

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
in Kooperation mit dem
Veterinär-Anatomischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

**Etablierung eines direkten Kokultur-Modells
zur Analyse der Interaktion zwischen mikrovaskulären Endothelzellen
und epidermalen Keratinozyten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Andjela Sarcev
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2010
Journal-Nr.: 3436

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. J. Plendl
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Ch. Mülling
Dritter Gutachter: PD Dr. A. Schnapper

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): cell culture, in vitro, models, endothelium,
keratinocytes, angiogenesis, keratinization

Deskriptoren (nach MeSH): coculture techniques

Tag der Promotion: 11.03.2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-164-2

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Coverbild vorne © Abstractus Designus - Fotolia.com

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2012

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

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

1 Einleitung und Ziel

Die Interaktion zwischen endothelialen und epidermalen Zellen stellt insbesondere im bovinen Zehenendorgan eine Besonderheit während physiologischer und pathologischer Vorgänge dar. Die pododermale Mikrovaskularisation beziehungsweise Mikrozirkulation ist für die Aufrechterhaltung von physiologischen Prozessen in der Rinderklaue entscheidend (Hirschberg et al., 2001). Die Versorgung der epidermalen Zellen mit Nährstoffen erfolgt über ein komplexes Gefäßnetz in der Lederhaut via Diffusion. Somit wird die Homöostase und Funktion der Klauenhaut gewährleistet. Des Weiteren wird insbesondere das Kapillarbett der Klauenlederhaut durch Mechanismen der Angioadaptation an die jeweiligen aktuellen Stoffwechselbedingungen und mechanischen Belastungen, sowohl der Dermis als auch der nicht vaskularisierten Epidermis, angepasst (Bragulla und Hirschberg, 2003). Im Rahmen physiologischer Prozesse aber auch für Reparationsvorgänge spielt somit die Angiogenese, ein Mechanismus zur Aussprossung von Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen, eine herausragende Rolle (Hirschberg und Plendl, 2005). Bei der Pathogenese von Klauenerkrankungen stehen eine durch mechanische Ursachen oder biochemische Prozesse bedingte Störung der Mikrozirkulation im kapillären Endstromgebiet in der Klauenlederhaut mit Hypoperfusion und ischämischen Erscheinungen im Mittelpunkt. Diese Mikrozirkulationsstörungen haben eine Gewebeschädigung von Dermis und Epidermis zur Folge (Lischer und Ossent, 2001; Mülling und Lischer, 2002). Nach derzeitigem Forschungsstand sind die maßgeblichen Zellen hierbei einerseits die mikrovaskulären Endothelzellen und andererseits die epidermalen Keratinozyten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Kokultur in vitro zu schaffen, die es durch geeignete Kulturbedingungen erlaubt, die zelluläre Interaktion und die morphologischen Veränderungen einschließlich der Ausbildung spezifischer Merkmale boviner Keratinozyten und mikrovaskulärer Endothelzellen im Langzeitmodell zu studieren. Dabei sollten eine eindeutige Identifizierung und eine morphologische Charakterisierung beider Zelltypen innerhalb der Kokulturen erfolgen. Einen weiteren Fokus der Untersuchungen stellten hierbei die angiogene Potenz der mikrovaskulären Endothelzellen sowie die Erfassung der Stadien der angiogenen Kaskade in den mit Keratinozyten kokultivierten in vitro-Modellen dar.

Bisher gibt es nur wenige aus Endothelzellen und Keratinozyten entwickelte in vitro-Modelle (Pouliot et al., 1998; Heidenreich et al., 2009; Micali et al., 2010). In der Humanmedizin werden mikro- und makrovaskuläre Endothelzellen zusammen mit Keratinozyten und Fibroblasten bei der Herstellung von Haut-Äquivalenten kokultiviert (Boyce et al., 2002; Supp und Boyce, 2002;

Supp et al., 2002; Ponec, 2002; Ponec et al., 2004; Martins-Green et al., 2005; Tonello et al., 2005; Tremblay et al., 2005). Ein in vitro-Modell zur experimentellen Untersuchung der Interaktion boviner mikrovaskulärer Endothelzellen und epidermaler Keratinozyten ist in der Veterinärmedizin bislang nicht verfügbar.

Da die Zell-Zell-Interaktion zwischen mikrovaskulären Endothelzellen und epidermalen Keratinozyten insbesondere in den Umbau- und Reparationsvorgängen während der Wundheilung in der äußeren Haut eine entscheidende Rolle spielt (Hackam et al., 2002; Baum und Arpey, 2005), wurden für diese Arbeit in vitro- und in vivo-Modelle der Wundheilung aus der Humanmedizin als Grundlage für die Entwicklung und Etablierung des bovinen Modells herangezogen.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei der Entwicklung des Kokultur-Modells folgende Fragen erörtert:

- 1) Welches sind die geeigneten Kulturbedingungen zur Etablierung des Kokultur-Modells?
- 2) Lassen sich Endothelzellen und Keratinozyten im direkten in vitro-Modell kokultivieren?
- 3) Welcher Marker eignet sich zur spezifischen Markierung einerseits von Endothelzellen und andererseits von Keratinozyten?
- 4) Welche endothelialen und epidermalen morphologischen Veränderungen zeigen sich im Langzeitmodell?
- 5) Bilden Endothelzellen angiogene Merkmale in der Kokultur aus?
- 6) Zeigen Keratinozyten gewebespezifische Merkmale in der Kokultur?

Letztendlich soll diese Arbeit dazu beitragen, neue Perspektiven in der Erforschung der epidermalen Differenzierung, der in vitro-Angiogenese und der spezifischen Zell-Zell-Interaktion zu schaffen. Ein Kokultur-Modell boviner mikrovaskulärer Endothelzellen und Keratinozyten erscheint insbesondere für die Erforschung der Pathogenese des wirtschaftlich und tierschützerisch bedeutsamen Klauenrehe-Komplexes besonders erfolgversprechend.

2 Literaturübersicht

Das vorliegende Projekt beschäftigt sich mit der Etablierung verschiedener direkter Kultivierungsansätze, in denen bovine mikrovaskuläre Endothelzellen mit bovinen epidermalen Keratinozyten kokultiviert wurden. Aufgrund der unterschiedlichen physiologischen Funktionen und der gewebespezifischen Lokalisation dieser Zelltypen, werden in der Literaturübersicht folgende Themenschwerpunkte dargelegt. Zunächst werden die Endothelzellen und deren spezifische Funktionen im Einzelnen beschrieben. Dabei liegt ein Fokus auf der Beschreibung der morphologischen Charakteristika der Endothelzellen in der *in vitro*-Angiogenese. Im Folgenden wird der anatomische Aufbau der äußeren Haut, insbesondere der bovinen Klaue einschließlich der vaskulären Versorgung der Epidermis beschrieben. Des Weiteren werden die Funktionen der epidermalen Keratinozyten sowie ihre Morphologie aufgeführt. Hierauf folgt die Beschreibung der in der äußeren Haut stattfindenden zellulären Interaktion zwischen Endothelzellen und Keratinozyten. Abschließend werden relevante Studien, in denen Endothelzellen und Keratinozyten in verschiedenen Ansätzen kokultiviert wurden, vorgestellt. Diese dienen in der vorliegenden Arbeit als Grundlage für die Entwicklung der bovinen Kokultur-Modelle aus Endothelzellen und Keratinozyten.

2.1 Das vaskuläre Endothel

Das vaskuläre Endothel zählt zum einschichtigen, platten Epithelgewebe und kleidet die zum Lumen gekehrte Seite sämtlicher Blutgefäße des Kreislaufsystems aus. Zusammen mit der Basalmembran gehört das Endothel zur Tunica interna der Blutgefäße. Die Blutkapillaren bestehen ausschließlich aus dem Endothel und der Basalmembran sowie außen anliegenden meist abgeflachten Perizyten, die vermutlich aus perivaskulär gelagerten mesenchymalen Zellen stammen (Allt und Lawrenson, 2001; Ribatti et al., 2002; Jain, 2003; Crisan et al., 2008).

Arterien, Arteriolen, Venen und Venulen sind dagegen charakterisiert durch zwei weitere Schichten. Einer aus glatten Muskelzellen und elastischen sowie kollagenen Fasern bestehenden Tunica media und einer aus überwiegend lockerem Bindegewebe bestehenden Tunica externa oder Tunica adventitia (Junqueira et al., 2002).

Kapillaren werden nach ihrem Endothel in drei Typen gegliedert, die den jeweiligen funktionalen Erfordernissen einer permeablen Barriere angepasst sind. Dazu zählen kontinuierliche Endothelien, gefensterte Endothelien und diskontinuierliche Endothelien. Die vaskulären Endothelzellen der Haut werden strukturell dem kontinuierlichen Endothel zugeordnet und kleiden das Kapillarlumen lückenlos aus. Diese lückenlose Auskleidung der Kapillaren

gewährleistet einen optimalen Stoffaustausch zwischen dem Blut und dem umgebenden Gewebe. Die einzelnen Zellen des Endothels sind, abhängig von der Lokalisation, durch interendotheliale Zellkontakte wie tight junctions, adherent junctions und gap junctions miteinander verbunden, die die Permeabilität der Gefäßwände bestimmen (Dejana et al., 2001; Sarin, 2010). Damit stellt das Endothel einen selektiven Filter zwischen dem Gewebe und dem zirkulierenden Blut dar.

Die vaskulären Endothelzellen zeichnen sich durch ihre Heterogenität in Morphologie, Funktion, der Expression ihrer Oberflächenmoleküle und ihrer Ansprechbarkeit auf Wachstumsfaktoren aus (Garlanda und Dejana, 1997; Davis et al., 2003). Diese Heterogenität stellt die Basis für die Kommunikation zwischen Endothelzellen und dem umgebenden Gewebe dar und ermöglicht somit die Erfüllung verschiedener Aufgaben in unterschiedlichen Organen (Hewett, 2009). Die Endothelzellen exprimieren organspezifische Oberflächenmoleküle für Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen und unterscheiden sich schließlich nicht nur in den unterschiedlichen Organen, sondern auch innerhalb eines Organs (Plendl et al., 1992; Pries et al., 2000; Pries und Kuebler, 2006). Unterschiede bestehen in den Eigenschaften zwischen Endothelzellen kleiner und großer Blutgefäße, d.h. mikro- und makrovaskulären Endothelzellen, sowie zwischen denen des arteriellen und venösen Blutgefäßsystems (Hewett, 2009). Die Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum gehören zu den am meisten untersuchten mikrovaskulären Endothelzellen (Davis et al, 2003; Tamanini und De Ambrogi, 2004; Käsmeyer und Plendl, 2009). Anhand heterogener Zellstrukturen sowie unterschiedlicher Expression und Funktion von Oberflächenmolekülen wurden mehrere verschiedene Subtypen von lutealen bovinen mikrovaskulären Endothelzellen charakterisiert (Spanel-Borowski und Fenyves, 1994; Spanel-Borowski et al., 1994; Ricken et al., 1995; Davis et al., 2003).

