

## B. Literaturübersicht

### 1. Die Klaue

#### 1.1 Definition der Klaue und ihrer Segmente

Das Zehenendorgan der Haussäugetiere wird von den zentralen Stützteilen und der modifizierten Haut an den Zehenenden gebildet (*Zietzschmann, 1918*). Unter dem Begriff „Klaue“ im weiteren Sinne versteht man den Horn- oder Klauenschuh mit allen von ihm eingeschlossenen Strukturen (*Hohmann, 1902; Zietzschmann, 1918*). Diese Definition umfasst also auch Knochen, Gelenke, Bänder und Weichteile (*Mülling und Budras, 2002*). Dagegen definiert *Gegenbaur (1885)* die Klaue im engeren Sinne als den Horn- oder Klauenschuh, das Differenzierungsprodukt der epidermalen Keratinozyten.

Der modifizierte Hautüberzug des Zehenendorgans kann nach Schichten und Segmenten gegliedert werden (*Wilkins, 1963*). Die drei Schichten der äußeren Haut, Unterhaut (Subkutis), Lederhaut (Dermis) und Oberhaut (Epidermis) können auch an der modifizierten Haut des Hornschuhs unterschieden werden (*Bruhnke, 1931*). An der Klaue bezeichnet man diese als Klauenunterhaut, Klauenlederhaut und Klauenoberhaut. Diese drei Hautschichten sind in der Klaue in verschiedenen Abschnitten modifiziert (*Budras et al., 1989; Budras et al., 1996*).

Die Klaue wird in das Saum-, Kron-, Wand-, Sohlen- und Ballensegment gegliedert. Diese fünf Segmente sind nach der Exungulation an der dermoepidermalen Grenzfläche deutlicher zu erkennen und abzugrenzen als an der äußeren Oberfläche des Hornschuhs (*Mülling, 1993*).

Das schmale Saumsegment bildet den Übergang vor der äußeren behaarten Haut zu dem Klauenschuh und geht palmar bzw. plantar in das Ballensegment über (*Dirks, 1985; Hohmann 1902*). Distal an das Saumsegment schließt das Kronsegment an, es erstreckt sich etwa bis zur Mitte der Klauenwand. In diesem Segment wird der größte Teil der Wand des Hornschuhs gebildet (*Dirks, 1985; Fürst, 1992*). Die distale Fortsetzung des Kronsegments ist das Wandsegment. Es ist auf die distale Hälfte der Klaue beschränkt und erstreckt sich bis zum Übergang in das Sohlen- bzw. Ballensegment (*Dirks, 1985; Fürst, 1992; Warzecha, 1993*). Die weiße Linie (zona alba) ist die Verbindungszone zwischen der Hornwand und dem Sohlen- bzw. Ballenhorn der Klauengrundfläche (*Mülling, 1993; Warzecha, 1993*).

*Mülling (1993)* beschreibt das Sohlensegment als einen engen Halbmond mit zwei schmalen, langausgezogenen Schenkeln. Der halbmondförmige Sohlenkörper nimmt den apikalen Teil der Klauengrundfläche ein und verzüngt sich axial und abaxial fortlaufend zu den Schenkeln, die der weißen Linie angelagert sind. Das Sohlensegment endet axial und

abaxial kurz vor dem jeweiligen Ende der weißen Linie. Das Fehlen der Subkutis im Sohlensegment ermöglicht eine morphologische Abgrenzung dieses Segmentes gegenüber dem Ballensegment (*Fürst, 1992; Warzecha, 1993; Wilkens, 1963*).

Das Ballensegment dehnt sich fast über die gesamte Klauengrundfläche aus (*Fürst, 1992*) und geht fließend ohne deutliche Abgrenzung in die angrenzenden Segmente über (*Budras et al., 1996*). Während *Wilkens (1963)* das Ballensegment nicht weiter unterteilt, wird es anhand struktureller Unterschiede von *Mülling (1993)* in zwei und von *Fürst (1992)* in drei Abschnitte unterteilt. *Mülling (1993)* definiert wie folgt die beiden Abschnitte des Ballensegmentes: der proximale Abschnitt erstreckt sich vom palmaren bzw. plantaren Ballenbeginn an der Grenze zur behaarten Haut bis zu einer Verbindungslinie zwischen dem axialen und abaxialen Ende der weißen Linie, in deren Höhe er in den distalen Abschnitt des Ballensegmentes übergeht. Der distale Abschnitt des Ballensegmentes wird von den Schenkeln des Sohlensegmentes umfasst, zwischen denen er sich zungenförmig klauenspitzenwärts erstreckt.

## 1.2 Mikroskopische Anatomie der Klaue

### 1.2.1 Lichtmikroskopische Merkmale der Klauenepidermis

Die im zweiten Teil der Literaturübersicht beschriebenen *in vitro* Modelle stammen fast ausschließlich aus der Humanmedizin und verwenden Keratinozyten der äußeren Haut (Integumentum commune). Daher wird im Folgenden auf Unterschiede in der mikroskopischen Anatomie der humanen äußeren Haut im Vergleich zur Rinderklaue hingewiesen.

Der offensichtlichste Unterschied besteht in der Anzahl der Zellschichten, in der Haut werden generell wesentlich weniger Zellschichten ausgebildet. In der Klaue ist das Ineinandergreifen der Oberhaut und der Lederhaut viel stärker ausgeprägt als in der äußeren Haut. Das Stratum papillare der Klauenlederhaut bildet fingerförmige Ausstülpungen, die Zotten (Papillae) und leistenförmige Ausstülpungen, die Blättchen (Laminae), aus (*Mülling, 2000*). Diese Ausstülpungen reichen sehr weit in die Epidermis hinein. Über dem zöttchenförmigen Papillarkörper wird von der Epidermis sehr viel Horn in Form von Röhrcchen gebildet, über den Lederhautblättchen bildet die Epidermis Hornblättchen. Diese verzahnten Blättchen sorgen für eine belastungsfähige Verbindung der Klauenkapsel mit dem Klauenbein (*Fürst, 1992*) und sind Bestandteil des Klauenbeinträgers (*Westerfeld, 2003*).

Die Klauenepidermis ist ein grundsätzlich der Epidermis der äußeren Haut entsprechend aufgebautes, mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel. Dieses Epithel besteht aus einem Stratum basale, Stratum spinosum und einem Stratum corneum. Das Stratum

granulosum befindet sich nur im proximalen Abschnitt des Ballensegmentes und im Saumsegment, wo weiches Horn gebildet wird (*Fuchs, 1993; Fürst, 1992*), ein Stratum lucidum fehlt auch hier (*Fuchs, 1993*).

Das Stratum basale ist einschichtig. Die Basalzellen sind regelmäßig angeordnet und sitzen palisadenförmig auf einer gut erkennbaren Basalmembran (*Fürst, 1992; Mülling, 1993*). *Fürst (1992)* beschreibt die Zellen des Stratum basale als annähernd kubische bis hochprismatische Zellen. Verallgemeinert beschreibt *Mülling (1993)* die Basalzellen als meist schlanke und hochprismatische Zellen, die einen großen, längs- bis rundovalen, heterochromatischen Zellkern aufweisen. Der Zellkern ist in der Mitte der Zelle oder an ihrem distalen Zellpol lokalisiert und besitzt einen kleinen Nukleolus. In der äußeren Haut besteht das Stratum basale aus iso- bis hochprismatischen Zellen (*Liebich, 1999*). Die Basalzellen sind über Hemidesmosomen mit der Basalmembran verbunden.

In den folgenden Schichten werden die Zellen mit zunehmender Differenzierung zuerst polygonal und flachen danach immer stärker ab (*Fürst, 1992*). Das Stratum spinosum besteht aus bis zu 70 Zelllagen (*Mülling, 1993*). Nach *Fürst (1992)* erscheinen die ersten suprabasalen Zellen kubisch. Je weiter distal die Zellen des Stratum spinosum liegen, desto flacher werden sie. Zwischen den kubischen und plattenförmigen Zellen gibt es eine Vielzahl von Übergangsformen, denen er keine bestimmte Geometrie zuordnen kann und sie deshalb als polyedrisch bezeichnet. Nach *Mülling (1993)* sind die Zellen der ersten suprabasalen Zelllage nur geringgradig größer als die Basalzellen selbst und besitzen einen rundovalen Zellkern mit einem kleinen Nukleolus. In den obersten Zelllagen des Stratum spinosum erreichen die Zellen die fünf- bis sechsfache Größe der Basalzellen. Verbunden mit der Größenzunahme kommt es zu einem Formwandel von ovalen über eckigovale bis hin zu den charakteristischen polygonalen Zellen. Parallel zu der Größenzunahme der Spinosazellen kommt es auch zu einer vermehrten Keratinsynthese, die Keratinfilamente sind in Form einer streifigen Maserung sichtbar (*Mülling, 1993*). Im Lichtmikroskop sind Zellausläufer, durch welche die Zellen untereinander Verbindung aufnehmen, erkennbar und geben den Zellen des Stratum spinosum das charakteristische stachelartige Aussehen (*Fürst, 1992*). Die Zellen des Stratum spinosum der äußeren Haut sind vorwiegend polygonal mit einem runden Zellkern und flachen erst am Übergang zum Stratum granulosum ab (*Liebich, 1999*). Der Hauptunterschied zur Klaue ist jedoch die Anzahl der Zelllagen des Stratum spinosum, in der äußeren Haut wird nur ein Bruchteil der Zelllagen ausgebildet.

Im proximalen Abschnitt des Ballensegmentes wird ein Stratum granulosum ausgebildet, im distalen Abschnitt des Ballensegmentes fehlt diese Schicht (*Fürst, 1992; Mülling, 1993; Wilkens 1963*), die je nach Lokalisation aus bis zu 15 Zelllagen besteht. 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 vielen, kleinen, intensiv basophilen Granula angefüllt, den sogenannten Keratohyalingranula.

Je nach Lokalisation sind bis zu fünf Lagen Übergangszellen zur Verhornung sichtbar. Dies sind größere, hellere Zellen mit einem pyknotischen Zellkern (*Mülling, 1993*).

