

E. Diskussion

Ziel dieser Untersuchungen war es, erstmals ein *in vitro* Modell der Rinderklaue zu etablieren und zu charakterisieren. Ein derartiges Modell eignet sich zur Erforschung unterschiedlichster Faktoren, die einen entscheidenden Einfluss auf die Zelldifferenzierung und die Hornbildung haben. Zusätzlich ermöglicht ein organotypisches Modell das Studium dermoepidermaler Wechselwirkungen. Eine bessere Kenntnis dieser biologischen Prozesse ist entscheidend für das Verständnis der Pathogenese von Klauenerkrankungen, wie z.B. der Klauenrehe (*Eckalck et al., 1991; Hendry et al., 1999*). Das große Spektrum der verwendeten Methoden ermöglichte die Etablierung eines *in vitro* Modells der Rinderklaue. Die Vielzahl der dabei erhobenen Befunde wird unter vier Schwerpunkten diskutiert. Auf die Notwendigkeit von *in vitro* Modellen wird im ersten Schwerpunkt eingegangen, wobei der Bedarf für ein Modell der Rinderklaue besonders hervorgehoben wird. Der zweite Diskussionsschwerpunkt betrifft die Methodik. Im dritten Schwerpunkt erfolgt eine Erörterung der Differenzierung und Charakterisierung der angezüchteten Zellen. Abschließend werden im vierten Schwerpunkt praktische Anwendungsmöglichkeiten des Modells diskutiert, zusätzlich werden auf dieser Arbeit beruhende Folgeprojekte kurz vorgestellt. Außerdem erfolgt eine Gewichtung der eigenen Befunde.

1. Notwendigkeit der Erstellung von *in vitro* Modellen

Neben dem Studium der biologischen Prozesse der gesunden Haut haben humane Hautäquivalente einen großen Erkenntniszuwachs über die Wundheilung (*Turchi et al., 2002*), die Pathogenese von Hauterkrankungen und Hautkrebs ermöglicht. Sie sind auch ein wichtiger Bestandteil bei der Behandlung von Verbrennungsoptionen. Viele „künstliche“ Hautäquivalente wurden speziell für diesen Zweck entwickelt (*Huang et al., 2003; Kim et al., 1999*). Außerdem gestatten kutane *in vitro* Modelle das Studium dermo-epidermaler Interaktionen, sowie Untersuchungen der Modulation durch pharmakologische bzw. physiologische Substanzen (*Hinterhuber et al., 2002; Holbrook und Hennings, 1983*). Ein weiterer, wichtiger Aspekt ist der Tierschutz (*Ponec, 2002*). Durch die Entwicklung der verschiedenen *in vitro* Modelle der Haut, wurde die Zahl der früher notwendigen Tierversuche drastisch reduziert.

In der Veterinärmedizin eignen sich *in vitro* Modelle sowohl für die Grundlagenforschung, als auch für das Studium praxisrelevanter Gegebenheiten. Zell- und Gewebekulturen bieten die einmalige Möglichkeit, unter standardisierten, gut kontrollierbaren Bedingungen, die Wirkung verschiedener Substanzen zu untersuchen. Hierbei kann unter

anderem der Effekt von Hormonen oder Arzneimittelwirkstoffen in beliebig variierbaren Konditionen erforscht werden. Für die Zellisolierungen können Organe euthanasierter Haustiere bzw. geschlachteter Nutztiere herangezogen werden, wodurch der Bedarf an Versuchstieren in der Veterinärmedizin reduziert werden kann (*Sultan und Haagsman, 2001*).

Klauenerkrankungen der landwirtschaftlich genutzten Rinder sind von großer wirtschaftlicher und tierschützerischer Bedeutung. Die Erhaltung der Klauengesundheit ist daher ein entscheidender Faktor geworden, der unter anderem von der Hornqualität abhängig ist. Die Hornqualität ist abhängig von der Güte des gebildeten Klauenhorns, für die verschiedene intrazelluläre sowie extrazelluläre Faktoren von großer Bedeutung sind. Bei den intrazellulären Faktoren sind Art, Menge und Vernetzungsgrad der Keratinproteine besonders hervorzuheben. Die Ausbildung von Desmosomen sowie die Beschaffenheit des Interzellularkittes gehören zu den entscheidenden interzellulären Faktoren (*Hendry et al., 1995; Hochstetter, 1998*). Ein *in vitro* Modell der Rinderklaue, das das Studium der für die Verhornung und damit auch für die Hornqualität entscheidenden Faktoren ermöglicht (*Eckfalck et al., 1991; Hinterhuber et al., 2002; Holbrook und Hennings, 1983; Poumay und Leclercq-Smekens, 1998; Wunn et al., 1999*), war bisher nicht verfügbar. Die Beeinflussung der Hornqualität durch Futtermittelzusätze, deren Wirkung *in vivo* beschrieben wurde (*Mülling et al., 1999; Tomlinson et al., 2004*), kann *in vitro* auf molekularbiologischer Ebene erforscht werden. Die Pathomechanismen verschiedener Klauenerkrankungen, wie z.B. der Klauenrehe, sind noch nicht vollständig geklärt (*Hendry et al., 1999*). Bessere Kenntnisse der biologischen Abläufe sind entscheidend für das Verständnis der Pathogenese von Klauenerkrankungen. Vielleicht können zu einem späteren Zeitpunkt neue Erkenntnisse über biologische Prozesse, die ausschlaggebend an der Wundheilung beteiligt sind, in der Behandlung von Klauenläsionen eingesetzt werden.

In vitro Modelle weisen viele Vorteile gegenüber Feldversuchen auf und bieten zusätzlich die Möglichkeit bei Feldversuchen gewonnene Erkenntnisse zu untermauern. Ein Punkt ist die Vermeidung von Tierversuchen. Klauen sind Abfallprodukte der Fleischgewinnung und stehen somit für die Zellisolierung zur Verfügung. Des Weiteren können mit einer Zelllinie eine große Anzahl verschiedenster Untersuchungen durchgeführt werden. Dies eröffnet die Möglichkeit, Versuchsreihen unter gleichbleibenden Bedingungen ausführen zu können. So kann z.B. die Wirkung von Wachstumsfaktoren, wie KGF, in beliebig vielen Konzentrationen ausgetestet werden. Für Versuchsreihen können Zellen, die alle von dem gleichen Tier stammen, verwendet werden. Somit entfallen genetische Variationen, was zu einer guten Vergleichbarkeit und Auswertbarkeit der Untersuchungsergebnisse führt.

Nun stellt sich die Frage, ob die *in vitro* Modelle der Haut als Modell für die Klaue herangezogen werden können. Die Klaue, das Zehenendorgan des Rindes, ist eine Modifikation der Haut. Dabei kommt es zu einer massiven Zunahme der Zelllagen in der Klauenepidermis. Die Klauenepidermis ist sehr dick und bildet eine dicke Hornschicht. Aufbau und Charakteristika der kutanen Epidermis bleiben jedoch erhalten. Auch die Differenzierung der epidermalen Keratinozyten ist prinzipiell gleich, daher können Modelle der Haut mit gutem Grund als Basis für ein *in vitro* Modell der Klaue herangezogen werden. Es stand daher ein weites Spektrum an methodischen und technischen Informationen zur Verfügung

Abschließend wird unter diesem Schwerpunkt auf die Hauptunterschiede zwischen *in vitro* Modellen und den Ursprungsgeweben *in vivo* eingegangen. In der konventionellen Monolayer Zellkultur wird mit dissoziierten Zellen gearbeitet, die dreidimensionale Architektur des Ursprungsgewebes geht verloren. Zellkontakte werden nur in geringen Maße ausgebildet. Dreidimensionale Kulturen gleichen dem Ursprungsgewebe, es werden gewebespezifische Merkmale ausgebildet. Betrachtet man die Haut, so muss bedacht werden, dass sie ein komplexes Gewebe ist und nicht nur aus der Epidermis besteht. Für das Wachstum und die Differenzierung epidermaler Keratinozyten ist der Einfluss der Dermis entscheidend (*Merne und Syrjänen, 2003*). Dreidimensionale Kulturen aus epidermalen Keratinozyten und dermalen Fibrozyten weisen eine gewebespezifische Differenzierung auf (*Hinterhuber et al., 2002; Merne und Syrjänen, 2003; Stark et al., 1999*).

In der Kultur fehlen die systemischen Einflüsse des Körpers. Eine Regulierung durch das endokrine System und Nervensystem entfällt. Allerdings sind den Nährmedien verschiedene Hormone zugesetzt. Auch fetales bovines Serum beinhaltet eine von Charge zu Charge schwankende Konzentration an Hormonen. Bei Bedarf können dem Medium Hormone, Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter in den jeweils erforderlichen Konzentrationen zugesetzt werden. So können die Bedingungen *in vitro* an unterschiedlichste Situationen *in vivo* angepasst werden.

Der Energiestoffwechsel angezüchteter Zellen beruht in Gegensatz zu der Situation *in vivo* größtenteils auf Glycolyse. Der Zitronensäurezyklus ist zwar noch funktionsfähig, spielt aber nur noch eine untergeordnete Rolle (*Freshney, 2000*).

