

| | | |
|---------|--|----|
| 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-Filtereinsätzen | 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 | Semidünnschnitte des direkten Millicell®-PCF-Systems 1 (K+E) | 101 |
| 5.3.2 | Semidünnschnitte des direkten Millicell®-PCF-Systems 2 (E+K) | 103 |
| 5.3.3 | Semidünnschnitte 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 |