Das Stratum corneum der Klaue zeichnet sich durch das Vorhandensein von speziellen Strukturen, den Hornröhrchen und den Hornblättchen aus (*Fürst, 1992*). Diese Strukturen werden in dieser Arbeit nicht weiter beschrieben, da sie in einem *in vitro* Modell epidermaler Keratinozyten der Klaue aufgrund des fehlenden Papillarkörpers nicht ausgebildet werden können. Das Stratum corneum umfasst maximal bis zu 80 Zellschichten im proximalen Abschnitt des Ballensegmentes (*Mülling, 1993*). Junge Hornzellen sind gegenüber den Spinosazellen deutlich abgeflacht, langgezogen spindelförmig und besitzen oft noch einen basophilen pyknotischen Zellkern. Ihre Längsachse liegt parallel zu der Verhornungsgrenze. Die älteren Hornzellen sind noch etwas stärker abgeflacht und besitzen nur vereinzelt in den unteren Zellschichten Kernreste (*Mülling, 1993*). In der äußeren Haut ist die Dicke des ausgebildeten Stratum corneum abhängig von der Beanspruchung, erreicht aber niemals auch nur annähernd die Dicke des Stratum corneum der Klaue, die 1 cm betragen kann (*Mülling, 2000*).

#### 1.2.2 Ultrastruktur der Zelldifferenzierung

Die Zellen des Stratum basale sitzen auf einer Basalmembran. Ihre Zellkerne sind rund oder oval, zentral gelegen und nehmen den Hauptteil der Zellen ein. Bei ihnen sind Nukleolus und randständiges Heterochromatin deutlich zu erkennen (*Dirks, 1985*). An den Polen der Basalzellen, vor allem an dem basalen Pol, sind Mitochondrien vom Crista-Typ, meist ein ausgedehnter Golgi Apparat und seltener raues endoplasmatisches Retikulum anzutreffen. Das Zytoplasma wird von einzelnen Keratinfilamenten mit einem Durchmesser von 10 nm oder von dünnen, locker gepackten Filamentbündeln durchzogen (*Dirks, 1985; Mülling, 1993*), nur ein sehr deutlich erkennbarer perinukleärer Raum bleibt frei von Filamenten (*Dirks, 1985*). Die Keratinfilamente verlaufen in der Regel parallel zur Längsachse der Zelle und ziehen zu den Desmosomen bzw. zu den an der basalen Zellmembran gelegenen Hemidesmosomen. Die Hemidesmosomen dienen zur Verankerung der Basalzellen mit der subepidermalen Basalmembran (*Dirks, 1985; Mülling, 1993*) und sind entscheidend für die polare Organisation des Epithels (*Poumay und Leclercq-Smekens, 1998*). Zwischen den Filamenten liegen zahlreiche Ribosomen und Polyribosomen.

Das Stratum spinosum zeichnet sich durch spezifische Organellen, die membrane coating granules, aus. Dies sind membranumhüllte Granula mit einem Durchmesser von 180 bis 300 nm (*Budras et al., 1996; Mülling, 1993*). Des Weiteren kommt es zu einer stetigen

Zunahme von Keratinfilamenten, die längs und quer verlaufen. Die Filamentbündel werden zunehmend dicker und häufig scheren einige Filamente aus einem Bündel aus, um sich mit einem benachbarten Bündel zu vereinigen (*Dirks, 1985; Mülling, 1993*). *Mülling (1993)* beschreibt, dass auch die Menge der amorphen Keratinproteine steigt. In den oberen Zellschichten füllen kompakte Bündel zusammen mit amorphen Keratinproteinen die Zellen überwiegend aus. Im Stratum spinosum bleibt ein schmaler perinukleärer Raum frei von Keratinfilamenten. Die Spinosazellen sind durch Desmosomen miteinander verbunden, deren Anzahl mit dem Differenzierungsgrad ansteigt. Vereinzelt können zwischen den Desmosomen gap junctions beobachtet werden. Bis hin zu den mittleren Zellschichten des Stratum spinosum sind intakte Zellorganellen sichtbar. Danach kommt es zu einem schnell fortschreitenden Abbau der Zellorganellen. In den oberen Zellschichten sind nur noch vereinzelt Fragmente der Zellorganellen anzutreffen (*Mülling, 1993*). Kernwandhyperchromasie sowie pyknotische Zellkerne sind erst in den oberen Zellschichten zu sehen, schreiten dann aber schnell voran, so dass in den obersten Spinosazellen nur noch flache Kernreste sichtbar sind (*Mülling, 1993*).

In den Übergangszellen zur Verhornung wird der cornified envelope sichtbar, der als homogene, elektronendichte Linie an die innere Oberfläche der Zellmembran angelagert ist (*Mülling, 1993*).

Beginnend mit der untersten Zellschicht des Stratum corneum zeigen die Desmosomen fortschreitende Auflösungserscheinungen. Die Zellen werden vollständig von Keratinmassen angefüllt. Die jungen Hornzellen sind im Gegensatz zu den alten noch etwas weniger abgeflacht und besitzen oft noch einen strichförmigen Kernrest (*Mülling, 1993*). Der cornified envelope ist in den alten Hornzellen undeutlicher erkennbar als in den jungen, da es stärker von den elektronendichten Keratinmassen maskiert wird (*Budras et al., 1996*).

### 1.3 Verhornung

#### 1.3.1 Keratinisierung und Verhornung

Vorraussetzung für die Verhornung ist die Keratinisierung. Dies ist ein gerichteter Differenzierungsprozess, gekennzeichnet durch spezifische Syntheseleistungen der Zellen im Stratum spinosum, und mit der Bildung von Keratinen, Filaggrinen sowie membrane coating granules verbunden (*Liebich, 1999*). *Tomlinson et al. (2004)* führen die biochemische Vernetzung der Keratinproteine sowie die Synthese und Exozytose von Interzellularkitt als Hauptmerkmale der Keratinisierung auf. Auch in nicht verhornenden Epithelien kommt dieser Differenzierungsprozess vor. Daher sollte man die Keratinisierung nicht mit der Verhornung gleichsetzen (*Künzel, 1990*). *Künzel (1990)* definiert die Keratinisierung als Bildung einer „Substanz“, des Keratins, durch fortschreitende Differenzierung spezialisierter Zellen. Die Verhornung dagegen als die Bildung einer jeweils funktionell einheitlichen Struktur durch fortschreitende Differenzierung eines spezialisierten Gewebes.

Die Verhornung der Keratinozyten erfolgt nach der Keratinisierung in weiteren Differenzierungsschritten (*Budras et al., 1998*). Die Keratinfilamente werden untereinander 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 bilden (*Akiyama et al., 2002; Baden et al., 1984*). *Tomlinson et al. (2004)* verstehen unter dem Begriff Verhornung den programmierten Zelltod der Keratinozyten. Dieser Prozess führt zu toten, vollständig mit Keratinproteinen ausgefüllten Zellen.

Nach *Matoltsy (1976)* ist die Verhornung eine spezifische Form der Differenzierung von epithelialen Zellen, die sich aus einer Synthesephase und einer Transformationsphase zusammensetzt. Wobei die Synthesephase, mit der steigenden Produktion von Keratinfilamenten, membrane coating granules und Keratohyalin granula, der Keratinisierung und die Transformationsphase mit den weiteren Schritten der Differenzierung der Verhornung entspricht.

#### 1.3.2 Verhornungstypen

Aufgrund struktureller und biochemischer Kriterien kann ein weicher und ein harter Verhornungstyp unterschieden werden. Strukturelles Hauptcharakteristikum hierfür ist das Vorhandensein bzw. Fehlen des Stratum granulosum (*Giroud und Leblond, 1951; Korte, 1987; Künzel, 1990*).

Bei dem weichen Verhornungstyp wird ein Stratum granulosum ausgebildet. Für diese Zellschicht sind zahlreiche, stark basophile Keratohyalin granula charakteristisch. Nach *Künzel (1990)* ist dies der Verhornungstyp der nicht spezialisierten Epidermis, bei dem

ständig Keratinozyten in den äußeren Epidermislagen abschilfern. Biochemisch unterscheidet sich das in der weichen Verhornung gebildete Horn von dem der harten Verhornung durch einen niedrigen Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren (*Giroud und Leblond, 1951; Korte, 1987*) und einem höheren Lipidgehalt (*Fuchs, 1993*). An der Rinderklaue verhornen der proximale Abschnitt des Ballensegmentes (*Fürst, 1992; Mülling, 1993; Wilkens, 1963*) und das Saumsegment nach diesem Verhornungsprinzip (*Fürst, 1992; Wilkens, 1963*).

Bei dem harten Verhornungstyp fehlt das Stratum granulosum (*Fuchs, 1993; Giroud und Leblond, 1951*).

### 1.3.3 Keratine

Keratine erscheinen in Form der spezifischen, unverwechselbaren Intermediärfilamente der Epithelzellen. Ihr Muster ist einzigartig für jedes Epithel und kann als zuverlässiger Marker für die Differenzierung des jeweiligen Epithels verwendet werden (*Kitahara und Ogawa, 1994*). Sie gehören zur Familie von wasserunlöslichen,  $\alpha$ -helikalen Proteinen, die Intermediärfilamente mit einem Durchmesser von 10 nm bilden und ein Molekulargewicht von 40 bis 70 kD aufweisen (*Cooper und Sun, 1986; Sun et al., 1983; Tseng et al., 1982*). Nach *Hochstetter (1998)* besitzen sie beim Rind ein Molekulargewicht von 41 bis 80 kD. Weitere charakteristische Merkmale der Keratine sind: Spezifität für Epithelien, Assoziation mit dem durch Desmosomen verbundenen Tonofilamentnetzwerk und Reaktion mit hochspezifischen monoklonalen Antikörpern (*Sun et al., 1983*). Keratine werden in der Literatur auch als Präkeratin, Zytokeratin,  $\alpha$ -Keratin oder Keratinproteine bezeichnet.

Anhand ihres isoelektrischen Punktes<sup>1</sup> (*Moll et al, 1982*), ihres Molekulargewichtes und der Reaktion mit den monoklonalen Antikörpern AE1 und AE3 werden die Keratine in zwei Gruppen unterteilt (*Bowden et al., 1987; Cooper und Sun, 1986; Moll et al, 1982; Sun et al., 1983*). Typ I Keratine sind kleiner (40 bis 64 kD) und sauer (pI 4.8 bis 5,7), die meisten Keratine dieser Gruppe reagieren mit AE1. Typ II Keratine sind größer (54 bis 70 kD), basisch (pI 5.8 bis 8.0) und reagieren mit AE3 (*Bowden et al., 1987*). Die genaue Einteilung der Keratine von Mensch und Rind nach den oben genannten Gesichtspunkten kann den Tabellen 1 und 2 entnommen werden.

<sup>1</sup> Als isoelektrischen Punkt (pI) eines Proteins bezeichnet man den pH-Wert, bei dem die Nettoladung des Proteins Null beträgt (*Strecher, 1996*).