Trotz der genannten Unterschiede bieten Zellkultursysteme die hervorragende Möglichkeit, bessere Kenntnisse über epidermale Keratinozyten zu gewinnen, da die wichtigen gewebespezifischen Funktionen *in vitro* erhalten bleiben. Dies gilt auch für das *in vitro* Modell der Rinderklaue. Die Ergebnisse müssen jedoch immer kritisch betrachtet werden und können nur mit Einschränkung auf das lebende Tier übertragen werden.

2. Methodik

Keratinocyten aus der Klauenepidermis wurden bisher nur selten isoliert. Diese Isolate wurden ausschließlich als Vergleich für Untersuchungen an humanen Keratinocyten (*Baden und Kubilus, 1983; Kubilus et al., 1979*) oder Keratinocyten des Fingernagels (*Kitahara und Ogawa 1994*) herangezogen. Ein *in vitro* Modell, das ein Studium der Pathogenese von Klauenerkrankungen ermöglicht, existierte nicht. Daher standen nur sehr wenige Informationen zur Isolierungstechnik dieser Zellen zur Verfügung. Es wurde auf Methoden zur Isolierung von Keratinocyten aus der Haut zurückgegriffen (*Freshney, 2000; Häkkinen et al., 2002*). Diese Techniken mussten jedoch entsprechend der anatomischen Bedingungen der Klaue modifiziert werden. Problematisch waren die Unterschiede zwischen der Klauenepidermis und der übrigen Epidermis. Die Ausbildung einer wesentlich höheren Anzahl verhornter Zellschichten, die in der Klaue eine Dicke von bis zu 1 cm erreichen (*Mülling, 2000*), stellte das Hauptproblem dar. Um an die teilungsfähigen Basalzellen zu gelangen, musste erst die harte Hornkapsel durchtrennt werden. Dies war nur mit Hilfe einer Tischbandsäge möglich, wodurch sich zwei Schwierigkeiten ergaben. Zum einen kam es zu einer Wärmeentwicklung, die zu einer Zellschädigung führen konnte. Zum anderen wurden nach der Säuberung verbliebene Verunreinigungen von der Oberfläche in tiefere Schichten der Klauenepidermis gedrückt. Deshalb wurde die Klaue in 1 bis 2 cm breite Sagittalscheiben zerlegt, was nach gründlicher Desinfektion ein großflächiges Abtrennen der Säugeränder ermöglichte. Dies verringerte das Kontaminationsrisiko der Primärkultur und schloss durch die Wärmeeinwirkung geschädigte Zellen aus. Es ist bemerkenswert, dass trotz der zu überwindenden Schwierigkeiten, nur einmal eine Primärkultur kontaminiert war.

Des Weiteren bereitete die starke Verzahnung von Dermis und Epidermis Probleme. Aufgrund dieser innigen Verbindung war eine eindeutige Trennung nicht möglich. Erschwerend kam hinzu, dass nur Zellen aus dem Stratum basale angezüchtet werden konnten und somit die Zellisolierung in dem Übergangsbereich von Dermis zu Epidermis erfolgen musste. Dies hatte zur Folge, dass in den Primärkulturen ein variierender Anteil von dermalen Fibrozyten mit angezüchtet wurde. Um die Fibrozyten gleich bei der Isolierung zu eliminieren, wurde als zusätzlicher Schritt eine Inkubation in Dispase eingeführt. *Wunn et al. (1999)* beschreiben diese Methode für die Isolierung von Keratinocyten aus dem Huf. Sie konnten nach Abschluss der Inkubation in Dispase die Dermis von der Epidermis abziehen. Auch bei der Gewinnung von Keratinocyten aus der Haut wurde diese Methode erfolgreich eingesetzt (*Inokuchi et al., 1995; Park et al., 2004; Yamasaki et al., 2003*). Im Gegensatz zu *Wunn et al. (1999)* konnte diese Technik nicht erfolgreich an der Klaue angewendet werden. Die eigenen Versuche konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen. Die Dermis wirkte wie „angedaut“ und ließ sich nur in kleinen

Bruchstücken von der Epidermis abziehen. Der Anteil dermalen Fibrozyten in der Primärkultur entsprach dem der Standardisierung. Ursachen für das Scheitern dieser Methode können eine zu niedrig gewählte Dispasekonzentration oder eine zu kurze Inkubationszeit sein. Im Vergleich zur kutanen Epidermis ist mit Sicherheit die sehr gut ausgeprägte Verzahnung von Dermis und Epidermis für das Scheitern dieser Methode verantwortlich. Hierfür spricht, dass die Dermis nur bruchstückhaft bzw. in faserigen Bestandteilen abgelöst werden konnte.

Die Anzüchtung der epidermalen Keratinozyten erwies sich als schwierig, da nur das Stratum basale die teilungsfähige Zellpopulation umfasste. In dieser Zellschicht repräsentieren Stammzellen und transit amplifying cells die teilungsfähige Zellpopulation, daneben kommen postmitotische Zellen vor (*Alonso und Watt, 2003; Aurelian et al., 2001; Dunnwald et al., 2001; Jones und Watt, 1993; Watt, 1988; Zhu et al., 1999*). Transit amplifying cells verfügen nur über eine eingeschränkte Teilungskapazität (*Alonso und Watt, 2003; Aurelian et al., 2001; Jones und Watt, 1993*). Bei jeder neuen Zellisolierung war der Erfolg von der Anzahl der angezüchteten Stammzellen abhängig. Nach *Jones und Watt (1993)* variiert die relative Verteilung der unterschiedlichen Basalzellen in Abhängigkeit von Zelllinie und Konfluenz der Kultur. Diese Beobachtung konnte durch die eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Jede Primärkultur benötigte, beeinflusst durch den wechselnden Anteil teilungsfähiger Zellen, einen unterschiedlichen Zeitraum zur Ausbildung eines Monolayers. Auch das langsame Zellwachstum nach einer Isolierung ist auf die Anzahl der Stammzellen im Isolat zurückzuführen. Bei einer Primärkultur konnte beobachtet werden, dass nach vier Wochen fast alle Zellen differenziert waren. Dies kann durch eine hohe Anzahl von transit amplifying cells in dieser Kultur erklärt werden. Nach *Zhu et al. (1999)* können sich diese Zellen noch drei bis fünfmal teilen, bevor sie terminal differenzieren.

Sowohl für die Primärkultur als auch für die Subkultivierung erwiesen sich mittelgroße Kultivierungsgefäße, wie p60s und 6-wells, als am besten geeignet. Eine rasche Ausbildung von Kontakten der Zellen untereinander war von entscheidender Bedeutung für die Wachstumsgeschwindigkeit der Keratinozyten. Direkt nach der Isolierung, wenn nur sehr wenige, einzeln liegende Zellen adhären waren, war die Proliferationsrate sehr niedrig. Nach dem Erreichen einer gewissen Zelldichte und Zellanzahl, stieg die Proliferationsrate rapide an. Dieser Befund stimmt mit den von *Poumay und Leclercq-Smekens (1998)* beschriebenen autonomen Wachstumsbedingungen epidermalen Keratinozyten überein. Erreichen die Keratinozyten eine bestimmte Dichte auf dem Kultivierungsgefäß, so kommt es zu einer autokrinen Wachstumsstimulation durch das

von ihnen synthetisierte Amphiregulin (*Schelfhout et al., 2002*). *Shirakata et al. (2000)* berichteten von einem weiteren proliferationssteigernden autokrinen Wachstumsfaktor, dem Epiregulin.

Bei der Betrachtung des Aufbaues der Klauenepidermis (*Mülling, 1993; Tomlinson et al., 2004*) fällt auf, dass die Keratinozyten in einem engen Zellverband mit ausgeprägten Kontakten zu ihren Nachbarzellen liegen. Vergleicht man die Situation *in vivo* mit den Gegebenheiten *in vitro*, so wird verständlich, warum sich die angezüchteten Zellen erst ab einer bestimmten Zelldichte „wohlfühlen“.

Es wurden verschiedene Nährmedien ausgetestet, um die optimalen Bedingungen für die Kultivierung der epidermalen Klauenzellen zu ermitteln. Die verwendeten Medien gehörten zu zwei unterschiedlichen Gruppen. Als erste Gruppe werden die serumhaltigen Medien erörtert. Diesen Medien wurde 10 % fetales bovines Serum (FBS) zugesetzt. FBS enthält verschiedene Wachstumsfaktoren, Hormone und Vitamine, in von Charge zu Charge, schwankenden Konzentrationen (*Freshney, 2000*). Der größte Nachteil bei der Verwendung von serumhaltigen Medien ist, dass man nie vollkommen standardisierte Kultivierungsbedingungen erreicht. Bei Versuchreihen sollte daher nur Serum einer Charge verwendet werden, um vergleichbare Konditionen zu gewährleisten. Über eine Sonderstellung verfügte Quantum 286, ein Spezialmedium für Epithelzellen. Dieses Medium enthält nur ausgewählte Serumbestandteile, so dass innerhalb einer Charge vergleichbare Bedingungen aufrechterhalten werden. Aber auch hier sind nicht alle Inhaltsstoffe genau bekannt.

