

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchung der Hornbildungsrate und des Abnutzungsgrades des Kronhorns standen insgesamt 15 Przewalskipferde zur Verfügung, die im Rahmen des Europäischen Erhaltungszuchtprogramms (EEP) für Przewalskipferde im Semireservat Schorfheide nördlich von Berlin gehalten werden. Ein Teil der Przewalskipferde wurde außerdem von Dr. K.-M. SCHEIBE und Mitarbeitern des Instituts für Zoo- und Wildtierforschung in Berlin für Untersuchungen zur Ermittlung des Körpergewichtes und der Bewegungsaktivität genutzt.

Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich von Januar 1996 bis September 1998. Aufgrund eines abnehmenden Toleranzverhaltens konnten die meisten Pferde nicht über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg in die Untersuchung einbezogen werden. Drei Przewalskistuten wurden außerdem 1997 im Rahmen von Auswilderungsprogrammen aus dem Semireservat entfernt. Im gleichen Jahr wurden als Ausgleich fünf weitere Stuten in die Herde integriert. Einen Überblick über die untersuchten Przewalskipferde mit Angaben zum Alter, zum Geschlecht sowie zum individuellen Untersuchungszeitraum gibt Tabelle 4.

Tabelle 4: Tiermaterial für die Untersuchung der Hornbildungsrate und des Hornverlustes am Huf von Przewalskipferden (alphabetisch geordnet)

Name	Zuchtbuch- Nummer	Geschlecht	Geburtsdatum	individueller Untersuchungs- zeitraum
ALINA	1789	weiblich	21.12.1988	Januar 1996 - August 1996, Februar 1998 - Juli 1998
ASHNAI ^{1), 2)}	4587	weiblich	15.05.1991	Juli 1996 - Juli 1997
ATAMAN	1618	männlich	27.06.1987	September 1997 - September 1998
BARBARINA ²⁾	4636	weiblich	23.05.1991	Februar 1996 - Februar 1997
MADA ^{1), 2)}	4651	weiblich	10.10.1991	September 1996 - Oktober 1997, Juni 1998 - September 1998
MEDI	5159	weiblich	21.05.1991	Mai 1997 - September 1998
MEDINA	2722	weiblich	11.07.1994	Mai 1997 - September 1998
MIDA	4557	weiblich	30.11.1991	August 1996 - Juni 1998
NOMIN ^{1), 2)}	4588	weiblich	18.05.1991	August 1996 - Juli 1997, November 1997 - Mai 1998
SIRENA ²⁾	4634	weiblich	13.05.1991	Januar 1996 - Februar 1997
SPIRRE ^{1), 2)}	4680	weiblich	27.04.1991	August 1996 - September 1998
SPRILLE	4523	weiblich	15.04.1990	Juni 1997 - Januar 1998
VICKY	2951	weiblich	15.06.1996	September 1997 - September 1998
VIOLA	2904	weiblich	29.04.1996	September 1997 - September 1998
VIRGINIA	2952	weiblich	16.06.1996	September 1997 - September 1998

¹⁾ im Frühjahr 1997 gedeckt, Fohlen bei Fuß ab April bzw. Mai 1998;

²⁾ Härtemessung des äußeren Kronhorns im Feldversuch

Im Semireservat Schorfheide-Liebenthal wurde zunächst eine reine Stutenherde auf einem 44 Hektar großen Areal gehalten, das 82 % Grünland sowie 18 % Wald umfasst. Im Juli 1996 wurden vier Przewalskistuten in ein 24 Hektar großes Gehege des Wildparks Groß Schönebeck verbracht. Zu dieser Stutenherde wurde im April 1997 ein Hengst hinzugesellt,

der alle vier Stuten deckte. In beiden Gehegen waren ähnliche Haltungsbedingungen für die Przewalskipferde gegeben. Die jeweilige Weidefläche diente den Pferden ganzjährig als Nahrungsgrundlage, auch in den Wintermonaten erfolgte keine zusätzliche Fütterung.

Als Untersuchungsmaterial für die strukturellen Untersuchungen am Kronhorn standen Hufe von 10 Przewalskipferden zur Verfügung, die in Semireservaten oder Zoologischen Gärten vorwiegend in Deutschland gehalten wurden und aufgrund medizinischer Indikationen getötet werden mussten. Laut Vorbericht waren sämtliche Tiere klinisch hufgesund. Die Angaben zum Alter und Geschlecht sowie zur Haltung und Fütterung der Przewalskipferde und das Datum der Euthanasie der einzelnen Tiere sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Tiermaterial für die strukturelle Untersuchung des Hufhornes von Przewalskipferden (alphabetisch geordnet)

Nr.	Name	Zuchtbuch-Nr.	Geschlecht	Geburtsdatum	Tag der Tötung
I	ANAR ^{#, 1)}	2120	weiblich	12.06.1991	29.08.1995
II	ANNIKA ^{#, 2)}	1652	weiblich	18.10.1987	27.06.1997
III	GEORG *	2152	männlich	09.01.1991	13.06.1996
IV	MEDINA [#]	563	weiblich	25.06.1973	01.12.1997
V	MERIAN ^{#, 1)}	2825	männlich	01.06.1995	15.01.1997
VI	MURINA [#]	2919	weiblich	12.05.1996	22.06.1997
VII	NATHAN *	1153	männlich	17.06.1983	18.11.1996
VIII	PRIMUS *	2376	männlich	17.04.1992	28.06.1997
IX	ROMANA [#]	815	weiblich	06.05.1979	06.03.1997
X	ROSINANTE [#]	788	weiblich	21.07.1978	16.01.1997

* Haltung in einem Semireservat, ganzjährig Weide;

Haltung im Gehege eines Zoologischen Gartens bei ganzjährig gleichmäßiger Fütterung

¹⁾ zusätzlich Gras im Sommer, ²⁾ zusätzlich Gras im Sommer und Silage im Winter

Daneben wurden sechs Hornchips in die Untersuchung einbezogen, die aus dem Tragrand der in Tabelle 4 genannten Przewalskipferde herausgebrochen waren (siehe auch Textabb. 3). Für eine vergleichende Untersuchung wurde außerdem Probenmaterial aus den Hufen von vier Warmblutpferden entnommen, die aus dem Schlachtgut der Pferdeschlächterei W. GENTHIN stammten. Weitere 28 Hufe von Warmblutpferden wurden zeitgleich von Frau B. KÖNIG im Rahmen eines weiteren Dissertationsvorhabens untersucht.

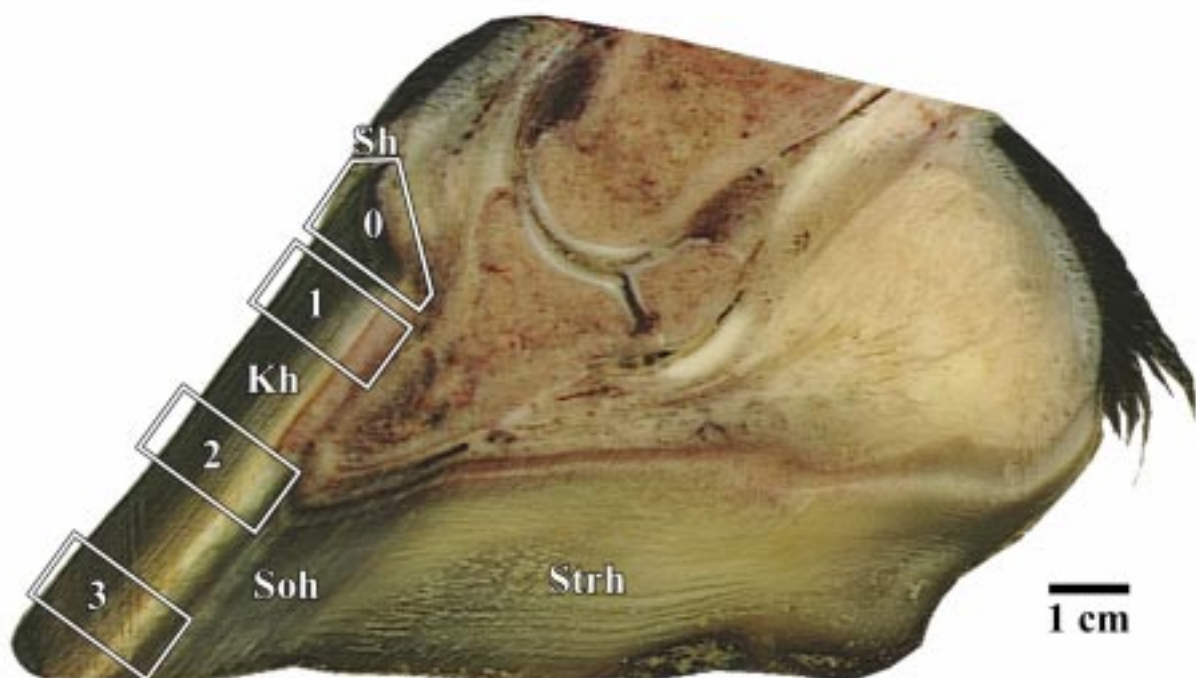
Die distalen Gliedmaßenabschnitte sämtlicher Pferde wurden nach der Tötung im Fesselgelenk abgesetzt, zum Transport zunächst tiefgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -22° C tiefgefroren gelagert.

