gesamtzahl der Kolonien (n_{total}) bestimmt. Um eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Gesamtkolonienzahlen zu gewährleisten, wurde die prozentuale Rangordnung der Kolonien bestimmt. Dadurch ergab sich $x = n/n_{\text{total}} * 100$.

Kolonien, wie in Stachelscheid *et al.*, 2008 dargestellt, erstellt. Eine solche Darstellung ermöglicht auf einen Blick eine Aussage über das Vermögen der Zellen zur Bildung verschiedener Koloniegrößen. Die durch eine solche Auftragung erzeugte Kurve zeigt in Wildtypzellen einen flachen, gleichmäßigen Verlauf, der jedoch im letzten Abschnitt (5-10%) in einen starken Anstieg der Koloniefäche übergeht. Es wird angenommen, dass es sich bei dieser Population um Stammzellen mit einem großen proliferativen Potential handelt.

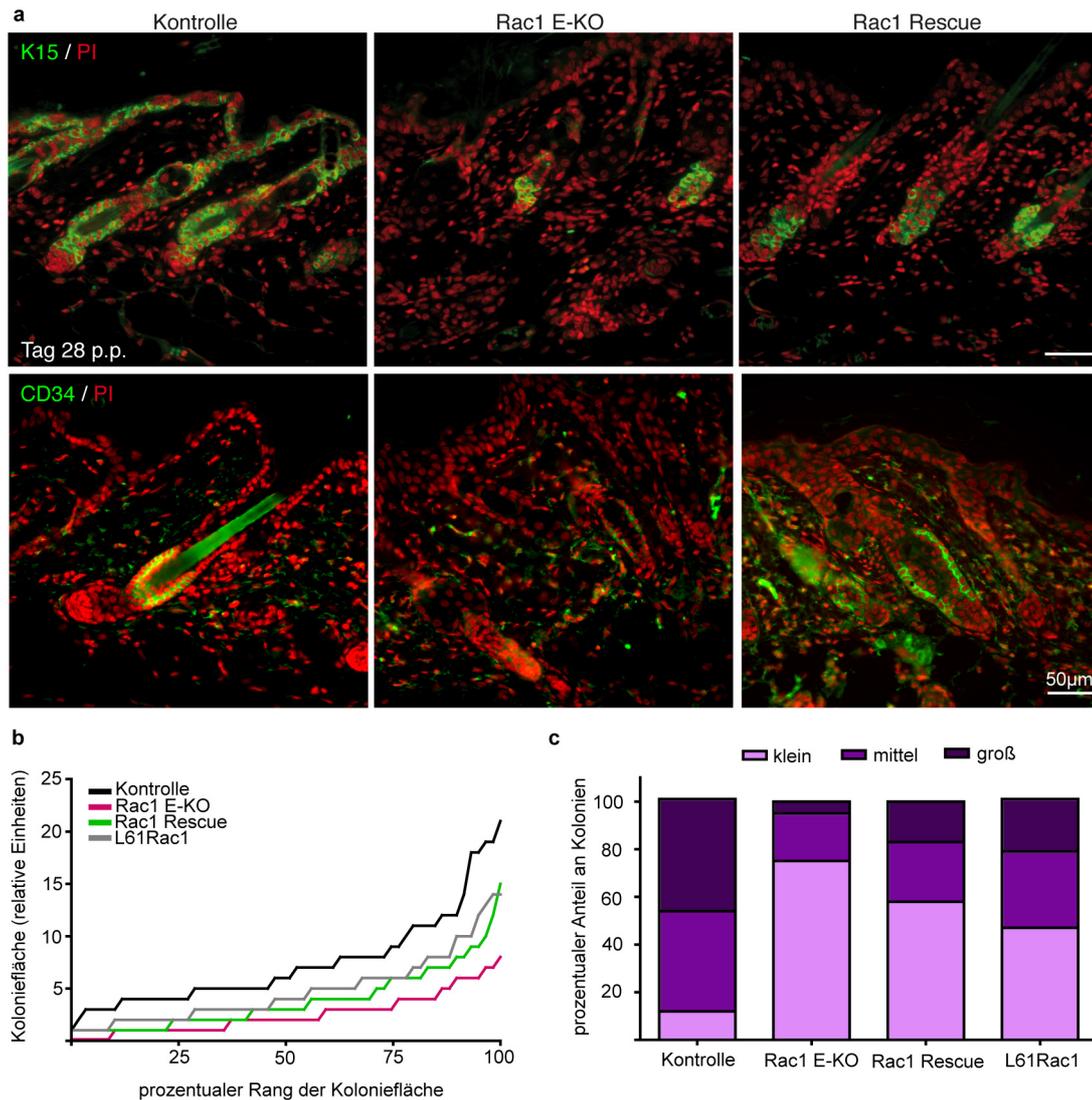


Abbildung 3-8: Charakterisierung der Bulge-Stammzellregion *in vivo* (a) und der klonogenen Eigenschaften primärer Keratinozyten *in vitro* (b,c). (a) Expression der Stammzellmarker Keratin 15 (grün) (obere Reihe) und CD34 (grün) (untere Reihe) in der Bulge-Region von 28 Tage alten Mäusen. Die Kernfärbung mit PI ist in rot dargestellt. Skalierungsbalken: 50 µm. (b,c) Bestimmung der klonogenen Eigenschaften von murinen Keratinozyten isoliert aus den unterschiedlichen Mausstämmen *in vitro* mit Hilfe eines Koloniebildungsassays. (b) zeigt die Auftragung aller Kolonien in einem Größenverteilungsprofil, (c) die Auftragung als Balkendiagramm nach Unterteilung der Kolonien nach ihrer Größe. Die Ergebnisse aus (b) und (c) sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die Auswertung in einem Größenverteilungsprofil zeigte eine allgemeine Reduktion der Koloniefäche in aus Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen isolierten primären Keratinozyten im Vergleich zu der Kontrollzelllinie. Der in den Kontrollzellen zu sehende steile Anstieg im hinteren Bereich der Kurve von ca. 90-100% war in Rac1 E-KO Mäusen nicht zu erkennen (siehe Abb. 3-8b). Dies könnte auf einen Verlust von Zellen mit einem hohen proliferativen Potential, wie es Stammzellen aufweisen, hindeuten. Durch basale Expression von L61Rac1 konnte ein Anstieg in der Anzahl größerer Kolonien in Rac1 Rescue Keratinozyten erreicht werden (vgl. Abb. 3-8b). Die Kurvenverläufe für L61Rac1 transgene Zellen und Rac1 Rescue Zellen waren nahezu identisch. Der Verlust an proliferativer Kapazität durch die Deletion von Rac1 konnte also durch die Expression von L61Rac1 im basalen Kompartiment allein aufgehoben werden. Jedoch erreichten Rac1 Rescue Kolonien wie auch L61Rac1 transgene Kolonien nicht die Koloniefäche von Kontrollkeratinozyten, was darauf hinweist, dass die basale Expression von L61Rac1 sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von endogenem Rac1 zu einer Reduktion des proliferativen Potentials von Keratinozyten im Vergleich zu Kontrollzellkulturen führt.

Zusätzlich wurde die ermittelte Koloniefäche in einem Balkendiagramm aufgetragen. Hierzu wurden die Kolonien nach ihrer Größe in kleine, mittlere und große Kolonien unterteilt. Bei dieser Form der Auswertung können Verschiebungen in der Koloniegröße einfach festgestellt werden. Die Auftragung der Koloniefäche von Kontroll- und L61Rac1 transgenen Keratinozyten sowie Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Keratinozyten im Balkendiagramm zeigte eine starke Reduktion in der Größe der analysierten Rac1 E-KO Kolonien im Vergleich zu den Kontrollzellen und eine Verschiebung im Balkendiagramm hin zu mehr kleinen und sehr viel weniger großen Kolonien und bestätigt dadurch die aus der Analyse im Liniendiagramm gewonnenen Erkenntnisse (siehe Abb. 3-8c).

Die nur partielle Wiederherstellung des Anteils großer Kolonien in Rac1 Rescue Keratinozyten durch Expression von L61Rac1 könnte durch das veränderte Koloniebildungsvermögen in L61Rac1 transgenen Keratinozyten, wie in Abbildung 3-8b und c zu sehen, verursacht sein. Diese zeigten sowohl im Linien- (Abb. 3-8b) als auch im Balkendiagramm (Abb. 3-8c) ein im Vergleich zu den Kontrollzellen vermindertes Vermögen zur Bildung großer Kolonien. Eine Erklärung hierfür könnten die morphologischen Veränderungen aufgrund der Expression von konstitutiv aktivem Rac1 in L61Rac1 transgenen Keratinozyten liefern. Diese zeigten bei Kultivierung *in vitro* eine sehr flache, ausgebreitete Morphologie (vgl. Abb. 3-9a), die auf ein erhöhtes Zellausbreitungsverhalten zurückgeführt werden kann (siehe Abb. 3-9b). Möglicherweise beschränkt die oftmals enorme Größe der L61Rac1 transgenen Keratinozyten das Wachstum der Kolonien. Es ist

wahrscheinlich, dass die Änderungen in der Zellmorphologie und im Ausbreitungsverhalten mit Veränderungen im Aktinzytoskelett zusammenhängen. Es ist bereits vielfach in der Literatur beschrieben, dass Rac1 einen erheblichen Einfluss auf die Struktur des Aktinzytoskeletts *in vitro* ausübt [Tschardtke *et al.*, 2005; Chrostek *et al.*, 2006; Tschardtke *et al.*, 2007]. Färbungen von polymerisiertem Aktin mit Phalloidin in Zellkulturen bestätigen die Veränderung des Zytoskeletts in L61Rac1 transgenen Zellen (nicht dargestellt).

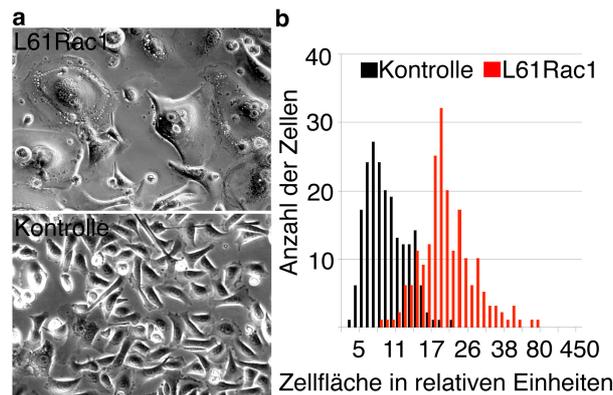


Abbildung 3-9: Veränderte Zellmorphologie (a) und verändertes Zellausbreitungsverhalten („Spreading“) (b) in L61Rac1 transgenen und Kontroll- (Wildtyp-) Keratinozyten. (a) zeigt die Zellmorphologie von L61Rac1 und Kontrollkeratinozyten bei gleicher Vergrößerung, (b) die Histogramm-Auswertung der Zellfläche im „Spreading“-Assay.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass eine Deletion von Rac1 nicht nur die Expression von Bulge-Stammzellmarkern *in vivo* beeinflusst, sondern einen direkten Einfluss auf die Stammzeleigenschaften besitzt, wie die *in vitro* Untersuchungen gezeigt haben. Weiterhin deuten die Daten darauf hin, dass auch die Expression von Rac1 in den suprabasalen Schichten einen Einfluss auf das Haarfollikelstammzellkompartiment *in vivo* besitzen könnte, da in Rac1 Rescue Mäusen die Expression beider Marker nicht vollständig wiederhergestellt werden konnte. Ein Einfluss von L61Rac1 ist nicht wahrscheinlich, da in L61Rac1 transgenen Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen keine Veränderungen in der Expression von K15 und CD34 detektiert werden konnten. Die *in vitro* Untersuchungen in Rac1 Rescue Keratinozyten lassen außerdem vermuten, dass eine Expression von L61Rac1 in der Basalzellschicht und der äußeren Haarwurzelscheide allein nicht ausreichend ist, um die Stammzeleigenschaften *in vitro* vollständig wiederherzustellen.

3.2.4 Haarphänotypen in Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen

Der Verlust des Fells in Rac1 E-KO Mäusen bis auf ein paar wenige einzelne Haare wirft die Frage auf, ob selektiv bestimmte Haartypen in Rac1 E-KO Mäusen verloren gehen, während andere erhalten bleiben. Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine Analyse der

Haartypkomposition des Rückenkörperfells durchgeführt, wobei die Haare immer an vergleichbaren Stellen entnommen wurden. In Mäusen können fünf verschiedene Haartypen unterschieden werden, die, wie in Abschnitt 1.2.2.1 beschrieben, durch unterschiedliche Induktionszeitpunkte während der Entwicklung sowie Unterschiede in der Länge und dem inneren Aufbau charakterisiert sind [Sundberg, 1994; Duverger & Morasso, 2009].

In den untersuchten Kontrollmäusen konnten die in der Literatur beschriebenen Anteile der verschiedenen Haartypen nachgewiesen werden (Abb. 3-10b). In Rac1 E-KO Mäusen gestaltete sich die Klassifizierung der Haarfollikel schwierig, da eine eindeutige Zuordnung der Haare in die unterschiedlichen Gruppen Guard-, Awl/Auchene- und Zigzag-Haare oftmals nur schwer möglich war (siehe Abb. 3-10a). Daher wurden die Haare der Rac1 E-KO Mäuse lediglich in Awl/Auchene-ähnliche, die durch einen geraden Aufbau und die Anwesenheit von zwei oder mehr Pigmentierungssäulen gekennzeichnet sind, und Zigzag-ähnliche, die durch nur eine Pigmentierungssäule gekennzeichnet sind, unterteilt. In den Zigzag-ähnlichen Haaren der Rac1 E-KO Mäuse war besonders auffällig, dass in diesen der durch scharfe Richtungswechsel gekennzeichnete Aufbau der Zigzag-Haare stark verändert ist. Sie besaßen einen wellenartigen Aufbau, der vermuten lässt, dass Rac1 einen Einfluss auf die Strukturbildung dieser Haare besitzt. Zusätzlich erschienen in Rac1 E-KO Mäusen alle Haare im Vergleich zu den Kontrollen kürzer, weshalb keine Guard-Haare zugeordnet werden konnten. Dies könnte zum einen bedeuten, dass dieser Haartyp in Rac1 E-KO Mäusen fehlt oder zum anderen, dass die Längenentwicklung der Haare, zum Beispiel durch den beschriebenen Proliferationsdefekt im Haarbulbus, so stark beeinträchtigt ist, dass diese Haare nicht von den häufiger vorkommenden Awl/Auchene-Haaren unterschieden werden konnten (Abb. 3-10a).

Die Analyse in Rac1 Rescue Mäusen zeigte, dass die Verteilung der Haartypen zum Teil wiederhergestellt werden konnte. Es wurden sowohl Haare gefunden, die eine normale Struktur aufwiesen und somit den Klassen eindeutig zugeordnet werden konnten als auch Haare, die die veränderte Struktur der Rac1 E-KO Haare zeigten und daher den zusätzlich eingeführten Klassen zugeordnet werden mussten (siehe Abb. 3-10b). Besonders auffällig war hierbei auch die Veränderung in der Struktur der Zigzag-Haare, die auch in einem Großteil der Haare einen eher wellenartigen Aufbau zeigten (Abb. 3-10a). Die Relation von Awl/Auchene- und Zigzag-Haaren zu der von Awl/Auchene-ähnlichen und Zigzag-ähnlichen Haaren schien dabei nicht verändert zu sein. Auch in Rac1 Rescue Mäusen konnten keine Guard-Haare nachgewiesen werden (siehe Abb. 3-10b). Die basale Expression von aktivem Rac1 in Rac1 Rescue Mäusen ermöglicht ein Wachstum der Haare. Sie scheint jedoch nicht ausreichend zu sein, um eine normale Strukturbildung, besonders der Zigzag-Haare, wiederherzustellen, was in der veränderten Verteilung der Haartypen deutlich wird.

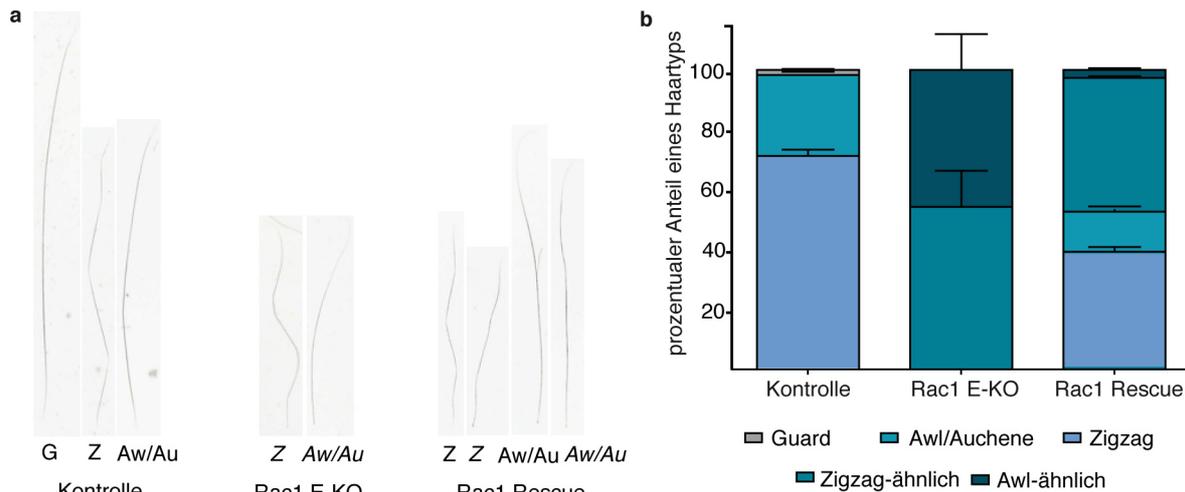


Abbildung 3-10: Untersuchung der Struktur der verschiedenen Haartypen (a) und deren Vorkommen im Fell von Kontroll- sowie Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen. (a) Die Struktur verschiedener Haartypen wurde unter einem Stereomikroskop bei gleicher Vergrößerung untersucht. G: Guard, Z: Zigzag, Aw/Au: Awl/Auchene, Z: Zigzag-ähnlich, Aw/Au: Awl-ähnlich (b) Die unterschiedlichen Haartypen wurden an Tag 28 p.p. anhand der in Duverger & Morasso, 2009 beschriebenen Charakteristika zugeordnet und der prozentuale Anteil an 100 ausgewerteten Haaren bestimmt.

3.2.5 Verzögerte Haarfollikelmorphogenese in Rac1 Rescue Mäusen

Während der Haarmorphogenese und der Anagenphase des adulten Haarzyklus differenzieren die Keratinozyten der Haarmatrix zu den verschiedenen Schichten des Haarfollikels und determinieren so die Struktur der Haarfollikel und des Haarschafts [Hardy, 1992; Kopan *et al.*, 2002; Legue & Nicolas, 2005]. Eine Störung der Haarmorphogenese könnte daher eine mögliche Ursache für die beobachteten histologischen Veränderungen der Haarfollikelstruktur in Rac1 Rescue Mäusen sein. Aus diesem Grund wurde eine Analyse der Haarmorphogenese in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. R. Paus (Lübeck) durchgeführt. Dabei wurden die Haarfollikel an einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt anhand der in Paus *et al.*, 1999 beschriebenen Charakteristika den einzelnen Morphogenesestadien zugeordnet und der prozentuale Anteil an Haarfollikeln in einem bestimmten Stadium bestimmt und graphisch dargestellt.

Die Analyse der Morphogenese an Tag 10 p.p. zeigt, dass sich in Kontroll- und L61Rac1 transgenen Mäusen nahezu 100% der analysierten Haarfollikel in dem am weitesten entwickelten Stadium (Stadium 8) befinden. Die Haarfollikel in diesem Stadium erreichen ihre maximale Länge, der Haarschaft der vollständig differenzierten Haarfollikel durchbricht die Epidermis und tritt nach außen. Einige wenige Haarfollikel der Kontrolltiere befinden sich zu diesem Zeitpunkt noch im siebten Morphogenesestadium, in welchem die Spitze des Haarschafts die innere Haarwurzelscheide verlässt und in den Haarkanal eintritt. In Rac1 E-KO Mäusen befinden sich im Gegensatz zu den Kontrollmäusen sowie den L61Rac1 transgenen Tieren noch ca. 40% der Haarfollikel im siebten Entwicklungsstadium (siehe Abb.

3-11), was auf eine verzögerte Entwicklung in der Morphogenese in Rac1 E-KO Mäusen hinweist. Die Haarfollikel von L61Rac1 transgenen Mäusen zeigen eine mit den Kontrolltieren vergleichbare Verteilung der Haarfollikel in den Morphogenesestadien (siehe Abb. 3-11). Dies zeigt, dass die Expression des L61Rac1 TGs allein keine Auswirkungen auf den Ablauf der Haarmorphogenese besitzt. Durch basale Expression des L61Rac1 TGs kann eine normale Haarfollikelmorphogenese in Rac1 Rescue Mäusen zum Teil wiederhergestellt werden, was durch die verringerte Anzahl der Haarfollikel in Stadium 7 und die erhöhte Anzahl der Haarfollikel in Stadium 8 im Vergleich zu Rac1 E-KO Mäusen deutlich wird. Es werden jedoch nicht die in den Kontrolltieren bestimmten Anteile der Haarfollikel in Stadium 7 und 8 erreicht (siehe Abb. 3-11). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Anwesenheit eines funktionalen Rac1 in der Basalzellschicht und/oder in der äußeren Haarwurzelscheide für den Ablauf der normalen Haarmorphogenese in den späten Stadien erforderlich ist. Das Fehlen von Rac1 in den differenzierten Anteilen der Epidermis und des Haarfollikels in Rac1 Rescue Mäusen besitzt hingegen nur geringe Auswirkungen auf die Haarmorphogenese, resultiert aber dennoch in einer verbleibenden Verzögerung in der Entwicklung der Haarfollikel. Da die Zuordnung der Haarfollikel zu den bestimmten Morphogenesestadien lediglich anhand morphologischer Kriterien erfolgte, kann aber nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass die gefundenen Veränderungen in den Rac1 E-KO Mäusen nicht allein durch eine Hemmung der Haarmorphogenese verursacht werden, sondern auch mit der beobachteten Haarfollikeldegradierung zusammenhängen.

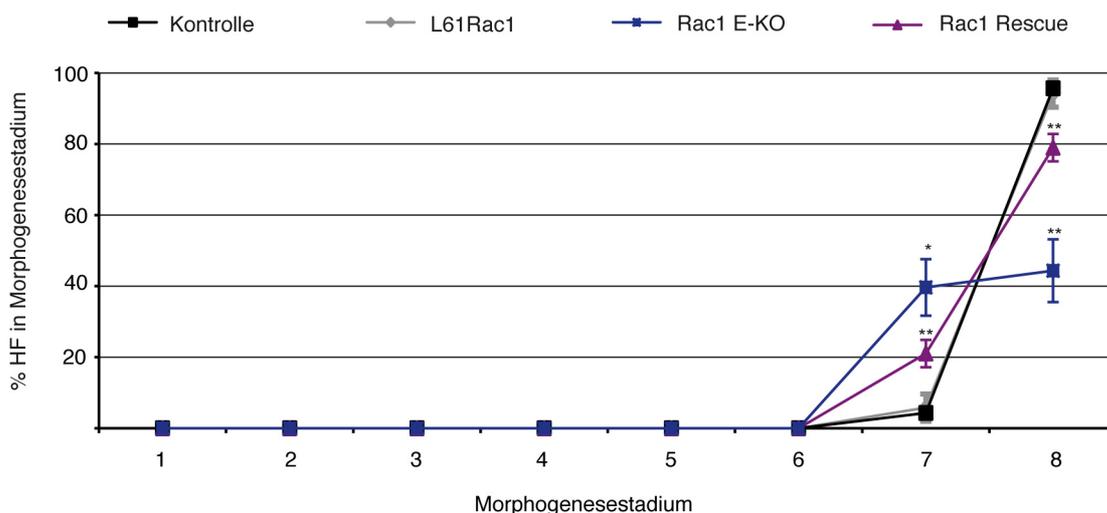


Abbildung 3-11: Analyse der Haarmorphogenese in Kontroll-, L61Rac1 sowie Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen an Tag 10 p.p. Die Haarfollikel an Tag 10 p.p. wurden anhand der in Paus *et al.*, 1999 beschriebenen Charakteristika den verschiedenen Morphogenesestadien zugeordnet und der prozentuale Anteil der Haarfollikel in den unterschiedlichen Morphogenesestadien bestimmt (n= 3-6). Die Auftragung erfolgte im Anschluss in einem Liniendiagramm. Mittelwert \pm SEM, statistische Analyse mittels Mann Whitney Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Kontrolle vs. Rac1 E-KO bzw. Rac1 Rescue).

3.2.6 Unveränderte Haarfollikeldifferenzierung in Rac1 Rescue Mäusen

Die Bildung differenzierter Anagen-Haarfollikel während der Haarfollikelmorphogenese ist durch eine Differenzierung der verschiedenen Schichten im Haarfollikel gekennzeichnet, die in der Bildung des Haares resultiert [Hardy, 1992; Kopan *et al.*, 2002; Legue & Nicolas, 2005]. Eine Störung der Haarfollikeldifferenzierung könnte daher eine mögliche Ursache für die verzögerte Entwicklung der Haarfollikel, die in der Haarmorphogeneseanalyse festgestellt wurde, sowie auch für die gefundenen Haarphänotypen darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Expression und Lokalisation wichtiger Proteine, die die komplexe Differenzierung der inneren Schichten des Haarfollikels, wie in Abschnitt 1.2.2 erläutert, determinieren, genauer untersucht. Zu den wichtigsten signalaktiven Proteinen, die hier untersucht wurden, gehören CCAAT displacement protein (CDP), Foxn1, Lef1 und β -Catenin. Der Transkriptionsfaktor CDP spielt im Haarfollikel eine wichtige Rolle in der Differenzierung des IRS, wo CDP an der Expressionskontrolle spezifischer Gene in der inneren Haarwurzelscheide beteiligt ist [Ellis, 2001]. Der Transkriptionsfaktor Foxn1 dagegen wird in postmitotischen Vorläuferzellen des differenzierenden Cortex und der Cuticula exprimiert [Lee *et al.*, 1999] und besitzt eine wichtige Rolle in der Differenzierung des Haarschafts und der Haarmedulla [Johns *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2009]. Es wurde gezeigt, dass eine Mutation von Foxn1, die als „Nude-Mutation“ bezeichnet wird, einen Verlust des Fells zur Folge hat, der auf eine Deformation der Haarfollikel und einen daraus resultierenden Penetrationsdefekt der Haarfollikel durch die Epidermis zurückzuführen ist [Mecklenburg, 2001; Mecklenburg *et al.*, 2005]. Weiterhin spielt Foxn1 eine wichtige Rolle während des Pigmentierungsprozesses des Haarschafts, da die Melanozyten des Bulbus ihr Pigment nur an die Foxn1-positiven Vorläuferzellen des Haarschafts weitergeben. Die Pigmentabgabe der Melanozyten wird dabei durch die Sekretion von Fgf2 durch die Foxn1-positiven Haarmatrixzellen stimuliert [Weiner *et al.*, 2007]. Auch der Transkriptionsfaktor Lef1 und nukleär lokalisiertes β -Catenin als Proteine des Wnt-Signalwegs spielen eine wichtige Rolle in der Haarfollikeldifferenzierung. Nukleäres β -Catenin, d.h. transkriptionell aktives β -Catenin und Lef1 sind im Haarfollikel vornehmlich in den Zellen der oberen Haarmatrix zu finden [Tsuji *et al.*, 2001], wo sie an der Bildung und Differenzierung des Haarschafts beteiligt sind [DasGupta & Fuchs, 1999, Narhi *et al.*, 2008].

Durch Analyse dieser Proteine mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen an Tag 10 p.p. konnte kein Verlust der Expression dieser Proteine in Rac1 E-KO Hautproben festgestellt werden. Jedoch kann aufgrund der Haarfollikelzerstörung in diesen Tieren nicht ausgeschlossen werden, dass diese einen Einfluss auf die Expression der untersuchten Differenzierungsmarker besitzt. Da in den untersuchten Rac1 Rescue Hautproben, in denen die Haarfollikelstruktur erhalten ist, keine Veränderungen in der Expression dieser für die

Haarfollikeldifferenzierung wichtigen Proteine gefunden werden konnte (siehe Abb. 3-12), stellt die Reduktion in Rac1 E-KO Mäusen möglicherweise einen Effekt der Haarfollikelzerstörung dar. Alternativ ist es möglich, dass die Expression und Aktivität der beschriebenen Transkriptionsfaktoren eine Funktion der Aktivität von Rac1 in der Basalzellschicht und in der äußeren Haarwurzelscheide widerspiegelt. Die so gewonnenen Erkenntnisse sprechen dafür, dass kein genereller Defekt in den untersuchten Signalwegen der Haarfollikeldifferenzierung nach Rac1-Deletion vorliegt. Es kann weiterhin nicht ausgeschlossen werden, dass Rac1 an anderen Signalwegen, die hier nicht untersucht wurden, beteiligt ist.

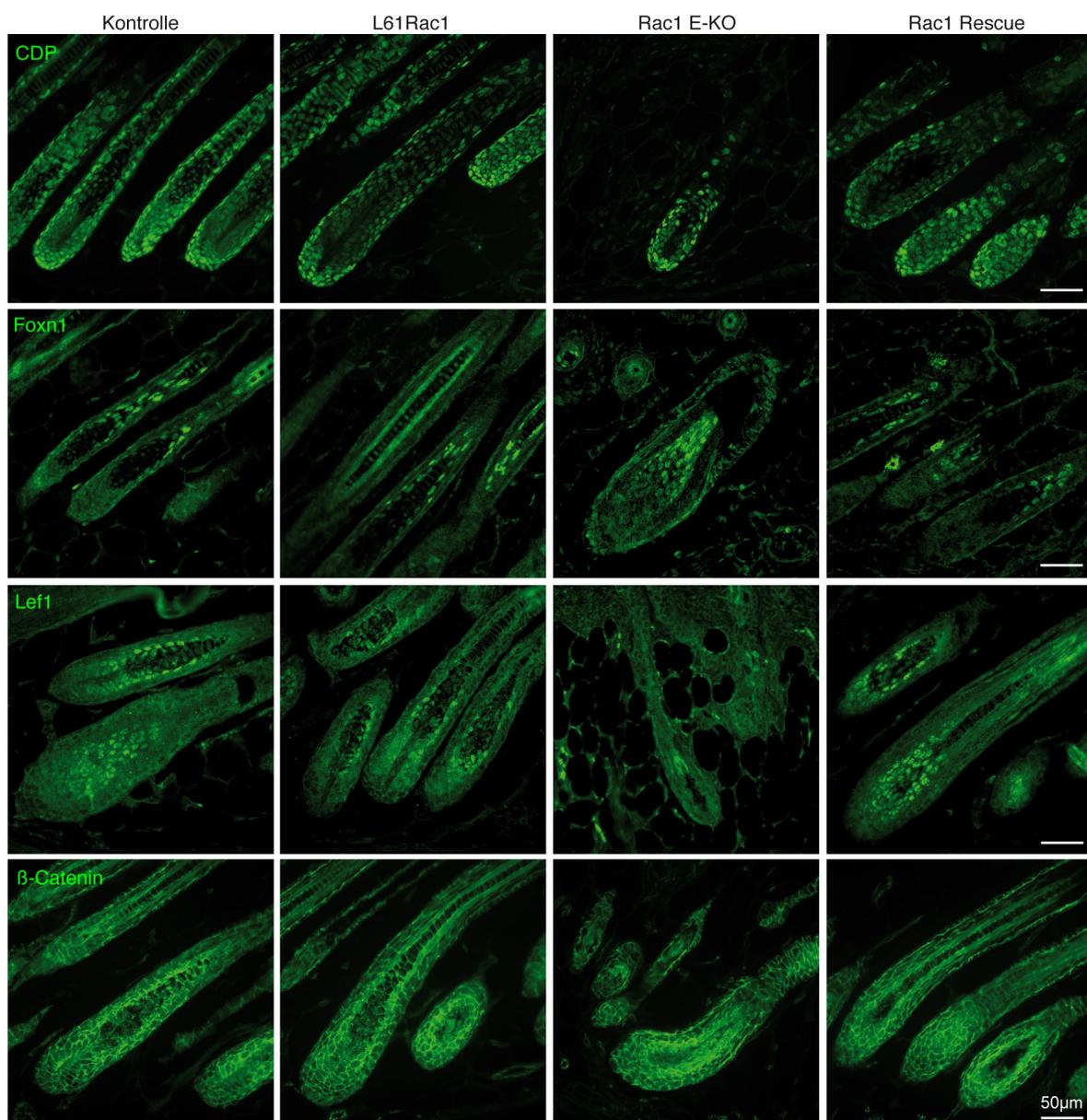


Abbildung 3-12: Untersuchung der Expression wichtiger Haarfollikeldifferenzierungsmarker in Kontroll- und L61Rac1 transgenen Mäusen sowie Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Tieren an Tag 10 p.p.. Zur Untersuchung der Haarfollikeldifferenzierung wurden die Marker CDP (erste Reihe), Foxn1 (zweite Reihe), Lef1 (dritte Reihe) sowie β -Catenin (vierte Reihe) auf Paraffinschnitten gefärbt (grün). Skalierungsbalken: 50 μ m.

Während der Differenzierung des Haarfollikels und der Bildung des Haares wird die Expression verschiedener haarspezifischer Keratine induziert (siehe Abschnitt 1.2.2). Diese sind durch ihre spezifische Expression in verschiedenen Schichten des Haarfollikels gekennzeichnet und für die Strukturbildung des Haarfollikels und der Haare verantwortlich [Rogers *et al.*, 1997; Winter *et al.*, 1998; Langbein *et al.*, 1999; Langbein *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003]. Aufgrund des veränderten Erscheinungsbilds des Fells in Rac1 Rescue Mäusen (vgl. Abb. 3-2a) wurden für die Analyse der Haare solche Keratine ausgewählt, die im Bereich des Haarschafts, in der Cuticula, dem Cortex und der Medulla, exprimiert werden. Zu diesen gehören Keratin 81 für Haarcortex und Medulla sowie Keratin 82 für die Cuticula [Rogers *et al.*, 1997; Winter *et al.*, 1998; Langbein *et al.*, 1999; Langbein *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003]. Die Analyse dieser Haarkeratine an Tag 10 p.p., wie in Abbildung 3-13 dargestellt, zeigt eine Reduktion der untersuchten Keratine in Rac1 E-KO Mäusen. Hier ist anzunehmen, dass die Reduktion der Färbung mit der Zerstörung der Haarfollikel in diesen Mäusen zusammenhängt. Bei basaler Expression von L61Rac1 in Rac1 Rescue Mäusen ist an Tag 10 p.p. eine deutliche Expression von Keratin 81 und Keratin 82 erkennbar.

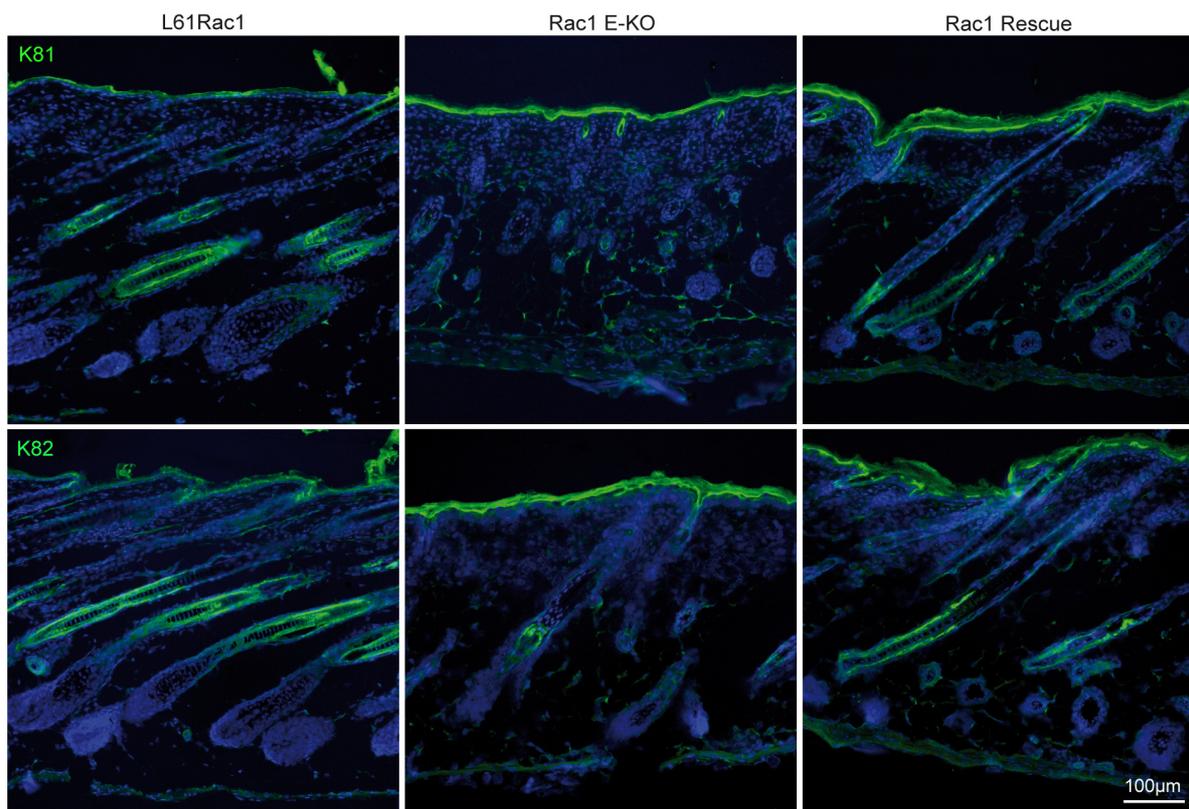


Abbildung 3-13: Expression der Haarkeratine Keratin 81 und 82 in Kontroll- und L61Rac1 transgenen Mäusen sowie Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Tieren an Tag 10 p.p. Zur Untersuchung der Expression der Haarkeratine wurden Kryoschnitte mit Antikörpern gegen Keratin 81 und Keratin 82 (grün) gefärbt. Zellkerne wurden durch eine Dapi-Färbung (blau) markiert. Skalierungsbalken: 100 µm.

