

F. Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit wurde ein *in vitro* Model epidermaler Keratinozyten der Rinderklaue, sowie ein organotypisches Modell dieses Gewebes etabliert und charakterisiert.

Aus dem komplexen Epithel der Klaue konnten erfolgreich Keratinozyten isoliert werden. Aufgrund der anatomischen Verhältnisse an der Rinderklaue war eine Modifikation der für Epidermiszellen der Haut beschriebenen Isolierungstechniken notwendig. Die isolierten Zellen konnten unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, feuchte Atmosphäre) angezüchtet und subkultiviert werden. Da in der Rinderklaue Dermis und Epidermis über eine innige und stark verzahnte Verbindung verfügen, wurde in den Primärkulturen immer ein variierender Anteil dermalen Fibrozyten mit angezüchtet. Mit Hilfe verschiedener Methoden gelang es Reinkulturen der Keratinozyten zu gewinnen. Die Untersuchungen ergaben, dass die Reinkulturen nur langsam wuchsen und nur unvollständig differenzierte Keratinozytenkolonien ausbildeten. In Kokulturen mit einem Fibrozytenanteil von bis zu einem Drittel wurden jedoch dreidimensionale, organotypische Keratinozytenkolonien mit gewebespezifischer Differenzierung ausgebildet. Eine segmentspezifische Differenzierung konnte in den organotypischen Kulturen nicht beobachtet werden. Der hohe Differenzierungsgrad in diesen Kulturen ist auf die von den dermalen Fibrozyten exprimierten fibroblast growth factors zurückzuführen.

Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden konnte die Expression von gewebespezifischen Keratinproteinen nachgewiesen werden. Mit der Elektrophorese (SDS-PAGE) und dem Western Blot erfolgte eine genaue Zuordnung der Keratinproteine. Folgende Keratine wurden von den Kulturen exprimiert: K1-3, K4/5, K6, K13/14 und K16. K4/5 und K13/14 sind das für die Rinderhaut charakteristische Keratinpaar. Licht- und elektronmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass in den organotypischen Kulturen die charakteristischen Merkmale der Klauenepidermis *in vivo* vorzufinden waren. In diesen Kulturen waren drei unterschiedliche differenzierte Zellschichten erkennbar, vergleichbar mit der charakteristischen räumlichen Anordnung *in vivo*. Eine basale Zellschicht direkt auf dem Kultivierungsgefäß, gefolgt von bis zu 18 Lagen Stachelzellen, die dem Stratum spinosum der Klauenepidermis *in vivo* entsprachen. Des Weiteren eine superfizielle Zellschicht mit mehreren Lagen unterschiedlich stark verhornter Zellen. Bei den ultrastrukturellen Untersuchungen waren Intermediärfilamente sichtbar, die ein Zytoskelett ausbildeten. Dieses Zytoskelett war in typischer Weise mit den Desmosomen assoziiert. Mit dem immunogold labelling wurde nachgewiesen, dass es sich bei diesen Intermediärfilamenten um Keratinfilamente handelte. In der intermediären Zellschicht waren membrane coating granules, spezifische Zellorganellen epidermaler Epithelzellen, sichtbar. Interzellularkitt konnte in blasig erweiterten Interzellularspalten beobachtet

werden. In den oberen Zellschichten waren folgende Merkmale der terminalen Differenzierung nachweisbar: cornified envelopes und solide verhornte Zellen.

Neben der Etablierung einer normalen Zellkultur, die mehrere Zelllinien umfasste, konnte erstmals ein organotypisches Modell der Rinderklaue beschrieben werden. Das organotypische Modell ist besonders für weitere Untersuchungen dermoepidermaler Interaktionen geeignet, denen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Klauenerkrankungen zukommt. Aber auch die gewöhnliche Zellkultur ist z.B. für das Studium einzelner des Wachstums beeinflussender Faktoren von großer Bedeutung. Ein großer Vorteil der *in vitro* Untersuchungen ist der Wegfall genetischer Varianzen, da mit den Zellen einer Zelllinie gearbeitet werden kann. Zusätzlich können Adhäsion und zytopathische Effekte von Bakterien, die eine Rolle bei infektiösen Klauenerkrankungen spielen, untersucht werden. Erste praxisorientierte Anwendungen sind bereits erfolgt. So wurden angezüchtete bovine Keratinozyten erfolgreich mit einer Treponemensuspension infiziert.

Mit dem Einsatz dieser *in vitro* Modelle können die biologischen Prozesse in der Klauenepidermis, sowie Einflüsse dermalen Komponenten auf Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten studiert werden. Die dadurch gewonnenen neuen Erkenntnisse können einen wichtigen Beitrag zu einem besseren Verständnis von Pathomechanismen verschiedener Klauenerkrankungen leisten. Insbesondere bei Fragestellungen, die mit klinischen Studien allein bisher nicht zu klären waren.