Das vaskuläre Endothel spielt eine herausragende Rolle in der Blutgefäßbildung. Die Neubildung von Blutgefäßen entsteht durch zwei Prozesse, die Vaskulogenese und die Angiogenese (Fischer et al, 2006). Die beiden Prozesse der Blutgefäßbildung werden im folgenden Kapitel näher beschrieben. Das Ovar und insbesondere das Corpus luteum sowie die behaarte Haut gehören zu den wenigen Organsystemen, in denen physiologischerweise eine zyklische Angiogenese und Antiangiogenese stattfinden (Modlich et al., 1996; Yano et al., 2001; Tamanini und De Ambrogi, 2004). Die angiogene Kaskade stellt einen Prozess dar, der durch die komplexe Interaktion zwischen Endothelzellen und den umgebenden gewebs- bzw. organotypischen Zellen ermöglicht wird. Im Corpus luteum des Ovars entsprechend spielt die Interaktion zwischen Endothelzellen und den Granulosazellen beziehungsweise im Falle der

Haut zwischen Endothelzellen und den Keratinozyten eine herausragende Rolle (Fuchs-Schoenleber, 1999; Hojo et al., 2003).

2.2 Mechanismen der Blutgefäßbildung

2.2.1 Vaskulogenese und Angiogenese

Die **Vaskulogenese** beinhaltet vornehmlich die Bildung eines primären, vaskulären Netzwerks von Blutgefäßen durch die de-novo-Differenzierung von endothelialen Vorläuferzellen, den Angioblasten, in der frühen Phase der Embryonalentwicklung (Tang und Conti, 2004). Die Vaskularisation von Organen wie Herz und Milz erfolgt primär durch Vaskulogenese (Patan, 2004). Neuere Untersuchungen zeigten aber auch in der postnatalen Entwicklung die Gefäßbildung durch Vaskulogenese beziehungsweise einer Kombination aus Vaskulogenese und Angiogenese (Luttun und Carmeliet, 2003; Asahara und Kawamoto, 2004; Schatteman und Awad, 2004; Ribatti, 2007). Die Neovaskularisation in Form der postnatalen Vaskulogenese beruht auf der Differenzierung von adulten Stammzellen (Asahara und Kawamoto, 2004). Kässmeyer (2006) beschreibt Vaskulogenese-artige Prozesse bei in vitro kultivierten Endothelzellen, die aus dem adulten bovinen Corpus luteum isoliert wurden. Diese in vitro-Vaskulogenese nimmt ihren Ausgang von adulten Stammzellen (Kässmeyer et al., 2009).

Die weitere Differenzierung und Verzweigung des primären Gefäßsystems wird als **Angiogenese** bezeichnet und stellt die Voraussetzung für physiologisches sowie pathologisches Wachstum dar. Gekennzeichnet ist dieser angiogene Prozess durch die Neubildung von Kapillaren aus bereits bestehenden Blutgefäßen (Carmeliet, 2000; Patan, 2000). Diese ist nicht nur notwendig während der embryonalen Entwicklung, sondern auch physiologisch im weiblichen Reproduktionstrakt des adulten Organismus, während der Follikelreifung, für die Anbildung des Corpus luteum und die Ausbildung der Plazenta und der weiblichen Milchdrüse (Berisha und Schams, 2005; Reynolds et al., 2005; Kässmeyer und Plendl, 2009). Des Weiteren findet eine zyklische Angiogenese in der behaarten Haut statt, sowie während regenerativer Ereignisse in der Wundheilung der Haut (Eming et al., 2007). Die Angiogenese ist ein mehrstufiger Prozess, der in Abhängigkeit von angiogenen Stimuli aktivierbar ist (Carmeliet, 2000; Carmeliet, 2005). Das Hauptmerkmal des physiologischen angiogenen Vorgangs ist, dass es sich um einen streng kontrollierten Prozess handelt, der kurzzeitig aktiviert und anschließend inhibiert wird.

Die Neubildung von Blutgefäßen kann zum einen durch die klassische Sprossung von Endothelzellen oder zum anderen durch die Intussuszeption, durch Teilung eines vorhandenen Gefäßlumens, erfolgen.

2.2.1.1 Sprossung

Der komplexe Prozess der angiogenen Kaskade beginnt mit der Aktivierung der Endothelzellen durch einen angiogenen Stimulus. Um in das umgebende Gewebe migrieren zu können, müssen sich die Endothelzellen hierbei zunächst von ihren benachbarten Zellen lösen. Zelladhäsionsmoleküle sind hierbei maßgeblich beteiligt (Bischoff, 1997; Lehmann et al., 2000). Die Synthese von proteolytischen Enzymen, wie Plasminogen-Aktivator (PA) und Matrix-Metalloproteinasen (MMP), unter anderem von Endothelzellen und Perizyten, führen zum Abbau der Basalmembran und der umgebenden extrazellulären Matrix (van Hinsbergh et al., 2006; van Hinsbergh und Koolwijk, 2008). Infolgedessen entsteht eine lokal fragmentierte Basalmembran. Mit Hilfe von Zellausläufern, so genannten Pseudopodien, migrieren nun die Endothelzellen aus dem Zellverband in Richtung des angiogenen Stimulus in das umliegende Gewebe (Ferrara und Gerber, 2001). Die Endothelzellen wandern im engen Kontakt aus dem Gefäß aus. Hieraus entsteht ein aus linear aneinander gereihten Endothelzellen gebildeter Endothelzellspross. Durch Proliferation nachfolgender Endothelzellen kommt es ausgehend von der distalen Basis zur Verlängerung des endothelialen Sprosses. Anschließend erfolgt an der Spitze des Sprosses eine Degradation der extrazellulären Matrix, wodurch eine weitere Migration der Zellen ermöglicht wird. Durch Anastomose der Enden kapillärer Sprosse kommt es zur Schlingenbildung („loops“). Die weitere Migration und Proliferation von Endothelzellen führt ausgehend von den entstandenen Schlingen zu einem Netzwerk Kapillar-ähnlicher Strukturen (Gimbrone et al., 1974; Folkman, 1984).

2.2.1.2 Lumenbildung

Zur Lumenbildung innerhalb neuer endothelialer Kapillarsprosse kursieren verschiedene Hypothesen anhand von in vitro-Untersuchungen. In den phasenkontrastmikroskopischen Untersuchungen beschrieben Folkman und Haudenschild (1980b) das vereinzelte Auftreten intrazellulärer Vakuolen in den kultivierten Endothelzellen. Durch Zusammenfließen und Verschmelzen von Vakuolen benachbarter Endothelzellen erfolgte die Bildung eines von nur einer Zelle begrenzten, kontinuierlichen und zellfreien Lumens. Im weiteren Verlauf konnte beobachtet werden, dass sich aus dem endothelialen Monolayer ein Netzwerk aus verzweigten Kapillar-ähnlichen Strukturen entwickelte. In den transmissionselektronenmikroskopischen

Untersuchungen wiesen diese Kapillar-ähnlichen Strukturen ein kontinuierliches Lumen auf. Gleichzeitig waren die Lumina von einer endothelialen Membran begrenzt. Sowohl in den Vakuolen der Zellen als auch in den entstandenen Lumina konnte zunächst die Ablagerung fibrillären Materials beobachtet werden, das sich in der späten Phase aufgelöst zu haben schien. Dadurch entstanden Kapillar-ähnliche Strukturen mit echten Lumina.

Nach einer anderen Hypothese verschmelzen kleine intrazelluläre Vakuolen im Verlauf der Kultivierung zu größeren Vakuolen, um schließlich mit der Plasmamembran zu fusionieren. Die hierdurch erfolgte Erweiterung des interzellulären Spaltraums führt somit zur Bildung eines Lumens (Meyer et al., 1997). Diese Beobachtungen erfolgten an Endothelzellen aus der humanen Nabelschnur (HUVEC), die auf einem Kollagengel kultiviert wurden. In den folgenden vier Stunden migrierten die Endothelzellen in das Kollagengel und formten Kapillar-ähnliche Strukturen aus. Apoptose der Zellen im Zentrum des Sprosses und die Migration weiterer Endothelzellen zwischen die das Lumen auskleidenden Zellen, führt zur fortschreitenden Ausdehnung des Lumens (Meyer et al., 1997; Davis et al., 2000). Meyer et al. (1997) vermuten hierbei einen durch Apoptose bedingten Detritus an Zellen innerhalb des entstandenen Lumens. Peters et al. (2002) kultivierten humane Endothelzellen (HUVEC) auf einer Gelatinebeschichtung. Anschließend wurden diese mit einer Kollagengelschicht bedeckt. Schon nach drei Tagen entwickelte sich ein Netzwerk aus Kapillar-ähnlichen Strukturen. Nach der Hypothese dieser Arbeitsgruppe resultiert die Lumenbildung innerhalb der Kapillar-ähnlichen Strukturen aus der Apoptose von Endothelzellen, die durch den Abbau der extrazellulären Matrix induziert wird. In den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen waren innerhalb der Lumina apoptotische Zellen zu finden. Es wurde vermutet, dass der Kontaktverlust der Zellen von der degradierten Matrix im Zuge der angiogenen Kaskade zur Ablösung der Endothelzellen im Zentrum der Kapillar-ähnlichen Struktur führt und somit in der Apoptose der Zellen resultiert.

Nach einer anderen Hypothese entstehen Lumina neuer Gefäßstrukturen durch die kreisförmige Umbiegung der Zellkörper von Endothelzellen und Bildung eines zentralen Hohlraums und einer anschließenden Verschmelzung der Zellenden (Paku, 1998; Sacewicz et al., 2009).