Auch weitere untersuchte Haarkeratine wie Keratin 28, welches in der inneren Haarwurzelscheide lokalisiert ist, und Keratin 75, welches spezifisch in der Cuticula der inneren Haarwurzelscheide exprimiert wird, zeigten keine veränderte Expression in Rac1 Rescue Mäusen im Vergleich zu den untersuchten Kontrollen (nicht dargestellt). Ein möglicher, nicht durch Immunfluoreszenz nachweisbarer Unterschied könnte durch eine quantitative Analyse im Western Blot verifiziert werden.

Die aus den Untersuchungen der Haarfollikel- und Haardifferenzierung gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass eine Rac1-Aktivität in den differenzierten Anteilen des Haarfollikels für die differenzierungsabhängige Expression der oben angegebenen Haarkeratine nicht erforderlich ist.

3.3 Charakterisierung möglicher Ursachen für das veränderte Erscheinungsbild des Fells in Rac1 Rescue Mäusen

3.3.1 Untersuchung der Haaroberflächenstruktur von Rac1 Rescue Haaren

Rac1 Rescue Mäuse sind, wie bereits beschrieben, durch ein verändertes Erscheinungsbild des Fells gekennzeichnet. Sie besitzen im Vergleich zu dem glänzenden Fell der Kontrolltiere ein matt erscheinendes und gräulich gefärbtes Fell. Eine mögliche Ursache für das matt erscheinende Fell der Rac1 Rescue Mäuse könnte in der gestörten Haaroberflächenstruktur der Rac1 Rescue Haare zu finden sein. Daher wurde die Haaroberflächenstruktur von Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Haaren mit Hilfe von REM genauer untersucht. Die Haare der Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäuse zeigten dabei eine Vielzahl an Veränderungen. Besonders auffällig waren die rillenartigen Einkerbungen auf den Haarschuppen, die sowohl bei Rac1 E-KO als auch bei Rac1 Rescue Mäusen in einer Vielzahl der Haare zu finden waren. Außerdem zeigten einige Haare der Mutanten Einbuchtungen, die eine eher flachere statt einer runden Form der einzelnen Haare zur Folge haben. Eine solche Veränderung der Oberflächenstruktur konnte auch in den verbleibenden Haaren der Rac1 E-KO Mäuse nachgewiesen werden (siehe Abb. 3-14). Jedoch konnten in diesen strukturelle Veränderungen in den Haarfollikeln aufgrund der Zerstörung der Haarfollikel nicht näher untersucht werden. Die Wiederherstellung des Haarwachstums in Rac1 Rescue Mäusen ermöglicht dagegen eine genauere Analyse der Haarfollikelstruktur.

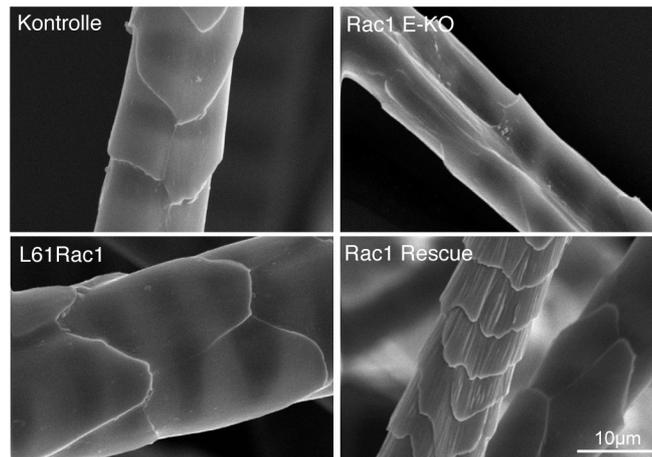


Abbildung 3-14: Veränderungen in der Haaroberflächenstruktur von Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen. Mit Hilfe von REM wurde die Oberflächenstruktur einzelner Haare an Tag 17 p.p. untersucht. Skalierungsbalken: 10 µm.

Zur weiteren Charakterisierung der Haarfollikel in Rac1 Rescue Mäusen wurde die Struktur der Haarfollikel in H&E-gefärbten Schnitten an Tag 10 p.p. noch einmal detailliert untersucht. Dabei zeigten sich, wie in Abbildung 3-15 zu sehen, gravierende Veränderungen in der Pigmentverteilung im Haarbulbus und im Haarschaft von Rac1 Rescue Mäusen. So schienen in den Haarbulbi der Rac1 Rescue Mäuse im Vergleich zu den untersuchten Kontrollen die Melaningranula weniger gut in den Haarmatrixzellen verteilt zu sein. Außerdem machten die Melaningranula in Rac1 Rescue Mäusen einen „verklumpten“ und nicht, wie in den Kontrollen zu sehen, einen gleichmäßig verteilten Eindruck (siehe Abb. 3-15a, links). Zusätzlich wurde deutlich, dass die Verteilung des Pigments im Haarschaft selbst in Rac1 Rescue Mäusen sowie die regelmäßige, säulenförmige Anordnung der Medullazellen gestört ist. Im Vergleich zu den Kontrollen schien in Rac1 Rescue Mäusen die gleichmäßige Verteilung des Pigments verloren zu sein (siehe Abb. 3-15a, rechts). Dies konnte durch lichtmikroskopische Analyse einzelner Zigzag- (oben) sowie Awl/Auchene-Haare (unten) bestätigt werden (siehe Abb. 3-15b).

Der genaue Mechanismus, der die Pigmentverteilung im Haarbulbus und insbesondere im Haarschaft reguliert, ist bisher nur unzureichend untersucht. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass reife Melaningranula der bulbaren Melanozyten an die Keratinozyten der Haarmatrix, die später die Zellen der Medulla bilden, übertragen werden [Slominski *et al.*, 2005]. Diese wandern während ihrer Differenzierung zu Haarschaftkeratinozyten den Haarschaft hinauf. Wie die Verteilung des Pigments in den Medullazellen reguliert wird, ist jedoch nicht bekannt. Mögliche Ursachen für die gestörte Pigmentverteilung der Medulla der Rac1 Rescue Mäuse könnten zum einen in einem strukturellen Defekt des Haares oder zum anderen in einer funktionellen Beeinträchtigung des Pigmentierungssystems des Haares begründet sein.

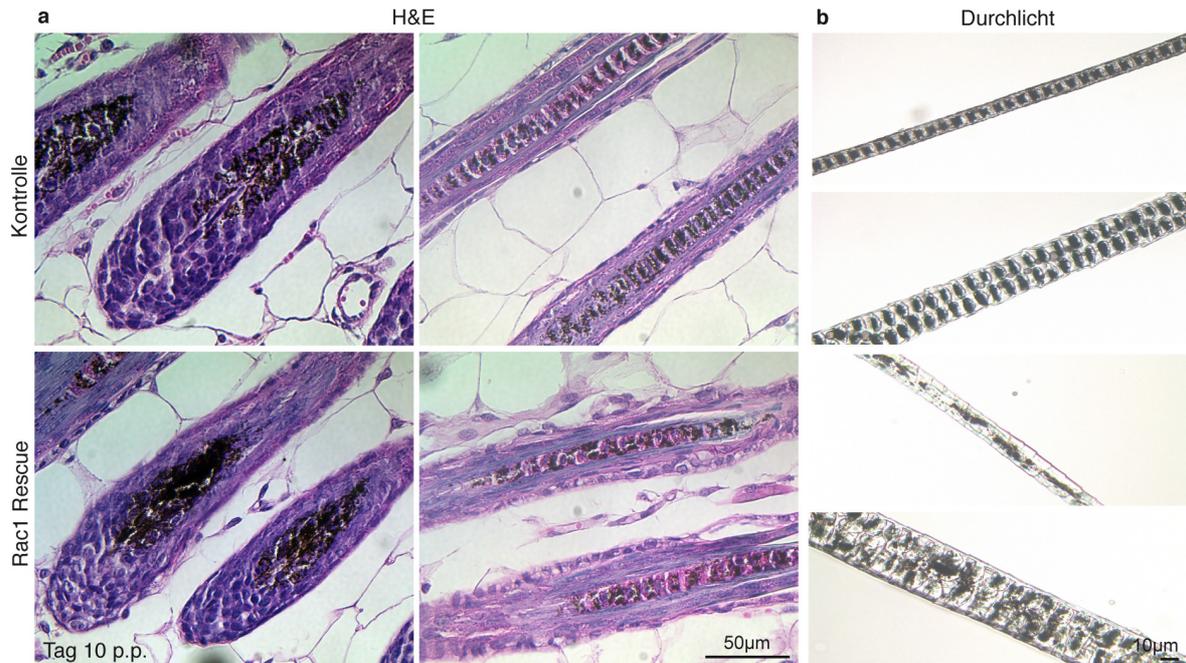


Abbildung 3-15: Gestörte Pigmentierung der Haarbülbi, des Haarschafts (a) und einzelner Haare (b) in Rac1 Rescue Mäusen. Die Untersuchung der Pigmentierung in den Haarbülbi und im Haarschaft wurde an H&E-gefärbten Paraffinschnitten an Tag 10 p.p. durchgeführt (a). Die Pigmentierung des Haares wurde durch lichtmikroskopische Analyse von einzelnen Haaren an Tag 17 p.p. untersucht. Skalierungsbalken: 50 µm (a), 10 µm (b).

3.3.2 Veränderungen in der Haarfollikelstruktur als möglicher Auslöser für die gestörte Pigmentierung in Rac1 Rescue Haaren

Zunächst wurde untersucht, ob strukturbedingte Veränderungen des Haarschafts zu der gestörten Pigmentverteilung im Haarschaft beigetragen haben. Dazu wurde die Struktur des Haarschafts in Semidünnschnitten untersucht. Diese eignen sich hierzu besonders gut, da sie, durch die geringe Dicke der Schnitte von ca. 0,5 µm, über ein höheres lichtmikroskopisches Auflösungsvermögen verfügen als die etwas dickeren Paraffinschnitte.

Die Analyse der Pigmentverteilung in Semidünnschnitten verdeutlichte, dass in den Kontrollhaarfollikeln, wie bereits in der histologischen Analyse beschrieben, eine regelmäßige Verteilung des Pigments in der Medulla vorlag. Die Analyse zeigte außerdem eine apikale Lokalisation des Pigments in den Medullazellen. Die Medullazellen besaßen eine regelmäßige, aneinander gereihete Verteilung und waren mit den seitlich gelegenen Cortexschichten verankert (siehe Abb. 3-16). Ein solcher Aufbau wurde auch durch TEM-Analysen von Wildtyp-Haarfollikeln in Ratten von Morioka, 2005 beschrieben. Im Gegensatz dazu zeigte das Pigment in den Haarschaften von Rac1 Rescue Mäusen in Semidünnschnitten eine unregelmäßige, ungeordnete Verteilung. Außerdem war die regelmäßige Struktur des Cortex in Rac1 Rescue Mäusen verloren, die in den Kontrollen durch die regelmäßige Aufeinanderfolge von in die Medulla hineinreichenden Ausläufern des

Cortex gekennzeichnet ist. Weiterhin schienen die Medullazellen in Rac1 Rescue Haarfollikeln nicht mehr regelmäßig übereinander angeordnet zu sein, wie es in den Kontrollen zu erkennen war, sondern lagen an einigen Stellen nebeneinander (siehe Abb. 3-16). Möglicherweise weist dies auf einen Verlust der Assoziation der Medullazellen mit dem Cortex hin. Die beschriebenen Veränderungen sind zur besseren Verdeutlichung in Abbildung 3-16 zusätzlich schematisch dargestellt.

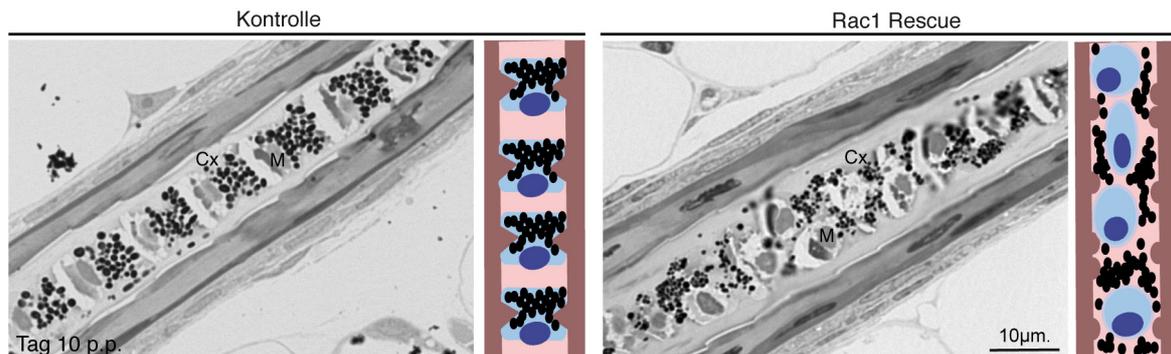


Abbildung 3-16: Gestörte Pigmentverteilung und Cortexstruktur in Rac1 Rescue Mäusen. Die Analyse erfolgte durch Untersuchung von Toluidinblau-gefärbten Semidünnschnitten an Tag 10 p.p. unter dem Lichtmikroskop (links); M: Medulla, Cx: Cortex. Die Struktur des Haarschafts wurde zusätzlich in den dargestellten Schemata (rechts) zusammengefasst. Skalierungsbalken: 10 µm.

Zur näheren Charakterisierung möglicher Veränderungen in der Haarcortexstruktur wurde eine Immunfluoreszenzfärbung des AE13 Antigens durchgeführt, welches spezifisch harte Typ I Keratine des Haarfollikels anfärbt (nicht dargestellt). Diese Färbung zeigte jedoch keine Veränderungen in der Expression der Cortexkeratine in Rac1 Rescue Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen. Allerdings konnten auch hier Strukturveränderungen im differenzierten Anteil des Cortex detektiert werden. In Kontrollmäusen zeigten die AE13-gefärbten Cortexstrukturen ein regelmäßiges, leiterartig erscheinendes Muster des Cortex, dessen Ausläufer in die Medulla hineinreichen. In Rac1 Rescue Mäusen waren diese Ausstülpungen des Cortex weniger stark ausgebildet und schienen weniger stark in die Medulla hineinzureichen (vgl. auch Abb. 3-18).

Aufgrund der Limitierungen der einfachen Fluoreszenzmikroskopie war eine detaillierte Analyse dieser Veränderungen jedoch nicht möglich. Daher wurde die Struktur des Cortex in Kooperation mit Prof. W. Bloch (Köln) im Transmissionselektronenmikroskop genauer untersucht. Die strukturelle Analyse des Cortex unter dem Elektronenmikroskop zeigte in Kontrollmäusen in den differenzierten Bereichen des Cortex zackenartige Ausläufer, die mit den Medullazellen durch Zell-Zell-Kontakte verankert zu sein scheinen (siehe Abb. 3-17). Diese entstehen, wie von Morioka, 2005 beschrieben, während der Differenzierung des Haarschafts durch Ausbildung von cortikalen Pseudopodia um die Medullazellen, die in einer

ringförmigen Verengung der Medullazellen resultieren. Sie werden im Laufe der Differenzierung mit Cortexkeratinen aufgefüllt, um die Struktur zu stabilisieren. Die in Schnitten als Ausstülpungen sichtbar werdenden Strukturen stellen daher vielmehr ringförmige Verengungen des Cortex dar. In Rac1 Rescue Mäusen weisen diese Strukturen im gleichen Differenzierungsstadium jedoch massive Veränderungen auf. Sie erscheinen oftmals weniger gut ausgebildet. So reichen sie zum Beispiel nicht so weit in die Medulla hinein und zeigen auch nicht die charakteristische zackenartige Struktur (siehe Abb. 3-17).

Da bereits in einigen Studien gezeigt wurde, dass Rac1 eine entscheidende Rolle in der Ausbildung von Pseudopodien, insbesondere von Lamellipodien, besitzt [Ridley *et al.*, 1992; Nobes & Hall, 1995b; Kaibuchi *et al.*, 1999; Waterman-Storer *et al.*, 1999; Yamada & Nelson, 2007], ist es denkbar, dass Rac1 auch eine wichtige Funktion in der Ausbildung dieser Strukturen im Haarschaft einnimmt.

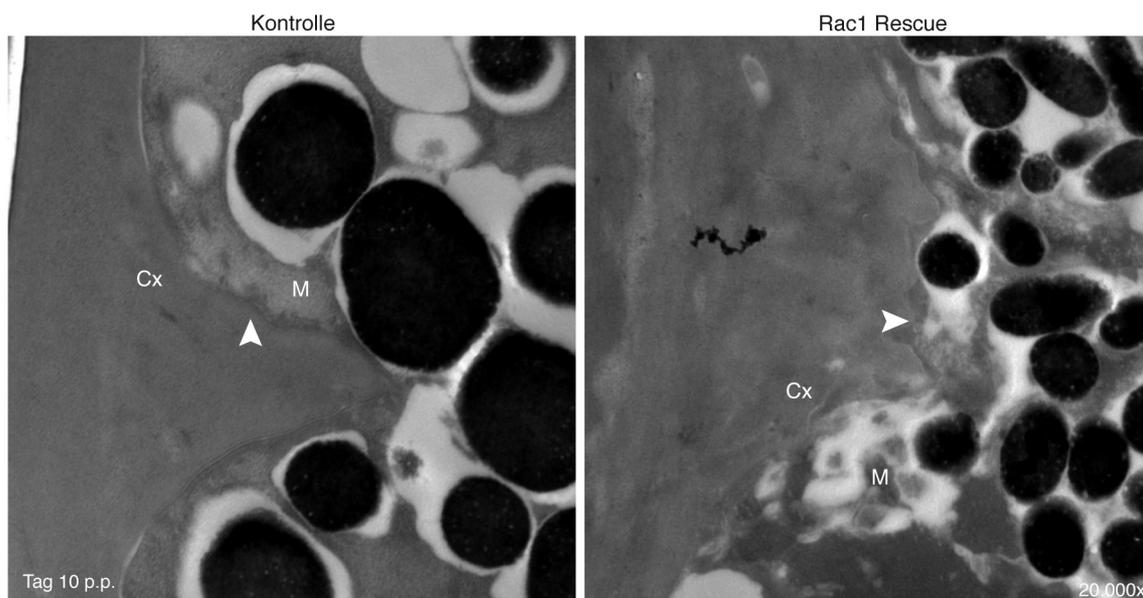


Abbildung 3-17: Veränderungen der corticalen Strukturen in Rac1 Rescue Mäusen. Hautproben, die an Tag 10 p.p. entnommen wurden, wurden transmissionselektronenmikroskopisch untersucht, um die corticalen Veränderungen im Detail analysieren zu können. Dargestellt sind Bilder aufgenommen mit 20.000x Vergrößerung (Aufnahmen durch Prof. W. Bloch, Köln).

Zusätzlich zu den beschriebenen Veränderungen in der Cortexstruktur zeigen die Untersuchungen, dass die Ränder der Ausstülpungen in den Kontrollen im TEM elektronendicht erscheinen (siehe Pfeile in Abb. 3-17). Im Gegensatz dazu sind die Strukturen im Cortex in Rac1 Rescue Mäusen nur flau gegen die Medullaumgebung abgegrenzt. Die abgegrenzten elektronendichteren Bereiche deuten auf eine Ansammlung von Proteinen an den Rändern der Ausstülpungen hin. Über die genaue Zusammensetzung

dieser Strukturen ist jedoch wenig bekannt. Allerdings wurde von Roth & Helwig, 1964 und Morioka, 2005 beschrieben, dass in diesen Bereichen Cortex und Medulla durch Desmosomen miteinander verbunden sind.

Einen weiteren Hinweis für die Lokalisation von Desmosomen in den corticalen Ausläufern liefert eine Studie von Johns *et al.*, 2005, die gezeigt haben, dass die Expression des desmosomalen Cadherins Desmocollin 2 (Dsc2) spezifisch an den Grenzflächen zwischen Cortex und Medulla sowie auch zwischen vertikal benachbarten Medullazellen lokalisiert ist. Sie schließen daraus, dass die Interaktion von Dsc2 mit einer Desmoglein-Isoform die Ausbildung der Adhäsionen zwischen Cortex und Medulla sowie zwischen benachbarten Medullazellen ermöglicht und dadurch die Ausbildung einer regelmäßigen Haarschaftstruktur entscheidend beeinflusst.

Aufgrund seiner Bedeutung in der Haarschaftstrukturbildung wurde die Dsc2-Expression in Kontrollmäusen und Rac1 Rescue Tieren an Tag 10 p.p. untersucht. Zusätzlich wurden Haarcortexkeratine (AE13-positiv) angefärbt, um die Dsc2-Expression genau lokalisieren zu können. Die Analyse zeigt in Kontrollmäusen ein regelmäßiges Expressionsmuster von Dsc2 im Haarschaft, das mit dem in Johns *et al.*, 2005 beschriebenen Muster vergleichbar ist (siehe Abb. 3-18). Die Doppelfärbung von Dsc2 und AE13 zeigte außerdem eine Assoziation der Dsc2-Expression mit den corticalen Keratinen (AE13-positiv). Die zusätzliche Darstellung des Pigments (hier pseudocoloriert in pink) lässt auf eine Assoziation von Dsc2 mit dem Pigment der Medullazellen schließen. Dies wurde bisher nicht von Johns *et al.*, 2005 beschrieben, die nicht-pigmentierende Mausstämmen für ihre Analysen eingesetzt haben. Dsc2 selbst zeigte, wie bei höherer Vergrößerung zu erkennen ist, eine spezifische Expression an den zuvor beschriebenen Ausstülpungen des Cortex in die Medulla. Im Gegensatz zu den Kontrollen war in Rac1 Rescue Mäusen die regelmäßige und geordnete Expression von Dsc2 gestört. Besonders in den Bereichen, in denen eine starke Veränderung der corticalen Strukturen zu finden und die Pigmentverteilung stark gestört war, konnte ein Verlust der Dsc2-Expression beobachtet werden (siehe Abb. 3-18).

Die Beobachtungen lassen vermuten, dass eine starke Korrelation zwischen der Dsc2-Expression einerseits und der Pigmentverteilung sowie der Cortexstruktur andererseits besteht. Zu diesem Zeitpunkt bleibt jedoch unbekannt, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen den beobachteten Veränderungen vorliegt.

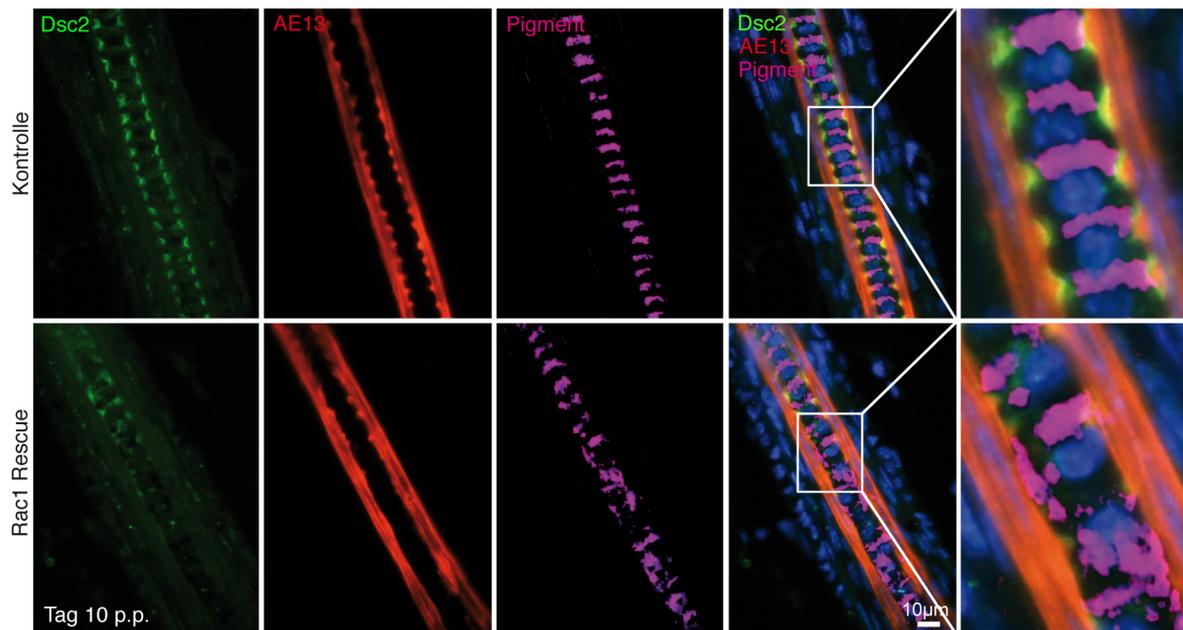


Abbildung 3-18: Reduzierte Expression und veränderte Lokalisation von Desmocollin 2 und Haarcortexkeratinen in Rac1 Rescue Mäusen. Paraffinschnitte von Hautproben, entnommen an Tag 10 p.p, wurden mit Antikörpern gegen Desmocollin 2 (Dsc2, grün) und Haarcortexkeratine (Klon AE13, rot) angefärbt. Zur Untersuchung der Pigmentassoziation wurden zusätzlich lichtmikroskopische Bilder aufgenommen, die invertiert und pseudocoloriert wurden (pink). Zellkerne wurden mit Dapi (blau) angefärbt. Zusätzlich ist in der Spalte rechts eine digital vergrößerte Aufnahme der Haarschaftstrukturen dargestellt. Skalierungsbalken: 10 µm.

Um zu überprüfen, ob die suprabasale Deletion von Rac1 lediglich die Expression und Lokalisation von Dsc2 beeinflusst oder ob zusätzlich weitere desmosomale Proteine betroffen sind, wurde die Expression von Plakoglobin wie auch Desmoglein 1 (Dsg1) und Desmoglein 2 (Dsg2) im Haarfollikel untersucht.

Desmoglein 1 und 2 sind an den Grenzen zweier Zellen transmembranös zum Extrazellulärraum lokalisiert. In der IFE wird Dsg1 vornehmlich in den suprabasalen Schichten exprimiert, wohingegen die Expression von Dsg2 hauptsächlich in den basalen Schichten zu finden ist. Dieses Expressionsmuster bestätigt sich auch in Untersuchungen im menschlichen Haarfollikel [Wu *et al.*, 2003]. Plakoglobin wird in der IFE gleichmäßig in allen Schichten exprimiert [zusammengefasst in Delva *et al.*, 2009]. Im Gegensatz zu Dsg1 und Dsg2 ist Plakoglobin intrazellulär an der Plasmamembran lokalisiert und dient der Verankerung der Intermediärfilamente an den Desmosomen über Desmoplakin [Kowalczyk *et al.*, 1997; Smith & Fuchs, 1998; Bornslaeger *et al.*, 2001].

In den Haarfollikeln der Kontrolltiere zeigte sich eine Expression von Dsg1+2 im äußersten Bereich des Haarfollikels (äußere Haarwurzelscheide) und im Bereich der Henle'schen Schicht der inneren Haarwurzelscheide (siehe Abb. 3-19). Die Analyse der Rac1 Rescue

Mäuse zeigte keine Veränderung in der Expression und Lokalisation von Dsg1+2, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass die Expression vornehmlich in den äußeren Schichten gefunden werden kann, jedoch nicht im Bereich des Haarschafts, in dem in Rac1 Rescue Mäusen die größten Veränderungen zu finden sind. Plakoglobin wird dagegen in nahezu allen Schichten des Haarfollikels im Bereich der zellulären Grenzflächen exprimiert. Dies entspricht dem Expressionsmuster von Plakoglobin in der IFE. Besonders in den inneren Anteilen des Haarfollikels, wie Matrix, Cortex und Medulla, die in Rac1 Rescue Mäusen Veränderungen aufweisen, ist eine starke Expression von Plakoglobin zu erkennen. Jedoch konnten in Rac1 Rescue Tieren keine Veränderungen in der Immunfärbung detektiert werden (siehe Abb. 3-19).

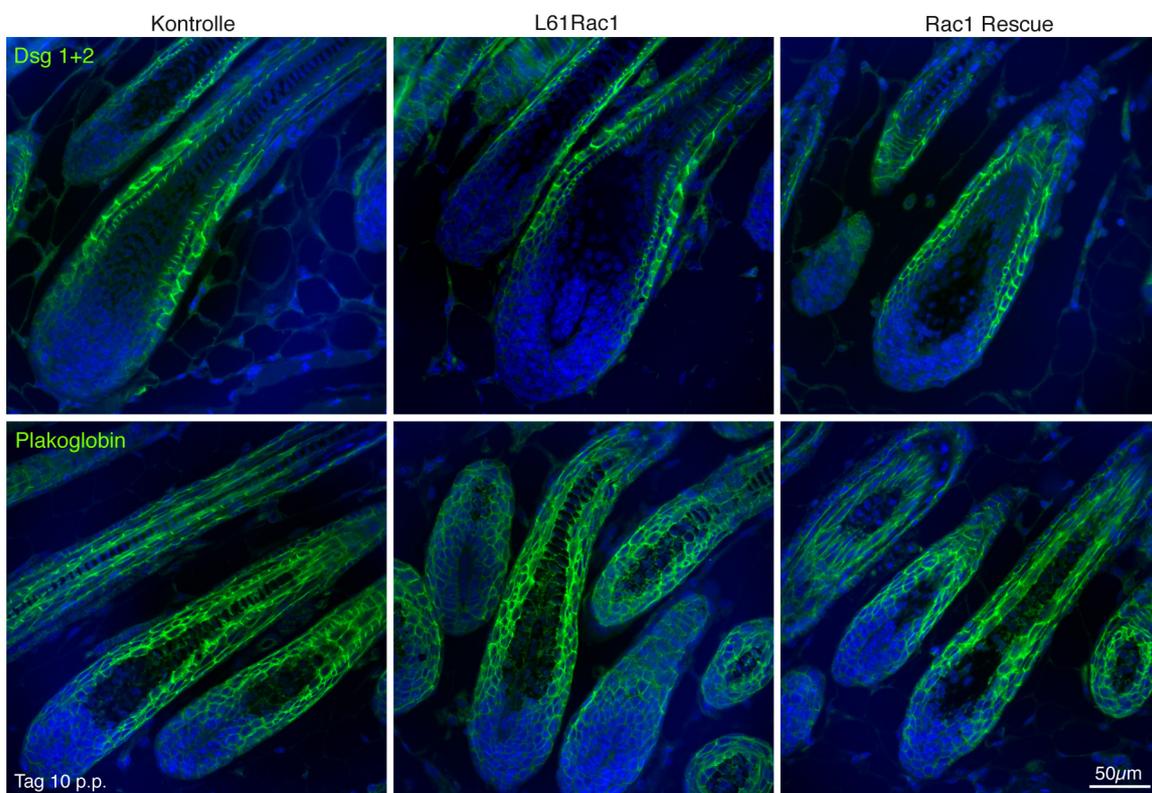


Abbildung 3-19: Unveränderte Expression der desmosomalen Proteine Desmoglein 1+2 und Plakoglobin in den Haarfollikeln von Rac1 Rescue Mäusen. Paraffinschnitte von Hautproben, die an Tag 10 p.p. entnommen wurden, wurden mit Antikörpern gegen Dsg1+2 und Plakoglobin (grün) gefärbt. Zellkerne wurden mit Dapi (blau) visualisiert. Skalierungsbalken: 50 µm.

Um einen generellen Defekt der Zell-Zell-Kontakte auszuschließen, der zu dem Phänotyp der Rac1 Rescue Mäuse beigetragen haben könnte, wurde die Expression der desmosomalen Komponenten Dsg1+2, Plakoglobin und β -Catenin in der IFE untersucht. Wie in Abbildung 3-20 dargestellt, konnten weder Unterschiede in der Expression noch in der Lokalisation der untersuchten Proteine in der IFE von Rac1 Rescue Mäusen im Vergleich zu den untersuchten Kontroll- und L61Rac1 transgenen Hautproben detektiert werden. Die

Dsg1+2-Färbung zeigt eine deutliche Expression in den suprabasalen Schichten, wohingegen Plakoglobin in allen Schichten der Epidermis exprimiert wird (siehe Abb. 3-20). Auch β -Catenin wird in allen Schichten der Epidermis von Rac1 Rescue Mäusen exprimiert und ist dort, wie auch Dsg1+2 und Plakoglobin, an den Zellgrenzen lokalisiert (siehe Abb. 3-20).

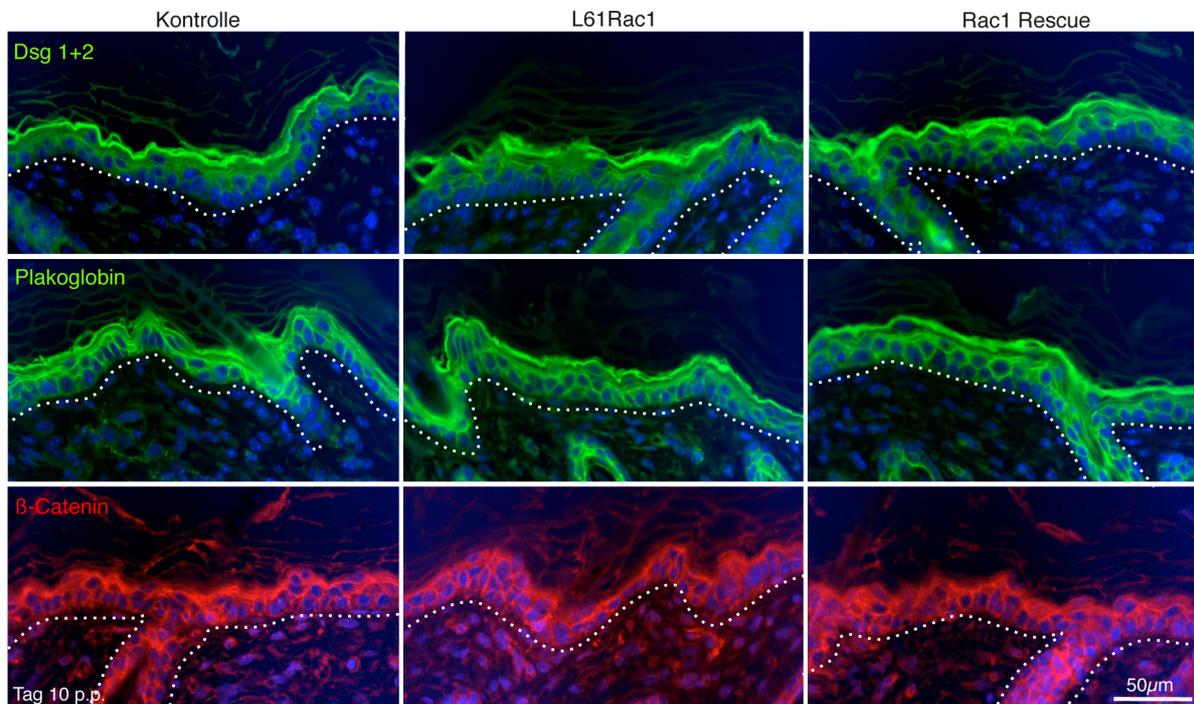


Abbildung 3-20: Unveränderte Expression der desmosomalen Proteine Desmoglein 1+2, Plakoglobin und β -Catenin in der IFE. Die Expression von Dsg1+2, Plakoglobin (grün) und β -Catenin (rot) in der IFE wurde an Paraffinschnitten, entnommen an Tag 10 p.p., untersucht. Zellkerne wurden mit Dapi (blau) angefärbt. Skalierungsbalken: 50 μ m.

Aufgrund der unveränderten Expression dieser Proteine in der IFE ist ein genereller Defekt der Desmosomen *in vivo* nach suprabasaler Deletion von Rac1 unwahrscheinlich. Mit Hilfe von Differenzierungsexperimenten primärer Keratinozyten aus Kontroll- und Rac1 E-KO Mäusen wäre es möglich, diese Vermutung durch *in vitro*-Experimente abzusichern. Wegen der Probleme in der Kultivierung von primären Rac1 E-KO Keratinozyten (Adhäsionsdefekt, nicht dargestellt) war es jedoch bisher nicht möglich, derartige Experimente durchzuführen, um so einen möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen Rac1 und der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zu untersuchen. Die Verwendung von Keratinozyten mit transgener Expression des dominant negativen N17Rac1 TGs sind für eine solche Analyse nicht geeignet, da die Expression des TGs durch den Keratin 14-Promoter gesteuert wird und aus diesem Grund herunterreguliert wird, sobald der Differenzierungsprozess durchlaufen wird.

Ein desmosomales Protein, für das gezeigt wurde, dass es die Differenzierung des Haares und die Haarschaftstruktur beeinflusst, ist Desmoglein 4 (Dsg4) [Bazzi *et al.*, 2006; Bazzi *et al.*, 2009]. Dsg4 stellt damit eine Verknüpfung zwischen der Expression von Zell-Zell-Kontaktkomponenten mit der Differenzierung der Haarfollikel und des Haarschafts dar [Bazzi *et al.*, 2009; Shimomura & Christiano, 2010]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von Dsg4 in Mäusen in einer abnormen Haarschaftdifferenzierung und einem Verlust der Haare resultiert [Kljuic *et al.*, 2003; Bazzi & Christiano, 2007]. Aufgrund der Wichtigkeit von Dsg4 für die Haarschaftdifferenzierung wurde die Expression von Dsg4 im Haarfollikel in Rac1 Rescue Mäusen genauer untersucht (siehe Abb. 3-21). In Kontrollmäusen zeigte sich, wie in der Literatur beschrieben, eine Lokalisation von Dsg4 im Bereich der Zell-Zell-Grenzen des Cortex. Dieses Expressionsmuster scheint in Rac1 Rescue Mäusen unverändert und auch die Lokalisation von Dsg4 scheint keine offensichtlichen Beeinträchtigungen aufzuweisen (siehe Abb. 3-21).

