

B. Literaturübersicht

1. Definition und Aufbau der Rinderklaue

Die Klaue wird in der Literatur im engeren und im weiteren Sinne definiert (MÜLLING, 1993). ZIETZSCHMANN (1918) führt den Begriff Zehenendorgan ein und definiert diesen als die modifizierte Haut der Zehenenden.

Im weiteren Sinne versteht man unter dem Begriff Klaue den Horn- oder Klauenschuh mit allen von ihm eingeschlossenen Anteilen, inklusive der Knochen, Bänder, Gelenke und Weichteile (HOHMANN, 1902; ZIETZSCHMANN, 1918).

Topographisch wird die Klaue nach ZIETZSCHMANN (1918) und WILKENS (1963) in fünf Segmente gegliedert: Saum-, Kron-, Wand-, Sohlen- und Ballensegment. Der vordere Bereich des Klauenschuhes wird als Dorsalwand bezeichnet. Dabei ist zu beachten, dass der proximale Rand von der kutanen Klauentasche überlagert wird und somit nicht sichtbar, aber in der Regel deutlich palpierbar ist (WILKENS, 1963; HUBER et al., 1984). Im Bereich der Tracht unterscheidet man die Trachtenhöhe und die Trachtenlänge (MÜLLING, 1993).

Die Klaue lässt sich als ein spezifisches haarloses Hautorgan analog zur äußeren Haut in drei Schichten gliedern. Man unterscheidet die Klauenunterhaut (*Subcutis ungulae*), Klauenlederhaut (*Dermis ungulae*) und die verhornende Klauenoberhaut (*Epidermis ungulae*). Diese Schichten sind je nach Lage in den jeweiligen Segmenten typisch modifiziert (BUDRAS et al., 1989; BUDRAS et al., 1996; BUDRAS et al., 2002). Charakteristisch sind eine Haar- und weitgehende Drüsenlosigkeit dieser Schichten, sowie eine starke Epidermisproliferation mit hochgradiger Verhornung (HABERMEHL, 1984).

Die Klauenunterhaut (*Subcutis ungulae*) überzieht die zentralen Stützteile und weist an den drei verschiedenen Segmenten eine unterschiedlich starke Entwicklung auf. Sie fehlt im Wand- und Sohlensegment (MÜLLING und BUDRAS, 2002).

Die Klauenlederhaut (*Dermis ungulae*) liegt der Unterhaut als äußerste gefäßführende Schicht auf und wird in ein Stratum reticulare und ein Stratum papillare gegliedert (MÜLLING et al., 2002). Der Papillarkörper ist im Saum-, Kron-, Sohlen- und Ballensegment durch die Ausbildung von fingerförmigen Ausstülpungen, den Lederhautzöttchen, gekennzeichnet. Das Wandsegment hingegen weist leistenförmige Ausstülpungen in Form von Blättchen auf. Diese bewirken eine feste Verbindung zwischen der Epidermis und dem Innenteil der Klaue. Außerdem ermöglichen sie eine bis zu 40-fache Vergrößerung der Kontaktfläche und sorgen damit für den Nährstofftransport zwischen den beiden Schichten (WILKENS, 1963; HABERMEHL, 1984; FÜRST, 1992). Der Kontaktbereich zwischen *Dermis ungulae* und

Epidermis ungulae, sowie die Verbindung zwischen diesen beiden, ist für das Zehenendorgan von großer Bedeutung, da Störungen in diesem Bereich zu krankhaften Veränderungen führen können (HIRSCHBERG et al., 1999), wie z.B. zur Klauenrehe. So treten Veränderungen im Initialstadium der Rehe an der dermoepidermalen Grenze auf (MÜLLING und LISCHER, 2002).

Die Klauenoberhaut, *Epidermis ungulae*, bildet durch das Absterben oberflächlicher Zellen den schützenden Hornschuh der Klaue. Die in diesem Zusammenhang stehenden Begriffe Keratinisierung und Verhornung werden unter Punkt 2.2.3 näher erläutert. Der Hornschuh besteht aus abgestorbenen Hornzellen die durch eine interzelluläre Kittsubstanz stabil untereinander verbunden werden (BUDRAS et al., 1998).

2. Aufbau, Differenzierung und Proliferation der Epidermis

Die Epidermis als Grenze zwischen Organismus und Umgebung übernimmt eine Vielzahl lebenswichtiger Funktionen, insbesondere den Schutz gegen mechanische, chemische und mikrobielle Insulte und Austrocknung. Keratinozyten, die überwiegende zelluläre Komponente der Epidermis, erfüllen diese unterschiedlichen Funktionen dank ihrer Fähigkeit zu Wachstum, Differenzierung und vorprogrammiertem Zelltod mit der nachfolgenden Ausbildung einer abdeckenden Hornschicht. Die Epidermis setzt sich aus vier verschiedenen Zelltypen zusammen: Keratinozyten, Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen. Die verschiedenen Zelllagen werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur von innen nach außen als Basalzellschicht (Stratum basale), Stachelzellschicht (Stratum spinosum), Körnerzellschicht (Stratum granulosum) und Hornzellschicht (Stratum corneum) bezeichnet (SCOTT et al., 1988) (s. Abb. 1).

Grundlage für das Wachstum der Epidermis sind die teilungsfähigen Keratinozyten der Basalzellschicht, während Barrierefunktion und programmierter Zelltod überwiegend Eigenschaften der suprabasalen sich differenzierenden Keratinozyten bzw. Hornzellen sind. Im weiteren Verlauf der Ausführungen wird der Weg der bovinen Keratinozyten durch die einzelnen Hautschichten beschrieben. Dabei werden die für die jeweilige Schicht typischen Merkmale dargestellt.

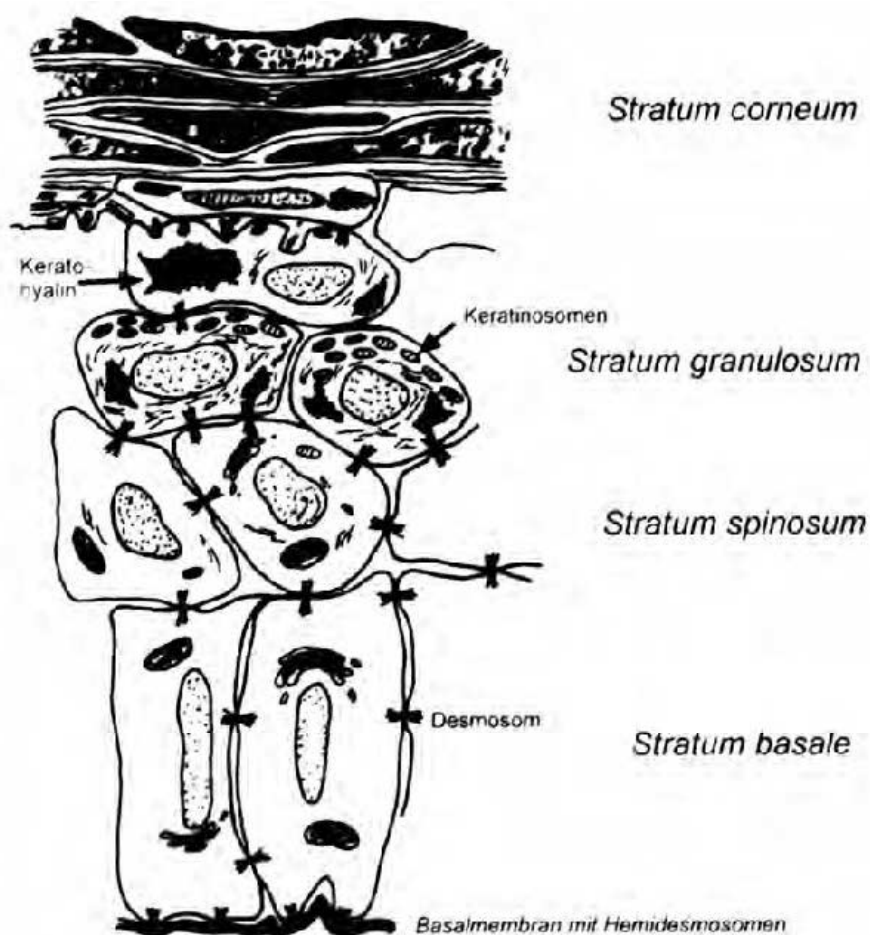


Abb. 1

Schematischer Querschnitt durch die humane Epidermis. Im *Stratum basale* stehen die Zellen säulenförmig auf der Basalmembran und sind über Hemidesmosomen mit dieser verbunden. Über Desmosomen stehen die Zellen untereinander in Kontakt. Nach dem Beginn der Differenzierung werden die Keratinozyten in das *Stratum spinosum* geschoben. Das *Stratum corneum* besteht aus Hornzellen mit umgebenden bzw. ummantelten Lipidschichten (ZELLMER et al., 2001).