Bei der Zellisolierung und Subkultivierung hat die Verwendung von Serum zwei Vorteile. Zum einen inaktiviert es die Wirkung des Trypsins und zum anderen enthält es Glukokortikoide (*Freshney, 2000*), die sich positiv auf die Zelladhäsion auswirken. Die Isolierung von Keratinozyten aus der Klauenepidermis wurde mit serumhaltigem Medium durchgeführt. Primärkulturen konnten nicht im serumfreien Medium anzüchten werden. *Kubilus (1983)* stellte fest, dass sich das Zellwachstum der Keratinozyten verlangsamt, wenn das Serum aus dem Medium entfernt wurde. Diese Beobachtung konnte bestätigt werden. Hierfür ist unter anderem das in ausreichender Menge im fetalen bovines Serum angebotene Vitamin A verantwortlich (*Fuchs und Green, 1981; Kubilus, 1983; Stark et al., 1999*). Vitamin A fördert die Proliferation und unterdrückt die Differenzierung von epidermalen Keratinozyten (*Eckfalck et al., 1991; Holbrook und Hennings, 1983; Islam et al., 2000*). Ein weiterer im Serum enthaltener und vor allem die Proliferation stimulierender Wachstumsfaktor ist EGF. Zusätzlich ist EGF auch ein potenter Inhibitor der Differenzierung (*Eckfalck et al., 1991; Wakita und Takigawa, 1999*).

Bei der eigenen quantitativen Auswertung des Zellwachstums der bovinen Keratinozyten in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Medien konnte nachgewiesen werden, dass mit serumhaltigen Medien wesentlich höhere Zellzahlen erreicht wurden (siehe Punkt 1.6.7). Von den ermittelten Zellzahlen wurden Rückschlüsse auf die Proliferationsraten gezogen. Neben der besseren Proliferation konnte auch eine verbesserte Differenzierung der angezüchteten Zellen beobachtet werden. Die Ausbildung von gewebespezifisch differenzierten Keratinozytenkolonien bzw. organotypischen Kokulturen konnte nur durch den Einsatz von einem Gemisch aus serumhaltigem und serumfreiem Medium erreicht werden. Zur Anzucht organotypischer Kokulturen verwenden auch andere Autoren immer noch serumhaltige Medien (*Mass-Szabowski et al., 2001; Stark et al., 2004*).

Serumfreie Medien haben den Vorteil, dass alle Bestandteile genau definiert sind, somit unerwünschte Interaktionen mit nicht genau bekannten Medienbestandteilen ausgeschlossen werden (*Bulić-Jakuš et al., 2001; Oku et al., 1994; Tsao et al., 1982*). Bei diesen Medien ist es möglich, gezielt einzelne Wachstumsfaktoren zuzufügen, um ausschließlich die Wirkung dieses Faktors zu untersuchen. Auch das Wachstum von Fibrozyten wird durch diese Medien unterdrückt (*Tsao et al., 1982*). Für die Anzucht der Klauenzellen wurden kommerziell erhältliche Komplettmedien für Keratinozyten verwendet, die alle neben anderen wachstumsfördernden Faktoren EGF enthielten. EGF hat eine starke mitogene Wirkung auf epidermale Keratinozyten, zusätzlich inhibiert es die Differenzierung (*Eckfalck et al., 1991; Holbrook und Hennings, 1983; Rheinwald und Green, 1977; Wakita und Takigawa, 1999*). Trotz der genannten Vorteile hat sich das verwendete serumfreie Komplettmedium für die bovinen Keratinozyten nicht bewährt. Der Anteil der Fibrozyten war zwar deutlich reduziert, aber gleichzeitig war die Proliferationsrate der Keratinozyten herabgesetzt. Des Weiteren wurden nur wenige unvollständig differenzierte Kolonien ausgebildet.

Hager et al. (1999) berichten, dass mit einem von Fibrozyten konditioniertem Medium die Anzucht und Subkultivierung von murinen epidermalen Keratinozyten verbessert wurde. Die Anzucht der bovinen epidermalen Keratinozyten konnte durch konditioniertes Medium nicht verbessert werden. Für die Herstellung von konditioniertem Medium wurden in Anlehnung an die Methode von *Hager et al. (1999)* subkonfluente Fibrozytenkulturen verwendet. Für die Konditionierung des Mediums ist die aktive Proliferation der Fibrozyten ausschlaggebend, da nur unter diesen Bedingungen Wachstumsfaktoren in das Medium abgegeben werden (*Hager et al., 1999*). Eine mögliche Erklärung für das Scheitern des konditionierten Mediums ist, dass die subkonfluenten, bovinen, dermalen Fibrozytenkulturen nicht mehr aktiv genug waren. In einer von dieser Arbeit unabhängig durchgeführten Versuchsreihe mit IL-1 α (*Mülling et al., 2004*) konnte diese Vermutung bestätigt werden. Um die Expression von FGFs in der

bovinen dermalen Fibrozytenkulturen zu erhöhen, wurde dem Medium IL-1 α in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Anschließend wurde dieses Medium auf eine genau definierte Zahl von Keratinozyten pipettiert und die Wirkung des Mediums anhand des Anstiegs der Zellzahl bestimmt. Nur das Medium, das von frisch ausgesäten Fibrozyten konditioniert worden war, hatte einen positiven Einfluss auf die Proliferationsrate der Keratinozyten. Ab dem Erreichen einer Konfluenz von 50% in den Fibrozytenkulturen konnte, im Vergleich zu der mitgeführten Negativkontrolle, kein positiver Effekt mehr festgestellt werden.

Da es unmöglich war, eine reine Keratinozytenpopulation aus der Klaue zu isolieren, handelte es sich bei den Primärkulturen immer um Mischkulturen. In diesen Kulturen waren immer epidermale Keratinozyten und dermale Fibrozyten vertreten. Sehr selten wurden vereinzelt Melanozyten mit angezchtet. Da Fibrozyten unter den normalen Kultivierungsbedingungen wesentlich schneller wuchsen, bestand immer die Gefahr des Überwucherns der Keratinozyten. Eine Reinkultur ist jedoch für die Untersuchung verschiedenster Faktoren, die Wachstum und die Differenzierung beeinflussen, unerlässlich. Auf die unterschiedlichen Methoden zur Eliminierung von Fibrozyten wird im nächsten Abschnitt eingegangen. Allerdings darf nicht vergessen werden, dass einige Fibrozyten in den Kulturen einen positiven Effekt auf die Keratinozyten haben. Der Fibrozytenanteil darf jedoch nicht ein Drittel der gesamten Zellzahl übersteigen. Eine gewebespezifische Differenzierung ist abhängig von den dermoepidermalen Wechselwirkungen (*Mass-Szabowski et al., 2001; Smola et al., 1999*). Einen großen Einfluss haben die von den dermalen Fibrozyten gebildeten FGFs. FGFs können entweder dem Medium zugegeben werden oder werden in Kokulturen direkt von den Fibrozyten gebildet. Die Anzahl und Zusammensetzung der von Fibrozyten in Kokulturen gebildeten FGFs entspricht mit Sicherheit eher der *in vivo* Situation. Kokulturen von dermalen und epidermalen Zellen der Klaue haben zusätzlich den Vorteil, dass die gebildeten FGFs artspezifisch sind. Bovine Wachstumsfaktoren sind, abgesehen von wenigen Ausnahmen, nicht kommerziell erhältlich.

Von den unterschiedlichen verwendeten Methoden zur Eliminierung von Fibrozyten aus den Kokulturen war die einfachste die Ablösung der Fibrozyten mit einem Zellschaber. Eine gute Kenntnis der Zellmorphologie und sorgfältiges Arbeiten sind die Grundvoraussetzungen für einen Erfolg mit dieser Methode. Bei einer Anwendung über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen können gute Ergebnisse erzielt werden. Ferner konnte das Wachstum und die Differenzierung einzelner Keratinozytenkolonien unterstützt werden, indem die angrenzenden Zellen abgelöst wurden. Dies verschaffte der

Kolonie einen Vorteil durch ein erhöhtes Nährstoffangebot und genügend Freiraum zur seitlichen Ausdehnung. Nachteilig ist der hohe Arbeitsaufwand. Die Zellen müssen unter Berücksichtigung der gesetzten Markierungen mindestens jeden zweiten Tag beurteilt werden. Zusätzlich besteht immer die Gefahr, einige Fibrozyten zu übersehen, was zu einer Überwucherung führen kann.