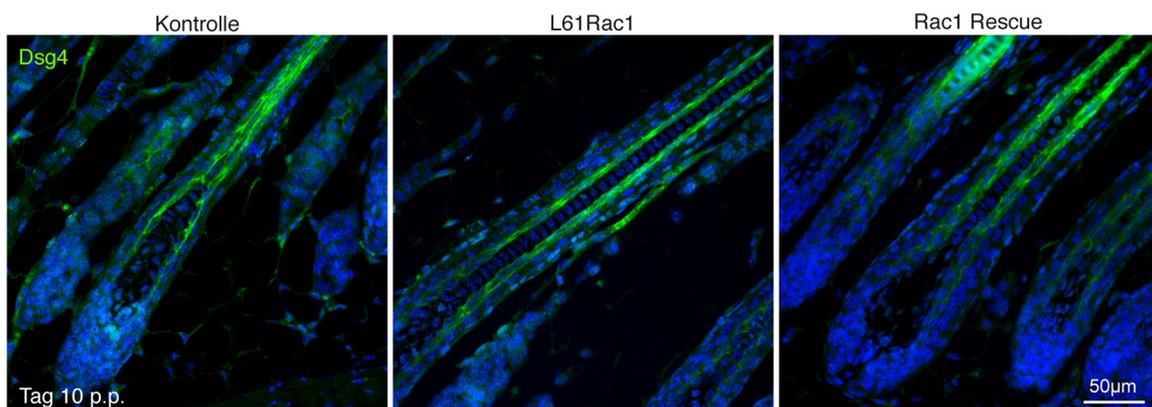


Abbildung 3-21: Unveränderte Expression des desmosomalen Proteins Desmoglein 4 in den Haarbulbi von Rac1 Rescue Mäusen. Auf Paraffinschnitten von Hautproben, entnommen an Tag 10 p.p., wurde Dsg4 (grün) angefärbt und Zellkerne mit Dapi (blau) gegengefärbt. Skalierungsbalken: 50 µm.

Über weitere zelluläre Komponenten, die die Struktur des Cortex beeinflussen, ist bisher wenig bekannt. Auch wurde bisher nicht untersucht, welche Rolle das Aktinzytoskelett für die Strukturbildung des Haarschafts und die Pigmentverteilung in der Medulla übernimmt. Das Aktinzytoskelett besitzt eine wichtige Funktion in der Ausbildung der Zellgestalt. Da Rac1 eine wichtige Rolle in der Organisation des Aktinzytoskeletts sowie in der Regulation der davon abhängigen Prozesse, wie das Ausbreitungsverhalten der Zellen („Spreading“) und die Bildung von Lamellipoda in Keratinozyten, besitzt [Tscharnitke *et al.*, 2005; Chrostek *et al.*, 2006; Tscharnitke *et al.*, 2007], wurde polymerisiertes Aktin mit Hilfe einer Phalloidin-Färbung im Haarfollikel visualisiert. Im Haarschaft von Kontrollmäusen zeigen sich im Bereich des differenzierten Cortex regelmäßige, geordnete Strukturen von polymerisiertem Aktin, die beide Seiten des Cortex miteinander zu verbinden scheinen. Sie entsprechen dem

Färbemuster der Cortexkeratine und scheinen wie diese mit dem Pigment assoziiert zu sein. Sie treten, wie in der Färbung der Cortexkeratine, als zackenartige Ausstülpungen des Cortex hervor, die in die Medulla hineinreichen. Im Haarschaft von Rac1 Rescue Mäusen dagegen ist die zackenartige Struktur nicht vollständig entwickelt, wie es auch für Cortexkeratine beschrieben wurde, und die kortikalen Protrusionen reichen nicht so weit in die Medulla hinein (siehe Abb. 3-22).

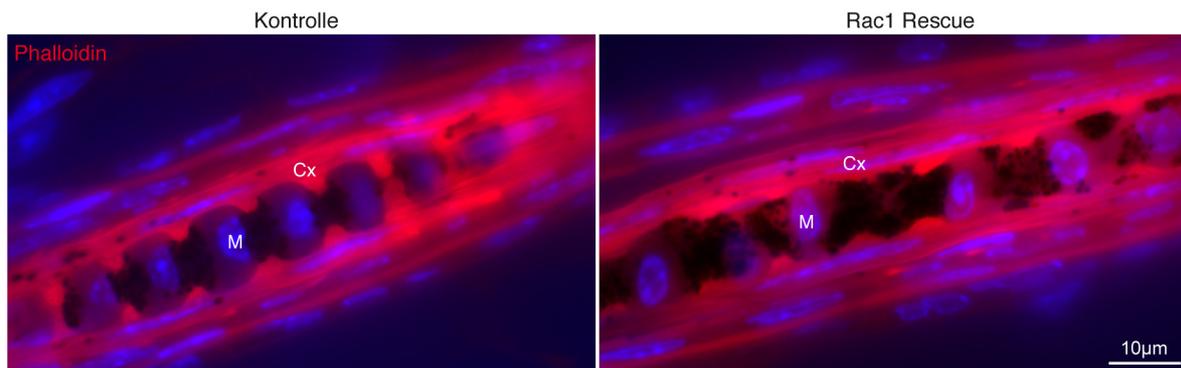


Abbildung 3-22: Verändertes Aktinzytoskelett im Haarschaft von Rac1 Rescue Mäusen. Paraffinschnitte von Hautproben, entnommen an Tag 10 p.p., wurden mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin (rot) gefärbt, um polymerisiertes Aktin im Haarschaft zu visualisieren. Zellkerne wurden mit Dapi (blau) angefärbt. M: Medulla, Cx: Cortex. Skalierungsbalken: 10 µm.

Anhand der Ergebnisse aus der Analyse der Haarschaftstruktur in Rac1 Rescue Mäusen lässt sich ein direkter Einfluss der Deletion von Rac1 in den differenzierten Anteilen des Haarfollikels auf Zell-Zell-Kontakte nicht nachweisen. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass Rac1 eine spezifische Funktion in der Ausbildung der speziellen Cortex-Protrusionen besitzt. Eine fehlerhafte Ausbildung dieser Strukturen könnte die Ausbildung der Desmosomen im Haarschaft beeinflussen. Möglicherweise ist Rac1 an der Regulation der Zytoskelettorganisation während der Ausbildung der Pseudopodien im Rahmen der Haarschaftdifferenzierung beteiligt. Die Ergebnisse weisen erstmals auf eine spezifische Funktion von Rac1 in der Regulation der Cortexstrukturbildung während der Differenzierung des Haarschafts hin.

3.3.3 Veränderungen in den Pigmentierungsprozessen als Auslöser für die gestörte Pigmentierung in Rac1 Rescue Haaren

Neben den beschriebenen strukturellen Veränderungen im Cortex könnte eine Beeinflussung der Pigmentaufnahme durch die Keratinozyten in den Haarbulbi oder eine Beeinflussung der Melanozyten selber für die gestörte Pigmentverteilung im Haarschaft verantwortlich sein. Daher wurden zusätzlich mögliche pigmentierungsbedingte Veränderungen in den Haarfollikeln von Rac1 Rescue Mäusen näher untersucht.

Eine Analyse der Pigmentierung des Haarbulbus in H&E-gefärbten Schnitten hat bereits gezeigt, dass Rac1 Rescue Mäuse eine abnorme Haarbulbuspigmentierung aufweisen (vgl. Abb. 3-15). Um diese Veränderungen genauer zu charakterisieren, wurde die Pigmentverteilung im Haarbulbus in Semidünnschnitten untersucht. In Rac1 Rescue Mäusen wurden Melaningranula nicht nur im Bereich der Haarmatrix gefunden, wie in den Kontrollen zu erkennen, sondern zusätzlich auch im Bereich der dermalen Papille (Abb. 3-23, oben). Weiterhin schienen die Melaningranula in den Haarbulbi der Rac1 Rescue Mäuse nicht, wie in den Kontrollen, mit den haarschaftbildenden Zellen assoziiert, sondern vielmehr in den Zellzwischenräumen der Haarmatrixzellen abgelagert zu sein. Möglicherweise besitzen die pigmentsaufnehmenden Keratinozyten des Haarbulbus in Rac1 Rescue Mäusen einen Defekt in der Melaningranulaaufnahme, der das extrazellulär abgelagerte Pigment erklären könnte. Auch die in den Kontrollen zu erkennende apikale Lokalisation des Pigments in den haarschaftbildenden Zellen des Haarbulbus war in Rac1 Rescue Mäusen verloren gegangen (siehe Abb. 3-23, unten). Dies könnte darauf hinweisen, dass eine Störung der subzellulären Verteilung des Pigments in den suprabasalen Rac1-defizienten Keratinozyten des Haarbulbus vorliegt.

Da diese suprabasalen Keratinozyten defizient für Rac1 sind, wäre es möglich, dass Rac1 Prozesse der Pigmentaufnahme und -verteilung in diesen Zellen reguliert. Weiner *et al.*, 2007 haben beschrieben, dass die pigmentsaufnehmenden Zellen im Haarbulbus durch eine Expression von Foxn1 gekennzeichnet sind. Da jedoch die Foxn1-Expression in den Haarfollikeln von Rac1 Rescue Mäusen unverändert zu sein scheint (vgl. Abb. 3-12), ist es nicht wahrscheinlich, dass Rac1 die Pigmentaufnahme über einen Foxn1-abhängigen Mechanismus reguliert. Jedoch ist es möglich, dass Rac1 andere Mechanismen, die die Pigmentaufnahme regulieren, beeinflusst.

Bei der Untersuchung der Pigmentierung der Haarbulbi fiel außerdem auf, dass die Melaningranula in Rac1 Rescue Mäusen scheinbar eine geringere Größe besaßen. Dies fiel bereits auch während der elektronenmikroskopischen Analyse des Cortex auf, wo die Melaningranula in Rac1 Rescue Haarschäften ebenfalls reduziert erschienen (vgl. Abb. 3-17). Die reduzierte Größe der Melaningranula könnte zum einen dadurch bedingt sein, dass diese in den Melanozyten bereits mit einer verringerten Größe gebildet wurden oder zum anderen, dass diese nach Aufnahme durch die Keratinozyten bereits abgebaut wurden. Um jedoch eine genaue Aussage über die Größe der Granula treffen zu können, sollte in weiterführenden Studien eine Quantifizierung der Granulagröße erfolgen.

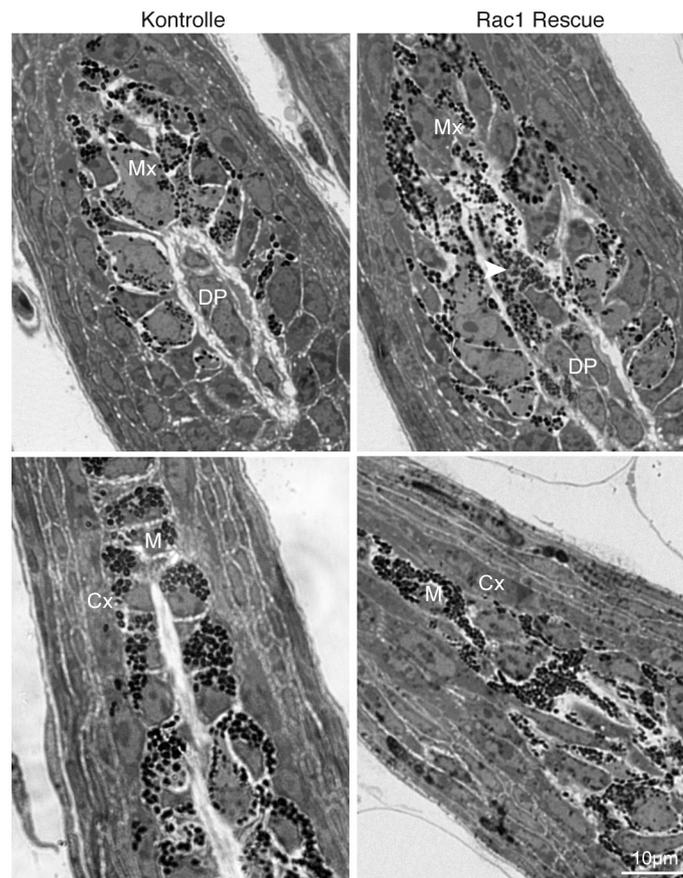


Abbildung 3-23: Verteilung der Melaningranula in den Haarbulbi von Kontrolltieren und Rac1 Rescue Mäusen. Die Pigmentierung der Haarbulbi wurde durch lichtmikroskopische Untersuchung an Semidünnschnitten analysiert. M: Medulla, Cx: Cortex, DP: dermale Papille. Skalierungsbalken: 10 µm.

Um zu überprüfen, ob die Veränderungen in der Pigmentierung der Haarbulbi durch eine Veränderung oder einen Verlust der Melanozyten in den Haarbulbi von Rac1 Rescue Mäusen ausgelöst wurden, wurden die Melanozytenpopulationen in den Haarbulbi untersucht. Hierzu wurde eine Doppelfärbung von Trp2 als Marker für Melanozytenvorläuferzellen [Steel *et al.*, 1992] und Tyrp1 als Marker für reife Melanozyten [Virador *et al.*, 2001] durchgeführt. Es zeigte sich, dass an Tag 10 p.p. in Rac1 Rescue Mäusen im Vergleich zu den untersuchten Kontrollen keine Veränderung in der Melanozytengesamtanzahl in den Haarbulbi vorlag. Zusätzlich konnte kein Verlust einer speziellen Melanozytenpopulation in den Haarbulbi festgestellt werden (siehe Abb. 3-24a). Eine Untersuchung der Melanogeneseaktivität in den Haarbulbi durch Durchführung eines Tyramid-basierten Tyrosinase-Assays (TTA) [Han *et al.*, 2002] ergab in Rac1 Rescue Mäusen ebenfalls keine Veränderungen (siehe Abb. 3-24b). Zusammengefasst weisen die Ergebnisse darauf hin, dass eine suprabasale Deletion von Rac1 keinen Einfluss auf den Erhalt der Melanozyten in den Haarbulbi oder deren Melanogeneseaktivität besitzt.

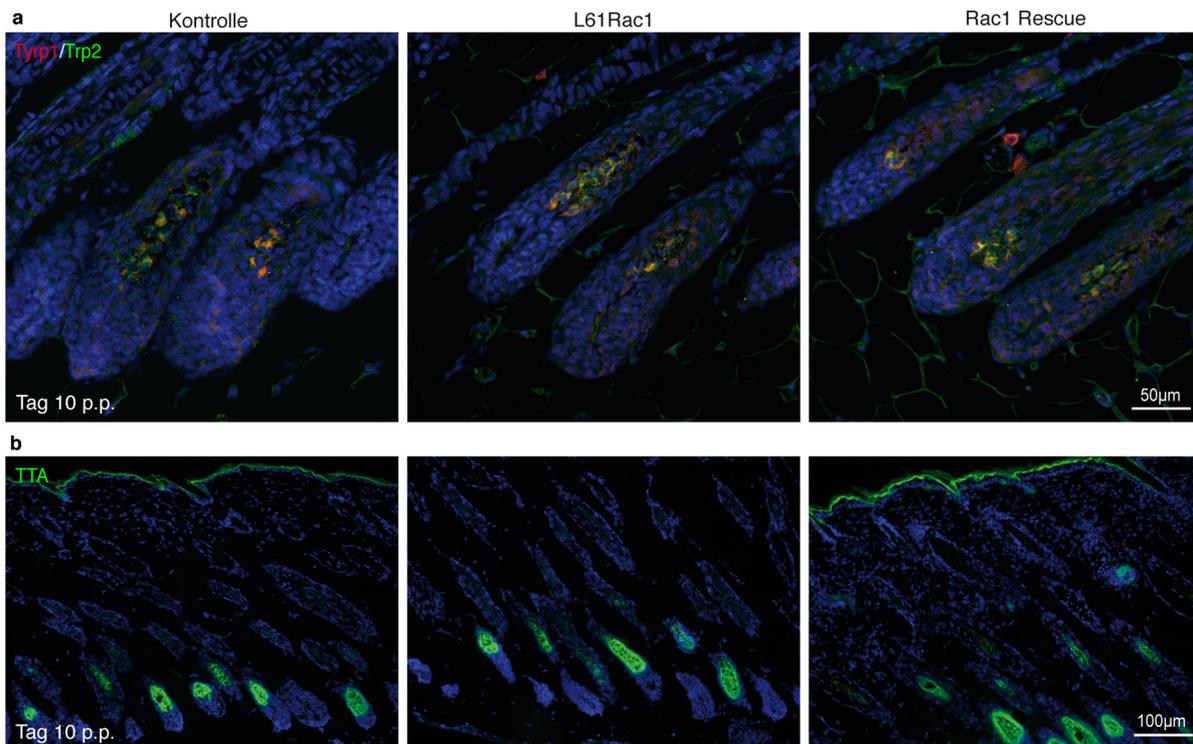


Abbildung 3-24: Untersuchung der Melanozytenpopulationen im Haarbulbus (a) und Nachweis Melanin-produzierender Tyrosinase-aktiver Melanozyten im Haarbulbus (b) in 10 Tage alten Mäusen. (a) Zum Nachweis reifer Melanozyten (Typr1-positiv) und Melanozytenvorläuferzellen (Trp2-positiv) in den Haarbulbi von 10 Tage alten Mäusen wurden Paraffinschnitte mit Antikörpern gegen Typr1 (rot) und Trp2 (grün) gefärbt, Zellkerne wurden mit Dapi (blau) gefärbt. (b) Melanin-produzierende Tyrosinase-aktive Melanozyten wurden mit Hilfe des Tyramide-basierten Tyrosinase-Assays in den Haarbulbi auf Kryoschnitten angefärbt. Skalierungsbalken: 50 µm (a), 100 µm (b).

Bei Untersuchung der Haarfollikelmorphologie in H&E-gefärbten Schnitten an Tag 10 p.p. fiel auf, dass sowohl bei Rac1 E-KO als auch bei Rac1 Rescue Mäusen Melanozyten in der IFE zu finden waren. Zu diesem Zeitpunkt sind jedoch bei normaler Entwicklung kaum noch Melanozyten in muriner Epidermis nachweisbar [Mayer, 1973; Hirobe, 1984; Hirobe, 1992; Mackenzie *et al.*, 1997; Nishimura *et al.*, 1999], da diese während der Entwicklung aus der Epidermis in die sich bildenden Haarfollikel einwandern und sich in der Haarmatrix lokalisieren [Yoshida *et al.*, 1996; Nishimura *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 2002; Botchkareva *et al.*, 2003].

Um die epidermalen Melanozyten in Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen quantifizieren zu können, wurde eine histochemische Färbung mit L-DOPA durchgeführt. L-DOPA wird von dem in Melanozyten enthaltenen Enzym Tyrosinase umgesetzt und färbt die DOPA-reaktiven Bereiche dunkelbraun an [Laidlaw & Blackberg, 1932; Hirobe, 1984]. Die Färbung von Hautproben an Tag 10 p.p. mit L-DOPA zeigt deutlich gefärbte Melanozyten in der Epidermis von Rac1 E-KO Mäusen, die an der dermalen-epidermalen Grenze lokalisiert sind. Auch in der Rac1 Rescue Haut sind einige Melanozyten in der IFE lokalisiert, jedoch scheint deren Anzahl im Vergleich zu Rac1 E-KO reduziert zu sein (siehe Pfeile in Abb. 3-25a). Die Anzahl

der DOPA-positiven Zellen in der IFE wurde zu verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert, um einen Überblick über das Einwanderungsverhalten der Melanozyten in die Epidermis zu erhalten. Eine Quantifizierung der DOPA-positiven Zellen in der Epidermis an Tag 1 p.p. zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Melanozytenanzahl, jedoch konnte an Tag 5 p.p., an dem bereits eine starke Zerstörung der Haarfollikel festzustellen war (nicht dargestellt), eine 20-fach erhöhte Anzahl epidermaler Melanozyten im Vergleich zu den untersuchten Kontrollen nachgewiesen werden.

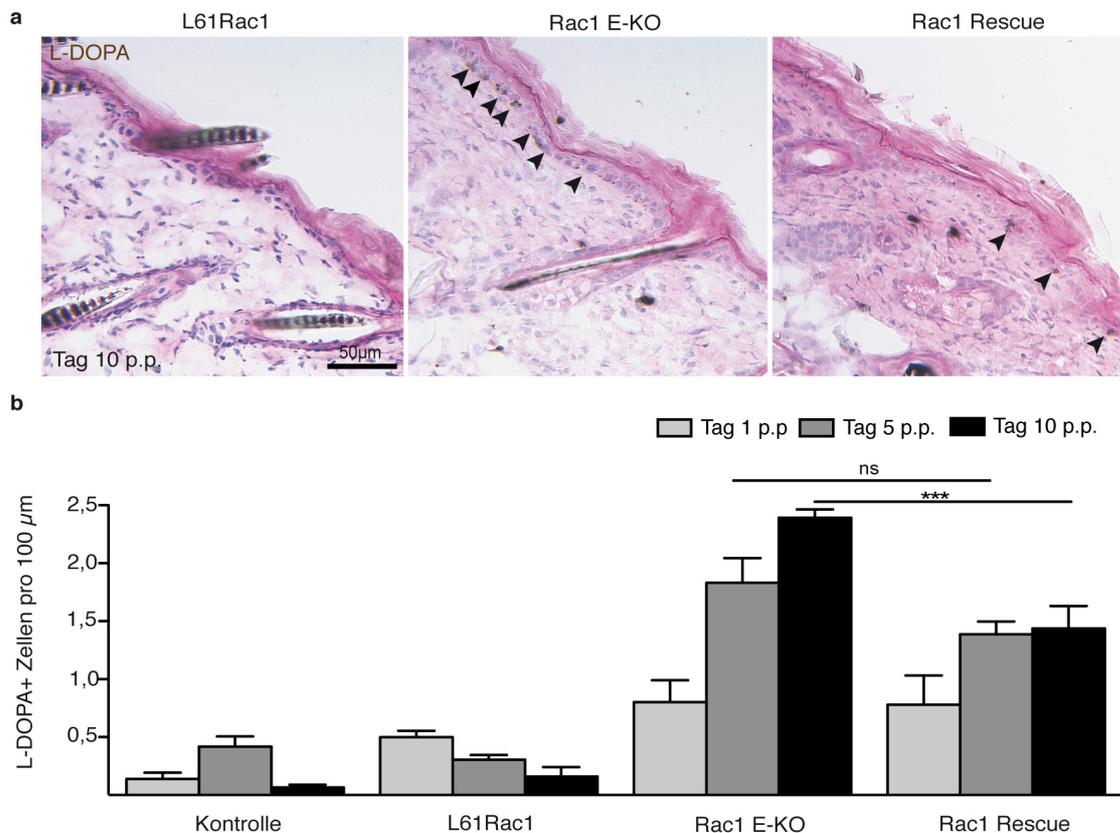


Abbildung 3-25: Ektopische Pigmentierung in Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen. (a) Visualisierung von Melanozyten in der Epidermis durch Färbung mit L-DOPA in 10 Tage alten Mäusen. Pfeile markieren dabei epidermale Melanozyten in Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen. Skalierungsbalken: 50 µm. (b) Quantifizierung der epidermalen DOPA-positiven Zellen pro 100 µm in Kontroll- und L61Rac1 transgenen Tieren sowie Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen an Tag 1, 5 und 10 p.p. (n=3-6). Mittelwert ± SEM, statistische Analyse mittels Student's t-Test, ns p>0,05, ***p<0,001.

Auch in Rac1 Rescue Hautproben ist die Melanozytenanzahl zu diesem Zeitpunkt bereits 15-fach erhöht. An Tag 10 p.p konnte eine weitere Erhöhung in Rac1 E-KO Mäusen im Vergleich zu den untersuchten Kontrolltieren und L61Rac1 transgenen Mäusen detektiert werden, wohingegen in Rac1 Rescue Mäusen die Anzahl der Melanozyten nicht weiter zugenommen hat. Im Gegensatz zu Rac1 E-KO Mäusen war sie signifikant reduziert (siehe

Abb. 3-25b). Es ist möglich, dass die erhöhte Anzahl in Rac1 E-KO Mäusen durch Melanozyten verursacht wird, die aus den zerstörten Haarbulbi in die Epidermis einwandern, um dort eine andere vakante Nische zu besiedeln. Es wurde bereits beschrieben, dass unter gewissen Voraussetzungen Melanozyten das Vermögen besitzen, in das epidermale Kompartiment einwandern zu können [Nishimura *et al.*, 2002; Weiner *et al.*, 2007]. Andererseits wandern möglicherweise nicht alle Melanozyten der Epidermis in die sich bildenden Haarfollikel ein und sorgen dadurch für eine Erhöhung der Melanozytenanzahl in Rac1 Rescue Mäusen (siehe Abb. 3-25b).

Die durch L-DOPA-Färbung nachgewiesenen epidermalen Melanozyten in Rac1 E-KO Mäusen betreiben aktiv Melanogenese, was durch die Durchführung eines TTA-Assays auf Hautproben von 10 Tage alten Mäusen nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3-26a). Wahrscheinlich resultiert die Melanogeneseaktivität der epidermalen Melanozyten in adulten Rac1 E-KO Mäusen in dem in Abbildung 3-26b dargestellten äußerlich sichtbaren Pigmentierungsphänotyp. Diese Mäuse wiesen in fortgeschrittenem Alter äußerlich sichtbare Pigmentflecken der Haut an Kopf und Rücken sowie eine fast vollständige Pigmentierung des Schwanzes auf. Die Pigmentierung der Haut in adulten Rac1 Rescue Mäusen wurde bisher nicht untersucht. Vermutlich weisen diese unter ihrem Fell einen ähnlichen Pigmentierungsdefekt der Haut auf, da auch bei ihnen durch TTA-Analyse melanogenetisch aktive Melanozyten in der IFE nachgewiesen werden konnten (vgl. Abb. 3-26a).

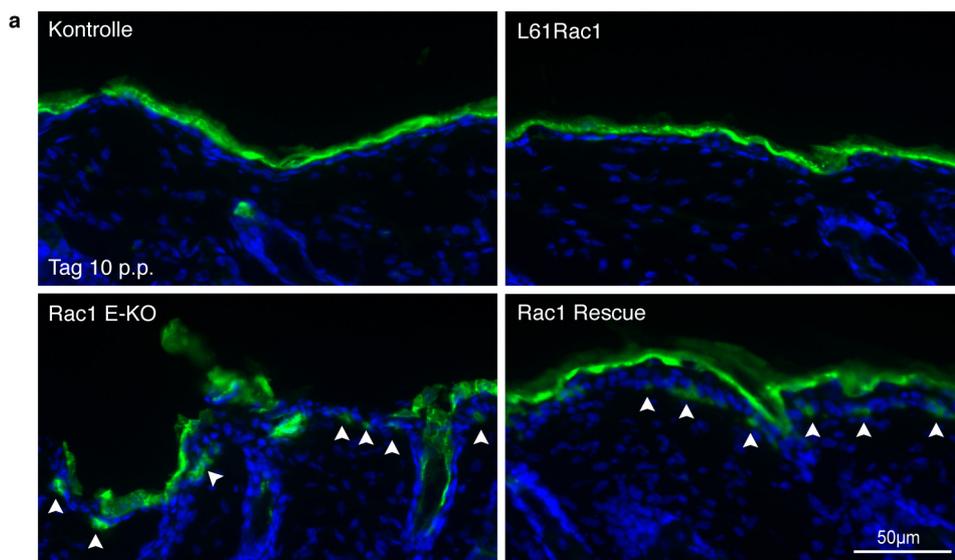




Abbildung 3-26: Nachweis melanogenetisch aktiver Melanozyten in der IFE in 10 Tage alten Mäusen (a) und Pigmentierungsdefekt der Haut in adulten Rac1 E-KO Mäusen. (a) Melanin-produzierende, d.h. Tyrosinase-aktive Melanozyten wurden mit Hilfe des Tyramide-basierten Tyrosinase-Assays in den Haarbulbi auf Kryoschnitten angefärbt. (b) Die Aufnahmen zeigen die äußerliche Pigmentierung der Haut in einer ca. 10 Monate alten Rac1 E-KO Maus an Kopf (links), Rücken (Mitte) und Schwanz (rechts). Skalierungsbalken: 50 μ m

3.4 Untersuchung möglicher Ursachen der Haarfollikeldegradierung in Rac1 E-KO Mäusen

Da, wie in vorangegangenen Abschnitten beschrieben, die Haarfollikel in Rac1 E-KO Mäusen durch eine fortschreitende Zerstörung des nicht-permanenten Teils des Haarfollikels gekennzeichnet sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit außerdem mögliche Gründe für die Haarfollikeldegradierung untersucht.

Zunächst wurde hierzu die genaue Lokalisation und Anzahl an dermalen und perifollikulären Entzündungszellen im Bereich der Haarfollikel durch Doppelfärbung mit Antikörpern gegen F4/80 für aktivierte Makrophagen und MHCII für dendritische Zellen analysiert. Bereits an Tag 1 p.p., an welchem in histologischen Untersuchungen keine pathologische Veränderung der Haarfollikel zu finden war (nicht dargestellt), konnte an einer geringen Anzahl an Haarfollikeln in Rac1 E-KO Mäusen eine Akkumulation von sowohl Makrophagen als auch dendritischen Zellen spezifisch an den Haarbulbi beobachtet werden (siehe Pfeil in Abb. 3-27, oben). Eine solche Akkumulation der Zellen war an Tag 5 p.p. an nahezu jedem zerstörten Haarfollikel zu finden (siehe Pfeil in Abb. 3-27, unten). Im Vergleich zu Rac1 E-KO Mäusen konnte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine Ansammlung der Immunzellen im Bereich der Haarfollikel in Rac1 Rescue Mäusen beobachtet werden. Auch die untersuchten Kontroll- und L61Rac1 transgenen Mäuse zeigten keine Assoziation der Immunzellen mit dem Haarfollikel (siehe Abb. 3-27, unten).

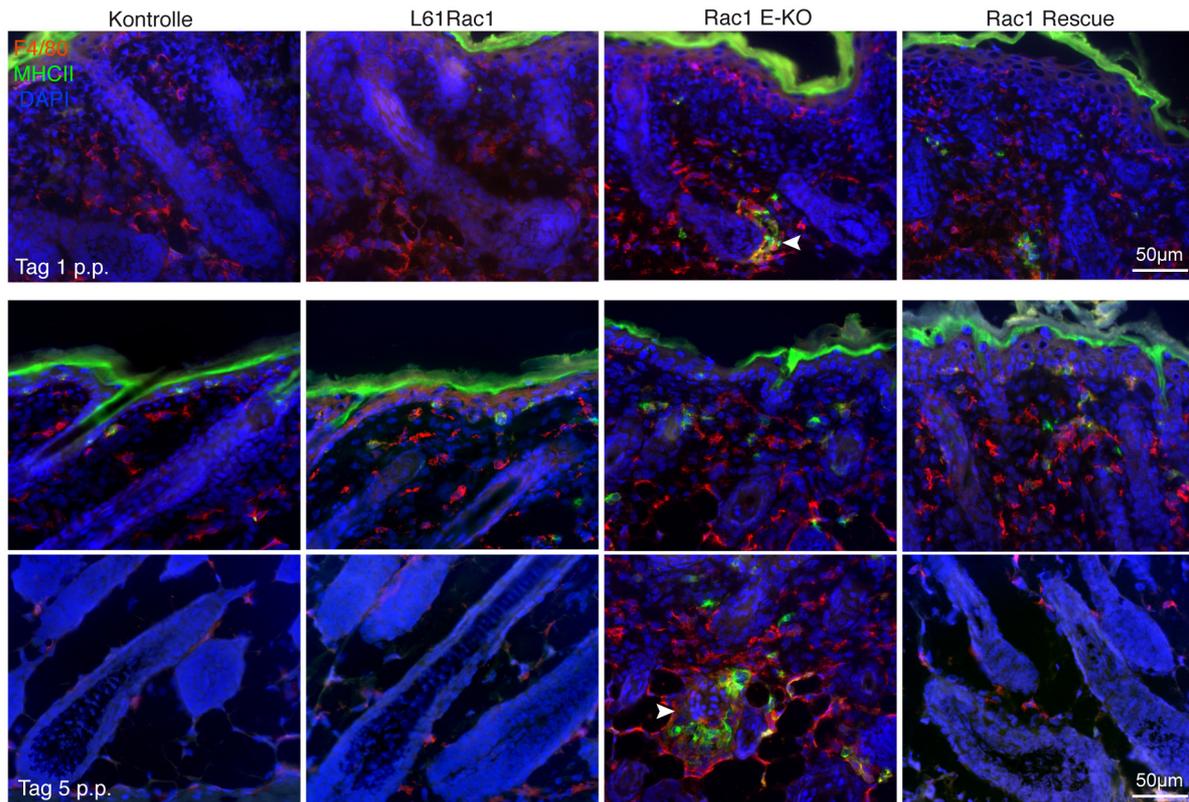


Abbildung 3-27: Beteiligung inflammatorischer Zellen an der Haarfollikeldegradierung in Rac1 E-KO Mäusen. Hautproben von Kontroll- und L61Rac1 transgenen Tieren sowie Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen, entnommen an Tag 1 p.p. und Tag 5 p.p., wurden mit Antikörpern gegen F4/80 für Makrophagen (rot) und MHCII für dendritische Zellen (grün) gefärbt, die Zellnuklei wurden mit Dapi (blau) angefärbt. Skalierungsbalken: 50 µm.

Wie von Maurer *et al.*, 1995 beschrieben, übernehmen wahrscheinlich auch Mastzellen eine wichtige Funktion in der Ausbildung von Anagen-Haarfollikeln sowie der Ausführung der Veränderungen in der dermalen Organisation während des Haarwachstums. Daher wurden auch mögliche Veränderungen in der Mastzellpopulation in Rac1 E-KO Mäusen untersucht. Hierzu wurde eine Giemsa-Färbung durchgeführt, die histologisch Mastzellen durch ihre dunkelviolette Färbung erkennen lässt. An Tag 10 p.p. konnte im Vergleich zu homozygot geflochten Kontrollmäusen in Rac1 E-KO Mäusen keine veränderte Anzahl an Mastzellen oder eine Akkumulation von Mastzellen an den Haarfollikeln, die an Tag 10 p.p. bereits vollständig degradiert sind, detektiert werden (siehe Abb. 3-28). Auch zu einem früheren Zeitpunkt (Tag 1 p.p.) konnte kein Unterschied in Mastzellanzahl und Lokalisation in Rac1 E-KO Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden (siehe Abb. 3-28).

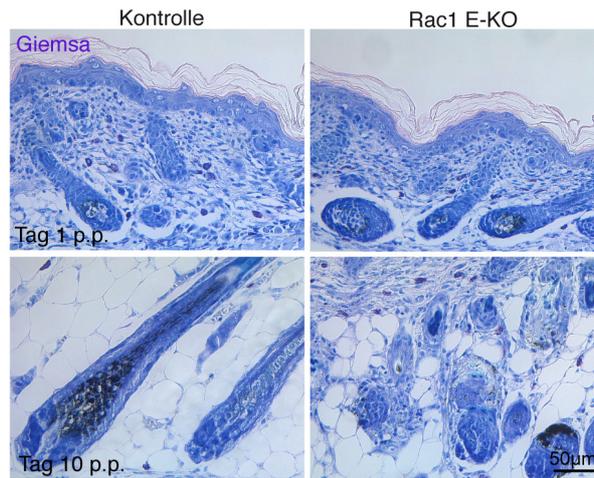


Abbildung 3-28: Verteilung dermalen und perifollikulärer Mastzellen in Kontroll- und Rac1 E-KO Mäusen. Mastzellen wurden an Tag 1 und Tag 10 p.p. durch Anfärbung mit Giemsa histologisch durch ihre dunkelviolette Färbung nachgewiesen. Zur Visualisierung des umliegenden Gewebes wurde mit Hämalaun gegengefärbt. Skalierungsbalken: 50 µm.

Da, wie von Eichmüller *et al.*, 1998 beschrieben, in Bereichen mit einer starken Akkumulation von perifollikulären Immunzellen oftmals auch eine erhöhte Apoptose der Keratinozyten der äußeren Haarwurzelscheide zu finden ist, wurde die Lokalisation und Anzahl apoptotischer Zellen in einem TUNEL-Assay [Gavrieli *et al.*, 1992] an verschiedenen postnatalen Zeitpunkten untersucht.

An Tag 10 p.p. zeigten die bereits stark zerstörten Haarfollikel der Rac1 E-KO Mäuse eine deutliche Akkumulation von TUNEL-positiven Zellen in den Bereichen der zerstörten Haarfollikel, wohingegen in Kontroll- und L61Rac1 transgenen Mäusen kaum TUNEL-positiv Zellen entlang der Haarfollikel detektiert werden konnten. In Rac1 Rescue Mäusen konnte zu diesem Zeitpunkt eine erhöhte Anzahl an perifollikulären TUNEL-positiven Zellen festgestellt werden (siehe Pfeile in Abb. 3-29, unten). Diese scheinen jedoch nicht direkt mit dem Haarfollikel assoziiert zu sein. Um herauszufinden, zu welchem Zeitpunkt der apoptotische Abbau der Haarfollikel einsetzt, wurde zusätzlich eine TUNEL-Analyse für Tag 1 p.p. durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt konnte bereits an einzelnen Haarfollikeln eine Akkumulation von TUNEL-positiven Zellen im Bereich der Haarbulbi in Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen detektiert werden (siehe Pfeile in Abb. 3-29, oben), was jedoch nicht näher quantifiziert wurde. Im Vergleich dazu konnten in Kontrolltieren sowie L61Rac1 transgenen Kontrollen nur positive Zellen in der inneren Haarwurzelscheide nachgewiesen werden, die jedoch für gewöhnlich während der Differenzierung des Haarfollikels dort entstehen [Magerl *et al.*, 2001].