2.1 Basalmembran

Die Basalmembran (Membrana basalis) besteht aus der Lamina lucida, der Lamina densa und der Lamina fibroreticularis (MERKER, 1994). Die Lamina densa und Lamina lucida werden in der Elektronenmikroskopie unter dem Begriff Basallamina (Lamina basalis) zusammengefasst (WEYRAUCH und SMOLLICH, 1998). Die Basallamina wird als Produkt jener Epidermiszellen beschrieben, denen sie unmittelbar anliegt. An ihrem Aufbau beteiligen sich das amorphe Kollagen Typ IV sowie für die Zellhaftung wichtige Strukturen wie Glykoproteine und Fibronectin (RYO et al., 2004).

Die Lamina fibroreticularis wird von Fibroblasten gebildet. Sie besteht aus Kollagenfasern vom Typ III (Retikulinfasern), Ankerfilamenten Kollagen Typ VII und Grundsubstanz (ANDRIANI et al., 2004), die über Ankerfilamente mit dem Kollagentyp III der Lederhaut

verankert sind. Diese weist einen hohen Gehalt an Proteoglykanen auf, die eine „schmierstoffähnliche“ Konsistenz bedingen. Dies führt zu einer hohen Elastizität und Druckresistenz dieser Substanz (KOWALEWSKI et al., 2004).

In den Epithelzellen kommt es zur Ausbildung von Hemidesmosomen, welche punktförmige feste Haftkomplexe in dem über der Basalmembran gelegenen Abschnitt der epidermalen Zellmembran sind (MERKER, 1994). Diese elektronendichten Strukturen dienen der Anheftung der basalen Epidermiszellen an der darunter liegenden Basalmembran und verhindern die Ablösung der Zellen bei einwirkenden Scherkräften. Aus dem Zytoskelett ragen Keratinfilamente (welche zumeist aus den Zytokeratinen K5 und K14 aufgebaut sind) in den apikalen Plaque eines Hemidesmosoms ein. Über feinste Filamente ist dieser obere Plaque an einen darunter gelegenen zweiten Plaque angeheftet (ECKHART et al., 2003).

2.2 Stratum basale

Die Basalzellschicht besteht aus einer Lage von 10-15 µm hoch- bis isoprismatischen Zellen, die der Basalmembran aufliegen (SCOTT et al., 1988). Zytoplasmatische Ausläufer der Basalzellen, sogenannte Wurzelfüßchen, verbinden die Zellen mit der Basalmembran. Die Wurzelfüßchen der Basalzellen vergrößern die funktionelle Oberfläche der Epidermis, sowohl den Stoffaustausch (BUCHER, 1997), als auch die mechanische Verankerung. Die Basalzellen zeichnen sich durch runde, euchromatische Kerne aus und sind durch Hemidesmosomen fest an der Basallamina, sowie durch Desmosomen an den benachbarten Zellen verankert (STENN et al., 1988).

Desmosomen sind charakterisiert durch zellspezifische transmembrane Cadherine und Plattenepithel-typische Proteine (Desmoglein und Desmocollin) (McMILLAN et al., 2001). Die Hauptbestandteile der Desmosomen sind Phosphorproteine (Desmoglein und Desmocollin), sodass sie in vielerlei Hinsicht an Phosphorylierungsprozessen und an Protein-zu-Protein-Regulationen beteiligt sind (GREEN et al., 1996). Insgesamt betrachtet sind Desmosomen auch an aktiven Transportvorgängen beteiligt, die eine wichtige Rolle in der Morphogenese und der Regulation von Wachstumsfaktoren in der Differenzierung der Keratinozyten spielen (GREEN et al., 1996).

Der weit überwiegende Zelltyp der lebenden *Epidermis ungulae* sind die Keratinozyten. Diese Zellen ändern während ihres Wachstums und der Reifung mehrfach ihre Eigenschaften. Im Stratum basale kommen Stammzellen, *transit amplifying cells* und postmitotische Zellen vor, welche in der Lage sind, sich in zwei Tochterzellen zu teilen. Während eines

Teilungsvorganges der Keratinozyten durchlaufen diese verschiedenen Phasen des Zellzyklus (G₀-, G₁-, S-, G₂- und M-Phase) (s. Abb.2).

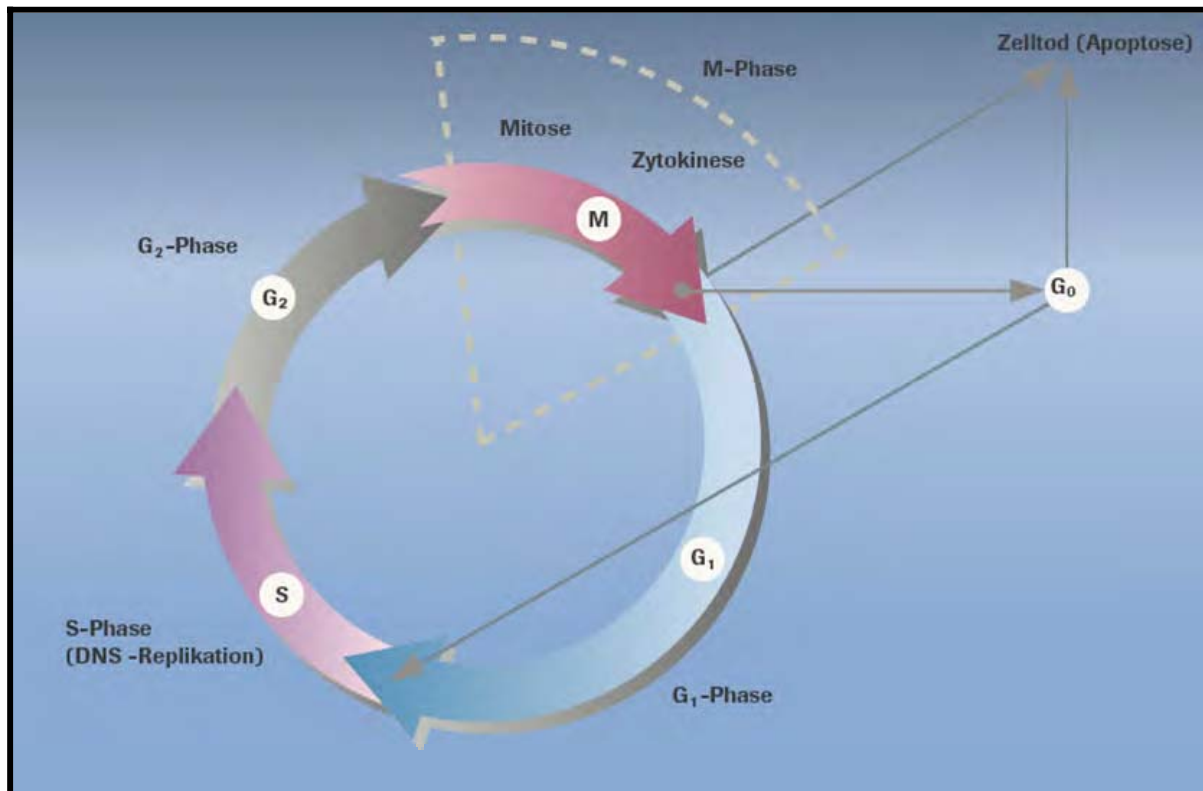


Abb. 2 Zellzyklus der Proliferation und Differenzierung des humanen Keratinozyten (WOHLRAB, 1973)

Sich ständig erneuernde Epithelien beinhalten in der Basalzellschicht kleine, undifferenzierte Stammzellen (BICKENBACH et al., 1998). Stammzellen proliferieren nur langsam und bleiben das ganze Leben im Gewebe enthalten (DUNNWALD et al., 2001). Stammzellen haben eine sehr lange Lebensdauer und eine lange zyklische Phase der Mitose, aber eine kurze S-Phase (POTTEN et al., 1988). Wird das Epithel verletzt, haben die beschriebenen Stammzellen das Potential, sich zu so genannten *transit amplifying cells* weiterzuentwickeln, die sich nur vorübergehend vermehren (BYRNE et al., 2003). Diese Zellen differenzieren in einem weiteren Schritt zur endgültigen Zellpopulation aus.

2.2.1 Integrine

Eine wichtige Rolle bei der Etablierung von Zell-Kontakten sowie in der zellulären Informationsvermittlung spielen die Integrine. Integrine sind heterodimere Transmembranrezeptoren. Diese gehören zu der Familie der Glykoproteine und bestehen jeweils aus einer α - und einer β -Untereinheit (HUANG et al., 2003). Wichtig für die

Adhäsion mit der extrazellulären Matrix sind β_1 -Integrine, die zudem eine wichtige Rolle bei Zell-zu-Zellkontakten spielen. Sie regulieren die Initiation der terminalen Differenzierung, indem sie die Differenzierung unterdrücken. Epidermale Stammzellen exprimieren einen höheren Level an β_1 -Integrinen und sind stärker adhäsiv als die *transit amplifying cells*, die sich erst später differenzieren (ZHOU et al., 2004).

Die unterschiedlichen Zelltypen können in der Gewebezüchtung anhand der Form ihrer Kolonien unterschieden werden. Stammzellen erneuern sich selbst und bilden große Kolonien (BICKENBACH et al., 1998), während *transit amplifying cells* nur kleine Kolonien bilden (ZHOU et al., 2004). Durch eine höhere Expression von β_1 -Integrinen ist die Adhäsion der Stammzellen höher, wodurch sie im Stratum basale gehalten werden (ZHOU et al., 2004). Zellen, deren Integrin-Rezeptoren nicht mit Integrinen besetzt werden, differenzieren sich, wohingegen solche, deren Integrin-Rezeptoren besetzt sind, dies unterlassen (ZHOU et al., 2004).

