

1	<u>Einleitung und Ziel</u>	7
2	<u>Literaturübersicht</u>	9
2.1	Das vaskuläre Endothel	9
2.2	Mechanismen der Blutgefäßbildung	11
2.2.1	Vaskulogenese und Angiogenese	11
2.2.1.1	Sprossung	12
2.2.1.2	Lumenbildung	12
2.2.1.3	Intussuszeption	14
2.2.2	Apoptose	14
2.2.3	Vaskuläre Basalmembran	15
2.2.4	Phasenkontrastmikroskopische Differenzierung angiogener Endothelzellen in vitro	15
2.2.5	Transmissionselektronenmikroskopische Differenzierung angiogener Endothelzellen in vitro	16
2.3	Allgemeiner Aufbau der äußeren behaarten Haut	17
2.4	Spezieller Aufbau der bovinen Klauenhaut	18
2.4.1	Aufbau der Klauenepidermis	18
2.4.1.1	Spezielle Struktur der Klauenepidermis	19
2.4.1.2	Struktur der Klauendermis	20
2.4.1.3	Struktur der Klauensubkutis	20
2.4.2	Extrazelluläre Matrix	21
2.4.3	Basalmembran an der dermo-epidermalen Grenzfläche	21
2.4.4	Keratinisierung und Verhornung in der Klauenepidermis	22
2.4.5	Phasenkontrastmikroskopische Differenzierung von Keratinozyten in vitro	23
2.4.6	Ultrastruktur der Keratinozyten in vitro	23
2.4.7	Vaskuläre Versorgung der Epidermis	24

2.5	Zytokeratine zum Nachweis von Keratinozyten und Endothelzellen in vitro	25
2.6	Regulierung der Angiogenese	26
2.6.1	Angiogene Faktoren	27
2.6.1.1	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	27
2.7	VEGF in der Interaktion zwischen Endothelzellen und Keratinozyten	27
2.8	In vitro-Hautkulturmodelle	29
2.8.1	Kokultivierung von Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten im dreidimensionalen in vitro-Modell	29
2.8.2	Kokulturen in Filtereinsätzen	34
2.8.2.1	Kokultivierung von Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten in Filtereinsätzen	34
3	<u>Material</u>	37
3.1	Zellen	37
3.1.1	Endothelzellen	37
3.1.2	Keratinozyten	37
3.2	Kulturmedien	38
3.2.1	Medien, Medienzusätze und Lösungen	38
3.2.2	Verwendete Nährmedien	40
3.2.3	Zusammensetzung des Selektivmediums P ₀	40
3.2.4	Zusammensetzung des Selektivmediums Quantum 286	40
3.2.5	Zusammensetzung des Erhaltungsmediums DMEM+	41
3.3	Verbrauchsmaterialien	41
3.4	Geräte	42
3.5	Immunzytochemie	43
3.5.1	Primärantikörper zur Markierung von Endothelzellen und Keratinozyten in den direkten Kokulturen	43

3.5.2	Immunreagenzien, Chemikalien	44
3.6	Transmissionselektronenmikroskopie	45
3.6.1	Verbrauchsmaterialien	45
3.6.2	Chemikalien	45
4	<u>Methoden</u>	47
4.1	Kultivierungsbedingungen	47
4.2	Kultivierungsgefäße	47
4.3	Dokumentation	48
4.4	Subkultivierung	48
4.5	Kryokonservierung	48
4.6	Auftauen der Zellkulturen	48
4.7	Zellzählung	49
4.8	Kultivierungstechniken	49
4.8.1	Pilotstudie 1: Zellkulturplatten-Beschichtung	49
4.8.2	Direkte Kokultivierung auf Glasplättchen mit Kollagenbeschichtung	51
4.8.2.1	Direktes Kokultur-System 1 (K+E)	52
4.8.2.2	Direktes Kokultur-System 2 (E+K)	53
4.8.2.3	Direktes Kokultur-System 3 (Suspension)	54
4.8.3	Pilotstudie 2: Direkte Kokultur in Millicell®-Filtereinsätzen	54
4.8.4	Direkte Kokultur in Millicell®-PCF-Filtereinsätzen mit Kollagenbeschichtung	56
4.8.4.1	Direktes Millicell®-PCF-System 1 (K+E)	57
4.8.4.2	Direktes Millicell®-PCF-System 2 (E+K)	58
4.8.4.3	Direktes Millicell®-PCF-System 3 (Suspension)	59
4.8.5	Pilotstudie 3: Indirekte Kokultivierung im Matrix-Modell	59
4.8.6	Herstellung einer Kollagen-Matrix	59