**Tabelle 1:** Unterteilung der Typ I Keratine von Mensch und Rind

Typ I (saure Keratine)				
Molekulargewicht (kD) und Keratinnummer beim Mensch nach <i>Moll et al., 1982</i>	Molekulargewicht (kD) beim Rind nach <i>Cooper und Sun, 1986</i>	Keratinnummer beim Rind nach <i>Schiller et al., 1982</i>	Reaktion mit monoklonalen Antikörpern	Lokalisation beim Rind
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	aktivierte Keratinozyten
46/48 (16/17)	46	19	-	Hyperproliferation von Keratinozyten
45 (18)	45	21	-	einfaches Epithel
40 (19)	41	22	AE1	

**Tabelle 2:** Unterteilung der Typ II Keratine von Mensch und Rind

Typ II (basische Keratine)				
Molekulargewicht (kD) und Keratinnummer beim Mensch nach <i>Moll et al., 1982</i>	Molekulargewicht (kD) beim Rind nach <i>Cooper und Sun, 1986</i>	Keratinnummer beim Rind nach <i>Schiller et al., 1982</i>	Reaktion mit monoklonalen Antikörpern	Lokalisation beim Rind
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	Keratinozyten
56 (6)	57	7	AE3	Hyperproliferation von Keratinozyten
52 (8)	55	8	AE3	einfaches Epithel

Keratine mit ähnlichem Gewicht bilden Paare, die in der Regel während der Differenzierung zusammen exprimiert werden. Das basische Keratin dieses Paares ist beim Menschen ca. 8-10 kD und beim Rind sogar bis 15 kD größer als das saure (*Cooper und Sun, 1986*). Bestimmte Keratinpaare werden von bestimmten Epithelarten exprimiert, z.B. K5 und K14 von mehrschichtigen Epithelien. Dieses Paar wird als Marker für Keratinozyten aus mehrschichtigen Epithelien angesehen. Außerdem exprimiert jedes epitheliale Gewebe ein für dieses Gewebe charakteristisches Keratinpaar, in der Haut ist dies K1 und K10 (*Kitahara und Ogawa, 1994*).

Aus der Rinderklauenepidermis isolierten *Lee et al. (1979)* 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 McGuire (1981)* sogar acht filamentbildende Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 49 bis 65 kD nachgewiesen. K6, K16, K7 und K14 wiesen *Kvedar et al. (1986)* in der Rinderklaue nach, sowie zusätzlich ein basisches Keratin und vier saure Keratine. *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 vorkommen. An Klauen mit Sohlengeschwüren konnten sie in der Peripherie des Geschwürs zusätzlich K16 nachweisen. 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 anzutreffen sind. In Hornproben aus der Ballenepidermis wies *Hochstetter (1998)* vier saure und zwei basische Keratine mit Molekulargewichten von 44,5 bis 57,5 kD nach.

#### 1.3.4 Filaggrin

Filaggrine sind basische, histidinreiche Proteine (*Baden, 1984; Kubilus et al., 1985*) und werden in den oberen Zelllagen des Stratum spinosum und im Stratum granulosum exprimiert (*Baden, 1984; Zhang et al., 2002*). *Ishida-Yamamoto et al. (1999)* geben für humanes Filaggrin ein Molekulargewicht von 38 kD an. Bovines Filaggrin hat nach *Gan und Steinert (1993)* ein Molekulargewicht von 16 kD. Filaggrin ist ein funktioneller Name, er steht für filament aggregating protein (*Kubilus et al., 1985*). Filaggrin ist ein Keratinfilament-assoziiertes Protein, das Keratinfilamente in verhornten Keratinozyten aggregiert (*Ishida-Yamamoto et al., 1999*) und damit ein Zusammenbrechen des Keratinnetzwerkes mit der daraus resultierenden Abflachung der verhornenden Zellen verursacht (*Gan und Steinert, 1993*). *Mack et al. (1993)* vermuten, dass ionische Interaktionen zwischen basischen Endungen des Filaggrins und den negativen Domänen der  $\alpha$ -Helix des Keratins für die Aggregation verantwortlich sind. Filaggrin wird in den oberen Schichten des Stratum corneum abgebaut. Die Abbauprodukte schützen die Haut

vor UV-Strahlung (*Ishida-Yamamoto et al., 1999*) und spielen eine entscheidende Rolle für die Wasserbindungskapazität (*Ishida-Yamamoto et al., 1999; Nirunsuksiri et al., 1998*). Profilaggrin, die Vorstufe des Filaggrins (*Fleckmann et al., 1985; 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 aus 10 bis 12 hintereinanderfolgenden Kopien von Filaggrin (*Gan und Steinert, 1993; Ishida-Yamamoto et al., 1999; Zhang et al., 2002*) und hydrophoben Verbindungssequenzen (*Gan und Steinert, 1993*) zusammen. Profilaggrin wird im Stratum granulosum synthetisiert und in den Keratohyalin granula gespeichert. Profilaggrin enthaltende Keratohyalin granula werden auch F-Granula genannt. Sie unterscheiden sich von den L-Granula, die Loricrin einen Vorläufer der cornified envelope enthalten (*Ishida-Yamamoto et al., 1999*). Profilaggrin wird dephosphoryliert und proteolytisch in Filaggrinmonomere gespalten (*Ishida-Yamamoto et al., 1999; Kubilus et al., 1985*).

#### 1.3.5 Membrane coating granules und membrane coating material

Neben den Keratinen ist das membrane coating material (MCM) das Hauptsyntheseprodukt der epidermalen Keratinozyten der Rinderklaue (*Mülling und Budras, 1998*). Andere Bezeichnungen für MCM sind intercellular cementing substance (*Bragulla und Mülling, 1992, Budras et al., 1998*), Kittsubstanz (*Budras und Bragulla, 1991*) und Interzellularkitt (*Mülling und Budras, 1998*). 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 vertreten. Von keratinisierenden Zellen wird das MCM in den unteren und mittleren Zelllagen des Stratum spinosum gebildet (*Hayward, 1979; Mülling und Budras, 1998*). 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 Struktur und biochemische Zusammensetzung des MCM je nach untersuchter Lokalisation der Klaue, sie sind segmentspezifisch. Die nur im Elektronenmikroskop sichtbaren membrane coated granules (MCGs) enthalten das MCM. MCGs sind spezifische Organellen der Spinosazellen (*Hayward, 1979; Matoltsy und Parakkal, 1965*) mit einer dreischichtigen Hüllmembran und einer lamellär geschichteten Binnenstruktur (*Hashimoto, 1971; Landmann, 1988; Matoltsy, 1976*). In der Humanmedizin haben sich die Bezeichnungen lamellar granules (*Madison et al., 1988*) und lamellar bodies (*Hinterhuber et al., 2002*) durchgesetzt.

In den oberen Zelllagen des Stratum spinosum und im Stratum granulosum bewegen sich die MCGs zu der Zellperipherie, wobei sie sich am apikalen Zellpol unter der Zellmembran

versammeln und anschließend ihren Inhalt durch Exozytose in den Interzellularraum schleusen. Der Interzellularraum wird zwischen den Desmosomen mit dem MCM gefüllt und dabei fortschreitend erweitert (*Mülling und Budras, 1998*). Die lamellären oder feinkörnigen Strukturen des MCM sind im Interzellularraum sichtbar (*Hayward, 1979*). In der Rinderklaue sind nur in der Saumepidermis und in axial gelegenen Teilen der Ballenepidermis lamelläre Strukturen anzutreffen, das feinkörnige MCM beherrscht das Bild in den anderen Anteilen der Klaue (*Mülling und Budras, 1998*). Mit einer zunehmenden Füllung des Interzellularraumes mit MCM sinkt die Zahl der gap junctions (*Hashimoto, 1971*). Die dreischichtige Hüllmembran der MCGs lagert sich an die Zellmembran an und verschmilzt mit dieser (*Landmann, 1988; Matoltsy und Parakkal, 1965*).

In der Haut ist die Hauptfunktion des MCM der Aufbau einer semipermeablen Barriere zum Schutz vor exzessiven Wasserverlusten (*Landmann, 1988*). Im Gegensatz zur Haut spielt diese Barriere in der Rinderklaue eine untergeordnetere Rolle. Sie reguliert den Wassergehalt des Hornes und schützt vor dem Eindringen von chemischen sowie mikrobiellen Noxen aus der Umgebung. Die Hauptfunktion des MCM in der Klaue ist die Etablierung eines stabilen Zellzusammenhaltes des Klauenhorns. Hierfür ist der Glykogenanteil von entscheidender Bedeutung (*Mülling und Budras, 1998*).

## 2. Zellkultur

Verschiedene *in vitro* Modelle der Haut sind unter anderem für die Untersuchung von Modulation der Differenzierung und Proliferation durch pharmakologische und physiologische Substanzen, dermo-epidermale Interaktionen und Wundheilung entwickelt worden (*Hinterhuber et al., 2002; Holbrook und Hennings, 1983*). Zell- oder Gewebekulturen von Organen euthanasierter Haustiere oder geschlachteter Nutztiere sind in der veterinärmedizinischen Forschung nur selten benutzt worden (*Sultan und Haagsman, 2001*). Da die Klaue eine Modifikation der Haut darstellt, wird in diesem Teil auf humanmedizinische Hautmodelle, sowie überwiegend auf das humanmedizinische Schrifttum zurückgegriffen.

### 2.1 Warum ist ein *in vitro* Modell der Rinderklaue erforderlich?

Die Hornqualität der Rinderklaue, sowie die funktionelle Integrität und letztendlich die Klauengesundheit sind abhängig von der Differenzierung und Verhornung der epidermalen Zellen. Großen Einfluss auf die Qualität des Klauenhorns haben intrazelluläre und interzelluläre Faktoren. Besonders hervorzuheben sind Art, Menge und Vernetzungsgrad der Keratinproteine durch Intermediärfilament-assoziierte Proteine als intrazelluläre Faktoren, sowie Zellkontakte durch Desmosomen und die Beschaffenheit des Interzellularkittes bei den interzellulären Faktoren (*Hendry et al., 1995; Hochstetter, 1998*).

Eine schlechte Hornqualität führt zur Verminderung oder zum Verlust der Schutzfunktion der Klauenkapsel, somit auch zur Beeinträchtigung der mechanischen Belastbarkeit und ist die Hauptursache für viele Läsionen, die zu Lahmheiten führen. Auch die Klauenrehe, eine häufig bei laktierenden Kühen auftretende Krankheit, soll zu einer Verschlechterung der Hornqualität führen (*Hendry et al., 1995; Hendry et al., 1999*).