2.2.2 Cadherine

Nach WASCHKE et al. (2004) gibt es zwei Hauptklassen von adhäsiven Rezeptoren, die Integrine (s. o.) und die Cadherine. Letztere werden von Keratinozyten in allen Hautschichten exprimiert, während die Integrine hauptsächlich auf das Stratum basale beschränkt sind. Sie gehören zu einer großen Familie von Calcium abhängigen zellulären Adhäsionsmolekülen (HINES et al., 1999). Cadherine sind wichtig für die Regulation der Integrine, damit die Keratinozyten sich während der Differenzierung vom Stratum basale trennen können. Versuche mit Antikörpern gegen Cadherine haben *in vitro* gezeigt, dass in Abwesenheit von Cadherinen kein mehrschichtiges Epithel entstehen kann, obwohl das Wachstum der Keratinozyten unbeeinflusst blieb (TAKEDA, 2004).

Es können mehrere Arten von Cadherinen unterschieden werden, wobei in diesem Zusammenhang nur zwei genannt werden sollen. Zum einen die E-Cadherine, die sich in allen epithelialen Schichten befinden, und zum anderen die P-Cadherine, die auf die Basalzellschicht beschränkt sind (TAKEDA, 2004). Diese Cadherine vermitteln den Zellkontakt über einen homotypischen Mechanismus, d.h. E-Cadherine binden nur an E-Cadherine (HINES et al., 1999).

2.2.3 Keratinisierung und Verhornung

Unter Keratinisierung wird der Prozess verstanden, in dem sich lebende Epithelzellen differenzieren und spezifische Produkte bilden. Sie beginnt mit der mitotischen Teilung der Basalzellen und setzt sich im Stratum spinosum fort. Hier erfolgt die Bildung von spezifischen, filamentären und amorphen Zytokeratinen, die im *cornified envelope (CE)* (früher marginales Band) und im *membrane coating material (MCM)* (s. Punkt 2.3.1) vorkommen (MÜLLING und BUDRAS, 2002).

Die Verhornung beginnt mit dem programmierten Tod (Apoptose) der Epidermiszellen am Ende ihrer Differenzierung (BUDRAS et al., 1998). Die Keratinfilamente werden dabei untereinander verbunden und mit den Filaggrinen über Disulfidbrücken chemisch stabil vernetzt. Gleichzeitig werden Proteine synthetisiert, die sich an der inneren Oberfläche der Plasmamembran anlagern und den *cornified envelope* (s. Punkt 2.3.3) bilden (AKIYAMA et al., 2002).

Keratinfilamente (s. Punkt 2.2.3.2) sind die charakteristischen und bedeutendsten Intermediärfilamente in Epithelzellen, die das Zytoskelett aufbauen und die verhornten Zellen ausfüllen werden nachfolgend beschrieben. Zusätzlich werden auch die Keratinisierung, Verhornung und die Verhornungstypen abgehandelt.

2.2.3.1 Verhornungstypen

Nach MATOLTSY (1976) ist die Verhornung eine spezifische Form der Differenzierung von epithelialen Zellen, die sich aus einer Synthesephase und einer Transformationsphase zusammensetzt. Während der Synthesephase steigt die Produktion von Keratinfilamenten und *membrane coated material (MCM)*. Als Transformationsphase werden dann die weiteren Schritte der terminalen Differenzierung angesehen.

In der Literatur werden ein weicher und ein harter Verhornungstyp unterschieden, Hauptkriterium hierfür ist das Fehlen oder Auftreten eines Stratum granulosum (LARSSON et al., 1956). Bei der weichen Verhornung durchlaufen die Epidermiszellen ein Stratum granulosum, gekennzeichnet durch zahlreiche basophile Keratohyalin granula. Diese fehlen bei der harten Verhornung, so dass das Stratum spinosum nach Durchlaufen einer Verhornungszone direkt an das Stratum corneum grenzt (LARSSON et al., 1956). Biochemisch unterscheidet sich das Endprodukt der weichen Verhornung von dem der harten

Verhornung durch einen niedrigeren Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren (KÜNZEL, 1990).

2.2.3.2 Keratine

Keratine sind wasserunlösliche filamentäre Proteine mit einem Molekulargewicht von 40 bis 70 kD, sie besitzen einen hohen Schwefelgehalt durch Sulfhydryl-Gruppen. Bei den Säugetieren kommen 19 verschiedene Keratine vor, die 8 nm dicke Intermediärfilamente bilden (COOPER und SUN, 1986). Keratine besitzen einen mehrkettigen Grundbaustein bestehend aus mehreren Polypeptiden mit α -helikaler Struktur (LEE und BADEN, 1976). Diese Polypeptide werden in der Literatur als Zytokeratine, α -Keratine oder Keratinproteine bezeichnet.

Grundsätzlich unterscheidet man zwei verschiedene Keratintypen (Typ I + II), die sich anhand ihres isoelektrischen Punktes¹ (MOLL et al., 1982), ihres Molekulargewichtes und der Reaktion mit den monoklonalen Antikörpern AE1 und AE3 in zwei Gruppen unterteilen lassen (BOWDEN et al., 1987). Zum einen Typ I Keratine, welche kleiner (40 bis 64 kD) und saurer (pI 4.8 bis 5.7) sind, als die Keratine vom Typ II. Sie reagieren auf den monoklonalen Antikörper AE1. Typ II Keratine sind größer (54 bis 70 kD), basischer (pI 5.8 bis 8.0) und reagieren mit AE3 (BOWDEN et al., 1987). Welche Keratinproteine von einer Zelle exprimiert werden, hängt von der Art des Epithels und vom jeweiligen Differenzierungsgrad ab (BOWDEN et al., 1987). Nach HOCHSTETTER (1998) besitzen die Keratine des Rindes ein Molekulargewicht von 41 bis 80 kD. Die genaue Einteilung der Keratine von Mensch und Rind sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Keratine der zwei Typen mit ähnlichem Gewicht bilden Paare, die in der Regel während der Differenzierung zusammen exprimiert werden. Das basische (Typ II-Keratin) dieses Paares ist beim Menschen ca. 8 bis 10 kD und beim Rind sogar bis zu 15 kD größer als das saure (Typ I-Keratin) (COOPER und SUN, 1986).

¹ Als isoelektrischen Punkt (pI) eines Proteins bezeichnet man den pH-Wert, bei dem die Nettoladung des Proteins Null beträgt (Berg, 2003).

Tabelle 1 Übersicht über die Zytokeratine beim Mensch und Säugetier

Typ I (saure Keratine)				
Molekulargewicht (kD) und Keratinnummer beim Mensch nach Moll et al., 1982	Molekulargewicht (kD) beim Rind nach Cooper und Sun, 1986	Keratinnummer beim Rind nach Schiller et al., 1982	Reaktion mit monoklonalen Antikörpern	Vorkommen beim Rind nach Cooper und Sun, 1986
56.5 (10)	56,5	10	AE1	Flotzmaul
56.5 (10)	54	13,14	AE1	Haut
55 (12)	56	11, 12	-	Cornea
51 (13)	43	18	AE1	Oesophagus
50 (14/15)	50	16	AE1	Keratinocyten der Rinderklaue
46 /48 (16/17)	46	19	-	Hyperproliferation von Keratinocyten der Rinderklaue
45 (18)	45	21	-	einfaches Epithel
40 (19)	41	22	AE1	einfaches Epithel

Typ II (basische Keratine)				
Molekulargewicht (kD) und Keratinnummer beim Mensch nach Moll et al., 1982	Molekulargewicht (kD) und Keratinnummern beim Rind nach Cooper und Sun, 1986	Keratinnummer beim Rind nach Schiller et al., 1982	Reaktion mit monoklonalen Antikörpern	Vorkommen beim Rind nach Cooper und Sun, 1986
65-67 (1,2)	67	1-3	AE3	Flotzmaul
65-67 (1,2)	62-65	4,5	AE3	Haut
64 (3)	66	1-3	AE3	Cornea
59 (4)	58	6	AE3	Oesophagus
58 (5)	58	6	AE3	Keratinocyten
56 (6)	57	7	AE3	Hyperproliferation von Keratinocyten
52 (8)	55	8	AE3	einfaches Epithel

Die verschiedenen Epithelarten exprimieren Keratinpaare, deren Muster für sie typisch ist. So werden z.B. K5 und K14 ausschließlich von mehrschichtigen Epithelien exprimiert, wodurch dieses Paar als spezifischer Marker für Keratinozyten aus mehrschichtigen Epithelien angesehen wird (KITAHARA und OGAWA, 1994).

Aus der Rinderklauenepidermis isolierten LEE et al. (1976) vier filamentbildende Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 48 bis 60 kD. In der lebenden Epidermis der Klaue wurden von STEINERT und IDLER (1975) sieben und von MILSTONE und MC CUIRE (1981) sogar acht filamentbildende Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 49 bis 65 kD nachgewiesen. Neben den Keratinen K6, K16, K7 und K14 wurden von KVEDAR et al. (1986) zusätzlich ein basisches und vier saure für die Klaue spezifische Keratine nachgewiesen.