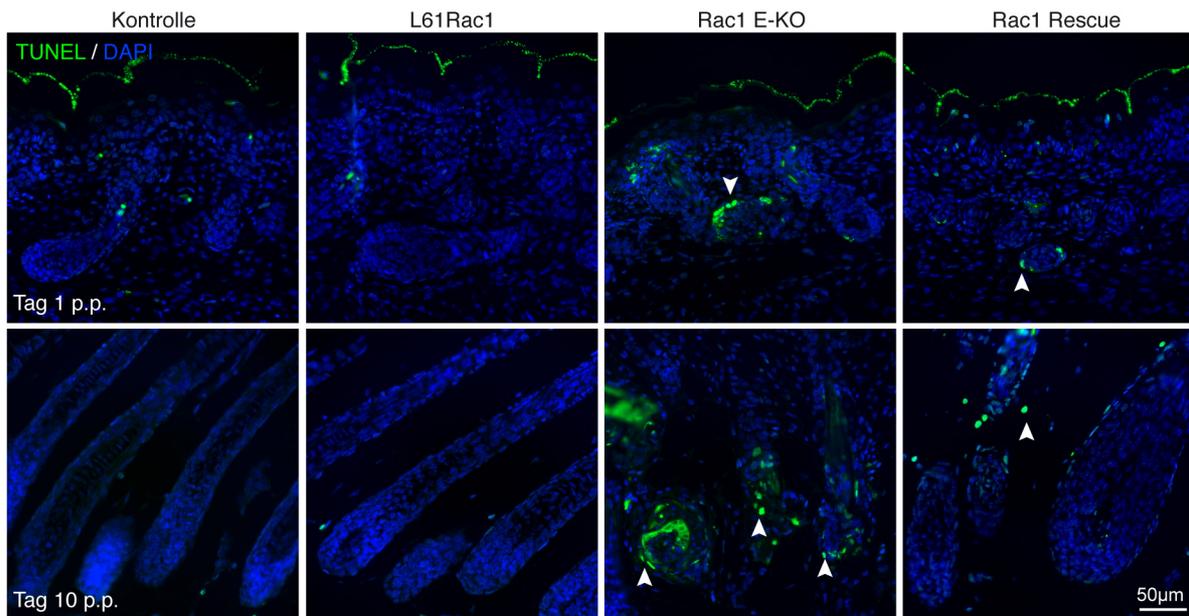


Abbildung 3-29: Analyse perifollikulärer apoptotischer Zellen in Kontroll- und L61 transgenen Tieren sowie Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen. Durch Anwendung des kommerziell erhältlichen TUNEL-Assays wurde in Paraffinschnitten an Tag 1 (obere Zeile) und Tag 10 p.p. (untere Zeile) die Anwesenheit apoptotischer Zellen detektiert (grün). Zellkerne wurden zusätzlich mit DAPI gefärbt (blau). Skalierungsbalken: 50 µm.

Durch zusätzliche Untersuchung von an Tag 2, 4 und 5 p.p. entnommenen Hautproben konnte ein Anstieg TUNEL-positiver Zellen im Bereich der Haarbulbi bzw. später im Bereich der zerstörten Haarfollikel in Rac1 E-KO Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt werden (Pfeile in Abb. 3-30).

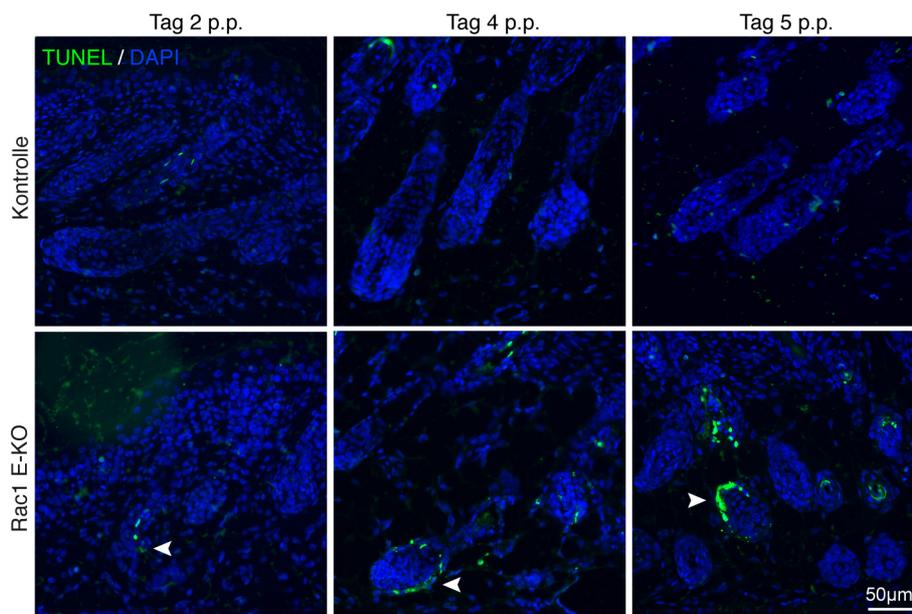


Abbildung 3-30: Analyse apoptotischer Zellen in der äußeren Haarwurzelscheide von Kontroll- und Rac1 E-KO Mäusen. Durch Anwendung des kommerziell erhältlichen TUNEL-Assays wurde in Paraffinschnitten an Tag 2 (links), Tag 4 (Mitte) und Tag 5 p.p. (rechts) die Anwesenheit apoptotischer Zellen detektiert (grün). Zellkerne wurden zusätzlich mit DAPI gefärbt (blau). Skalierungsbalken: 50 µm.

Eine TEM-Analyse der Rac1 E-KO Haarfollikel an Tag 10 p.p. bestätigte die Lokalisation apoptotischer Zellen in der äußeren Haarwurzelscheide. Diese konnten in Querschnitten der Haarfollikel unter dem Elektronenmikroskop durch ihren charakteristischen stark kondensierten Kern und ein kaum vorhandenes Zytoplasma identifiziert werden (Pfeil in Abb. 3-31). Im Vergleich dazu konnten weder in Kontroll- noch in L61Rac1 transgenen Mäusen apoptotische Zellen in der äußeren Haarwurzelscheide nachgewiesen werden.

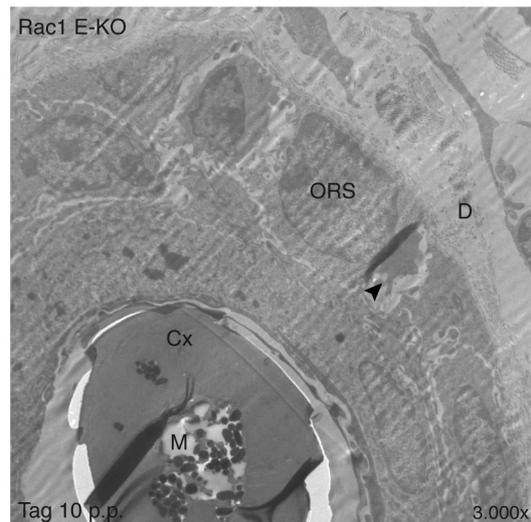


Abbildung 3-31: Apoptotische Zellen in der äußeren Haarwurzelscheide von Rac1 E-KO Mäusen. Apoptotische Zellen wurden in Hautproben, die an Tag 10 p.p. entnommen wurden, transmissionselektronenmikroskopisch anhand ihrer histologischen Eigenschaften identifiziert. Darstellung in 3.000x Vergrößerung. M: Medulla, Cx: Cortex, ORS: äußere Haarwurzelscheide (Aufnahme durch Prof. W. Bloch, Köln).

Unklar bleibt jedoch, ob ein direkter intrinsischer Effekt für die erhöhte Apoptose in den Rac1 E-KO Bulbuskeratinozyten verantwortlich ist oder ob zum Beispiel die äußere Schutzfunktion des Haarfollikels, die diesen gegen Angriffe von Immunzellen schützt (Immunprivileg des Haarfollikels), negativ beeinflusst wurde. Es wurde bereits gezeigt [Rosenblum *et al.*, 2004], dass die Expression von CD200, die um den Haarfollikel in der äußeren Haarwurzelscheide lokalisiert ist, eine solche Funktion übernimmt. Um zu überprüfen, ob die CD200-Expression in Rac1 E-KO Mäusen eventuell beeinträchtigt ist, wurde CD200 in der Haut von Rac1 E-KO, Rac1 Rescue sowie Kontroll- und L61Rac1 transgenen Mäusen gefärbt. Diese zeigten keine Veränderung in der CD200-Expression in der äußeren Haarwurzelscheide in Rac1 E-KO Mäusen an Tag 1 und Tag 10 p.p. im Vergleich zu den Kontrollen (nicht dargestellt).

Zusammenfassend lassen es die Ergebnisse möglich erscheinen, dass in Rac1 E-KO Mäusen eine Induktion apoptotischer Prozesse in den Keratinozyten der äußeren Haarwurzelscheide der Auslöser für die fortschreitende Haarfollikeldegradierung ist. Die

Induktion der Apoptose konnte in Rac1 Rescue Mäusen durch basale Expression des L61Rac1 TGs verhindert werden, was darauf hinweisen könnte, dass die Zerstörung der Haarfollikel in Rac1 E-KO Mäusen durch eine Induktion der Apoptose bedingt ist. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Rac1 eine Rolle in der Regulation apoptotischer Prozesse besitzt. Um zu untersuchen, ob Rac1 in Keratinozyten eine generelle Funktion in der Induktion apoptotischer Prozesse übernimmt, wurden zusätzlich Experimente zur Untersuchung der Empfindlichkeit von Rac1-defizienten Keratinozyten gegenüber apoptotischen Reizen durchgeführt.

3.5 Untersuchung UVB-induzierter Apoptose in Rac1 E-KO Mäusen

UVB-Strahlung stellt den häufigsten Auslöser der Apoptose von epidermalen Keratinozyten dar. Sie wird von den Keratinozyten der Epidermis absorbiert. Dies führt zu einer Reihe von zellulären Veränderungen und kann bei starker Schädigung der Zellen, beispielsweise durch eine hohe UV-Dosis, zur Induktion von Apoptose in der Epidermis führen. Zur Analyse eines möglichen generellen Defekts in der Regulation apoptotischer Prozesse in Rac1-defizienten Keratinozyten wurden UVB-Bestrahlungsexperimente an Kontroll- und Rac1 E-KO Mäusen durchgeführt. Hierbei wurde die Rückenhaut der Mäuse einmalig mit einer hohen Dosis UVB-Strahlung von 1000 mJ/cm² behandelt und die Haut im Anschluss zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung histologisch begutachtet.

Die histologische Untersuchung der Hautproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung zeigte 1 h nach Bestrahlung keinerlei Veränderungen der Morphologie der IFE von sowohl Kontroll- als auch Rac1 E-KO Mäusen. Auch 12 h nach Bestrahlung konnten keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen in der Haut von Kontroll- und Rac1 E-KO Mäusen detektiert werden. Jedoch zeigten die Histologien der Mäuse zu diesem Zeitpunkt apoptotische Keratinozyten, so genannte Sonnenbrandzellen (SBZ), in der IFE. Diese können in H&E-gefärbten Schnitten durch ihr eosinophiles Zytoplasma und ihren kondensierten Kern erkannt werden [Daniels *et al.*, 1961; Woodcock & Magnus, 1976]. 24 h nach Bestrahlung waren im Vergleich dazu schwerwiegende pathologische Veränderungen in den Hautproben der Rac1 E-KO Mäuse zu erkennen. Rac1 E-KO Mäuse zeigten zu diesem Zeitpunkt eine vakuolige Degeneration der basalen Zellen bis hin zu einer vollständigen Zerstörung dieser Zellen, was in einer Ablösung der Epidermis von der Dermis resultiert (siehe Pfeile in Abb. 3-32). Die Epidermis der bestrahlten Kontrollmäuse wies zu diesem Zeitpunkt keine derartigen Veränderungen auf (siehe Abb. 3-32). Jedoch konnten in den Kontrollen auch zu diesem Zeitpunkt SBZ in der IFE histologisch detektiert werden. Die geringen Veränderungen in der Morphologie der IFE von Kontrolltieren 24 h nach

Bestrahlung belegen, dass die für die Bestrahlung gewählte hohe Dosis von 1000 mJ/cm^2 generell nicht zu hoch ist, jedoch ausreichend war, um Apoptose in den Keratinozyten der IFE zu induzieren und die beschriebenen pathologischen Veränderungen in der Epidermis von Rac1 E-KO Mäusen hervorzurufen. Aus diesem Grund wurden auch alle konsekutiven Untersuchungen an Hautproben, die mit derselben Dosis von 1000 mJ/cm^2 bestrahlt wurden, durchgeführt.

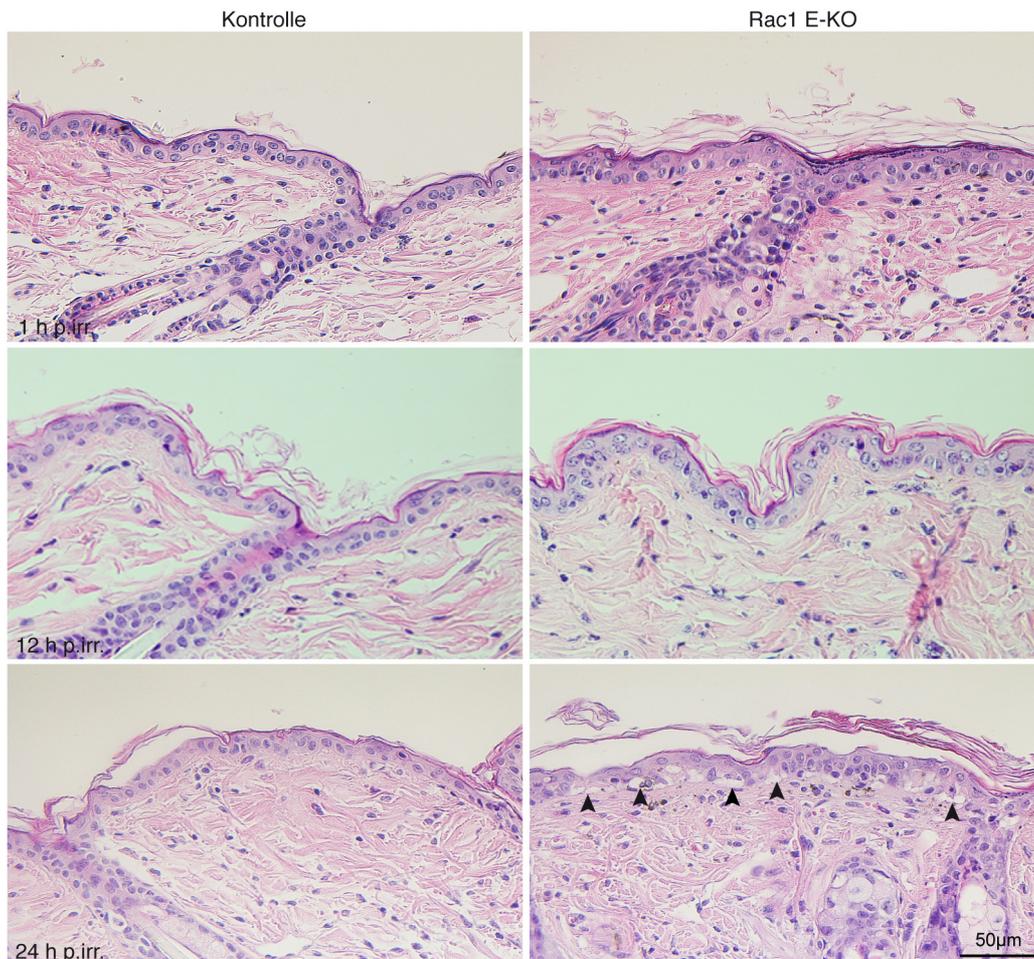


Abbildung 3-32: Histologische Darstellung der UVB-vermittelten Effekte auf die IFE von Kontrolltieren und Rac1 E-KO Mäusen. Die Abbildung zeigt die Morphologie der IFE von Kontroll- und Rac1 E-KO Mäusen 1, 12 und 24 h nach Bestrahlung mit 1000 mJ/cm^2 UVB in H&E-gefärbten Paraffinschnitten. Skalierungsbalken: $50 \text{ }\mu\text{m}$.

Um zu überprüfen, ob die Ablösung der Basalzellschicht der Epidermis in Rac1 E-KO Mäusen 24 h p. irr. durch eine erhöhte Anzahl zugrunde gehender Keratinozyten in der IFE ausgelöst wurde, wurde 12 h nach Bestrahlung die Anzahl an Sonnenbrandzellen (SBZ) in der IFE bestimmt. Wie zuvor erwähnt, sind SBZ durch ein eosinophiles Zytoplasma und einen kondensierten Kern gekennzeichnet [Daniels *et al.*, 1961; Woodcock & Magnus, 1976] und können anhand dieser Charakteristika leicht in H&E-gefärbten Schnitten detektiert werden. Da bereits während der mikroskopischen Betrachtung der Hautproben von Rac1

E-KO Mäusen 12 h p.irr. scheinbar eine größere Menge SBZ in der IFE lokalisiert waren (Pfeile in Abb. 3-33a), wurde eine Quantifizierung der SBZ in Kontroll- und Rac1 E-KO Mäusen durchgeführt (siehe Abb. 3-33b).

Die Quantifizierung der SBZ zeigte eine ca. 5-fach erhöhte Anzahl an SBZ in der Epidermis von Rac1 E-KO Mäusen im Vergleich zu den untersuchten Kontrollen. Zum Zeitpunkt der Probenahme 12 h p.irr. wurden von den bestrahlten Mäusen zusätzlich Hautproben aus einem unbestrahlten Areal am Rücken entnommen. In diesen wurde ebenfalls die Anzahl an SBZ in der IFE bestimmt. Jedoch konnte auch in den unbestrahlten Proben keine Erhöhung der Anzahl der SBZ sowohl in Rac1 E-KO Mäusen als auch in den Kontrollen gefunden werden. Dies zeigt, dass Apoptose von epidermalen Keratinozyten nicht spontan verläuft, sondern dass ein pro-apoptotischer Stimulus, wie die Bestrahlung mit UVB, notwendig ist, um die Apoptose in den Keratinozyten der IFE zu induzieren.

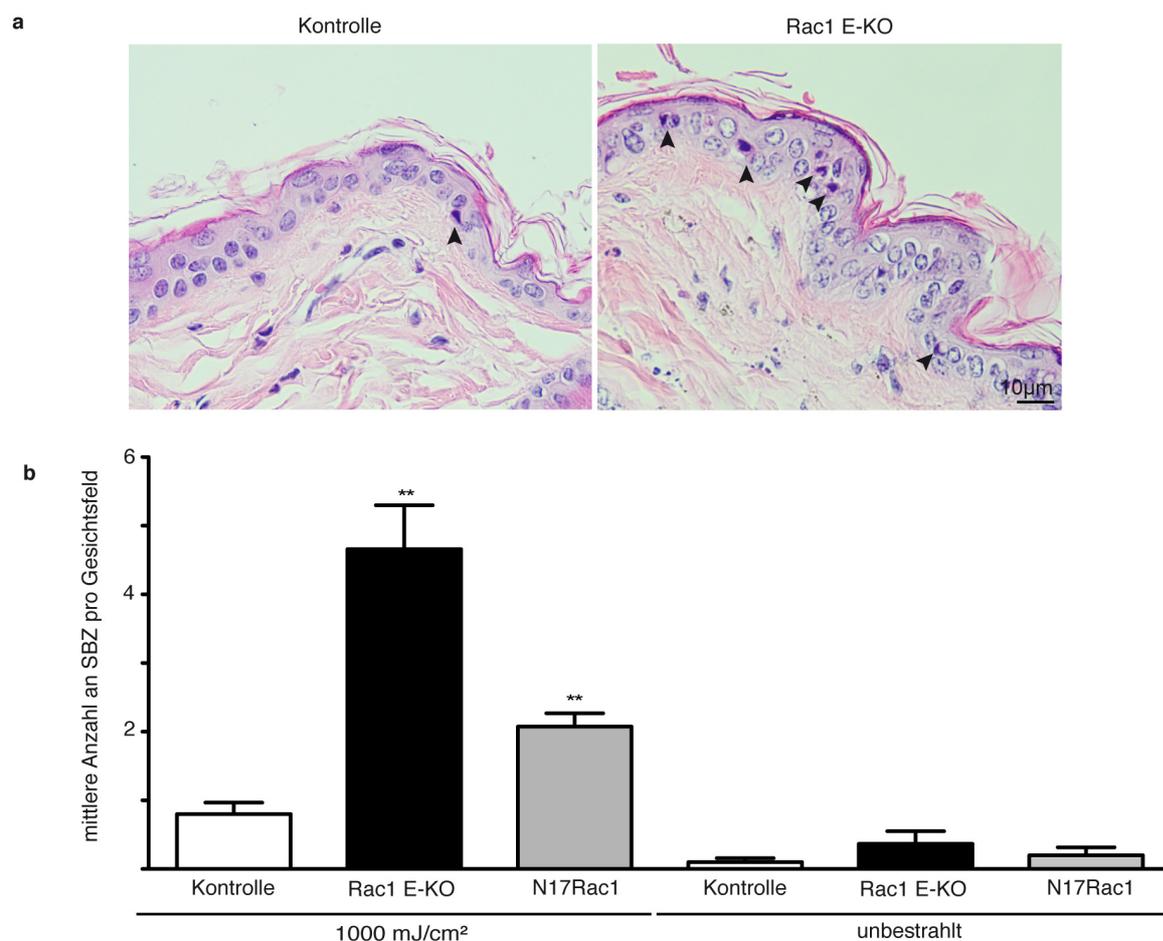


Abbildung 3-33: Histologisches Erscheinungsbild UV-induzierter apoptotischer Sonnenbrandzellen (SBZ) in der IFE von Kontrolltieren und Rac1 E-KO Mäusen (a) und deren Quantifizierung in Kontroll-, Rac1 E-KO und N17Rac1 transgenen Mäusen (b) nach UVB-Bestrahlung. (a) SBZ sind in H&E-gefärbten Schnitten von Kontroll- und Rac1 E-KO Mäusen 12 h p.irr. mit 1000 mJ/cm² aufgrund ihres kondensierten Kerns und ihres eosinophilen Zytoplasmas eindeutig zu erkennen. Skalierungsbalken: 50 µm. (b) Bestimmung der SBZ pro Gesichtsfeld in Kontroll- und Rac1 E-KO Mäusen sowie N17Rac1 transgenen Tieren 12 h p.irr. mit 1000 mJ/cm² UVB erfolgte unter einem 40x Objektiv (n=3-5 Mäuse). Mittelwert ± SEM, statistische Analyse mittels Student's t-Test, **p<0,01 (Kontrolle vs. Rac1 E-KO bzw. N17Rac1).

Um weiterhin auszuschließen, dass die Zerstörung der Haarfollikel in Rac1 E-KO Mäusen einen Einfluss auf die Bildung der SBZ in der IFE besitzt, wurden Mäuse, die basal dominant negatives N17Rac1 exprimieren, mit derselben Dosis UVB bestrahlt und die Anzahl der SBZ in bestrahlter und unbestrahlter Haut bestimmt. N17Rac1 transgene Tiere besitzen, wie L61Rac1 transgene Mäuse, keinen makroskopisch erkennbaren Phänotyp (vgl. Abschnitt 1.1.2.1). Insbesondere weisen sie, im Gegensatz zu Mäusen mit einer epidermalen Deletion von Rac1, keine Zerstörung der Haarfollikel auf. Die Quantifizierung der SBZ in der IFE von N17Rac1 transgenen Mäusen zeigte, wie in der Epidermis von Rac1 E-KO Mäusen, ebenfalls eine erhöhte Anzahl an SBZ in den bestrahlten Hautproben, wohingegen in den untersuchten unbestrahlten Hautproben keine Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden konnte. Die aus der Analyse der SBZ gewonnenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Deletion von Rac1 oder eine Inaktivierung der Rac1-Aktivität einen direkten Einfluss auf die Entstehung apoptotischer Keratinozyten in der IFE nach UVB-Bestrahlung besitzt.

Zusätzlich zur Quantifizierung zugrunde gehender Keratinozyten anhand histologischer Kriterien, wie es bei der Bestimmung der SBZ der Fall war, wurde eine Quantifizierung anhand weiterer Marker apoptotischer Zellen durchgeführt. Eine Methode zur Detektion apoptotischer Zellen *in situ* stellt die Durchführung eines TUNEL-Assays [Gavrieli *et al.*, 1992; Labat-Moleur *et al.*, 1998] dar, der bereits zur Detektion apoptotischer Zellen im Bereich der Haarfollikel in Rac1 E-KO Mäusen eingesetzt wurde. Mit diesem Assay werden späte Stadien der Apoptose detektiert, da dieser die freiliegenden Enden der fragmentierten DNA im Zellkern markiert.

Die Quantifizierung der TUNEL-positiven Zellen nach Bestrahlung mit 1000 mJ/cm^2 in der IFE von Rac1 E-KO und Kontrollmäusen ergab eine ungefähr dreimal höhere Anzahl an TUNEL-positiven Zellen in der Epidermis von Rac1 E-KO Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen. Auch in den untersuchten N17Rac1 transgenen Mäusen konnte eine signifikante Erhöhung der positiven Zellen nachgewiesen werden, wobei jedoch der Effekt geringer als in Rac1 E-KO Mäusen war (ca. 2-fach erhöht) (siehe Abb. 3-34). Eine zusätzliche Bestimmung der TUNEL-positiven Zellen in der IFE von Hautproben, die einem unbestrahlten Areal entnommen wurden, zeigte eine Erhöhung der positiven Zellen in Rac1 E-KO Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen. Eine solche Erhöhung konnte in N17Rac1 Mäusen nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 3-34). Die Ergebnisse zeigen, dass die epidermale Deletion von Rac1 allein bereits zu einer erhöhten Anzahl an TUNEL-positiven Zellen in der IFE führt, jedoch eine Inhibierung der basalen Rac1-Funktion in N17Rac1 transgenen Mäusen allein nicht in der Lage ist, eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen zu induzieren.

Dieser Unterschied ist am ehesten durch die in den Rac1 E-KO Mäusen vorhandene Entzündung der Haut erklärbar, die in N17Rac1 transgenen Mäusen nicht auftritt. Es ist bekannt, dass das Milieu in der Haut, insbesondere die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine, die Wahrscheinlichkeit der Apoptose von Keratinozyten entscheidend beeinflussen kann [Schwarz *et al.*, 2002].

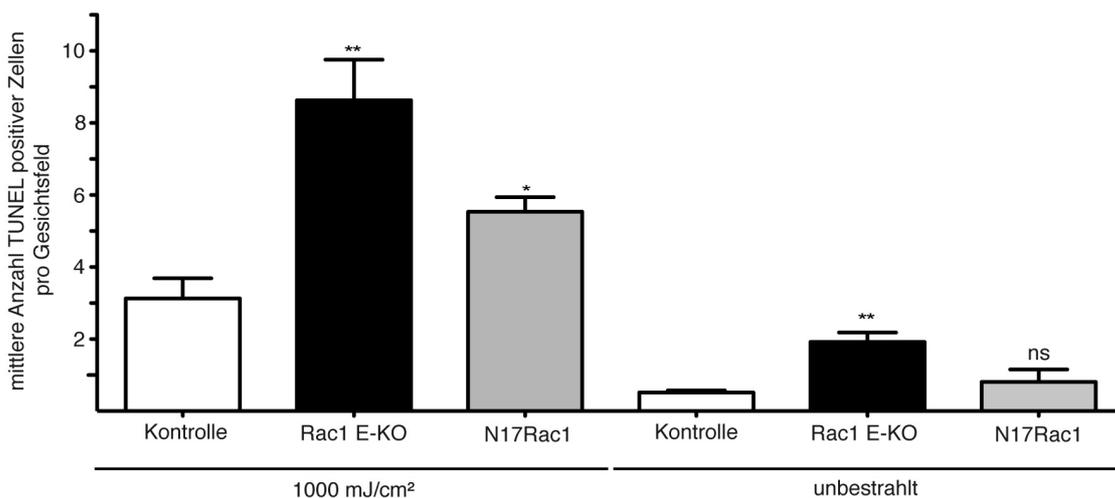


Abbildung 3-34: Quantifizierung TUNEL-positiver Zellen in der IFE von Kontrolltieren und Rac1 E-KO Mäusen sowie N17Rac1 transgenen Mäusen nach UVB-Bestrahlung. Die Bestimmung der TUNEL-positiven Zellen pro Gesichtsfeld in der IFE von Kontroll- und Rac1 E-KO Mäusen sowie N17Rac1 transgenen Tieren erfolgte 12 h p. irr. mit 1000 mJ/cm² UVB unter einem 20x Objektiv (n=3-5 Mäuse). Mittelwert \pm SEM, statistische Analyse mittels Student's t-Test, ns $p > 0,05$ (Kontrolle vs. N17Rac1, unbestrahlt), * $p < 0,05$ (Kontrolle vs. N17Rac1), ** $p < 0,01$ (Kontrolle vs. Rac1 E-KO, 1000 mJ/cm² und unbestrahlt).

Da jedoch die TUNEL-Färbung nicht völlig spezifisch für den Nachweis von apoptotischen Zelluntergängen zu sein scheint, sondern auch nekrotische Zellen nachgewiesen werden [Grasl-Kraupp *et al.*, 1995], wurde zusätzlich eine Färbung mit dem Apoptose-spezifischen Marker „aktive Caspase 3“ durchgeführt. Während der Einleitung der Apoptose wird eine Kaskade nacheinander geschalteter Caspasen aktiviert, die letztendlich für den Abbau der Zelle verantwortlich sind. Initiator-Caspasen spalten die *pro*-Form nachgeschalteter Effektor-Caspasen [Sitailo *et al.*, 2002], zu denen auch Caspase 3 zählt. Die proteolytische Aktivierung von Caspase 3 induziert die Aktivierung der abbauenden zellulären Prozesse, wie z.B. die Fragmentierung der DNA im Zellkern. Die immunhistologische Färbung der aktiven Caspase 3 stellt eine Methode dar, die apoptotische Zellen markiert, die noch nicht durch die TUNEL-Färbung erfasst werden können. Zur Färbung der aktiven Caspase 3 wurde das ca. 17 kDa große Fragment mit Hilfe eines Antikörpers nachgewiesen, der spezifisch das durch die proteolytische Aktivierung entstehende Neo-Epitop erkennt [Nicholson *et al.*, 1995].

Die Quantifizierung der aktive Caspase 3-positiven Zellen in der IFE von mit 1000 mJ/cm² UVB bestrahlten Hautproben ergab eine ca. 7-mal höhere Anzahl positiver Zellen in der Epidermis von Rac1 E-KO Mäusen verglichen mit den untersuchten Kontrollen. Im Vergleich zu den vorher dargestellten Ergebnissen konnte keine erhöhte Anzahl positiver Zellen in der Epidermis von N17Rac1 transgenen Mäusen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3-35). Möglicherweise handelt es sich bei dem beobachteten Effekt nach UVB-Bestrahlung nicht ausschließlich um Apoptose, da der TUNEL-Assay nicht spezifisch für den Apoptose-induzierten Zelltod ist. Im Gegensatz dazu kann eine Aktivierung von Caspase 3 wahrscheinlich eher als Marker für den apoptotischen Zelltod angesehen werden. Möglicherweise wird die Apoptose in Rac1 E-KO Mäusen durch das Milieu (Immunzellen in der Dermis) stimuliert. In N17Rac1 transgenen Mäusen fehlt dieses Milieu, weshalb die Steigerung der TUNEL-positiven Zellen nach Bestrahlung auch geringer ausfällt. Die Auswertung in den unbestrahlten Hautproben ergab, wie bereits in der TUNEL-Auswertung festgestellt, eine erhöhte Anzahl aktive Caspase 3-positiver Zellen in Rac1 E-KO Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen und den untersuchten N17Rac1 transgenen Mäusen (siehe Abb. 3-35). Die insgesamt höhere Anzahl apoptotischer Zellen, die, verglichen mit der TUNEL-Färbung, durch aktive Caspase 3-Färbung nachgewiesen werden konnte, könnte dadurch erklärt werden, dass diese Zellen zwar bereits Apoptose induziert haben und daher positiv für aktive Caspase 3 sind, jedoch noch nicht den Abbau der DNA, die durch den TUNEL-Assay nachgewiesen wird, eingeleitet haben.

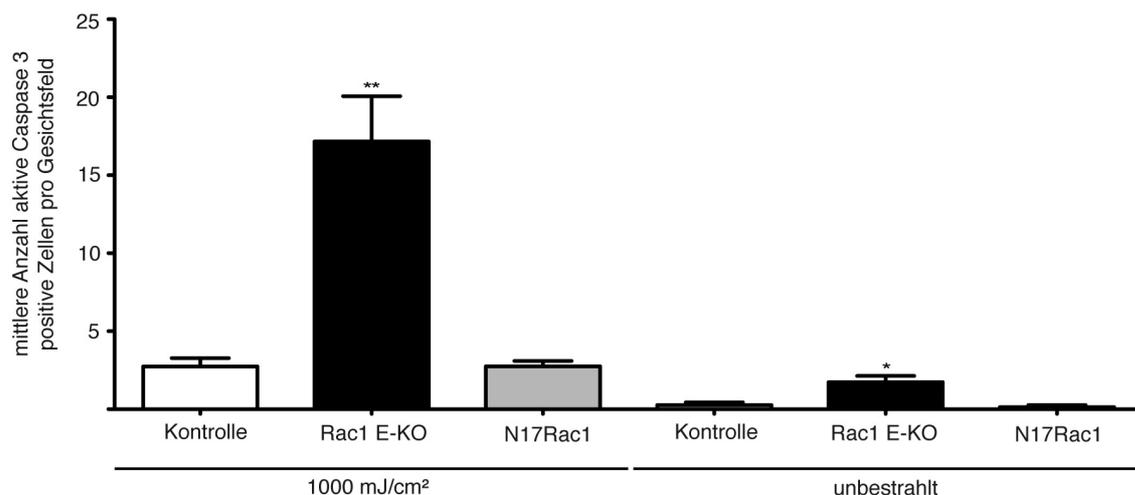


Abbildung 3-35: Quantifizierung aktive Caspase 3-positiver Zellen in der IFE von Kontrolltieren und Rac1 E-KO Mäusen sowie N17Rac1 transgenen Mäusen nach UVB-Bestrahlung. Die Bestimmung der aktive Caspase 3-positiven Zellen pro Gesichtsfeld in der IFE von Kontroll- und Rac1 E-KO Mäusen sowie N17Rac1 transgenen Tieren 12 h p.irr. mit 1000 mJ/cm² erfolgte unter einem 20x Objektiv (n=2-5 Mäuse). Mittelwert ± SEM, statistische Analyse mittels Student's t-Test, *p<0,05 (Kontrolle vs. Rac1 E-KO, unbestrahlt), **p<0,01 (Kontrolle vs. Rac1 E-KO, 1000 mJ/cm²).

Um festzustellen, ob die beschriebenen Effekte in der IFE nach Rac1-Deletion oder basaler Inhibierung der Rac1-Aktivität *in vivo* einen zellintrinsic Effekt der Keratinozyten darstellt, wurden zusätzlich primäre Keratinozyten, isoliert aus Kontroll- (Wildtyp-) und N17Rac1 transgenen Mäusen, mit 1000 mJ/cm² bestrahlt. Eine Analyse der Apoptose in Rac1 E-KO Zellen war nicht möglich, da diese *in vitro* nicht kultiviert werden konnten. Der Nachweis apoptotischer Zellen erfolgte ebenfalls 12 h p.irr. durch Durchführung des TUNEL-Assays. Zur quantitativen Analyse der Ergebnisse wurde der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen in sowohl bestrahlten als auch unbestrahlten Zellkulturen bestimmt.

Die Quantifizierung der TUNEL-positiven Zellen *in vitro* ergab einen viermal höheren prozentualen Anteil TUNEL-positiver Zellen in bestrahlten N17Rac1 transgenen Kulturen im Vergleich zu den Kontrollzellen (siehe Abb. 3-36). Im Gegensatz dazu konnte in den analysierten unbestrahlten Kulturen keine Erhöhung der Anzahl TUNEL-positiver Zellen nachgewiesen werden. Die erhöhte Anzahl an TUNEL-positiven Keratinozyten in N17Rac1 transgenen Zellkulturen *in vitro* verdeutlicht, dass eine Inhibierung der Rac1-Aktivität allein zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der Induktion apoptotischer Prozesse führt, es sich also um einen zellintrinsic Defekt der Keratinozyten handelt, und die erhöhte Apoptose in der IFE *in vivo* nicht primär auf eine Interaktion mit dem umgebenden Milieu, zum Beispiel auf die Entzündungsreaktion im Bereich der Haarfollikel in Rac1 E-KO Mäusen, zurückgeführt werden kann.

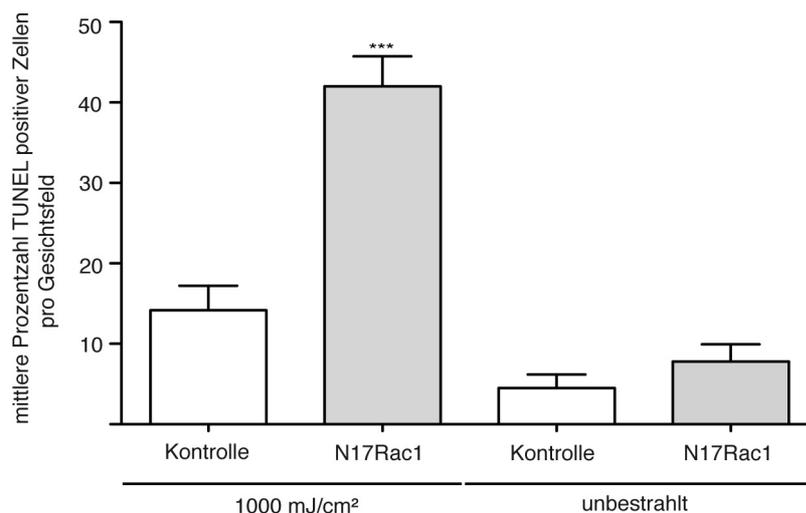


Abbildung 3-36: *In vitro* Quantifizierung TUNEL-positiver Zellen in Kontrollzellen und N17Rac1 transgenen Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung. Die Bestimmung des prozentualen Anteils der TUNEL-positiven Zellen pro Gesichtsfeld in der IFE von Kontroll- und N17Rac1 transgenen Zellen 12 h p.irr. mit 1000 mJ/cm² erfolgte bei 20x Vergrößerung (n=6 Kontroll-, 5 N17Rac1 Zelllinien). Mittelwert ± SEM, statistische Analyse mittels Student's t-Test, ***p<0,001 (Kontrolle vs. N17Rac1, 1000 mJ/cm²).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Rac1 eine generelle Funktion im Schutz vor UV-induziertem Zelltod übernimmt und dass vermutlich ein zellintrinsischer Mechanismus in Rac1 E-KO und N17Rac1 transgenen Keratinozyten für eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UVB-Strahlung teilweise verantwortlich ist. Weiterführende Untersuchungen sollen nun klären, über welchen Mechanismus Rac1 auf die Induktion des Zelltods wirkt und welche beteiligten Signalwege durch eine Deletion von Rac1 oder Inhibierung der Rac1-Aktivität beeinflusst werden. Die Ergebnisse aus der UVB-Bestrahlung von N17Rac1 transgenen Mäusen *in vivo* weisen darauf hin, dass der UV-induzierte Zelltod in den Mäusen und den transgenen Zellen *in vitro* möglicherweise nicht ausschließlich Apoptose ist. Um dies genauer zu untersuchen, wäre es sinnvoll, eine parallele Analyse von TUNEL- und aktive Caspase 3-positiven Zellen durchzuführen.