Vor der Probengewinnung erfolgte stets eine makroskopische Untersuchung der Hufe. Es wurde ausschließlich Untersuchungsmaterial von solchen Hufen verwendet, die bei der makroskopischen Untersuchung keine Anzeichen einer pathologischen Veränderung aufwiesen.

1.1 Probeentnahmestellen

Aus dem linken Vorderhuf der in Tabelle 5 genannten 10 Przewalskipferde wurden am Rückenteil der Hufplatte insgesamt an vier definierten Lokalisationen Proben aus dem Kronsegment entnommen. Die Probeentnahmestellen sind in Textabb. 1 dargestellt. Eine Probeentnahme erfolgte jeweils direkt am Kronrand, um die Struktur der lebenden Kronepidermis sowie die Oberfläche der Kronlederhaut untersuchen zu können. Zur Untersuchung der vollständig verhornten Kronepidermis hinsichtlich struktureller und qualitativer Veränderungen während des Distalschubes wurde das Probenmaterial außerdem an drei weiteren Lokalisationen entnommen. Für die proximale Kronhornprobe befand sich die Probeentnahmestelle 1,5 cm, für die mittlere 4 cm und für die distale Kronhornprobe 6,5 cm unterhalb des Kronrandes. Die Probenentnahmestellen am Fohlenhuf waren der geringeren Vorderwandlänge angepasst (1,5 cm / 3,5 cm / 5,5 cm unterhalb des Kronrandes). Bei dieser Probeentnahme konnten Hornproben gewonnen werden, die in unterschiedlichen Jahreszeiten gebildet wurden. Der Zeitpunkt der Hornbildung kann mit Hilfe der Ergebnisse aus der Untersuchung der monatlichen Hornbildungsrate und der genauen Kenntnis des Todestages geschätzt werden.

Um die Untersuchungsergebnisse der verschiedenen Untersuchungsmethoden miteinander in Verbindung setzen zu können, wurde das Probenmaterial für alle Untersuchungen gleichzeitig entnommen.



Textabb. 1: Medianschnitt des Hufes eines Przewalskipferdes. Die direkt am Kronrand entnommene Probe zur Untersuchung der lebenden Kronepidermis und der Kronlederhaut ist mit der Ziffer 0 gekennzeichnet. Die Probeentnahmestellen im Kronhorn (Kh) sind mit den Ziffern 1 bis 3 bezeichnet (1 = proximale Kronhornprobe, 2 = mittlere Kronhornprobe, 3 = distale Kronhornprobe).

Sh = Saumhorn; Soh = Sohlenhorn; Strh = Strahlhorn

2. Ermittlung der Hornbildungsrate und des Hornverlustes des Kronhornes

Zur Bestimmung der monatlichen Hornbildungsrate und des Hornverlustes des äußeren Kronhornes wurden alle Hufe der in Tabelle 4 genannten 15 Przewalskipferde am Rückenteil der Hufplatte mit Markierungen versehen. Die Markierungen wurden anfänglich mit einer Metallsäge angebracht, was später von den Pferden nicht mehr toleriert wurde. Aus diesem Grund erfolgte die weitere Markierung mit Hilfe eines Lötkolbens (siehe Textabb. 2). Infolge des Distalschubes des Kronhornes mussten die Markierungen im Abstand von 4 - 6 Monaten erneuert werden. Von den markierten Hufen wurden monatlich Videoaufnahmen bzw. Diapositive angefertigt, an denen der Abstand zwischen Kronrand und Markierung sowie zwischen Markierung und Tragrand gemessen wurde. Die Messung erfolgte unter definierten Bedingungen, das heißt stets am gleichen Punkt der Markierung und parallel zur Längsachse der Hornröhrchen. Anhand eines Maßstabes, der ebenfalls am Rückenteil der Hufplatte angebracht wurde (siehe Textabb. 2), konnten die im Bild gemessenen Abstände auf die realen Verhältnisse umgerechnet werden. Aufgrund des Distalschubes des Kronhornes vergrößerte sich der Abstand zwischen Kronrand und Markierung zunehmend, während der Abstand zwischen Markierung und Tragrand geringer wurde. Aus der jeweiligen Differenz wurde die monatliche Hornbildungsrate bzw. der Hornverlust des äußeren Kronhornes berechnet. Der Hornverlust ergab sich dabei nicht nur aus dem Abrieb am Tragrand, sondern war teilweise auch durch Tragrandausbrüche (siehe Textabb. 3) bedingt.



Textabb. 2: Thermomarkierung (Pfeil) und Maßstab am Rückenteil der Hufplatte eines Przewalskipferdes



Textabb. 3: Hornausbruch am Tragrand eines Przewalskipferdes
Einleger: ausgebrochener Hornchip

3. Speichertelemetrische Messung der Bewegungsaktivität (BERGER et al., 1999; SCHEIBE et al., 1998a)

Um den Jahresgang der täglichen Bewegungsaktivität der im Semireservat Schorfheide-Liebenthal gehaltenen Przewalskipferde zu bestimmen, wurden vier Tiere von Mitarbeitern des Instituts für Zoo- und Wildtierforschung / Berlin ein Jahr lang mit Hilfe eines Speichertelemetrie-Systems (ETHOSYS[®], IMF Electronic, Frankfurt / Oder) untersucht. Dieses System ermöglicht eine kontinuierliche automatische Aufzeichnung der Bewegungsaktivität, die von Sensoren in Halsbändern (ETHOREC) gemessen wird. Von den Sensoren werden in bestimmten Zeitintervallen Signale ausgesendet, die von einer Zentralstation (ETHOLINK) erfasst werden. Zu dem System gehört außerdem Software für die Datenübertragung und Verarbeitung am Computer (ETHODAT).

4. Ermittlung des Körpergewichtes (SCHEIBE et al., 1998b)

Im Semireservat Schorfheide-Liebenthal wurde aufgrund des Fehlens einer natürlichen Wasserquelle eine frostgeschützte stationäre Tränke eingerichtet, die einen Messplatz zur individuellen Messung der Körpermasse enthält. Die Tränke befindet sich in einem Gang, den jeweils nur ein Tier betreten kann und dessen Boden eine Wägplattform darstellt. Sobald ein Tier diesen Gang betritt, wird die Gewichtsmessung über eine Lichtschranke ausgelöst. Zur individuellen Erkennung wurden alle Przewalskipferde mit Halsbändern versehen, an denen externe Transponder (TROVAN) befestigt sind. Beim Auslösen der Lichtschranke erfasste ein Computer das Datum, die Tageszeit, die Lufttemperatur, die Tiernummer und das Körpergewicht des Tieres (Messplatz realisiert von IMF Electronic, Frankfurt / Oder). Die Datenauswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern des Instituts für Zoo- und Wildtierforschung / Berlin, wobei für den gesamten Untersuchungszeitraum (Januar 1996 bis September 1998) das monatliche Durchschnittsgewicht der Przewalskipferde sowie die monatliche Durchschnittstemperatur berechnet wurden.

5. Physikalische Materialprüfung

Für die Untersuchung der Materialeigenschaften des Kronhornes wurde der linke Vorderhuf von den in Tabelle 5 genannten 10 Przewalskipferden unmittelbar nach dem Auftauen mit einer Tischbandsäge durch einen Medianschnitt halbiert und an der medialen Hälfte eine 2 cm dicke Sagittalscheibe herausgesägt. Mit Hilfe einer Metallbügelsäge wurden anschließend an den unter III.1.1. beschriebenen Probeentnahmestellen reine Hornblöckchen mit einer Kantenlänge von 20 x 10 x 15 mm entnommen. Diese Proben wurden zur Ermittlung von Unterschieden in den drei Kronhornzonen durch Transversalschnitte in ca. 20 x 10 x 5 mm große Blöckchen zerlegt. Zur Bestimmung der Feuchtigkeitsparameter wurden die jeweiligen proximalen, mittleren und distalen Hornproben zusammen untersucht, die Hornhärte der verschiedenen Kronhornzonen wurde an den mittleren Hornproben gemessen. Um die Materialeigenschaften des in verschiedenen Jahreszeiten gebildeten Hornes zu untersuchen, wurde aus dem äußeren

Kronhorn zusätzlich ein 20 mm breiter sagittaler Streifen entnommen und in seiner gesamten proximodistalen Ausdehnung in 20 x 10 x 5 mm große Blöckchen zersägt. Daneben wurde am Tragrand bzw. in der Mitte und an der Bruchkante von sechs Hornchips, die aus den Hufen der in Tabelle 4 genannten Przewalskipferde ausgebrochen waren, 20 x 10 x 5 mm große Kronhornproben entnommen. Anhand dieser Proben sollte geklärt werden, ob unterschiedliche Materialeigenschaften für den Ausbruch der Hornchips mitverantwortlich sind. Diese Proben wurden sowohl für die Bestimmung der Feuchtigkeitsparameter als auch für die Härtemessung genutzt.

