

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der freien Universität Berlin
Laboratorium Prof. Dr. K.-D. Budras

***In vitro* Modelle proliferierender und differenzierender epidermaler
Keratinocyten der Rinderklaue**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulrike Nebel
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2004
Journal-Nr. 2869

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. K.-D. Budras
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. W. Heuwieser
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. K. Dämmrich

Deskriptoren: cattle, claws, epidermis, keratinization, cell culture

Tag der Promotion: 28.01.2005

meiner Mutter

und in Erinnerung an meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

A.	EINLEITUNG	12
B.	LITERATURÜBERSICHT	13
1.	<u>Die Klaue</u>	13
1.1	Definition der Klaue und ihrer Segmente	13
1.2	Mikroskopische Anatomie der Klaue	14
1.2.1	Lichtmikroskopische Zelldifferenzierung	14
1.2.2	Ultrastruktur der Zelldifferenzierung	16
1.3	Verhornung	18
1.3.1	Keratinisierung und Verhornung	18
1.3.2	Verhornungstypen	18
1.3.3	Keratine	19
1.3.4	Filaggrin	21
1.3.5	Membrane coated granules und membrane coating material	22
2.	<u>Zellkultur</u>	24
2.1	Warum ist ein <i>in vitro</i> Model der Rinderklaue erforderlich?	24
2.2	Verschiedene <i>in vitro</i> Modelle epidermaler Keratinozyten	25
2.3	Wachstum und Morphologie von epidermalen Keratinozyten	26
	<i>in vitro</i>	
2.3.1	Beobachtung von Wachstum und Differenzierung im Phasenkontrastmikroskop	26
2.3.2	Epidermale Homöostase in der Zellkultur	27
2.3.3	Morphologie der Keratinozyten im Transmissionselektronenmikroskop	27
2.4	Differenzierung der Keratinozyten <i>in vitro</i>	29
2.4.1	Basalzellen	29
2.4.1.1	Basalzelltypen	29
2.4.1.2	Unterscheidung von Stammzellen und transit amplifying cells	30
2.4.2	Integrine und die Initiation der terminalen Differenzierung	31
2.4.3	Cadherine	32
2.4.4	Keratine	33
2.4.5	Weitere Differenzierungsmarker	34

2.5	Weitere Faktoren mit Einfluss auf Proliferation und Differenzierung	36
2.5.1	Calcium	36
2.5.2	Endokrine Faktoren	37
2.5.3	Parakrine Faktoren der Dermis	38
2.5.4	Autokrine Faktoren	39
2.5.5	Vitamine	39
2.5.6	Fibrozyten	40
2.5.7	Bebrütungstemperatur	40
2.5.8	Andere Faktoren	41
C.	MATERIAL UND METHODEN	42
1.	<u>Untersuchungsmaterial</u>	42
2.	<u>Methoden</u>	42
2.1	Isolierung der Zellen	42
2.2	Anzucht der Zellen	44
2.2.1	Verwendete Medien	44
2.2.2	Kultivierungsbedingungen	45
2.2.3	Kultivierungsgefäße	45
2.2.4	Beschichtete Kultivierungsgefäße	46
2.2.5	Dokumentation der Zellproliferation	46
2.2.6	Subkultivierung	47
2.3	Kryokonservierung	47
2.3.1	Einfrieren von Zellen	47
2.3.2	Auftauen von Zellen	47
2.4	Zellzählung der kultivierten Zellen	48
2.5	Bestimmung der unterschieden Proliferationsrate der angezüchteten Zellen in Abhängigkeit von den verschiedenen Medien	48
2.6	Trennung von Keratinozyten und Fibrozyten	49
2.6.1	Trennung mit Hilfe eines Zellschabers	49
2.6.2	Single well cloning	49
2.6.3	Magnetic-activated cell sorting (MACS)	50

2.7	Licht- und Elektronenmikroskopie	52
2.7.1	Lichtmikroskopie	52
2.7.1.1	Paraffineinbettung	52
2.7.1.2	Einbettung in Technovit 7100	52
2.7.1.3	Histologische Übersichtsfärbungen	52
2.7.2	Elektronenmikroskopie	53
2.7.2.1	Untersuchungsmaterial	53
2.7.2.2	Einbettung in AGAR 100	53
2.7.2.3	Einbettung in LR-White Resin®	53
2.7.2.4	Semidünnschnitte	54
2.7.2.5	Ultradünnschnitte und Kontrastierung	54
2.7.2.6	Transmissionselektronenmikroskopische Auswertung und Dokumentation	54
2.7.2.7	Nachweis von Keratinen am Transmissionselektronenmikroskop mit der Protein A-Gold Technik	54
2.8	Nachweis von Proteinen mit dem Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	55
2.9	SDS-PAGE und Western blot	56
2.9.1	SDS-PAGE (sodiumdodecylsulfat polyacrylamide gel electrophoresis)	56
2.9.1.1	Prinzip	56
2.9.1.2	Probenmaterial und Probenvorbereitung	56
2.9.1.3	Proteinextraktion	56
2.9.1.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	58
2.9.1.5	Auftrennung und Darstellung der Proteine	58
2.9.2	Western Blot	59
2.9.2.1	Prinzip	59
2.9.2.2	Proteintransfer	59
2.9.2.3	Nachweis von Keratinproteinen	59
D.	UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE	61
1.	<u>Anzüchtung der Zellen</u>	61
1.1	Isolierung	61
1.1.1	Isolierung und anschließende Anzüchtung der Zellen	61
1.1.2	Isolierung der Zellen mittels Dispase-Inkubation	64