4 Diskussion

4.1 Die Rolle von Rac1 in der Basalzellschicht und der äußeren Haarwurzelscheide für die Integrität von Haarfollikeln

Ein Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob eine Wiederherstellung der basalen Rac1-Aktivität in Rac1 E-KO Mäusen ausreichend ist, um den Haarphänotyp der Rac1 E-KO Mäuse zu revertieren. Die Einkreuzung des konstitutiv aktiven L61Rac1 TGs in Rac1 Rescue Mäuse zeigte eine Wiederherstellung des Haarwachstums, also eine Aufhebung des in Chrostek *et al.*, 2006 beschriebenen Fellverlusts. Dieses Ergebnis demonstriert, dass für den Erhalt der Integrität der Haarfollikel eine Aktivität von Rac1 in den Keratinozyten des Keratin 14-positiven Kompartiments erforderlich ist. Da das L61Rac1 TG unter der Kontrolle des Keratin 14-Promoters exprimiert wird und sich in der Immunhistologie lediglich in den basalen Anteilen der Epidermis, jedoch nicht in den suprabasalen Anteilen, nachweisen ließ, ist die Expression von endogenem oder exogenem, mutiertem Rac1 in den differenzierten Anteilen der Epidermis und des Haarfollikels für die Bildung von Haaren offenbar nicht erforderlich. Diese Funktion von Rac1 im Keratin 14-positiven Kompartiment ist gut vereinbar mit der beschriebenen Notwendigkeit von Rac1 für die Erhaltung von Haarfollikelstammzellen [Castilho *et al.*, 2007] (Stammzell-Erhaltungshypothese). Es handelt sich hierbei jedoch nur um eine Hypothese, da bisher lediglich der Zusammenhang zwischen der Rac1-Expression und dem proliferativen Potential von Keratinozyten gezeigt werden konnte [Benitah *et al.*, 2005; Chrostek *et al.*, 2006; Castilho *et al.*, 2007]. Unklar ist jedoch noch, ob der Untergang der Haarfollikel *in vivo* tatsächlich eine Folge dieses Verlusts an proliferativer Kapazität ist. Zwar zeigen die von mir durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen, dass die basale Expression von L61Rac1 zu einer partiellen Wiederherstellung der CD34- und Keratin 15-positiven Zellpopulationen im Haarfollikel führt. Es ist daher möglich, dass das Wachstum der Haare erfolgt, weil die relevanten Stammzellpopulationen durch die Rekonstitution der basalen Rac1-Aktivität vorhanden sind. Jedoch besteht auch hier nur ein korrelativer Zusammenhang mit der Wiederherstellung des Haarwachstums. Ein kausaler Zusammenhang lässt sich daraus nicht ableiten.

Zu der oben erwähnten Stammzell-Erhaltungshypothese lässt sich aufgrund der von mir erzielten Ergebnisse eine alternative Hypothese entwickeln, die man als Apoptose-Hypothese bezeichnen könnte. Erstmals habe ich gezeigt, dass der Verlust von Rac1 in epidermalen Keratinozyten zu einer verminderten Apoptoseresistenz nach Bestrahlung mit UVB führt. Zudem zeigen meine immunhistologischen Untersuchungen, dass in Rac1 E-KO Mäusen bereits spontan eine erhöhte Anzahl apoptotischer Keratinozyten zu finden ist. Apoptotische Keratinozyten konnten mittels TUNEL-Färbung in der äußeren Haarwurzelscheide

scheide der Haarfollikel von Rac1 E-KO Mäusen bereits in den ersten Lebenstagen nachgewiesen werden, ein für sich normalerweise synchron im Anagen befindliche Haarfollikel neugeborener Mäuse völlig abnormer Befund. Dies lässt es möglich erscheinen, dass der Verlust von Rac1 generell zu einer verminderten Apoptoseresistenz in Keratinozyten führt, die sich dann in einem Untergang von Keratinozyten der äußeren Haarwurzelscheide während des Anagens äußert. Bei dieser Betrachtung ist es von Bedeutung, dass die Keratinozyten des proximalen Anteils der äußeren Haarwurzelscheide und der inneren Haarwurzelscheide während des Einwachsens des Anagen-Haarfollikels in die Dermis Träger des so genannten Immunprivilegs des Haarfollikels sind [Christoph *et al.*, 2000; Paus *et al.*, 2003]. Diese Bereiche sind im Menschen und in Mäusen durch eine Abwesenheit einer MHC-I-Expression gekennzeichnet [Paus *et al.*, 1994; Ito *et al.*, 2004]. Weiterhin bildet die Expression und Ausschüttung starker immunsuppressiver Botenstoffe durch die Zellen des Haarbulbus, wie TGF- β 1 [Welker *et al.*, 1997], ACTH [Slominski *et al.*, 1998; Mazurkiewicz *et al.*, 2000] und α -MSH [Paus *et al.*, 1998; Botchkarev *et al.*, 1999; Mazurkiewicz *et al.*, 2000], sowie eine Expression von CD200 in den Keratinozyten der äußeren Haarwurzelscheide [Rosenblum *et al.*, 2004] einen wirkungsvollen Schutz gegenüber einem Angriff des Haarfollikels durch Immunzellen. Dieses Immunprivileg wird bei Verlust von Keratinozyten der äußeren Haarwurzelscheide partiell oder vollständig durchbrochen. Infolge dessen sind die Haarfollikel angreifbar für Zellen des Immunsystems. In der Tat wird bei Rac1 E-KO Mäusen bereits an Tag 5 p.p. eine Ansammlung von MHC-II-positiven Makrophagen perifollikulär beobachtet, die sich im Verlaufe der folgenden Lebenstage (Tag 9 p.p.) verstärkt [Chrostek *et al.*, 2006, eigene Beobachtungen]. Es ist also möglich, dass der Untergang der Haarfollikel in Rac1 E-KO Mäusen auf die vermehrte Apoptose der Keratinozyten der äußeren Haarwurzelscheide und die nachfolgende Immunreaktion zurückzuführen ist. Dabei schließen sich beide Hypothesen nicht gegenseitig aus: ein Nebeneinander von follikulärem Stammzellverlust und vermehrter Apoptose von Keratinozyten der äußeren Haarwurzelscheide ist vorstellbar. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um zu identifizieren, ob und welche Mechanismen hauptsächlich für den Haarverlust in Rac1 E-KO Mäusen verantwortlich sind.

4.2 Regulation der Haarmorphogenese und Haarstrukturbildung durch Rac1

4.2.1 Die Rolle von Rac1 in der Haarmorphogenese

Die Analyse der Haarmorphogenese an Tag 10 p.p. zeigt eine starke Verzögerung in der Haarmorphogenese in Rac1 E-KO Mäusen speziell in den späten Entwicklungsstadien des Haarfollikels. In den späten Entwicklungsstadien 8 und 9 der Morphogenese sind besonders

Prozesse der Haarfollikelelongation sowie der Haarschaftdifferenzierung und -pigmentierung von Bedeutung [Paus *et al.*, 1999]. Die in Rac1 E-KO Mäusen festgestellte Verzögerung in der Morphogenese kann durch die basale Expression von L61Rac1 in Rac1 Rescue Mäusen nur teilweise aufgehoben werden. Wahrscheinlich übernimmt Rac1 eine Funktion in den differenzierten, nicht-basalen Anteilen des Haarfollikels, in denen wichtige Differenzierungsprozesse während der Morphogenese stattfinden. Welche Funktionen könnten dies sein? Die bisher verfügbare Literatur beschreibt sehr häufig Funktionen von Rac1 in der Regulation der Migration und Lamellipodienbildung einerseits sowie der Zellproliferation andererseits [Etienne-Manneville & Hall, 2002; Heasman & Ridley, 2008; Bosco *et al.*, 2009]. Veränderungen in gerade diesen Zellfunktionen als Folge der Deletion von Rac1 in den nicht-basalen Zellen des Haarfollikels könnten für die Erklärung der gefundenen Verzögerung der Haarmorphogenese herangezogen werden.

Von Chrostek *et al.*, 2006 wurde bereits eine mögliche Beeinflussung der Migration spezieller Haarfollikelzellen, der „Flügelzellen“⁸, während der Haardifferenzierung diskutiert. Diese wandern während der Bildung der inneren Haarwurzelscheide von der Huxley'schen Schicht durch die Henle'sche Schicht hindurch, bis sie mit den Keratinozyten der Cuticula der inneren Haarwurzelscheide in Kontakt kommen. Dieser Prozess basiert vermutlich auf der Bildung von speziellen Zellfortsätzen, so genannten Lamellipodien [Langbein *et al.*, 2003]. Rac1 ist für die Bildung dieser Zellstrukturen erforderlich [Ridley *et al.*, 1992; Nobes & Hall, 1995b; Kaibuchi *et al.*, 1999; Yamada & Nelson, 2007]. Ein Verlust von Rac1 könnte damit möglicherweise die Migration der „Flügelzellen“ während der Haarfollikelbildung hemmen und so zu einer veränderten Haarfollikelstrukturbildung während der Morphogenese beitragen, was Auswirkungen auf das Voranschreiten der Morphogenese besitzen könnte. Zwar ist Rac1 nicht in allen Zelltypen für eine Migration erforderlich [Wells *et al.*, 2004; Wheeler *et al.*, 2006], in epidermalen Keratinozyten ließ sich jedoch die Notwendigkeit einer Rac1-Aktivität für die Ausbildung stabiler Lamellipodien und für physiologische Migrationsprozesse während der epithelialen Wundheilung nachweisen [Tscharnitke, 2006; Tscharnitke *et al.*, 2007].

Neben einer gerichteten Zellmigration ist auch eine rasche Haarfollikelelongation für die späte Haarmorphogenese kennzeichnend. Das Längenwachstum des Haares wird besonders durch Prozesse, die die Proliferation der Keratinozyten der Haarmatrix beeinflussen, bestimmt [Cotsarelis *et al.*, 1990; Sun *et al.*, 1991]. Die Analyse der Haarfollikellänge an Tag 10 p.p. zeigte eine signifikante Verringerung der Haarfollikellänge in

⁸ spezialisierte Zellen der Huxley'schen Schicht im Haarfollikel, die eine Funktion in der Verankerung der inneren und äußeren Haarwurzelscheide übernehmen

Rac1 Rescue Mäusen. Durch Bestimmung der BrdU-positiven Kerne im Haarbulbus einen Tag zuvor (Tag 9 p.p.) konnte ich nachweisen, dass ein Proliferationsdefekt in den Zellen des Haarbulbus vorliegt. Dieser könnte die reduzierte Haarfollikellänge an Tag 10 p.p. sowie auch die in der Haartypusanalyse festgestellte Verkürzung der Haare in Rac1 Rescue Mäusen erklären. Da die Proliferation der Haarbulbuskeratinozyten auch einen Einfluss auf die Strukturbildung der Haarfollikel und der Haare während der Morphogenese besitzt, ist nicht auszuschließen, dass die verzögerte Haarfollikelmorphogenese in Rac1 Rescue Mäusen neben einer Hemmung der Zellmigration auch einen Proliferationsdefekt der Haarmatrixkeratinozyten zur Ursache hat. Ein Einfluss von Rac1 auf die Proliferation der Haarmatrixzellen konnte in Rac1 E-KO Mäusen bisher nicht untersucht werden, da in diesen Mäusen der nicht-permanente Teil des Haarfollikels inklusive des Haarbulbus, in dem die proliferierenden Zellen der Haarmatrix lokalisiert sind, zerstört wird. Das hier vorgestellte Modell der Rac1 Rescue Mäuse ermöglicht dagegen, aufgrund der Wiederherstellung der Haarfollikelmorphologie, eine weiterführende Analyse einer möglichen Regulation der Proliferation der Matrixkeratinozyten durch Rac1 in den Haarbulbi von Rac1 Rescue Mäusen.

Ein Einfluss von Rac1 auf die Zellproliferation ist bereits aus anderen Systemen bekannt [Etienne-Manneville & Hall, 2002; Villalonga & Ridley, 2006; Bosco *et al.*, 2009]. Darüber hinaus haben frühere Analysen unserer Arbeitsgruppe an Mäusen, die basal dominant negatives N17Rac1 exprimieren, gezeigt, dass die Proliferation der Keratinozyten dieser Tiere in den Wundrändern und -zungen gestanzter Wunden während der Wundheilung vermindert ist, was zu einer verzögerten Wundheilung *in vivo* und *in vitro* führt [Tschardt *et al.*, 2007]. Jedoch scheint die Regulation der Proliferation von Keratinozyten durch Rac1 eine weniger bedeutungsvolle Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase der IFE zu besitzen. Deshalb wird wahrscheinlich die Funktion von Rac1 in der Regulation der Proliferation nur in bestimmten, nicht-homöostatischen Situationen, die eine starke Zellproliferation erfordern, erkennbar, wie beispielsweise in der Wundheilung oder im Haarfollikellängenwachstum.

Wie wird die Proliferation der Haarmatrixkeratinozyten durch Rac1 reguliert? Untersuchungen von Olson *et al.*, 1995 und Vidali *et al.*, 2006 in ruhenden (quieszenten) Fibroblasten haben gezeigt, dass sowohl eine Deletion von Rac1 als auch eine Inhibierung der Rac1-Aktivität eine Progression des Zellzyklus von G1 nach S unterbindet, wodurch die Zellen in der G1-Phase arretieren. Eine Zellzyklusanalyse von isolierten primären Rac1 E-KO Keratinozyten könnte Aufschluss darüber geben, ob Rac1 auch in Keratinozyten die Zellzyklusprogression von G1 nach S reguliert. Ein Zellzyklusarrest in G1 könnte zu einem

reduzierten Einbau von BrdU führen, der in der S-Phase des Zellzyklus stattfindet, und daher in der Folge für die geringere Anzahl an BrdU-positiven Zellen in der Haarmatrix von Rac1 Rescue Mäusen verantwortlich sein.

Ein wichtiger Regulator des Zellzyklus und damit der Proliferation von Keratinozyten sowie auch von deren terminaler Differenzierung ist der Transkriptionsfaktor c-Myc. [Watt *et al.*, 2008]. Im menschlichen Haarfollikel wurde gezeigt, dass c-Myc in den proliferativen Ki67-positiven Keratinozyten des Haarbulbus exprimiert wird [Bull *et al.*, 2001]. Benitah *et al.*, 2005 haben demonstriert, dass Rac1 die Expression von c-Myc in humanen epidermalen Keratinozytenvorläuferzellen über einen PAK2-abhängigen Mechanismus negativ reguliert. Die Depletion von Rac1 in Rac1 E-KO Mäusen führt danach durch Aktivierung von c-Myc zu einer vorzeitigen Differenzierung und einem damit verbundenen Verlust der Bulge-Stammzellen. Aktivierte Stammzellen der Bulge-Region teilen sich in Tochterzellen, die laut der Bulge-Aktivierungshypothese in den Haarbulbus einwandern und dort die proliferierenden Zellen der Haarmatrix bilden [Cotsarelis *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1994; Oshima *et al.*, 2001; Tumber *et al.*, 2004]. Diese proliferieren und sorgen dadurch für eine Elongation des Haarfollikels [Cotsarelis *et al.*, 1990; Sun *et al.*, 1991]. Eine Depletion der Bulge-Stammzellen könnte diesem Mechanismus zufolge zu einer reduzierten Rekrutierung der aktivierten Bulge-Zellen führen. Die reduzierte Anzahl der aktivierten Keratinozyten könnte demnach eine verminderte Proliferation der Haarmatrixkeratinozyten zur Folge haben. Andererseits könnte die Deletion von Rac1 in den Keratinozyten des Haarbulbus auch dafür sorgen, dass die Expression von c-Myc nicht mehr reguliert werden kann. Eine stetige starke Aktivierung von c-Myc könnte einen vorzeitigen Eintritt von Matrixkeratinozyten in die Differenzierungsphase stimulieren und so für eine Reduktion der proliferierenden Matrix-keratinozyten sorgen. Wie Gebhardt *et al.*, 2006 gezeigt haben, führt eine forcierte Expression von c-Myc in humanen Keratinozyten zu einer frühzeitigen Differenzierung dieser Zellen in *in vitro*-rekonstituierter Epidermis.

Welches proliferationsrelevante Signal wird in der Haarmatrix durch Rac1 übertragen? Eine große Bedeutung kommt Rac1 in der Übertragung von Signalen zu, die durch Adhäsionsrezeptoren generiert werden [Jaffe & Hall, 2005; Bosco *et al.*, 2009]. Integrin-vermittelte Adhäsion ist eine Voraussetzung für die Proliferation von Epithelzellen unter physiologischen Umständen („anchorage-dependence“). Es wurde gezeigt, dass ein Verlust dieser Adhäsion, wie bei der Hemmung von Rac1, zu einer Arretierung der Zellen in der G1-Phase führt [Stoker *et al.*, 1968], wodurch eine Proliferation dieser Zellen unterdrückt wird. Eine Analyse der Integrin-Expression durch Chrostek *et al.*, 2006 an primären Keratinozyten, isoliert aus adulten Rac1 E-KO und Kontrollmäusen, zeigte keine Veränderung in der

Expression der für die Haut wichtigen Integrine, wie $\alpha 2$, $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$. Aus diesem Grund ist es eher unwahrscheinlich, dass ein Adhäsionsdefekt für die reduzierte Proliferation in den Matrixkeratinozyten verantwortlich ist. Allerdings wurde hier nur deren Expression *in vitro* analysiert, was jedoch nichts über die Signalaktivität der Integrine im Haarfollikel *in vivo* aussagt. Es bleibt daher offen, ob das für die Regulation der Proliferation verantwortliche, durch Rac1 übertragene Signal von einem Adhäsionsrezeptor kommt. Möglich ist weiterhin, dass Rac1 ein oder mehrere wichtige Signale von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren überträgt und dass der Verlust dieser Übertragung dann zu einer eingeschränkten Proliferation führt. Rac1 ist als Überträger von Wachstumsfaktor-Signalen, die auch in der Haarbildung eine Rolle spielen, wie beispielsweise der EGF-, IGF- und des KGF-Rezeptors (FGFR2), bekannt [Lu *et al.*, 2003; Cardinali *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2007; Dise *et al.*, 2008; Stachelscheid *et al.*, 2008].

4.2.2 Die Rolle von Rac1 in der frühen Haardifferenzierung

Die Expression von L61Rac1 als TG im Keratin 14-positiven Kompartiment von Rac1 E-KO Mäusen führte zwar zu einem Wachstum der Haare, allerdings wiesen die Haare der Rac1 Rescue Mäuse verschiedene Defekte auf. Diese waren bereits makroskopisch als Veränderungen der Fellstruktur und der Fellfarbe erkennbar. Es ist wahrscheinlich, dass diese Veränderungen durch die Abwesenheit von Rac1 in den nicht-basalen Anteilen des Haarfollikels und/oder der IFE hervorgerufen wurden. Immunhistologische Färbungen zeigten, dass die Expression des L61Rac1 TGs auf das Keratin 14-positive Kompartiment beschränkt war. L61Rac1 ließ sich nicht in den Keratin 14-negativen Anteilen der IFE und des Haarfollikels nachweisen. Demnach sind die im Folgenden diskutierten Veränderungen in der Haardifferenzierung und Haarstrukturbildung Folgen der Deletion von Rac1 in den differenzierten Anteilen des Haarfollikels und der IFE. Da in Rac1 Rescue Mäusen nicht Wildtyp-Rac1, sondern die konstitutiv aktive Mutante L61Rac1 exprimiert wurde, könnten die beobachteten Veränderungen in den Rac1 Rescue Mäusen auch als Folgen der konstitutiven Aktivierung von Rac1 im Keratin 14-positiven Kompartiment oder als Folgen einer höheren Rac1-Aktivität infolge der Expression mehrerer TG-Kopien diskutiert werden. Allerdings wurden für alle Analysen sowohl Wildtyp-Tiere (Kontrolltiere) als auch L61Rac1 transgene Mäuse des gleichen Stammes im Wildtyp-Hintergrund als Kontrollen mitgeführt. Dabei zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen Wildtypen und L61Rac1 transgenen Kontrollen *in vivo*. Dies zeigt, dass die Expression von L61Rac1 allein als TG nicht zu Veränderungen in der Epidermis und im Haarkleid führt. Die in den Rac1 Rescue Mäusen beobachteten Veränderungen können also nicht durch die erhöhte Aktivität des L61Rac1-TGs gegenüber Wildtyp-Rac1 erklärt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass Rac1 zusätzlich zu seiner Funktion in der Aufrechterhaltung der Haarfollikelmorphologie auch

wichtige Funktionen in den Keratin 14-negativen Schichten des Haarfollikels übernimmt, die mit Hilfe des hier vorgestellten Modells der Rac1 Rescue Mäuse genauer untersucht werden konnten.

Die Ausbildung der Haarfollikelmorphologie und der frühen Haardifferenzierung wird durch die Proliferation und anschließende Differenzierung der Haarmatrixkeratinozyten maßgeblich beeinflusst [Legue & Nicolas, 2005]. Die Analyse der Expression von Foxn1, CDP, Lef1 und β -Catenin, die wegen ihrer entscheidenden und nicht-redundanten Rolle in der Haarfollikeldifferenzierung durchgeführt wurde, ergab keine Veränderungen in Rac1 Rescue Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen. Es liegt daher nahe, dass Rac1 keinen Einfluss auf die Foxn1-, CDP-, Lef1- und β -Catenin-abhängigen Differenzierungsprozesse im Haarfollikel während der Ausbildung eines voll entwickelten Anagen-Haarfollikels besitzt. Es ist daher wahrscheinlich, dass weitere, bisher nicht untersuchte Signalwege, die an der Differenzierung beteiligt sind, durch die Rac1-Deletion in den suprabasalen Schichten beeinträchtigt werden.

Neben den untersuchten Markern ist der Transkriptionsfaktor Gata-3 für die Differenzierung der inneren Haarwurzelscheide von Bedeutung [Kaufman *et al.*, 2003]. Es wurde gezeigt, dass dessen Expression durch BMPR1A („bone morphogenic protein receptor 1A“) reguliert wird [Kobielak *et al.*, 2003]. BMPR1A wird von allen Zellen des Haarbulbus einschließlich der dermalen Papille exprimiert [Botchkarev & Sharov, 2004; Rendl *et al.*, 2005] und reguliert, wie verschiedene Studien gezeigt haben, sowohl die Differenzierung der inneren Haarwurzelscheide als auch die Differenzierung des Haarschafts [Kobielak *et al.*, 2003; Andl *et al.*, 2004; Yuhki *et al.*, 2004]. Für die Differenzierung dieser beiden Kompartimente sind außerdem Signale des Hedgehog-Signalwegs von Bedeutung [Gritti-Linde *et al.*, 2007]. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Deletion des FGFR2-IIIb eine Verzögerung der Morphogenese sowie Veränderungen in der Haarfollikel- und Haarstruktur zur Folge hat [Petiot *et al.*, 2003]. Die zuvor beschriebenen Proteine und von ihnen abhängige Signalwege wären mögliche Kandidaten, über die Rac1 die Differenzierung der Haarfollikel beeinflussen könnte.

Die Expression der Keratine des Haarfollikels wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren und Signalwege, wie zum Beispiel den Wnt/ β -Catenin-Signalweg [DasGupta & Fuchs, 1999] sowie die Transkriptionsfaktoren Foxn1 [Schlake *et al.*, 2000]; Msx2 [Ma *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2009] und Hoxc13 [Tkatchenko *et al.*, 2001], beeinflusst. Foxn1 und Msx2 beispielsweise regulieren die Expression von K32 (Cuticula), K33 und K86 (Cortex), wobei Foxn1, wie verschiedene Mutationsstudien gezeigt haben, anscheinend den größten Einfluss

auf die Haarkeratinexpression besitzt [Johns *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2009]. Von Chrostek *et al.*, 2006 wurde beschrieben, dass in Rac1 E-KO Mäusen die Expression verschiedener Haarkeratine vor allem im proximalen Anteil des Haarfollikels reduziert ist und auch unsere Untersuchungen in Rac1 E-KO Mäusen scheinen eine Reduktion in der Expression der untersuchten Haarkeratine (Keratin 81, Keratin 82) zu bestätigen. Im Gegensatz dazu weisen die Haarfollikel der Rac1 Rescue Mäuse keine Veränderungen in der Expression dieser Haarkeratine auf. Vermutlich ist daher die in Rac1 E-KO Mäusen detektierte reduzierte Expression der Haarkeratine auf die Zerstörung der Haarfollikel in diesen Tieren zurückzuführen und stellt damit lediglich einen sekundären Effekt dar. Eine alternative Erklärung wäre, dass die Expression dieser Keratine im differenzierten Anteil des Haarfollikels von Faktoren in den Keratinozyten der äußeren Haarwurzelscheide abhängt. Da die untersuchten Keratine jedoch durchweg nur in den differenzierten Anteilen des Haarfollikels gefunden werden und ihre Expression charakteristisch für dieses Kompartiment ist, erscheint diese Erklärung eher unwahrscheinlich.

4.2.3 Die Rolle von Rac1 in der späten Haardifferenzierung

Die epidermale Deletion von Rac1 führt zu Veränderungen in der Haarstruktur. Es konnten sowohl Abnormitäten in der Haaroberflächenstruktur als auch in der Struktur der Zigzag-Haare nachgewiesen werden. Diese konnten durch die basale Expression von L61Rac1 in Rac1 Rescue Mäusen nur teilweise wiederhergestellt werden.

Das Fell von Rac1 Rescue Mäusen erscheint matt und, wie eine REM-Analyse einzelner Haare demonstrierte, zeigt die Oberfläche der Haare, die wesentlich durch die Cuticula-Struktur bestimmt wird, bei Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen eine Reihe von Veränderungen. Die Haaroberfläche dieser Tiere ist im Vergleich zu der der Kontrollen durch rillenartige Einkerbungen der Haarschuppen gekennzeichnet. Weiterhin zeigen die Haare abnorme Einbuchtungen sowie oftmals eine abgeflachte Form im Gegensatz zur normalen runden Haarform. Ähnliche Veränderungen finden sich auch in anderen Mutanten, in denen die jeweilige Mutation einen Einfluss auf die Cuticula-Struktur hat, beispielsweise in Notch1 Knockout Mäusen sowie in Tieren mit ektopischer Expression eines dominant aktiven Notch1. Die Veränderungen des Fells werden hier auf strukturelle Abnormitäten der Haarschuppen zurückgeführt [Lin *et al.*, 2000; Vauclair *et al.*, 2005]. Es ist daher denkbar, dass die gestörte Haaroberflächenstruktur wesentlich zu dem matten Erscheinungsbild des Fells der Rac1 Rescue Mäuse beigetragen hat.

Die Analyse verschiedener Mausmutanten hat jedoch auch gezeigt, dass die Struktur der Medulla einen entscheidenden Einfluss auf das Erscheinungsbild des Fells besitzt. Mäuse, die ektopisch aktives Notch1 exprimieren und ein glänzend erscheinendes Fell aufweisen,

sind durch einen Verlust der Lufteinschlüsse der Medulla gekennzeichnet. Auch Mäuse mit einer Mutation im Gen des Transkriptionsfaktors Foxq1 sowie FGFR2-IIIb Knockout-Mäuse und auch Mäuse, die einen dominant negativen FGFR2-IIIb exprimieren, zeigen ein glänzender erscheinendes Fell, das ebenfalls auf Veränderungen in der Medullastruktur zurückzuführen ist [Hong *et al.*, 2001; Petiot *et al.*, 2003; Schlake, 2005a]. Da ich in Rac1 Rescue Mäusen auch Veränderungen in der Medullastruktur gefunden habe, hat möglicherweise eine Kombination aus Veränderungen in der Haarmedulla und der Haaroberflächenstruktur zu dem matten Erscheinungsbild des Fells in Rac1 Rescue Mäusen beigetragen.

Die Analyse der Haartypkomposition des Fells in Rac1 E-KO Mäusen und Rac1 Rescue Mäusen zeigte neben dem scheinbaren Verlust der Guard-Haare, eine Störung der regelmäßigen zackentartigen Struktur der Zigzag-Haare, wobei die normale Struktur in Rac1 Rescue Mäusen teilweise wiederhergestellt werden konnte. Die abnormen Zigzag-Haare von Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen zeigten einen eher wellenförmigen Aufbau, mit weniger stark ausgeprägten Krümmungen und Richtungswechseln, was darauf hindeutet, dass die für diese Strukturen verantwortlichen Prozesse durch die Deletion von Rac1 möglicherweise beeinflusst wurden. Die Mechanismen, die an der Strukturbildung der Zigzag-Haare, dem Haarschaft-„Bending“, beteiligt sind, wurden in den vergangenen Jahren intensiv untersucht und es konnte gezeigt werden, dass die Struktur durch die Expression verschiedener Proteine und eine komplexe Interaktion dieser, besonders auch in den suprabasalen Schichten, entscheidend beeinflusst wird. Vor allem Proteine des IGF-Signalwegs und des FGF-Signalwegs determinieren die Struktur der Zigzag-Haare. IGFBP5, das in der Haarmedulla exprimiert wird, scheint ein Marker für Zigzag-Haarfollikel zu sein und die Strukturbildung dieses Haartyps zu regulieren [Schlake, 2005b]. Die IGFBP5-Expression in der Medulla wird dabei durch den Transkriptionsfaktor Krox20 kontrolliert [Schlake, 2006]. Weitere Studien haben gezeigt, dass auch eine Überexpression von IGF-1 sowie die Expression eines dominant negativen FGFR2-IIIb zu einer abnormen Struktur der Zigzag-Haare führen kann [Petiot *et al.*, 2003; Schlake, 2005a; Weger & Schlake, 2005]. Weiterhin unterdrücken von ihnen abhängige Signale die Expression von Krox20 und dessen Target IGFBP5 [Schlake, 2006]. Die charakteristischen Orientierungswechsel in den Zigzag-Haaren werden durch eine asymmetrische Expression von Krox20 und Shh im Haarbulbus bestimmt [Hammerschmidt & Schlake, 2007]. Eine suprabasale, transgenvermittelte Expression des Wnt-Signalinhibitors Dkk1 unterdrückt die Expression von Krox20 und Shh im Haarbulbus und im Haarfollikel [Hammerschmidt & Schlake, 2007] und führt in Dkk1-transgenen Mäusen zu Veränderungen der Haarstruktur. Auch zahlreiche andere Mausmodelle zeigen Veränderungen in der Struktur der Zigzag-Haare und des Haarschaft-

„Bendings“. So sind epidermale Knockout-Mäuse der Transkriptionsfaktoren Runx1 und Runx3 durch eine Störung der „Bend“-Strukturen gekennzeichnet [Raveh *et al.*, 2005; Raveh *et al.*, 2006]. Ebenfalls beeinflusst die Expression des c-Myc-bindenden Transkriptionsfaktors Miz1 die Ausbildung des Haarschaft-„Bendings“ [Gebhardt *et al.*, 2007]. Eine Beeinflussung der Expression eines dieser Proteine durch die suprabasale Deletion von Rac1 könnte möglicherweise für die wellenförmige Struktur der Zigzag-Haare verantwortlich sein. Weiterführende Untersuchungen könnten dazu genutzt werden, zu überprüfen, ob diese Signalwege durch den Verlust von Rac1 beeinflusst werden, um Aufschluss über eine mögliche Funktion von Rac1 in der Ausbildung der „Bend“-Strukturen der Zigzag-Haare zu erhalten.

4.3 Regulation der Haarschaftstruktur und Pigmentverteilung im Haarschaft durch Rac1

Wie histologische und mikroskopische Untersuchungen der Haarfollikel und Haare gezeigt haben, sind die Haarschäfte von Rac1 Rescue Mäusen durch eine unregelmäßige, unstrukturierte Verteilung der Melaningranula in der Medulla gekennzeichnet, wohingegen in Kontrollmäusen das Pigment eine regelmäßige apikale Verteilung in den Medullazellen aufweist. Die Veränderungen in der Pigmentverteilung im Haarschaft könnten zu dem gräulich erscheinenden Fell der Rac1 Rescue Mäuse beigetragen haben. Es ist denkbar, dass die gestörte Pigmentverteilung in der Medulla zum einen durch Veränderungen in der Haarschaftstruktur und/oder zum anderen durch eine direkte Beeinflussung der Pigmentierungsprozesse des Haares ausgelöst wurde.

4.3.1 Die Rolle von Rac1 in der Haarschaftstrukturbildung

Während der Bildung des Haarschafts differenzieren die Keratinozyten des Haarfollikels, wobei sie ihre Organellen verlieren und Haarkeratinfilamente bilden. Diese werden anschließend miteinander verknüpft und sorgen so für die Bildung einer stabilen und dennoch flexiblen Haarschaftstruktur. Es wurde gezeigt, dass eine Reihe von Transkriptionsfaktoren die Struktur des Haarschafts entscheidend beeinflussen. Beispielweise führt ein Verlust der Expression des Transkriptionsfaktors Msx2 zu Veränderungen des Haarschafts [Ma *et al.*, 2003]. Weiterhin wurde gezeigt, dass ein Verlust von Msx2 Notch1-abhängige Signale reduziert und eine normale Differenzierung der inneren Haarwurzelscheide, des Cortex und der Medulla beeinträchtigt [Cai *et al.*, 2009]. Mäuse, in denen Notch1 unter Verwendung des Msx2-Promotors deletiert wurde, zeigen eine gestörte Organisation der inneren Haarwurzelscheide sowie eine gestörte Verteilung der Medullazellen. Diese Veränderungen gehen mit einer reduzierten Expression von Keratin 17

in der Medulla einher [Pan *et al.*, 2004], ein Keratin, das im Haarschaft spezifisch in der Medulla exprimiert wird [McGowan & Coulombe, 2000] und dessen Deletion mit einer erhöhten Fragilität der Haare assoziiert wurde [McGowan *et al.*, 2002].

Die typische leiterartige Struktur des Haarschafts von Mäusen wird durch einen speziellen Mechanismus determiniert. Dabei umschließen während der Differenzierung des Haarschafts Pseudopodien des Cortex zunächst die Medullazellen ringförmig. Diese Strukturen werden anschließend zur Strukturfestigung mit Haarcortexkeratinen aufgefüllt. Im weiteren Verlauf gehen die Zellen der Medulla in die Apoptose und hinterlassen schließlich die typische leiterähnliche Struktur des Haarschafts [Morioka, 2005; Morioka, 2009]. Die ausgebildeten Pseudopodien des Haarcortex werden, wie unsere Untersuchungen gezeigt haben, in Semidünnschnitten sowie nach Färbung von polymerisiertem Aktin und Cortexkeratinen als zackenartige, in die Medulla reichende Strukturen sichtbar. Im Gegensatz zu den Kontrollen sind diese in Rac1 Rescue Mäusen weniger stark ausgeprägt und scheinen weniger tief in die Medulla hineinzureichen. Unsere Untersuchungen haben außerdem gezeigt, dass in den dunkel pigmentierten C57Bl/6 x C3H/He-Mäusen die Verteilung des Haarschaftpigments besonders in den Bereichen unregelmäßig ist, in denen die Ausbildung dieser Strukturen gestört zu sein scheint. Daher könnten die gefundenen Veränderungen in der Cortex- und Medullastruktur in Rac1 Rescue Mäusen mögliche Ursachen für die gestörte Pigmentverteilung im Haarschaft darstellen.

Eine wichtige und gut charakterisierte Funktion von Rac1 in epithelialen Zelltypen ist die Regulation der Polymerisation von Aktin zur Bildung neuer Aktinfilamente [Arber *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998]. Rac1 reguliert die Aktin-Polymerisation durch Interaktion mit dem WAVE-Multiprotein-Komplex [Miki *et al.*, 1998; Suetsugu *et al.*, 2006], der aus WAVE2, dem Rac1-Bindeprotein Sra-1, Nap1 sowie Abi-1 besteht [Gautreau *et al.*, 2004; Innocenti *et al.*, 2004]. Dieser Komplex ist nach Aktivierung durch Rac1 in der Lage, für eine Aktivierung des Arp2/3-Komplexes zu sorgen, welcher im Anschluss die Aktin-Polymerisation induziert [Steffen *et al.*, 2004; Ten Klooster *et al.*, 2006]. Weiterhin treibt Rac1 die Polymerisation von Aktin und die korrekte Ausbildung eines Aktinnetzwerks durch Regulation der Aktivität der LIM-Kinasen über den Rac1-Effektor PAK1 voran [Arber *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998]. Die Aktivierung der LIM-Kinasen führt zu einer Inaktivierung von Cofilin, einem Aktin-depolymerisierenden Faktor, was eine erhöhte Polymerisation von Aktin zur Folge hat [Huang *et al.*, 2006]. Die Regulation der Aktin-Polymerisation und die damit verbundene Regulation des Aktinzytoskeletts durch Rac1 ist besonders für die Ausbildung von Zellprotrusionen, wie von Lamellipodien und so genannten „Ruffles“ [Ridley *et al.*, 1992; Nobes & Hall, 1995b; Kaibuchi *et al.*, 1999], von Bedeutung, die vor allem während der

Zellbewegung eine Rolle spielen. Wie bereits zuvor erläutert, spielt die Ausbildung von Zellprotrusionen auch eine wichtige Rolle in der Ausbildung der typischen leiterartigen Struktur des Haarschafts [Morioka, 2005; Morioka, 2009]. Über die Lokalisation und Funktion von polymerisiertem Aktin im Haarfollikel ist bisher wenig bekannt. Unsere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass Phalloidin-gefärbtes polymerisiertes Aktin im Bereich des Haarcortex lokalisiert ist. Aktin scheint in diesem Bereich regelmäßige Strukturen auszubilden, die einen Aufbau aufweisen, der mit dem der AE13-gefärbten Cortexkeratine übereinstimmt. Die regelmäßigen Aktinstrukturen weisen in Rac1 Rescue Mäusen im Gegensatz zu den Kontrollen im Bereich des Cortex starke Veränderungen auf. So scheint die zackenartige Struktur nicht vollständig entwickelt und die kortikalen Protrusionen reichen im Gegensatz zu den Kontrolltieren nicht so weit in die Medulla hinein. Möglicherweise beeinflusst Rac1 auch die Ausbildung der Protrusionen des Haarcortex durch Regulation der Aktinzytoskelett-Organisation und übt dadurch einen Einfluss auf die Strukturbildung des Haarschafts und die Pigmentverteilung in der Medulla aus.