5.1 Bestimmung der Feuchtigkeitsparameter

Direkt nach der Probeentnahme wurden die Hornblöckchen auf einer Feinanalysewaage gewogen und anschließend zur Bestimmung der Wasserabgabe bei Raumtemperatur bis zur Gewichtskonstanz (4 Wochen) getrocknet. Zur Untersuchung des Wasseraufnahmevermögens wurden die Proben anschließend bis zur Gewichtskonstanz (in Abhängigkeit von der untersuchten Kronhornzone 7 - 14 Tage) bei 4° C in Wasser gelagert. Um die Geschwindigkeit der Wasseraufnahme zu ermitteln, wurden einige Proben in bestimmten Zeitintervallen (siehe Tab. VII im Anhang) gewogen. Anschließend wurden die Proben erneut bei Raumtemperatur getrocknet und zur Bestimmung der Geschwindigkeit der Wasserabgabe wiederum nach bestimmten Zeitintervallen (siehe Tab. VIII im Anhang) gewogen. Abschließend wurden die Proben im Trockenschrank bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz (3 Tage) getrocknet.

Die Feuchtigkeitsparameter wurden nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{physiologischer Wassergehalt der Hornprobe [\%]} \quad = \frac{A - HTr}{A} \times 100$$

(= maximale Wasserabgabe)

$$\text{Wasserabgabe nach Trocknung bei Raumtemperatur [\%]} \quad = \frac{A - RTr}{A - HTr} \times 100$$

(bezogen auf die maximale Wasserabgabe bei 105° C)

$$\text{minimaler Wassergehalt [\%]} \quad = \frac{RTr - HTr}{A} \times 100$$

(nach Trocknung bei Raumtemperatur)

$$\text{relative Wasseraufnahme nach einem definierten Zeitintervall [\%]} \quad = \frac{Wx - RTr}{MaxF - RTr} \times 100$$

(bezogen auf die maximale Wasseraufnahme)

$$\text{maximaler Wassergehalt [\%]} \quad = \frac{MaxF - HTr}{MaxF} \times 100$$

(= maximale Wasserabgabe der maximal feuchten Probe)

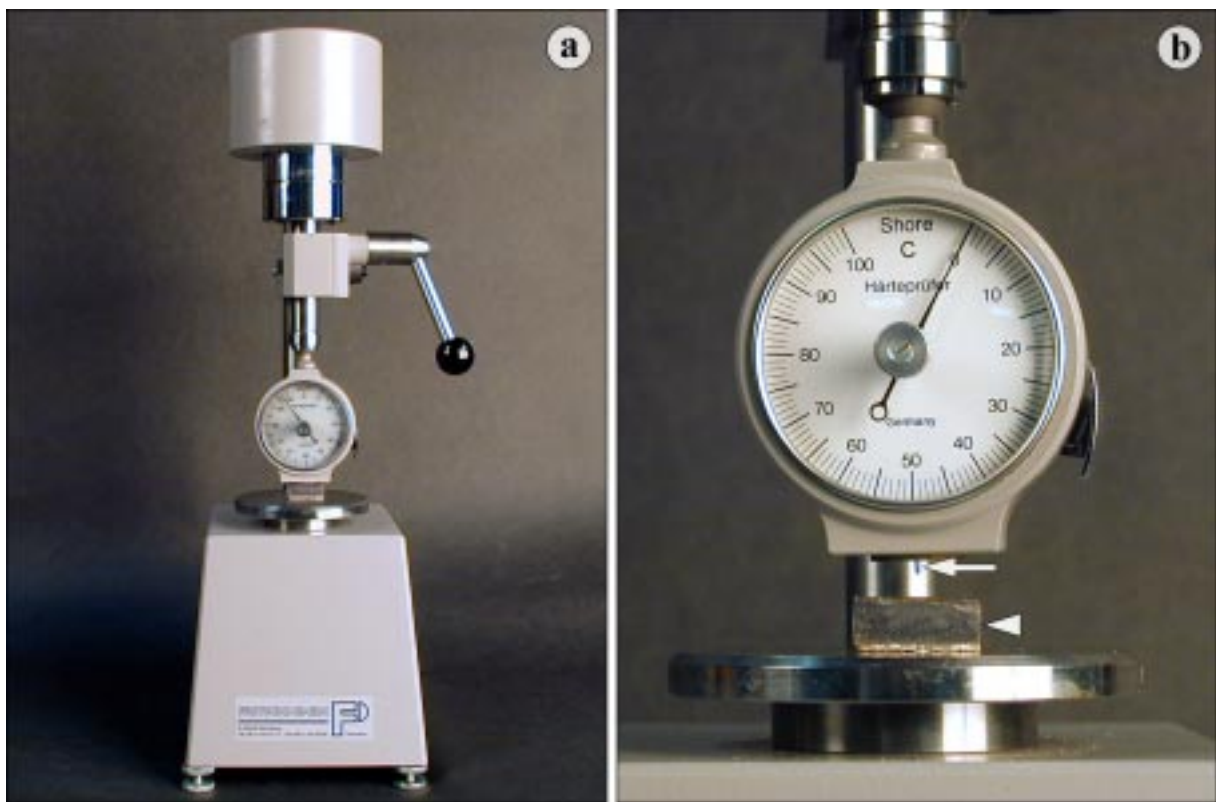
$$\text{relative Wasserabgabe nach einem definierten Zeitintervall [\%]} \quad = \frac{MaxF - Tx}{MaxF - HTr} \times 100$$

(bezogen auf den maximalen Wassergehalt)

- A = Ausgangsgewicht der Hornprobe direkt nach der Probeentnahme
- HTr = Gewicht der Probe nach Hitzetrocknung bei 105° C
- RTr = Gewicht der Probe nach Trocknung bei Raumtemperatur
- MaxF = Gewicht der maximal feuchten Probe
- Wx = Gewicht der für einen definierten Zeitintervall gewässerten Probe
- Tx = Gewicht der im Anschluss an die Wässerung für einen definierten Zeitintervall bei Raumtemperatur getrockneten Probe

5.2 Messung der Hornhärte

Die Bestimmung der Hornhärte erfolgte mit Hilfe eines SHORE C-Härteprüfgerätes (Fa. Fritschi, Nürnberg), das den Widerstand eines Materials gegen das Eindringen eines kegelförmigen Eindringkörpers misst (siehe Textabb. 4). Das Gerät ist geeicht und entspricht der amerikanischen Norm ASTM D 2240. Die Anpresskraft, die über eine Feder im Prüfgerät konstant gehalten wird, beträgt 50 Newton. Die Härte des Materials wird in SHORE-Einheiten von 0 bis 100 angegeben, wobei 100 SHORE-Einheiten einer maximalen Härte entsprechen. Um subjektive Einflüsse auf das Messergebnis auszuschließen, wurde das Härteprüfgerät für die Untersuchung in einen Prüfständler (Fa. Fritschi, Nürnberg) eingespannt. Die Prüfung im Feldversuch an den in Tabelle 4 genannten Przewalskipferden erfolgte ohne diesen Prüfständler, um den Fehler zu minimieren jedoch immer durch den gleichen Untersucher.



Textabb. 4: a) In den Prüfständler eingespanntes SHORE C-Härteprüfgerät während der Härtemessung;
 b) Detailansicht des Gerätes vor der Härtemessung (Pfeil: Eindringkörper des Härteprüfgerätes, Pfeilkopf: Hornprobe)

Die Härteprüfung wurde zunächst parallel zur Längsachse der Hornröhrchen durchgeführt, da die natürliche Druckbelastung auf das Horn beim Fußen des Hufes nachempfunden werden sollte. Dabei wurden in der Mitte der Messfläche jeweils drei aufeinanderfolgende Messungen vorgenommen und aus den Ergebnissen der Mittelwert errechnet. Um zu prüfen, ob eine andere Orientierung des Messgerätes eine Auswirkung auf das Ergebnis der Hornhärte hat, wurden die Messungen in einem Vorversuch zusätzlich senkrecht zur Röhrchenachse durchgeführt. Dies ist insofern von Bedeutung, da im Feldversuch die Hornhärte der

natürlichen Oberfläche des äußeren Kronhornes ausschließlich senkrecht zur Längsachse der Hornröhrchen gemessen werden kann. Zusätzlich zur Härtemessung bei physiologischem Wassergehalt (direkt nach der Probeentnahme) wurde die Härte der maximal feuchten und der maximal getrockneten Hornproben gemessen.