Auch beim single well cloning sind gute Kenntnisse der Zellmorphologie unentbehrlich, um zu entscheiden, welche Zellen weiter angezüchtet werden sollen. Es besteht die Gefahr Keratinozyten mit Fibroblasten zu verwechseln, da diese Zellen einzeln liegend ein ähnliches Erscheinungsbild aufweisen können. Allerdings würde ein derartiger Irrtum nach einigen Tagen in der Kultur erkennbar sein, da die morphologischen Unterschiede von Keratinozyten und Fibrozyten dann deutlicher ausgeprägt sind. Eine weitere Schwierigkeit ist die mikroskopische Beurteilung der Ränder der Vertiefungen einer 96-Lochplatte. Dieser Bereich ist im Mikroskop nur unscharf darzustellen, es besteht die Gefahr, dort Fibrozyten zu übersehen. Ist eine einzelne Zelle in einer Vertiefung als Keratinozyt identifiziert worden, so war die Etablierung einer Zelllinie nur dann erfolgreich, wenn es sich um eine Stammzelle handelte. Ansonsten degenerierte die Zelle, wenn es sich um ein postmitotisches Exemplar handelte. Falls es nach nur wenigen Mitosen zur terminalen Differenzierung aller Zellen kam, war dies ein deutlicher Hinweis, dass eine transit amplifying cell isoliert worden war.

Magnetic-activated cell sorting (MACS) ist ein System zur Isolierung und Anreicherung einer vorher gewählten Zellart (*Miltenyi et al., 1990*). *Formanek et al. (1998)* konnten mit dieser Methode effektiv eine hochgereinigte Fraktion oraler Keratinozyten gewinnen. Die eigenen, zur Trennung der epidermalen Keratinozyten von den dermalen Fibrozyten durchgeführten Separationen waren jedoch unbefriedigend. In der gereinigten Keratinozytenfraktion tauchte bei der anschließenden Anzucht immer wieder eine variierende, meist geringe Anzahl von Fibrozyten auf. Aufgrund der höheren Proliferationsrate stieg der Anteil der Fibrozyten in diesen Kulturen schnell an. Die Ursache für das Scheitern dieser Methode dürfte die Wahl des Antikörpers sein. Der verwendete markierte Antikörper war gegen humane Fibrozyten gerichtet, wobei nichts über eine Kreuzreaktivität mit bovinem Gewebe bekannt war. Ein gegen spezifische Oberflächenantigene der bovinen epidermalen Keratinozyten gerichteter Antikörper ist nicht verfügbar. Epidermale Stammzellen weisen eine sehr hohe Dichte an β_1 Integrinen auf (*Dunnwald et al., 2001; Levy et al., 2000; Potten und Booth, 2002*). Eine Trennung mit gegen β_1 Integrine gerichteten Antikörpern ist aber nicht möglich, da sie auch von Fibrozyten exprimiert werden (*Herzhoff et al., 1999; Szulgit et al., 2002*). Auch Keratine kommen nicht in Frage. Sie könnten zwar markiert werden, aber dafür müsste die

Zellmembran aufgebrochen werden und die betroffenen Zellen wären für eine weitere Anzuchtung nicht geeignet.

Die parallele Kultivierung bei unterschiedlichen Temperaturen von 37°C und 34°C beruhte auf zwei Gegebenheiten. Die äußere Haut ist den Witterungsverhältnissen ausgesetzt, folglich erreicht sie nie die Körperkerntemperatur von 37°C. Unter physiologischen Bedingungen liegt die Temperatur zwischen 30 und 33°C (*Gibbs et al., 1998*). *Ponec et al. (1997)* konnten mit ihrem *in vitro* Modell für die Haut bei 33°C in Abwesenheit von EGF eine gut differenzierte Epidermis anzüchten. Diese Kultur wies größere Ähnlichkeiten mit der Haut *in vivo* auf als mit Kulturen, die bei 37°C inkubiert wurden. *Gibbs et al. (1998)* postulieren, dass ein Temperaturgradient in der Haut die Morphogenese der Keratinozyten reguliert. Es ist fraglich, ob diese Umwelteinflüsse auch einen Einfluss auf die lebenden Zellschichten der Klauenepidermis ausüben. An der Klaue muss die Dicke der Epidermis mit berücksichtigt werden, das Stratum corneum erreicht eine Dicke von etwa 1 cm und im Stratum spinosum werden bis zu 70 Zellschichten ausgebildet (*Mülling 1993; 2000*). Vor allem die stark ausgebildete Hornschicht führt zu einer guten Isolierung der darunter liegenden Zellschichten. Daher ist es unwahrscheinlich, dass äußere Temperaturschwankungen einen großen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten in dieser Schicht ausüben. Es konnte *in vitro* keine Beeinflussung durch die Inkubationstemperatur nachgewiesen werden. Proliferation und Differenzierung der aus der Klauenepidermis isolierten Keratinozyten waren bei den gewählten Inkubationstemperaturen gleich. Der zweite Grund für die Wahl einer Bebrütungstemperatur von 34°C war die Überlegung, durch die gewählten Bedingungen den Fibrozytenanteil in den Mischkulturen zu reduzieren. Gestützt wurde diese Überlegung durch Berichte von *Eckalck et al. (1990)* und *Wunn et al. (1999)*, dass Fibrozyten bei 34°C nur langsam wuchsen. Durch die eigenen Untersuchungen konnten diese Ergebnisse nur bedingt nachvollzogen werden. Die Wachstumsrate der Fibrozyten wurde durch die niedrig gewählte Inkubationstemperatur nur geringfügig herabgesetzt. Eine relevante Reduzierung der dermalen Fibrozyten in den Mischkulturen konnte nicht beobachtet werden.

Bei der Probenaufbereitung für die Licht- und Elektronenmikroskopie hat es sich bewährt, die Zellen und Kolonien vorsichtig mit einem Zellschaber vom Untergrund des Kultivierungsgefäßes abzulösen. Bei dieser Methode bleibt die überwiegende Anzahl der ausgebildeten Zellkontakte erhalten und die Zellen werden nicht so stark geschädigt. Löst man einen Zellrasen mit Trypsin ab, so werden fast alle Zellkontakte zerstört und auch die Zellstruktur verändert sich. Betrachtet man ein mittels Trypsin gewonnenes Zellpellet

unter dem Mikroskop, so sieht man nur veränderte Zellen. Diese Zellen sind nur sehr eingeschränkt zu beurteilen.

3. Differenzierung und Charakterisierung der angezüchteten Zellen

Um die Adhäsion der Zellen an dem Untergrund zu verbessern, wurden mit BD Matrigel^{TN}-Matrix oder Kollagen I beschichtete Kultivierungsgefäße verwendet. Die BD Matrigel^{TN}-Matrix enthält Bestandteile der Basalmembran, wie Laminin und Kollagen Typ IV. Diese Beschichtung wurde primär eingesetzt, um die Zelladhäsion zu steigern, jedoch waren auch Wachstumsfaktoren wie TGF- β und FGF in dieser Mischung enthalten. Die Basalmembrankomponenten sollen vor allem bei Stammzellen, die über eine sehr große Zahl von β_1 Integrinen verfügen (*Bickenbach und Chism, 1998; Dunnwald et al., 2001; Potteen and Booth, 2002; Zhu et al., 1999*), zu einer gesteigerten Adhäsion führen. Eine Anreicherung von Stammzellen wäre für die weitere Anzüchtung von Vorteil, da nur diese Zellen über ein unbegrenztes Wachstumspotential verfügen (*Alonso und Watt, 2003; Bickenbach und Chism, 1998*). Einen weiteren, vorteilhaften Nebeneffekt versprachen die in der BD Matrigel^{TN}-Matrix enthaltenen Wachstumsfaktoren.

Die Adhäsion der angezüchteten Zellen konnte durch die verschiedenen Beschichtungen nicht gesteigert werden. Die Anzahl der adhären Zellen war im Vergleich zu der an unbeschichteten Kultivierungsgefäßen in etwa gleich. Daher wurde die Anzüchtung der Zellen überwiegend auf unbeschichteten Kultivierungsgefäßen aus Plastik durchgeführt. Auch die Proliferationsrate, sowie Differenzierung und Koloniebildung wurde nicht messbar beeinflusst, die in der BD Matrigel^{TN}-Matrix enthaltenen Wachstumsfaktoren hatten keinen erkennbaren Einfluss auf die angezüchteten Zellen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass FGF auf Keratinozyten zwar eine mitogene Wirkung hat, diese aber durch TGF- β aufgehoben wird. TGF- β ist ein potenter Inhibitor der Proliferation epidermaler Keratinozyten (*Uchi et al., 2000; Yamasaki et al., 2003*), die Differenzierung wird von diesem Faktor jedoch nicht beeinflusst (*Pasonen-Seppänen et al., 2003*).

Proliferationsrate und Differenzierungsgrad der angezüchteten Keratinozyten wurden durch mehrere Faktoren beeinflusst. Das Alter des Tieres, von dem die Klauen für die Zellisolierung stammten, hatte einen Einfluss. Es konnte beobachtet werden, dass Primärkulturen von jüngeren Tieren ein tendenziell besseres Wachstumspotential *in vitro* aufwiesen. Für die Zellisolierung wurden nur Klauen ohne pathologische Befunde verwendet, um in der Kultur repräsentative Zellen für die biologischen Prozesse gesunder Klauen zu erhalten.