HENDRY et al. (2001) wiesen in der Epidermis der gesunden Rinderklaue K4, K5/6, K10 und K14 nach, wobei K5/6 sowie K14 in den Basalzellen und K10 in den suprabasalen Zelllagen vorgekommen war. Nach Angabe der Autoren konnte an Klauengeschwüren im Sohlensegment zusätzlich K16 nachgewiesen werden.

Eine weitere bei einem Sohlengeschwür auftretende Veränderung ist die räumliche Verteilung von K5/6 und K14, die nun nicht nur in den Basalzellen, sondern auch in den suprabasalen Zelllagen nachweisbar waren. In Hornproben aus der Ballenepidermis wies HOCHSTETTER (1998) vier saure und zwei basische Keratine mit einem Molekulargewicht von 44,5 bis 57,5 kD nach. In der Epidermis ändert sich die Keratinzusammensetzung von den unteren Schichten, die kleinere Keratinproteine aufweisen, zu den oberen Schichten, in denen größere exprimiert werden (FUCHS et al., 1987). Diese Größenzunahme beruht auf einer geänderten Proteinsynthese im Laufe des Differenzierungsprozesses. Abhängig von ihrem Auftreten in den Basalzellen oder den Suprabasalzellen werden die Keratine beider Typen daher noch in zwei Subtypen unterteilt. Keratine, die bereits in Basalzellen synthetisiert werden, gehören zum Subtyp B, während Keratinproteine vom Subtyp A erst später im Laufe der Differenzierung gebildet werden (BOWDEN et al., 1987).

2.3 Stratum spinosum

In der menschlichen Haut folgen der Basalzellschicht mehrere Lagen polyedrische Zellen, die über Desmosomen und Interzellularbrücken miteinander verbunden sind. Diese Zytoplasmafortsätze bedingen ein stacheliges Aussehen der Oberfläche dieser Zellen und sind daher auch verantwortlich für die Bezeichnung Stachelzellen, bzw. Stratum spinosum (STENN et al., 1998). In den tieferen Lagen sind die Kerne rund und die Zelllängsachsen stehen senkrecht zur Hautoberfläche. In den höheren Lagen werden die Kerne oval und die Zellen abgeflacht, wobei die längsten Kern- und Zelldurchmesser parallel zur Oberfläche ausgerichtet sind.

Im Klauenhornschuh kommt es zu einer stetigen Zunahme von Keratinfilamenten, die in alle Richtungen des Raums längs, quer und senkrecht verlaufen. Die Filamentbündel werden zunehmend dicker und häufig scheren einige Filamente aus einem Bündel heraus, um sich mit einem benachbarten Bündel zu vereinigen (DIRKS, 1985; MÜLLING, 1993). Zudem beschreibt MÜLLING (1993), dass es zu einem Anstieg der amorphen Keratinproteine kommt, die die Zellen zusammen mit den kompakten Bündeln in den oberen Zellschichten ausfüllen.

Im Stratum spinosum bleibt ein schmaler perinukleärer Raum frei von Keratinfilamenten. Die Zahl der Desmosomen steigt mit dem Differenzierungsgrad der Keratinozyten. Zwischen den Desmosomen können regelmäßig *Gap junctions* beobachtet werden. Bis zu den mittleren Zellschichten des Stratum spinosum sind intakte Zellorganellen sichtbar, danach kommt es zu einem schnell fortschreitenden Abbau der Zellorganellen, sodass die Zellen der oberen Zellschichten nur noch vereinzelt Fragmente der Zellorganellen enthalten (MÜLLING, 1993). Diese absterbenden Zellen erreichen dabei etwa die dreifache Größe der Basalzellen (DIRKS, 1985), dennoch sind typische Apoptosemerkmale wie Kernwandhyperchromasie sowie pyknotische Zellkerne erst in den obersten Zellschichten erkennbar, so dass im lichtmikroskopischen Bild nur noch flache Kernreste sichtbar sind (MÜLLING, 1993). In den Übergangszellen der Verhornung wird das an die innere Oberfläche der Zellmembran angelagerte *cornified envelope* (s. Punkt 2.3.3) als homogene, elektronendichte Linie sichtbar (MÜLLING, 1993), und die Durchmesser der Filamentbündel nehmen stetig zu (DIRKS, 1985).

Es bildet sich ein Interzellularspalt, der in den unteren und mittleren Lagen gleichmäßig eng ist. Dieser wird bei unregelmäßiger Weite in den oberen Lagen zunehmend breiter und ist dabei teils blasenförmig erweitert. In den unteren Zellschichten ist er elektronenoptisch leer.

2.3.1 Membrane coating material (MCM) in membrane coating granules (MCG)

Nach BUDRAS und MÜLLING (1998) ist das *membrane coating material (MCM)*, neben den Keratinen das zweite spezifische Syntheseprodukt epidermaler Keratinozyten der Rinderklaue. Die wichtigsten Funktionen des MCM bestehen in der festen mechanischen Verbindung der Zellen untereinander durch Glykoproteine (BRAGULLA und MÜLLING, 1994), dem Aufbau der Permeabilitätsbarriere durch Lipide (BUDRAS et al., 1998; LANDMANN, 1988), der Desquamation und dem Abbau von Zellorganellen und Desmosomen durch Enzyme (BUDRAS und BRAGULLA, 1991; BUDRAS et al., 1989; BUDRAS und SEIDEL, 1992; ANTHAUER et al., 2005). Die MCGs sind 200 bis 300 nm große kugelförmige bis rundlich ovale, spezifische zytoplasmatische Zellorganellen der Spinosazellen (HAYWARD, 1979; MATOLTSY und PARAKKAL, 1965). Sie besitzen in der Rinderklaue eine dreilagige Hüllmembran und in der menschlichen Haut eine lamelläre Binnenstruktur (HASHIMOTO, 1971; LANDMANN, 1988; MATOLTSY, 1966). Sie enthalten das *membrane coating material (MCM)*, welches neben geldrollenartig gestapelten Phospholipidlamellen auch aus Enzymen und feinkörnigen Glykoproteinen besteht (MÜLLING et al., 1992). Viele Autoren (BUDRAS et al., 1998; LANDMANN, 1988; MÜLLING et al., 1994) vergleichen den Hornzellverband mit dem Aufbau einer Ziegelmauer, wobei die Hornzellen die Ziegelsteine und das MCM den Mörtel darstellen (s. Abb. 3a, b).

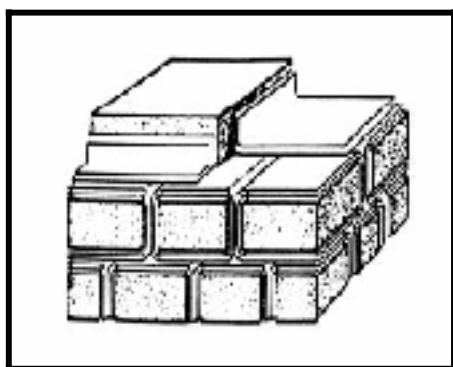


Abb. 3a: Modellhafte Darstellung des Hornzellverbandes der Haut nach Landmann (1991)

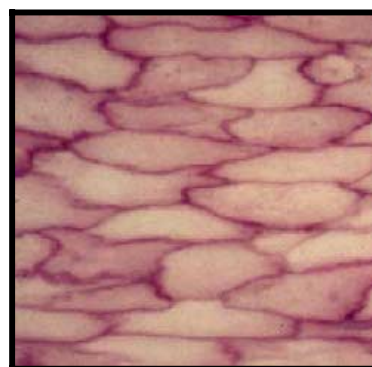


Abb. 3b: Hornzellverband der Rinderklaue (PAS-Färbung)

Das MCM wird von keratinisierenden Zellen gebildet (HAYWARD, 1979; MÜLLING und BUDRAS, 1998), wobei angenommen wird, dass es im Golgi-Apparat im Zusammenhang mit dem rauen endoplasmatischen Retikulum gebildet wird (MÜLLING, 1993). Es ist das einzige bekannte sekretorische Syntheseprodukt der epidermalen Keratinozyten (LANDMANN, 1988) und besteht aus Glykoproteinen und komplexen Lipiden. Nach MÜLLING und

BUDRAS (1998) variieren die Struktur und die biochemische Zusammensetzung des MCM je nach untersuchtem Segment der Klaue und den lokalen Anforderungen an das Biomaterial Klauenhorn.

