

C MATERIAL UND METHODEN

1 Untersuchungsmaterial

1.1 Tiere

Für die vorliegende Arbeit wurden zunächst 27 Milchkühe ausgewählt, die an einem unkomplizierten, meist leichtgradigen, einseitigen RUSTERHOLZschen Klauengeschwür an der äußeren Hauptklaue der rechten oder linken Hintergliedmaße erkrankt waren. Sie wurden auf Initiative von *Dr. Ch. Lischer* zwischen März 1996 und Oktober 1996 an verschiedenen Schlachtviehmärkten in der Zentral- und Ostschweiz gekauft und zur Verlaufsuntersuchung und Probenentnahme in das Tierhospital der Veterinär-Chirurgischen Klinik der Universität Zürich eingestallt. Diese Studie war als Tierversuch gemäß den Schweizer Richtlinien genehmigt. Bei den Tieren handelt es sich um weibliche 3- bis 13-jährige Schlachtrinder der Rasse Schweizer Braunvieh (Tiere Nr. 1 bis 3 für erste Vorversuche sowie Tiere Nr. 4 bis 27 für Hauptversuche).

Zusätzlich wurde zur Verlaufskontrolle des Heilungsprozesses in kürzeren Intervallen eine 4-jährige Schwarzfleckvieh-Kuh (Tier Nr. 28) mit einem RUSTERHOLZschen Klauengeschwür an der Außenklaue der linken Hintergliedmaße und einem Sohlenwandgeschwür an der Außenklaue der rechten Hintergliedmaße eingestallt.

1.2 Vorbereitungen durch die Schweizer Kollegen

Nach gründlicher Eintrittsuntersuchung einschließlich Anamnese (Milchleistung, Fruchtbarkeit, frühere und aktuelle Krankheiten, Klauengesundheit und Schlachtungsgrund des betreffenden Tieres) wurde eine Allgemeinuntersuchung mit Bestimmung der wichtigsten Blutparameter vorgenommen und Erkrankungen von anderen Organsystemen ausgeschlossen. Zu den Ergebnissen dieser Untersuchungen siehe *Koller (1998)*.

Den Tieren wurde eine kurze Eingewöhnungsphase von etwa drei Tagen gewährt. Dann begann die eigentliche Studie (Tag 0). Nach einer orthopädischen Lahmheitsuntersuchung im Stand und im Gang, einer Beurteilung der Klauengesundheit, der Klauenläsion vor Versuchsbeginn und einer Blutuntersuchung auf Biotin zur Feststellung des Ausgangszustandes und des Biotin-Nullwertes wurden die Klauengeschwüre chirurgisch behandelt, indem die betroffene laterale Klaue fachgerecht

getrimmt wurde. Das Geschwür wurde bis in die Dermis trichterförmig ausgeschnitten und die Fläche der freigelegten Lederhaut auf eine Standardgröße von 4 cm² erweitert. Anschließend wurden ziegelsteinförmige Biopsien (Probe G1, s. Textabbildung 1) aus dem Geschwürsort im axialen Übergangsbereich vom proximalen Weichballen zum distalen Hartballen der erkrankten Außenklaue der rechten oder linken Hintergliedmaße entnommen. Die Innenklaue derselben Gliedmaße wurde für das Aufbringen eines modifizierten Klotzes (Cowslip, Fa. Giltspur Scientific Ltd., GB) vorbereitet. Die freigelegte Lederhaut wurde mit verdünnter Polividon-Jod-Lösung (Betadine, Fa. Mundipharma, Basel) desinfiziert und verbunden.

Ferner wurde mit der Biotin- bzw. Placebosupplementierung begonnen, wobei zwölf Tiere zweimal täglich 20 mg Biotin (Rovimix-H-2, Hoffmann-LaRoche, Basel) erhielten. Die Tagesdosis der supplementierten Tiere betrug somit 40 mg Biotin.