Ein wichtiger Gesichtspunkt war der Anteil dermalen Fibrozyten in den unterschiedlichen Primärkulturen. Durch die Eliminierung der dermalen Fibrozyten konnten reine Keratinozytenkulturen gewonnen werden. Diese Kulturen wuchsen viel langsamer als Mischkulturen. Auch war die Subkultivierung dieser Reinkulturen nur über einen begrenzten Zeitraum möglich. Maximal wurden 35 Passagen innerhalb eines Jahres erreicht. Die Anzahl der gebildeten Keratinozytenkolonien war viel geringer als in den Mischkulturen. Die entstandenen Kolonien waren klein und unvollständig differenziert. Es wurden nur wenige Zelllagen ausgebildet und sehr selten konnten verhornte Zellen beobachtet werden. Weitaus häufiger waren einzelne, differenzierte Zellen oder auch kleine, ausdifferenzierte Zellverbände freischwimmend im Medium anzutreffen. In Keratinozytenreinkulturen differenziert sich die Mehrzahl der Zellen, ohne dabei Kolonien auszubilden. Die differenzierten Zellen lösen sich vom Untergrund des Kultivierungsgefäßes ab. Auch *Holbrook und Hennings (1983)* beschreiben, dass sich terminal differenzierte Zellen ablösen und in das Medium abschwimmen. Nach *El-Ghalbzouri et al. (2002a)* ist eine normale Differenzierung von Keratinozyten in Abwesenheit von Fibrozyten nur mit einer entsprechenden Mediumsupplementierung zu erreichen. Ohne Fibrozyten besteht eine angezüchtete Epidermis nur aus zwei bis drei lebenden Zelllagen, die von einem dünnen Stratum corneum bedeckt sind. Die eigenen Befunde entsprechen diesen Ergebnissen. Allerdings konnte der Differenzierungsgrad der reinen Keratinozytenkulturen nur im geringen Masse verbessert werden, wenn sie mit kommerziell erhältlichen Komplettdien für Keratinozyten kultiviert wurden. Diese Medien enthielten bereits ein Gemisch verschiedener Wachstumsfaktoren, wie EGF und wachstumsfördernder Substanzen, wie Hydrokortison. Der Haupteffekt war ein Anstieg der Anzahl ausgebildeter Kolonien. Die Zahl der gebildeten Zelllagen blieb jedoch gleich. Ein Grund für das Scheitern der Anzüchtung mit kommerziellen Medien kann sein, dass die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren nicht den optimalen Bedingungen für die Differenzierung der bovinen Keratinozyten entsprachen. Die verwendeten Komplettdien verfügten über eine optimale Zusammensetzung für die Anzüchtung humaner, epidermalen Zellen.

Epidermale Keratinozyten regulieren ihr Wachstum mittels eines doppelten parakrinen Mechanismus (*Maas-Szabowski et al., 2001; Werner und Smola, 2001*). Darunter versteht man, dass die Keratinozyten Faktoren produzieren, die eine Expression von Wachstumsfaktoren in den dermalen Fibrozyten induzieren. IL-1 wird von den Keratinozyten der Haut synthetisiert und verbleibt im Zytoplasma. Normalerweise geht es bei Abschilferung von Hornzellen verloren. Bei Verletzungen oder mechanischen Deformationen der Haut wird es in großen Mengen freigesetzt (*Uchi et al. 2000*). Da *in vitro* Modelle epidermalen Keratinozyten mit einem pathologischen Zustand *in vivo*

verglichen werden können (*El-Ghalbzouri et al., 2002a*), ist mit einer erhöhten Expression von IL-1 zu rechnen. Durch das von den Keratinozyten freigesetzte IL-1 α wird in den dermalen Fibrozyten die Expression von KGF und GM-CSF induziert. KGF wird als Hauptmediator dermo-epidermaler Interaktionen angesehen und verfügt über eine starke mitogene Wirkung (*Maas-Szabowski et al., 1999; Marchese et al., 2001; Werner und Smola, 2001*). Nach *Marchese et al. (2001)* unterstützt KGF die frühen Stadien der Differenzierung und inhibiert die terminale Differenzierung der Keratinozyten. GM-CSF ist ebenfalls ein wichtiger Regulator der Proliferation und Differenzierung epidermaler Keratinozyten (*Maas-Szabowski et al., 2001*). Dieser Wachstumsfaktor verfügt ebenfalls über eine mitogene Wirkung, zusätzlich fördert er die späten Differenzierungsstadien in den suprabasalen Zellen der Haut (*Werner und Smola, 2001*). Ein gewisser Anteil dermalen Fibrozyten in den Kulturen wirkte sich positiv sowohl auf die Proliferation als auch auf die Differenzierung der bovinen Keratinozyten aus. Der Anteil der dermalen Fibrozyten durfte jedoch nicht größer als ein Drittel sein, da sonst die Keratinozyten von den Fibrozyten überwuchert wurden. Die von den Fibrozyten gebildeten FGFs führten zu einer gesteigerten Proliferationsrate der Keratinozyten. Die Anzahl der ausgebildeten Kolonien war stark erhöht. Bereits im Anfangsstadium waren die Keratinozytenkolonien deutlich als eine kleine Gruppe von 40 bis 60 μm großen, runden Zellen erkennbar. Bei einem zu hohen Fibrozytenanteil in der Kultur kam es in diesem Stadium des Öfteren zur Überwucherung von Kolonien.

Innerhalb einer Woche vergrößerte sich der Umfang der Kolonien beträchtlich und die Keratinozyten begannen mit der Ausbildung einer zweiten Zellschicht. In den folgenden 4 bis 6 Wochen kam es zu einer Zunahme des Umfangs und der Anzahl der Zellschichten. Der Differenzierungsgrad der gebildeten Kolonien variierte in Abhängigkeit von der Zelllinie und der Anzahl von Passagen. Die Ausbildung gewebespezifisch differenzierter Kolonien erfolgte in der Regel nur bis zur zehnten Passage. Diese dreidimensionalen Kolonien können auch als organotypische Kokulturen bezeichnet werden. *Eun und Nam (2003)* berichten, dass in Anwesenheit von dermalen Komponenten, wie Fibrozyten, dreidimensionale Kulturen der Haut *in vivo* ähneln. Die organotypischen Kokulturen der Rinderklaue bildeten so viele Zelllagen aus, dass ihre Anzahl erst durch die lichtmikroskopische Untersuchung bestimmt werden konnte. Die größten Kulturen waren 1 cm lang, 0,7 cm breit und hatten eine Dicke von 1 mm. Makroskopisch glichen sie einer unvollständig verhornten Epidermis (Abb. 7c).

In manchen Kulturen konnten keine eindeutig erkennbaren Kolonien beobachtet werden. Nach der Ausbildung eines Monolayers, mit dem für Epithelzellen typischen kopfsteinpflasterähnlichen Aussehen (Abb. 7a), erfolgte der Aufbau einer kompletten zweiten Zellschicht. In einigen Bereichen wurden auch noch mehr Schichten ausgebildet.

In den oberen Zellagen waren vermehrt große, differenzierte, zum Teil kernlose Zellen sichtbar. Es ist denkbar, dass es sich bei diesen Kulturen um Mischkulturen mit einem sehr kleinen Fibrozytenanteil handelt. Dieser scheint für eine Wachstumsstimulation ausreichend zu sein, aber zu gering, um eine großflächige Differenzierung der Keratinozyten zu beeinträchtigen.

Die zur Anzüchtung genutzten Medien hatten einen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der Zellen. Um das Wachstum von Keratinozytenreinkulturen zu steigern, wurde RPMI 1640 mit 20 % FBS angereichert. Durch den höheren Serumanteil sollte auch die Konzentration der im Serum enthaltenen wachstumsfördernden Inhaltsstoffe, z.B. EGF und Vitamin A, heraufgesetzt werden. Ein kleiner Erfolg konnte hiermit erzielt werden. Es wurden weniger Vakuolen im Zytoplasma beobachtet und die Anzahl extrem großer Zellen wurde reduziert. Eine sichtbare Steigerung des Zellwachstums konnte dennoch nicht beobachtet werden.

Auch das jeweils verwendete Medium spielte eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Keratinozytenkolonien. Die größten und am besten differenzierten Kolonien wurden mit einem Mediengemisch, bestehend aus DMEM, supplementiert mit 10 % FBS und serumfreien Komplettmedium für Keratinozyten, im Verhältnis 1:2 angezüchtet. Der Erfolg mit diesem Gemisch ist zum einen auf den Serumanteil und zum anderen auf die im Komplettmedium enthaltenen Wachstumsfaktoren zurückzuführen. Des Weiteren wurde durch den hohen Anteil serumfreien Mediums das Wachstum der Fibrozyten eingeschränkt. So wurden zwar von den Fibrozyten FGFs synthetisiert aber gleichzeitig die Gefahr des Überwucherns der Keratinozytenkolonien stark reduziert.

Bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen der Keratinozytenkolonien und der organotypischen Kulturen wurden die Anzahl der gebildeten Zellschichten, sowie deren Differenzierungsgrad beurteilt. Die gebildeten „Kolonien“ konnten in drei Gruppen mit verschiedenen Differenzierungsgraden eingeteilt werden. Die zur ersten Gruppe gehörenden kolonieähnlichen Zellansammlungen waren mit dem Invert-Mikroskop nur schwer von echten Kolonien zu trennen. Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung war der hohe Anteil dermalen Fibrozyten sofort erkennbar. Der Aufbau dieser Zellgebilde unterschied sich eindeutig von einem mehrschichtigen, verhornten Plattenepithel. Es gibt mehrere Erklärungen für die Entstehung dieser Zellansammlungen. Die einfachste ist, dass es sich um eine Kultur mit einem hohen Fibrozytenanteil handelt. Nach dem Erreichen der Konfluenz begannen auch die Fibrozyten in einer zweiten Ebene zu wachsen. Dies geschah jedoch nicht gleichmäßig, sondern punktuell auf bestimmte Bereiche begrenzt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass es sich um überwucherte

Keratinocytenkolonien handelt. In diesen Kolonien wurden die Keratinocyten durch schneller wachsende Fibrozyten verdrängt, bzw. an den Rand gedrückt.

Die zweite Gruppe wurde von den unvollständig differenzierten Kolonien gebildet. Es wurden 5 bis 9 übereinanderliegende Zellschichten ausgebildet. Die Architektur dieser Kolonien war mit der Epidermis vergleichbar. Die unteren Zellschichten wurden von polygonalen oder kubischen Zellen gebildet. In den oberen Zellschichten flachten die Zellen ab. Die superfiziellen Zellen waren oft stark abgeplattet und besaßen schmale, längliche Zellkerne. Auch für die Ausbildung dieser unvollständig differenzierten Kolonien gibt es verschiedene Möglichkeiten. Die einfachste ist, dass ein Teil der Kolonien für die mikroskopischen Untersuchungen fixiert wurde, bevor die gewebespezifische Differenzierung abgeschlossen war. Bei anderen waren die Kultivierungsbedingungen nicht optimal, das heißt, die Konzentration der Wachstumsfaktoren entsprach nicht den für eine gewebespezifische Differenzierung erforderlichen Bedingungen. Nach *El-Ghalbzouri et al. (2002a)* besteht eine angezüchtete Epidermis nur aus zwei bis drei lebenden Zellschichten und einem dünnen Stratum corneum, wenn sie ohne dermale Fibrozyten oder eine entsprechende Mediumsupplementierung kultiviert wurde.

Gewebespezifisch differenzierte Kolonien, die auch als organotypische Kulturen bezeichnet werden können, bildeten die dritte Gruppe. Sie bestanden aus bis zu 22 Zellschichten. Die Ausbildung der morphologischen Merkmale dieser Kolonien war mit denen der Klauenepidermis *in vivo* vergleichbar. Innerhalb der Kolonien konnten drei Regionen mit verschiedenen Differenzierungsstadien unterschieden werden. Eine basale Zellschicht lag direkt auf dem Boden des Kultivierungsgefäßes. Hier waren annähernd kubische Zellen mit einem zentral gelegenen Zellkern anzutreffen. Diese Zellschicht glich dem Stratum basale der Klauenepidermis *in vivo*. Dort ist das morphologische Erscheinungsbild der Basalzellen abhängig von ihrer Lage. Die Form der Zellen variiert von annähernd kubisch bis hochprismatisch (*Fürst, 1992; Mülling 1993*). Ihre Zellkerne sind entweder zentral oder am oberen Zellpol lokalisiert (*Mülling, 1993*).

Darauf folgte eine intermediäre Zellschicht, die aus 10 bis 18 Zellschichten bestand und dem Stratum spinosum der Klauenepidermis *in vivo* entsprach. *In vitro* waren überwiegend polygonale Zellen mit vielen, stachelartigen Ausläufern anzutreffen (Abb. 9a). *In vivo* sind es polygonale Zellen (*Mülling, 1993*) mit Ausbildung von Zellausläufern, die dieser Schicht das charakteristische Aussehen verleihen (*Fürst, 1992*). Aufgrund einer vermehrten Keratinsynthese kommt es im Stratum spinosum zu einer Zunahme von Keratinfilamenten, die in Form einer streifigen Maserung sichtbar sind (*Mülling, 2003*). Diese Maserung war auch *in vitro* deutlich erkennbar.

Es folgte die superfizielle Zellschicht, bestehend aus 3 bis 5 unterschiedlich stark verhornten Zellschichten. Hier waren unterschiedlich stark abgeflachte, länglichovale Zellen

sichtbar. Einige Zellen enthielten nur noch einen basophilen pyknotischen Zellkernrest. Die Zellen färbten sich aufgrund ihres hohen Gehaltes an Keratinfilamenten mit einer 1%igen Methylenblau-Azur-II-Lösung dunkelblau an. Diese Zellschicht war mit den unteren Zelllagen des Stratum corneum der Klauenepidermis *in vivo* vergleichbar. Nach *Mülling (1993)* sind junge Hornzellen der Klauenepidermis gegenüber den Spinosazellen deutlich abgeflacht, langgezogen spindelförmig und besitzen oft noch einen Kernrest. Obwohl die bovinen Keratinozyten aus drei verschiedenen Segmenten isoliert wurden, konnten in den organotypischen Kulturen keine Segmentspezifität festgestellt werden. Zellen aus dem proximalen Abschnitt des Ballensegmentes bildeten im Gegensatz zu der Situation *in vivo* kein Stratum granulosum aus. In Kulturen, deren Zellen aus dem Kron- und Sohlensegment stammten, wurde entsprechend des Aufbaues der Klauenepidermis *in vivo* kein Stratum granulosum ausgebildet. Da *in vitro* die Dermis, die mit Ausstülpungen die Grundlage für Hornröhrchen und Hornblättchen bildet, sowie jegliche mechanische Belastung fehlen, ist nicht mit einer segmentspezifischen Differenzierung der Kulturen zu rechnen.

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden überwiegend Kolonien mit gewebespezifischer Differenzierung berücksichtigt. Die räumliche Anordnung der Zellen wich in manchen Regionen von der Architektur der Klauenepidermis *in vivo* ab. Eine klare Trennung unterschiedlich differenzierter Areale war nicht immer gegeben. So lagen noch undifferenzierte Zellen mit wenigen, locker angeordneten Keratinfilamenten zwischen Zellen, deren Zytoplasma mit dicken Keratinfilamentbündeln fast vollständig ausgefüllt war. Für diese Mischung der verschiedenen Differenzierungsstadien gibt es unterschiedliche Erklärungsmöglichkeiten. Nach *Andriani et al. (2003)* und *Poumay und Leclercq-Smekens (1998)* ist die Bindung der Keratinozyten an die Extrazellulärmatrix der Basalmembran für eine polarisierte Organisation des Epithels absolut notwendig. Eine strukturierte Basalmembran wird aber bei der Anzüchtung epidermaler Keratinozyten in Kultivierungsgefäßen aus Plastik nicht ausgebildet. Das gleiche gilt für Kollagen beschichtete Kultivierungsgefäße (*Bohnert et al., 1986; Watt, 1988*). Auch in den organotypischen Kulturen der Klauenepidermis waren weder Basalmembran noch Hemidesmosomen sichtbar. Neben der Basalmembran ist auch der Kontakt zu den dermalen Fibrozyten entscheidend für eine regelrechte Morphologie (*Andriani et al., 2003; Merne und Syrjänen*). Es ist wahrscheinlich, dass innerhalb der Kolonien nicht alle basalen Zellen Berührung mit Fibrozyten hatten. Als Folge der nichtausgebildeten Verbindungen zu dermalen Komponenten bzw. Fibrozyten ging die polare Organisation des Epithels verloren. Zusätzlich ist die Klauenepidermis *in vivo* ständig Druck- und

Zugbelastungen ausgesetzt, dagegen fehlt *in vitro* jegliche mechanische Belastung. Diese Einbuße hat mit Sicherheit Auswirkungen auf die Architektur der Kolonien.

Es wurde beschrieben, dass in dreidimensionalen, organotypischen Kokulturen verschiedene Organellen wie Keratohyalin granula, MCGs und Desmosomen in ähnlicher Weise wie in der normalen Haut ausgebildet werden (*Eun und Nam, 2003; Hinterhuber et al., 2002; Stark et al., 1999*). Im Folgenden werden die eigenen Befunde entsprechend der Abfolge der Differenzierungsphasen epidermaler Keratinozyten diskutiert.

Die basale Zellschicht bestand aus rundlichen Zellen, deren Zytoplasma entsprechend der Situation *in vivo* (*Dirks, 1985; Mülling, 1993*) von einzelnen Intermediärfilamenten oder dünnen Filamentbündeln durchzogen wurde. Mit Hilfe des immunogold labeling konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei diesen Intermediärfilamenten um Keratinfilamente handelte (Abb. 17a). Mit den monoklonalen Antikörpern AE1 und AE3 gelang eine Markierung der Filamente. Ein Teil der Keratinfilamentbündel zog zu den zahlreich ausgebildeten Desmosomen. Desmosomen sind adhäsive Zellverbindungen, die dem Gewebe mechanische Belastbarkeit verleihen (*Green and Gaudry, 2000*). Im Stratum basale der Klauenepidermis werden die Basalzellen *in vivo* durch eine relativ geringe Zahl kleiner Desmosomen verbunden (*Mülling, 1993*). Im Gegensatz zum Stratum basale der Klauenepidermis *in vivo* lagen zwischen den Filamentbündeln *in vitro* nur wenige Zellorganellen. Perinukleär war ein schmaler filamentfreier Raum sichtbar, wie auch für die Klauenepidermis *in vivo* beschrieben wurde (*Dirks, 1985*). Allerdings wurde häufiger beobachtet, dass an einigen Stellen die Keratinfilamente direkt der Kernmembran anlagen.