Im Anschluss an die Bildung neuer tubulärer Gefäßstrukturen endet der Prozess, indem die Endothelzellen wieder in den inaktiven Zustand übergehen (Conway et al., 2001). Während die Produktion von proteolytischen Enzymen und die Migration und Proliferation der Zellen eingestellt wird, synthetisieren und sezernieren Endothelzellen durch unmittelbaren Kontakt zur extrazellulären Matrix Komponenten der Basalmembran, wodurch der Aufbau einer Basalmembran im Bereich des neu gebildeten Gefäßes gewährleistet wird. Zu den von

Endothelzellen produzierten Komponenten der Basalmembran gehören Kollagen IV, Laminin, Heparansulfat, Proteoglykan und Fibronectin (Tilling et al., 2002). Im weiteren Verlauf lagern sich zusätzlich Perizyten entlang des Sprosses an (Hirschi und D'Amore, 1996; Hirschi und D'Amore, 1997; Gerhardt und Betsholtz, 2003)

Nach Neubildung der Kapillaren setzt der Blutfluss langsam ein. Durch anschließendes vaskuläres Remodeling, stoffwechselbedingten Umbauprozessen der Strukturen, adaptieren die neuen Gefäße an den jeweiligen Bedarf (Hughes und Chang-Ling, 2000; Humphrey, 2008). Dazu zählen die Veränderung der Gefäßwände in Form und Größe durch weitere Zelldifferenzierung, Zellproliferation, sowie der Bildung von Proteinen der extrazellulären Matrix. Die infolge der räumlichen Neuordnung neu geformten Blutgefäße können entweder zu Kapillaren heranreifen oder sie entwickeln sich zu größeren venösen oder arteriellen Gefäßen (Risau, 1997; Patan, 2000).

2.2.1.3 Intussuszeption

Neben der klassischen Bildung eines Endothelzellsprosses wird eine zweite Form der Angiogenese beschrieben, die Intussuszeption oder „non-sprouting“-Angiogenese, die insbesondere im Herzen und in der Lunge beobachtet wird (Risau, 1997; Burri und Djonov, 2002). Die Intussuszeption ist charakterisiert durch die Einschnürung beziehungsweise Teilung eines bereits bestehenden Gefäßlumens durch einwachsende Endothelzelpfeiler (Djonov et al., 2003; Burri et al, 2004).

Während der Intussuszeption entstehen die neuen Blutgefäße, indem das Lumen durch das Einwachsen von Endothelzelpfeilern mit extrazellulärer Matrix geteilt wird. Durch das Zurückziehen von Endothelzellen aus lokal begrenzten Abschnitten der Gefäßwand entsteht zunächst ein endothelzellularer Bereich. Hieraus folgt ein Ausstülpfen der Basalmembran in das umliegende Gewebe. Nach Abbau der Basalmembran in diesem Abschnitt kommt es zur Migration von Endothelzellen in die Ausstülpung. Schließlich führt die Entwicklung einer extrazellulären Matrix, ausgehend vom ursprünglichen Blutgefäß, zur Bildung eines neuen Gefäßes (Patan, 2000).

2.2.2 Apoptose

Die Apoptose bezeichnet den programmierten Zelltod und findet sowohl in der embryonalen Entwicklung als auch im adulten Organismus statt. Hierbei handelt es sich um einen regulierten Prozess, der gekennzeichnet ist durch morphologische Veränderungen der Zelle und der dabei weder den Zelltod benachbarter Zellen noch die Aktivierung von Entzündungsreaktionen

verursacht (Stefanec, 2000). Der apoptotische Prozess scheint im Zuge der Angiogenese eine wichtige Rolle zu erfüllen (Peters et al., 2002). Hervorzuheben ist hierbei, dass die Apoptose durch die Anwesenheit von proangiogenen Faktoren verhindert wird. Zu Beginn des Apoptose-Prozesses kommt es zur Schrumpfung der Zelle. Die sich nun aus dem Zellverband lösende Zelle ist charakterisiert durch so genannte apoptotische Bläschen an der Zelloberfläche. Nach Kondensation des Chromatins folgt eine Fragmentierung des Zellkerns. Schließlich zerfällt die gesamte Zelle in apoptotische Körperchen (Tertemiz et al., 2005). Diese membranumschlossenen, organellenreichen Teilchen werden von benachbarten Zellen und Makrophagen phagozytiert. In vitro-Studien zeigten, dass zum einen die fehlende Zelladhäsion aber auch die Kultivierung mit serumfreien Nährmedien zur Aktivierung des apoptotischen Vorgangs führt (Zoellner et al., 1996).

2.2.3 Vaskuläre Basalmembran

Die vaskuläre Basalmembran ist als spezialisierte homogene Schicht der extrazellulären Matrix zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen oder Perizyten zu finden. Dabei grenzt die Basalmembran direkt an die basale Oberfläche der Endothelzellen an. Transmissionselektronenmikroskopisch können Basalmembranen in eine Lamina lucida oder rara, Lamina densa, die zusammen als Basallamina bezeichnet werden, und in eine Lamina reticularis eingeteilt werden. Die Hauptkomponenten der Basalmembran sind Kollagen Typ IV, Glykoproteine wie Laminin und Entaktin, sowie Glukosaminoglykane wie Perlecan (Tilling et al. 2002; Hallmann et al., 2005). Sowohl Endothelzellen als auch Perizyten sind an der Bildung von Komponenten der Basalmembran beteiligt (Stratmann et al., 2009).

2.2.4 Phasenkontrastmikroskopische Differenzierung angiogener Endothelzellen in vitro

Bahramsoltani (2003) konnte die angiogene Kaskade anhand von charakteristischen phasenkontrastmikroskopischen Merkmalen des Zellbildes in einem in vitro-Angiogenese-Modell, das von bovinen Corpora lutea in Rückbildung gewonnen wurde, einteilen. Im Stadium 1 (Konfluenten Monolayer) bildeten polygonale Endothelzellen nach Aussaat einen konfluenten Monolayer im epitheltypischen „Kopfsteinpflaster-Muster“. Nach Erreichen der Konfluenz kam es im Stadium 2 und 3 (Aussprossung, frühe und späte Phase) zur Ausbildung von Zellausläufern. Stadium 4 und 5 (Lineare Aneinanderreihung, frühe und späte Phase) definierte sich über die Ausbildung von Endothelzellreihen durch Aneinanderreihung von langgestreckten Zellen. Charakteristisch für das Stadium 6 (Netzwerkbildung) ist die Bildung eines Netzwerks

aus Einzelzellreihen durch deren Verlängerung und Aneinanderreihung. Gleichzeitig lösen sich die im Netzwerk organisierten Zellen von denen im Monolayer liegenden Zellen. Des Weiteren erfolgt die Auflösung des Zellrasens. Im Stadium 7 und 8 (Dreidimensionale Organisation, frühe und späte Phase) erfolgt die Bildung Kapillar-ähnlicher Strukturen durch die Aneinanderreihung von Endothelzellreihen. Auf diesem Weg nimmt der Durchmesser der im Netzwerk organisierten Zellstränge zu.

2.2.5 Transmissionselektronenmikroskopische Differenzierung angiogener Endothelzellen in vitro

Die im Stadium 2 und 3 (Aussprossung, frühe und späte Phase) der in vitro-Angiogenese betrachteten Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung zeigen eine langgestreckte Gestalt (Bahramsoltani, 2003). In jeder Zelle ist ein ovaler, euchromatinreicher Zellkern mit mindestens einem Nukleolus zu erkennen. Parallel angeordnete Endothelzellreihen linear aneinander gereihter Zellen weisen einen schmalen, mit fibrillärem Material gefüllten Spalt auf. Die Zellen innerhalb der endothelialen Zellreihen sind hauptsächlich durch gap junctions, vereinzelt auch durch Desmosomen verbunden. Zahlreiche Mitochondrien vom Crista-Typ, vereinzelt auftretendes raues endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Felder sind vor allem in der Zellperipherie anzutreffen. Im Stadium 5 (Aneinanderreihung, späte Phase) und im Stadium 6 (Netzwerkbildung) zeigen sich in den Endothelzellreihen langgestreckte Zellen bis hin zu abgerundeten Zellen, die über schmale Zellausläufer miteinander verknüpft sind. Die abgerundeten Zellen sind mit stark gelappten Zellkernen gekennzeichnet. In begrenzten Abschnitten ist zwischen den Zellreihen ein mit fibrillärem Material gefüllter erweiterter Spaltraum sichtbar. Neben dominierenden Mitochondrien ist eine Zunahme des rauhen endoplasmatischen Retikulums zu erkennen. Im Stadium 7 und 8 (Dreidimensionale Organisation) weisen in Tubuli organisierte Endothelzellen ausschließlich eine runde bis ovale Zellform auf. Charakteristisch für dieses Stadium sind die gebildeten Endothelzelltubuli mit erweitertem zellfreien Lumen. Die Lumina sind nur teilweise mit fibrillärem Material angefüllt. Die Anzahl der Mitochondrien ist deutlich verringert, daneben sind nur noch vereinzelt raues endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Felder zu erkennen. Des Weiteren sind zunehmend viele intrazelluläre Vakuolen, teils mit fibrillärem Material und teils elektronenoptisch leere, zu beobachten.

Bereits 24 Stunden nach Aussaat beobachtete Käsmeyer (2006) ein für mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Ausbildung typisches Wachstum. Hierbei gruppierten sich circa zehn längliche Endothelzellen um eine zentrale polygonale Zelle.

Ausgehend von den so genannten „Starting points“ bildeten sich Zellcluster durch intensive Proliferation. Die Zellcluster traten über lange Zellausläufer in Verbindung und überbrückten dabei die im Monolayer liegenden polygonalen Zellen. Im weiteren Verlauf zeigten die Zellen des Monolayers längliche Zellform und gliederten sich in das Netzwerk aus überbrückenden Zellstraßen ein. Durch Aneinanderreihung zusätzlicher Zellreihen erfolgte die Bildung eines dreidimensionalen Netzwerks aus Kapillar-ähnlichen Strukturen während sich zellfreie Lücken auf dem Kulturschalenboden zunehmend ausdehnten.

Die im Netzwerk aus mehrreihigen Zellstraßen organisierten Endothelzellen zeigten eine runde bis ovale oder längliche Zellform. Die euchromatischen Zellkerne waren gekennzeichnet durch ein gelapptes Profil. Neben zahlreichen Mitochondrien vom Crista-Typ in der Zellperipherie, waren besonders in Zellkernnähe vermehrt raues endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Felder aufzufinden. Lysosomen unterschiedlicher Gestalt, Vesikel und multivesikuläre Körperchen zeigten sich frei im Zytoplasma. Untereinander waren die Zellen über Desmosomen verknüpft, ansonsten zeichnete sich ein erweiterter Interzellularraum ab, in den zahlreiche Zellausläufer hineinragten. Der Spaltraum war mit fibrillärem Material angefüllt. Ebenso waren Zellen über lange Zellausläufer miteinander verbunden. Die dem extrazellulären Material zugewandte Zellfläche war glatt, während das Profil der Plasmamembran ansonsten geprägt war durch zahlreiche Zellfortsätze. Im weiteren Zuge der Differenzierung enthielten einige Zellen unterschiedlich große Vakuolen, die teils elektronenoptisch leer und teils Zelldetritus enthielten. Eine weitere Beobachtung waren gebogene Zellkörper, die ein Lumen umschlossen. Längsschnitte von gebildeten Tubuli zeigten in ihrem Lumen fibrilläres Material.