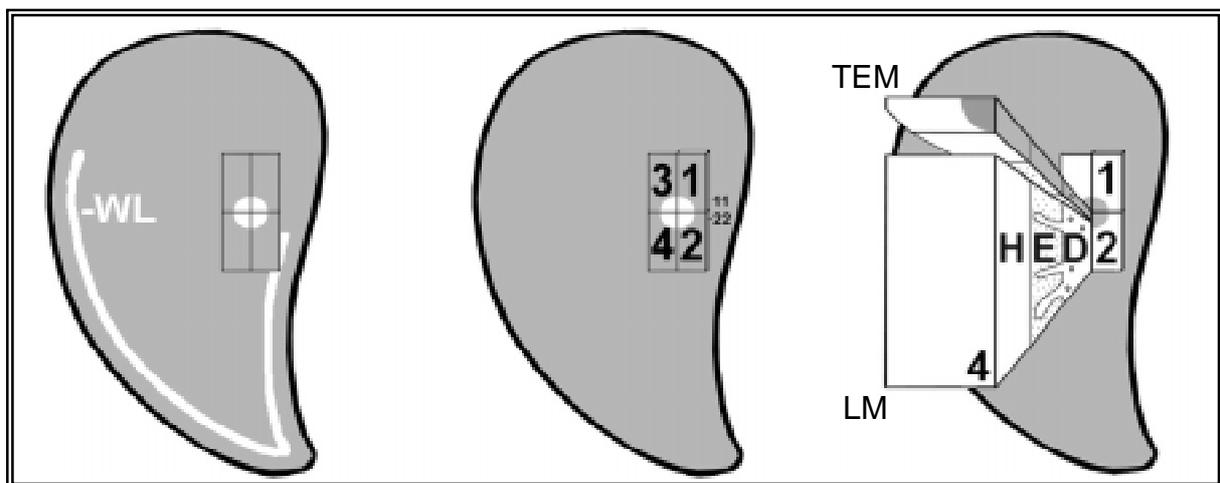
1.3 Material

Den Tieren Nr. 1 bis 3, die für Vorversuche zur Durchführbarkeit der geplanten Untersuchungen herangezogen wurden, ist viermal im Abstand von zehn Tagen jeweils eine ziegelsteinförmige Probe aus dem Bereich des Geschwüres (G1, G2, G3, G4) entnommen worden. Diese hatten eine Kantenlänge von etwa 25 mm, eine Breite von etwa 8 mm und waren nach Möglichkeit so tief entnommen, dass sie die zwei Gewebeschichten Dermis mit vaskularisierter Papillarkörpermatrize (**D**) und Epidermis mit lebenden, unverhornten (**E**) und toten, verhornten (**H**) Schichten enthalten (s. Textabbildung 1). Von den Proben wurde an der schmalen, dem Zentrum des Geschwüres zugewandten Kante ein dünnes Stück für licht- und transmissionselektronenmikroskopische (TEM-) Untersuchung abgetrennt. Die dem Zentrum des Geschwüres diagonal gegenüber liegende Ecke wurde zur Markierung abgeschnitten. Dann wurde das Stück zur Fixation in 2,5%iges phosphatgepuffertes Glutaraldehyd gebracht. Der Rest wurde tiefgefroren, um ihn für Gefrierschnitte und die Elektrophorese bereitzuhalten. Nach den ersten drei Tieren wurde bei den restlichen Kühen der Probenentnahme-Modus geändert, weil sich die Gewebeentnahme im Abstand von zehn Tagen als zu invasiv erwies. Fortan erfolgte die Probenentnahme an den Tagen T0 (Probe G1), T20 (Probe G2) und nach der Schlachtung der Patienten an T50 (Proben G3, G4, G1.1, G2.2).

Am Tag 0 wurde außerdem eine Referenzprobe (K1) für die gelelektrophoretische

Auftrennung der Hornzellproteine aus dem Übergangsbereich vom proximalen Weichballen zum distalen Hartballen der kontralateralen gesunden Außenklaue entnommen. Die Tiere Nr. 4 bis 27 blieben also 50 Tage im Versuch. Folgende Skizzen sollen das Vorgehen bei der Probenentnahme von den Tieren Nr. 4 bis 27 veranschaulichen.

Textabbildung 1: zeigt an der Fußungsfläche der Klaue die Lokalisation, Probennummern (1 bis 22) und Probenentnahme der Geschwüre von den Tieren Nr. 4 bis 27. D = **D**ermis, E = **E**pidermis, H = **H**orn, WL = **w**eisse **L**inie, TEM/LM = **TEM/LM**-Untersuchung (Kap. C.2.2)



Da Tier Nr. 28 besonders zu berücksichtigen ist, wird es durch eine andere Schriftart hervorgehoben. Dem Tier Nr. 28 wurden im Abstand von 5 Tagen, also am Tag 0, Tag 5, Tag 10, Tag 15 und Tag 20, jeweils zwei sich gegenüber liegende dreieckige Proben aus den Geschwüren an den Außenklauen beider Hintergliedmaßen entnommen. Die Spitzen der Dreiecke wiesen zur Peripherie der Geschwüre, eine Probe immer Richtung Klauenspitze, die andere Richtung Ballen. Von jedem Entnahmetag standen somit vier Proben zur Verfügung. Dieses Verfahren ist nicht schematisch dargestellt.