4.8.6.1	Indirektes Millicell®-PET-Matrix-System	60
4.8.6.2	Indirektes Millicell®-PET-Matrix-System 1	62
4.8.6.3	Indirektes Millicell®-PET-Matrix-System 2	63
4.8.6.4	Indirektes Millicell®-PET-Matrix-System 3	64
4.8.7	Kollagen-Kit-Modell	65
4.8.7.1	Kollagen-Kit-Modell 1	67
4.8.7.2	Kollagen-Kit-Modell 2	68
4.8.7.3	Kollagen-Kit-Modell 3	69
4.9	Phasenkontrastmikroskopie	71
4.9.1	Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen der direkten Kokulturen auf Glasplättchen	71
4.10	Immunzytochemie	71
4.10.1	Immunzytochemische Untersuchungen der direkten Kokulturen auf Glasplättchen	71
4.11	Transmissionselektronenmikroskopie	73
4.11.1	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der direkten Kokulturen auf Millicell®-PCF-Filttereinsätzen	73
5	<u>Ergebnisse</u>	76
5.1	Untersuchung der Morphologie von Endothelzellen und Keratinozyten und deren Interaktion im direkten Kokultur-Modell auf Glasplättchen	76
5.1.1	Phasenkontrastmikroskopische Untersuchung der direkten Kokultur-Modelle auf Glasplättchen	76
5.1.1.1	Untersuchung des direkten Kokultur-Systems 1 (K+E)	76
5.1.1.2	Untersuchung des direkten Kokultur-Systems 2 (E+K)	80
5.1.1.3	Untersuchung des direkten Kokultur-Systems 3 (Suspension)	86
5.2	Immunzytochemische Untersuchungen zum Nachweis von CK14 und CK19 in Keratinozyten und Endothelzellen im direkten Kokultur-System	90
5.2.1	Immunzytochemische Markierung mit Anti-CK19 in mikrovaskulären Endothelzellen im direkten Kokultur-System 1 (K+E)	91

5.2.1.1	Kontrollen	93
5.2.2	Immunzytochemische Markierung mit Anti-CK14 in epidermalen Keratinozyten im direkten Kokultur-System 2 (E+K)	95
5.2.2.1	Kontrollen	97
5.2.3	Immunzytochemische Markierung mit Anti-CK19 in mikrovaskulären Endothelzellen im direkten Kokultur-System 3 (Suspension)	98
5.2.3.1	Kontrollen	99
5.3	Histologische Untersuchung der direkten Millicell®-PCF-Systeme	101
5.3.1	Semidünnnschnitte des direkten Millicell®-PCF-Systems 1 (K+E)	101
5.3.2	Semidünnnschnitte des direkten Millicell®-PCF-Systems 2 (E+K)	103
5.3.3	Semidünnnschnitte des direkten Millicell®-PCF-Systems 3 (Suspension)	105
5.4	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der direkten Kokulturen in Millicell®-PCF-Filtereinsätzen	108
5.4.1	Ultrastruktur des direkten Millicell®-PCF-Systems 1 (K+E)	108
5.4.2	Ultrastruktur des direkten Millicell®-PCF-Systems 2 (E+K)	113
5.4.3	Ultrastruktur des direkten Millicell®-PCF-Systems 3 (Suspension)	118
6	<u>Diskussion</u>	125
6.1	Grundlagen zur in vitro-Kultivierung von Endothelzellen und Keratinozyten und deren Praxisrelevanz	126
6.2	Entwicklung eines Kokultur-Modells in vitro aus mikrovaskulären Endothelzellen und epidermalen Keratinozyten	128
6.3	Etablierung einer Methodik zur Kokultivierung von Endothelzellen und Keratinozyten im direkten Modell	130
6.4	Morphologische Charakteristika und Differenzierung der epidermalen Keratinozyten und mikrovaskulären Endothelzellen in den drei direkten Kokultur-Systemen 1 (K+E), 2 (E+K) und 3 (Suspension) auf Glasplättchen	132
6.4.1	Angiogenese-artige Merkmale an mikrovaskulären Endothelzellen in den Kokultur-Systemen auf Glasplättchen	135
6.5	Immunzytochemische Differenzierung von Endothelzellen und Keratinozyten in den Kokultur-Systemen auf Glasplättchen	137

6.6	Direkte Kokultur-Systeme in Millicell®-PCF-Filtereinsätzen	138
6.7	Morphologische Charakteristika und Differenzierung der epidermalen Keratinozyten und mikrovaskulären Endothelzellen in den drei direkten Kokultur-Systemen 1 (K+E), 2 (E+K) und 3 (Suspension) in Millicell®-PCF-Filtereinsätzen	140
6.8	Dermo-epidermale Interaktion	144
6.9	Angiogenese-artige Merkmale an mikrovaskulären Endothelzellen in den Kokultur-Systemen in Millicell®-PCF-Filtereinsätzen	144
6.9.1	Lumenbildung im Kokultur-System 1 (K+E), Kokultur-System 2 (E+K) und Kokultur-System 3 (Suspension) im Millicell®-PCF-Filtereinsatz	145
6.10	Einsatz der Kokultur-Systeme in der Erforschung der Pathomechanismen der Klauenrehe und der Hufrehe	146
7	<u>Zusammenfassung</u>	149
8	<u>Summary</u>	152
9	<u>Abkürzungen</u>	154
10	<u>Literaturverzeichnis</u>	155
11	<u>Publikationsverzeichnis</u>	177
12	<u>Danksagung</u>	178
13	<u>Selbständigkeitserklärung</u>	179