6. Methoden für die lichtmikroskopischen Untersuchungen

Nach der Entnahme der Proben für die Materialprüfung wurde an der lateralen Hälfte des linken Vorderhufes von den in Tabelle 5 genannten 10 Przewalskipferden sowie von vier Warmblutpferden eine 1 cm dicke Sagittalscheibe herausgesägt. Mit Hilfe einer Metallbügelsäge wurden anschließend aus dem Kronhorn an den unter III.1.1 beschriebenen Probeentnahmestellen reine Hornblöckchen mit einer Kantenlänge von 10 x 10 x 15 mm entnommen. Für die histometrische Untersuchung wurde zusätzlich das Kronhorn von zwei Hufen in seiner gesamten proximodistalen Ausdehnung in 10 x 10 x 15 mm große Blöckchen zersägt. Etwa gleichgroße Blöckchen wurden außerdem an der Bruchkante und am Tragrand von zwei Hornchips entnommen, die am Tragrand der in Tabelle 4 genannten Przewalskipferde herausgebrochenen waren. Ohne eine weitere Vorbehandlung der Hornproben durch Fixierungsmittel oder Einbettungsmedien wurden am Hart- und Großschnittmikrotom POLYCUT-S (Fa. Reichert-Jung, Heidelberg) längs und quer zur Hornröhrchenachse verlaufende Sagittal- bzw. Horizontalschnitte mit einer Dicke von 7 µm angefertigt, anschließend flottierend gefärbt und auf Objektträger aufgezogen. Weitere "Nativschnitte" mit einer Dicke von 20 µm wurden für die histometrische Untersuchung hergestellt, wobei die Schnittebene senkrecht zum Verlauf der Hornröhrchen lag. Nach der Beendigung der lichtmikroskopischen Untersuchung wurden die unfixierten Hornblöckchen durch einen Sagittalschnitt halbiert und zur Herstellung von Präparaten für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung bzw. für die gelelektrophoretische Untersuchung genutzt.

Zur Untersuchung der lebenden Epidermis und der Lederhaut im Kronsegment wurden am Kronrand mit Hilfe eines Skalpells Blöckchen mit einer Größe von 10 x 15 x 20 mm entnommen, die sowohl Epidermis als auch Dermis umfassten. Das Horn wurde an jedem Blöckchen bis auf eine 3 mm breite Schicht abgetragen. Von den Blöckchen wurde an der seitlichen Kante eine 2 mm dicke Sagittalscheibe abgetrennt, anschließend wurde das Blöckchen in 2 mm dicke Horizontalscheiben zerlegt. Diese Proben wurden in 4 %iger wässriger Paraformaldehyd-Lösung für 8 Stunden bei 4° C immersionsfixiert, anschließend in Aqua dest. gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Zur Einbettung in Hydroxyethylmethacrylat (Technovit 7100®; Fa. Kulzer, Wehrheim) wurden die Einbettungsvorschriften der Fa. Kulzer in modifizierter Form angewandt. Nach einer 10-stündigen Präinfiltration mit 50 %igem alkoholischen Technovit 7100® wurden die Proben für 15 Stunden in reinem Technovit 7100® inkubiert. Im Anschluss an eine 8-stündige Inkubation in Technovit 7100®, das einen Zusatz von 1 % Dibenzoylperoxid enthielt, erfolgte die Einbettung der Proben in den Kunststoff. Nach dem Auflocken der Kunststoffblöckchen mit

Technovit 3040[®] (Fa. Kulzer, Wehrheim) wurden von den fixierten Proben ebenfalls am Hart- und Großschnittmikrotom POLYCUT-S (Fa. Reichert-Jung, Heidelberg) 3 µm dicke Sagittal- bzw. Horizontalschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden im Wasserbad gestreckt, anschließend auf Objektträger aufgezogen, zwei Stunden auf einer Heizplatte bei 60° C getrocknet und abschließend gefärbt. Für die DDD-Reaktion (siehe Kap. III.6.2.2) wurden Silane-beschichtete Objektträger benutzt, die eine bessere Haftung der Schnitte bewirken.

6.1 Histologische Übersichtsfärbungen

An den fixierten Kunststoffschnitten wurde als Übersichtsfärbung eine Hämalaun/Eosin (HE)-Färbung (GERRITS, 1992, S. 4; ROMEIS, 1989, S. 235ff) angewandt. Bei dieser Färbung werden saure, basophile Strukturen (z.B. Nukleinsäuren im Zellkern, ribosomale Nukleinsäuren oder Keratohyalin granula im Stratum granulosum) durch Hämalaun nach MAYER blau angefärbt. Die Gegenfärbung mit 0,1 %iger wässriger Eosin-Lösung erfasst basische, azidophile Strukturen, die rötlich gefärbt werden.

Eine weitere Übersichtsfärbung in Form der Methylenblau-Azur-II-Färbung nach RICHARDSON (ROMEIS, 1989, S. 248) wurde sowohl an den fixierten Kunststoffschnitten als auch an den "Nativschnitten" durchgeführt. Diese Schnellfärbung dient der Erhöhung der Schnittkontraste der Semidünnschnitte, anhand derer geeignete Stellen für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen ausgewählt wurden. Basophile und osmiophile Strukturen färben sich blau, während metachromatische Substanzen rotviolett dargestellt werden.

6.2 Histochemische Nachweisverfahren

6.2.1 Darstellung von Keratinen

Die spezifische Anfärbung der Keratine erfolgte mittels der Rhodamin-B-Färbung nach LIISBERG (1968). Für die Färbung der "Nativschnitte" wurde die von LIISBERG (1968) angegebene Färbezeit eingehalten, für die Kunststoffschnitte wurde die Färbezeit verdoppelt. Das Rhodamin-B färbt die Keratine in den verhornten Epidermiszellen leuchtend rot. Durch eine Gegenfärbung mit Toluidinblau werden basophile Strukturen wie die Zellkerne in den lebenden Epidermiszellen blau bis blauschwarz angefärbt.

6.2.2 Darstellung von Sulfhydrylgruppen und Disulfidbrücken

Für den semiquantitativen Nachweis von Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) und Disulfidbrückenbindungen (SS-Gruppen) wurde sowohl an den Kunststoffschnitten als auch an den "Nativschnitten" die Dihydroxy-Dinaphthyl-Disulfid-(DDD)-Reaktion nach BARNETT und SELIGMANN (1952 u. 1954) in modifizierter Form angewandt. Das DDD-Reagenz bindet bei dieser Reaktion an freie SH-Gruppen und wird anschließend durch den Farbstoff Fast-Blue-B dargestellt. Ein niedriger Gehalt an SH-Gruppen führt durch eine einseitige Kopplung des Fast-Blue-B-Salzes zu einer roten Färbung, ein hoher Gehalt an SH-Gruppen durch bilaterale Kopplung zu einer Blaufärbung.

Für den Nachweis der SH-Gruppen wurden die Schnitte für eine Stunde in 0,1 %iger DDD-Lösung in alkoholischem 0,1 molarem Trispuffer (pH 8,5) bei 50° C inkubiert, anschließend gründlich in alkoholischem Trispuffer und Aqua dest. gespült und zwei Minuten in 0,1 %iger Fast-Blue-B-Lösung in 0,1 molarem Phosphatpuffer nach SØRENSEN (pH 7,4) (ROMEIS, 1989, S. 657) gefärbt. Zur Entfernung überschüssiger Färbelösung wurden die Schnitte nach der Färbung gründlich in Leitungswasser gespült.

Zum Nachweis der SS-Gruppen wurden zunächst die freien SH-Gruppen blockiert, indem die Schnitte für 24 Stunden in 1,25 %iger phosphatgepufferter N-Ethylmaleinimid-Lösung bei 37° C inkubiert wurden. Nach gründlichem Spülen in 1 %iger Essigsäure und Aqua dest. erfolgte eine Reduktion der SS-Gruppen zu SH-Gruppen durch eine zweistündige Inkubation in 0,4 molarer Natrium-Thioglykolat-Lösung (pH 8,0) bei 56° C. Im Anschluss an ein erneutes Spülen mit 1 %iger Essigsäure und Aqua dest. wurden die SH-Gruppen, die durch die Reduktion aus den SS-Gruppen entstanden sind, mit Hilfe der DDD-Reaktion und der anschließenden Färbung mit Fast-Blue-B nachgewiesen.

Zur Kontrolle der SH-Gruppen-Blockierung wurde an einigen Schnitten direkt im Anschluss an die Inkubation mit N-Ethylmaleinimid eine DDD-Reaktion durchgeführt. Bei vollständiger Blockierung der SH-Gruppen kann das DDD-Reagenz nicht an die Proteine gebunden werden. Infolgedessen bleibt die Farbreaktion aus.

Die Auswertung erfolgte in Anlehnung an das von KORTE (1987) aufgestellte Schema, das in Tabelle 6 dargestellt ist.