Vergleichbar mit den Stratum spinosum der Klauenepidermis *in vivo*, nahm in den intermediären Zellschichten die Größe der Zellen zu. Auch die Anzahl der Keratinfilamente stieg stetig an. Die Filamentbündel wurden zunehmend dicker, und es konnte beobachtet werden, dass sie sich mit benachbarten Bündeln zusammenlagern. Diese Befunde entsprachen den ultrastrukturellen Beobachtungen der Spinosazellen der Klauenepidermis *in vivo* von *Dirks (1985)* und *Mülling (1993)*. Wie in Abb. 12a erkennbar, änderte sich die Ausrichtung der Keratinfilamente *in vitro* oft von Zelle zu Zelle. Eine mögliche Ursache hierfür war das Fehlen der mechanischen Belastung *in vitro*. Die Zellen waren entsprechend des morphologischen Erscheinungsbilds *in vivo* (*Mülling, 1993*) durch eine erhebliche Anzahl von Desmosomen miteinander verbunden. Neben vollständig ausdifferenzierten Desmosomen (Abb. 13a) konnte in den unteren Zelllagen der intermediären Schicht auch die Entstehung von Desmosomen entdeckt werden (Abb. 12b + c). In den oberen Zelllagen vergrößerte sich die Anzahl an Desmosomen und die Zellen waren durch viele ineinandergreifende Zellfortsätze stark miteinander verzahnt.

Genau wie in der Klauenepidermis *in vivo* (Mülling, 1993) konnten zwischen den Desmosomen vereinzelt gap junctions beobachtet werden (Abb. 13b).

Das Stratum spinosum der Klauenepidermis zeichnet sich *in vivo* durch spezifische Organellen, die membrane coated granules (MCGs), aus. Diese membranumhüllten Granula erreichen einen Durchmesser von 180 bis 300 nm (Budras *et al.*, 1996; Mülling, 1993). *In vitro* wurden MCGs von Zellen gebildet, deren Zytoplasma mit vielen Keratinfilamenten angefüllt war. Der Durchmesser dieser Organellen wies große Schwankungen auf. Mit Werten zwischen 290 und 400 nm waren die MCGs größer als *in vivo*. Meist hatte der Inhalt der MCGs eine feinkörnige bis homogene elektronendichte Struktur (Abb. 14b). Äußerst selten konnten in organotypischen Kulturen der bovinen Keratinozyten MCGs beobachtet werden, die übereinandergeschichtete Membranstapel mit charakteristischer Periodizität enthielten (Textabb. 13). Auch Hinterhuber *et al.* (2002) und Stark *et al.* (1999) konnten in ihren organotypischen Modellen der Haut MCGs elektronenmikroskopisch nachweisen. Madison *et al.* (1988) konnten beobachten, dass murine Keratinozyten in ihrem Kokultivierungssystem viele MCGs bildeten, deren Inhalt in den Interzellularraum ausgeschleust wurde. Auch in dem organotypischen *in vitro* Modell der Rinderklaue kam es zur Exozytose des Inhaltes der MCGs, der dann als Interzellularkitt in den ovalen Erweiterungen des Interzellularspaltes zwischen Desmosomen sichtbar war (Abb. 15a + b). Der Interzellularkitt ist ein Hauptsyntheseprodukt epidermaler Zellen der Rinderklaue *in vivo* (Mülling und Budras, 1998) und ist in den blasigen Erweiterungen des Interzellularspaltes deutlich vermehrt (Mülling, 1993).

Der cornified envelope wird sowohl in der Epidermis als auch von epidermalen Keratinozyten *in vitro* ausgebildet (Rice und Green, 1979). In Keratinozytenkolonien ist es in den oberen differenzierteren Zelllagen sichtbar (Banks-Schlegel und Green, 1981; Holbrook und Hennings, 1983). In den unverhornten Zellen der oberen Zelllagen der intermediären Zellschicht war der cornified envelope als homogene, elektronendichte Linie auch in den bovinen Keratinozytenkolonien sichtbar (Abb. 14c). Es war der inneren Oberfläche der Zellmembran angelagert. Der cornified envelope ist ein Marker der späten Differenzierungsstadien, wodurch eine weitreichende Differenzierung der gewebespezifisch differenzierten Kolonien belegt wird.

Mit zunehmendem Differenzierungsgrad kam es zu fortschreitenden Veränderungen der Zellkerne (Abb. 11 a + b). Der perinukleäre, filamentfreie Raum wurde immer schmaler und die Kernmembran war immer undeutlicher erkennbar. Besonders in den oberen Zelllagen nahm die Kondensation des Chromatins stark zu. Das zu Schollen kondensierte Chromatin lag an der Innenseite der Kernmembran. Im Stratum spinosum der

Klauenepidermis sind *in vivo* Kernwandhyperchromasie und pyknotische Zellkerne in den oberen Zellschichten anzutreffen (Mülling, 1993).

Die superfizielle Zellschicht bestand aus 4 bis 5 teilweise unvollständig verhornten Zellschichten. Die Zellen waren durch zahlreiche wellenförmige Ausstülpungen der Zellmembran eng miteinander verbunden (Abb. 16b). Es konnten vergleichbar mit der Situation *in vivo* fortschreitende Auflösungserscheinungen der Desmosomen beobachtet werden. Zwischen den Resten der Desmosomen waren Erweiterungen des Interzellularspaltes vorzufinden. Diese Erweiterungen waren nur selten mit feinkörnigem Interzellularkitt ausgefüllt, in der Regel waren sie elektronendurchlässig (Abb. 16a). Wie im Stratum corneum der Klauenepidermis *in vivo* (Mülling, 1993) waren viele Zellen mit dicken, dichtgepackten Keratinmassen vollständig ausgefüllt (Abb. 16a + c). Auch in den oberen Zellschichten von Keratinozytenkolonien wurden Zellen beschrieben, die mit Keratinfilamenten ausgefüllt waren (Bohnert et al., 1986; Green, 1977; Holbrook und Hennings, 1983). Nach Banks-Schlegel und Green (1981) sowie Watt (1988) besitzen in dieser Zone die meisten Zellen noch einen Zellkern. Diese Beobachtung kann durch die eigenen Ergebnisse bestätigt werden.

Mit Hilfe der immunhistochemischen und molekularbiologischen Charakterisierung wurde nachgewiesen, dass es sich bei den angezüchteten Zellen um Keratinozyten handelte. Überwiegend wurde dies mit monoklonalen Antikörpern gegen Keratinproteine bewiesen. Keratine sind die unverwechselbaren, spezifischen Intermediärfilamente der Epithelzellen. Das von ihnen gebildete Muster ist einzigartig für das jeweilige Epithel (Kitahara und Ogawa, 1994). Jedes epitheliale Gewebe synthetisiert ein charakteristisches Keratinpaar, bei der Haut ist dies K1 und K10 (Kitahara und Ogawa, 1994; Moll et al., 1982; Poumay und Leclercq-Smekens, 1998). Auch *in vitro* werden von Epidermiszellen Keratinproteine gebildet (Fuchs und Green, 1978). Die exprimierten Keratine können jedoch von den *in vivo* synthetisierten leicht abweichen (Baden, 1984; Bowden et al., 1987; Ekfalck et al., 1991).

Mit einem ELISA konnten die Zellen direkt auf dem Kultivierungsgefäß charakterisiert werden. Im Gegensatz zu der mikroskopischen Charakterisierung konnten mit dieser Methode auch undifferenzierte Zellen eindeutig zugeordnet werden. Ein weiterer Vorteil ist der geringe Zeitaufwand, weshalb sich die Methode für regelmäßige Kontrollen der angezüchteten Zellen gut bewährt hat. Mit den monoklonalen Antikörpern AE1 und AE3, die das gesamte Spektrum der sauren und basischen Keratine abdecken, wurden Keratinproteine nachgewiesen. Zusätzlich wurde an einigen Zelllinien ein Nachweis von Desmoglein, einem Baustein der Desmosomen, durchgeführt.

Keratine sind α -helikale Proteine, deren Molekulargewicht zwischen 40 und 70 kD liegt (Cooper und Sun, 1986; Sun et al., 1983, Tseng et al., 1982). Hochstetter (1998) extrahierte aus dem Stratum corneum des Ballensegmentes der Rinderklaue Keratinproteine mit einem Molekulargewicht von 40 bis 80 kD. Hendry et al. (2001) weisen in der gesunden Klauenepidermis die Keratine K4, K5/6, K10 und K14 nach. Bei dem Vorhandensein eines Klauengeschwürs konnten sie zusätzlich K16 dokumentieren.