*In vitro* Modelle ermöglichen das Studium der für die Verhornung und damit auch die Hornqualität entscheidenden Faktoren (*Ekfalck et al., 1991; Hinterhuber et al., 2002; Holbrook und Hennings, 1983; Poumay und Leclercq-Smekens, 1998; Wunn et al., 1999*). Sie bieten die Möglichkeit, Pathomechanismen von Klauenerkrankungen, wie z.B. der Klauenrehe, zu erforschen (*Hendry et al., 1999*). Des Weiteren ermöglichen sie, die Beeinflussung der Hornqualität durch Futtermittelzusätze, deren *in vivo* Wirkung auf die Klaue von *Mülling et al. (1999)* beschrieben wurde, *in vitro* zu studieren.

Epidermale Keratinozyten der Rinderklaue wurden von *Ekfalck et al. (1990)* und *Hendry et al. (1999)* in Form von Explants kultiviert. Bisher untersuchten nur *Kubilus et al. (1979)* sowie *Baden und Kubilus (1983)* filamentäre Proteine der Rinderklaue mit Hilfe einer

Zellkultur. *Kitahara und Ogawa (1994; 1997)* züchteten epidermale Keratinozyten der Rinderklaue im Vergleich zum humanen Nagel an.

## 2.2 Verschiedene *in vitro* Modelle epidermaler Keratinozyten

Die Zellkultur wird definiert als das Wachstum dissoziierter Zellen, die von einem Muttergewebe nach spontaner Migration oder mechanischer bzw. enzymatischer Auftrennung stammen (*Freshney, 2000*). *Holbrook und Hennings (1983)* nennen als Charakteristika für die Zellkultur epidermaler Zellen die Trennung der Zellen und das Aussäen der Zellsuspension auf einen Untergrund. Nach der Aussaat erhält man entweder eine reine Keratinozytenpopulation oder eine Mischkultur aus epidermalen Zellen sowie Melanozyten und Langerhans Zellen oder eine Kokultur, bestehend aus epidermalen Zellen und Fibrozyten.

Unter dem feeder layer System versteht man die Anzüchtung von Keratinozyten auf einer Unterlage aus 3T3 Zellen, das heißt durch Bestrahlung im Wachstum gehemmte, murine Fibrozyten (*Poumay und Leclercq-Smekens, 1998; Rheinwald und Green, 1975a*). Normale Fibrozyten, wie sie häufig in einer Primärkultur epidermaler Zellen vorkommen, wachsen schlecht auf diesem feeder layer (*Rheinwald und Green, 1975a*).

Unter einem Explant versteht man ein Gewebefragment, das aus seinem Ursprungsgewebe herausgelöst wird und anschließend in einem Nährmedium am Leben gehalten wird (*Freshney, 2000*). Das Explant kann entweder aus der gesamten Haut oder aus einzelnen Anteilen bestehen (*Holbrook und Hennings, 1983*). Dieses Modell ist nicht für eine Kultivierung über einen längeren Zeitraum geeignet. *Hendry et al. (1999)* kultivierten Explants aus der Rinderklaue erfolgreich über einen Zeitraum von 48 Stunden. Eine organotypische Kokultur setzt sich aus epidermalen Keratinozyten und Fibrozyten zusammen. Sie ist ein dreidimensionales Modell, das aus dissoziierten Zellen angezüchtet wird und epidermale als auch dermale Anteile der Haut repräsentiert. In diesem Modell entspricht die räumliche Anordnung der Zellen, die Zellmorphologie und die Differenzierung sowie die Proteinexpression weitgehend der Situation *in vivo*. Es dient der Rekonstruktion von lebenden Hautäquivalenten und ist für das Studium der zellulären Interaktionen von Dermis und Epidermis besonders geeignet (*Hinterhuber et al., 2002; Stark et al., 1999*).

## 2.3 Wachstum und Morphologie von epidermalen Keratinozyten *in vitro*

### 2.3.1 Beobachtung von Wachstum und Differenzierung im Phasenkontrastmikroskop

Wenn eine Suspension von dissoziierten epidermalen Keratinozyten ausgesät wird, haften diese Zellen entweder einzeln oder in Klumpen innerhalb der ersten Stunden am Boden des Kultivierungsgefäßes. Zeit und Effektivität der Anheftung sind abhängig vom Untergrund bzw. der Beschichtung des Kultivierungsgefäßes, sowie der Ionenkonzentration im Medium und dem Differenzierungsstadium der ausgesäten Zellen. In einer Zeitspanne von 24 bis 48 Stunden nach dem Aussäen strecken sich die Zellen und beginnen mit der Proliferation. Zunächst wachsen sie kontinuierlich bis sie einen Monolayer bilden. Danach erreichen die Keratinozyten die Konfluenz und beginnen mit der Koloniebildung (*Holbrock und Hennings, 1983*). *Boyce und Ham (1983)* definieren eine Kolonie als eine Gruppe von vier oder mehr Zellen, die anhand ihrer Morphologie beurteilt werden und von einer Zelle abstammen. In den Kolonien bilden sich mehrere Zelllagen mit unterschiedlicher Morphologie und unterschiedlichem Differenzierungsgrad der Keratinozyten. Mit einigen Ausnahmen entsprechen diese Zelllagen nicht der Anzahl und Differenzierung der Zellschichten *in vivo*, deshalb werden die Zelllagen als basale, intermediäre und obere Zone beschrieben. Terminal differenzierte Zellen, die meist noch kernhaltig sind, lösen sich einzeln oder in größeren Verbänden von den Kolonien und schwimmen in das Kultivierungsmedium ab (*Holbrook und Hennings, 1983*).

*Wunn et al. (1999)* beschreiben die von ihnen aus dem Pferdehuf angezüchteten Keratinozyten als polygonale oder runde Zellen, die meist nach sieben bis zehn Tagen in der Kultur einen konfluenten Monolayer bilden. Für gewöhnlich wachsen diese Zellen dann in runden Kolonien oder weiten Flächen. *Kitahara und Ogawa (1994)* züchteten Zellen aus der Rinderklaue an. Diese Zellen sind bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0.15 mM im Nährmedium spindelförmig oder polygonal, nach der Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bildet sich ein Monolayer mit fokalen mehrschichtigen Arealen.

Nach *Ghalbzouri et al (2002a)* besteht eine in Abwesenheit von Fibrozyten angezüchtete Epidermis nur aus zwei bis drei lebenden Zelllagen und einem dünnen Stratum corneum, wobei keine Unterscheidung der Zellen in ein Stratum basale und ein Stratum spinosum möglich ist. Werden Keratinozyten in Gegenwart von wachstumsgehemmten Fibrozyten angezüchtet, bilden sie verhornende Kolonien (*Green, 1977; Rheinwald und Green, 1975b*). Etwa vier Tage nach der Aussaat werden die ersten kleinen Kolonien sichtbar. Im weiteren Verlauf wachsen sie durch seitliche Ausdehnung und zentrale Verdickung. In den Kolonien sind die Zellgrenzen nur noch schwer zu erkennen (*Rheinwald und Green, 1975b*). Diese Kolonien bestehen aus mehreren Zelllagen, die eine Basalschicht mit

teilungsfähigen Zellen sowie einige Lagen mit differenzierten Zellen umfassen (*Green, 1977; Rheinwald und Green, 1975b*).

### 2.3.2 Epidermale Homöostase in der Zellkultur

Mehrschichtige Plattenepithelien befinden sich normalerweise in einem dynamischen Gleichgewicht. Durch Proliferation der Basalzellen werden die an der Oberfläche abgeschilferten, differenzierten Zellen ersetzt. Es gibt drei verschiedene dynamische Kompartimente: das proliferierende Kompartiment (1) mit sich teilenden und ruhenden teilungsfähigen Zellen, sowie das sich differenzierende Kompartiment (2) mit postmitotischen Zellen, die während der terminalen Differenzierung biochemisch aktiv sind und das Desquamationskompartiment (3), das die differenzierten, vom Epithel gelösten Zellen enthält. Kulturen von mehrschichtigen Epithelien zeigen einen ähnlichen Aufbau *in vitro*. Die Populationsdynamik kann durch folgende Parameter beschrieben werden: Anzahl der Mitosen, Anzahl der Zellschichten, Transitzeit und Desquamationsrate (*Milstone, 1983*).

*Green (1977)* beschreibt, dass die im feeder layer System angezüchteten, mehrschichtigen Kolonien ein Gleichgewicht von Proliferation und Differenzierung erreichen, indem aus der obersten Zellschicht differenzierte Zellen in das Medium abgestoßen und durch Zellen aus der Basalschicht ersetzt werden. In das Medium abgeschilferte Zellen sind abgeflacht, groß und überwiegend kernhaltig.

### 2.3.3 Morphologie der Keratinozyten im Transmissionselektronenmikroskop

*Rheinwald und Green (1975b)* beschreiben, dass die von ihnen mit dem feeder layer System angezüchteten Kolonien aus mehreren Zellschichten, in denen die Zellen immer abgeflacht sind, bestehen. In allen Zellschichten kann man reichlich Desmosomen antreffen. Die oberste Schicht bzw. die obersten Schichten zeigen die typischen Verhornungsmerkmale.

*Bohnert et al. (1986)* beschreiben die Morphologie von ein bis zwei Wochen alten Kulturen muriner Keratinozyten. Diese bestehen aus drei bis fünf Lagen kernhaltiger Zellen mit weiten Interzellularräumen, über denen bis zu zehn Lagen dicht gepackter, abgeflachter Zellen mit einem cornified envelope liegen.

Die basale Zone besteht nach *Holbrook und Hennings (1983)* aus einer einzelnen Schicht von locker assoziierten, kubischen Keratinozyten, die am Untergrund anhaften. Im Gegensatz dazu beschreibt *Watt (1988)* die Basalzellen als abgeflachte Zellen. Eine strukturierte Basalmembran ist bei der Anzüchtung von epidermalen Keratinozyten in Plastik oder kollagenbeschichteten Kultivierungsgefäßen nicht sichtbar (*Bohnert et al, 1986; Watt, 1988*) und die Expression von Bestandteilen der Basalmembran ist

unvollständig (*Bohnert et al, 1986*). Meist ist die einzige Modifikation der am Untergrund haftenden Zellmembran ein Band von ausgerichteten Mikrofibrillen. Strukturell komplette Hemidesmosomen sind in Kulturen, die auf Kollagengelen angezüchtet wurden, beobachtet worden. Zellkontakte werden von Desmosomen und gap junctions gebildet, ansonsten sind die Zellen durch einen beträchtlichen Interzellularspalt getrennt. Im Zytoplasma sind reichlich Mitochondrien, ein gut entwickelter Golgi Apparat, wenig raues und glattes endoplasmatisches Retikulum, sowie reichlich freie Ribosomen und Polyribosomen anzutreffen. Der Zellkern besitzt einen oder mehrere große Nukleoli und oft sind tiefe Invaginationen sichtbar. In der basalen Zone findet man als Bestandteile des Zytoskeletts Mikrotubuli, Mikrofilamente und schmale Bündel von Keratinfilamenten, die entweder wahllos oder ausgerichtet angeordnet sind. Wenn die mehrschichtigen Kolonien über einen längeren Zeitraum kultiviert werden, kann man in den Basalzellen oft Lipide und sekundäre Lysosomen finden (*Holbrook und Hennings, 1983*).