Tabelle 6: Reaktionsintensität bzw. Gehalt an SH- und SS-Gruppen bei der DDD-Reaktion (in Anlehnung an KORTE, 1987)

Reaktionsintensität	Färbung	Gehalt an SH- und SS-Gruppen
0 = keine Reaktion	farblos	keine SH- / SS-Gruppen
1 = schwach positiv	rosa	
2 = schwach bis mittelgradig positiv	rosarot	
3 = mittelgradig positiv	dunkelrot	
4 = mittelgradig bis stark positiv	rotviolett	
5 = stark positiv	violett	
6 = stark bis sehr stark positiv	blauviolett	
7 = sehr stark positiv	blau	hoher Gehalt an SH- / SS-Gruppen

6.2.3 Nachweis von Glykogen sowie Zuckeranteilen in Lipiden und Proteinen

Für die histochemische Darstellung von Glykogen im Zytoplasma der Epidermiszellen sowie von Glykolipiden und Glykoproteinen, die insbesondere im Interzellularkitt auftreten, wurde die Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion) nach MCMANUS (GERRITS, 1992, S. 5; ROMEIS, 1989, S. 393ff u. 441ff) sowohl an den "Nativschnitten" als auch an den Kunststoff-schnitten angewandt. Die Perjodsäure oxidiert Hydroxyl-Gruppen des Zuckers zu Aldehyd-Gruppen, die anschließend durch das Schiff-Reagenz angefärbt werden. PAS-positive Substanzen färben sich rosarot bis violett, schwach positive hellrosa und PAS-negative

Substanzen bleiben farblos. Die Zellkerne der lebenden Epidermiszellen werden durch eine Gegenfärbung mit Hämalaun nach MAYER (ROMEIS, 1989, S. 215) dargestellt. Um Glykogen von Glykoproteinen bzw. Glykolipiden zu differenzieren, wurde ein Teil der Schnitte vor der PAS-Reaktion für eine Stunde in 2 %iger wässriger Diastase-Lösung bei 37° C inkubiert. Das Enzym Diastase bewirkt eine Herauslösung des diastaselabilen Glykogens aus der Epidermiszelle, wohingegen die diastasestabilen Glykoproteine und -lipide auch nach der Diastase-Inkubation PAS-positiv reagieren.

6.2.4 Darstellung von Lipiden

Der Nachweis von Lipiden in den Zellen und vor allem im Bereich der Zellgrenzen wurde mit dem Farbstoff Sudanschwarz-B (ROMEIS, 1989, S. 381) ausschließlich an den "Nativschnitten" durchgeführt. An den Kunststoffschnitten lassen sich die Lipide nicht mehr darstellen, da sie infolge der Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe herausgelöst wurden. Bei der Sudanschwarz-B-Färbung bedingt ein hoher Lipidgehalt eine schwarzgraue Färbung, während ein niedriger Lipidgehalt zu einer hellgrauen Färbung führt.

6.3 Histometrische Untersuchung

Die histometrische Untersuchung wurde durchgeführt, um die Architektur des Hornzellverbandes im Kronhorn zu studieren. Die Ergebnisse sollen eine Vorstellung über den Unterschied der strukturellen Parameter in den drei Kronhornzonen beim Przewalskipferd sowie über strukturelle Unterschiede zwischen Haus- und Wildpferd vermitteln. Die Untersuchung erfolgte an den distalen Kronhornproben der in Tabelle 5 genannten 10 Przewalskipferde und an den entsprechenden Kronhornproben von drei Warmblutpferden. Daneben sollte untersucht werden, ob tendenzielle Unterschiede der Röhrenparameter im jahreszeitlichen Rhythmus auftreten. Dazu wurde das äußere Kronhorn von zwei Hufen in seiner gesamten proximodistalen Ausdehnung im Abstand von 1 cm untersucht, wobei jeweils exakt die gleichen Röhren vermessen wurden. Zur Klärung der Frage, ob strukturelle Unterschiede für den Ausbruch der Hornchips am Tragrand mitverantwortlich sind, wurden zusätzlich die strukturellen Parameter des äußeren Kronhorns von Proben, die am Tragrand bzw. an der Bruchkante von zwei Hornchips entnommen wurden, gegenübergestellt.

Die Untersuchung erfolgte an 20 µm dicken Nativschnitten, an denen eine PAS-Reaktion durchgeführt wurde. Die PAS-Färbung bewirkt eine deutliche Darstellung der Zellgrenzen gegenüber dem ungefärbten Zytoplasma, wodurch Röhrenmark und Röhrenrinde sowie Hornröhren und Zwischenröhrenhorn gut voneinander zu differenzieren sind.

Die morphometrische Untersuchung erfolgte an einem Mikroskop vom Typ AXIOSKOP (Fa. Zeiss, Oberkochen) mittels eines speziellen Computerprogramms (KONTRON-KS400®). Zunächst wurden die zu untersuchenden Kronhornbereiche über eine mit dem Mikroskop verbundene digitale Videokamera (SONY 3CCD®) in das Computerprogramm überführt. Das Untersuchungsareal umfasste jeweils fünf Bilder mit einer Fläche von

ca. 1 mm². Da die bereits aufgenommenen Bilder am Bildschirm des Computers angezeigt wurden, konnte eine Überschneidung von Bereichen des Schnittes ausgeschlossen werden. Anschließend wurden die Bilder nacheinander ausgewertet.

Auf einem Digitalisiertablett (SummaSketch III[®]) wurde mit einer Stiftmaus zunächst die Gesamtfläche eines Bildes erfasst. Im Anschluss daran wurden alle Querschnitte solcher Hornröhrchen mit der Stiftmaus umfahren, deren gesamte Querschnittsfläche im Bildausschnitt sichtbar war. Im gleichen Schritt wurde auch der Querschnitt des jeweiligen Röhrchenmarkes umrandet. Eine farbige Markierung der bereits umfahrenen Hornröhrchen bzw. der Markanteile schloss eine doppelte Vermessung aus. Die Software ermöglicht durch diesen Arbeitsschritt die Messung der Fläche einzelner Hornröhrchen bzw. des Röhrchenmarkes sowie die Angabe des größten und kleinsten Röhrchen- bzw. Markdurchmessers. In einem zweiten Schritt wurde die Fläche der am Bildrand befindlichen und daher unvollständig abgebildeten Hornröhrchen ermittelt.

Die erhobenen Daten wurden in das Programm EXCEL 97[®] (Microsoft) überführt, in welchem weitere Berechnungen der strukturellen Parameter erfolgten.

Aus der Addition der Gesamtflächen der fünf einzelnen Bilder ergibt sich die Fläche des untersuchten Kronhornbereiches (jeweils ca. 5 mm²). Die Addition aller Querschnittsflächen der Hornröhrchen (einschließlich der angeschnittenen Röhrchen) liefert die Gesamtfläche der Hornröhrchen. Die Differenz dieser beiden Flächen stellt die Fläche des Zwischenröhrchenhornes in absoluten Zahlen dar. Aus diesen Angaben lässt sich der prozentuale Flächenanteil der Hornröhrchen bzw. des Zwischenröhrchenhornes errechnen und das Verhältnis von Hornröhrchen zu Zwischenröhrchenhorn ableiten.

In die Berechnung des Mittelwertes der Hornröhrchen- bzw. Markfläche sowie der maximalen und minimalen Röhrchendurchmesser gingen ausschließlich solche Hornröhrchen ein, deren Querschnittsfläche vollständig im Bildausschnitt sichtbar war.

Der Quotient aus dem Flächenanteil der Hornröhrchen und dem Mittelwert der Röhrchengröße ergibt die Anzahl der Hornröhrchen pro Flächeneinheit.

Die Fläche der Röhrchenrinde lässt sich aus der Differenz von Röhrchenfläche und Markfläche berechnen. Daraus kann das Verhältnis von Röhrchenrinde zu Röhrchenmark abgeleitet werden.

Bei einem runden Querschnitt von Hornröhrchen bzw. Röhrchenmark sind maximaler und minimaler Durchmesser identisch und der Quotient aus beiden ist 1. Der Quotient ist umso größer, je stärker oval der Querschnitt ist. Daher kann das Verhältnis von maximalem zu minimalem Röhrchen- bzw. Markdurchmesser als Maß für die Form des Hornröhrchens bzw. des Röhrchenmarkes angesehen werden.

Das Verhältnis von maximaler zu minimaler Querschnittsfläche der verschiedenen Hornröhrchen kann als Maß für die Variabilität der Röhrchengröße angesehen werden.

7. Methoden für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen

7.1 Trennung von Dermis und Epidermis

Zur Darstellung der dermoepidermalen Grenzfläche im Kronsegment wurden aus dem Rückenteil der Hufe von den in Tabelle 5 genannten 10 Przewalskipferden am Kronrand Blöckchen mit einer Kantenlänge von 10 x 20 x 25 mm entnommen, die sowohl Epidermis als auch Dermis umfassten. Um den Übergang von der Kronlederhaut in die Saum- bzw. Wandlerhaut zu erfassen, enthielten die Probenblöckchen auch Teile der an das Kronsegment angrenzenden Segmente. Die Trennung von Epidermis und Lederhaut mittels Essigsäure wurde nach der von BAIER (1950) an Huf und Klaue angewandten Methode in modifizierter Form durchgeführt. Bei dieser Methode erfolgt die Trennung nach MÜLLING (1993) in bzw. dicht oberhalb der Basalmembran.

Die Probenblöckchen wurden 48 - 60 Stunden in 1 %iger Essigsäure bei 37° C inkubiert und anschließend kurz in Leitungswasser gespült. Zur Trennung von Dermis und Epidermis wurde unter einer Präparierlupe (Fa. Zeiss, Oberkochen) mit zwei Pinzetten ein vorsichtiger Zug ausgeübt. Reichte ein leichter Zug zur Trennung nicht aus, wurde die Inkubation in der Essigsäure fortgesetzt. Direkt nach der Trennung wurden die Lederhaut- und Epidermisproben für 8 - 12 Stunden in Phosphatpuffer nach SØRENSEN (pH 7,4) (ROMEIS, 1989, S. 657) gespült. Um ein Verkleben der Lederhautzotten zu vermeiden, wurden die Lederhautproben vorher auf Korkscheiben aufgespießt und schwimmend behandelt. Dadurch waren die Lederhautpapillen frei flottierend und der Schwerkraft folgend nach unten gerichtet. Nach der Spülung erfolgte eine 72-stündige Immersionsfixation in 3 %iger phosphatgepufferter Glutaraldehyd-Lösung. Im Anschluss wurden die Proben erneut für 8 - 12 Stunden in Phosphatpuffer gespült und zur Nachfixierung und Kontrastierung für 18 Stunden in einer 1 %igen phosphatgepufferten Osmiumtetroxid-Lösung inkubiert.