2 Untersuchungsmethoden

2.1 Lichtmikroskopie

2.1.1 Herstellung und Färbung von Gefrierschnitten

Zur Kryotomie wurden ausreichend große, bei -20 °C tiefgefrorene Proben verwandt.

Einige Proben wurden durch kurzes Abspülen mit fließendem, kaltem Leitungswasser von groben Unreinheiten befreit. Dann wurden die Proben mit Tissue-Tek (Fa. Miles Inc., Elkhart, USA), einem Einbettungsmedium für gefrorene Gewebeproben, eingebettet und am Gefriermikrotom (Fa. Mikrom, Heidelberg) mit einem metallenen Mikrotommesser mit C-Schliff bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ etwa 5 bis 8 μm dicke proximodistal gerichtete Kryostatschnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgezogen, die vorher zur besseren Objekthaftung mit 3-Aminopropyltriethoxysilane (Fa. Sigma, Deisenhofen) beschichtet wurden.

Bei der anschließenden PAS-Hämatoxylin-Färbung nach *McMANUS (1948)* entstanden durch Oxidation mit Perjodsäure an Molekülgruppen von Kohlenhydraten Aldehyde, die sich mit Leukofuchsin (SCHIFFS Reagens, Fa. Merck, Darmstadt) rot anfärben. Zum Überblick wurde mit Hämatoxylin gegengefärbt. Ein Einschließen der Präparate mit synthetischen Eindeckkunstharzen wie Eukitt (Fa. Kindler, Freiburg) hat sich in Vorversuchen als ungünstig erwiesen, da die Schnitte durch die dazu notwendige Prozedur des Wasserentzuges zu sehr geschrumpft und brüchig geworden waren, so dass auf Glyzeringelatine (*Romeis, 1989*) als Einschlussmittel zurückgegriffen wurde.

2.1.2 Semidünnschnitte

2.1.2.1 *Vorbereitende Tätigkeiten*

Die in 2,5%igem phosphatgepuffertem Glutaraldehyd fixierten TEM-Proben wurden mit einseitig geschliffenen Rasierklingen unter der Stereolupe (Fa. Zeiss, Jena) auf die für die folgende Einbettung in Epon 812 erforderliche Größe von etwa 2 mm x 2 mm x 5 mm zugeschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Proben einerseits möglichst aus dem Zentrum des Geschwüres stammten, was bei der Probenentnahme durch die abgeschnittene Ecke auf der gegenüberliegenden Seite kenntlich gemacht worden war, andererseits sollten sie Dermis (D) und Epidermis (E) mit Horn (H) enthalten.

2.1.2.2 *Einbettung in Epon 812*

Zunächst wurde die Fixierungslösung, das 2,5%ige phosphatgepufferte Glutaraldehyd, mit 0,2 Mol Phosphatpufferlösung ausgewaschen. In dem gleichen Puffer wurde eine Nachfixation in 1%igem wässrigem Osmiumtetroxid (Fa. Roth, Karlsruhe), das

anschließend aus den Präparaten gespült wurde, vollzogen. Die Proben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Propylenoxid (Fa. Merck, Darmstadt) für die nachfolgende Einbettung vorbereitet und in Epon 812 (Fa. Serva, Heidelberg), bestehend aus 46,2 % Glyzerolether, 28,5 % 2-Duodezylsuccinylazidanhydrid, 25,1 % Methyladicanhydrid und 1,5 % 2,4,6-TrisDimethylaminomethylphenol, eingebettet.

2.1.2.3 *Semidünnschneiden und Färben der Präparate*

Von den in Epon eingebetteten Proben wurden am Ultramikrotom OmU2 (Fa. Reichert, Wien) mit einem Glasmesser 0,5 µm dünne Semidünnschnitte angefertigt, die auf Objektträger übertragen und nach Antrocknung mit einer Mischung aus 1%iger Methylenblau- und 1%iger Azur-II-Lösung im Verhältnis 1+1 nach *RICHARDSON (1960)* gefärbt wurden.

2.1.3 Paraffinschnitte

2.1.3.1 *Probenaufbereitung*

Aus einigen Glutaraldehyd-fixierten Probenteilchen, die nach Herauspräparation der TEM-Präparate verblieben, konnte noch Material für die Herstellung von Paraffinpräparaten gewonnen werden.

2.1.3.2 *Einbettung in Paraffin*

Vorbereitend wurde mit Hilfe einer Phosphatpufferlösung das Glutaraldehyd aus den Proben herausgespült. In einer aufsteigenden Alkoholreihe und anschließender Xylolbehandlung wurden die Proben entwässert und für die vollständige Aufnahme des Paraffins vorbereitet. Dies ist automatisch mit dem Elliott Automatic Tissue Processor SE 400 und Citadel 2000 (Fa. Shandon Scientific, London) geschehen. Mit Xylol behandelte Proben wurden am Histocentre 2 (Fa. Shandon Scientific, London) in Paraffin eingebettet. Dabei wurde auch hier darauf geachtet, dass die spätere Schnittfläche gleichermaßen Dermis und Epidermis enthält.