Mit den eigenen durchgeführten Elektrophoresen (SDS-PAGE) konnten in den angezüchteten bovinen Keratinozyten insgesamt 11 unterschiedliche Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 41 bis 67 kD dargestellt werden. Die am häufigsten nachgewiesene Bande hatte ein Molekulargewicht von 67 kD, dies entsprach den Keratinnummern 1 bis 3 beim Rind nach Schiller et al. (1982). Des Weiteren wurden häufig Proteine mit einem Molekulargewicht von 62 - 65 kD und 54 kD in den angezüchteten bovinen Keratinozyten beobachtet. Nach Schiller et al. (1982) werden den Proteinen im Bereich von 62 – 65 kD die Keratinnummern 4 und 5 zugeordnet, dem Protein mit einem Molekulargewicht von 54 kD die Keratinnummern 13 und 14. Die Keratine 4/5 und 13/14 bilden ein Keratinpaar, das typisch für die Haut des Rindes ist. Der Nachweis dieses Keratinpaars belegt, dass in den gewebespezifischen Kulturen eine der Situation *in vivo* entsprechende Differenzierung erfolgt. Verwendet man die humanmedizinischen Keratinnummern nach Moll et al. (1982), entspricht dies dem Keratinpaar K1 und K10, dem charakteristischen Keratinpaar der Haut. *In vitro* wird von den eigenen Kulturen häufig das für die Haut und somit auch die Klaue typische Keratinpaar exprimiert.

Mit dem an die Elektrophorese angeschlossenen Western Blot konnte nachgewiesen werden, dass die Banden mit einem Molekulargewicht von 50, 54, 58, 62-65 und 67 kD Keratinproteine repräsentierten. Die Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 58 kD entspricht der Keratinnummer 6 nach Schiller et al. (1982). Dieses Keratin ist in der gesunden Klaue nachgewiesen worden (Hendry et al., 2001). Nach Schiller et al. (1982) wird der Bande mit einem Molekulargewicht von 58 kD die Keratinnummer 16 zugeordnet. Keratin 16 wurde von Hendry et al. (2001) bei Geschwüererkrankungen nachgewiesen. K16 ist ein Indikator für aktivierte Keratinozyten und essentiell für die Wundheilung. Der Nachweis von K16 ist nicht verwunderlich, da eine Expression dieses Keratins auch in anderen *in vitro* Modellen beschrieben wurde (Hinterhuber et al., 2002; Stark et al., 1999). El-Ghalbzouri et al. (2002a) bieten folgende Erklärung für die Expression von K16 an. *In vitro* Modelle epidermaler Keratinozyten können mit einem pathologischen Zustand *in vivo* verglichen werden. Die Expression der Keratine 6, 16 und 17 weist auf einen aktivierten Zustand der Keratinozyten hin.

4. Praktischer Einsatz des Modells und Folgeprojekte

Das *in vitro* Modell der Klauenepidermis bietet ein weitgefächertes Spektrum an praktischen Anwendungsmöglichkeiten. Praxisbezogene Studien könnten die Wirkung von Futtermittelzusätzen, wie z.B. Biotin und Zink, auf die angezüchteten epidermalen Zellen der Rinderklaue untersuchen. Neben einem Studium des Einflusses auf Wachstum und Differenzierung sowie der für die Hornqualität relevanten Faktoren, wäre es möglich, die optimale Wirkstoffkonzentration *in vitro* zu ermitteln. Auch die Anheftungsmechanismen von unterschiedlichen Bakterien, sowie das Ausmaß der von ihnen verursachten Zellschädigung, können studiert werden. Mit den hier vorgestellten Modellen wurde bereits im Labor die Infektion von bovinen epidermalen Keratinozyten und Hautexplants mit Treponemen untersucht. Dermatitis digitalis ist eine der am weitesten verbreiteten Klauenerkrankungen. Es ist immer noch nicht vollständig geklärt, welche Rolle *Treponema ssp.* in der Ätiologie der Dermatitis digitalis spielen. Zur Klärung dieser Frage ist ein adäquates *in vitro* Modell notwendig, das zusätzlich die Erforschung von Virulenzfaktoren der Treponemen erlaubt. In den bereits durchgeführten Versuchen wurden die bovinen epidermalen Keratinozyten bis zu vier Tage lang mit einer Treponemensuspension inkubiert. Bereits nach vier Stunden konnten die ersten adhärennten Treponemen nachgewiesen werden. Nach 24 Stunden konnten leichte Zellschädigungen beobachtet werden. Nach drei Tagen waren die Zellen stark geschädigt, oft war nur noch ein einheitlicher Zellklumpen erkennbar. In diesem Stadium lösten sich viele Zellen vom Untergrund des Kultivierungsgefäßes (Nebel *et al.*, 2004b). Weitere Untersuchungen der Virulenzfaktoren sind geplant.

Auch in der Grundlagenforschung sind noch viele Fragen offen. So ist z.B. die Pathogenese der Klauenrehe nach wie vor nicht vollständig geklärt, insbesondere die Kopplung der metabolischen Probleme mit den zellulären Veränderungen innerhalb der Klaue. Eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Klauenerkrankungen spielen dermo-epidermale Wechselwirkungen, die auch einen großen Einfluss auf die Hornqualität ausüben. Mit Hilfe des Modells ist es möglich, die Wirkung einzelner Faktoren, wie z.B. IL-1 und KGF zu erforschen. Gute Kenntnisse der Wirkungsweise dieser Faktoren können zu einem besseren Verständnis von Klauenerkrankungen und damit zu einer verbesserten Prävention führen.

In einer weiteren Doktorarbeit, die auf den hier etablierten Modellen aufbaut, werden epidermale und dermale Zellen der Klaue in einer Perfusionskammer kultiviert. Die unterschiedlichen Zellarten werden bei der Anzüchtung durch eine Membran mit einer definierten Porengröße getrennt. Durch das Perfusionssystem wird das Nährstoff- und Sauerstoffangebot verbessert, was eine erhöhte Proliferationsrate zur Folge hat. Auch der Differenzierungsgrad der Zellen wird verbessert. Dieses System ermöglicht ein gezieltes

Studium der dermoepidermalen Wechselwirkungen. Im Gegensatz zu der „normalen“ Zellkultur kann bei diesem Modell dem Medium einer Zellart ein Wachstumsfaktor zugesetzt werden, um die Wirkung dieses Faktors auf die andere Zellart zu untersuchen (Nebel et al., 2004a).

4.1 Schlussfolgerung und Gewichtung der eigenen Befunde

In der Humanmedizin sind künstliche Hautäquivalente (Huang et al., 2003; Kim et al., 1999; Kremer et al., 2000) bei der Behandlung von Brandwunden von großer Bedeutung. Für die Erforschung verschiedenster Hauterkrankungen stehen viele, hochentwickelte *in vitro* Modelle zur Verfügung. Diese Untersuchungen werden überwiegend am murinen oder humanen Keratinozyten durchgeführt. In der Veterinärmedizin spielt die Behandlung von Brandwunden, sowie die plastische Chirurgie so gut wie keine Rolle. Dies ist einer der Gründe warum wenige *in vitro* Modelle epidermaler Zellen entwickelt wurden. Es stehen nur wenige *in vitro* Modelle, z.B. der Haut des Pferdes (Dahm et al., 2002) und des Hundes (Chan et al., 2002; Watson et al., 2004) sowie des Hufes (Wunn et al., 1999), für die Klärung veterinärmedizinischer Fragestellungen zur Verfügung. Keratinozyten aus der Rinderklaue wurden nur über sehr kurze Zeiträume und ausschließlich als Vergleich für Untersuchungen an humanen Keratinozyten (Baden und Kubilus, 1983; Kubilus et al., 1979) oder Keratinozyten des Fingernagels (Kitahara und Ogawa 1994) herangezogen.

In dieser Arbeit konnten aus dem komplexen Epithel der Klaue erfolgreich Keratinozyten isoliert werden. Neben der Etablierung einer normalen Zellkultur, die mehrere Zelllinien umfasste, konnte erstmals ein organotypisches Modell der Klaue beschrieben werden. Die ultrastrukturellen Untersuchungen ergaben, dass in diesem Modell viele charakteristische Merkmale der Klauenepidermis *in vivo* anzutreffen waren. Dies schloss die ausgebildeten Zellkontakte mit ein. Neben dem mechanischen Zusammenhalt durch Desmosomen waren gap junctions, die der Zellkommunikation dienen, sichtbar. Das organotypische Modell, das auf einer Kokultur von epidermalen Keratinozyten und dermalen Fibrozyten beruht, ist besonders für weite Untersuchungen dermo-epidermaler Interaktionen geeignet. Aber auch die gewöhnliche Monolayer-Kultur ist für das Studium einzelner, das Wachstum beeinflussender Faktoren von großer Bedeutung. Mit dem gleichen oder einem ähnlichen Versuchsaufbau, wie er in dieser Arbeit zur Auswertung des Zellwachstums bei der Verwendung unterschiedlicher Medien (siehe Punkt 1.6.7) verwendet wurde, kann die Wirkung beliebiger Substanzen auf die Zellproliferation erforscht werden. Selbstverständlich sind viele andere Einsatzmöglichkeiten denkbar.