7.2 Gerichteter Gefrierbruch

Um die Architektur des Hornzellverbandes im Kronhorn darzustellen, wurden von den in Tabelle 5 genannten 10 Przewalskipferden an den unter III.1.1 beschriebenen Probeentnahmestellen im Rückenteil der Hufplatte reine Hornproben mit einer Größe von 10 x 10 x 15 mm entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Probenblöckchen mit einer Zange sowohl parallel zur Längsachse der Hornröhrchen als auch quer zum Röhrchenverlauf gebrochen und für 18 Stunden in einer 1 %igen phosphatgepufferten Osmiumtetroxid-Lösung inkubiert.

7.3 Herstellung der Präparate für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Die fixierten Präparate wurden gründlich in Phosphatpuffer gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Zur Substitution des Alkohols wurden die Proben anschließend für 18 Stunden in Hexamethyldisilazan verbracht, das nachfolgend durch 72-stündiges Abdampfen aus den Proben entfernt wurde. Die getrockneten Präparate wurden mittels Leit-C nach

GÖCKE (Fa. Plano, Marburg) auf kleine Aluminiumteller geklebt und in einem Kathodenzerstäubungsgerät (Fa. Polaron, Watford / England) mit Gold in einer Schichtdicke von 50 nm besputtert. Die Untersuchung und fotografische Befunddokumentation erfolgten am Rasterelektronenmikroskop NANOLAP 2000 (Fa. Bausch u. Lomb, Kanada).

8. Methoden für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen

Als Probenmaterial für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung dienten die unfixierten Hornblöckchen, die zuvor für die Herstellung von "Nativschnitten" für die lichtmikroskopischen Untersuchungen genutzt wurden. Die Blöckchen wurden durch einen Sagittalschnitt halbiert und eine Hälfte wurde jeweils für die gelelektrophoretische Untersuchung weiterverarbeitet. Aus der anderen Hälfte wurden 10 x 5 x 5 mm große Blöckchen herausgesägt, die repräsentative Stellen des äußeren, mittleren und inneren Kronhornes umfassten. Die Schnittfläche wurde anschließend auf eine Größe von 2 x 2 mm getrimmt. Von diesen Probenblöcken wurden ohne weitere Vorbehandlung "Nativschnitte" angefertigt, deren Schnittebene senkrecht zum Verlauf der Hornröhrchen lag.

Dazu wurden an einem Ultramikrotom ULTRACUT-E (Fa. Reichert-Jung, Heidelberg) zunächst mit einem Glasmesser 1 µm dicke Semidünnschnitte von den Blöckchen abgenommen, im Wasserbad gestreckt und auf Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte mit 1 %iger Methylenblau-Azur-II-Lösung (Romeis, 1989, S. 248) für die lichtmikroskopische Vororientierung gefärbt. Diese histologische Übersichtsfärbung ermöglicht die Auswahl geeigneter Areale für die Anfertigung von Ultradünnschnitten. Von den ausgewählten Bereichen wurden am Ultramikrotom mit einem Diamantmesser 90 nm dicke Ultradünnschnitte hergestellt. Nach dem Auffangen der Schnitte auf befilmten Kupfernetzen wurde abschließend in einem Ultrastainer (Fa. Leica, Bensheim) eine Schnittkontrastierung mit Uranylacetat und Bleizitrat nach der Methode von VENABLE und COGGESHALL (1965) durchgeführt. Die Auswertung der Ultradünnschnitte und die fotografische Befunddokumentation erfolgten an einem Transmissionselektronenmikroskop des Typs EM 10 CR (Fa. Zeiss, Oberkochen).

Da die in der Literatur beschriebenen elektronenmikroskopischen Befunde bisher ausschließlich an fixiertem und in Kunststoff eingebettetem Material erhoben wurden, sollte in einem Vorversuch geklärt werden, ob die "Nativschnitte" mit den herkömmlich hergestellten Kunststoffschnitten vergleichbar sind. Dazu wurden einige Hornblöckchen nach der Abnahme der Nativschnitte für 20 Stunden in 2,5 %iger phosphatgepufferter Glutaraldehyd-Lösung (pH 7,4) immersionsfixiert. Anschließend wurden die Schnitte gründlich in Phosphatpuffer nach SØRENSEN (pH 7,4) (ROMEIS, 1989, S. 657) gespült und 18 Stunden zur Nachfixation und Kontrastierung in einer 1 %igen Osmiumtetroxid-Lösung inkubiert. Nach der Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Hornblöckchen schließlich in Epoxy-Harz (Epon[®]; Fa. Serva, Heidelberg) eingebettet. Von den in Epon eingebetteten Probenblöckchen wurden am Ultramikrotom ebenfalls 1 µm dicke Semidünnschnitte und

90 nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt. Das weitere Vorgehen entsprach der für die "Nativschnitte" beschriebenen Methode.

8.1 Immunhistochemische Untersuchung zur Darstellung von Keratinen

Die Anordnung und Verteilung der Zytokeratine, die mit Hilfe der Gelelektrophorese und dem Western Blotting im Kronhorn nachgewiesen wurden, sollte durch eine ultrastrukturelle immunhistochemische Untersuchung dargestellt werden. Bei dieser Untersuchung wurden einige der Anti-Zytokeratine genutzt, die auch beim Western Blotting zur Anwendung kamen (siehe Tab. 7, Kap. III.11). Die immunhistochemische Untersuchung wurde an "nativen" Ultradünnschnitten durchgeführt, die auf befilmte Nickelnetzchen aufgezogen wurden. Die anschließende Inkubation der Schnitte erfolgte jeweils auf einem Tropfen der entsprechenden Lösung.

Zur Unterdrückung einer unspezifischen Hintergrundfärbung wurden die Schnitte zunächst 10 Minuten in einer 0,02 molaren Tris-gepufferten Glycin-Lösung, die 0,1 % bovines Serumalbumin enthielt, inkubiert. Darauf folgte eine 15-minütige Inkubation in einer 5 %igen Tris-gepufferten Lösung des Normalserums der Tierart (Ziege), deren Immunsystem den sekundären Antikörper erzeugt. Um eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers zu vermeiden, wurde dem Trispuffer 0,1 % bovines Serumalbumin zugesetzt. Im Anschluss erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem jeweiligen Primär-Antikörper (Anti-Zytokeratin). Dieser war in einem Verhältnis von 1:100 mit Trispuffer, der 0,1 % bovines Serumalbumin und 1 % Ziegen-Normalserum enthielt, verdünnt. Zur Entfernung der ungebundenen Anteile der Inkubationslösung wurden die Schnitte anschließend gründlich in Trispuffer, der einen 0,1 %igen Zusatz von bovinem Serumalbumin enthielt, gespült. Der an das Antigen gebundene primäre Antikörper wurde schließlich durch eine einstündige Inkubation mit einem Sekundär-Antikörper (Fa. BioTrend, Köln), der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, nachgewiesen. Der Sekundär-Antikörper ist mit 6 nm großen Goldkörnchen markiert, die sich im Elektronenmikroskop darstellen lassen. Für diesen Reaktionsschritt wurde der Sekundär-Antikörper in einer Verdünnung von 1:30 in Trispuffer gelöst, dem 0,1 % bovines Serumalbumin und 1 % Ziegen-Normalserum zugesetzt war. Um den ungebundenen Anteil des sekundären Antikörpers zu entfernen, wurden die Schnitte gründlich in Trispuffer, der einen 0,1 %igen Zusatz von bovinem Serumalbumin enthielt, und phosphatgepuffertes Salzlösung (ECKERT u. KARTENBECK, 1997, S. 230) gespült. Eine Nachfixation zur Stabilisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgte durch eine 2minütige Inkubation in einer 2 %igen phosphatgepufferten Glutaraldehyd-Lösung. Nach dem Waschen der Schnitte in Aqua bidest. erfolgte eine Schnittkontrastierung mit Uranylacetat und Bleizitrat.

Zum Ausschluss unspezifischer Reaktionen wurden in jedem Versuch Negativkontrollen durchgeführt, wobei der primäre Antikörper durch eine Trispuffer-Lösung, die 0,1 % bovines Serumalbumin und 1 % Ziegen-Normalserum enthielt, ersetzt wurde.

9. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

9.1 Extraktion der Proteine aus dem Hufhorn

Die Proteinextraktion erfolgte nach der von GROSENBAUGH und HOOD (1992) beschriebenen Methode, die von HOCHSTETTER (1998) und FROHNES (1999) modifiziert wurde. Dazu wurden die Hornproben verwendet, die bei der Probeentnahme für die Transmissions-elektronenmikroskopie abgeteilt worden sind. Neben den Proben von den in Tabelle 5 genannten Przewalskipferden wurden außerdem vergleichbare Hornproben von vier Warmblutpferden untersucht.