In den oberen Spinoso- bis Granulosazellschichten wandern die MCGs in die Zellperipherie und konzentrieren sich besonders am distalen Zellpol, wo sie sich unter der Zellmembran aufreihen (MÜLLING und BUDRAS, 1998). Im oberen Stratum spinosum geben sie ihren Inhalt, das MCM, durch Exozytose in den Interzellularspalt ab (MÜLLING et al., 1994), wobei ihre dreilagige Hüllmembran sich an die Zellmembran anlagert und mit ihr verschmilzt (LANDMANN, 1988; MATOLTSY und PARAKKAL, 1965). Die kurzen Membranstapel fusionieren zu großflächigen, blattartigen Membranlagen (BRAGULLA et al., 1998). Mit seiner zunehmenden Füllung nimmt die Zahl der *Gap junctions* ab (HASHIMOTO, 1971). In besonders stark beanspruchtem hartem Horn der Klaue, dem Kronhorn, dominiert die Adhäsionsfunktion des Kittes in Form von feingranulären Glykoproteinen. Für die Stabilität der Zellverbindungen ist nicht nur die qualitative Zusammensetzung des Kittes entscheidend, sondern auch seine Menge und die Verankerung des Kittes über Zelladhäsionsmoleküle in der Zellmembran (BRAGULLA und MÜLLING, 1994).

2.3.2 Keratinfilament-assoziierte Proteine und Keratohyalingranula

Die Keratinfilament-assoziierten Proteine (KFAP) sind basische, histidinreiche Proteine (BADEN et al., 1984; KUBILUS et al., 1985). Sie werden in den oberen Zelllagen des Stratum spinosum und im Stratum granulosum exprimiert (BADEN, 1984; ZHANG et al., 2002). KFAP bilden die interfibrilläre Matrix und aggregieren die Keratinfilamente zu Bündeln (MARKOVA, 1993). Aufgrund dieser Fähigkeit und ihrer im Gegensatz zu den Keratinen relativ ungeordneten Struktur bezeichnen BUDRAS und HUSKAMP (1995) sie als amorphe Keratine. Zudem bewirken sie eine gute Elastizität des Zytoskeletts (MATOLTSY und PARAKKAL, 1965). Die bei der weichen Verhornung gebildeten Proteine benennen HINTNER et al. (1985) und MARKOVA et al. (1993) als Filaggrine. Filaggrin ist ein funktioneller Name, er steht für *filament aggregating protein* (KUBILUS et al., 1985). Sie besitzen beim Rind ein Molekulargewicht von 16 kD (MARKOVA et al., 1993).

Profilaggrin, der Vorläufer des Filaggrins (KUBILUS et al., 1985), ist ein großes, unlösliches und hoch phosphoryliertes Protein (BADEN, 1984; ISHIDA-YAMAMOTO et al., 1999). Nach ISHIDA-YAMAMOTO et al. (1999) ist das Molekulargewicht dieses Proteins größer als 400 kD. Es setzt sich zusammen aus 10 bis 12 hintereinander folgenden Kopien von

Filaggrin (GAN und STEINERT, 1993; ISHIDA-YAMAMOTO et al., 1999; ZHANG et al., 2002) und hydrophoben Verbindungssequenzen (GAN et al., 1991). Profilaggrin wird im Stratum granulosum synthetisiert und in den Keratohyalin granula gespeichert (FROHNES, 1999). Keratohyalin granula, die Profilaggrin enthalten, werden auch F-Granula genannt, um sie von den L-Granula zu unterscheiden, die Loricrin enthalten (ISHIDA-YAMAMOTO et al., 1999). Loricrin ist ein wichtiges Vorläuferprotein, das im Zuge der weichen Verhornung im Stratum granulosum in Form des Cysteinreichen Typs der Keratohyalin granula (L-Granula) gespeichert wird. Profilaggrin wird dephosphoryliert und proteolytisch in Filaggrinmonomere gespalten (ISHIDA-YAMAMOTO et al., 1999; KUBILUS et al., 1985). HINTNER et al. (1985) schreiben den Keratohyalin granula die alleinige Bildung der interfilamentären Substanz zu. Suprapapillär lässt sich eine geringere Menge dieser Proteine ermitteln als inter- und peripapillär. Durch Dephosphorylierung und Proteolyse entstehen die eigentlichen Filaggrine, die aber nur in den ersten drei bis fünf Hornzelllagen nachzuweisen sind. Danach zerfallen die Proteine durch enzymatischen Abbau zu freien Aminosäuren (HINTNER et al., 1985; MARKOVA et al., 1993).

2.3.3 *Cornified envelope* (marginales Band)

Gegen Ende der epidermalen Differenzierung wird an die innere Oberfläche der Zellmembran eine dritte Gruppe intrazellulärer Strukturproteine angelagert, die zusammen mit den Keratinfilamenten ein kontinuierliches Stützskelett der Hornzellen bilden (BADEN und KVEDAR, 1993; HAFTEK et al., 1991). Diese Proteine sind ein wesentlicher Bestandteil des *cornified envelope* (Abb. 4), das aus einem inneren Proteinanteil und einer äußeren vier bis fünf nm breiten Lipidhülle besteht (MEHREL et al., 1990). Die Proteinhülle tritt als unterschiedlich breiter elektronendichter Streifen auf und wird von HASHIMOTO (1971) als *cornified envelope* bezeichnet. Nach IJIMA et al. (2005) wird das *cornified envelope* sowohl bei der weichen, als auch bei der harten Verhornung gebildet.

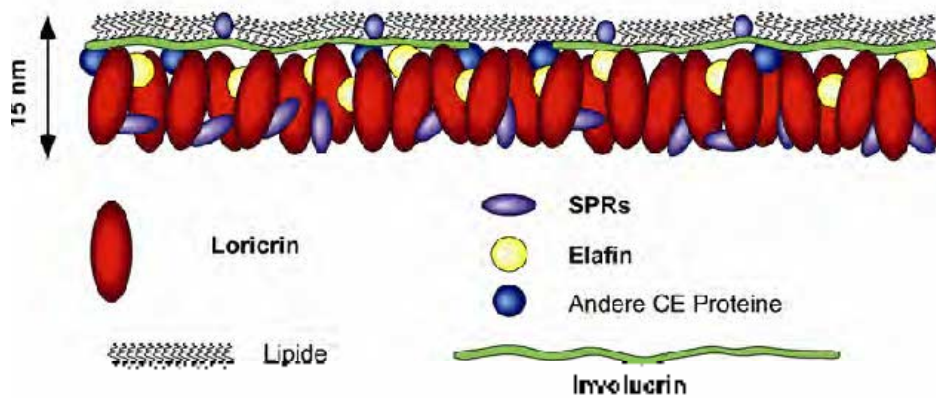


Abb. 4 Molekulares Modell des marginalen Bandes nach JARNIK et al. (1998)
 CE = *cornified envelope*
 SPRs = *small-proline-rich-Proteine*

Das *cornified envelope* ist nach HOHL (2005) die chemisch widerstandsfähigste, insbesondere sehr proteaseresistente Struktur in der Hornzelle und trägt maßgeblich zur physikalischen und chemischen Widerstandsfähigkeit der Hornzellschicht bei.

2.3.4 Stratum granulosum

Das Stratum granulosum in der Klauenepidermis kann je nach Lokalisation bis zu 15 Zelllagen enthalten (MÜLLING, 1993). Nach MÜLLING (1993) entsprechen die Zellen und Zellkerne in ihrer Größe und Form den oberen Spinosazellen. Das Zytoplasma der Zellen des Stratum granulosum ist mit kleinen intensiv basophilen Granula, den Keratohyalingranula, angefüllt. In den Keratohyalingranula der menschlichen Haut aggregieren Profilaggrin und Keratinfilamente miteinander (ZELLMER et al., 2001). In Folge weiterer Differenzierungsschritte kommt es zur Bildung von Filaggrin, das die Vernetzung der Keratinfilamente fördert und zur Bildung von Involucrin führt, das den späteren Korneozyten stabilisiert (ZELLMER et al., 2001).

2.4 Stratum corneum

In der Verhornungsgrenze werden bis zu fünf Lagen Übergangszellen sichtbar. Diese sind voluminösere und hellere Zellen mit einem pyknotischen Zellkern (MÜLLING, 1993).

Der Übergang zu den verhornten Zellen erfolgt als „Sprung in die Verhornung“ unter abrupter Veränderung der Zellgestalt und weitgehender Maskierung der Keratinfilamentbündel, sowie im Zwischenröhrchenhorn des proximalen Ballens unter Verlust der Keratohyalingranula. Stellenweise bietet die Verhornungsgrenze ein sägezahnartiges Bild, das durch die Zellzapfen entsteht, die mit ihren mehr oder weniger verhornten Spitzen über die Verhornungsgrenze der interpapillären Epidermis hinaus in das Stratum corneum ragen (BUDRAS et al., 1996).

Apikal an das physiologisch aktive Stratum spinosum schließt sich das inaktive Stratum corneum, die Hornzellschicht, an. Es besteht in der menschlichen Haut aus ausdifferenzierten Keratinozyten, die in multilamelläre Lipidschichten eingelagert sind (ZELLMER et al., 2001). Junge Hornzellen sind gegenüber den Spinosazellen deutlich abgeflacht, langgezogen spindelförmig und besitzen oft noch einen basophilen pyknotischen Zellkernrest. Die älteren Hornzellen sind noch etwas stärker abgeflacht und besitzen nur in den unteren Zellschichten Kernreste (MÜLLING, 1993).

Im Verlauf des Verhornungsprozesses sterben die Zellen ab, der Zellkern wird pyknotisch und löst sich auf. Das Keratin bleibt erhalten, da es chemisch und physikalisch sehr widerstandsfähig ist (BUCHER und WARTENBERG, 1997).