2.3 Allgemeiner Aufbau der äußeren behaarten Haut

Als größtes Organ des menschlichen und tierischen Körpers stellt die äußere behaarte Haut eine hochspezialisierte Barriere gegenüber der Umwelt dar. Des Weiteren schützt sie vor chemischen, biologischen und physikalischen Noxen, vor dem Verlust oder Eindringen von Wasser und ist beteiligt an der Regulation von Körpertemperatur und Immunabwehr (Bouwstra und Ponec, 2006). Die Haut ist zur ständigen Regeneration befähigt (Blanpain und Fuchs, 2006; Abbas und Mahalingam, 2009).

Die äußere Haut (Integumentum commune) besteht aus einem epithelialen Anteil, der Epidermis (Oberhaut), die über die tiefe Keimschicht, dem Stratum basale, papillenförmig und damit unverschieblich mit der darunterliegenden Dermis (Lederhaut, Korium) verzahnt ist, welche über die darunterliegende in der Regel lockere Verschiebeschicht der Subkutis (Unterhaut, Hypoderma) mit dem Körper verbunden ist. Dermis und Epidermis sind voneinander

durch die Basalmembran getrennt. In dem Papillarkörper der Dermis liegt das Gefäßnetz, der subepidermale Gefäßplexus, das die angrenzende Epidermis mit Nährstoffen versorgt und einen regulatorischen Einfluss auf Prozesse in der Epidermis ausübt. Sie determiniert unter anderem die Differenzierung epidermaler Zellen. Die Dermis besteht aus dicht verflochtenen Lagen von kollagenen und elastischen Fasernetzen, während die Subkutis aus lockerem Bindegewebe und Fettgewebe aufgebaut ist, in dem zahlreiche Blut- und Lymphgefäße und Nerven verlaufen. Die abschließende Subkutis stellt die Verbindung zu Faszien, Muskeln und Knochen her (Nash et al., 2004).

Der Horn- oder Klauenschuh des bovinen Zehenendorgans ist ein modifizierter Hautüberzug und weist funktionsbedingte Variationen des oben beschriebenen schematischen Grundbauplans der äußeren Haut auf.

2.4 Spezieller Aufbau der bovinen Klauenhaut

2.4.1 Aufbau der bovinen Klauenepidermis

Die bovine Klaue wird definiert als Zehenendorgan, das gebildet wird von den zentralen Stützteilen und der stark modifizierten Haut an den Zehenenden (Zietzschmann, 1918; Maierl und Mülling, 2004). Die Hautmodifikation des Zehenendorgans wird nach Schichten und Segmenten gegliedert. Dabei werden ebenso wie in der äußeren Haut eine Unterhaut, Lederhaut und Oberhaut unterschieden (Maierl und Mülling, 2004). Im Gegensatz zur äußeren Haut ist die bovine Klaue eine haar- und drüsenlose Hautmodifikation, die funktionsbedingte Variationen im bereits geschilderten Grundbauplan aufweist. Primäre strukturelle Besonderheiten der Klauenepidermis ermöglichen vielfältige Aufgaben. Die Hauptunterschiede zur äußeren behaarten, unmodifizierten Haut resultieren aus der Aufnahme des Körpergewichts in einer starken Keratinisierung mit anschließender hochgradiger Verhornung sowie besonders strukturierten Horngebilden, dem Papillar- beziehungsweise Lamellarkörper der Dermis, und spezifischen Unterhautpolstern.

Die einzelnen Hautschichten der Klaue (Klauenunterhaut, Klauenlederhaut, Klauenoberhaut) sind aufgrund unterschiedlicher Funktionen in verschiedenen Abschnitten modifiziert (Budras und Wünsche, 2002; Maierl und Mülling, 2004). Basierend auf den jeweiligen unterschiedlichen Hautmodifikationen findet daher eine Segmenteinteilung in Saum-, Kron-, Wand-, Sohlen-, und Ballensegment statt (Budras und Wünsche, 2002). Das Ausmaß der Modifikation in den einzelnen Klauensegmenten ist jeweils abhängig von der besonderen Funktion (Mülling, 2002; Maierl und Mülling, 2004).

2.4.1.1 Spezielle Struktur der Klauenepidermis

Der Aufbau der Klauenepidermis entspricht grundsätzlich dem der Epidermis der äußeren Haut. Die Klauenepidermis bildet im Vergleich jedoch wesentlich mehr Zelllagen aus. Die Verzahnung von Oberhaut und Lederhaut ist hierbei sehr viel deutlicher ausgeprägt. Des Weiteren ist das Stratum papillare der Klauenlederhaut gekennzeichnet durch fingerförmige Ausstülpungen (Zotten und Blättchen), die sehr weit in die Epidermis hineinreichen (Mülling, 2000). Über dem zöttchenförmigen Papillarkörper bilden die epidermalen Zellen Horn in Form von Röhrenchen, über den Blättchen der Lederhaut bildet die Epidermis Hornblättchen. Die mechanisch belastbare Verbindung der Klauenkapsel mit dem Klauenbein wird gewährleistet durch diese Blättchen (Fürst, 1992; Mülling, 2002). Die gefäßlose Epidermis ist charakterisiert durch ein mehrschichtiges Plattenepithel und ist untergliedert in ein Stratum basale, Stratum spinosum und Stratum corneum. Ausschließlich in den proximalen Abschnitten des Ballensegments und im Saumsegment weist die Epidermis ein Stratum granulosum auf (Fuchs, 1993). Ein Stratum lucidum wird nicht ausgebildet.

Das **Stratum basale** bildet die unterste Schicht der Epidermis. Die Zellen des einschichtigen Stratum basale sind meist schlanke und hochprismatische Keratinozyten mit großen längs- bis rundovalen heterochromatischen, zentral gelegenen Zellkernen (Mülling, 1993; Liebich et al., 2004). Die Basalzellen sind über Hemidesmosomen in der Basalmembran fest verankert und auf diese Weise direkt mit der Lederhaut verbunden. Dabei sind die Hemidesmosomen entscheidend für die polare Organisation des Epithels (Poumay und Leclercq-Smekens, 1998). In den nächsten Zellschichten weisen die Zellen mit voranschreitender Differenzierung zunächst eine polygonale Zellform auf und flachen dann zunehmend ab.

Die ersten suprabasalen Zellen sind zunächst kubisch und flachen weiter distal ab. Jede Zelle weist einen rundovalen Zellkern mit einem kleinen Nukleolus auf. In den oberen Zelllagen des Stratum spinosum weisen die Zellen eine polygonale Zellform auf und sind durch eine deutliche Größenzunahme gekennzeichnet. Die Zellen sind bis zu fünf- bis sechsfach größer als die Basalzellen. Die vermehrte Keratinsynthese im Stratum spinosum ist charakterisiert durch Keratinfilamente in Form einer gestreiften Maserung (Mülling, 1993; Mülling und Budras, 2002a). Die Zellen des Stratum spinosum sind über Desmosom-verankerte Zellausläufer miteinander verbunden. Das Stratum spinosum besteht in der Klaue aus bis zu 70 Zelllagen (Mülling, 1993).

Das **Stratum granulosum** besteht aus bis zu 15 Zelllagen und ist im proximalen Abschnitt des Ballensegments und im Saumsegment vorhanden. Im distalen Abschnitt des Ballensegments fehlt diese Schicht. Die Zellen sind in Form und Größe mit denen des Stratum spinosum

vergleichbar und durch intrazelluläre Keratohyalin granula charakterisiert. Am Übergang zum Stratum corneum können größere, hellere Zellen mit pyknotischem Zellkern beobachtet werden (Mülling, 1993).

Das **Stratum corneum** der Klaue kann eine Stärke von bis zu 1cm erreichen (Mülling, 2000). Die Zellen sind spindelförmig und weisen zunächst noch einen pyknotischen Zellkern auf. Je weiter die Verhornung voranschreitet, desto stärker flachen die älteren Hornzellen ab. Nur noch vereinzelt werden Zellkernreste vorgefunden (Mülling, 1993).

2.4.1.2 Struktur der Klauendermis

Die gefäßführende Dermis der Klaue, die Klauenlederhaut, liegt der Klauenunterhaut direkt auf und kann in Saum-, Kron-, Wand-, Sohlen- und Ballenlederhaut eingeteilt werden. Während die Lederhaut einzig im Wandsegment Lamellen beziehungsweise Blättchen ausbildet, weist sie in allen übrigen Segmenten (Saum-, Kron-, Sohlen- und Ballensegment) Papillen beziehungsweise Zotten auf (Maierl und Mülling, 2004). Die epidermale Struktur ist von dieser räumlichen Anordnung abhängig. Die Zotten und Blättchen der Klauenlederhaut spielen für die dermo-epidermale Interaktion eine herausragende Rolle (Mülling und Budras, 2002b). Die Dermis gliedert sich in das oberflächliche Stratum papillare und das tiefer gelegene Stratum reticulare (Mülling und Lischer, 2002). Das Stratum papillare wird aus einem bindegewebigen Papillarkörper gebildet. Es verankert die Epidermis und versorgt sie mit Nährstoffen. Am Übergang vom Stratum papillare und reticulare befindet sich ein subpapilläres Gefäßnetz mit Arteriolen und Venolen. Die von hier ausgehenden Arteriolen bilden in den Papillen ein besonders stark ausgeprägtes Kapillarnetz, das für eine Versorgung der epidermalen Zellen per Diffusion sorgen. Das Stratum reticulare besteht aus einem komplexen Netzwerk aus Kollagenfaserbündeln des Kollagen Typ I und III, die die Verbindung zum Stützskelett oder zur Klauenunterhaut herstellen.

2.4.1.3 Struktur der Klauensubkutis

Die zentralen Stützteile des Zehenendorgans werden von der Subkutis, Klauenunterhaut, überzogen. Sie ist an den fünf Segmenten der Klaue unterschiedlich stark ausgeprägt (Habermahl, 1996). In dem Saum-, Kron und Ballensegment erfüllt sie eine stoßdämpfende Funktion (Räber et al., 2004). Im Ballensegment stellt die Subkutis ein modifiziertes Fettgewebepolster dar (Räber, 2000). Eine klassische Subkutis fehlt dagegen im Wand- und Sohlensegment (Maierl und Mülling, 2004).