Von den Hornproben wurden mit Hilfe einer Raspel feine Hornspäne hergestellt. Zur Extraktion der schwer löslichen intrazellulären Strukturproteine wurden 50 mg dieser Späne in 1,25 ml Tris-gepufferter 8 molarer Harnstoff-Lösung (pH 9,0) inkubiert, die zusätzlich zur Spaltung von Disulfidbrücken 0,39 % Dithiotreitol enthielt. Die 18-stündige Inkubation erfolgte unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur. Nach 30-minütigem Zentrifugieren in der High-Speed-Tischzentrifuge BIOFUGE 22R (Fa. Heraeus, Osterode) bei einer Drehzahl von 22.000 min⁻¹ und einer Temperatur von 4° C wurde vom Überstand zweimal 0,5 ml entnommen und zur Fällung der gelösten Proteine mit jeweils 1 ml Aceton versetzt. Nach GROSENBAUGH und HOOD (1992) werden durch das Aceton lediglich die Keratinproteine und die Keratinfilament-assoziierten Proteine vom HS-Typ gefällt, während die Keratinfilament-assoziierten Proteine vom HT-Typ in Lösung bleiben. Im Anschluss an eine erneute 30minütige Zentrifugation (4° C, Drehzahl: 22.000 min⁻¹) wurde je eines der Präzipitate zur Bestimmung der extrahierten Proteinmenge herangezogen (siehe Kap. III.9.2). Das korrespondierende Präzipitat wurde in einer Tris-gepufferten 1 %igen Natriumdodecylsulfat-(SDS)-Lösung (pH 8,0) gelöst, die außerdem 0,14 % Dithiotreitol und 0,01 % Bromphenolblau enthielt, und für drei Minuten auf 95° C erhitzt. Bromphenolblau ist ein Farbstoff mit hoher elektrophoretischer Mobilität, der den Verlauf der Trennung anzeigt. Durch das Dithiotreitol werden intra- und intermolekulare Disulfidbindungen gespalten. Die Reoxidation der entstandenen Sulfhydrylgruppen wurde durch eine Alkylierung infolge der Zugabe von 1,5 % Jodacetamid verhindert. Das anionische Detergenz SDS bewirkt zum einen die Überführung der Proteine in ihre Primärstruktur, da stabilisierende intra- und intermolekulare nicht-kovalente Bindungen gelöst werden, und überdeckt zum anderen individuelle Ladungsunterschiede der Proteine. Infolgedessen entstehen Mizellen, deren negative Ladung proportional zur Masse des Proteins ist. Daher werden die Proteine in der anschließenden Elektrophorese ausschließlich aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte getrennt (WESTERMEIER, 1990).

Daneben wurde eine von ECKERT und KARTENBECK (1997, S. 21ff) vorgeschlagene Methode zur Extraktion von Zytokeratinen aus mehrschichtigen verhornten Epithelien angewandt. Mit dieser Methode konnten aus dem Kronhorn jedoch keine Proteine extrahiert werden.

9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der bei der Extraktion aus den Hornproben gelösten Proteine wurde nach der Biuret-Methode (ROBINSON u. HOGDEN, 1940) bestimmt. Dazu wurde das unter III.9.1 beschriebene Präzipitat in 1 ml Natronlauge (0,1 molar) gelöst und mit 4 ml Biuret-Reagenz (Fa. Fluka, Buchs) versetzt. Nach einer 30-minütigen Einwirkzeit wurde der Proteingehalt an einem Spektralphotometer PMQ II (Fa. Zeiss, Oberkochen) photometrisch bei 550 nm bestimmt. Als Eichprotein diente bovines Serumalbumin (Fa. Sigma, Deisenhofen). Die Bestimmung der Proteinkonzentration diente als Grundlage für die Verdünnung der Proben, die für die gelelektrophoretische Proteintrennung genutzt wurden.

9.3 Herstellung der diskontinuierlichen Polyacrylamidgele

Die für die Elektrophorese verwendeten Polyacrylamidgele wurden in einem vertikalen Gießständer (Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg) nach der von WESTERMEIER (1990, S. 172ff) beschriebenen Methode auf eine Trägerfolie aufpolymerisiert. Die Herstellung der Gele basiert auf einer chemischen Co-Polymerisation von Acrylamidmonomeren mit einem Vernetzer (Methylenbisacrylamid). Dabei entsteht durch eine radikalische Kettenreaktion ein komplexes, flexibles dreidimensionales Netzwerk. Es wurde eine diskontinuierliche Elektrophorese durchgeführt, bei der die Gelmatrix aus zwei Bereichen besteht. Das großporige Sammelgel bedingt bei der Elektrophorese durch eine Stapelbildung der Proteine ("stacking"-Effekt) eine Konzentrierung der in das Gel diffundierenden Proteine. Das engporige Trenngel setzt den Proteinen einen hohen Reibungswiderstand entgegen und bewirkt eine Auftrennung der Proteine in der Reihenfolge ihrer Molekülgröße und eine Zonenschärfung der Proteinbanden. Die Porengröße ist umgekehrt proportional zur Totalacrylamidkonzentration T und zusätzlich abhängig vom Vernetzungsgrad C , der durch das Verhältnis von Acrylamid zu Methylenbisacrylamid bestimmt wird (ECKERT u. KARTENBECK, 1997; WESTERMEIER, 1990). Für die Herstellung der Trenngele wurde eine Tris-gepufferte Acrylamid-Methylenbisacrylamid-Lösung ($T = 7\%$, 10% oder $12,5\%$; $\text{pH } 8,8$) verwendet, die außerdem 10% Glycerol und 1% SDS enthielt. Die Acrylamid-Methylenbisacrylamid-Lösung wurde aus einem Konzentrat ($T = 40\%$, $C = 5\%$; Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg) durch Verdünnung mit Aqua dest. hergestellt. Für das Sammelgel wurde einer Tris-gepufferten Acrylamid-Methylenbisacrylamid-Lösung ($\text{pH } 6,8$) 4% Glycerol und 1% SDS zugesetzt. Die Polymerisationsreaktion wurde jeweils durch freie Radikale gestartet, die bei der Wechselwirkung der zugesetzten Katalysatoren Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) entstehen (ECKERT u. KARTENBECK, 1997, S. 69).

9.4 Auftrennung und Darstellung der Proteine

Die Trennung der Proteine erfolgte in einer horizontalen Trennkammer (Multiphor® II Electrophoresis System; Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg), die eine Kühlplatte und seitlich angeordnete Puffertanks besitzt. Als Kühlkontaktflüssigkeit wurde Mineralöl (Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg) eingesetzt. Nach dem Füllen der Puffertanks mit Anoden- bzw. Kathodenpuffer (WESTERMEIER, 1990, S. 172) wurde mit Hilfe von Papier-Elektrodenbrücken eine Verbindung zwischen den Puffer-Lösungen und dem Gel hergestellt. Anschließend wurden die Proben gemeinsam mit einem Marker (Low Molecular Weight [LMW] Calibration Kit for Electrophoresis; Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg), der sechs verschiedene Referenzproteine mit bekannten Molekulargewichten von 14,4 bis 94 kDa enthält, auf das Gel aufgetragen. Um methodisch bedingte Einflüsse auf das Proteinbandenmuster ausschließen zu können, wurden die Hornproben eines Hufes im selben Arbeitsgang aufbereitet und anschließend nebeneinander auf das Gel pipettiert. Auch die Proben von den Warmblutpferden wurden gemeinsam mit denen der Przewalskipferde hergestellt und zusammen mit diesen auf ein Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde in zwei Phasen bei einer Temperatur von 15° C durchgeführt. Nach einer 30-minütigen Eindringphase bei Niedrigspannung (100 Volt, 50 Milliampere, 30 Watt), die einen sanften Proteineintritt in das Trennmedium ermöglicht, wurden die Proteine in der zweiten Phase bei Hochspannung (600 Volt, 50 Milliampere, 30 Watt) über 2,5 - 3,5 Stunden aufgetrennt. Die hohe Spannung bewirkt eine schnelle Trennung bei minimaler Diffusion der Proteine. Im Anschluss wurden die Gele in 40 %igem Ethanol, dem 10 % Eisessig zugesetzt war, fixiert. Die abschließende Darstellung der Proteinbanden erfolgte durch eine Coomassie-Färbung bzw. durch eine Versilberung nach HEUKESHOVEN und DERNICK (1985). Für die Coomassie-Färbung, die für Proben mit einem Proteingehalt von 0,2 - 5,0 mg / ml geeignet ist, wurde der Farbstoff PhastGel Blue R (Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Die deutlich empfindlichere Silberfärbung wurde mit dem Silver Staining Kit, Protein (Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Bei dieser Färbung werden die Proteinbanden durch eine photochemische Reaktion dargestellt, wobei die Silber-Ionen mit den Proteinen Silber-Protein-Komplexe bilden. Die Versilberung ist für Proben mit einem Proteingehalt von 0,01-1,0 mg / ml geeignet.