Im Ballen der Rinderklaue liefert das interpapilläre Zwischenröhrchenhorn den dominierenden Anteil der Hornmassen. An der Ballengrenze besteht das Stratum corneum noch aus 30 bis 40 Lagen. Im Bereich des Ballenwulstes gewinnt es distal rasch an Höhe und erreicht 60 bis 80 Zellschichten (MÜLLING, 1993).

2.5 Apoptose/Programmierter Zelltod

Die Apoptose ist eine morphologisch distinkte und genetisch regulierte Form des Zelltodes (FRÖDE, 1998) (s. Abb. 5). Im Gegensatz zur Nekrose wird die Apoptose durch extrazelluläre Signale ausgelöst, wie z.B. den Verlust essentieller Wachstumsfaktoren, die Aktivierung bestimmter Zelloberflächenrezeptoren, die Einwirkung von Glukokortikoidhormonen oder durch DNS-schädigende Agenzien (LEE et al., 2004).

Morphologische und biochemische Analysen apoptotischer Zellen lassen charakteristische Merkmale, wie Kondensation des Zytoplasmas, Segmentierung des Zellkerns und intranukleosomeren Abbau chromosomaler DNS erkennen (FALEIROS et al., 2004).

Morphologisch kann man zu Beginn der Apoptose eine Verringerung des Zellvolumens beobachten. Die Organellen bleiben im Gegensatz zur Nekrose intakt, und der Stoffwechsel der apoptotischen Zelle läuft zunächst unbeeinflusst weiter. Der Zellkern schrumpft und das Chromatin verdichtet sich (RUCKERT et al., 2000).

In vivo werden die apoptotischen Körperchen von phagozytierenden Zellen aufgenommen und somit ohne lokale Entzündungsreaktionen eliminiert. Deshalb lassen sie sich in Gewebeschnitten nur sehr selten nachweisen (GALLE et al., 2005). *In vitro* kann man zum Ende der Apoptose die Auflösung der apoptotischen Körperchen beobachten bzw. dokumentieren. Die Haut stellt in diesem Zusammenhang eine Sonderform der Apoptose, ohne Desintegration und Phagozytose der Zellen, dar.

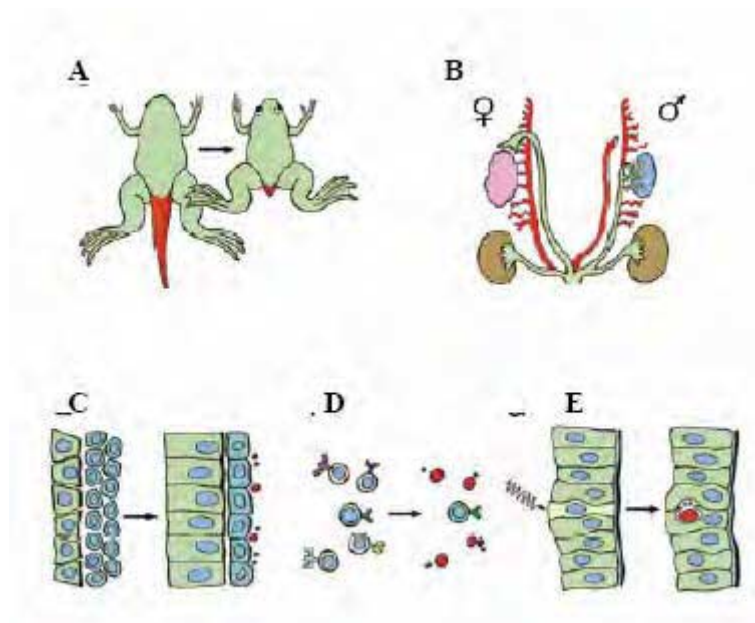


Abb. 5 Funktionen der Apoptose. (A) Entfernung von nicht mehr benötigten Strukturen während der Entwicklung eines Lebewesens, z. B. des Schwanzes der Kaulquappe. (B) Entfernung von nicht mehr benötigten Geweben während der Entwicklung der Geschlechtsorgane. (C) Regulation der Anzahl der Zellen in Organen oder Geweben. (D,E) Eliminierung gefährlicher und infizierter Zellen. (Übersicht von Jacobson et al., 1997)

3. Dermoepidermale Kommunikation

Dermoepidermale Interaktionen kontrollieren die epidermale Proliferation und Differenzierung (MAAS-SZABOWSKI et al., 1999). Das Zusammenspiel der Zellen beruht auf drei Prozessen. Zum einen produzieren sie lösliche Faktoren (Wachstumsfaktoren), die Einfluss auf autokrine (s. Punkt 3.1) und parakrine (s. Punkt 3.2) Aktivitäten haben (SMOLA et al., 1999), zum zweiten wirken sie extrazellulär auf Zell-Matrix Interaktionen (ASHKENAS et al., 1996) und zum dritten wirken sie auf Botenstoffe durch direkte Zellkontakte (JAHAVERIAN et al., 1998).

In der Rinderklaue ist die dermoepidermale Verbindung für die Integrität und Funktion der Klaue von großer Bedeutung und spielt in den Initialstadien der Klauenreihe eine wichtige Rolle (MÜLLING und LISCHER, 2002). Als Beispiel für Funktionsstörungen gilt die Aktivierung von Matrixmetalloproteasen, die Kollagen abbauen, sowie weiterhin die Aktivierung und Wirkung von Wachstums- und Nekrosefaktoren zu nennen (MÜLLING und LISCHER, 2002).

3.1 Autokrine Faktoren

Die autokrine Regulation meint die Produktion und die Aufnahme eines Botenstoffes durch ein und dieselbe Zelle (WERNER und SMOLA, 2001).

POUMAY und LECLERCQ-SMEKENS (1998) beschrieben autonomes Wachstum für epidermale Keratinozyten. Ist die Anzahl der Keratinozyten in Kultivierungsgefäßen groß genug, stimulieren die Zellen sich selbst, durch einen von ihnen selbst synthetisierten Faktor, das Amphiregulin, welches den EGF-Rezeptor aktivieren kann. Nach SCHELFHOUT et al. (2002) ist Amphiregulin der stärkste autokrine Wachstumsfaktor für epidermale Keratinozyten. Das von Fibrozyten gebildete Epiregulin ist damit ein weiterer, die Proliferation der epidermalen Keratinozyten, stimulierender autokriner Wachstumsfaktor. Wie auch das Amphiregulin gehört er zu der EGF-Familie und besitzt ebenfalls die Eigenschaft an den EGF Rezeptor binden zu können (SHIRAKATA et al., 2000).

3.2 Parakrine Einflüsse

Unter parakriner Regulation versteht man, dass die von der Zelle gebildeten Stoffe auf Rezeptoren der Nachbarzellen wirken. Hier sind z.B. Wachstumsfaktoren zu nennen, die von dermalen Fibrozyten gebildet werden und auf die epidermalen Keratinozyten wirken (WERNER und SMOLA, 2001).

3.2.1 Beeinflussung des Wachstums von Keratinozyten durch Fibrozyten

Eine wichtige Rolle bei dieser Regulation zwischen Keratinozyten und Fibrozyten spielen Interleukine. Interleukine sind eine Untergruppe der α -Zytokine und wirken als Botenstoffe zwischen Zellen (GRONE, 2002). Wie bei den anderen Zytokinen unterscheidet man auch bei den Interleukinen pro-inflammatorische und anti-inflammatorische (LANGER, 2000). Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gehören insbesondere der *Tumor Nekrose Faktor* TNF- α und *Interleukin-1* (IL-1), zu den anti-inflammatorischen Zytokinen gehören insbesondere *Interleukin-10* (IL-10), *Interleukin-4* (IL-4) sowie *Interleukin-11* (IL-11) (LANGER, 2000). MAAS-SZABOWSKI et al. (1999) zeigten, dass *Interleukin 1* (IL-1) keinen direkten Einfluss auf das Wachstum von Keratinozyten hat, aber die vermehrte Ausschüttung von weiterem *Interleukin 1* in den Keratinozyten induziert. IL-1 regt in den Fibrozyten die Expression von Wachstumsfaktoren (z.B. *Keratinocyte Growth Factor*, KGF) an, die wiederum auf das epidermale Wachstum wirken (s. Abb. 6) und somit einen direkten Einfluss auf die Proliferation haben.