2.4.2 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) entsteht durch die Bildung eines komplexen Netzwerkes aus Makromolekülen, das in Epithel-, Muskel-, Nerven-, Binde- und Stützgewebe eine stabile Verbindung mit den Zellen eingeht. Die Zellen werden mit der Zellmembran über spezifische Oberflächen-Rezeptoren, die Integrine, an der extrazellulären Matrix verankert. Neben einer mechanischen Funktion der extrazellulären Matrix für eine stabile Gewebestruktur, spielt die Wechselwirkung zwischen der EZM und den Zellen eine herausragende Rolle für die Zelladhäsion, Zellmigration und Proliferation sowie Differenzierung der adhärenen Zellen (Sternlicht und Werb, 2001; Jost und Rodeck, 2005). Verlieren die Zellen ihren Kontakt zur extrazellulären Matrix, kommt es meist zur Apoptose der Zellen. Die von Epithel- und Bindegewebszellen selbst synthetisierten und sezernierten hochmolekularen Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix sind fibrilläre Proteine (Kollagen, Elastin, Fibronectin) und Glykosaminoglykane. Die Zusammensetzung der EZM ist dabei von den matrixproduzierenden Zellen abhängig. In der interstitiellen Matrix dominieren fibrilläre Kollagenfasern des Kollagen Typ I, III, V und Glykoproteine wie Fibronectin (Iivanainen et al., 2003).

2.4.3 Basalmembran an der dermo-epidermalen Grenzfläche

Die Basalmembran ist in allen epithelialen Geweben zu finden und stellt die Grenzschicht zum Bindegewebe dar. Basale Epithelzellen, wie basale Epidermiszellen und Endothelzellen, liegen der Basallamina dicht auf (Tilling et al., 2002). Sie erfüllt für die Zellen eine adhäsive Funktion und dient der mechanischen Stabilität, ist selektiv permeabel und elastisch.

Sie stellt die charakteristische Verbindung zwischen den bindegewebigen (Dermis) und den epidermalen Strukturen (Epidermis) des Zehenendorgans dar. Die Basalmembran der dermo-epidermalen Grenzfläche ist charakterisiert durch den sogenannten hemidesmosomalen Adhäsionskomplex, durch den die basalen epidermalen Zellen mit der extrazellulären Matrix verbunden sind und unterscheidet sich somit von anderen Basalmembranen. Verankerungsfilamente und hemidesmosomale Proteine ziehen von der Plasmamembran basaler Keratinozyten über die Lamina lucida zur Lamina densa (Hendry et al., 2002). Die Lamina densa ist wiederum mit der Lamina fibroreticularis und damit dem Stratum papillare der Dermis über Verankerungsfibrillen verknüpft.

Die Komponenten der Basalmembran werden hauptsächlich von auf ihr ruhenden Zellen aus Dermis als auch Epidermis synthetisiert und sind dadurch ein Produkt dieser beiden Gewebeschichten (Hallmann et al., 2005; Lu et al., 2007). Hauptsächlich besteht die dermo-epidermale Basalmembran aus Kollagen Typ IV und Laminin. Die Wechselwirkungen zwischen

den Zellen der Dermis und denen der Epidermis und die Ausbildung einer stabilen Basalmembran spielen neben der Gewebemöostase eine herausragende Rolle für das Wachstum und die Differenzierung epidermaler Zellen. Reguliert wird diese Interaktion durch die Synthese von löslichen Faktoren mit autokriner und parakriner Wirkungsweise, sowie durch die extrazelluläre Matrix und von den interzellulären Zellkontakten.

2.4.4 Keratinisierung und Verhornung in der Klauenepidermis

In allen Epithelien, damit auch in den nicht verhornenden Epithelgeweben, findet der Prozess der Keratinisierung statt. Die Keratinisierung ist ein gerichteter Differenzierungsprozess der Epithelzellen, der gekennzeichnet ist durch die Ausbildung von Keratinproteinen und stellt die Voraussetzung für den anschließenden Verhornungsprozess dar. Kennzeichnend für die epidermale Keratinisierung ist die spezifische Syntheseleistung der Zellen im Stratum spinosum und das typische Keratinexpressionsmuster.

Während der Keratinisierung synthetisieren die Zellen des Stratum spinosum spezifische Keratinproteine, oder sogenannte Zytokeratine, Filaggrine (Keratinfilament-assoziiertes Protein) und das membrane coating material (MCM), auch Interzellularkitt genannt (Mülling und Budras, 1998; Anthauer et al., 2005). Im Vordergrund der Keratinisierung steht die biochemische Verbindung der Keratinproteine (Zytokeratine) und die Synthese und Exozytose von Interzellularkitt (Hendry et al., 2001; Tomlinson et al., 2004). Keratine sind spezifische Intermediärfilamente der Epithelzellen und bilden für jedes Epithel ein charakteristisches Keratinexpressionsmuster. Das MCM wird in spezifischen zytoplasmatischen Zellorganellen, den membrane coated granules (MCGs) gespeichert, die auch lamellar granules oder lamellar bodies genannt werden. Durch Exozytose der MCM in den Interzellularraum bildet es eine äußerst stabile mechanische Verbindung zwischen den Hornzellen (Bragulla und Mülling, 1994).

Auf die Keratinisierung folgt die Verhornung, die eine spezifische Form der Differenzierung darstellt. Während der Verhornung erfolgt die über Disulfidbrücken stabilisierte Vernetzung von Keratinfilamenten mit den Filaggrinen. Die Filaggrine sind somit verantwortlich für die Aggregation der Keratinfilamente in den verhornenden Zellen und sorgen für die Abflachung der Zellen. Durch Anlagerung synthetisierter intrazellulärer Strukturproteine an die innere Plasmamembran kommt es gleichzeitig zur Bildung des „cornified envelope“ (Akiyama et al., 2002). Nach Hohl (2005) stellt das „cornified envelope“ eine protektive Barriere der Hornschicht dar. Die Verhornung endet mit dem programmierten Zelltod, der Apoptose (Tomlinson et al., 2004).

Des Weiteren wird zwischen einem weichen und einem harten Verhornungstyp unterschieden. Der weiche Verhornungstyp ist abhängig von dem Vorhandensein eines Stratum granulosum. Somit findet die weiche Verhornung in der Rinderklaue nur im proximalen Abschnitt des Ballensegments sowie im Saumsegment statt. In den Abschnitten, in denen das Stratum granulosum fehlt, ist der harte Verhornungstyp zu beobachten (Fuchs, 1993).

2.4.5 Phasenkontrastmikroskopische Differenzierung von Keratinozyten in vitro

In vitro inkubierte epidermale Keratinozyten werden nach wenigen Stunden auf dem Untergrund des Kulturgefäßes entweder einzeln oder in Clustern zusammengelagert vorgefunden. Innerhalb der ersten 24 bis 48 Stunden strecken sie sich und proliferieren bis sie einen konfluenten Monolayer ausbilden. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgt die Koloniebildung von wenigstens vier Zellen. Die Zellen innerhalb der Kolonien weisen mehrere Zelllagen auf, in denen sich die zelluläre Morphologie und der Grad der Differenzierung unterscheiden. Ausgehend hiervon werden die Zelllagen in eine basale, intermediäre und obere Zone eingeteilt. Zellen mit noch vorhandenem Zellkern, dennoch terminal differenziert, verlieren ihre Adhärenz und schwimmen in das Nährmedium ab (Holbrook und Hennings, 1983). Kitahara und Ogawa (1994) beschreiben ihre aus der bovinen Klaue kultivierten Zellen als spindelförmig oder polygonal. Eine in Abwesenheit von Fibrozyten generierte Epidermis wies nach El-Ghalbzouri et al. (2002a) ausschließlich zwei bis drei lebende Zelllagen mit einem schmalen Stratum corneum auf. Innerhalb der Epidermis konnte die Basalschicht nicht von einem Stratum spinosum unterschieden werden.

2.4.6 Ultrastruktur der Keratinozyten in vitro

Die auf dem Untergrund, der Basalmembran, anheftenden in einer Zellschicht wachsenden Zellen werden von Watt (1988) als abgeflachte Basalzellen beschrieben. In der Ultrastruktur zeigen die Basalzellen einen zentralen ovalen heterochromatinreichen Zellkern mit einem Nukleolus. Die Zellkerne sind charakterisiert durch Einstülpungen der Oberfläche. Die Basalschicht der Keratinozytenreinkultur von Nebel (2004) war charakterisiert durch runde Zellen mit runden bis ovalen Zellkernen. Die mit Keratinfilamenten durchzogenen Basalzellen weisen zahlreiche Desmosomen auf. Bei der Kultivierung von epidermalen Keratinozyten auf Kollagen beschichteten Kulturgefäßen konnte Watt (1988) keine komplette Basalmembran beobachten. Auf Kollagengel kultivierte Keratinozyten zeigen die Ausbildung von Hemidesmosomen, die die Basalzellen mit der Basalmembran fest verankern. Zwischen den Zellen zeichnet sich ein deutlicher interzellulärer Spaltraum ab. Die Zellen weisen zahlreiche vor

allem an den Zellpolen anzutreffende Mitochondrien vom Crista-Typ, den Golgi-Apparat und endoplasmatisches Retikulum auf. Zwischen den im Zytoplasma längs verlaufenden Keratinfilamenten liegen zahlreiche Ribosomen und Polyribosomen. Im Zytoplasma der Basalzellen mehrschichtiger Kolonien können häufig sekundäre Lysosomen beobachtet werden (Holbrook und Hennings, 1983).

Die suprabasalen Zellen zeigen im Gegensatz zu den Zellen des Stratum spinosum in vivo nach Holbrook und Hennings (1983) eine flache Zellform mit länglichem Zellkern. Nebel (2004) beschreibt in der intermediären Zellschicht große Zellen mit längsovalen Zellkernen. Untereinander sind die mit Keratinfilamenten gefüllten Zellen durch Desmosomen verbunden und weisen desmosomalen Haftkitt auf (Nebel, 2004). Neben Mitochondrien und Golgi-Apparat werden ebenso Vakuolen und Glykogen beobachtet. Dabei werden nach Sun (1983) selten Keratohyalin granula sowie membrane coating granules ausgebildet. Ebenso werden im Stratum granulosum Keratohyalin granula beobachtet. Mit steigender Differenzierung nehmen die desmosomalen Verbindungen zwischen den Zellen des Stratum spinosum zu. Gleichzeitig kommt es zu einer Dickenzunahme nun längs und quer verlaufender Keratinfilamente (Mülling, 1993). In den Zellen der oberen Zellschichten findet ein Abbau der Zellorganellen statt, mit pyknotischen Zellkernen bis hin zu flachen Kernresten in den obersten Zellschichten (Mülling, 1993).