Anhand der bekannten Molekulargewichte der Proteinbanden des Markers wurde für jedes Gel eine Eichkurve erstellt, die eine Berechnung der Molekulargewichte der einzelnen Proteinbanden des Untersuchungsmaterials ermöglichte.

10. Western Blotting

Die durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine können durch das Western Blotting vollständig auf eine synthetische Membran übertragen werden. Die auf der Membranoberfläche gebundenen Proteine sind dadurch für einen anschließenden immunologischen Nachweis mit spezifischen Antikörpern leicht zugänglich.

Bei der Verwendung der zuvor hergestellten diskontinuierlichen Polyacrylamidgele wurden leider nur unbefriedigende Ergebnisse erzielt. Aus diesem Grund wurde für das Blotting auf kommerziell erhältliche Gradientengele (ExcelGel[®] SDS, gradient 8 - 18; Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg) zurückgegriffen.

10.1 Proteintransfer

Zum Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurde das Semidry-Blotting-Verfahren angewandt. Dazu wurde das Polyacrylamidgel zusammen mit der Blotmembran zwischen zwei in Transferpuffer getränkte Filterpapierstapel gelegt, die direkten Kontakt zu zwei horizontalen Graphitplatten-Elektroden hatten. Der Transfer erfolgte in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach KYHSE-ANDERSEN (WESTERMEIER, 1990, S. 59 u. 190ff) bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 Milliampere / cm² innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur.

11. Differenzierung der Zytokeratine

Vor dem spezifischen immunologischen Proteinnachweis wurden die Proteine auf der Blotmembran durch eine reversible Anfärbung mit Ponceau S (ECKERT u. KARTENBECK, 1997, S. 155ff) dargestellt. Das Bandenmuster wurde zur späteren Orientierung fotografiert. Anschließend wurde die Blotmembran zur Entfärbung gründlich in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS, pH 7,4) (ECKERT u. KARTENBECK, 1997, S. 230) gespült.

Zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen auf der Blotmembran wurde zunächst eine 45-minütige Inkubation in 3 %iger Magermilch bei 37° C durchgeführt. Dazu wurde Magermilchpulver (Fa. Sigma, Deisenhofen) in TBS gelöst, dem 0,1 % der oberflächenaktiven Substanz Tween 20 zugesetzt war (TBST). Direkt im Anschluss erfolgte eine 18-stündige Inkubation mit dem jeweiligen Primär-Antikörper (Anti-Zytokeratin, siehe Tab. 7), der je nach Typ und Ausgangskonzentration in einem Verhältnis von 1:100 bis 1:1000 mit TBST verdünnt war, bei 4° C. Zur Entfernung der ungebundenen Anteile des Primär-Antikörpers wurde die Blotmembran anschließend gründlich in TBST gewaschen. Der an das Antigen gebundene Primär-Antikörper wurde schließlich durch einen enzymgekoppelten Sekundär-Antikörper (DAKO[®], StreptAB-Komplex/HRP-Duett, Fa. DAKO Diagnostika, Hamburg), der gegen den Primär-Antikörper gerichtet ist, nachgewiesen. Dazu wurde die Blotmembran zunächst eine Stunde mit dem biotinylierten Sekundär-Antikörper, der in einem Verhältnis von 1:200 mit TBS verdünnt war, bei Raumtemperatur inkubiert. Um den ungebundenen Anteil des Sekundär-Antikörpers zu entfernen, wurde die Blotmembran anschließend gründlich in TBS gewaschen. Im Anschluss daran wurde eine einstündige Inkubation mit einem Streptavidin-biotinylierten Peroxidase-Komplex, der ebenfalls in einem Verhältnis von 1:200 mit TBS verdünnt war, bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Avidin, das eine hohe Affinität zu Biotin besitzt, fungiert bei dieser Reaktion als Brückenmolekül zwischen dem biotinylierten Sekundär-Antikörper und dem biotinylierten Enzym. Danach wurde die Blotmembran erneut

gründlich in TBS gewaschen. Abschließend wurde der Antigen-Antikörper-Komplex durch eine Chromogen-Substrat-Lösung (3,3'-Diaminobenzidin [DAB]; ECKERT u. KARTENBECK, 1997, S. 188ff) als brauner Farbniederschlag sichtbar gemacht.

Als Negativkontrolle wurde parallel zu den zu untersuchenden Proben der Marker (Low Molecular Weight [LMW] Calibration Kit for Electrophoresis; Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg) mit den Antikörpern inkubiert.

Tabelle 7: Zusammenstellung der beim spezifischen immunologischen Proteinnachweis angewandten Anti-Zytokeratine und der durch diese nachgewiesenen Keratinproteine

<u>Anti-Zytokeratin</u> (Hersteller)	<u>Affinität zum Zytokeratin</u>		<u>Bemerkungen</u>
	<u>Molekulargewicht</u> [kDa]*	<u>Katalog-Nummer</u> (MOLL et al., 1982)	
<u>Anti-Ck 5/6</u> (Fa. Boehringer, Mannheim)	58/56	Ck 5 / Ck 6	Kreuzreaktion mit Ck 4
<u>Anti-Ck 10</u> (Fa. DAKO Diagnostika, Hamburg)	56,5	Ck 10	
<u>Anti-Ck 14[#]</u> (Fa. Sigma, Deisenhofen)	50	Ck 14	
<u>AE1[#]</u> (Fa. Serotec, Oxford/England)	40 - 56,5	Ck 10, Ck 14, Ck 15, Ck 16; Ck 19	reagiert mit den meisten sauren Zytokeratinen vom Typ I
<u>AE3[#]</u> (Fa. Serotec, Oxford/England)	52,5 - 68	Ck 1 - Ck 8	reagiert mit den basischen Zytokeratinen vom Typ II

* Angaben der Molekulargewichte für die Zytokeratine in der menschlichen Epidermis

[#] Antikörper wurden auch für die immunhistochemische Untersuchung verwendet (siehe Kap. III.8.1)

12. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte am Computer mit Hilfe der Programme SPSS[®] (Version 9.0) und EXCEL[®] 97 (Microsoft). Es wurden sowohl Methoden der beschreibenden als auch der schließenden Statistik angewandt.

12.1 Methoden der beschreibenden Statistik

Die ermittelten Daten wurden tabellarisch und teilweise auch graphisch dargestellt. Zur numerischen Charakterisierung der Datenmengen wurden außerdem folgende Kenngrößen bestimmt:

- Arithmetische Mittelwerte (Mw) zur Beschreibung der durchschnittlichen Größe der Einzelwerte;
- Standardabweichungen (SD) zur Quantifizierung der Variabilität der Einzelwerte;
- Pearsonsche Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten (r) zur Quantifizierung von Art und Intensität eines linearen Zusammenhanges zwischen den Ausprägungen

verschiedener Merkmale. Es gilt: $-1 < r < 1$, wobei eine negative Korrelation bedeutet, dass eine Erhöhung der Werte eines Merkmals mit einer Abnahme der Werte des anderen Merkmals verbunden ist. Bei einer positiven Korrelation ist dagegen bei beiden Merkmalen eine Zu- bzw. Abnahme zu verzeichnen.

- Zur graphischen Darstellung von Zusammenhängen wurden außerdem Streudiagramme und Regressionsgeraden gezeichnet.

12.2 Methoden der schließenden Statistik

Die folgenden Methoden der schließenden Statistik wurden bei der Untersuchung der Hornbildungsrate und des Hornverlustes als explorative Verfahren angewandt. Die Aussagen, die sich aus den Ergebnissen ableiten lassen, beziehen sich ausschließlich auf die beobachteten Pferde, Verallgemeinerungen sind nicht ohne weiteres möglich.

Nach der Schätzung des auf die Hufe bezogenen mittleren Fehlers wurde aufgrund der Unbalanciertheit der erhobenen Daten für jedes Przewalskipferd ein monatlicher Mittelwert berechnet, der sich aus den Messwerten aller vier Hufe ergibt. Um den zeitlichen Effekt zu untersuchen, wurde ein Faktor „Quartal“ wie folgt definiert:

Winter: Januar bis März

Frühling: April bis Juni

Sommer: Juli bis September

Herbst: Oktober bis Dezember.

Zur Bestimmung des jahreszeitlichen Einflusses auf die Hornbildung bzw. den Hornverlust wurde jeweils eine zweifaktorielle Varianzanalyse unter Berücksichtigung der Faktoren "Quartal" und "Przewalskipferd" durchgeführt. Dabei wurde ein bedeutsamer Effekt dann angenommen, wenn die globale Nullhypothese ("Im Mittel besteht kein Unterschied der Hornbildung bzw. des Hornverlustes zwischen den Jahreszeiten.") bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ abgelehnt wird. Voraussetzung für die Varianzanalyse ist das Vorliegen einer Normalverteilung, die mittels des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstestes geprüft wurde. Der Test wurde auf die standardisierten Residuen des Modells angewandt. Im Anschluss an die Varianzanalyse wurden paarweise Vergleiche der Quartalswerte nach Scheffé durchgeführt ($\alpha = 0,05$).