*Holbrook und Hennings (1983)* berichten, dass die Keratinozyten der intermediären Zone nur wenige der charakteristischen Merkmale der Zellen des Stratum spinosum *in vivo* aufweisen. Diese Zellen sind flach (*Holbrook und Hennings, 1983; Watt, 1988*) und haben einen länglichen Kern, der zu ihrer Längsachse ausgerichtet ist. Sie sind durch Desmosomen verbunden. Es werden mehr Keratinfilamente als in der basalen Zone exprimiert und eine deutliche Verbindung der Keratinfilamente mit den Desmosomen ist sichtbar. Im Zytoplasma sieht man vor allem Mitochondrien und den Golgi Apparat sowie degenerative Vakuolen und Glykogen (*Holbrook und Hennings, 1983*). Nach *Lavker und Sun (1983)* sind, wenn überhaupt, nur wenige Keratohyalin granula und membrane coating granules sichtbar. Auch *Holbrook und Hennings (1983)* berichten, dass Keratohyalin granula nur selten und membrane coating granules noch seltener gebildet werden.

*Lavker und Sun (1983)* beschreiben, dass in den angezüchteten epidermalen Kolonien kein normales Stratum corneum ausgebildet wird. *Green (1977)* hingegen behauptet, dass die Keratinozyten der obersten Zellschichten in den Kolonien den Zellen des Stratum corneum gleichen. Meist besteht die obere Zone aus ein bis zwei Zellschichten (*Holbrook und Hennings, 1983*), in der die Keratinozyten einen cornified envelope erkennen lassen (*Banks-Schlegel und Green, 1981; Green, 1977; Holbrook und Hennings, 1983*). Nur noch vereinzelt sind Zellorganellen anzutreffen, die wenigen eventuell vorhandenen Zellorganellen weisen starke degenerative Veränderungen auf (*Holbrook und Hennings, 1983*). Nach *Banks-Schlegel und Green (1981)* sowie *Watt (1988)* besitzen in dieser Zone aber die meisten Zellen noch einen Zellkern. Im Gegensatz dazu beschreiben *Bohnert et al. (1986)* schuppenähnliche, kernlose Zellen in dieser Zone. Die Keratinozyten sind mit Keratinfilamenten angefüllt, die von den Keratohyalin granula abstammende

elektronendichte Matrix fehlt jedoch in den verhornten Zellen (*Bohnert et al., 1986; Green, 1977; Holbrook und Hennings, 1983*).

In einer organotypischen Kokultur entspricht das morphologische Bild eher dem der Epidermis der Haut. Eine Einteilung der Zellschichten in Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum ist möglich. Von den Basalzellen werden gut entwickelte Hemidesmosomen ausgebildet und das Stratum spinosum besitzt größere, flachere Zellen mit typischen Filamentbündeln, die an Desmosomen inserieren. Keratohyalin granula sind im Stratum granulosum und membrane coating granules in der Überganszone anzutreffen. Das Stratum corneum besteht aus kernlosen Zellen, die dicht gepackte Keratinfilamente enthalten (*Hinterhuber et al., 2002; Stark et al., 1999*). *Madison et al. (1988)* berichten, dass in ihrem Kokultivierungssystem von primären murinen Keratinozyten viele membrane coating granules gebildet werden, deren Inhalt in den Interzellularraum ausgeschleust wird.

## 2.4 Differenzierung der Keratinozyten *in vitro*

### 2.4.1 Basalzellen

#### 2.4.1.1 Basalzelltypen

Die Grundvoraussetzung für das Wachstum epidermaler Keratinozyten in der Zellkultur ist ihre Fähigkeit, sich *in vitro* zu teilen. Im Stratum basale kommen drei unterschiedliche Zelltypen vornehmlich Stammzellen, transit amplifying cells und postmitotische Basalzellen vor. Dabei repräsentieren Stammzellen und transit amplifying cells die teilungsfähige Zellpopulation (*Alonso und Watt, 2003; Aurelian et al., 2001; Dunnwald et al., 2001; Jones und Watt, 1993; Watt, 1988; Zhu et al., 1999*). *Jones und Watt (1993)* sprechen von Stammzellen, wenn sie im Erwachsenenalter eine hohe Kapazität an Selbsterneuerung besitzen. Zusätzlich haben sie die Fähigkeit, Tochterzellen zu produzieren, die sich dann terminal differenzieren (*Alonso und Watt, 2003*). Sich ständig erneuernde Epithelien enthalten kleine undifferenzierte Stammzellen, die sich selbst erneuern und für die Erhaltung der sich differenzierenden Zellpopulation sorgen (*Bickenbach und Chism, 1998*). Stammzellen sind die kleinsten Vertreter der epidermalen Keratinozyten (*Potten und Booth, 2002*). Ein spezifischer Marker für epidermale Stammzellen ist noch nicht bekannt (*Alonso und Watt, 2003*). *Dunnwald et al. (2001)* nehmen an, dass bei jeder Teilung einer Stammzelle eine neue Stammzelle und eine transit amplifying cell entsteht. Die Bezeichnung transit amplifying cell ist von der Hämatopoese abgeleitet und weist darauf hin, dass diese Keratinozyten die Proliferation der Stammzellen verstärken, da sie noch über eine gewisse Teilungskapazität verfügen (*Aurelian et al., 2001; Jones und*

Watt, 1993). Nach Zhu et al. (1999) können sich transit amplifying cells noch drei bis fünfmal teilen, bevor sie sich terminal differenzieren.

In Experimenten mit humanen epidermalen Keratinozyten variiert die relative Verteilung von Stammzellen, transit amplifying cells und postmitotischen Keratinozyten in Abhängigkeit von der angezüchteten Zelllinie, Passage und Konfluenz der Kultur (Jones und Watt, 1993).

#### 2.4.1.2 Unterscheidung von Stammzellen und transit amplifying cells

Alle drei Basalzelltypen exprimieren Rezeptoren der Integrinfamilie auf ihrer Oberfläche. Diese Rezeptoren dienen nicht nur der Anheftung der Keratinozyten an die extrazelluläre Matrix, sondern spielen auch eine wichtige Rolle in der Regulation der Differenzierung und der damit verbundenen Migration der Zellen aus dem Stratum basale (Fuchs et al., 1997; Hodivala und Watt, 1994; Jones und Watt, 1993). Für die Unterscheidung der proliferativen Basalzelltypen sind die  $\beta_1$  Integrine von großer Bedeutung. Jones und Watt (1993) beschreiben eine Beziehung zwischen der Dichte von  $\beta_1$  Integrinen auf der Zelloberfläche und der proliferativen Kapazität der Keratinozyten des Stratum basale. Zellen mit einer hohen Expression von  $\beta_1$  Integrinen besitzen eine hohe proliferative Kapazität, daher bietet die Anzahl von  $\beta_1$  Integrinen auf der Zelloberfläche eine gute Möglichkeit, die drei Basalzelltypen mit ihren unterschiedlichen Proliferationskapazitäten zu unterscheiden. Stammzellen besitzen die größte Teilungskapazität und folglich auch die höchste Dichte an  $\beta_1$  Integrinen (Dunnwald et al., 2001; Jones und Watt, 1993; Levy et al., 2000; Potten und Booth, 2002). Die Expression von  $\beta_1$  Integrinen der Stammzellen ist doppelt so hoch wie die der transit amplifying cells (Zhu et al., 1999). Postmitotische Basalzellen besitzen zwar noch  $\beta_1$  Integrine auf ihrer Oberfläche, obwohl die  $\beta_1$  Integrine ihre Rezeptorenfunktion verloren haben (Poumay et al., 1994; Zhu et al., 1999).

Weitere Unterscheidungskriterien für Stammzellen und transit amplifying cells sind die Fähigkeit, sich an ein Substrat, d.h. an den Untergrund des jeweils verwendeten Kultivierungsgefäßes zu binden und die Morphologie der von ihnen *in vitro* gebildeten Kolonien. Stammzellen bilden große Kolonien aus kleinen undifferenzierten Zellen (Bickenbach und Chism, 1998). Diese Kolonien wachsen langsamer, sind dafür aber größer, da sie aus einer höheren Zellzahl bestehen, als die von den transit amplifying cells gebildeten Kolonien. Transit amplifying cells bilden Kolonien aus größeren, differenzierteren Zellen, mit einer begrenzten Lebensdauer (Dunnwald et al., 2001; Zhu et al., 1999).

Aufgrund der höheren Expression von  $\beta_1$  Integrinen verfügen Stammzellen über die Fähigkeit des schnelleren Anheftens an extrazelluläre Matrixproteine bzw. das jeweils

verwendete Substrat als die transit amplifying cells (*Bickenbach und Chism, 1998; Jones und Watt, 1993; Zhu et al., 1999*).

#### 2.4.2 Integrine und die Initiation der Differenzierung

In der Epidermis fällt die Initiation der Differenzierung normalerweise mit der Inhibition der Expression und Funktion der Integrine zusammen. Dabei wird sichergestellt, dass die differenzierenden Zellen selektiv aus dem Stratum basale ausgestoßen werden. Experimente mit angezüchteten Keratinozyten haben eine Wechselwirkung zwischen der Differenzierung und der darauf folgenden Migration aus dem Stratum basale mit den adhäsiven Fähigkeiten der Zellen aufgezeigt (*Hobbs et al., 2004; Hoidalva und Watt, 1994*). Von den epidermalen Keratinozyten werden drei verschiedene  $\beta_1$  Integrine exprimiert:  $\alpha_2\beta_1$  Integrin ist der Rezeptor für Kollagen und Laminin,  $\alpha_3\beta_1$  Integrin ist der Rezeptor für Laminin sowie Epiligrin, und  $\alpha_5\beta_1$  Integrin ist der Rezeptor für Fibronectin (*Potten und Booth, 2002*).