Kennzeichnend für die Übergangszellen zur Verhornung sind die cornified envelope, eine homogene elektronendichte Linie an der inneren Oberfläche der Zellmembran (Mülling, 1993). In der untersten Zellschicht des Stratum corneum werden die Desmosomen zwischen den Zellen abgebaut. Zum einen flachen die Zellen zunehmend ab und zum anderen zeigen diese eine große Masse an Keratin. Zellorganellen unterliegen degenerativen Veränderungen. Nach Hinterhuber et al. (2002) besteht das Stratum corneum einer organotypischen Kokultur aus kernlosen mit Keratinfilamenten gefüllten Keratinozyten. Nebel (2004) beobachtete in einem in vitro-Modell epidermaler Keratinozyten die Ausbildung gut differenzierter Zellkolonien aus bis zu 22 Zellschichten mit spezifischen morphologischen Merkmalen der Klauenepidermis. Die Zellschichten des Stratum corneum zeigen unterschiedlich stark verhornte Zellen, selten vollständig verhornte kernlose Zellen.

2.4.7 Vaskuläre Versorgung der Epidermis

Die Versorgung der stoffwechselaktiven Epidermis mit Sauerstoff und Nährstoffen erfolgt über ein komplexes Blutgefäßsystem in der Lederhaut via Diffusionsvorgänge (Maierl und Mülling, 2004). Gewährleistet wird diese Versorgung durch ein dermales Zu- und Ableitungssystem aus

Arterien und Venen sowie einem makrovaskulären Gefäßnetz, das sich wiederum in einen oberflächlichen (zwischen papillärer und retikulärer Dermis) und einen tiefen (zwischen Dermis und Subkutis) Plexus sowie dazwischen liegende Verbindungsgefäße unterteilen lässt. Vom oberflächlichen Plexus ziehen vertikale Kapillarschlingen bis in die Papillenspitzen der Dermis, die an die Epidermis reichen. Der subepidermal in der obersten Schicht der Dermis liegende Gefäßplexus besteht hauptsächlich aus Arteriolen, arteriellen und venösen Kapillaren sowie postkapillären Venolen. Eine geringe Blutflußgeschwindigkeit und Dünnwandigkeit der Gefäße erlauben eine Wechselwirkung zwischen dem Blut und dem gefäßauskleidenden Endothelgewebe. Die mikrovaskulären Endothelzellen der postkapillären Venolen spielen daher für die Gewebemöostase eine herausragende Rolle.

Die Struktur und Dichte des Gefäßsystems des Zehenendorgans ist in seiner Form einmalig (Hirschberg et al., 1999; Hirschberg et al., 2001). Die Angioarchitektur und Mikrozirkulation sind den mechanischen Belastungen, die auf die unterschiedlichen Regionen der bovinen Klaue einwirken, angepasst und übernehmen eine herausragende Rolle in der physiologischen Funktion der Klaue. Grundsätzlich sind die Blutgefäße für die Aufrechterhaltung der Homöostase und Funktion der Klauenhaut essentiell. An der dermo-epidermalen Grenze ist die Feinstruktur des Kapillarnetzes besonders dicht ausgeprägt. Die hornproduzierenden epidermalen Zellen sind hinsichtlich ihrer Versorgung mit Nährstoffen vollständig abhängig von dem pododermalen vaskulären System (Meyer, 2009). Dabei ist die Vaskularisation in den papillären Bereichen dichter als in den lamellären Bereichen. Störungen in der Mikrozirkulation führen zu Verhornungsstörungen und somit zur Beeinträchtigung von Struktur und Qualität des Horns. Die Interaktion zwischen Dermis und Epidermis spielt für die Funktionalität der Klaue eine besondere Bedeutung, da in diesem Bereich auftretende Ischämien pathologische Veränderungen zur Folge haben können (Hirschberg et al., 1999).

2.5 Zytokeratine zum Nachweis von Keratinozyten und Endothelzellen in vitro

Zytokeratine sind spezifische Intermediärfilamente der Epithelzellen, die ein stabiles dreidimensionales Zytoskelett bilden und das Hauptprodukt der Differenzierung darstellen. Die Zytokeratine lassen sich in saure Zytokeratine Typ A (9-10) sowie in neutral-basische Zytokeratine Typ B (1-8) einteilen (Fuchs, 1994; Utito et al., 2007). Jedes Epithel bildet ein aus Zytokeratinen gebildetes spezifisches Keratinpaar, das in der Regel während der Differenzierung exprimiert wird. Bestimmte Keratinpaare werden somit von einem bestimmten Epithel exprimiert und dienen als Marker für die Differenzierung des jeweiligen Epithels. Es wird vermutet, dass Epithelzellen ihre Keratingene modifizieren können. So konnte beobachtet

werden, dass kultivierte epidermale Keratinozyten nicht dieselben Zytokeratine exprimieren, die in vivo vorkommen (Ekfalck et al., 1991).

Spezifische Epithelien können mit einem Antikörper gegen ein einzelnes Zytokeratin detektiert werden. Da Zytokeratine charakteristische Bestandteile der Stützfilamente darstellen, erfolgt die immunzytochemische Anfärbung der Zellen intrazytoplasmatisch. In der vorliegenden Arbeit wurde daher für die Markierung der Endothelzellen der Antikörper gegen Zytokeratin 19 (CK19) und für die Markierung der Keratinozyten der Antikörper gegen Zytokeratin 14 (CK14) verwendet. Entsprechend ihres Molekulargewichtes gehört CK19 zu den niedrigmolekularen Zytokeratinen. CK 19 wird in einer Vielzahl von einfachen Epithelzelltypen dargestellt und dient dem Nachweis von Zellen besonders kleiner Blutgefäße (Bader et al., 1988). Wie für andere Zytokeratine gilt auch für CK19, dass es selten in Zellen nicht epithelialen Ursprungs gefunden wird (Moll, 1993; Moll, 1998). Zytokeratin 14 wird in den Basalzellen der gesunden bovinen Klauenepidermis exprimiert (Hendry et al, 2001). In den differenzierten suprabasalen Zellen wird somit die Genexpression für CK14 herunter reguliert (El-Ghalbzouri et al., 2002b). Im Gegensatz dazu konnte CK14 insbesondere bei pathologischen Veränderungen der Rinderklaue, beispielsweise einem Sohlengeschwür, sowohl in den Basalzellen als auch in den suprabasalen Zellen nachgewiesen werden (Hendry et al, 2001). Ebenso beschreiben Hinterhuber et al. (2002) in der organotypischen Kokultur eine Expression von CK14 in Basalzellen und suprabasalen Zelllagen.

2.6 Regulierung der Angiogenese

Die Angiogenese wird durch ein Ungleichgewicht zwischen löslichen stimulierenden pro- und inhibierenden antiangiogenen Faktoren reguliert. Der Ruhezustand der Endothelzellen wird daher vermutlich durch endogene antiangiogene Faktoren aufrechterhalten. Dominieren im Gegenzug proangiogene Faktoren, erfolgt eine Aktivierung von Endothelzellen. Sie wirken auf dem para- oder autokrinen Regulationsweg auf die Endothelzellen (Ghahary und Ghaffari, 2007). Diese Faktoren können direkt auf Endothelzellen wirken oder indirekt über die primäre Aktivierung anderer benachbarter Zellen, die anschließend ihrerseits stimulierende oder inhibierende Faktoren freisetzen. Reize wie Hypoxie, ein niedriger pH-Wert oder inflammatorische Prozesse führen zur Freisetzung proangiogener Faktoren und können damit zur Aktivierung der Angiogenese führen (Simon, 2007).

Für die vorliegende Arbeit spielen Wachstumsfaktoren eine untergeordnete Rolle. Da VEGF jedoch anscheinend in der Interaktion zwischen dermalen Endothelzellen und epidermalen Keratinozyten von herausragender Bedeutung ist, wurde VEGF in den hier durchgeführten

Studien ausschließlich für die Anzucht von Endothelzellen in Monokultur zum Nährmedium supplementiert. Im Folgenden wird der angiogene Wachstumsfaktor VEGF näher beschrieben.

2.6.1 Angiogene Faktoren

2.6.1.1 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF ist ein heparinbindendes dimerisches Glykoprotein (40-45 kD) und stimuliert als Mitogen nicht nur das Gefäßwachstum (Detmar et al., 1995; Ferrara, 2004), die Proliferation und die Migration von Endothelzellen, sondern erhöht auch die kapilläre Gefäßpermeabilität und Dilatation im Rahmen der physiologischen und pathologischen Angiogenese in vivo (Barrientos et al., 2008). Auch in der Vaskulogenese ist VEGF ein wichtiger Induktor und Regulator (Poole et al., 2001). VEGF wird von endothelialen und nicht-endothelialen Zellen wie Keratinozyten und dermalen Fibroblasten gebildet und sezerniert (Ballaun et al., 1995; Szpaderska et al., 2005).

Die Stimulation und Regulation der Expression erfolgt durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren. Der am stärksten wirkende Modulator der Expression von VEGF in vivo ist die Hypoxie des Gewebes, die ausgelöst wird durch eine nicht ausreichende oder fehlende Durchblutung. Durch die entstandene Hypoxie vermitteln molekulare Signale die Expression und Sekretion von angiogenen Faktoren (Germain et al., 2010). VEGF reguliert Prozesse erhöhter Angiogenese bei der Bildung des embryonalen Gefäßsystems und im adulten Organismus, während des weiblichen Reproduktionszyklus und in der Wundheilung (Harper und Bates, 2008; Kumar et al., 2009; Beindorff et al., 2010).