Die kortikalen Zellen werden mit den Zellen der Medulla in den Bereichen der kortikalen Protrusionen über die Ausbildung von Desmosomen zusammengehalten [Roth & Helwig, 1964; Morioka, 2005]. Einen weiteren Hinweis für die Lokalisation von Desmosomen in den kortikalen Ausläufern liefern Studien von Johns *et al.*, 2005 und Cai *et al.*, 2009, die gezeigt haben, dass die Expression des desmosomalen Cadherins Desmocollin 2 (Dsc2) spezifisch an den Grenzflächen zwischen Cortex und Medulla sowie auch in geringerem Maße zwischen vertikal benachbarten Medullazellen vorhanden ist. Auch meine Untersuchungen haben gezeigt, dass in Kontrolltieren Dsc2 spezifisch an den kortikalen Ausläufern, die in die Medulla hineinreichen, exprimiert wird. Johns *et al.*, 2005 schließen aus dem Expressionsmuster von Dsc2 in der Medulla, dass dessen Interaktion mit einer Desmoglein-Isoform die Ausbildung der Adhäsionen zwischen Cortex und Medulla sowie zwischen benachbarten Medullazellen ermöglicht. Diese Interaktionen scheinen notwendig zu sein, um für die Ausbildung einer regelmäßigen Haarschaftstruktur sowie die geordnete Verteilung der Medullazellen im Haarschaft zu sorgen. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren scheint die Expression von Dsc2 im Haarschaft von Rac1 Rescue Mäusen stark reduziert zu sein. Dies ist besonders in Bereichen auffällig, in denen die Pigmentverteilung stark gestört ist. Es ist daher auch denkbar, dass Rac1 direkt die Expression und/oder die Lokalisation von Dsc2 in den Medullazellen reguliert und hierüber die Pigmentverteilung im Haarschaft beeinflusst.

Über die transkriptionelle Regulation desmosomaler Proteine, besonders im Haarfollikel, ist bisher wenig bekannt. Jedoch wurde für einige Mitglieder, wie Dsg4 und Dsc2, gezeigt, dass deren Expression durch Regulatoren der Haarfollikeldifferenzierung beeinflusst wird. Die

Expression von Dsc2 wird zum Beispiel durch die für die Haarfollikeldifferenzierung wichtigen Transkriptionsfaktoren Hoxc13 [Potter *et al.*, 2006] und Foxn1 [Johns *et al.*, 2005] reguliert. Auch wurde eine Regulation der Expression von Dsc2 durch den Notch-Signalweg nachgewiesen. Notch1-defiziente Haarfollikel sind durch eine gestörte Medullastruktur sowie einen Verlust der Dsc2-Expression in diesem Bereich gekennzeichnet [Cai *et al.*, 2009]. Die Expression von Notch1 wird weiterhin sowohl durch Foxn1 als auch Msx2 reguliert [Cai *et al.*, 2009]. Diese besitzen ebenfalls, wie bereits erläutert, einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation der Differenzierung des Haarschafts. Msx2-Knockout Mäuse sind, wie von Ma *et al.*, 2003 beschrieben, durch eine abnorme Struktur der Medulla, aber auch durch Veränderungen in der Haaroberfläche und der Haarstruktur gekennzeichnet, wohingegen in Mäusen mit einer Mutation in dem Transkriptionsfaktor Foxn1 („Nude“-Mutation) aufgrund einer Störung des Keratinisierungsprozesses keine Cuticula der inneren Haarwurzelscheide und keine Haare gebildet wurden [Kopf-Maier *et al.*, 1990; Mecklenburg, 2001].

Auch FGFR2-IIIb besitzt einen entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung des Haarschafts und reguliert dort besonders die Differenzierung der Medulla [Petiot *et al.*, 2003; Schlake, 2005a; Grose *et al.*, 2007]. Sowohl eine ektopische Expression eines dominant negativen FGFR2-IIIb als auch eine Deletion von FGFR2-IIIb führen zu Veränderungen in der Medullastruktur, die von einer gestörten Lokalisation der Medullazellen bis hin zu einem reduzierten Durchmesser und einer reduzierten Anzahl der Medullasäulen reichen [Petiot *et al.*, 2003; Schlake, 2005a]. Die bisher erläuterten Einflüsse von FGFR2-IIIb und auch anderen beschriebenen Proteinen auf die Medullastruktur wurden in nicht-pigmentierenden Mausstämmen untersucht, weshalb kein Rückschluss auf eine mögliche Beeinflussung der Pigmentverteilung im Haarschaft getroffen werden konnte. Grose *et al.*, 2007 zeigen jedoch durch ihre Analysen in dominant negativen FGFR2-IIIb Mutanten, dass in einem C57Bl/6/J x 129/Ola gemischten Hintergrund eine abnorme Pigmentverteilung in Zigzag-Haaren auftritt, die von ihnen aber nicht näher diskutiert worden ist. Die Untersuchungen von Schlake, 2005a zeigen außerdem, dass auch eine Hemmung des FGFR2-IIIb zu einer Reduktion in der Expression von Dsc2 in der Medulla führt. Zusammen mit den in dieser Arbeit dargestellten Daten deuten die in der Literatur verfügbaren Erkenntnisse auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Pigmentverteilung und der Dsc2-Expression in der Medulla hin. Es ist vorstellbar, dass FGFR2-IIIb und Rac1 die Aktivität eines Signalwegs kontrollieren, der Dsc2-Expression reguliert. Eine Beeinflussung der Dsc2-Expression durch Rac1 über Regulation der Foxn1-Expression ist jedoch eher unwahrscheinlich, da in den Haarfollikeln der Rac1 Rescue Mäuse keine Veränderungen in der Foxn1-Expression nachgewiesen werden konnten. Eine Analyse der Expression anderer, zuvor beschriebener Regulatoren der Dsc2-Expression könnte Aufschluss darüber geben, ob Rac1 eine

spezifische Funktion in der Strukturbildung des Haarschafts durch Regulation der Dsc2-Expression in der Medulla übernimmt oder ob die Veränderungen in der Haarschaftstruktur durch eine gestörte Organisation des Aktinzytoskeletts und die daraus resultierenden Veränderungen in den cortikalen Strukturen bedingt sind.

Bei den Veränderungen in der Dsc2-Expression scheint es sich um einen spezifischen Effekt auf dieses Adhäsionsprotein zu handeln. Wie Untersuchungen zur Expression verschiedener desmosomaler Proteine im Haarfollikel und in der IFE gezeigt haben, konnte mit den hier angewandten Methoden keine generelle Beeinflussung der Zell-Zell-Kontakte in Rac1 Rescue Mäusen beobachtet werden. Auch von Chrostek *et al.*, 2006 wurde bereits beschrieben, dass nach epidermaler Deletion von Rac1 keine Veränderungen in der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten auftraten. Weiterführende *in vitro*-Studien mit primären Keratinozyten könnten herangezogen werden, um die *de novo*-Bildung sowie die Funktionalität der gebildeten Desmosomen zu untersuchen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Expression oder Funktionsweise anderer, hier nicht untersuchter desmosomaler Komponenten durch die Deletion von Rac1 beeinträchtigt wurden und so für die Veränderungen in der Haarfollikelmorphologie verantwortlich sein könnten. Knockout-Mausmodelle von zellkontaktassoziierten Proteinen haben bereits gezeigt, dass eine Expression und korrekte Lokalisation dieser Proteine essentiell für die Haarstrukturbildung und Morphologie sein können. So konnte in Plakophilin3 epidermalen Knockout-Mäusen eine veränderte Haaroberflächenstruktur und eine gestörte Medullastruktur sowie eine Reduktion des Haardurchmessers nachgewiesen werden [Sklyarova *et al.*, 2008]. Auch eine basale Überexpression von Plakoglobin führt zu einer Reduktion der Haarlänge, die teilweise auf eine reduzierte Proliferation im Haarfollikel zurückzuführen ist [Charpentier *et al.*, 2000].

Die bisher erhaltenen Ergebnisse könnten für einen Mechanismus sprechen, bei dem die Rekrutierung von Dsc2 in den Medullazellen an die Kontaktstellen mit den Cortex-Ausstülpungen einen späten Schritt in der Haarschaftdifferenzierung darstellt. Eine gestörte Ausbildung dieser Cortex-Ausstülpungen in Rac1 Rescue Mäusen könnte die Rekrutierung von Dsc2 zu diesen Adhäsionspunkten verhindern, was die beobachtete reduzierte Dsc2-Präsenz an den Adhäsionspunkten erklären könnte. Danach wären sowohl die gestörte Verteilung des Pigments als auch die gräuliche Fellfarbe von Rac1 Rescue Mäusen auf die veränderte Cortexstruktur nach Deletion von Rac1 zurückzuführen. Auch eine direkte Regulation der Dsc2-Expression oder der Dsc2-Verteilung in den Medullazellen durch Rac1 wäre denkbar, wodurch die Cortexstrukturbildung beeinflusst werden könnte.

4.3.2 Die Rolle von Rac1 in den Pigmentierungsprozessen der Haare und in der Pigmentzelllokalisation

Auch eine direkte Regulation der Pigmentierungsprozesse im Haarbulbus durch Rac1 wäre als Auslöser für die gestörte Pigmentverteilung im Haarschaft von Rac1 Rescue Mäusen denkbar. Ein Verlust einer bestimmten Melanozytenpopulation oder eine Reduktion der Melanogeneseaktivität im Haarbulbus können als Grund für eine Beeinflussung der Pigmentverteilung ausgeschlossen werden, da in einer immunhistologischen Analyse der Melanozytenpopulationen und der Melanogeneseaktivität im Haarbulbus keine Veränderungen nachgewiesen werden konnten.

Die Pigmentierung des Haarschafts wird durch die Pigmentaufnahme der Haarmatrixkeratinozyten bestimmt, die in weiterer Differenzierung des Haarschafts die Zellen der Medulla bilden [Slominski *et al.*, 2005]. Eine gestörte Pigmentaufnahme im Haarbulbus könnte daher zu einer Veränderung der Haarschaftpigmentierung führen. Wie eine Analyse der Pigmentverteilung im Haarbulbus in Semidünnschnitten in Rac1 Rescue Mäusen ergeben hat, zeigen die Haarbulbi dieser Tiere eine gestörte subzelluläre Verteilung und eine abnorme extrazelluläre Lokalisation des Pigments. *In vitro*-Untersuchungen zur Pigmentaufnahme von humanen Keratinozyten haben gezeigt, dass diese durch eine KGF-abhängige Rac1/Cdc42-Aktivierung reguliert wird. Die Zugabe von KGF ins Kulturmedium der Keratinozyten führte zu einer erhöhten Phagozytose von fluoreszierenden Latexpartikeln mit einer Melanosomen-ähnlichen Größe, welche durch Hemmung der Rac1/Cdc42-abhängigen Phagozytose über die Inhibierung der Src-Tyrosinkinasefamilie drastisch reduziert wurde [Cardinali *et al.*, 2005]. Ihre Daten weisen auf eine Regulation der Pigmentaufnahme durch Rac1 hin. Ein Verlust der Rac1-Aktivität in den Zellen der Haarmatrix kann demnach als eine mögliche Erklärung für die abnorme Pigmentverteilung und die extrazelluläre Lokalisation von Pigment in der Haarmatrix herangezogen werden. Experimente, die die Pigmentaufnahme *in vitro* nachahmen, könnten Aufschluss darüber geben, ob ein Verlust der Rac1-Expression zu einer reduzierten Pigmentaufnahme und zu vermehrt extrazellulär lokalisiertem Pigment oder einer gestörten subzellulären Verteilung des Pigments führt. Da Keratinozyten, isoliert aus Rac1 E-KO Mäusen, nicht kultiviert werden konnten, war ich nicht in der Lage, eine derartige Analyse in Rac1 E-KO Keratinozyten durchzuführen.

Die beobachtete Ansammlung von Melanozyten und Melanozytenvorläuferzellen in der IFE von Rac1 E-KO Mäusen stellt möglicherweise zum Teil eine indirekte Folge des Verlusts der Rac1-Expression dar, die sekundär durch den Untergang des nicht-permanenten Teils des Haarfollikels ausgelöst wurde. Die Anzahl der epidermalen Melanozyten nimmt dabei mit

fortschreitender Zerstörung der Haarfollikel in Rac1 E-KO Mäusen zu. In Rac1 Rescue Mäusen, in denen keine Zerstörung der Haarfollikel nachgewiesen werden konnte, konnte die Anzahl epidermaler Melanozyten zum Teil reduziert werden, was auf einen möglichen Zusammenhang der epidermalen Lokalisation der Melanozyten mit der Zerstörung der Haarfollikel hindeuten könnte. Jedoch würde diese Hypothese nicht erklären, warum auch in Rac1 Rescue Mäusen ein nicht unwesentlicher Anteil an Melanozyten in der Epidermis nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der Melanozytenstammzellnische zu finden sein. Die Zellidentität von Melanozytenstammzellen wird, wie bei allen Stammzellen, maßgeblich durch das sie umgebende Milieu, die Stammzellnische, [Tumbar *et al.*, 2004; Osawa *et al.*, 2005] beeinflusst. Melanozytenstammzellen sind im unteren permanenten Bereich des Haarfollikels in der Nähe der Bulge-Region lokalisiert [Nishimura *et al.*, 2002; Osawa *et al.*, 2005]. Da jedoch in Rac1 Rescue Mäusen die Bulge-Stammzellregion nach basaler Expression von L61Rac1 nicht vollständig wiederhergestellt werden konnte, ist es denkbar, dass die spezifische Nische der Melanozytenstammzellen durch die suprabasale Deletion von Rac1 beeinträchtigt wurde bzw. nicht vorhanden ist, so dass Melanozytenvorläuferzellen ihre Nische verlassen und in die Epidermis einwandern, um dort reife, Tyrosinase-aktive Melanozyten zu bilden. Nishimura *et al.*, 2002 haben gezeigt, dass Melanozytenstammzellen das Vermögen besitzen, ihre natürliche Nische zu verlassen, um in andere vakante Nischen, wie die IFE, einzuwandern. Denkbar wäre auch, dass ein bestimmter Faktor, der für die Rekrutierung der Melanozyten in die Haarbulbi verantwortlich ist und durch Rac1 reguliert wird, in Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen nicht mehr in seiner ursprünglichen Form exprimiert wird. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass eine Expression von Foxn1 unter der Kontrolle eines Keratin 5-Promotors zu einer Rekrutierung von Melanozyten in die Epidermis und einer Pigmentierung der Haut führt. Sie schließen daraus, dass die Expression von Foxn1, die unter physiologischen Bedingungen nur in den pigmenterhaltenden Keratinozyten der Haarmatrix zu finden ist, die Pigmentierungsprozesse im Haarschaft und die Lokalisation von Melanozyten entscheidend beeinflusst [Weiner *et al.*, 2007]. Ein Einfluss von Rac1 auf die Expression von Foxn1 ist jedoch eher unwahrscheinlich, da in den Haarfollikeln von Rac1 Rescue Mäusen keine Veränderungen in der Foxn1 Expression festgestellt werden konnten. Weiterhin wurde gezeigt, dass Melanozytenvorläuferzellen nach Expression von SCF unter der Kontrolle eines Keratin 14-Promotors aus dem Haarfollikel in die Epidermis einwandern [Kunisada *et al.*, 1998; Nishimura *et al.*, 2002]. Auch andere Studien haben belegt, dass eine Expression von SCF durch Keratinozyten für die Rekrutierung der Melanoblasten in die Haarfollikel verantwortlich ist [Jordan & Jackson, 2000; Peters *et al.*, 2002]. Eine Regulation von SCF durch Rac1 könnte möglicherweise dazu geführt haben, dass nicht alle Melanoblasten in die sich entwickelnden Haarfollikel einwandern, sondern einige in der

Epidermis verbleiben und so zu einer erhöhten Anzahl an Melanozyten in der IFE von Rac1 E-KO und Rac1 Rescue Mäusen beigetragen haben.

Zusammengefasst weisen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten erstmalig auf spezifische Funktionen von Rac1 in den suprabasalen Schichten des Haarfollikels in der Strukturbildung und der Pigmentierung des Haarschafts hin. Eine solche Funktion von Rac1 wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben, weil in den bisher verfügbaren Mausmodellen aufgrund der kompletten Deletion von Rac1 in allen Epidermis- und Haarfollikelschichten und dem daraus resultierenden graduellen Abbau der Haarfollikel eine genaue strukturelle Analyse der Haarfollikelmorphologie nicht möglich war. Das von uns etablierte und hier vorgestellte Modell der Rac1 Rescue Mäuse ermöglichte durch die partielle Wiederherstellung der äußeren Haarfollikelmorphologie eine genaue Analyse der strukturellen Veränderungen im Haarschaft und der Haarpigmentierung und bietet zukünftig die Möglichkeit, weitere neuartige suprabasale Funktionen von Rac1 in der Epidermis und dem Haarfollikel zu untersuchen.

4.4 Die Rolle von Rac1 in der Erhaltung der Haarfollikel

Wie von Chrostek *et al.*, 2006 charakterisiert, resultiert eine epidermale Deletion von Rac1 in einer Degradierung des unteren, nicht-permanenten Teils des Haarfollikels. Die Zerstörung des nicht-permanenten Teils des Haarfollikels ist, wie von ihnen dargestellt, von einem Abbau durch Immunzellen, genauer gesagt durch Makrophagen, abhängig. Wie unsere Untersuchungen gezeigt haben, akkumulieren phagozytierende F4/80-positive Makrophagen in einem fortgeschrittenen Stadium um die zerstörten Haarfollikelüberreste. Neben Makrophagen waren aber auch MHCII-exprimierende dendritische Zellen an den zugrunde gehenden Haarfollikeln in Rac1 E-KO Mäusen lokalisiert. Eine solche Akkumulation der Immunzellen konnte an vereinzelt Haarfollikeln in Rac1 E-KO Mäusen bereits an Tag 1 p.p. nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Rac1 E-KO Mäusen wurde die Akkumulation von Immunzellen nicht in Rac1 Rescue Mäusen beobachtet. Die basale Rekonstitution der Rac1-Aktivität verhindert also diese Immunreaktion gegen Haarfollikelbestandteile.

Es stellt sich die Frage, wie der Verlust von Rac1 in den Zellen des Keratin 14-positiven Kompartiments zu einer Aktivierung von Immunmechanismen und einem Abbau von Anteilen des Haarfollikels führen kann. Es ist bekannt, dass während des Längenwachstums des Haarfollikels Schutzmechanismen aktiviert werden, die einen Angriff auf den in die Dermis einwachsenden Haarfollikel durch Immunzellen verhindern. Diese Mechanismen umfassen, wie bereits beschrieben, zum einen die Expression bestimmter Proteine in Keratinozyten der

äußeren Haarwurzelscheide, wie CD200 [Rosenblum *et al.*, 2004], oder zum anderen auch die Freisetzung bestimmter immunsuppressiver Botenstoffe, wie beispielsweise TGF- β 1 [Welker *et al.*, 1997]. Die Anwesenheit solcher Proteine und Botenstoffe zum Schutz des Haarfollikels wird in der Literatur mit dem Begriff „Immunprivileg des Haarfollikels“ beschrieben und stellt einen wirkungsvollen Schutz gegenüber einem Abbau des Haarfollikels durch Immunzellen dar.

Eichmüller *et al.*, 1998 haben beschrieben, dass ein Haarfollikel, der irreversible Veränderungen aufweist, aus dem Haarzyklus austreten kann und zugrunde geht. Dieser Vorgang geht mit dem Verlust des Immunprivilegs einher und wird mit dem Begriff „programmed organ deletion“ beschrieben. Der Haarfollikel wird dabei durch einen Angriff inflammatorischer Zellen im Bereich der äußeren Haarwurzelscheide und der Bulge-Region abgebaut und ist durch eine erhöhte Zahl apoptotischer TUNEL-positiver Zellen im Bereich der äußeren Haarwurzelscheide sowie durch eine Reduktion der Basalmembran in diesem Bereich gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu sind während einer normalen Entwicklung und Differenzierung der Haarfollikel apoptotische Zellen lediglich im Bereich der inneren Haarwurzelscheide zu finden [Lindner *et al.*, 1997; Magerl *et al.*, 2001].

Untersuchungen mittels Immunhistologie zur Expression von CD200 in Haarfollikeln von Rac1 E-KO Mäusen zeigten keine Reduktion in der Expression dieses Proteins in der äußeren Haarwurzelscheide, was nicht auf eine Beeinträchtigung des Immunprivilegs des Haarfollikels in Rac1 E-KO Mäusen hinweist. Es scheint wahrscheinlicher, dass apoptotische Prozesse den Abbau der Haarfollikel induziert haben. In Rac1 E-KO Mäusen scheint das durch CD200 vermittelte Immunprivileg des Haarfollikels also nicht beeinträchtigt zu sein, wobei andere Mechanismen, beispielsweise TGF- β -abhängige, hier nicht untersucht wurden. Hingegen beobachtete ich im Rahmen meiner Untersuchungen, dass es in Rac1 E-KO Haarfollikeln sehr häufig und bereits in den ersten Tagen nach der Geburt zu einer Apoptose der Keratinozyten der äußeren Haarwurzelscheide, dem Keratin 14-positiven Kompartiment des Haarfollikels, kam. Diese Apoptose ließ sich auch in der äußeren Haarwurzelscheide von Haarfollikeln nachweisen, die noch kein deutliches perifollikuläres Immunzellinfiltrat aufwiesen. Daraus ergab sich die Frage, ob die Apoptose der Keratinozyten der äußeren Haarwurzelscheide die Ursache oder die Folge der perifollikulären Ansammlung von Immunzellen ist.

Eine Analyse apoptotischer Zellen in Rac1 E-KO Mäusen an Tag 1 p.p. zeigte eine abnorme Lokalisation TUNEL-positiver Zellen an vereinzelt Haarfollikeln im Bereich des Haarbulbus, was primär pathologische Veränderungen im Bereich des Haarbulbus vermuten

lässt. Die Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den in Chrostek *et al.*, 2006 beschriebenen Daten, die keine apoptotischen Zellen an den Haarfollikeln von Rac1 E-KO Mäusen an Tag 14 p.p. nachweisen konnten. Daraus schließen sie, dass Apoptose kein Grund für die Rekrutierung der Immunzellen sein kann. Ein mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte in der Verwendung eines anderen Promotors oder in dem Zeitpunkt, der zum Nachweis apoptotischer Zellen verwendet wurde, liegen. Chrostek *et al.*, 2006 untersuchten apoptotische Zellen an Tag 14 p.p., an dem in ihrem (und unserem) Modell die Zerstörung der Haarfollikel bereits sehr weit fortgeschritten war und so die Ergebnisse beeinflusst haben könnte. Wenn es um die Frage der initialen Schritte geht, die zum Untergang der Haarfollikel führten, ist jedoch die Analyse TUNEL-positiver Zellen vor der Zerstörung der Haarfollikel, also zu einem frühen Zeitpunkt, aufschlussreicher. Die von uns durchgeführten Untersuchungen TUNEL-positiver Zellen an Tag 10 p.p. sowie an weiteren früheren Zeitpunkten (Tag 2, 4 und 5) und die TEM-Analyse der Haarfollikel demonstrieren eindeutig eine erhöhte Apoptoserate der Haarfollikelkeratinozyten in Rac1 E-KO Mäusen, vornehmlich im Bereich der äußeren Haarwurzelscheide. In den Bereichen, in denen die apoptotischen Zellen an den degradierten Haarfollikeln zu finden sind, sind auch die um den Haarfollikel akkumulierenden Immunzellen lokalisiert. Es ist bekannt, dass phagozytierende Zellen durch apoptotische Zellen mittels Chemotaxis angezogen werden [Lauber *et al.*, 2004]. Andererseits ist durch den Verlust von Keratinozyten der äußeren Haarwurzelscheide auch kein intaktes Immunprivileg des Haarfollikels mehr vorhanden. Es ist daher möglich, dass die Apoptose der Haarfollikelkeratinozyten den initialen Grund für die Haarfollikeldegradierung darstellt. Die Rekrutierung der Immunzellen wäre damit ein sekundärer Effekt, der für den Abbau der apoptotischen Zellen und des nicht-permanenten Teils des Haarfollikels verantwortlich ist.

4.5 Regulation der UVB-induzierten Apoptose durch Rac1

Wenn Keratinozyten der äußeren Haarwurzelscheide eine höhere Wahrscheinlichkeit des apoptotischen Untergangs haben, dann sollte diese bei Exposition gegenüber pro-apoptotischen Stimuli nachweisbar sein. Um der Frage nachzugehen, ob Rac1 spezifisch die Apoptosewahrscheinlichkeit der Keratinozyten der äußeren Haarwurzelscheide beeinflussen kann und ob Rac1 eine generelle Rolle in der Induktion apoptotischer Prozesse in Keratinozyten zukommt, wurden UVB-Bestrahlungsexperimente an Mäusen, in denen Rac1 im Epithel deletiert bzw. inhibiert wurde, durchgeführt. Diese zeigten eine erhöhte Empfindlichkeit der Rac1-defizienten Keratinozyten gegenüber der UVB-vermittelten Induktion der Apoptose *in vivo*. So konnte 12 h p.irr. in der Epidermis von Rac1 E-KO Mäusen eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Keratinozyten sowohl histologisch (SBZ) als auch immunhistologisch durch TUNEL- und aktive Caspase 3-Färbung nachgewiesen

werden. *In vitro* Experimente weisen darauf hin, dass die erhöhte Apoptose nach Rac1-Deletion oder Inhibierung auf einen Rac1-abhängigen zellintrinsic Defekt der Keratinozyten zurückzuführen ist.

Die erhöhte Anzahl an aktive Caspase 3-positiven Zellen in der Epidermis zeigt eindeutig eine erhöhte Induktion apoptotischer Prozesse. Jedoch kann hierdurch nicht auf einen bestimmten Mechanismus geschlossen werden, durch den Rac1 die Apoptose der epidermalen Keratinozyten reguliert, da alle UVB-abhängigen Wege zur Induktion der Apoptose in einer Aktivierung von Caspase 3 münden. Die UVB-induzierte Apoptose in Keratinozyten kann zum einen durch eine direkte Schädigung der DNA eingeleitet werden, die bei Nicht-Reparatur die Expression pro-apoptotischer Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder induzieren kann und so die Apoptose über den mitochondrialen Weg einleitet. Zum anderen kann die exzessive Bildung von ROS durch photochemische Reaktionen in der Zelle oder Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren zur Einleitung des intrinsischen Signalwegs führen. Beide Wege resultieren in der Aktivierung der Initiator-Caspase 9, die Caspase 3 spaltet. Der intrinsische Signalweg kann zum einen durch anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie wie Bcl-2 oder Bcl-X_L [Hockenbery *et al.*, 1990] oder zum anderen durch Apoptose-inhibitorische Proteine (IAP) [Deveraux *et al.*, 1997] blockiert werden.

Demnach wäre also denkbar, dass ein Verlust von Rac1 eine erhöhte DNA-Schädigung oder unzureichende DNA-Reparatur nach sich zieht. Diese könnte anschließend zu der erhöhten Apoptose in den epidermalen Keratinozyten geführt haben. Jedoch wurde bisher in der Literatur keine Funktion von Rac1 in der DNA-Schadensinduktion oder der DNA-Reparatur belegt. Eine Analyse der Induktion UVB-assoziiertes DNA-Schäden, wie Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CDP), und deren Reparaturkinetik könnte Hinweise liefern, ob Rac1 eine Rolle in der UVB-vermittelten Schadensinduktion und -reparatur besitzt.

Rac1 könnte jedoch auch durch Regulation anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 oder inhibitorischer Proteine wie XIAP die Induktion der Apoptose beeinflussen haben. Dabei könnte eine, vom Verlust von Rac1 abhängige Reduktion der Expression dieser Proteine zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Zellen gegenüber apoptotischen Reizen führen. In Brustkrebszelllinien wurde bereits gezeigt, dass eine Inhibierung von Rac1 die Expression von anti-apoptotischen Proteinen der IAP-Familie, wie XIAP und Survivin, über einen NF κ B-abhängigen Mechanismus reduziert, wodurch vermehrt Apoptose induziert wird [Yoshida *et al.*, 2010]. Weiterhin wäre aber auch denkbar, dass Rac1 einen Einfluss auf die pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-Proteinfamilie, wie Bad oder Bax, ausübt. In humanen Lymphomazellen wurde beispielsweise gezeigt, dass eine Aktivierung von Rac1 die

Phosphorylierung von Bad an Ser75 (analog zu Maus Ser112) positiv reguliert, wodurch die apoptotische Aktivität von Bad inhibiert wird [Zhang *et al.*, 2004]. Dieser Mechanismus scheint über PAK-Effektorinasen abzulaufen. So wurde gezeigt, dass eine Aktivierung von PAK zu einer verstärkten Phosphorylierung von Bad an Ser112 führt [Schürmann *et al.*, 2000]. Eine reduzierte Aktivität von Rac1 könnte somit theoretisch zu einer reduzierten Bad-Phosphorylierung und einer erhöhten apoptotischen Aktivität von Bad führen. Weiterhin ist die Einleitung der Apoptose mit einer Translokation von Bax in die Mitochondrien verbunden, was die Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien induziert. Eine Untersuchung der Bax-Translokation in die Mitochondrien könnte daher zunächst Aufschluss darüber geben, ob Rac1 die Induktion der Apoptose in Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung über den intrinsischen Signalweg reguliert oder ob ein anderer Mechanismus in Frage kommt.

Eine Bax-Translokation in die Mitochondrien würde jedoch noch keinen Hinweis darüber liefern, ob Rac1 den intrinsischen Signalweg über einen Mechanismus, der eine direkte DNA-Schädigung oder -Reparatur reguliert oder ob Rac1 über die Bildung von ROS an der Apoptose-Induktion beteiligt ist. Die Bildung von ROS wird in Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung durch Nox1 reguliert [Wang & Kochevar, 2005]. Die Aktivität von Nox1 wiederum wird durch Rac1 durch Interaktion an der Zellmembran direkt reguliert [Lee *et al.*, 2006; Miyano *et al.*, 2006]. In epithelialen Zellen führt jedoch lediglich eine Aktivierung von Rac1 zu einer erhöhten Nox1-Aktivität und einer davon abhängigen Erhöhung der ROS-Produktion [Cheng *et al.*, 2006; Miyano *et al.*, 2006]. In HEK-Zellen wurde gezeigt, dass ein Serumentzug zu einem erhöhten Zelltod führt. Dieser ist auf eine erhöhte Rac1-abhängige Bildung von ROS durch Nox1 zurückzuführen [Lee *et al.*, 2006]. Eine Hemmung der Rac1-Aktivität führt in diesen Zellen zu einer Reduktion des ROS-vermittelten Zelltods. Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass eine Deletion von Rac1 oder Hemmung der Rac1-Aktivität über einen ROS-abhängigen Mechanismus die Apoptose der epidermalen Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung ausgelöst hat. Im Gegensatz hierzu wurde jedoch durch Studien in Rac1-defizienten MEF-Zellen gezeigt, dass sowohl eine Aktivierung als auch eine Deletion von Rac1 zu einer erhöhten Bildung von ROS führen kann [Debidda *et al.*, 2006]. Eine Analyse der ROS-Produktion in Rac1 E-KO oder N17Rac1 transgenen Keratinozyten könnte dazu genutzt werden, um aufzuklären, ob nach UVB-Bestrahlung auch eine Inhibierung der Rac1-Aktivität zu einer erhöhten Bildung von ROS führt.

Eine Deletion des Rac1-Aktivators Tiam1 in Mauskeratinozyten führt nach Wachstumsfaktorentzug zu einem erhöhten Zelltod. Tiam1-defiziente Keratinozyten zeigen jedoch eine Reduktion der intrazellulären ROS. Das verstärkte Absterben dieser Zellen wurde hierbei auf eine Reduktion der ERK-Phosphorylierung, die als Überlebenssignal der Zellen fungiert,

zurückgeführt [Rygiel *et al.*, 2008]. Untersuchungen in Endothelzellen haben Ähnliches gezeigt. Eine Inhibierung der Rac1-Aktivität durch Expression von N17Rac1 führte in diesen Zellen ebenfalls zu einer reduzierten ROS-Produktion und einem erhöhten Zelltod. Dieser ist auf eine Aktivierung des EGFR und ERK sowie eine erhöhte Expression des proapoptischen Proteins Bim zurückzuführen [Giannoni *et al.*, 2008]. Diese Form des Zelltods wird jedoch mit dem Begriff Anoikis beschrieben, bei dem es sich um eine von der Zell-Matrix-Adhäsion abhängige Form des Zelltods handelt. Ob diese Art des Zelltods bzw. eine reduzierte Zell-Matrix-Adhäsion auch einen Einfluss auf die UVB-abhängige Induktion der Apoptose besitzt, wurde bisher nicht untersucht. Jedoch wurde bereits gezeigt, dass auch UVB-Strahlung in der Lage ist, eine EGFR-abhängige Aktivierung von ERK und p38 in HaCaT-Zellen zu induzieren [Xu *et al.*, 2006]. Eine Untersuchung der ERK-Aktivierung nach UVB-Bestrahlung in Rac1 E-KO Mäusen *in vivo* und N17Rac1 transgenen Zellen *in vitro* könnte Aufschluss darüber geben, ob eine reduzierte Aktivierung von ERK als Überlebenssignal in Rac1 E-KO Mäusen auch zur Induktion der Apoptose nach UVB-Bestrahlung beigetragen haben könnte.

Die Induktion der Apoptose in Keratinozyten nach UVB-Strahlung kann zusätzlich auch über den extrinsischen Signalweg durch eine Aktivierung von Todesrezeptoren eingeleitet werden. Todesrezeptoren gehören zur TNF-Rezeptor-Superfamilie und umfassen TNFR1, TRAIL-Rezeptoren sowie Fas [Leverkus *et al.*, 1997; Kibitel *et al.*, 1998; Qin *et al.*, 2004]. Im extrinsischen Signalweg wird im Gegensatz zum intrinsischen Weg Caspase 3 durch Spaltung durch die Initiator-Caspase 8 aktiviert. Es wurde gezeigt, dass die Expression eines dominant negativen N17Rac1-Konstrukts in murinen Fibroblasten zu einer erhöhten Expression des Fas-Rezeptors an der Zelloberfläche führt [Ivanov *et al.*, 2002]. Es wird angenommen, dass der Fas-Rezeptor nach UVB-Bestrahlung Caspase 8 auch über einen Liganden-unabhängigen Mechanismus aktivieren kann [Aragane *et al.*, 1998], wobei jüngere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe jedoch gezeigt haben, dass Fas für die UV-induzierte Apoptose von Keratinozyten nicht erforderlich ist [Hedrych-Ozimina *et al.*, 2010]. Eine Analyse der UVB-abhängigen Aktivierung von Caspase 8 und Caspase 9 in N17Rac1 transgenen Keratinozyten *in vitro* oder in Rac1 E-KO bzw. N17Rac1 transgenen Mäusen *in vivo* könnte dazu genutzt werden, um zu klären, ob Rac1 an der Induktion der Apoptose eher über den extrinsischen oder intrinsischen Signalweg beteiligt ist.

Die Regulation von Apoptose durch Rac1 in Keratinozyten hat möglicherweise eine Relevanz für bestimmte Hauterkrankungen des Menschen. Einerseits kann eine mögliche Rolle von Rac1 bei der Entscheidung über Untergang oder Vermehrung UV-geschädigter Keratinozyten in der Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen und deren Vorstufen auf

sonnengeschädigter Haut angenommen werden. Andererseits hat die verminderte Aktivität von Rac1 in epidermalen Keratinozyten bei dem seltenen Kindler-Syndrom eventuell direkte Auswirkungen auf die Sonnenempfindlichkeit der Haut. Das Kindler-Syndrom ist durch eine Mutation im Gen für das Integrin-bindende Adapterprotein Kindlin1 gekennzeichnet und geht mit erhöhter Verletzlichkeit der Haut einher. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der aus der Mutation resultierende Funktionsverlust von Kindlin1 in einer Hemmung der Rac1-Aktivität in den Keratinozyten resultiert [Has *et al.*, 2009]. Nach unseren Daten sollte eine Verminderung der Rac1-Aktivität zu einer vermehrten Apoptose in der Epidermis führen. In der Tat ist bekannt, dass Patienten mit Kindler-Syndrom an einer erhöhten Lichtempfindlichkeit der Haut leiden [Lai-Cheong *et al.*, 2009; Lai-Cheong & McGrath, 2010]. Wir haben deshalb begonnen, die UV-induzierte Apoptose in humanen Kindler-Keratinozyten zu untersuchen. Dazu haben wir die Rate apoptotischer Kindler-Keratinozyten mit der von humanen Kontroll-Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung verglichen. Die ersten Ergebnisse dieser Experimente zeigen unter diesen Bedingungen tatsächlich eine vermehrte Apoptose in Kindler-Keratinozyten. Demnach lässt sich die erhöhte Lichtempfindlichkeit von Patienten mit Kindler-Syndrom durch die reduzierte Rac1-Aktivität der epidermalen Keratinozyten erklären. Weitere Experimente zur Untersuchung der Rolle von Rac1 in der Regulation der UV-induzierten Apoptose sind in Arbeit.