$\beta_1$  Integrine werden von sowohl in der Epidermis als auch in mehrschichtigen Kulturen hauptsächlich von Basalzellen exprimiert (*Hobbs et al., 2004; Hoidalva und Watt, 1994; Jones und Watt, 1993; Poumay und Leclercq-Smekens, 1998; Poumay et al., 1994; Zhu et al., 1999*), in suprabasalen Keratinozyten sind keine  $\beta_1$  Integrine nachweisbar (*Jones und Watt, 1993*). Im Gegensatz dazu berichten *El-Ghalbzouri et al. (2002b)*, dass in den von ihnen angezüchteten Hautäquivalenten  $\beta_1$  Integrine auch in den suprabasalen Zellschichten exprimiert wurden. Sie führen dies auf eine Hyperproliferation zurück. Auch *Hobbs et al. (2004)* beobachteten eine suprabasale Expression von  $\beta_1$  Integrinen bei Hyperproliferation und entzündlichen Prozessen.

Beginnen die basalen Keratinozyten sich zu differenzieren, bleibt zunächst das Level der  $\beta_1$  Integrine auf dem gleichen Niveau, aber die Funktionsfähigkeit der  $\beta_1$  Integrine nimmt ab. Im weiteren Verlauf der Differenzierung gehen die  $\beta_1$  Integrine verloren (*Jones und Watt, 1993; Poumay et al., 1994; Zhu et al., 1999*). Cadherine spielen eine wichtige Rolle bei dem Funktionsverlust der Integrine, ein Beweis hierfür ist, dass Antikörper gegen Cadherine den Verlust von Proteinen und mRNA für Integrine verhindern (*Hoidalva und Watt, 1994*). Aufgrund des Funktionsverlustes der  $\beta_1$  Integrine verlieren die Basalzellen ihre Bindung zu der extrazellulären Matrix und als Folge des Kontaktverlustes gelangen die differenzierteren Zellen in das Stratum spinosum (*Jones und Watt, 1993; Poumay und Leclercq-Smekens, 1998*).

Ein Stimulus für die terminale Differenzierung der Keratinozyten ist die Reduktion der Liganden an den  $\beta_1$  Integrinrezeptoren (*Jones und Watt, 1993*). *Levy et al. (2000)* beschreiben zwei unterschiedliche, von der Anzahl an den  $\beta_1$  Integrinrezeptor

gebundenen Liganden „abhängige Signale“. Mit Liganden besetzte Rezeptoren signalisieren dem Keratinozyten „nicht differenzieren“, freie Rezeptoren bedeuten für den Keratinozyten „differenzieren“.

#### 2.4.3 Cadherine

Cadherine werden von normalen Keratinozyten für die interzelluläre Adhäsion und die Ausbildung mehrerer Zellschichten benötigt, außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Differenzierung (*Tinkle et al., 2004*). Cadherine bilden eine große Familie von calciumabhängigen Zelladhäsionsmolekülen, die wichtig für verschiedene morphologische Prozesse sind (*Hines et al., 1999; Hodivala und Watt, 1994; Zhou et al., 2002*). Von epidermalen Keratinozyten werden hauptsächlich folgende Cadherine exprimiert: E- und P-Cadherine, sowie Desmocollin und Desmoplakin (*Hodivala und Watt, 1994*). *Zhou et al. (2002)* beschreiben ein neues Mitglied der Cadherinfamilie, das T-Cadherin. T-Cadherine sind nur in Basalzellen nachweisbar und diffus auf der gesamten Zelloberfläche verteilt, während E- und P-Cadherine an den Zellkontakten konzentriert vorkommen. Die genaue Funktion dieser T-Cadherine in der Epidermis ist noch unbekannt.

Die klassischen Cadherine (E- und P-Cadherine) vermitteln Zellkontakte über einen homotypischen Mechanismus (*Haass et al., 2004*). Darunter versteht man, dass E-Cadherine einer Zelle sich nur an E-Cadherine einer Nachbarzelle binden (*Hines et al., 1999; Tinkle et al., 2004*). E-Cadherine werden in allen Zellschichten exprimiert. Im Gegensatz dazu ist die Expression von P-Cadherinen hauptsächlich auf das Stratum basale beschränkt (*Furukawa et al., 1997; Haass et al., 2004; Hodivala und Watt, 1994*).

Ein dreidimensionales Wachstum und die damit verbundene Ausbildung mehrerer Zellschichten werden bei angezüchteten epidermalen Keratinozyten unterdrückt, wenn die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Medium auf 0.1 mM reduziert wird (*Hodivala und Watt, 1994*). Zwar synthetisieren Keratinozyten bei niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration Cadherine, da diese jedoch nicht voll aktiv sind, werden von den Zellen keine Zellkontakte ausgebildet, und folglich ist die Ausbildung mehrerer Zelllagen unmöglich (*Hines et al., 1999*). Als Folge initiieren einige noch mit dem Untergrund verbundene Zellen, *in vivo* entsprechen sie den Basalzellen, die Differenzierung. Unter diesen Bedingungen werden Integrine und Differenzierungsmarker wie Involucrin zusammen exprimiert. Wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf ein normales Niveau von 1.8 mM erhöht, konzentrieren sich die Cadherine in Zellkontakten (*Hodivala und Watt, 1994*). Zuerst werden Zonulae adhaerentes ausgebildet. Die Bildung von Desmosomen (Maculae adhaerentes) beginnt etwas später. Sie ist abhängig von der Funktion der klassischen Cadherine, obwohl diese nicht in der desmosomalen Struktur vorhanden sind (*Hines et al., 1999*). Mit der Ausbildung von Zellkontakten beginnen die Keratinozyten dreidimensional zu wachsen und eine

mehrschichtige epithelähnliche Struktur zu bilden (*Hines et al., 1999; Hodivala und Watt, 1994*), Integrine und Differenzierungsmarker werden nicht mehr gleichzeitig exprimiert (*Hodivala und Watt, 1994*).

#### 2.4.4 Keratine

Das Hauptprodukt der Differenzierung sind die Keratinfilamente (*Yupsa et al., 1989*). Das Molekulargewicht der exprimierten Keratine erhöht sich während der Differenzierung (*Eckfalck et al., 1991*). Nach *Fuchs und Green (1978)* enthalten angezüchtete humane Epidermiszellen und humane Hornzellen aus dem Stratum corneum eine Anzahl von Keratinen mit unterschiedlichen Molekulargewichten, deren Größenverteilung aber unterschiedlich ist. Aufgrund der Unterschiede in Größe und Struktur der Keratine *in vitro* und *in vivo* nehmen *Fuchs und Green (1978)* an, dass epidermale Zellen die Expression ihrer Keratingene modifizieren können. Auch *Baden (1984)*, *Bowden et al. (1987)* und *Eckfalck et al. (1991)* berichten, dass kultivierte epidermale Keratinozyten nicht exakt die gleichen Keratine wie *in vivo* exprimieren und *in vitro* nur selten Keratine mit einem Molekulargewicht von über 60 kD exprimiert werden.

In den Keratinozyten der basalen Zellschicht dominieren die Keratine K5 und K14 (*Eckfalck et al., 1991; Poumay und Pittelkow, 1995; Yupsa et al., 1989*). Das erste Ereignis der Differenzierung ist der Verlust der Teilungsfähigkeit (*Drozdoﬀ und Pledger, 1993; Poumay und Pittelkow, 1995; Watt, 1988*). Es folgt die Migration der Keratinozyten in die suprabasalen Zellschichten (*Poumay und Leclercq-Smekens, 1998*). Die Keratintypen K1 und K10 werden sehr früh in der epidermalen Differenzierung exprimiert, d.h. wenn die Keratinozyten die Basalschicht verlassen und in die suprabasalen Zellschichten eintreten. K1 und K10 repräsentieren sensitive Marker für das frühe Stadium der Differenzierung (*Drozdoﬀ und Pledger, 1993; Poumay und Leclercq-Smekens, 1998; Poumay und Pittelkow, 1995; Stark et al., 1999*). In den suprabasalen Zellschichten wird die Genexpression für K5 und K14 unterdrückt (*Yupsa et al., 1989*). *In vitro* induziert das Erreichen der Konfluenz nach *Poumay und Pittelkow (1995)* den Beginn der Differenzierung und somit die Expression von K1 und K10. K10 wird *in vitro* in allen suprabasalen Zellschichten unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von Fibrozyten exprimiert (*Ghalbzouri et al., 2002a*).

K16 ist ein Indikator für aktivierte Keratinozyten und essentiell für die Wundheilung. Es zeigt eine starke suprabasale Expression in der organotypischen Kokultur von *Stark et al. (1999)*. Auch *Hinterhuber et al. (2002)* beschreiben eine Expression von K16, und des Weiteren eine Expression von K14 nicht nur in den Basalzellen sondern auch in den ersten suprabasalen Zellschichten. *In vitro* Modelle epidermaler Keratinozyten können mit einem pathologischen Zustand *in vivo* verglichen werden, die Keratine 6, 16 und 17

werden bei Verletzungen exprimiert und weisen auf einen aktivierten Zustand der Keratinozyten hin (*El-Ghalbzouri et al., 2002b*). In der organotypischen Kokultur von *Ghalbzouri et al. (2002a)* wird in Gegenwart von einer ausreichenden Anzahl von Fibrozyten die Expression von K6 reduziert und K16 sowie K17 sind nicht mehr nachweisbar.

#### 2.4.5 Weitere Differenzierungsmarker

Zu den spezifischen Markern der Differenzierung gehören neben K1 und K10 als Marker des frühen Stadiums der Differenzierung auch Filaggrin, Involucrin und epidermale Transglutaminase. Der cornified envelope gilt als Marker für die terminale Differenzierung (*Drozdoff und Pledger, 1993; Poumay und Leclercq-Smekens, 1998; Yupsa et al., 1989*).

Filaggrin ist ein basisches Protein und die Hauptkomponente der Keratohyalin granula. *In vivo* ist es im Stratum granulosum anzutreffen (*Eckfalck et al., 1991; Yupsa et al., 1989*). Dieses Protein interagiert mit den Keratinfilamenten, um Makrofibrillen und Filamentbündel zu bilden (*Yupsa et al., 1989*). Der Vorläufer des Filaggrins ist das Profilaggrin (*Fleckmann et al., 1985*). Von kultivierten Keratinozyten werden nur kleinere Mengen Profilaggrin synthetisiert, die nicht in Filaggrin umgebaut werden können (*Banks-Schlegel und Green, 1981; Fleckmann et al., 1985*). Nach *Nirunsuksiri et al. (1998)* beginnen epidermale Keratinozyten mit der Expression von Profilaggrin mRNA, wenn sie die Konfluenz erreichen. *Kubilus et al. (1985)* berichten, dass eine von ihnen angezüchtete Rattenzelllinie Filaggrin synthetisiert.