2.7 VEGF in der Interaktion zwischen Endothelzellen und Keratinozyten

Der Wundheilungsprozess in der Haut ist ein hervorragendes Beispiel für die Interaktion zwischen Endothelzellen und Keratinozyten, die auf einem komplexen Zusammenspiel zwischen biochemischen Mediatoren und Wachstumsfaktoren basiert (Grazul-Bilska et al., 2003). Im Vordergrund der Wundheilung steht die Angiogenese, die neben Endothelzellen und Keratinozyten auch dermale Fibrozyten, lösliche Faktoren und Komponenten der extrazellulären Matrix mit einbezieht. Wachstumsfaktoren regulieren und koordinieren eine Vielzahl der Abläufe des Heilungsprozesses. Eine verminderte oder ausbleibende Sekretion an Wachstumsfaktoren kann eine Ursache für Wundheilungsstörungen und chronische beziehungsweise schlecht heilende Wunden sein (Singer und Clark, 1999; Debus et al., 2000; Debus et al., 2001; Carter, 2003)

Angiogene Stimuli leiten eine schnelle Aktivierung des Endothels ein und induzieren im Rahmen der angiogenen Kaskade die Proliferation und Migration von Endothelzellen (Yancopoulos et al., 2000; Bhushan et al, 2002). Wie bereits erwähnt findet in der Haut eine zyklische Angiogenese und Antiangiogenese statt (Yano et al., 2001). Ebenso werden pathophysiologische Prozesse, wie die Wundheilung in der Haut, unter anderem durch VEGF reguliert (Frank et al., 1995; Detmar, 2000; Bao et al., 2009). VEGF wird in der Literatur als einer der mutmaßlich wichtigsten angiogenen Faktoren in der Regulation der dermalen Angiogenese beschrieben und wird nachweislich von aktivierten epidermalen Keratinozyten exprimiert und sezerniert (Rossiter et al., 2004; Canavese et al., 2010).

Im gesunden Gewebe ist die Produktion an VEGF moderat. Mit Ausnahme des Stratum corneum ist VEGF in allen Schichten der Epidermis nachweisbar. Während der Wundheilung wird VEGF in hohem Maße von proliferierenden epidermalen Keratinozyten gebildet (Weninger et al., 1996; Wilgus et al., 2005). Die Keratinozyten ihrerseits werden während der frühen Phase der Wundheilung durch Zytokine zur VEGF-Genexpression und Sekretion stimuliert (Brown et al., 1997; Kumar et al, 2009). Ebenso führt Hypoxie direkt zu einem Anstieg der VEGF-Genexpression in epidermalen Keratinozyten, dermalen Fibroblasten und dermalen Endothelzellen (Detmar et al., 1997; Lee et al., 2009). VEGF induziert die Angiogenese zum einen über den parakrinen Regulationsweg, nämlich durch die Bindung an Endothelzellen in der Dermis und aktiviert zum anderen über die autokrine Regulation die epidermale Proliferation.

Studien belegen, dass eine Korrelation zwischen der Produktion und Sekretion von VEGF und der epidermalen Zelldifferenzierung besteht. Mit steigendem Differenzierungsgrad und sinkender Proliferationsrate sinkt der Anteil an sezerniertem VEGF (Viac, et al., 1997; Man et al., 2008). Das heißt, je höher der Grad an Differenzierung, desto höher der Anteil an zellgebundenem VEGF.

Die dermale Angiogenese reguliert die Entwicklung und Funktion der bovinen Klaue. Sie spielt nach neueren Erkenntnissen auch in der Pathogenese von Klauenerkrankungen eine herausragende Rolle, z.B. im Rahmen des Klauenrehe-Komplexes (Hirschberg et al., 1999; Hirschberg et al., 2001). Bis heute ist die Pathogenese der subakuten Klauenrehe unklar. Es wird vermutet, dass eine Veränderung in der pododermalen Mikrozirkulation eine sekundäre Beeinträchtigung in der Keratinisierung der epidermalen Keratinozyten zur Folge hat (Mülling und Budras, 2002a, Bragulla und Hirschberg, 2003).

2.8 In vitro-Hautkulturmodelle

Organotypische in vitro-Systeme bieten die Möglichkeit der Grundlagenforschung, um die regulatorischen Mechanismen der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen von Endothel und Epidermis zu untersuchen. Die Vaskularisation des Gewebes stellt als limitierender Faktor dabei eine besondere Herausforderung dar. Darauf stützend wurden mikrovaskuläre Endothelzellen bei der Konstruktion von Hautersatz in die Kokultivierung mit einbezogen (Baum und Arpey, 2005). Die Kultivierung des Haut-Modells in vitro erfolgt nach physiologischen und anatomischen Gesichtspunkten. Der Aufbau des dermalen Anteils erfolgt aus dermalen Fibroblasten und mikrovaskulären Endothelzellen, die in eine Matrix aus gewebetypischen Matrixproteinen eingefügt werden. Die Zusammensetzung und Struktur der verwendeten Matrix und die Wechselwirkung zwischen den Zellen beziehungsweise zwischen den Zellen und der umgebenden Matrix hat wesentlichen Einfluss auf die Funktion des generierenden Gewebes. Der Dermalteil bildet die Grundlage für die darauf ausgesäten epidermalen Keratinozyten, die wiederum den epidermalen Anteil bilden. Zwischen dermalen und epidermalen Anteilen des Modells findet eine Wechselwirkung zwischen den Zelltypen statt, die für die Proliferation und Migration der Zellen, die Synthese von Wachstumsfaktoren und Matrixproteinen sowie die Ausbildung Kapillar-ähnlicher Strukturen in vitro verantwortlich ist. In Kokulturen von Keratinozyten, Endothelzellen und Fibroblasten können Kapillar-ähnliche Strukturen im Rahmen der in vitro-Angiogenese generiert werden (Supp et al., 2000; Hudon et al., 2003; Schechner et al., 2003; Tonello et al., 2005; Tremblay et al., 2005).

2.8.1 Kokultivierung von Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten im dreidimensionalen in vitro-Modell

In den folgenden Studien wurde die angiogene Potenz von Endothelzellen genutzt, um die Vaskularisation eines in vitro generierten Haut-Äquivalents zu beschleunigen (Ferretti et al., 2003).

Supp et al. (2002b) untersuchten die Kokultivierung von epidermalen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten mit mikrovaskulären Endothelzellen in einem Haut-Modell in vitro. Der Dermalteil des Haut-Äquivalents wurde gebildet, indem dermale Fibroblasten in einem Verhältnis 1:1 mit mikrovaskulären Endothelzellen in ein Kollagen-Glykosaminoglykan-Biopolymer gesät wurden. Das Kulturmedium wurde mit dem Wachstumsfaktor VEGF supplementiert. Nach 24 Stunden wurden epidermale Keratinozyten auf den Dermalteil aufgebracht. Die Kultivierung des Haut-Äquivalents erfolgte drei Tage im Medium. Hierauf fand die weitere Kultivierung für 16 Tage an der Luft-Medium-Grenze statt. Dem Medium wurde

hierbei kein Wachstumsfaktor mehr zugefügt. Lichtmikroskopische Untersuchungen an histologischen Schnitten zeigten ein dermales und epidermales Kompartiment. Die generierte Epidermis bestand aus wenigen gewebespezifisch differenzierten Zellschichten. Aus Endothelzellen gebildete ringförmige Aggregate und Kolonien wurden im Bereich der dermo-epidermalen Zone dargestellt. Diese Beobachtung konnte mit einer positiven Markierung von Endothelzellen durch einen humanen Antikörper gegen CD31 bestätigt werden. Eine Woche nach Transplantation auf die quergestreifte Muskulatur der lateralen Bauchwand von Mäusen wurden humane Endothelzellen des Haut-Äquivalents und murine Endothelzellen mittels spezifischer Antikörper gegen CD31 positiv markiert. Sowohl im Bereich der dermo-epidermalen Zone als auch in den tieferen Schichten des Dermalteils wurden Kolonien und kreisförmige Aggregate aus humanen Endothelzellen beobachtet. Murine Endothelzellen wanderten in das Haut-Äquivalent hinein und wurden in den tieferen Schichten des Dermalteils markiert. Ab der zweiten Woche nach Transplantation konnten vereinzelt kreisförmige und lineare Strukturen aus Endothelzellen innerhalb des Dermalteils vergesellschaftet mit murinen Endothelzellen immunhistochemisch positiv markiert werden. Durch die Aktivierung der Angiogenese *in vitro* konnte in dieser Studie der Zeitfaktor bis zur Vaskularisation des Haut-Äquivalents nach Transplantation verringert werden.

In einem ähnlichen Modell wurden Fibroblasten mit genetisch modifizierten Keratinozyten, die ein Übermaß an VEGF exprimierten, kokultiviert (Supp et al., 2002a). Nach Generierung eines Haut-Äquivalents aus einem dermalen und epidermalen Kompartiment *in vitro*, wurde der Hautersatz auf die quergestreifte Muskulatur der lateralen Bauchwand von Mäusen transplantiert. Dieses Modell wurde zur Analyse und Ermittlung des Effekts von Keratinozyten und dem von ihnen sezernierten Wachstumsfaktor VEGF auf das Wachstum von mikrovaskulären Endothelzellen eingesetzt. Durch den chemotaktischen Effekt von VEGF auf Endothelzellen bildeten die aus dem Wundareal in das Haut-Äquivalent einwandernden murinen Endothelzellen durch lineare Aneinanderreihung bedingte Kapillar-ähnliche Strukturen unmittelbar an der dermo-epidermalen Zone. Mittels immunhistochemischer Markierung mit einem Primärantikörper gegen PECAM-1 wurden die organisierten Endothelzellen markiert. Im zeitlichen Verlauf von zwei bis vier Wochen wurden die Kapillar-ähnlichen Strukturen zahlreicher und größer und waren innerhalb des gesamten dermalen Anteils des Haut-Äquivalents darstellbar. Aus dieser Studie schlussfolgerten Supp et al. (2002a), dass der sezernierte proangiogene Faktor VEGF über die dermo-epidermale Barriere hinweg

chemotaktisch das Einwandern der murinen Endothelzellen aus dem Wundareal und die Bildung angiogener Strukturen aus murinen Endothelzellen im Haut-Äquivalent einleitete.

Ein Biopolymer aus Kollagen-Glykosaminoglykan wurde als Trägerstruktur für die Entwicklung eines dreidimensionalen Modells verwendet, in dem die Kokultivierung von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC), dermalen Fibroblasten und epidermalen Keratinozyten möglich ist (Black et al., 1998; Black et al., 1999). Die Struktur des Biopolymers ermöglicht eine dreidimensionale Migration der Zellen. Es wurde ein aus Endothelzellen und Fibroblasten bestehendes dermales Äquivalent geschaffen, auf das anschließend Keratinozyten als epidermale Komponente gesät wurden. Endothelzellen und Fibroblasten wurden in einem Verhältnis 1:1 auf das Biopolymer gesät und anschließend 10 Tage lang kultiviert. Hierauf erfolgte das Einsäen der epidermalen Keratinozyten. Nach 7 Tagen Kultivierung im Medium wurde das Haut-Äquivalent für 14 Tage an der Luft-Medium-Grenze generiert.