4.6 Ausblick

Die Analysen zur Funktion von Rac1 in der Haarmorphologie und Haarfollikelintegrität weisen darauf hin, dass in Rac1 E-KO Mäusen vermutlich eine Induktion apoptotischer Prozesse in den Keratinozyten der äußeren Haarwurzelscheide der Auslöser für die fortschreitende Haarfollikeldegradierung ist. In UVB-Bestrahlungsexperimenten von Rac1 E-KO Mäusen konnte eine höhere Empfindlichkeit der Rac1-defizienten Keratinozyten gegenüber der Induktion der Apoptose festgestellt werden. So zeigten sie im Vergleich zu den Kontrollen 12 h nach Bestrahlung deutlich eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen in der Basalzellschicht der Epidermis. Weiterführende Untersuchungen sollen klären, über welchen Mechanismus oder Signalweg Rac1 die Induktion apoptotischer Prozesse in der Epidermis reguliert.

Wang *et al.*, 2010 haben gezeigt, dass die Papillombildung im DMBA/TPA-Tumormodell in K5-Cre Rac1 E-KO Mäusen reduziert ist. Auch Tiere, die für den Rac1-Aktivator Tiam1 defizient sind, zeigen eine höhere Resistenz gegenüber DMBA/TPA-induzierten Tumoren der Haut [Malliri *et al.*, 2002]. Beide haben festgestellt, dass die verminderte Tumorbildung auf eine reduzierte Proliferation der Rac1-defizienten Keratinozyten zurückzuführen ist.

Zusätzlich haben sie gezeigt, dass in Tiam1 E-KO Mäusen die reduzierte Tumorbildung auf eine erhöhte Apoptose der basalen Keratinozyten während der DMBA-vermittelten Initiation zurückzuführen ist, wohingegen die verringerte Proliferation die TPA-vermittelte Tumorprogression beeinflusst [Malliri *et al.*, 2002]. In transgenen Mäusen, die basal dominant negatives Rac1 exprimieren, konnte in Untersuchungen in einem transgenen Tumormodell unserer Arbeitsgruppe eine reduzierte Bildung von pathologischen, tumorösen Hautveränderungen beobachtet werden [Tscharncke, 2006]. In diesem Modell wird die gesamte frühe Region des Humanen Papillomvirus 8 (HPV8) als Transgen in der Epidermis exprimiert, was zur spontanen und UVB-induzierten Tumorentstehung führt [Schaper *et al.*, 2005]. Diese Erkenntnisse, zusammen mit der erhöhten Apoptosewahrscheinlichkeit UVB-vermittelter Apoptose nach Rac1-Deletion oder Hemmung der Rac1-Aktivität, legen nahe, dass Rac1 und Rac1-abhängige Signalwege eine wichtige Rolle sowohl in der Tumorinitiation als auch in der Tumorprogression zukommt. In weiterführenden Untersuchungen wäre es interessant zu analysieren, ob eine Regulation der Apoptose durch Rac1 auch einen Einfluss auf die Tumorentstehung in dem von uns verwendeten HPV8-Tumormodell besitzt. Untersuchungen zur Rolle von Rac1 in der Tumorentstehung der Haut sollen deshalb den Gegenstand eines weiterführenden Forschungsprojekts bilden.

5 Literaturverzeichnis

- Ahmadian, M.R., Stege, P., Scheffzek, K. & Wittinghofer, A.** (1997): Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nat Struct Biol* **4**(9): 686-689.
- Alonso, L. & Fuchs, E.** (2003): Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**: 11830-11835.
- Andl, T., Ahn, K., Kairo, A., Chu, E.Y., Wine-Lee, L., Reddy, S.T., Croft, N.J., Cebra-Thomas, J.A., Metzger, D., Chambon, P., Lyons, K.M., Mishina, Y., Seykora, J.T., Crenshaw, E.B., 3rd & Millar, S.E.** (2004): Epithelial Bmpr1a regulates differentiation and proliferation in postnatal hair follicles and is essential for tooth development. *Development* **131**(10): 2257-2268.
- Aragane, Y., Kulms, D., Metze, D., Wilkes, G., Poppelmann, B., Luger, T.A. & Schwarz, T.** (1998): Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol* **140**(1): 171-182.
- Arber, S., Barbayannis, F.A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C.A., Bernard, O. & Caroni, P.** (1998): Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* **393**(6687): 805-809.
- Arulanandam, R., Vultur, A., Cao, J., Carefoot, E., Elliott, B.E., Truesdell, P.F., Larue, L., Feracci, H. & Raptis, L.** (2009): Cadherin-cadherin engagement promotes cell survival via Rac1/Cdc42 and signal transducer and activator of transcription-3. *Molecular Cancer Research* **7**(8): 1310-1327.
- Barrandon, Y. & Green, H.** (1987): Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(8): 2302-2306.
- Bazzi, H. & Christiano, A.M.** (2007): Broken hearts, woolly hair, and tattered skin: when desmosomal adhesion goes awry. *Curr Opin Cell Biol* **19**(5): 515-520.
- Bazzi, H., Demehri, S., Potter, C.S., Barber, A.G., Awgulewitsch, A., Kopan, R. & Christiano, A.M.** (2009): Desmoglein 4 is regulated by transcription factors implicated in hair shaft differentiation. *Differentiation* **78**(5): 292-300.
- Bazzi, H., Getz, A., Mahoney, M.G., Ishida-Yamamoto, A., Langbein, L., Wahl, J.K. & Christiano, A.M.** (2006): Desmoglein 4 is expressed in highly differentiated keratinocytes and trichocytes in human epidermis and hair follicle. *Differentiation* **74**(2-3): 129-140.
- Benitah, S.A.** (2005): Stem Cell Depletion Through Epidermal Deletion of Rac1. *Science* **309**(5736): 933-935.
- Benitah, S.A., Frye, M., Glogauer, M. & Watt, F.M.** (2005): Stem cell depletion through epidermal deletion of Rac1. *Science* **309**(5736): 933-935.
- Benitah, S.A. & Watt, F.M.** (2007): Epidermal deletion of Rac1 causes stem cell depletion, irrespective of whether deletion occurs during embryogenesis or adulthood. *J Invest Dermatol* **127**(6): 1555-1557.

- Betson, M., Lozano, E., Zhang, J. & Braga, V.M.** (2002): Rac activation upon cell-cell contact formation is dependent on signaling from the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **277**(40): 36962-36969.
- Blanpain, C., Lowry, W.E., Pasolli, H.A. & Fuchs, E.** (2006): Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes Dev* **20**(21): 3022-3035.
- Bornslaeger, E.A., Godsel, L.M., Corcoran, C.M., Park, J.K., Hatzfeld, M., Kowalczyk, A.P. & Green, K.J.** (2001): Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cell borders. *J Cell Sci* **114**(Pt 4): 727-738.
- Bosco, E.E., Mulloy, J.C. & Zheng, Y.** (2009): Rac1 GTPase: a "Rac" of all trades. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**(3): 370-374.
- Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Slominski, A., Roloff, B., Luger, T. & Paus, R.** (1999): Developmentally regulated expression of alpha-MSH and MC-1 receptor in C57BL/6 mouse skin suggests functions beyond pigmentation. *Ann N Y Acad Sci* **885**: 433-439.
- Botchkarev, V.A. & Sharov, A.A.** (2004): BMP signaling in the control of skin development and hair follicle growth. *Differentiation* **72**(9-10): 512-526.
- Botchkareva, N.V., Botchkarev, V.A. & Gilchrist, B.A.** (2003): Fate of melanocytes during development of the hair follicle pigmentary unit. *J Invest Dermatol Symp Proc* **8**(1): 76-79.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. & McCormick, F.** (1990): The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**(6297): 125-132.
- Bowden, P.E., Hainey, S.D., Parker, G., Jones, D.O., Zimonjic, D., Popescu, N. & Hodgins, M.B.** (1998): Characterization and chromosomal localization of human hair-specific keratin genes and comparative expression during the hair growth cycle. *J Invest Dermatol* **110**(2): 158-164.
- Braga, V.M., Betson, M., Li, X. & Lamarche-Vane, N.** (2000): Activation of the small GTPase Rac is sufficient to disrupt cadherin-dependent cell-cell adhesion in normal human keratinocytes. *Mol Biol Cell* **11**(11): 3703-3721.
- Braga, V.M., Del Maschio, A., Machesky, L. & Dejana, E.** (1999): Regulation of cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context. *Mol Biol Cell* **10**(1): 9-22.
- Braga, V.M., Machesky, L.M., Hall, A. & Hotchin, N.A.** (1997): The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *The Journal of Cell Biology* **137**(6): 1421-1431.
- Bruewer, M., Hopkins, A.M., Hobert, M.E., Nusrat, A. & Madara, J.L.** (2004): RhoA, Rac1, and Cdc42 exert distinct effects on epithelial barrier via selective structural and biochemical modulation of junctional proteins and F-actin. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**(2): C327-335.
- Bull, J.J., Muller-Rover, S., Patel, S.V., Chronnell, C.M., McKay, I.A. & Philpott, M.P.** (2001): Contrasting localization of c-Myc with other Myc superfamily transcription factors in the human hair follicle and during the hair growth cycle. *J Invest Dermatol* **116**(4): 617-622.
- Cai, J., Lee, J., Kopan, R. & Ma, L.** (2009): Genetic interplays between Msx2 and Foxn1 are required for Notch1 expression and hair shaft differentiation. *Developmental Biology* **326**(2): 420-430.

- Cardinali, G., Ceccarelli, S., Kovacs, D., Aspite, N., Lotti, L.V., Torrisi, M.R. & Picardo, M.** (2005): Keratinocyte growth factor promotes melanosome transfer to keratinocytes. *J Invest Dermatol* **125**(6): 1190-1199.
- Castilho, R.M., Squarize, C.H., Leelahavanichkul, K., Zheng, Y., Bugge, T. & Gutkind, J.S.** (2010): Rac1 is required for epithelial stem cell function during dermal and oral mucosal wound healing but not for tissue homeostasis in mice. *PLoS ONE* **5**(5): e10503.
- Castilho, R.M., Squarize, C.H., Patel, V., Millar, S.E., Zheng, Y., Molinolo, A. & Gutkind, J.S.** (2007): Requirement of Rac1 distinguishes follicular from interfollicular epithelial stem cells. *Oncogene* **26**(35): 5078-5085.
- Charpentier, E., Lavker, R.M., Acquista, E. & Cowin, P.** (2000): Plakoglobin suppresses epithelial proliferation and hair growth in vivo. *J Cell Biol* **149**(2): 503-520.
- Cheng, G., Diebold, B.A., Hughes, Y. & Lambeth, J.D.** (2006): Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *J Biol Chem* **281**(26): 17718-17726.
- Christoph, T., Muller-Rover, S., Audring, H., Tobin, D.J., Hermes, B., Cotsarelis, G., Ruckert, R. & Paus, R.** (2000): The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege. *Br J Dermatol* **142**(5): 862-873.
- Chrostek, A., Wu, X., Quondamatteo, F., Hu, R., Sanecka, A., Niemann, C., Langbein, L., Haase, I. & Brakebusch, C.** (2006): Rac1 is crucial for hair follicle integrity but is not essential for maintenance of the epidermis. *Mol Cell Biol* **26**(18): 6957-6970.
- Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T. & Gutkind, J.S.** (1995): The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**(7): 1137-1146.
- Costa, R.M., Chigancas, V., Galhardo Rda, S., Carvalho, H. & Menck, C.F.** (2003): The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* **85**(11): 1083-1099.
- Cotsarelis, G., Sun, T.T. & Lavker, R.M.** (1990): Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* **61**(7): 1329-1337.
- Daniels, F., Jr., Brophy, D. & Lobitz, W.C., Jr.** (1961): Histochemical responses of human skin following ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol* **37**: 351-357.
- DasGupta, R. & Fuchs, E.** (1999): Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development* **126**(20): 4557-4568.
- Debidda, M., Williams, D.A. & Zheng, Y.** (2006): Rac1 GTPase Regulates Cell Genomic Stability and Senescence. *Journal of Biological Chemistry* **281**(50): 38519-38528.
- Delva, E., Tucker, D.K. & Kowalczyk, A.P.** (2009): The Desmosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **1**(2): a002543-a002543.
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. & Reed, J.C.** (1997): X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**(6639): 300-304.

- Didsbury, J., Weber, R.F., Bokoch, G.M., Evans, T. & Snyderman, R.** (1989): rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem* **264**(28): 16378-16382.
- Diekmann, D., Abo, A., Johnston, C., Segal, A.W. & Hall, A.** (1994): Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science* **265**(5171): 531-533.
- Dise, R.S., Frey, M.R., Whitehead, R.H. & Polk, D.B.** (2008): Epidermal growth factor stimulates Rac activation through Src and phosphatidylinositol 3-kinase to promote colonic epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**(1): G276-285.
- Duverger, O. & Morasso, M.I.** (2009): Epidermal patterning and induction of different hair types during mouse embryonic development. *Birth Defect Res C* **87**(3): 263-272.
- Eaton, S., Auvinen, P., Luo, L., Jan, Y.N. & Simons, K.** (1995): CDC42 and Rac1 control different actin-dependent processes in the Drosophila wing disc epithelium. *J Cell Biol* **131**(1): 151-164.
- Eichmüller, S., van der Veen, C., Moll, I., Hermes, B., Hofmann, U., Muller-Rover, S. & Paus, R.** (1998): Clusters of perifollicular macrophages in normal murine skin: physiological degeneration of selected hair follicles by programmed organ deletion. *J Histochem Cytochem* **46**(3): 361-370.
- Ellis, T.** (2001): The transcriptional repressor CDP (Cutl1) is essential for epithelial cell differentiation of the lung and the hair follicle. *Genes & Development* **15**(17): 2307-2319.
- Etienne-Manneville, S. & Hall, A.** (2002): Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**(6916): 629-635.
- Ezhkova, E., Pasolli, H.A., Parker, J.S., Stokes, N., Su, I.H., Hannon, G., Tarakhovskiy, A. & Fuchs, E.** (2009): Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells. *Cell* **136**(6): 1122-1135.
- Farber, J.L.** (1994): Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environ Health Perspect* **102 Suppl 10**: 17-24.
- Fiegen, D., Haeusler, L.C., Blumenstein, L., Herbrand, U., Dvorsky, R., Vetter, I.R. & Ahmadian, M.R.** (2004): Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase. *J Biol Chem* **279**(6): 4743-4749.
- Fuchs, E.** (2007): Scratching the surface of skin development. *Nature* **445**(7130): 834-842.
- Fuchs, E. & Green, H.** (1980): Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* **19**(4): 1033-1042.
- Fuchs, E. & Raghavan, S.** (2002): Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet* **3**(3): 199-209.
- Fuchs, E. & Weber, K.** (1994): Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* **63**: 345-382.
- Fukata, M., Kuroda, S., Nakagawa, M., Kawajiri, A., Itoh, N., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S., Fujisawa, H., Kikuchi, A. & Kaibuchi, K.** (1999): Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin. *J Biol Chem* **274**(37): 26044-26050.

- Gautreau, A., Ho, H.Y., Li, J., Steen, H., Gygi, S.P. & Kirschner, M.W.** (2004): Purification and architecture of the ubiquitous Wave complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(13): 4379-4383.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A.** (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* **119**(3): 493-501.
- Gebhardt, A., Frye, M., Herold, S., Benitah, S.A., Braun, K., Samans, B., Watt, F.M., Elsasser, H.P. & Eilers, M.** (2006): Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1. *J Cell Biol* **172**(1): 139-149.
- Gebhardt, A., Kosan, C., Herkert, B., Moroy, T., Lutz, W., Eilers, M. & Elsasser, H.P.** (2007): Miz1 is required for hair follicle structure and hair morphogenesis. *J Cell Sci* **120**(Pt 15): 2586-2593.
- Giannoni, E., Buricchi, F., Grimaldi, G., Parri, M., Cialdai, F., Taddei, M.L., Raugei, G., Ramponi, G. & Chiarugi, P.** (2008): Redox regulation of anoikis: reactive oxygen species as essential mediators of cell survival. *Cell Death Differ* **15**(5): 867-878.
- Gibson, M.C. & Perrimon, N.** (2003): Apicobasal polarization: epithelial form and function. *Curr Opin Cell Biol* **15**(6): 747-752.
- Glogauer, M., Marchal, C.C., Zhu, F., Worku, A., Clausen, B.E., Foerster, I., Marks, P., Downey, G.P., Dinauer, M. & Kwiatkowski, D.J.** (2003): Rac1 deletion in mouse neutrophils has selective effects on neutrophil functions. *J Immunol* **170**(11): 5652-5657.
- Glomset, J.A. & Farnsworth, C.C.** (1994): Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu Rev Cell Biol* **10**: 181-205.
- Godwin, A.R. & Capecchi, M.R.** (1998): Hoxc13 mutant mice lack external hair. *Genes Dev* **12**(1): 11-20.
- Grasl-Kraupp, B., Ruttkay-Nedecky, B., Koudelka, H., Bukowska, K., Bursch, W. & Schulte-Hermann, R.** (1995): In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* **21**(5): 1465-1468.
- Gritli-Linde, A., Hallberg, K., Harfe, B.D., Reyahi, A., Kannius-Janson, M., Nilsson, J., Cobourne, M.T., Sharpe, P.T., McMahon, A.P. & Linde, A.** (2007): Abnormal hair development and apparent follicular transformation to mammary gland in the absence of hedgehog signaling. *Dev Cell* **12**(1): 99-112.
- Grose, R., Fantl, V., Werner, S., Chioni, A.-M., Jarosz, M., Rudling, R., Cross, B., Hart, I.R. & Dickson, C.** (2007): The role of fibroblast growth factor receptor 2b in skin homeostasis and cancer development. *EMBO J* **26**(5): 1268-1278.
- Guo, F., Debidda, M., Yang, L., Williams, D.A. & Zheng, Y.** (2006): Genetic deletion of Rac1 GTPase reveals its critical role in actin stress fiber formation and focal adhesion complex assembly. *J Biol Chem* **281**(27): 18652-18659.
- Haase, I., Evans, R., Pofahl, R. & Watt, F.M.** (2003): Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways. *J Cell Sci* **116**(Pt 15): 3227-3238.

- Haataja, L., Groffen, J. & Heisterkamp, N.** (1997): Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J Biol Chem* **272**(33): 20384-20388.
- Hammerschmidt, B. & Schlake, T.** (2007): Localization of Shh expression by Wnt and Eda affects axial polarity and shape of hairs. *Developmental Biology* **305**(1): 246-261.
- Han, R., Baden, H.P., Brissette, J.L. & Weiner, L.** (2002): Redefining the skin's pigimentary system with a novel tyrosinase assay. *Pigment Cell Res* **15**(4): 290-297.
- Hardy, M.H.** (1992): The secret life of the hair follicle. *Trends Genet* **8**(2): 55-61.
- Has, C., Herz, C., Zimina, E., Qu, H.-Y., He, Y., Zhang, Z.-G., Wen, T.-T., Gache, Y., Aumailley, M. & Bruckner-Tuderman, L.** (2009): Kindlin-1 Is Required for RhoGTPase-Mediated Lamellipodia Formation in Keratinocytes. *American Journal Of Pathology* **175**(4): 1442-1452.
- He, X., Liu, J., Qi, Y., Brakebusch, C., Chrostek-Grashoff, A., Edgar, D., Yurchenco, P.D., Corbett, S.A., Lowry, S.F., Graham, A.M., Han, Y. & Li, S.** (2010): Rac1 is essential for basement membrane-dependent epiblast survival. *Mol Cell Biol*: 1-44.
- Heasman, S.J. & Ridley, A.J.** (2008): Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(9): 690-701.
- Hedrych-Ozimina, A., Behrendt, K., Hao, Z., Pofahl, R., Ussath, D., Knaup, R., Krieg, T. & Haase, I.** (2010): Enhanced contact allergen- and UVB-induced keratinocyte apoptosis in the absence of CD95/Fas/Apo-1. *Cell Death Differ*.
- Hirobe, T.** (1984): Histochemical survey of the distribution of the epidermal melanoblasts and melanocytes in the mouse during fetal and postnatal periods. *Anat Rec* **208**(4): 589-594.
- Hirobe, T.** (1992): Control of melanocyte proliferation and differentiation in the mouse epidermis. *Pigment Cell Res* **5**(1): 1-11.
- Hirobe, T.** (1995): Structure and function of melanocytes: microscopic morphology and cell biology of mouse melanocytes in the epidermis and hair follicle. *Histol Histopathol* **10**(1): 223-237.
- Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D. & Korsmeyer, S.J.** (1990): Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**(6299): 334-336.
- Hong, H.K., Noveroske, J.K., Headon, D.J., Liu, T., Sy, M.S., Justice, M.J. & Chakravarti, A.** (2001): The winged helix/forkhead transcription factor Foxq1 regulates differentiation of hair in satin mice. *Genesis* **29**(4): 163-171.
- Hordijk, P.L., ten Klooster, J.P., van der Kammen, R.A., Michiels, F., Oomen, L.C. & Collard, J.G.** (1997): Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science* **278**(5342): 1464-1466.
- Hotchin, N.A. & Hall, A.** (1995): The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J Cell Biol* **131**(6 Pt 2): 1857-1865.
- Huang, T.Y., DerMardirossian, C. & Bokoch, G.M.** (2006): Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. *Curr Opin Cell Biol* **18**(1): 26-31.

- Innocenti, M., Zucconi, A., Disanza, A., Frittoli, E., Areces, L.B., Steffen, A., Stradal, T.E., Di Fiore, P.P., Carlier, M.F. & Scita, G.** (2004): Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat Cell Biol* **6**(4): 319-327.
- Ito, S.** (1993): High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of eu- and pheomelanin in melanogenesis control. *J Invest Dermatol* **100**(2 Suppl): 166S-171S.
- Ito, T., Ito, N., Bettermann, A., Tokura, Y., Takigawa, M. & Paus, R.** (2004): Collapse and restoration of MHC class-I-dependent immune privilege: exploiting the human hair follicle as a model. *Am J Pathol* **164**(2): 623-634.
- Ivanov, V.N., Krasilnikov, M. & Ronai, Z.** (2002): Regulation of Fas expression by STAT3 and c-Jun is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling. *J Biol Chem* **277**(7): 4932-4944.
- Jaffe, A.B. & Hall, A.** (2005): Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 247-269.
- Jensen, K.B., Driskell, R.R. & Watt, F.M.** (2010): Assaying proliferation and differentiation capacity of stem cells using disaggregated adult mouse epidermis. *Nat Protoc* **5**(5): 898-911.
- Johns, S.A., Soullier, S., Rashbass, P. & Cunliffe, V.T.** (2005): Foxn1 is required for tissue assembly and desmosomal cadherin expression in the hair shaft. *Dev Dyn* **232**(4): 1062-1068.
- Jones, P.H. & Watt, F.M.** (1993): Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* **73**(4): 713-724.
- Jordan, P., Brazao, R., Boavida, M.G., Gespach, C. & Chastre, E.** (1999): Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene* **18**(48): 6835-6839.
- Jordan, S.A. & Jackson, I.J.** (2000): MGF (KIT ligand) is a chemokine factor for melanoblast migration into hair follicles. *Dev Biol* **225**(2): 424-436.
- Jou, T.S., Schneeberger, E.E. & Nelson, W.J.** (1998): Structural and functional regulation of tight junctions by RhoA and Rac1 small GTPases. *J Cell Biol* **142**(1): 101-115.
- Junqueira, L.C.U. & Carneiro, J.** (2005): Histologie. *Springer Medizin Verlag, Heidelberg*.
- Kaibuchi, K., Kuroda, S. & Amano, M.** (1999): Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* **68**: 459-486.
- Kato, G.J. & Dang, C.V.** (1992): Function of the c-Myc oncoprotein. *FASEB J* **6**(12): 3065-3072.
- Kaufman, C.K., Zhou, P., Pasolli, H.A., Rendl, M., Bolotin, D., Lim, K.C., Dai, X., Alegre, M.L. & Fuchs, E.** (2003): GATA-3: an unexpected regulator of cell lineage determination in skin. *Genes Dev* **17**(17): 2108-2122.
- Kibitel, J., Hejmadi, V., Alas, L., O'Connor, A., Sutherland, B.M. & Yarosh, D.** (1998): UV-DNA damage in mouse and human cells induces the expression of tumor necrosis factor alpha. *Photochem Photobiol* **67**(5): 541-546.
- Kjoller, L. & Hall, A.** (1999): Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res* **253**(1): 166-179.

- Kljuic, A., Bazzi, H., Sundberg, J.P., Martinez-Mir, A., O'Shaughnessy, R., Mahoney, M.G., Levy, M., Montagutelli, X., Ahmad, W., Aita, V.M., Gordon, D., Uitto, J., Whiting, D., Ott, J., Fischer, S., Gilliam, T.C., Jahoda, C.A., Morris, R.J., Panteleyev, A.A., Nguyen, V.T. & Christiano, A.M.** (2003): Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell* **113**(2): 249-260.
- Kobiela, K., Pasolli, H.A., Alonso, L., Polak, L. & Fuchs, E.** (2003): Defining BMP functions in the hair follicle by conditional ablation of BMP receptor IA. *J Cell Biol* **163**(3): 609-623.
- Kopan, R., Lee, J., Lin, M.H., Syder, A.J., Kesterson, J., Crutchfield, N., Li, C.R., Wu, W., Books, J. & Gordon, J.I.** (2002): Genetic mosaic analysis indicates that the bulb region of coat hair follicles contains a resident population of several active multipotent epithelial lineage progenitors. *Dev Biol* **242**(1): 44-57.
- Kopf-Maier, P., Mboneko, V.F. & Merker, H.J.** (1990): Nude mice are not hairless. A morphological study. *Acta Anat (Basel)* **139**(2): 178-190.
- Kowalczyk, A.P., Bornslaeger, E.A., Borgwardt, J.E., Palka, H.L., Dhaliwal, A.S., Corcoran, C.M., Denning, M.F. & Green, K.J.** (1997): The amino-terminal domain of desmoplakin binds to plakoglobin and clusters desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. *J Cell Biol* **139**(3): 773-784.
- Kraynov, V.S., Chamberlain, C., Bokoch, G.M., Schwartz, M.A., Slabaugh, S. & Hahn, K.M.** (2000): Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science* **290**(5490): 333-337.
- Kulms, D., Zeise, E., Poppelmann, B. & Schwarz, T.** (2002): DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way. *Oncogene* **21**(38): 5844-5851.
- Kunisada, T., Yoshida, H., Yamazaki, H., Miyamoto, A., Hemmi, H., Nishimura, E., Shultz, L.D., Nishikawa, S. & Hayashi, S.** (1998): Transgene expression of steel factor in the basal layer of epidermis promotes survival, proliferation, differentiation and migration of melanocyte precursors. *Development* **125**(15): 2915-2923.
- Labat-Moleur, F., Guillermet, C., Lorimier, P., Robert, C., Lantuejoul, S., Brambilla, E. & Negoescu, A.** (1998): TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem* **46**(3): 327-334.
- Lai-Cheong, J.E. & McGrath, J.A.** (2010): Kindler syndrome. *Dermatol Clin* **28**(1): 119-124.
- Lai-Cheong, J.E., Tanaka, A., Hawche, G., Emanuel, P., Maari, C., Taskesen, M., Akdeniz, S., Liu, L. & McGrath, J.A.** (2009): Kindler syndrome: a focal adhesion genodermatosis. *Br J Dermatol* **160**(2): 233-242.
- Laidlaw, G.F. & Blackberg, S.N.** (1932): Melanoma Studies: II. A Simple Technique for the Dopa Reaction. *Am J Pathol* **8**(5): 491-498.
- Lamarche, N. & Hall, A.** (1994): GAPs for rho-related GTPases. *Trends Genet* **10**(12): 436-440.

- Land, E.J. & Riley, P.A.** (2000): Spontaneous redox reactions of dopaquinone and the balance between the eumelanic and pheomelanic pathways. *Pigment Cell Res* **13**(4): 273-277.
- Langbein, L., Rogers, M.A., Praetzel, S., Winter, H. & Schweizer, J.** (2003): K6irs1, K6irs2, K6irs3, and K6irs4 represent the inner-root-sheath-specific type II epithelial keratins of the human hair follicle. *J Invest Dermatol* **120**(4): 512-522.
- Langbein, L., Rogers, M.A., Winter, H., Praetzel, S., Beckhaus, U., Rackwitz, H.R. & Schweizer, J.** (1999): The catalog of human hair keratins. I. Expression of the nine type I members in the hair follicle. *J Biol Chem* **274**(28): 19874-19884.
- Langbein, L., Rogers, M.A., Winter, H., Praetzel, S. & Schweizer, J.** (2001): The catalog of human hair keratins. II. Expression of the six type II members in the hair follicle and the combined catalog of human type I and II keratins. *J Biol Chem* **276**(37): 35123-35132.
- Langton, A.K., Herrick, S.E. & Headon, D.J.** (2008): An extended epidermal response heals cutaneous wounds in the absence of a hair follicle stem cell contribution. *J Invest Dermatol* **128**(5): 1311-1318.
- Lauber, K., Blumenthal, S.G., Waibel, M. & Wesselborg, S.** (2004): Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* **14**(3): 277-287.
- Lechler, T. & Fuchs, E.** (2005): Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* **437**(7056): 275-280.
- Lee, D., Prowse, D.M. & Brissette, J.L.** (1999): Association between mouse nude gene expression and the initiation of epithelial terminal differentiation. *Dev Biol* **208**(2): 362-374.
- Lee, S.B., Bae, I.H., Bae, Y.S. & Um, H.D.** (2006): Link between mitochondria and NADPH oxidase 1 isozyme for the sustained production of reactive oxygen species and cell death. *J Biol Chem* **281**(47): 36228-36235.
- Legue, E. & Nicolas, J.F.** (2005): Hair follicle renewal: organization of stem cells in the matrix and the role of stereotyped lineages and behaviors. *Development* **132**(18): 4143-4154.
- Leverkus, M., Yaar, M. & Gilchrist, B.A.** (1997): Fas/Fas ligand interaction contributes to UV-induced apoptosis in human keratinocytes. *Exp Cell Res* **232**(2): 255-262.
- Lin, M.H., Leimeister, C., Gessler, M. & Kopan, R.** (2000): Activation of the Notch pathway in the hair cortex leads to aberrant differentiation of the adjacent hair-shaft layers. *Development* **127**(11): 2421-2432.
- Lindner, G., Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Ling, G., van der Veen, C. & Paus, R.** (1997): Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol* **151**(6): 1601-1617.
- Lindqvist, M., Horn, Z., Bryja, V., Schulte, G., Papachristou, P., Ajima, R., Dyberg, C., Arenas, E., Yamaguchi, T.P., Lagercrantz, H. & Ringstedt, T.** (2010): Vang-like protein 2 and Rac1 interact to regulate adherens junctions. *Journal of Cell Science* **123**(3): 472-483.
- Lippens, S., Hoste, E., Vandenabeele, P., Agostinis, P. & Declercq, W.** (2009): Cell death in the skin. *Apoptosis* **14**(4): 549-569.

- Liu, Y., Lyle, S., Yang, Z. & Cotsarelis, G.** (2003): Keratin 15 promoter targets putative epithelial stem cells in the hair follicle bulge. *J Invest Dermatol* **121**(5): 963-968.
- Lu, Y., Pan, Z.Z., Devaux, Y. & Ray, P.** (2003): p21-activated protein kinase 4 (PAK4) interacts with the keratinocyte growth factor receptor and participates in keratinocyte growth factor-mediated inhibition of oxidant-induced cell death. *J Biol Chem* **278**(12): 10374-10380.
- Luo, L.** (2000): Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* **1**(3): 173-180.
- Lyle, S., Christofidou-Solomidou, M., Liu, Y., Elder, D.E., Albelda, S. & Cotsarelis, G.** (1998): The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. *J Cell Sci* **111** (Pt 21): 3179-3188.
- Lyle, S., Christofidou-Solomidou, M., Liu, Y., Elder, D.E., Albelda, S. & Cotsarelis, G.** (1999): Human hair follicle bulge cells are biochemically distinct and possess an epithelial stem cell phenotype. *J Invest Dermatol Symp Proc* **4**(3): 296-301.
- Ma, L., Liu, J., Wu, T., Plikus, M., Jiang, T.X., Bi, Q., Liu, Y.H., Muller-Rover, S., Peters, H., Sundberg, J.P., Maxson, R., Maas, R.L. & Chuong, C.M.** (2003): 'Cyclic alopecia' in Msx2 mutants: defects in hair cycling and hair shaft differentiation. *Development* **130**(2): 379-389.
- Mackenzie, I.C.** (1997): Retroviral transduction of murine epidermal stem cells demonstrates clonal units of epidermal structure. *J Invest Dermatol* **109**(3): 377-383.
- Mackenzie, M.A., Jordan, S.A., Budd, P.S. & Jackson, I.J.** (1997): Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. *Dev Biol* **192**(1): 99-107.
- Magerl, M., Tobin, D.J., Muller-Rover, S., Hagen, E., Lindner, G., McKay, I.A. & Paus, R.** (2001): Patterns of proliferation and apoptosis during murine hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol* **116**(6): 947-955.
- Malliri, A., van der Kammen, R.A., Clark, K., van der Valk, M., Michiels, F. & Collard, J.G.** (2002): Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature* **417**(6891): 867-871.
- Malliri, A., van Es, S., Huveneers, S. & Collard, J.G.** (2004): The Rac exchange factor Tiam1 is required for the establishment and maintenance of cadherin-based adhesions. *J Biol Chem* **279**(29): 30092-30098.
- Matos, P., Collard, J.G. & Jordan, P.** (2003): Tumor-related alternatively spliced Rac1b is not regulated by Rho-GDP dissociation inhibitors and exhibits selective downstream signaling. *J Biol Chem* **278**(50): 50442-50448.
- Matos, P. & Jordan, P.** (2005): Expression of Rac1b stimulates NF-kappaB-mediated cell survival and G1/S progression. *Exp Cell Res* **305**(2): 292-299.
- Matsunaga, T., Hieda, K. & Nikaido, O.** (1991): Wavelength dependent formation of thymine dimers and (6-4) photoproducts in DNA by monochromatic ultraviolet light ranging from 150 to 365 nm. *Photochem Photobiol* **54**(3): 403-410.
- Maurer, M., Paus, R. & Czarnetzki, B.M.** (1995): Mast cells as modulators of hair follicle cycling. *Exp Dermatol* **4**(4 Pt 2): 266-271.

- Mayer, T.C.** (1973): The migratory pathway of neural crest cells into the skin of mouse embryos. *Dev Biol* **34**(1): 39-46.
- Mazurkiewicz, J.E., Corliss, D. & Slominski, A.** (2000): Spatiotemporal expression, distribution, and processing of POMC and POMC-derived peptides in murine skin. *J Histochem Cytochem* **48**(7): 905-914.
- McGowan, K.M. & Coulombe, P.A.** (2000): Keratin 17 expression in the hard epithelial context of the hair and nail, and its relevance for the pachyonychia congenita phenotype. *J Invest Dermatol* **114**(6): 1101-1107.
- McGowan, K.M., Tong, X., Colucci-Guyon, E., Langa, F., Babinet, C. & Coulombe, P.A.** (2002): Keratin 17 null mice exhibit age- and strain-dependent alopecia. *Genes Dev* **16**(11): 1412-1422.
- Mecklenburg, L.** (2001): The Nude Mouse Skin Phenotype: The Role of Foxn1 in Hair Follicle Development and Cycling. *Experimental and Molecular Pathology* **71**(2): 171-178.
- Mecklenburg, L., Tychsen, B. & Paus, R.** (2005): Learning from nudity: lessons from the nude phenotype. *Exp Dermatol* **14**(11): 797-810.
- Mertens, A.E., Rygiel, T.P., Olivo, C., van der Kammen, R. & Collard, J.G.** (2005): The Rac activator Tiam1 controls tight junction biogenesis in keratinocytes through binding to and activation of the Par polarity complex. *J Cell Biol* **170**(7): 1029-1037.
- Mertens, A.E.E., Pegtel, D.M. & Collard, J.G.** (2006): Tiam1 takes PARt in cell polarity. *Trends Cell Biol* **16**(6): 308-316.
- Miki, H., Suetsugu, S. & Takenawa, T.** (1998): WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J* **17**(23): 6932-6941.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.X., Abo, A. & Karin, M.** (1995): Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**(7): 1147-1157.
- Ming Kwan, K., Li, A.G., Wang, X.J., Wurst, W. & Behringer, R.R.** (2004): Essential roles of BMPR-IA signaling in differentiation and growth of hair follicles and in skin tumorigenesis. *Genesis* **39**(1): 10-25.
- Miyano, K., Ueno, N., Takeya, R. & Sumimoto, H.** (2006): Direct involvement of the small GTPase Rac in activation of the superoxide-producing NADPH oxidase Nox1. *J Biol Chem* **281**(31): 21857-21868.
- Moll, R., Divo, M. & Langbein, L.** (2008): The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* **129**(6): 705-733.
- Moon, S.Y. & Zheng, Y.** (2003): Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* **13**(1): 13-22.
- Morioka, K.** (2005): Hair follicle differentiation under electron microscope: an atlas. *Springer, Tokyo; New York.*
- Morioka, K.** (2009): A guide to hair follicle analysis by transmission electron microscopy: technique and practice. *Exp Dermatol* **18**(7): 577-582.