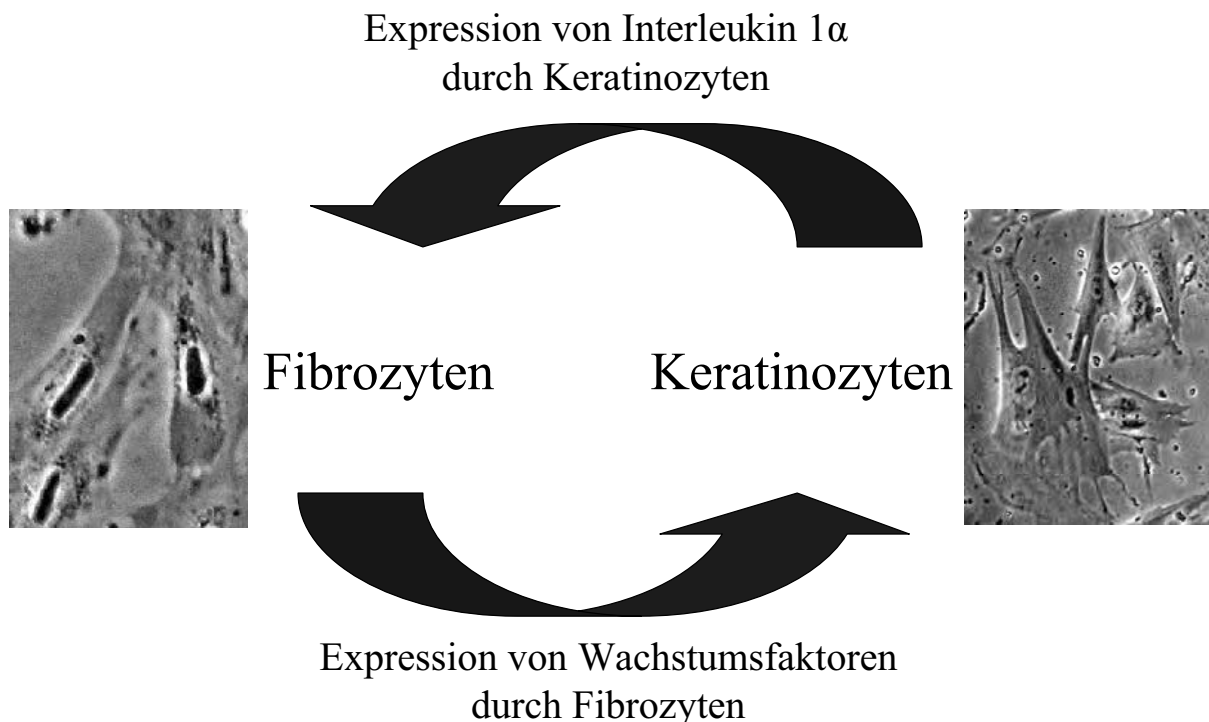


Abb. 6 Eigenregulation des epidermalen Wachstums durch Keratinozyten (HOFFMANN et al., 2004)

In vitro wird die Proliferation und Migration der Keratinozyten in Gegenwart der Fibrozyten stimuliert und die epidermale Struktur merklich normalisiert (EL GHALBZOURI et al., 2002). Nach diesen Autoren hat der stimulierende Effekt der Fibrozyten auf die Keratinozyten einen biphasischen Charakter, so steigt die Proliferation der Keratinozyten in der Initialphase an, verringert sich aber in den späteren Stadien der Kultivierung wieder.

Fibrozyten synthetisieren weitere Wachstumsfaktoren, die *fibroblast growth factors* (FGF), von denen folgende die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten beeinflussen können: *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *keratinocyte growth factor* (KGF, FGF-7), *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) und FGF-10 (FINCH und RUBIN, 2004). Nach BORAS et al. (2004) besitzen diese Wachstumsfaktoren mitogene Eigenschaften, danach hat bFGF eine ähnlich mitogene Wirkung wie der *epidermal growth factor* (EGF).

Nach WERNER und SMOLA (2001) kann KGF als Hauptmediator der epithelial-mesenchymalen Interaktionen angesehen werden. Nach YANG et al. (2002) fördert KGF die frühen Phasen der Differenzierung und spielt eine wichtige Rolle bei der Apoptose. Dagegen hat KGF nach MINUTH et al. (2004) als Medienzusatz keinen Einfluss auf das Wachstum *in vitro*.

Neben KGF spielt auch der *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) laut MAAS-SZABOWSKI et al. (2001) als Regulator eine wichtige Rolle in der Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten.

Auch der *fibroblast growth factor* (FGF) wirkt mitogen auf eine Vielzahl von epithelialen Zellen inklusive der Keratinozyten (BRAUN et al., 2004).

3.2.1.1 Zytokine

Zytokine sind Eiweißmoleküle, die hauptsächlich von Immunzellen, aber auch von nicht immunologischen Zellen gebildet und freigesetzt werden. In Bezug auf das epidermale Wachstum wirken sie als Wachstumsfaktoren, aktivieren oder deaktivieren Zellen und dienen als Schutz vor Gewebeschädigungen (GRONE, 2002). Dazu gehören *Interleukin-1* (IL-1) (s. Punkt 3.1.1) und der *Tumor Nekrose Faktor-Alpha* (TNF- α) (MAAS-SZABOWSKI et al., 1999).

Interleukine sind eine Untergruppe der Zytokine und wirken im Körper als Botenstoffe zwischen den Zellen (GRONE, 2002). Wie die anderen Zytokine ist Interleukin-1 ein Glykoprotein. Es wirkt als ein chemischer Botenstoff parakrin zwischen den Zellen und

unterscheidet sich damit beispielsweise von Hormonen, deren Wirkung über den Kreislauf und das Blut vermittelt wird (DINARELLO, 1994).

Keratinozyten bilden IL-1 α und IL-1 β und ihre kompetitiven Antagonisten (UCHI et al., 2000). IL-1 induziert die Produktion von anderen Zytokinen, unter anderem von IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF und TGF- β 1 (UCHI et al., 2000).

TNF- α ist ein multifunktionelles Zytokin, das eine Rolle bei Entzündungen, der Immunantwort und der Apoptose spielt (LOCKSLEY et al., 2001). Es wird von Makrophagen, Monozyten und Keratinozyten gebildet (CHEN und GOEDDEL, 2002). BANNO et al. (2004) fanden heraus, dass TNF- α zudem eine wichtige Rolle bei der epidermalen Wundheilung, Zellbewegung und Zellvermehrung spielt.

Eine geringe Menge TNF- α wird in den oberen Schichten der gesunden Epidermis exprimiert (TOMIC-CANIC et al., 1998). TNF- α induziert die Produktion von Aktin- Cytoskelett-Regulatoren, Integrinen und verstärkt die Keratinozytenbeweglichkeit samt -anheftung im Verlauf der Wundheilung (BANNO et al., 2004).

Nach TARLTON et al. (2002) spielt TNF- α bei der Regulierung von Matrixmetalloproteasen (MMP) eine wichtige Rolle, indem durch vermehrte Ausschüttung von TNF- α gleichzeitig MMPs aktiviert werden. HENDRY et al. (2003) stellte fest, dass es beim Krankheitsgeschehen der Klauenrehe zum Anstieg der MMPs 2 und 9 kommt und dadurch Kollagene aufgelöst werden und es somit zu weiteren Ulzerationen im Klauengewebe kommt. Nach HENDRY et al. (2003) ist die Aktivierung von MMPs der entscheidende Grund für Störungen im dermoepidermalen Bereich im Klauengewebe und somit ein Beitrag zur Entstehung des Krankheitsbildes der Klauenrehe.

4. Organotypische Kulturen und Perfusionsmodelle

4.1 Geschichtliche Entwicklungen

Der Schwede Carl August Ljunggren berichtete erstmals 1897 auf einem Kongress in Moskau von gezielten Versuchen einer Kultivierung von Hautfragmenten über einen längeren Zeitraum und veröffentlichte diese Ergebnisse ein Jahr später unter dem Titel „Von der Fähigkeit des Hautepithels, außerhalb des Organismus sein Leben zu behalten, mit Berücksichtigung der Transplantation“ (LAKARTIDN, 1960). Der nächste Schritt von der reinen Gewebekonservierung in einem Medium hin zur Untersuchung des aktiven Auswachsens von Zellen aus explantiertem Gewebe in das umgebende Medium wurde erstmals von dem Deutschen Leo Loeb (1869–1959) unternommen.

Während es den beiden bisher genannten Autoren nur gelungen war, Zellen und kleine Gewebeeinheiten über längere Zeit in Kultur oder fremden Organismen am Leben zu erhalten und dabei zum Teil ein Größenwachstum zu beobachten oder indirekt auf eine Migration von Zellen zu schließen, blieb es dem Embryologen Ross Granville Harrison (1870–1959) vorbehalten, mit einem einfachen aber bahnbrechenden Versuchsaufbau die Geburtsstunde der modernen Zellkulturverfahren einzuläuten (BANG, 1977).

Rhoda Erdmann (1870–1935) hatte eine herausragende Bedeutung für die Verbreitung der Zell- und Gewebekulturen. Sie konnte ab 1919 eine eigene Abteilung für experimentelle Zellforschung an der Berliner Charité aufbauen (ENGEL, 1994). Ihr Lehrbuch „Praktikum der Gewebepflege, besonders der Gewebezüchtung“ von 1922 fand weite Verbreitung, und drei Jahre später begründete sie das „Archiv für experimentelle Zellforschung besonders Gewebezüchtung (Explantation)“.

Ein Meilenstein in der Anwendung speziell von Keratinozytenkulturen ist die Arbeit „*Transplantation studies on sheets of pure epidermal epithelium and on epidermal cell suspensions*“ von Rupert E. Billingham und Joyce Reynolds aus dem Jahre 1952, die am *Department of Zoology* des *University College* in London unter der damaligen Leitung von Medawar tätig waren (BILLINGHAM et al., 1952). Sie konnten erstmals im Tiermodell belegen, dass Keratinozyten nicht nur nach *in vitro* Auswachsen aus Gewebestücken, sondern auch nach einer *in vitro* Isolierung mit Trypsin überleben können und tatsächlich für eine Kultivierung und spätere Transplantation geeignet waren.