2.1.3.3 *Herstellung von Paraffinschnitten*

Die Paraffinschnitte wurden am Schlittenmikrotom (Fa. Jung, Heidelberg) mit einem Mikrotommesser der Schlifffart D angefertigt und wurden auf Objektträger aufgezogen. Ihre Dicke betrug 5 - 7 µm.

2.1.3.4 *Histologische Übersichtsfärbungen*

2.1.3.4.1 Doppelfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (*Gerrits, 1992*)

Die angewendeten Farbstofflösungen Hämatoxylin nach GILL und Eosin ermöglichen eine Übersichtsfärbung bei blau erscheinendem Zellkernchromatin und basophilem bzw. rosa gefärbtem azidophilem Zytoplasma bzw. Interzellulärsubstanzen.

2.1.3.4.2 Trichromfärbung nach *MASSON-GOLDNER (1938)*

Diese Übersichtsfärbung arbeitet mit WEIGERTSchem Eisenhämatoxylin, Säurefuchsin-Ponceau, Phosphorwolframsäure-Orange und Lichtgrün und dient zur kontrastreichen Unterscheidung von Zellen und Interzellulärsubstanz, v.a. der kollagenen Faserbündel.

2.1.3.5 *Histochemische Nachweise*

2.1.3.5.1 Färbung mit der Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach *MCMANUS (1948)*

Eine Behandlung mit Perjodsäure, dann SCHIFFS Reagens und Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach GILL differenziert die Zellkerne blau und die kohlenhydratreichen Anteile wie Glykogen, Basalmembranen und Muzin violett bis rot.

2.1.3.4.2 Bindegewebsfärbung nach *LADEWIG (1938)*

Bei dieser Färbung, die mit WEIGERTSchem Eisenhämatoxylin, Salzsäurealkohol, Phosphorwolframsäure und LADEWIG-Lösung aus Anillinblau, Orange G und Säurefuchsin arbeitet, sehen die Zellkerne dunkelblau, Bindegewebsfasern blau bis rotviolett, Fibrin leuchtend zinnoberrot, Horn rot und Keratohyalin schwarzbraun aus.

2.1.3.4.3 Pikrosiriusrotfärbung, modifiziert nach *CONSTANTINE (1969)*

Eine Behandlung der Präparate mit Alzianblau-Lösung (Alzianblau 8GX), Aldehydfuchsin-Lösung nach GOMORI (1950), WEIGERTSchem Eisenhämatoxylin und Pikrosiriusrot aus Siriusrot F3B150-Lösung und Pikrinsäure färbt kollagene Fasern rot, elastische Fasern leuchtend violett, Zellkerne braun und das Zytoplasma bräunlich. Mastzellen erscheinen metachromatisch und zwar leuchtend blauviolett.

2.1.3.4.4 Fibrinfärbung mit Martiusgelb-Scarlett-Blue (*Lendrum, 1962*)

Die MSB dient zur Darstellung von Fibrin verschiedenen Alters. Frisches Fibrin wird rot, altes bläulich. Zellkerne werden schwarz und Erythrozyten gelb gefärbt.

2.1.3.4.5 Keratinfärbung nach *PAPANICOLAOU (1954)*

OG 6 aus Orange G und Phosphorwolframsäure und EA 50 aus Lichtgrün, Bismarkblau und Eosin vermögen die epidermalen Keratine zu differenzieren.

2.1.3.4.6 Mitosendarstellung mit der Feulgen-Nuklear-Reaktion

Nach Hydrolyse der DNA mit Salzsäure wurden die Präparate einer Behandlung mit SCHIFFS Reagenz und Sulfitwasser unterzogen, die die DNA violett bis rot färben, während die anderen Gewebeelemente ungefärbt bleiben.

2.1.4 Lichtmikroskopische Auswertung und Dokumentation

Die Auswertung der lichtmikroskopischen Präparate und die fotografische Dokumentation erfolgten am Axioskop und digitale ProgRes 3012 Kamera (Fa. Zeiss, Oberkochen).

2.2 **Transmissionselektronenmikroskopie**

2.2.1 Probenvorbereitung

Für die Herstellung der Ultradünnschnitte zur Elektronenmikroskopie wurden die in Epon 812 eingebetteten Proben verwendet, von denen zuvor Semidünnschnitte hergestellt worden waren. An diesen Schnitten wurden neben lichtmikroskopischer Auswertung geeignete Gewebeareale für Ultradünnschnitte ausgewählt.