- Morris, R.J. & Potten, C.S.** (1994): Slowly cycling (label-retaining) epidermal cells behave like clonogenic stem cells in vitro. *Cell Prolif* **27**(5): 279-289.
- Moser, J., Volker, M., Kool, H., Alekseev, S., Vrieling, H., Yasui, A., van Zeeland, A.A. & Mullenders, L.H.** (2005): The UV-damaged DNA binding protein mediates efficient targeting of the nucleotide excision repair complex to UV-induced photo lesions. *DNA Repair (Amst)* **4**(5): 571-582.
- Müller-Röver, S., Handjiski, B., van der Veen, C., Eichmüller, S., Foitzik, K., McKay, I.A., Stenn, K.S. & Paus, R.** (2001): A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol* **117**(1): 3-15.
- Munoz-Descalzo, S., Gomez-Cabrero, A., Mlodzik, M. & Paricio, N.** (2007): Analysis of the role of the Rac/Cdc42 GTPases during planar cell polarity generation in *Drosophila*. *Int J Dev Biol* **51**(5): 379-387.
- Murphy, G., Young, A.R., Wulf, H.C., Kulms, D. & Schwarz, T.** (2001): The molecular determinants of sunburn cell formation. *Exp Dermatol* **10**(3): 155-160.
- Nakagawa, M., Fukata, M., Yamaga, M., Itoh, N. & Kaibuchi, K.** (2001): Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *J Cell Sci* **114**(Pt 10): 1829-1838.
- Narhi, K., Jarvinen, E., Birchmeier, W., Taketo, M.M., Mikkola, M.L. & Thesleff, I.** (2008): Sustained epithelial beta-catenin activity induces precocious hair development but disrupts hair follicle down-growth and hair shaft formation. *Development* **135**(6): 1019-1028.
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A. & et al.** (1995): Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**(6535): 37-43.
- Nishimura, E.K., Granter, S.R. & Fisher, D.E.** (2005): Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* **307**(5710): 720-724.
- Nishimura, E.K., Jordan, S.A., Oshima, H., Yoshida, H., Osawa, M., Moriyama, M., Jackson, I.J., Barrandon, Y., Miyachi, Y. & Nishikawa, S.-I.** (2002): Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* **416**(6883): 854-860.
- Nishimura, E.K., Yoshida, H., Kunisada, T. & Nishikawa, S.I.** (1999): Regulation of E- and P-cadherin expression correlated with melanocyte migration and diversification. *Developmental Biology* **215**(2): 155-166.
- Nobes, C.D. & Hall, A.** (1995a): Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* **23**(3): 456-459.
- Nobes, C.D. & Hall, A.** (1995b): Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**(1): 53-62.
- Noren, N.K., Niessen, C.M., Gumbiner, B.M. & Burrridge, K.** (2001): Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. *J Biol Chem* **276**(36): 33305-33308.
- O'Brien, L.E., Jou, T.S., Pollack, A.L., Zhang, Q., Hansen, S.H., Yurchenco, P. & Mostov, K.E.** (2001): Rac1 orientates epithelial apical polarity through effects on basolateral laminin assembly. *Nat Cell Biol* **3**(9): 831-838.

- Olofsson, B.** (1999): Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* **11**(8): 545-554.
- Olson, M.F., Ashworth, A. & Hall, A.** (1995): An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* **269**(5228): 1270-1272.
- Osawa, M., Egawa, G., Mak, S.S., Moriyama, M., Freter, R., Yonetani, S., Beermann, F. & Nishikawa, S.** (2005): Molecular characterization of melanocyte stem cells in their niche. *Development* **132**(24): 5589-5599.
- Oshima, H., Rochat, A., Kedzia, C., Kobayashi, K. & Barrandon, Y.** (2001): Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* **104**(2): 233-245.
- Ozdinler, P.H. & Erzurumlu, R.S.** (2001): Regulation of neurotrophin-induced axonal responses via Rho GTPases. *J Comp Neurol* **438**(4): 377-387.
- Pan, Y., Lin, M.H., Tian, X., Cheng, H.T., Gridley, T., Shen, J. & Kopan, R.** (2004): gamma-secretase functions through Notch signaling to maintain skin appendages but is not required for their patterning or initial morphogenesis. *Dev Cell* **7**(5): 731-743.
- Panteleyev, A.A., Jahoda, C.A. & Christiano, A.M.** (2001): Hair follicle predetermination. *J Cell Sci* **114**(Pt 19): 3419-3431.
- Patel, V., Rosenfeldt, H.M., Lyons, R., Servitja, J.M., Bustelo, X.R., Siroff, M. & Gutkind, J.S.** (2007): Persistent activation of Rac1 in squamous carcinomas of the head and neck: evidence for an EGFR/Vav2 signaling axis involved in cell invasion. *Carcinogenesis* **28**(6): 1145-1152.
- Paus, R., Eichmuller, S., Hofmann, U., Czarnetzki, B.M. & Robinson, P.** (1994): Expression of classical and non-classical MHC class I antigens in murine hair follicles. *Br J Dermatol* **131**(2): 177-183.
- Paus, R., Ito, N., Takigawa, M. & Ito, T.** (2003): The hair follicle and immune privilege. *J Invest Dermatol Symp Proc* **8**(2): 188-194.
- Paus, R., Müller-Röver, S., Van Der Veen, C., Maurer, M., Eichmüller, S., Ling, G., Hofmann, U., Foitzik, K., Mecklenburg, L. & Handjiski, B.** (1999): A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol* **113**(4): 523-532.
- Paus, R., van der Veen, C., Eichmuller, S., Kopp, T., Hagen, E., Muller-Rover, S. & Hofmann, U.** (1998): Generation and cyclic remodeling of the hair follicle immune system in mice. *J Invest Dermatol* **111**(1): 7-18.
- Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sanchez-Perez, I., Bravo, R. & Lacal, J.C.** (1997): Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev* **11**(4): 463-475.
- Petermann, P., Haase, I. & Knebel-Morsdorf, D.** (2009): Impact of Rac1 and Cdc42 Signaling during Early Herpes Simplex Virus Type 1 Infection of Keratinocytes. *Journal of Virology* **83**(19): 9759-9772.

- Peters, E.M.J., Tobin, D.J., Botchkareva, N., Maurer, M. & Paus, R.** (2002): Migration of melanoblasts into the developing murine hair follicle is accompanied by transient c-Kit expression. *J Histochem Cytochem* **50**(6): 751-766.
- Petiot, A., Conti, F.J.A., Grose, R., Revest, J.-M., Hodivala-Dilke, K.M. & Dickson, C.** (2003): A crucial role for Fgfr2-IIIb signalling in epidermal development and hair follicle patterning. *Development* **130**(22): 5493-5501.
- Peus, D., Vasa, R.A., Beyerle, A., Meves, A., Krautmacher, C. & Pittelkow, M.R.** (1999): UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* **112**(5): 751-756.
- Potten, C.S.** (1974): The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell. *Cell Tissue Kinet* **7**(1): 77-88.
- Potten, C.S.** (1981): Cell replacement in epidermis (keratopoiesis) via discrete units of proliferation. *Int Rev Cytol* **69**: 271-318.
- Potten, C.S. & Booth, C.** (2002): Keratinocyte stem cells: a commentary. *J Invest Dermatol* **119**(4): 888-899.
- Potten, C.S. & Morris, R.J.** (1988): Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci Suppl* **10**: 45-62.
- Potter, C.S., Peterson, R.L., Barth, J.L., Pruett, N.D., Jacobs, D.F., Kern, M.J., Argraves, W.S., Sundberg, J.P. & Awgulewitsch, A.** (2006): Evidence that the satin hair mutant gene Foxq1 is among multiple and functionally diverse regulatory targets for Hoxc13 during hair follicle differentiation. *J Biol Chem* **281**(39): 29245-29255.
- Price, L.S., Leng, J., Schwartz, M.A. & Bokoch, G.M.** (1998): Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol Biol Cell* **9**(7): 1863-1871.
- Qin, J.Z., Bacon, P., Panella, J., Sitailo, L.A., Denning, M.F. & Nickoloff, B.J.** (2004): Low-dose UV-radiation sensitizes keratinocytes to TRAIL-induced apoptosis. *J Cell Physiol* **200**(1): 155-166.
- Ramirez, A., Page, A., Gandarillas, A., Zanet, J., Pibre, S., Vidal, M., Tusell, L., Genesca, A., Whitaker, D.A., Melton, D.W. & Jorcano, J.L.** (2004): A keratin K5Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized Cre-mediated recombination. *Genesis* **39**(1): 52-57.
- Raveh, E., Cohen, S., Levanon, D., Groner, Y. & Gat, U.** (2005): Runx3 is involved in hair shape determination. *Dev Dyn* **233**(4): 1478-1487.
- Raveh, E., Cohen, S., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y. & Gat, U.** (2006): Dynamic expression of Runx1 in skin affects hair structure. *Mech Dev* **123**(11): 842-850.
- Rawles, M.E.** (1947): Origin of pigment cells from the neural crest in the mouse embryo. *Physiol Zool* **20**(3): 248-266.
- Rendl, M., Lewis, L. & Fuchs, E.** (2005): Molecular dissection of mesenchymal-epithelial interactions in the hair follicle. *PLoS Biol* **3**(11): e331.
- Reynolds, J.** (1954): The epidermal melanocytes of mice. *J Anat* **88**(1): 45-58.

- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. & Hall, A.** (1992): The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**(3): 401-410.
- Rochat, A., Kobayashi, K. & Barrandon, Y.** (1994): Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell* **76**(6): 1063-1073.
- Rogers, M.A., Langbein, L., Praetzel, S., Moll, I., Krieg, T., Winter, H. & Schweizer, J.** (1997): Sequences and differential expression of three novel human type-II hair keratins. *Differentiation* **61**(3): 187-194.
- Rosenblum, M.D., Olasz, E.B., Yancey, K.B., Woodliff, J.E., Lazarova, Z., Gerber, K.A. & Truitt, R.L.** (2004): Expression of CD200 on epithelial cells of the murine hair follicle: a role in tissue-specific immune tolerance? *J Invest Dermatol* **123**(5): 880-887.
- Roth, S.I. & Helwig, E.B.** (1964): The Cytology of the Cuticle of the Cortex, the Cortex, and the Medulla of the Mouse Hair. *J Ultrastruct Res* **11**: 52-67.
- Rygiel, T.P., Mertens, A.E., Strumane, K., Van Der Kammen, R. & Collard, J.G.** (2008): The Rac activator Tiam1 prevents keratinocyte apoptosis by controlling ROS-mediated ERK phosphorylation. *Journal of Cell Science* **121**(8): 1183-1192.
- Sander, E.E., ten Klooster, J.P., van Delft, S., van der Kammen, R.A. & Collard, J.G.** (1999): Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* **147**(5): 1009-1022.
- Schaper, I.D., Marcuzzi, G.P., Weissenborn, S.J., Kasper, H.U., Dries, V., Smyth, N., Fuchs, P. & Pfister, H.** (2005): Development of skin tumors in mice transgenic for early genes of human papillomavirus type 8. *Cancer Res* **65**(4): 1394-1400.
- Schlake, T.** (2005a): FGF signals specifically regulate the structure of hair shaft medulla via IGF-binding protein 5. *Development* **132**(13): 2981-2990.
- Schlake, T.** (2005b): Segmental Igfbp5 expression is specifically associated with the bent structure of zigzag hairs. *Mechanisms of Development* **122**(9): 988-997.
- Schlake, T.** (2006): Krox20, a novel candidate for the regulatory hierarchy that controls hair shaft bending. *Mechanisms of Development* **123**(8): 641-648.
- Schlake, T., Schorpp, M., Maul-Pavicic, A., Malashenko, A.M. & Boehm, T.** (2000): Forkhead/winged-helix transcription factor Whn regulates hair keratin gene expression: molecular analysis of the nude skin phenotype. *Dev Dyn* **217**(4): 368-376.
- Schnelzer, A., Prechtel, D., Knaus, U., Dehne, K., Gerhard, M., Graeff, H., Harbeck, N., Schmitt, M. & Lengyel, E.** (2000): Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. *Oncogene* **19**(26): 3013-3020.
- Schurer, N.Y., Plewig, G. & Elias, P.M.** (1991): Stratum corneum lipid function. *Dermatologica* **183**(2): 77-94.
- Schürmann, A., Mooney, A.F., Sanders, L.C., Sells, M.A., Wang, H.G., Reed, J.C. & Bokoch, G.M.** (2000): p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. *Mol Cell Biol* **20**(2): 453-461.

- Schwarz, A., Ständer, S., Berneburg, M., Böhm, M., Kulms, D., Van Steeg, H., Grosse-Heitmeyer, K., Krutmann, J. & Schwarz, T. (2002): Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. *Nat. Cell Biol.* **4**(1): 26-31.
- Shimomura, Y. & Christiano, A.M. (2010): Biology and genetics of hair. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **11**: 109-132.
- Shirsat, N.V., Pignolo, R.J., Kreider, B.L. & Rovera, G. (1990): A member of the ras gene superfamily is expressed specifically in T, B and myeloid hemopoietic cells. *Oncogene* **5**(5): 769-772.
- Silver, A.F. & Chase, H.B. (1970): DNA synthesis in the adult hair germ during dormancy (telogen) and activation (early anagen). *Dev Biol* **21**(3): 440-451.
- Silver, A.F., Chase, H.B. & Potten, C.S. (1969): Melanocyte precursor cells in the hair follicle germ during the dormat stage (telogen). *Experientia* **25**(3): 299-301.
- Singh, A., Karnoub, A.E., Palmby, T.R., Lengyel, E., Sondek, J. & Der, C.J. (2004): Rac1b, a tumor associated, constitutively active Rac1 splice variant, promotes cellular transformation. *Oncogene* **23**(58): 9369-9380.
- Sitailo, L.A., Tibudan, S.S. & Denning, M.F. (2002): Activation of caspase-9 is required for UV-induced apoptosis of human keratinocytes. *J Biol Chem* **277**(22): 19346-19352.
- Sklyarova, T., Bonné, S., D'Hooge, P., Denecker, G., Goossens, S., De Rycke, R., Borgonie, G., Bösl, M., van Roy, F. & van Hengel, J. (2008): Plakophilin-3-deficient mice develop hair coat abnormalities and are prone to cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* **128**(6): 1375-1385.
- Slominski, A., Botchkareva, N.V., Botchkarev, V.A., Chakraborty, A., Luger, T., Uenalan, M. & Paus, R. (1998): Hair cycle-dependent production of ACTH in mouse skin. *Biochim Biophys Acta* **1448**(1): 147-152.
- Slominski, A. & 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**(1 Suppl): 90S-97S.
- Slominski, A., Paus, R. & Costantino, R. (1991): Differential expression and activity of melanogenesis-related proteins during induced hair growth in mice. *J Invest Dermatol* **96**(2): 172-179.
- Slominski, A., Wortsman, J., Plonka, P.M., Schallreuter, K.U., Paus, R. & Tobin, D.J. (2005): Hair follicle pigmentation. *J Invest Dermatol* **124**(1): 13-21.
- Smith, E.A. & Fuchs, E. (1998): Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J Cell Biol* **141**(5): 1229-1241.
- Stachelscheid, H., Ibrahim, H., Koch, L., Schmitz, A., Tschardt, M., Wunderlich, F.T., Scott, J., Michels, C., Wickenhauser, C., Haase, I., Bruning, J.C. & Niessen, C.M. (2008): Epidermal insulin/IGF-1 signalling control interfollicular morphogenesis and proliferative potential through Rac activation. *EMBO J* **27**(15): 2091-2101.
- Steel, K.P., Davidson, D.R. & Jackson, I.J. (1992): TRP-2/DT, a new early melanoblast marker, shows that steel growth factor (c-kit ligand) is a survival factor. *Development* **115**(4): 1111-1119.

- Steffen, A., Rottner, K., Ehinger, J., Innocenti, M., Scita, G., Wehland, J. & Stradal, T.E.** (2004): Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J* **23**(4): 749-759.
- Steinert, P.M. & Liem, R.K.** (1990): Intermediate filament dynamics. *Cell* **60**(4): 521-523.
- Stenn, K.S. & Paus, R.** (1999): What controls hair follicle cycling? *Exp Dermatol* **8**(4): 229-233; discussion 233-226.
- Steven, A.C. & Steinert, P.M.** (1994): Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J Cell Sci* **107** (Pt 2): 693-700.
- Stoker, M., O'Neill, C., Berryman, S. & Waxman, V.** (1968): Anchorage and growth regulation in normal and virus-transformed cells. *Int J Cancer* **3**(5): 683-693.
- Suetsugu, S., Kurisu, S., Oikawa, T., Yamazaki, D., Oda, A. & Takenawa, T.** (2006): Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. *J Cell Biol* **173**(4): 571-585.
- Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A. & Katsuki, M.** (1998): Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* **17**(26): 3427-3433.
- Sun, T.T., Cotsarelis, G. & Lavker, R.M.** (1991): Hair follicular stem cells: the bulge-activation hypothesis. *J Invest Dermatol* **96**(5): 77S-78S.
- Sundberg, J.P.** (1994): Handbook of Mouse Mutations with Skin and Hair Abnormalities: Animal Models and Biomedical Tools. *CRC Prss LLC, New York*.
- Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T.** (2001): Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**(1): 153-208.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H. & Takai, Y.** (1997): Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol* **139**(4): 1047-1059.
- Taylor, G., Lehrer, M.S., Jensen, P.J., Sun, T.T. & Lavker, R.M.** (2000): Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* **102**(4): 451-461.
- Ten Klooster, J.P., Evers, E.E., Janssen, L., Machesky, L.M., Michiels, F., Hordijk, P. & Collard, J.G.** (2006): Interaction between Tiam1 and the Arp2/3 complex links activation of Rac to actin polymerization. *Biochem J* **397**(1): 39-45.
- Timares, L., Katiyar, S.K. & Elmets, C.A.** (2008): DNA damage, apoptosis and langerhans cells--Activators of UV-induced immune tolerance. *Photochem Photobiol* **84**(2): 422-436.
- Tkatchenko, A.V., Visconti, R.P., Shang, L., Papenbrock, T., Pruett, N.D., Ito, T., Ogawa, M. & Awgulewitsch, A.** (2001): Overexpression of Hoxc13 in differentiating keratinocytes results in downregulation of a novel hair keratin gene cluster and alopecia. *Development* **128**(9): 1547-1558.
- Tobin, D.J., Hagen, E., Botchkarev, V.A. & Paus, R.** (1998): Do hair bulb melanocytes undergo apoptosis during hair follicle regression (catagen)? *J Invest Dermatol* **111**(6): 941-947.

- Trempeus, C.S., Morris, R.J., Bortner, C.D., Cotsarelis, G., Faircloth, R.S., Reece, J.M. & Tennant, R.W.** (2003): Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *J Invest Dermatol* **120**(4): 501-511.
- Tscharntke, M.** (2006): Funktionale Charakterisierung von Rac1 in der epidermalen Wundheilung in vivo und in vitro: *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät* (Dr. rer. nat.). Universität zu Köln, Köln.
- Tscharntke, M., Pofahl, R., Chrostek-Grashoff, A., Smyth, N., Niessen, C., Niemann, C., Hartwig, B., Herzog, V., Klein, H.W., Krieg, T., Brakebusch, C. & Haase, I.** (2007): Impaired epidermal wound healing in vivo upon inhibition or deletion of Rac1. *Journal of Cell Science* **120**(8): 1480-1490.
- Tscharntke, M., Pofahl, R., Krieg, T. & Haase, I.** (2005): Ras-induced spreading and wound closure in human epidermal keratinocytes. *FASEB J* **19**(13): 1836-1838.
- Tseng, S.C., Jarvinen, M.J., Nelson, W.G., Huang, J.W., Woodcock-Mitchell, J. & Sun, T.T.** (1982): Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: monoclonal antibody studies. *Cell* **30**(2): 361-372.
- Tsuji, H., Ishida-Yamamoto, A., Takahashi, H. & Iizuka, H.** (2001): Nuclear localization of beta-catenin in the hair matrix cells and differentiated keratinocytes. *J Dermatol Sci* **27**(3): 170-177.
- Tumbar, T., Guasch, G., Greco, V., Blanpain, C., Lowry, W.E., Rendl, M. & Fuchs, E.** (2004): Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* **303**(5656): 359-363.
- Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A. & Sander, C.** (1991): The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* **30**(19): 4637-4648.
- Van Aelst, L. & D'Souza-Schorey, C.** (1997): Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* **11**(18): 2295-2322.
- Van Laethem, A., Van Kelst, S., Lippens, S., Declercq, W., Vandenabeele, P., Janssens, S., Vandenheede, J.R., Garmyn, M. & Agostinis, P.** (2004): Activation of p38 MAPK is required for Bax translocation to mitochondria, cytochrome c release and apoptosis induced by UVB irradiation in human keratinocytes. *FASEB J* **18**(15): 1946-1948.
- Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M. & Fuchs, E.** (2000): Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* **100**(2): 209-219.
- Vauclair, S., Nicolas, M., Barrandon, Y. & Radtke, F.** (2005): Notch1 is essential for postnatal hair follicle development and homeostasis. *Developmental Biology* **284**(1): 184-193.
- Vega, F. & Ridley, A.** (2008): Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Letters* **582**(14): 2093-2101.
- Vetter, I.R. & Wittinghofer, A.** (2001): The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**(5545): 1299-1304.
- Vidali, L., Chen, F., Cicchetti, G., Ohta, Y. & Kwiatkowski, D.J.** (2006): Rac1-null mouse embryonic fibroblasts are motile and respond to platelet-derived growth factor. *Mol Biol Cell* **17**(5): 2377-2390.

- Villalonga, P. & Ridley, A.J.** (2006): Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Factors* **24**(3): 159-164.
- Virador, V., Matsunaga, N., Matsunaga, J., Valencia, J., Oldham, R.J., Kameyama, K., Peck, G.L., Ferrans, V.J., Vieira, W.D., Abdel-Malek, Z.A. & Hearing, V.J.** (2001): Production of melanocyte-specific antibodies to human melanosomal proteins: expression patterns in normal human skin and in cutaneous pigmented lesions. *Pigment Cell Res* **14**(4): 289-297.
- Walmsley, M.J., Ooi, S.K., Reynolds, L.F., Smith, S.H., Ruf, S., Mathiot, A., Vanes, L., Williams, D.A., Cancro, M.P. & Tybulewicz, V.L.** (2003): Critical roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B cell development and signaling. *Science* **302**(5644): 459-462.
- Wang, H. & Kochevar, I.E.** (2005): Involvement of UVB-induced reactive oxygen species in TGF-beta biosynthesis and activation in keratinocytes. *Free Radic Biol Med* **38**(7): 890-897.
- Wang, L. & Zheng, Y.** (2007): Cell type-specific functions of Rho GTPases revealed by gene targeting in mice. *Trends Cell Biol* **17**(2): 58-64.
- Wang, Z., Pedersen, E., Basse, A., Lefever, T., Peyrollier, K., Kapoor, S., Mei, Q., Karlsson, R., Chrostek-Grashoff, A. & Brakebusch, C.** (2010): Rac1 is crucial for Ras-dependent skin tumor formation by controlling Pak1-Mek-Erk hyperactivation and hyperproliferation in vivo. *Oncogene*: 1-12.
- Wang, Z., Wong, P., Langbein, L., Schweizer, J. & Coulombe, P.A.** (2003): Type II epithelial keratin 6hf (K6hf) is expressed in the companion layer, matrix, and medulla in anagen-stage hair follicles. *J Invest Dermatol* **121**(6): 1276-1282.
- Waterman-Storer, C.M., Worthylake, R.A., Liu, B.P., Burridge, K. & Salmon, E.D.** (1999): Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat Cell Biol* **1**(1): 45-50.
- Watt, F.M.** (1998): Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353**(1370): 831-837.
- Watt, F.M., Frye, M. & Benitah, S.A.** (2008): MYC in mammalian epidermis: how can an oncogene stimulate differentiation? *Nat Rev Cancer* **8**(3): 234-242.
- Weger, N. & Schlake, T.** (2005): Igf-I signalling controls the hair growth cycle and the differentiation of hair shafts. *J Invest Dermatol* **125**(5): 873-882.
- Weiner, L., Han, R., Scicchitano, B.M., Li, J., Hasegawa, K., Grossi, M., Lee, D. & Brissette, J.L.** (2007): Dedicated epithelial recipient cells determine pigmentation patterns. *Cell* **130**(5): 932-942.
- Welker, P., Foitzik, K., Bulfone-Paus, S., Henz, B.M. & Paus, R.** (1997): Hair cycle-dependent changes in the gene expression and protein content of transforming factor beta 1 and beta 3 in murine skin. *Arch Dermatol Res* **289**(9): 554-557.
- Wells, C.M., Walmsley, M., Ooi, S., Tybulewicz, V. & Ridley, A.J.** (2004): Rac1-deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and membrane ruffling but not migration. *J Cell Sci* **117**(Pt 7): 1259-1268.
- Wennerberg, K. & Der, C.J.** (2004): Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *Journal of Cell Science* **117**(Pt 8): 1301-1312.

- Wheeler, A.P., Wells, C.M., Smith, S.D., Vega, F.M., Henderson, R.B., Tybulewicz, V.L. & Ridley, A.J.** (2006): Rac1 and Rac2 regulate macrophage morphology but are not essential for migration. *J Cell Sci* **119**(Pt 13): 2749-2757.
- Wilson, C., Cotsarelis, G., Wei, Z.G., Fryer, E., Margolis-Fryer, J., Ostead, M., Tokarek, R., Sun, T.T. & Lavker, R.M.** (1994): Cells within the bulge region of mouse hair follicle transiently proliferate during early anagen: heterogeneity and functional differences of various hair cycles. *Differentiation* **55**(2): 127-136.
- Winter, H., Langbein, L., Praetzel, S., Jacobs, M., Rogers, M.A., Leigh, I.M., Tidman, N. & Schweizer, J.** (1998): A novel human type II cytokeratin, K6hf, specifically expressed in the companion layer of the hair follicle. *J Invest Dermatol* **111**(6): 955-962.
- Woodcock, A. & Magnus, I.A.** (1976): The sunburn cell in mouse skin: preliminary quantitative studies on its production. *Br J Dermatol* **95**(5): 459-468.
- Wu, H., Stanley, J.R. & Cotsarelis, G.** (2003): Desmoglein isotype expression in the hair follicle and its cysts correlates with type of keratinization and degree of differentiation. *J Invest Dermatol* **120**(6): 1052-1057.
- Xu, Y., Voorhees, J.J. & Fisher, G.J.** (2006): Epidermal growth factor receptor is a critical mediator of ultraviolet B irradiation-induced signal transduction in immortalized human keratinocyte HaCaT cells. *Am J Pathol* **169**(3): 823-830.
- Yamada, S. & Nelson, W.J.** (2007): Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion. *J Cell Biol* **178**(3): 517-527.
- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E. & Mizuno, K.** (1998): Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* **393**(6687): 809-812.
- Yoshida, H., Kunisada, T., Kusakabe, M., Nishikawa, S. & Nishikawa, S.I.** (1996): Distinct stages of melanocyte differentiation revealed by analysis of nonuniform pigmentation patterns. *Development* **122**(4): 1207-1214.
- Yoshida, T., Zhang, Y., Rivera Rosado, L.A., Chen, J., Khan, T., Moon, S.Y. & Zhang, B.** (2010): Blockade of Rac1 activity induces G(1) cell cycle arrest or apoptosis in breast cancer cells through downregulation of cyclin D1, survivin, and X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Mol Cancer Ther* **9**(6): 1657-1668.
- Young, A.R.** (1987): The sunburn cell. *Photodermatol* **4**(3): 127-134.
- Yu, W., Datta, A., Leroy, P., O'Brien, L.E., Mak, G., Jou, T.S., Matlin, K.S., Mostov, K.E. & Zegers, M.M.** (2005): Beta1-integrin orients epithelial polarity via Rac1 and laminin. *Mol Biol Cell* **16**(2): 433-445.
- Yuhki, M., Yamada, M., Kawano, M., Iwasato, T., Itohara, S., Yoshida, H., Ogawa, M. & Mishina, Y.** (2004): BMPRI1A signaling is necessary for hair follicle cycling and hair shaft differentiation in mice. *Development* **131**(8): 1825-1833.
- Zhang, B., Zhang, Y. & Shacter, E.** (2004): Rac1 inhibits apoptosis in human lymphoma cells by stimulating Bad phosphorylation on Ser-75. *Mol Cell Biol* **24**(14): 6205-6214.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
α -MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon alpha
Abb.	Abbildung
Abi-1	„Abl interactor“ 1
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADS	„Antibody Diluent Solution“ (Dako, Hamburg)
Akt	Proteinkinase B
aPKC	atypische Proteinkinase C
Arf	ADP-Ribosylierungsfaktor
Arp2/3	„actin-related proteins“ 2/3
AS	Aminosäure
Bad	“Bcl2-associated agonist of cell death“
Bak	„Bcl-2 antagonist/ killer“
Bax	Bcl-2 assoziiertes X Protein
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	„B-cell lymphoma“ 2
Bcl-x _L	„B-cell lymphoma“ x _L („extra large“)
BMPR1A	„bone morphogenic protein receptor 1A“
bp	Basenpaar
BrdU	5-Bromo-2-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
c-Myc	c-Myelocytomatosis Onkogen
ca.	circa
Caspase	Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Protease
CD200	„Cluster of Differentiation“ 200
Cdc42	„cell division control“ Protein 42
CDP	„CCAAT displacement“ Protein
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
Cre	Cause Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1
CRIB	Cdc42-/Rac1-interaktives Bindemotiv
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
Dkk1	Dickkopf-verwandtes Protein 1
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]anthracen
DMEM	„Dulbeccos Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
E-KO	epidermaler Knockout
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF/EGFR	„Epidermal Growth Factor“/„Epidermal Growth Factor“-Rezeptor
ERK	„extracellular-signal regulated kinase“
FCS	fötale Kälberserum
Fgf2	„Fibroblast Growth Factor“
FGFR2-IIIb	„Fibroblast Growth Factor“-Rezeptor 2-IIIb oder KGFR
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxn1/Foxq1	„Forkhead box“ Protein N1/Q1
FSG	Fischhautgelatine
fw	forward
g	Gramm
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
Gata-3	GATA-bindender Transkriptionsfaktor 3
GDI	Guanin-Nukleotid Dissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine-Nukleotid Austauschfaktor
GNS	normales Ziegenserum
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HEK	„human embryonic kidney“
HEMA	Hydroxyethylmethacrylat
HF	Haarfollikel
Hoxc13	Homeobox-Protein C13
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPV8	Humanes Papillomvirus 8
HRP	Meerrettichperoxidase
IAP	Apoptose-inhibitorisches Protein
IFE	interfollikuläre Epidermis
IGF/IGF-1	„Insulin-like growth factor“ /-1
IGFBP5	„Insulin-like growth factor“ Bindeprotein 5
IgG	Immunglobulin G
IRS	innere Haarwurzelscheide („inner root sheath“)
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K	Keratin

kDa	Kilodalton
KGF	„Keratinocyte Growth Factor“
KO	Knockout
Kontrolle	Tiere, die homozygot gefloxt sind für Rac1 (Genotyp Rac1 flox/flox)
Krox20	Krüppel Box 20
L-DOPA	Levodopa oder L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
Lef1	„Lymphoid enhancer-binding factor“ 1
LIM-Kinase	LIM-Domäne enthaltende Kinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
MHCI/MHCII	Haupthistokompatibilitätskomplex I/II
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
Msx2	Msh-Homeobox Protein 2
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Nap1	Nck-assoziiertes Protein 1
NF κ B	nukleärer Faktor κ B
Nox1	NADPH Oxidase 1
ORS	äußere Haarwurzelscheide („outer root sheath“)
p.p.	<i>post partum</i> (gemeint: nach der Geburt)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK1/PAK2	p21-aktivierte Kinase 1/2
Par3/Par6	„pulmonary adenoma resistance“ 3/6
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	p(otential of) h(ydrogen)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PJ	Propidiumjodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
poly-HEMA	poly-2-Hydroxyethylmethylacrylat
Rab	„Ras-related in brain“
Rac	Ras-ähnliches C3 Botulinum Toxin Substrat
Ran	Ras-verwandtes nukleäres Protein
Ras	Ratten Sarkom Proto-Onkogen
REM	Rasterelektronenmikroskopie
Rho	„Ras homologous“
Ripa	Radioimmunoprezipitations-Assay
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
Runx1/3	„runt related transcription factor“ 1/3
SBZ	Sonnenbrandzelle
SCF	„stem cell factor“
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEM	mittlerer Standardfehler
Shh	„sonic hedgehog homolog“
Sra-1	spezifisch Rac1-assoziiertes Protein-1
SSC	Standard Zitrat Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> DNA Polymerase
TBST	Tween 20-haltige Tris-gepufferte Salzlösung
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TG	Transgen
TGF-β1	„Transforming Growth Factor“ beta 1
Tiam1	„T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing“ Protein 1
TNF/TNFR	Tumornekrosefaktor/Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
TRAIL	Tumornekrosefaktor-verwandtes Apoptose-induzierender Ligand
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
Trp2	Tyrosinase-ähnliches Protein 2
TSA	Tyramid Signalamplifikation
TUNEL	„TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling“
Tween	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat
Tyrp1	Tyrosinase-ähnliches Protein 1
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Verdünnung
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WAVE	„WASP family protein member“ 1
Wnt	zusammengesetzt aus <i>Wg</i> für Wingless und <i>Int-1</i>
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten, Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Mörsdorf betreut worden.

Köln den 02.11.2010

Kristina Behrendt

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Saskia Kristina Behrendt

Geburtsdatum: 17.06.1983

Geburtsort: Idar-Oberstein

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

Universitäre Bildung

März 2007- heute *Universität zu Köln, Institut für Dermatologie*
Naturwissenschaftliche Doktorarbeit im Fach Genetik

unter Anleitung von Prof. Dr. Dagmar Mörsdorf
in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Dr. Ingo Haase

Dissertation: Funktionale Charakterisierung der kleinen Rho-GTPase Rac1
im Haarwachstum und in der Haardifferenzierung

2002 – 2007 Hochschule Darmstadt

Dipl.-Ing. (FH) Biotechnologie

Diplomarbeit: Untersuchung epigenetischer Merkmale schwer
UV-geschädigter Zellen in menschlicher Haut
(*Labor für Molekulare Zellbiologie, Elbekliniken Buxtehude*)

Diplomprüfungen: Bioverfahrenstechnik
Biochemie
Molekularbiologie & Gentechnik

Schulbildung

1993 – 2002 Konrad-Adenauer-Gymnasium Westerbürg
Abitur

Vorträge & Poster

K. Behrendt, M. Tschamtker, R. Pofahl, R. Knaup, T. Krieg, C. Niemann, I. Haase (2007): *Contribution of Rac1 to the formation of malignant sebaceous gland tumors in mice*. 34. Annual Meeting of the ADF, Freiburg, 2007

K. Behrendt, C. Brakebusch, R. Pofahl, T. Krieg, I. Haase (2008): *Pigmentation defect due to the deficiency of Rac1 in differentiated parts of the hair follicle*. International Investigative Dermatology, Kyoto, 2008

K. Behrendt, C. Brakebusch, R. Pofahl, T. Krieg, I. Haase (2009): *Hair abnormalities due to Rac1 deficiency in the differentiated parts of the hair follicle*. ESDR Meeting, Budapest, 2009

K. Behrendt, C. Brakebusch, R. Pofahl, T. Krieg, I. Haase (2009): *Hair abnormalities due to Rac1 deficiency in the differentiated parts of the hair follicle*. ESPCR Meeting, Münster, 2009 (Vortrag)

K. Behrendt, A. Hedrych-Ozimina, Z. Hao, R. Pofahl, D. Ussath, R. Knaup, T. Krieg, I. Haase (2010): *Enhanced contact allergen and UVB induced keratinocyte apoptosis in the absence of CD95/Fas/Apo-1*. ESDR Meeting, Helsinki, 2010

Publikationen

A. Hedrych-Ozimina, K. Behrendt, Z. Hao, R. Pofahl, D. Ussath, R. Knaup, T. Krieg, I. Haase (2010): *Enhanced contact allergen and UVB induced keratinocyte apoptosis in the absence of CD95/Fas/Apo-1*. Cell Death & Differentiation. Online-Publikation August 2010

Danksagung

Besonders danken möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. Ingo Haase für das Überlassen des interessanten Themas und die angenehme Betreuung während meiner Zeit in seiner Arbeitsgruppe. Außerdem möchte ich ihm für die konstruktive Betrachtung meiner Doktorarbeit danken. Mit seinem fundierten Fachwissen und vielen Anregungen hat er maßgeblich zu dem Gelingen meiner wissenschaftlichen Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Thomas Krieg danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln.

Frau Prof. Dr. Dagmar Mörsdorf danke ich für die Betreuung der Arbeit seitens der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät und nicht nur für die Übernahme des Erstgutachtens, sondern auch für Ihr stetiges Interesse und die konstruktive Betrachtung meiner Arbeit während der gesamten Doktorandenzeit. Herrn Prof. Dr. Matthias Hammerschmidt danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Des Weiteren möchte ich den Kolleginnen und Kollegen meiner Arbeitsgruppe Ruth Pofahl, Doreen Ussath, Renate Knaup, Snehlata Kumari und Benjamin Herzberg für ihre Unterstützung und gute Zusammenarbeit danken. Ein besonders herzlicher Dank geht an Ruth Pofahl, die mir während der letzten Jahre immer eine große Hilfe war und durch ihre tatkräftige Unterstützung und ihre Ideen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, und an Doreen Ussath, die sowohl im Labor als auch im privaten Bereich oftmals eine große Hilfe war.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Mitdoktoranden sowie alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Forschungsabteilung der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln für die außerordentlich gute Zusammenarbeit. Diese Arbeit wäre ohne ihre Hilfe nicht möglich gewesen, weshalb ich mich bei allen herzlich bedanken möchte. Im Besonderen möchte ich Yvonne Meyer, Heike Stachelscheid, Anna Riese, Michaela Nießen, Daniel Hofmann und Susanne László hervorheben, die nicht nur auf fachlicher, sondern auch auf sozialer und freundschaftlicher Ebene dazu beigetragen haben, dass ich mich in den letzten Jahren während meiner Arbeit immer sehr wohl gefühlt habe.

Besonders herzlich möchte ich mich nicht zuletzt bei meiner Familie bedanken, die mir während der Zeit des Anfertigens meiner Doktorarbeit immer ein unentbehrlicher Rückhalt war sowie bei allen meinen lieben Freunden für ihre Hilfe, Ausdauer, Ruhe und Geduld, mit der sie mir stets zur Seite standen und mich immer wieder aufgemuntert haben.