Involucrin ist ein lösliches Vorläuferprotein des cornified envelope und wird von epidermalen Keratinozyten *in vivo* und *in vitro* synthetisiert (*Banks-Schlegel und Green, 1981; Kubilus et al., 1987; Thacher und Rice, 1985; Watt und Green, 1981*). Es ist ein Substrat der Transglutaminase (*Baden et al., 1987*). Basalzellen der *in vitro* gebildeten Kolonien sind fast immer frei von nachweisbarem Involucrin (*Banks-Schlegel und Green, 1981*). *In vitro* ist Involucrin im Gegensatz zu der Situation *in vivo* für gewöhnlich ab der ersten suprabasalen Zelllage einer Kolonie nachweisbar (*Banks-Schlegel und Green, 1981; Watt, 1983; Watt und Green, 1982*). Nach *Watt und Green (1981)* beginnen Keratinozyten mit der Involucrinsynthese, wenn sie einen Durchmesser von mindestens 14 µm erreicht haben.

Transglutaminasen sind die Schlüsselenzyme in der späten Differenzierung der Keratinozyten, da sie direkt an der Bildung des cornified envelope beteiligt sind (*Mehul et al., 2001*). In kultivierten, humanen Keratinozyten wiesen *Thacher und Rice (1985)* drei verschiedene Transglutaminasen nach. Sie treten in zwei verschiedenen Formen auf, zum einen membrangebunden und zum anderen frei im Zytosol. Ca<sup>2+</sup> ist ein Kofaktor der Transglutaminasen, daher kann die Bildung des cornified envelope durch Ca<sup>2+</sup> induziert

werden (*Thacher und Rice, 1985*). Aber auch im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medium kommt es zur Ausbildung des cornified envelope und daraus ist zu schließen, dass in den Organellen der Keratinozyten genügend  $\text{Ca}^{2+}$  gespeichert sein muss (*Rice und Green, 1979*).

Der cornified envelope spielt eine wichtige Rolle in der Barrierefunktion des Stratum corneum (*Lieblich, 1999*) und übernimmt eine Stütz- oder Stabilisierungsfunktion (*Mülling, 1993*). Er wird erst spät während der Differenzierung, d.h. wenn die Zellen sterben und ihre Membran durchlässig wird, in der Epidermis und auch in angezüchteten epidermalen Keratinozyten ausgebildet (*Rice und Green, 1979*). Die Bildung des cornified envelope ist ein wichtiger Schritt in der finalen Phase der Verhornung. Es gibt insgesamt sieben Vorläuferproteine des cornified envelope, zu denen auch Involucrin, Periplakin und Envoplakin gehören (*Aho, 2004*). Diese Proteine werden durch epidermale Transglutaminasen an der inneren Oberfläche der Plasmamembran zu einer Proteinhülle verbunden (*Akiyama et al., 2002; Baden et al., 1985; Kubilus et al., 1987; Thacher und Rice, 1985*). Die äußere Oberfläche der Plasmamembran wird mit dem Material der membrane coating granules bedeckt (*Akiyama et al., 2002*). In den oberen differenzierteren Zellschichten der Kolonien bilden die Keratinozyten einen cornified envelope aus (*Banks-Schlegel und Green, 1981; Green, 1977; Holbrook und Hennings, 1983*). In der normalen Zellkultur bilden etwa fünf Prozent der angezüchteten Zellen einen cornified envelope, die Ausbildung von cornified envelopes kann *in vitro* durch Substanzen, wie nichtionische Detergenzien, die die Durchlässigkeit der Plasmamembran für  $\text{Ca}^{2+}$  erhöhen, initiiert werden (*Rice und Green, 1979*).

Calmodulin-like skin protein (CLSP) ist ein neuer Marker für das späte Stadium der Differenzierung. CLSP ist ein calciumbindendes, hautspezifisches Protein, das im Stratum granulosum und in den unteren Schichten des Stratum corneum exprimiert wird, nicht aber in proliferierenden Zellen. In angezüchteten epidermalen Keratinozyten wird die Expression dieses Proteins stark erhöht, nachdem die Differenzierung der Keratinozyten durch eine Anhebung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration induziert wurde (*Mehul et al., 2001*).

## 2.5 Weitere Faktoren mit Einfluss auf Proliferation und Differenzierung

### 2.5.1 Calcium

Die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten *in vitro* kann selektiv durch die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reguliert werden, wobei der intrazelluläre Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zur Synthese der Differenzierungsmarker und somit zur terminalen Differenzierung führt. Eine Erhöhung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in kultivierten Keratinozyten bewirkt aufgrund des schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über die Plasmamembran eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Der Calcium-Influx ist bei sich differenzierenden Keratinozyten erhöht (*Li et al., 1996; Manaves et al., 2004*). *In vivo* existiert ein Calciumgradient. Im Stratum basale ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration extrem niedrig und im Stratum granulosum ungewöhnlich hoch (*Elias et al., 2002a; Elias et al., 2002b; Li et al., 1996; Yupsa et al., 1989*). Dies lässt darauf schließen, dass für die aufeinander folgende Expression der epidermalen Differenzierungsmarker eine spezifische extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration notwendig ist (*Yupsa et al., 1989*). Auch für die Homöostase der epidermalen Barriere ist dieser Calciumgradient von entscheidender Bedeutung. Infolge eines Zusammenbruchs der epidermalen Barriere kommt es zu einer Erniedrigung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels, als Reaktion hierauf schleusen die membrane coating granules ihren Inhalt aus (*Elias et al., 2002b*), was zu einem Wiederaufbau der Barriere führt. Die Ausschleusung des membrane coating material kann also auch durch Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beeinflusst werden (*Elias et al., 2002a*).

Die Anzüchtung von Keratinozyten in Medien mit niedriger  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration (0.02-0.1 mM) führt zu einer hohen Proliferationsrate und einer Unterdrückung der Differenzierung (*Drozdorff und Pledger, 1993; Ekfalck et al., 1991; Hennings et al., 1980; Holbrook und Hennings, 1983*). Die Keratinozyten wachsen als Monolayer ohne mehrere Zellschichten auszubilden. Die Ausbildung von Desmosomen wird unterdrückt (*Ekfalck et al., 1991; Hennings et al., 1980; Wanner et al., 1999*) und die Keratinozyten können mehrere Monate hinweg angezüchtet sowie subkultiviert und geklont werden (*Hennings et al., 1980*). Eine Erniedrigung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration hat keinen Einfluss auf die Synthese der niedermolekularen Keratine 5 und 14 (*Li et al., 1996; Yupsa et al., 1989*). Nach der Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Medium wird die normale Struktur der angezüchteten Keratinozyten schnell wiederhergestellt (*Ekfalck et al., 1991; Hennings et al., 1980; Li et al., 1996*), Zellkontakte und Desmosomen bilden sich innerhalb kurzer Zeit aus (*Hennings et al., 1980; Li et al., 1996*). Bei einer Anzüchtung in einem Medium mit einer hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration werden die Differenzierung und die Synthese der Differenzierungsmarker K1, K10, Filaggrin, Loricrin und epidermale Transglutaminase induziert (*Hager et al., 1999; Li et al., 1996; Yupsa et al., 1989*).

### 2.5.2 Endokrine Faktoren

In Explants der Rinderklaue stimuliert Insulin die Proteinsynthese. Wenn es in einer physiologischen Konzentration im Medium enthalten ist, fördert es auch die DNA-Synthese, die ein Index für die Zellproliferation ist (*Hendry et al., 1999*).

Eine Supplementierung des Mediums mit Glukokortikoiden, in der Regel wird dem Medium Hydrokortison zugesetzt, führt zu einer Stimulierung der Zellteilung. Des Weiteren verzögern Glukokortikoide die Differenzierung von kultivierten epidermalen Keratinozyten (*Eckfalk et al. 1991; Rheinwald und Green, 1975b*) und verbessern die Anheftung von angezüchteten Zellen an den Untergrund (*Freshney, 2000*).

Hydrokortison führt zu einer Verringerung der Synthese von Proteinen, somit auch von Keratinen in Explants der Rinderklaue. Diese Wirkung ist vergleichbar mit der differenzierungshemmenden Wirkung des Hormons in humanen epidermalen Keratinozytenkulturen. Der marginale Effekt von Hydrocortison auf die DNA-Synthese von Explants der Rinderklaue steht im Widerspruch zu der Wachstumsstimulierung in humanen Keratinozytenkulturen, kann aber vielleicht auf die geringe Anzahl teilungsfähiger Zellen im Stratum germinativum der Klaue zurückgeführt werden (*Hendry et al., 1999*).

Epidermal growth factor (EGF) ist ein endogenes, mitogenes Peptid (*Rheinwald und Green, 1977*). Neben der starken mitogenen Wirkung ist EGF auch ein potenter Inhibitor der Differenzierung in bestimmten Zielzellen, zu denen auch die Keratinozyten gehören (*Eckfalk et al., 1991; Holbrook und Hennings, 1983; Rheinwald und Green, 1977; Wakita und Takigawa, 1999*). Nach *Poumay und Pittelkow (1995)* wird die Expression von mRNA für die Keratine 1 und 10 durch EGF unterdrückt, des Weiteren wird die Expression der meisten Integrine sowie die der Keratine 6 und 16, des Involucrin und der Transglutaminase erhöht, wenn dem Medium EGF zugesetzt wird (*Ghalbzouri et al., 2002a*). *Wakita und Takigawa (1999)* beschreiben für Keratinozyten ohne Kontakt zu extrazellulärer Matrix bzw. in Suspensionskultur einen gegenteiligen Effekt von EGF. Unter diesen Bedingungen wurden vermehrt Marker der späten Differenzierungsstadien exprimiert. *Green (1979)* beobachtete in Gegenwart von EGF neben einer erhöhten Wachstumsrate in konfluenten Keratinozytenkulturen, eine erhöhte Abschilferung von Zellen in das Medium.

*Eckfalk et al. (1988)* wiesen bei *in vitro* Versuchen an der Matrix der Rinderklaue eine spezifische Bindung von EGF an Membranen und somit einen EGF Rezeptor nach. Sie unterstellen EGF neben dem mitogenen Effekt auch die Fähigkeit, offenbar *in vitro* die Differenzierung von Keratinozyten hemmen zu können. Im Gegensatz dazu stellten *Hendry et al. (1999)* fest, dass EGF in Explants der Rinderklaue die Proteinsynthese

stimulierte aber keinen Einfluss auf die DNA-Synthese und somit auf die Wachstumsrate hatte.