2.2.2 Durchführung der Ultradünnschnitt-Technik

Das Präparat wurde in dem bestimmten, ausgewählten Bereich auf eine Oberfläche von etwa 1 mm x 1 mm trapezförmig zugeschnitten, am Ultramikrotom Ultracut E (Fa. Reichert-Jung, Heidelberg) mit einem Diamantmesser Histo-Diatome (Fa. Diatome AG, Pabisch, Bielefeld) 50 bis 60 nm dünn geschnitten und auf befilmte Kupferingblenden (Fa. Agar Scientific, Stansted, GB) aufgezogen.

2.2.3 Kontrastierung

Die Ultradünnschnitte wurden im Ultrastainer LKB 2168 (Fa. Leica, Wien) mit Ura-

nylazetat und Bleizitrat nach *Venable und Coggeshall (1965)* schnittkontrastiert.

2.2.4 Transmissionslektronenmikroskopische Auswertung und Dokumentation

Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Präparate und die fotografische Dokumentation erfolgten am Transmissions-Elektronenmikroskop Typ EM 10 (Fa. Zeiss, Oberkochen).

2.3 **Extraktion und gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine der verhornten Epidermis**

2.3.1 Prinzip

In einem elektrischen Gleichstromfeld wandern geladene Moleküle und Partikel jeweils in die Richtung der Elektrode mit entgegengesetztem Vorzeichen. Die Probensubstanzen befinden sich dabei in wässriger Lösung. Verschiedenartige Moleküle und Partikel eines Gemisches wandern aufgrund unterschiedlicher Ladungen, Massen und Molekülgrößen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und werden dabei in einzelne Fraktionen aufgeteilt ("Wettrennen der Moleküle").

Die elektrophoretische Mobilität, das heißt die Wanderungsgeschwindigkeit, wird beeinflusst von Nettoladung des Materials, Art, Konzentration und pH-Wert des Puffers, Temperatur, elektrischer Feldstärke, Reibungskoeffizienten sowie Beschaffenheit des Trägermaterials (*Stryer, 1991*). Die in einem definierten Zeitabschnitt zurückgelegten Wanderungstrecken sind damit ein Maß für die elektrophoretischen Mobilitäten der verschiedenen Substanzen.

Da sich Proteine in Polyacrylamidgelen hauptsächlich aufgrund ihrer Massen trennen lassen, muss die Probe bei der Natriumdodecylsulfat-Elektrophorese vorher denaturiert, d.h. die Proteinmoleküle müssen in die Form von Molekül-Detergenz-Mizellen gebracht werden. Das Proteingemisch wird zunächst unter Zusatz von Natriumdodecylsulfat (engl. **SodiumDodecylSulfat**, SDS) gelöst. Das Detergens zerstört fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen. Durch die Beladung mit dem anionischen Detergenz SDS werden die Eigenladungen von Proteinen so effektiv überdeckt, dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen. Zudem werden die unterschiedlichen Molekülformen ausgeglichen, indem die Sekundär- und Tertiärstrukturen durch Aufspalten der

Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst werden. Damit erhält man die monomeren Keratin-Polypeptide in ihrer Primärstruktur. Die mit SDS beladenen, gestreckten Aminosäureketten bilden Ellipsoide mit gleich langen Mittelabständen. Die von *Shapiro et al. (1967)* eingeführte SDS-Elektrophorese trennt ausschließlich nach unterschiedlichen Molekülgrößen auf.

Schwefelbrücken, die zwischen Cysteinen gebildet werden können, werden nur durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung, z.B. Dithiothreitol DTT oder 2-Mercaptoethanol, aufgespalten. Dithiothreitol DTT und Merkaptoethanol reduzieren Disulfidbrücken für elektrophoretische Analysen von Proteinen. Bei niedrigen Konzentrationen (1 mMol) verhindern sie die Oxidation der Proteine. Um den Verlauf der Trennung beobachten zu können und den Endpunkt der Trennung zu erkennen, lässt man Farbstoffe mit hohen elektrophoretischen Mobilitäten mit der Probe mitlaufen. Bei Proteintrennung in Richtung Anode verwendet man meist Bromphenolblau oder Orange G (*Westermeier, 1990*).