Das Problem der Fibroblastenüberwucherung ihrer Hautkulturen versuchten Mary Stearns Parshley und Henry S. Sims aus New York 1950 gezielt durch Veränderungen in der

chemischen Zusammensetzung ihrer Medien (Calcium, Phosphat, Aspartatsäure, Sulfamethazin, pH-Wert u. a.) sowie durch Optimierung der physikalischen Kulturbedingungen (Gewebepräparation u. a.) zu lösen (PARSHLEY et al., 1950).

Ein wesentlicher Durchbruch gelang mit der Identifizierung von physiologischen Wachstumsfaktoren, die bis dahin nur in unbekannter Menge in den serumhaltigen Medien enthalten waren. Dem Biochemiker Stanley Cohen gelang 1962 an der *Vanderbilt University* in Nashville die Isolation von *Epithelial Growth Factor* (EGF) (COHEN, 1962), und 3 Jahre später konnte er den direkten Effekt an Zellkulturen von Hühnerembryonen in seiner Arbeit „*The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF)*“ belegen (COHEN, 1965). Abschließend sei noch die Einführung von Ammenzellen (engl. „*feeder layer*“) in die Keratinozytenkultur im Jahre 1975 erwähnt. Durch die Co-Kultur von Keratinozyten mit bestrahlten 3T3-Fibroblasten erreichten James G. Rheinwald und Howard Green aus *Cambridge, Massachusetts*, eine optimierte Proliferation der Epidermiszellen bei gleichzeitiger Hemmung der Fibroblastenproliferation: „*Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells*“ (RHEINWALD und GREEN, 1975). Zwei Jahre später kombinierten sie dieses Verfahren erfolgreich mit dem Einsatz von Wachstumsfaktoren: „*Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes*“ (RHEINWALD und GREEN, 1977).

4.2 Zellkulturen

FRESHNEY (2000) definiert eine Zellkultur als das Wachstum von Zellen, die von einem Ursprungsgewebe nach Migration bzw. mechanischer oder enzymatischer Auftrennung stammen. Ein Perfusionsmodell stellt eine Erweiterung einer klassischen Zellkultur dar, in welchem die räumliche Anordnung der Zellen und die Zellmorphologie der Situation *in vivo* entspricht (HINTERHUBER et al., 2002). Dies bedeutet gleichzeitig, je mehr die *in vitro* Situation der *in vivo* Situation entspricht, desto mehr stellen diese Kulturen einen wichtigen Ersatz für Tierversuche dar.

In der heutigen Zeit stellen die organotypischen Zellkulturen nach HINTERHUBER et al. (2002) ein wichtiges „Werkzeug“ dar, um die Physiologie und Pathophysiologie der Haut zu studieren. Zellkulturen werden verwendet für Unverträglichkeitstests, Studium der biophysiological Mechanismen der epithelial-mesenchymalen Interaktionen,

Differenzierung und Apoptose, sowie der Zellinteraktionen auch zwischen unterschiedlichen Zelltypen.

Heute gibt es im Wesentlichen zwei unterschiedliche Ansätze, um Zellen zu kultivieren. Zellen können entweder im Kulturmedium schwimmen (nicht adhärent) oder an einem Kulturgefäßboden (adhärent) anhaften. Im Zellkulturlabor werden Zellen und Gewebe üblicherweise in Multiwellschalen kultiviert. Zellen und Gewebe verbleiben im Kulturmedium (statische Kultur). Ein kontinuierlicher Flüssigkeits- und Nährstoffaustausch findet dabei nicht statt. Dieser Austausch ist aber wichtig, um nicht nur die Zellen zu ernähren, sondern auch Stoffwechselprodukte der Zellen, die bei Akkumulation zellschädlich sind, zu entfernen (LEHMANN et al., 1997). Da die Gewebe nicht kontinuierlich versorgt werden, verlieren sie ihre spezifischen morphologischen und physiologischen Merkmale durch Dedifferenzierung. Die dedifferenzierten Zellen lassen sich nicht mehr mit den Zellen und Geweben *in vivo* vergleichen (KOPPELSTÄTTER, 2000). Bei diesem Modell dienten als Ausgangsmaterial die aus kutaner Haut gewonnenen Zellen, wobei man generell zwei Kategorien von Zellkulturen unterscheiden kann. Das sind zum einen die „primären“ und zum anderen die „kontinuierlichen“ Zellkulturen. Die Züchtung frisch isolierter Zellen eines Organs oder Gewebes *in vitro* wird als Primärkultur bezeichnet. Nach einiger Zeit müssen sie auf neue Kulturgefäße verteilt werden, damit sie sich weiter teilen und wachsen können. Dies geschieht dann, wenn sie den Kulturschalenboden vollständig bewachsen haben. Man spricht in diesem Fall von einem „monolayer“. Werden solche Subkultivierungen nicht durchgeführt, sterben die Zellen nach einiger Zeit ab. Nach dem Absterben spricht man von einer „primären“ Zellkultur. Wurde eine solche Zellkultur über 70 Subkultivierungen weiter vermehrt, spricht man von einer „kontinuierlichen“ Zellkultur.

4.3 Perfusionskultur

Bei einer Perfusionskultur werden Zellen und Gewebe kontinuierlich mit frischem Medium versorgt. Vorteile sind, dass Zellen und Gewebe differenziert bleiben, wodurch die Polarität von Zellen und dadurch der *in vivo* Aufbau der Gewebe aufrechterhalten werden (MINUTH et al., 2004). Verschiedene Parameter, wie die Flussrate und Medienzusammensetzung, sind variabel und können den organospezifischen Bedingungen angepasst werden.

Mittlerweile gibt es in der Humanmedizin viele Systeme, um Zellen in einem Perfusionsmodell anzuzüchten. In der Veterinärmedizin existieren im Vergleich deutlich weniger. Bis vor kurzem gab es keine organotypische Kultur aus Klauengewebe. Durch die

Arbeit von NEBEL (2005) liegt nunmehr ein Modell statischer Kulturen von bovinem Klauengewebe vor.

Nach EKFAŁCK et al. (1991) ermöglichen *in vitro* Modelle die Beobachtung der Verhornung und der sie beeinflussenden Faktoren. Die Pathogenese und Pathophysiologie von Klauenerkrankungen könnten auf diese Weise auf molekularer Ebene näher erforscht werden. Auch Zusätze, wie Wachstumsfaktoren oder Zytokine, die sich auf die Hornqualität auswirken, können an solchen Co-Kulturen näher untersucht werden. Tierversuche stellen in diesem Zusammenhang eine schlechte Alternative dar, da man nie genau sagen kann ob diese Zusätze auch an den Zielzellen ankommen oder vorher im Organismus abgebaut oder abgeschwächt werden. Die Hornproduktion kann am besten *in vitro* untersucht werden, da man hier mit konstanten Zellkulturen unterschiedlichste Faktoren und ihre Wirkung auf die Zellen beurteilen kann. Diese Sachverhalte zeigen, wie hoch der Bedarf an einem solchen organotypischen Modell ist.

Desweiteren können mit einem solchen System auch verschiedene Hornqualitäten beurteilt werden. Wichtig in diesem Zusammenhang ist eine gute Hornqualität, die nach REILLY (1998) eine Voraussetzung ist, dass das Horn seine jeweilige Funktion voll erfüllen kann. Eine schlechte Hornqualität führt nach EGGERS (2001) zur Verminderung der Schutzfunktion der Klauenkapsel und ist damit Hauptursache für Klauenerkrankungen.

Bisher wurden Keratinozyten der Rinderklaue nur in Form von *Explants* angezüchtet, die maximal 48 Stunden kultiviert werden konnten (HENDRY et al., 2001). Ein Perfusionsmodell einer organotypischen Zellkultur kann hingegen über mehrere Wochen oder Monate kultiviert werden (MINUTH et al., 2004).

In einem zukünftigen Themenschwerpunkt bei Perfusionsmodellen ist deshalb herauszufinden, wie funktionelle Gewebe in Kultur generiert werden können und wie die Ausbildung von Eigenschaften individuell gesteuert werden kann (MINUTH et al., 2004). Sehr wenig ist über die Entwicklungsmechanismen in entstehenden funktionellen Geweben bekannt. Die Kenntnis über diese Entwicklung beinhaltet den Schlüssel zur Herstellung von optimalen artifiziellen Geweben (MINUTH et al., 2004). Dies bedeutet, dass zukünftig der Blick für die Entwicklungsbedürfnisse von Geweben neu geschärft und entsprechend erweitert werden muss. Weiter stellt dieser Sachverhalt auch ein neues Gebiet der Gewebezüchtung mit einem großen Entwicklungspotential dar. Der Entwicklung von organotypischen Kulturen für Fragestellungen auf zellulärer Ebene und als Tierversuchersatzmethode aus dem Fach der Veterinärmedizin wird künftig eine wachsende Bedeutung zukommen (SULTAN und HAAGSMAN, 2001).