### 2.5.3 Parakrine Faktoren der Dermis

Dermo-epidermale Interaktionen kontrollieren das Wachstum und die Differenzierung der Epidermis (*Maas-Szabowski et al., 1999; Smola et al., 1993*) und spielen eine wichtige Rolle bei der Gewebemöostase und in der Wundheilung (*Maas-Szabowski et al., 1999*). Diese Wechselwirkungen haben drei Grundlagen: Produktion von löslichen Faktoren mit autokriner und parakriner Wirkung, extrazelluläre Matrix Einflüsse und Zellkontakte (*Maas-Szabowski et al., 1999; Smola et al., 1993*). Die dermo-epidermalen Wechselwirkungen werden mit Hilfe von Kokulturen untersucht, in denen Keratinozyten gemeinsam mit Fibrozyten angezüchtet werden. Die einfachste Form der Kokultur stellen die zweidimensionalen Kokulturen von *Rheinwald und Green (1975b)* dar. Eine starke Abhängigkeit der Proliferation der Keratinozyten *in vitro* von mesenchymalen Wechselwirkungen wurde zuerst in diesen zweidimensionalen Kokulturen von Keratinozyten und postmitotischen 3T3 Zellen demonstriert (*Rheinwald und Green, 1975b*). Fibrozyten synthetisieren lösliche, parakrin wirkende Wachstumsfaktoren, wie z.B. die fibroblast growth factors (FGFs). Folgende Mitglieder der FGF-Familie beeinflussen die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten: basic fibroblast growth factor (bFGF), keratinocyte growth factor (KGF, FGF-7), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) und FGF-10. Davon ist bFGF ein hochwirksamer Wachstumsfaktor, der ungefähr die gleiche mitogene Potenz wie EGF aufweist (*O'Keefe et al., 1988*). Auch KGF hat eine starke mitogene Wirkung und wird als Hauptmediator der dermo-epidermalen Interaktionen angesehen (*Maas-Szabowski et al., 1999; Marchese et al., 2001; Werner und Smola, 2001*). Außerdem fördert KGF die frühen Stadien der Differenzierung, inhibiert die terminale Differenzierung sowie die Apoptose und hat eine Schlüsselrolle in der Reepithelialisierung (*Marchese et al., 2001*). Nach *El-Ghalbzouri et al. (2002a)* ist der Effekt eines KGF Mediumzusatzes bei einer organotypischen Kokultur nur gering. Ein weiterer wichtiger Regulator der Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten ist GM-CSF (*Maas-Szabowski et al., 2001*), neben seiner mitogenen Wirkung fördert er auch die terminale Differenzierung in den suprabasalen Zellen (*Werner und Smola, 2001*). FGF-10 ist ein neues Mitglied der FGF Familie. Dieser Wachstumsfaktor ist nicht nur ein potentes Mitogen, sondern fördert auch die Expression der frühen Differenzierungsmarker K1 und K10, sowie des späten Differenzierungsmarkers Filaggrin als Antwort auf ein  $\text{Ca}^{2+}$  Signal (*Marchese et al., 2001*). Keratinozyten regulieren ihr Wachstum durch einen doppelten parakrinen Mechanismus, das heißt, die Keratinozyten produzieren Faktoren, die die Expression von

Wachstumsfaktoren in den Fibrozyten induzieren. Diese von den Fibrozyten synthetisierten Faktoren regulieren dann das Wachstum und die Differenzierung der Keratinozyten. Die Expression von KGF und GM-CSF wird auf diesem Weg durch eine Freisetzung von IL-1 aus den Keratinozyten induziert (*Maas-Szabowski et al., 2001; Werner und Smola, 2001*).

#### 2.5.4 Autokrine Faktoren

*Poumay und Leclercq-Smekens (1998)* beschreiben autonome Wachstumsbedingungen für epidermale Keratinozyten. Ist die Anzahl der Keratinozyten in Kultivierungsgefäß groß genug, stimulieren die Zellen sich selbst durch den von ihnen synthetisierten Faktor Amphiregulin, der den EGF-Rezeptor aktivieren kann. Nach *Schelfhout et al. (2002)* ist Amphiregulin der stärkste autokrine Wachstumsfaktor für epidermale Keratinozyten. Ein weiterer die Proliferation der epidermalen Keratinozyten stimulierender, autokriner Wachstumsfaktor ist das Epiregulin. Dieser Faktor gehört genau wie das Amphiregulin zu der EGF-Familie und kann ebenfalls an den EGF-Rezeptor binden (*Shirakata et al., 2000*).

#### 2.5.5 Vitamine

Die epidermale Differenzierung wird auch durch Vitamin A und andere Retinoide geregelt, die in einer konventionellen Kultur in ausreichender Menge durch das Serum angeboten werden (*Fuchs und Green, 1981; Kubilus, 1983; Stark et al., 1999*). Vitamin A in normalen Konzentrationen, ca.  $10^{-8}$  mol/l im konventionellen Medium (*Kubilus, 1983*), stimuliert die Proliferation, somit die DNA Synthese und verhindert die Differenzierung der Keratinozyten (*Eckfalck et al., 1991; Holbrook und Hennings, 1983; Islam et al., 2000; Kubilus, 1983*). Die Synthese von leichten Keratinen wird auf Kosten der schweren Keratine verstärkt (*Eckfalck et al., 1991; Fuchs und Green, 1981*). Die Bildung von Keratohyalingranula und des cornified envelope unterbleibt (*Eckfalck et al., 1991; Kubilus, 1983*), da die mRNA Expression der meisten Differenzierungsmarker unterdrückt wird (*Presland et al., 2001*). Vitamin A und andere Retinoide haben in hohen Konzentrationen einen starken Antikeratinisierungseffekt, wobei die Hauptwirkung eine erhöhte Desquamation der am stärksten keratinisierten Zellen in das Medium ist (*Kubilus, 1983; Kubilus et al., 1985*). Wird das Serum aus dem Medium entfernt, verlangsamt sich das Zellwachstum der Keratinozyten (*Kubilus, 1983*). Es werden mehrere Zelllagen ausgebildet und Marker der späten Differenzierungsstadien, einschließlich von hochmolekularen Keratinen, synthetisiert (*Fuchs und Green, 1981; Holbrook und Hennings, 1983; Kubilus, 1983*). Morphologisch sind die Haupteffekte der Retinoide eine Verbreiterung der Interzellularspalten und eine Abnahme des Zellzusammenhalts

aufgrund einer verringerten Anzahl von Desmosomen (*Kubilus, 1983; Wanner et al., 1999*). *Islam et al. (2000)* berichten, dass Retinoide in kultivierten Keratinozyten durch Rezeptoraktivierung Apoptose induzieren können.

Vitamin D<sub>3</sub> hat den entgegengesetzten Effekt von Vitamin A auf die Differenzierung der Keratinozyten. Ist ein Vitamin-D<sub>3</sub>-Überschuss im Kultivierungsmedium vorhanden, steigt der Anteil von Keratinozyten mit der Ausformung einer cornified envelope und anderen späten Differenzierungsmerkmalen (*Eckfalck et al., 1991*).

#### 2.5.6 Fibrozyten

In Gegenwart von Fibrozyten wird die Proliferation und Migration von Keratinozyten stimuliert, sowie die epidermale Struktur merklich verbessert (*Bohnert et al., 1986, El-Ghalbzouri et al., 2002a*). Nach *Rheinwald und Green (1975b)* sind die 3T3 Zellen der ausschlaggebende Faktor für die Bildung von verhornenden Kolonien der humanen Keratinozyten in feeder layer Systemen. *Green (1977)* behauptet, dass 3T3 Zellen keinen Einfluss auf die Differenzierung der Keratinozyten haben, aber essentiell für deren Wachstum sind. Eine normale Differenzierung von Keratinozyten in Abwesenheit von Fibrozyten ist nach *El-Ghalbzouri et al. (2002a)* nur mit einer Mediumsupplementierung von EGF und KGF möglich.

#### 2.5.7 Bebrütungstemperatur

Normalerweise werden Säugetierzellen bei einer Temperatur von 37°C, dies entspricht der Körperkerntemperatur, angezüchtet. Unter physiologischen Bedingungen erreicht eine Epidermiszelle nicht die Körperkerntemperatur. Daher entspricht eine Bebrütungstemperatur von 33°C eher den physiologischen Bedingungen und verbessert die Differenzierung (*Poumay und Leclercq-Smekens, 1998*). Ein weiterer Effekt einer niedrigen Bebrütungstemperatur ist, dass in einer Mischkultur aus Fibrozyten und Keratinozyten die Proliferation der Keratinozyten dominiert: Fibrozyten wachsen bei diesen niedrigen Temperaturen langsamer (*Eckfalck et al., 1990; Wunn et al., 1999*).

*Ponec et al. (1997)* berichten, dass sie mit ihrem Kultivierungssystem in Abwesenheit von EGF bei 33°C eine gut differenzierte Epidermis anzüchten konnten. Diese Kulturen wiesen eine höhere morphologische Ähnlichkeit zur Haut auf als bei 37°C angezüchtete. *Gibbs et al. (1998)* schlagen vor, dass der Temperaturgradient innerhalb der Epidermis die Differenzierung über temperaturempfindliche Regulierungsmechanismen mit steuert.

### 2.5.8 Andere Faktoren

In serumhaltigen Medien ist das aus dem Serum stammende Plasminogen der für den Kernabbau in differenzierten Keratinozyten entscheidende Serumbestandteil, da der Kernabbau in angezüchteten Keratinozyten unabhängig von Lysosomen ist (*Green, 1977*). Die Keratinozyten besitzen ein Aktivatorenzym für Plasminogen (*Green, 1977; Isserhof et al., 1983*).

Choleratoxin ist der stärkste Inhibitor der Vergrößerung und Differenzierung von epidermalen Keratinozyten *in vitro* (*Eckalck et al., 1991*).

Ein Extrakt aus der Rinderhypophyse wird häufig serumfreien Medium zugesetzt, um die Initiierung der Primärkultur sowie Serienkultivierung und Lagerung von epidermalen Keratinozyten in flüssigem Stickstoff zu verbessern (*Boyce und Ham, 1983*). Anderen serumfreien Medien werden Ethanolamine und/oder Phosphoethanolamine an Stelle des Extrakts aus der Rinderhypophyse zugesetzt, da sie eine ähnliche Wirkung haben, aber keine undefinierten Bestandteile enthalten (*Tsao et al., 1982*).