2.3.2 Probenvorbereitung und Proteinextraktion

Von den tiefgefrorenen Proben wurden nur die toten, verhornten (H) Schichten zur Weiterverarbeitung abgetrennt und nach etwa 12- bis 18-stündiger Lufttrocknung zur Oberflächenvergrößerung fein geraspelt. Je 50 mg Hornspäne wurden zur Lösung der Proteine in 1,25 ml Extraktionspuffer aus 8 Mol Harnstoff, 0,05 Mol Tris(hydroxyethyl)-Aminomethan-HCl und 0,025 Mol Dithiothreitol DTT (alle: plusone, Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg) 12 Stunden lang bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert (*Grosenbaugh und Hood, 1992*). Die nach Zentrifugation (30 min., 22.000 U/min., 4°C) im zweigeteilten (2 x 500 µl) Überstand befindlichen Proteine wurden durch Azetonzugabe (Fa. Merck, Darmstadt) in Verhältnis 2:3 (1+2) vollständig ausgefällt und durch erneute Zentrifugation (30 min., 22.000 U/min., 4°C) sedimentiert. Eines der Sedimente wurde zur Bestimmung der extrahierten Proteinmenge in 1 ml 0,1 molarer Natronlauge (Fa. Merck, Darmstadt) und das korrespondierende Sediment in je 1 ml Probenpuffer aus 60,5 g/l Tris(hydroxyethyl)-Aminomethan-HCl, 10 g/l Sodiumdodecylsulfat (plusone, Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg), 1,4 g/l Dithiothreitol DTT und 0,1 g/l Bromphenolblau (Fa. Merck, Darmstadt) über 18 bis 48 Stunden im Rüttler gelöst. Die Bestimmung der Menge der aus den Hornproben herausgelösten Proteine erfolgte nach der Biu-

ret-Methode (*Robinson und Hogden, 1940*). Biuret-Reagens weist Peptidbindungen in Proteinen nach (*Lottspeich und Zorbas, 1998; Rendina, 1971*). Dazu wurde das in 1 ml 0,1 molarer Natronlauge gelöste Sediment mit 4 ml Biuret-Reagens (Fa. Fluka, Buchs) versetzt und der Proteingehalt nach 30-minütiger Inkubation am Spektral-Photometer PMQII (Fa. Zeiss, Oberkochen) bei 550 nm photometrisch bestimmt. Bovines Serumalbumin (Fa. Sigma, Deisenhofen) diente als Standard, 0,1 molare Natronlauge als Leerwert. Gemäß der photometrisch bestimmten Proteinmenge und der erforderlichen Proteinkonzentration für die jeweilige spätere Färbung zur Darstellung der getrennten Zonen wurde die weitere Verdünnung der gelösten Sedimente in Probenpuffer vollzogen.

2.3.3 Herstellung homogener **Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacryl-Amid-Gele** (SDS-PAG)

Für die Untersuchung von Klauenextrakten wurde die Arbeitsanweisung der SDS-PAG-Elektrophorese nach *Westermeier (1990)* modifiziert. Da die SDS-PAGEle selbst hergestellt wurden, war die Gelmatrix bei gleichmäßiger Porengröße kontrolliert einstellbar, chemisch inert und besaß keine Elektroosmose. Sie wurden auf eine GelBond-PAG-Film-Trägerfolie (Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg) aufpolymerisiert und bestanden aus zwei Phasen. Die erste Phase, das "Stacking-Gel", war der untere Bereich des Geles, in dem sich die Probenauftragslöcher befanden und diente dem gleichmäßigen Eindringen der Probensubstanzen in das Gel. Es bestand aus Acrylamidmonomeren und N,N'Methylenbisacrylamid (ReadySol DNA/PAGE, 40 %), Tris-Puffer (pH 6,8), Glycerol (87 %, w/w), SDS, TEMED und Ammoniumpersulfat (alle: plusone, Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg).

Die zweite Phase, das "Separation-Gel" oberhalb des Stacking-Geles stellte die spätere eigentliche Laufstrecke der Probensubstanzen dar und enthielt 10 % ReadySol DNA/PAGE (40 %), 1,36 % Trispuffer (pH 8,8), 10 % Glycerol (87 %, w/w), 0,001 % SDS, 0,0003 % TEMED und 0,0003 % Ammoniumpersulfat (alle: plusone, Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Acrylamidmonomere und N,N'Methylenbisacrylamid im ReadySol DNA/PAGE wurden nach Auslösung der Polymerisation mit Ammoniumpersulfat und mit dem Vernetzer TEMED untereinander chemisch kopolymerisiert und ergaben ein klares durchsichtiges Gel. Da Sauerstoff ein Radikalfänger ist, erfolgte die Polymerisation unter Luftabschluß in vertikalen Gießkü-

vetten zwischen zwei Glasplatten mit U-förmigem Abstandhalter aus Silikongummi. Für die Auftragung der Proben bei der horizontalen Gelelektrophorese war auf der einen Glasplatte eine Reihe Former für die Probenauftragslöcher aufgebracht worden.