1.2	Subkultivierung	65
1.3	Eliminierung von Fibrozyten	65
1.3.1	Isolierung von Keratinozyten mit Hilfe eines Zellschabers	65
1.3.2	Single well cloning	66
1.3.3	Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS)	67
1.4	Differenzierung und Koloniebildung	68
1.4.1	Differenzierung	68
1.4.2	Koloniebildung	70
1.5	Zellwachstum in Abhängigkeit von den verwendeten Kultivierungsgefäßen und unterschiedlichen Beschichtungen	72
1.5.1	Verschiedene Kultivierungsgefäße	72
1.5.2	Zelladhärenz und Proliferation abhängig von der Art der Beschichtung	73
1.6	Wachstum mit verschiedenen Medien	74
1.6.1	DMEM+	74
1.6.2	RPMI+	74
1.6.3	Quantum 286	75
1.6.4	Konditioniertes Medium	75
1.6.5	Gemisch aus serumhaltigen und serumfreien Medien	75
1.6.6	Serumfreie Medien	76
1.6.7	Quantitative Auswertung des Zellwachstums bei der Verwendung verschiedener Medien	77
1.7	Wachstum bei verschiedenen Temperaturen	80
1.8	Zellalterung <i>in vitro</i>	81
1.9	Lagerung in flüssigem Stickstoff / Wiederauftauen	82
2.	<u>Morphologische Charakterisierung der angezüchteten Zellen</u>	82
2.1	Lichtmikroskopische Untersuchung	82
2.1.1	Kolonieähnliche Zellansammlungen mit Fibrozyten	82
2.1.2	Unvollständig differenzierte Kolonien	83
2.1.3	Keratinozytenkolonien mit gewebespezifischer Differenzierung	84
2.2	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung	85
2.2.1	Ultrastruktur der Kolonien mit gewebespezifischer Differenzierung	85
2.2.1.1	Basale Zellschicht	85

2.2.1.2	Intermediäre Zellschichten	87
2.2.1.3	Superfizielle Zellschichten	89
2.2.1.4	Segmentspezifische Differenzierung	89
3.	<u>Immunhistochemische und molekularbiologische Charakterisierung der angezüchteten Zellen</u>	90
3.1	Immunogold labelling	90
3.2	ELISA	91
3.3	SDS-PAGE	92
3.4	Western blot	94
E.	DISKUSSION	95
1.	<u>Notwendigkeit der Erstellung von <i>in vitro</i> Modellen</u>	95
2.	<u>Methodik</u>	98
3.	<u>Differenzierung und Charakterisierung der angezüchteten Zellen</u>	105
4.	<u>Praktischer Einsatz des Modells und Folgeprojekte</u>	115
4.1	Schlussfolgerung und Gewichtung der eigenen Befunde	116
F.	ZUSAMMENFASSUNG	117
G.	SUMMARY	119
H.	ABBILDUNGEN	121
I.	LITERATURVERZEICHNIS	156

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. K.-D. Budras, danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation sowie für seine wissenschaftliche Unterstützung und seinen fachlichen Rat.

Bei Dr. Ch. Mülling bedanke ich mich herzlich für die Betreuung der gesamten Arbeit, seine Unterstützung, viele fachliche Diskussionen sowie für die Übersetzung der Zusammenfassung.

Für die Unterstützung bei der Einarbeitung im Zellkulturlabor sowie die immer gewährte freundliche Hilfestellung danke Frau Dr. S. Schuster.

Mein besonderer Dank gilt Frau V. Eckert-Funke für die Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate und die Durchführung von Fotoarbeiten.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Zehenendorgan für den wissenschaftlichen Austausch, die Hilfsbereitschaft und für das gute Arbeitsklima.

Frau Dr. G. Arndt danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei der statistischen Datenverarbeitung.

Frau Dr. U. Franke und Familie Borgwardt danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Teile dieser Arbeit wurden gefördert durch die Europäische Gemeinschaft unter dem Lamcow Project QLK5-CT-2002-00969: Die Autorin ist alleine verantwortlich und die Arbeit repräsentiert nicht notwendigerweise die Meinung der Europäischen Union.

Lebenslauf

Name: Ulrike Nebel
Geburtsdatum: 13.03.1968
Geburtsort: Berlin
Staatsangehörigkeit: deutsch

1974-1980 Victor-Gollancz-Grundschule, Berlin
1980-1988 Georg-Herwegh-Gymnasium, Berlin
Abschluss: Abitur
1988-1990 Studium an der FU-Berlin
Hauptfach Ur- und Frühgeschichte
1990-1992 Ausbildung zur medizinisch technischen Laborassistentin an der
Landeslehranstalt für technische Assistenten in der Medizin, Berlin
02.-10.1993 Anstellung als MTLA im histologischen Labor des Institutes für
Pathologie, AVK Berlin
1993-1999 Studium der Veterinärmedizin an der FU-Berlin
06.09.1999 Approbation als Tierärztin
Mai 2000 Zulassung der Promotion
SS 2001 Lehrauftrag für Histologie
WS 2001/2002 Lehrauftrag für die Präparierübungen I, Anatomie des Hundes
März 2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Veterinär-Anatomie
im Drittmittelprojekt Lame Cow

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe.
Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Ulrike Nebel