Die Vorteile dünnerer Gele sind eine schnellere Auftrennung, schärfere Banden, schnellere Färbung, höhere Färbefektivität und höhere Nachweisempfindlichkeit. Es hat sich bewährt, bei dem Gießen des Geles in die Gießküvetten zunächst die Polymerisation des unteren Stacking-Geles abzuwarten, bevor man das Separation-Gel aufschichtet.

2.3.4 Auftrennung und Darstellung der Proteine

Zunächst wurden die SH-Gruppen der mit DTT reduzierten Proteine durch eine vorangehende Alkylierung mit 10 % Jodacetamid (Fa. Sigma, Deisenhofen) zur Stabilisierung des reduzierten Zustandes carboxymethyliert und geschützt. Die Trennung der Proteine erfolgte auf den selbst hergestellten homogenen Acrylamid-Gelen von 10 % in einer horizontalen Trennkammer (Multiphor II, Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg). Ein Kathodenpuffer aus 0,3025 % Trispulver, 1,44 % Glycin, 0,1 % SDS (alle: plusone, Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg) und fakultativ 0,001 % Natriumacid (Fa. Merck, Darmstadt) und ein Anodenpuffer aus 0,3025 % Tris (pH 8,4) in Aqua dest. vermittelten über 10 dachziegelartig gefächerte, mit dem jeweiligen Puffer getränkte Filterpapierstreifen (Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg) den Elektronenstrom durch das Gel.

Gemeinsam mit einem Marker aus sechs Referenzproteinen mit bekannten relativen Molekulargewichten von 14,4 bis 94 kd (LMW Calibration Kit for Electrophoresis, Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg) wurden jeweils ca. 20 bis 30 µl der Probenverdünnungen (ca. 0,5 mg Protein/ml) in die Probenauftragslöcher aufgetragen, bevor das "Proteinwettrennen" beginnen konnte. Bei einer konstanten Temperatur von 15 °C wurde die Elektrophorese in zwei Phasen durchgeführt. Nach einer Eindringphase (100 V, 50 mA, 30 W, 30 min) in das Stacking-Gel wurden die Proteine in der zweiten Phase (600 V, 50 mA, 30 W, bis zum Erreichen der Oberkante) im Separation-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der getrennten Proteinzonen der Zytokeratine erfolgte nach ihrer Fixierung in 40 % Ethanol und 10 % Eisessig unmittelbar im Gel durch Anfärbung mit einer Phast Gel Blue R-Lösung (Fa. Pharmacia Biotech, Frei-

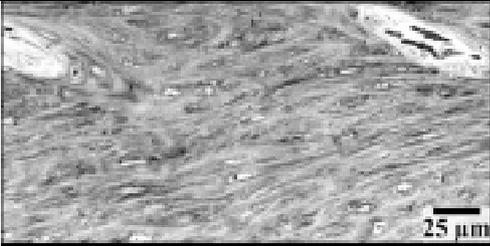
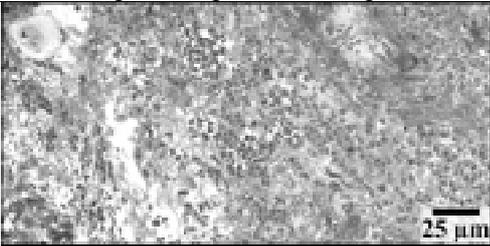
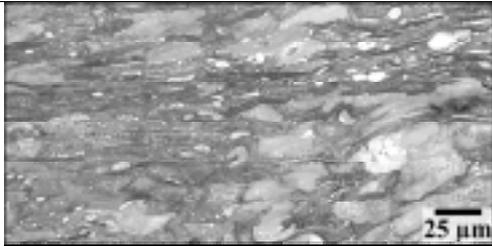
burg). Diese Darstellungsmethode ist geeignet für Proben mit einem Proteingehalt von 5,0 bis 0,1 mg/ml. Mit Hilfe der Markerproteine lassen sich über eine Eichkurve die Molekulargewichte der Proteine ermitteln.

2.4 Statistische Methoden zur Beurteilung des Heilungserfolges unter Biotineinfluß

2.4.1 Übertragung der Qualitätseigenschaften in statistisch nutzbare Zahlenwerte

Erst die Umwandlung der morphologischen Befunde zur Qualität in ein Notensystem mit ordinalen Merkmalen erlaubt ihre statistische Auswertung. Daher wurden histologische Noten vergeben, ein Bewertungsverfahren, mit dem schon zuvor *Hunkeler (1996)* und *Koller (1998)* erfolgreich gearbeitet haben. Beurteilt wurden das obere Stratum spinosum und die unteren, neu gebildeten 0,5 bis 1 mm des Stratum corneum der semidünn geschnittenen TEM-Geschwürproben (s. Textabbildung 1, Kap. C.1.3), die mit einer Mischung aus 1%iger Methylenblau- und 1%iger Azur-II-Lösung gefärbt worden waren. Die Bewertung erfolgte bei 20-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung nach drei strukturellen Faktoren der Hornqualität, die von *Mülling et al. (1994b)* aufgestellt wurden. Diese sind 1. intrazelluläre Faktoren, 2. interzelluläre Faktoren und 3. die Architektur des Hornzellverbandes, wobei die Beschaffenheit der Verhornungsgrenze in die dritte Note mit einfluss. Es wurden jeweils die drei Faktoren in den beiden Zellschichten bewertet und "Histologienoten" von 0 bis 3 vergeben, wobei 0 als unverändert, 1 als geringgradig, 2 als mittelgradig und 3 als hochgradig verändert definiert wurde. Halbgradienten (z.B. 1,5) waren möglich. Dazu wurden beispielhaft Referenzproben, die der Definition entsprachen, ausgewählt, beschrieben und im Folgenden abgebildet. Die Beurteilung erfolgte durch zwei unabhängige, neutrale Untersucher mit gleichem Kenntnisstand. Die Zuordnung zur Gruppe der biotinsupplementierten und nicht biotinsupplementierten Tiere war den Untersuchern nicht bekannt. Damit sollte eine objektive Beurteilung erreicht werden. Nach der Notengebung wurden die Ergebnisse der Untersucher verglichen. In wenigen Fällen traten Unterschiede in der Notengebung auf, die nur um 0,5 bzw. 1 Einheit differierten. Von den Noten der beiden Untersucher wurden jeweils Mittelwerte gebildet.

Textabbildung 2: Referenzproben zur histologischen Benotung des oberen Stratum spinosum und unteren Stratum corneum der TEM-Geschwürproben

Note	oberes Stratum spinosum	unteres Stratum corneum
0,0	 <p>gleichmäßig keratinfilamentgefüllte Zellen, dichter Interzellularspalt, regelmäßige Anordnung der Zellen</p>	 <p>gleichmäßig intensiv gefärbte Hornzellen, dichter Interzellularspalt, regelmäßige Anordnung der Zellen.</p>
1,0	 <p>geringfügig ungeordnete Keratinfilamente in den Zellen, unregelmäßige Anordnung der Zellen</p>	 <p>verminderter Zusammenhalt der Zellen durch den Interzellularkitt</p>
2,0	 <p>dyskeratotische Zellen, quantitativ vermehrter, qualitativ verminderter Interzellularkitt, unregelmäßige Anordnung</p>	 <p>gestörter Zellzusammenhalt</p>
3,0	 <p>Zellschichten mit Zelltrümmern und flüssigen und festen Blutbestandteilen gefüllt</p>	 <p>Hornzellen unterschiedlich intensiv gefärbt, Interzellularspalten blasenförmig geweitet, Zellanordnung unregelmäßig</p>

2.4.2 Statistische Aufarbeitung der Werte mit SPSS Version 9.0

Die Einzelnoten wurden mit Angabe der Gruppenzugehörigkeit und Tiernummer in eine Tabelle übertragen (Tabelle 7a und b, Kap. D.8). Um die Gruppen untereinander vergleichen zu können, wurde ein "Score" zur Gesamtbeurteilung eines Tieres pro Tag gebildet. Für die Tage T0 und T20 wurde der "Score" aus der Summe der sechs Einzelnoten berechnet. Da bei der Endbeurteilung am Tag 50 jeweils zwei Proben bewertet wurden, wurden zunächst die Summen der sechs Einzelnoten berechnet. Als "Score" wurde das arithmetische Mittel dieser beiden Werte verwendet. Zur Beurteilung des Heilungserfolges wurde die Änderung der Gesamtbeurteilung, also der "Score" am Ende der Behandlung (ST50) minus dem "Score" zu Beginn der Behandlung (ST0), verwendet (ÄND50-0).

Da es sich bei den "Scores" nicht um intervallskalierte Variablen handelte, wurden als statistische Kenngrößen Prozentpunkte angegeben. Dies ermöglicht eine einheitliche Wertung, in der die Einzeldaten zu gleichen Anteilen einfließen.

Zum Gruppenvergleich wurde der U-Test (zwei unabhängige Gruppen) durchgeführt. Boxplots dienen zur graphischen Darstellung. Die Ergebnisse der U-Tests sind im Sinne einer explorativen Statistik zu verstehen und sind nicht ohne Weiteres zu verallgemeinern.