Innerhalb des Biopolymers proliferierten die Fibroblasten und sezernierten Proteine der extrazellulären Matrix. Endothelzellen migrierten in die neu synthetisierte Matrix und bildeten Kapillar-ähnliche Strukturen. Auf die Supplementierung von proangiogenen Faktoren zum Medium wurde in diesem Modell verzichtet. Nach einer Kultivierungsperiode von 31 Tagen ließ die lichtmikroskopische Darstellung die Ausbildung Kapillar-ähnlicher Strukturen erkennen. Komponenten einer Basalmembran wie Laminin und Kollagen Typ IV wurden entlang der tubulären Strukturen und der dermo-epidermalen Zone in immunhistochemischen Untersuchungen positiv markiert. Neben den proangiogenen Eigenschaften der Fibroblasten exprimierten vor allem Keratinozyten den proangiogenen Wachstumsfaktor VEGF. Die Synthese und Sekretion von VEGF durch Keratinozyten sind während einer gesteigerten Proliferationsrate erhöht. Dieser Vorgang konnte sowohl im Prozess der Wundheilung (Frank et al., 1995) als auch unter Kulturbedingungen *in vitro* beobachtet werden (Ballaun et al., 1995). Keratinozyten differenzierten und bildeten eine mehrschichtige Epidermis bestehend aus einem Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum.

Black et al. (1998) führten die Bildung Kapillar-ähnlicher Strukturen ohne zusätzliche Inkubation angiogener Faktoren auf die direkte zelluläre Interaktion zwischen Endothelzellen und Fibroblasten, die von Fibroblasten gebildeten Komponenten der extrazellulären Matrix und die Sekretion von angiogenen Faktoren innerhalb des Äquivalents zurück. Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten ringförmige und lineare Strukturen aus Endothelzellen innerhalb des dermalen Kompartiments. Durch interzelluläre Kontakte bildeten Endothelzellen Kapillar-ähnliche Strukturen mit Lumen aus. Innerhalb des Lumens waren zelluläre Ablagerungen zu

erkennen. In der elektronenmikroskopischen Darstellung konnten zur Identifizierung der Endothelzellen intrazelluläre Weibel-Palade-Körperchen herangezogen werden. Durch Kultivierung des Äquivalents an der Luft-Medium-Grenze kam es zur Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels.

Ein Biopolymer aus Kollagen, Glykosaminoglykan und Chitosan diente Tremplay et al. (2005) als Grundgerüst für das Haut-Äquivalent. Fibroblasten und humane Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) wurden in einem Verhältnis 1:1 auf das Biopolymer gesät und über einen Zeitraum von 10 Tagen kokultiviert. Die *in vitro* rekonstruierte dermale Komponente wurde mit Keratinozyten, die die epidermale Komponente repräsentieren, für 7 Tage kokultiviert (Black et al., 1998; Hudon et al., 2003). Um die Ausbildung einer differenzierten Epidermis zu fördern, wurde anschließend das Haut-Äquivalent für 14 Tage an der Luft-Medium-Grenze kultiviert. Anschließend erfolgte die Transplantation der Proben auf die dorsale Muskulatur von Mäusen. Bereits vor der Transplantation konnte die Ausbildung Kapillar-ähnlicher Strukturen innerhalb des dermalen Kompartiments und einer mehrschichtigen Epidermis anhand von histologischen Untersuchungen beobachtet werden. Vier Tage nach Transplantation waren die Kapillar-ähnlichen Strukturen innerhalb des rekonstruierten dermalen Anteils unmittelbar unterhalb des epidermalen Anteils stabil. Diese Kapillar-ähnlichen Strukturen wurden mit einem Antikörper gegen Von-Willebrand-Faktor zur Markierung von humanen Endothelzellen positiv dargestellt. Es wurden des Weiteren vereinzelt rote Blutzellen innerhalb der Kapillar-ähnlichen Strukturen entdeckt, die durch einen spezifischen Antikörper gegen murine Blutzellen markiert wurden, was auf ein Einwandern von Blutzellen aus dem Wundareal schließen lässt. Nach 14 Tagen zeigten sich mittels eines konfokalen Mikroskops Kapillar-ähnliche Strukturen aus benachbarten humanen und murinen Endothelzellen. Murine Endothelzellen wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen PECAM-1 markiert. Die Darstellung muriner roter Blutzellen im Lumen der aus humanen Endothelzellen organisierten Kapillar-ähnlichen Strukturen resultiert aus der Anastomose von Kapillar-ähnlichen Strukturen des *in vitro* rekonstruierten Haut-Äquivalents mit den Strukturen des Wundbettes, ein Prozess, der als Inosculation bezeichnet wird.

Aufgrund von immunologischen Reaktionen bei der Verwendung von bovinem Kollagen *in vivo* nutzten Tonello et al. (2005) ein Biopolymer aus modifizierter Hyaluronsäure (HYAFF-11) als dreidimensionale Trägerstruktur, welches ein einfaches Handling ermöglichte. Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten wurden aus Hautbiopsien von adulten gesunden Patienten

isoliert. Keratinozyten und dermale Fibroblasten wurden mittels einer modifizierten Methode nach dem Protokoll von Rheinwald und Green (1975) kultiviert. Im ersten Schritt der Kultivierung wurden Fibroblasten über einen Zeitraum von 7 Tagen in dem Biopolymer kultiviert. Der Wachstumsfaktor basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) wurde dem Medium zugegeben. Endothelzellen wurden anschließend auf das Biopolymer gesät und 10 Tage lang im spezifischen Medium zusammen mit den Fibroblasten bis zur Bildung eines dermalen Äquivalents kokultiviert (Tonello et al., 2003). Die Fibroblasten produzierten und sezernierten unter diesen Kultivierungsbedingungen Komponenten der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Kollagen Typ I, III, IV, Laminin und Fibronectin, die zur Proliferation der Endothelzellen und Reorganisation von Kapillar-ähnlichen Strukturen aus Endothelzellen notwendig sind (Zacchi et al., 1998; Scherberich und Beretz, 2000). Im letzten Schritt wurden Keratinozyten auf die Kokultur aufgebracht. Nach einem Zeitraum von einer Woche wurde die epidermale Oberfläche des Haut-Äquivalents an der Luft-Medium-Grenze über 21 Tage kultiviert („air-liquid-interface“). Anhand histologischer Untersuchungen war eine deutliche räumliche Trennung zwischen dem dermalen und dem epidermalen Anteil des Äquivalents zu erkennen. Nach 21 Tagen in Kultur bildete sich eine mehrschichtige gewebespezifische Epidermis bestehend aus einer Basalschicht, einer Schicht superfizialer Zellen und einer abschließenden verhornenden Zellschicht aus. Mit der immunhistochemischen Markierung mit Antikörpern gegen Kollagen VII und Laminin konnte die Bildung einer Basalmembran-ähnlichen Struktur nachgewiesen werden, die die dermale von der epidermalen Komponente des Äquivalents trennte. Die Endothelzellen infiltrierten das dreidimensionale Gerüst des Biopolymers entlang der synthetisierten extrazellulären Matrix und bildeten nach 21 Tagen ringförmige Strukturen mit einem Lumen aus. Die Vertreter der Komponenten der extrazellulären Matrix (Kollagen IV, VII und Laminin) wurden einerseits entlang der tubulären Strukturen und andererseits entlang der dermo-epidermalen Zone entdeckt. Neben der von Fibroblasten gebildeten Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen I, III, IV, VII und Laminin (Tonello et al., 2003), stimuliert vor allem der von Keratinozyten produzierte angiogene Wachstumsfaktor VEGF die Proliferation und Reorganisation der Endothelzellen in Kapillar-ähnliche Strukturen (Trompezinski et al., 2004).

Zur Ermittlung des Einflusses von Biopolymeren und ihrer Dreidimensionalität auf die Vitalität und Proliferations- und Organisationsverhalten von Zellen *in vitro*, wurden Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten gemeinsam auf der Oberfläche eines synthetisch hergestellten Biopolymers kokultiviert (Sun et al., 2005). Für die Untersuchungen wurden die Biopolymere in

Vertiefungen von 6-Lochplatten eingesetzt. Auf deren Oberfläche wurden anschließend aus rostfreiem Stahl angefertigte Ringe mit einem Durchmesser von 1 cm platziert. Innerhalb des Rings wurden die Zellen ausgesät und über 18 Stunden in Medium, das ohne Serum oder mit Serum angereichert wurde, kultiviert. Anschließend erfolgte die weitere Kultivierung für 14 Tage an der Luft-Medium-Grenze. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die in Serum kultivierten Zellen in horizontaler Richtung weiter ausbreiteten als die ohne Serum kokultivierten Zellen. Dennoch war die zu beobachtende Vitalität der Zellen in beiden Proben annähernd gleich. Keratinozyten bildeten eine spezifische mehrschichtige Epidermis aus, während Endothelzellen und Fibroblasten innerhalb des Biopolymers migrierten. Unter diesen Kultivierungsbedingungen formten Endothelzellen keine Kapillar-ähnlichen Strukturen aus.

2.8.2 Kokulturen in Filtereinsätzen

In diesem Abschnitt steht die Kultivierung von Kokulturen in unterschiedlichen Filtereinsätzen im Vordergrund. Diese Filtereinsätze trennen die Vertiefungen der Kulturplatten in eine untere und obere Kammer. Hiermit ist eine direkte und indirekte Kokultivierung möglich.

Die Struktur der Filtereinsätze entspricht der Form eines Zylinders und passt sich optimal in die Vertiefungen der Gewebekulturplatten ein. Durch seitliche Fortsätze an den Seitenwänden einiger Filtereinsätze (Transwell-Filtereinsätze, Fa. Costar Corning, Fernwald, Germany) wird eine optimale Positionierung in der Vertiefung der Kulturplatten gewährleistet. Gleichzeitig wird hiermit ein bestimmter Abstand zum Boden der Vertiefung eingehalten. Andere Filtereinsätze (Millicell[®]-Filtereinsätze, Millipore GmbH, Schwalbach, Germany) sind an der Unterseite mit Stützen versehen, wodurch wiederum ein definierter Abstand zwischen Filtereinsatz und Kulturplatte besteht. Der Boden der Filtereinsätze wird durch eine Membran gebildet. Diese Membran ist mit unterschiedlicher Porengröße und aus unterschiedlichem Material bestehend einsetzbar.

2.8.2.1 Kokultivierung von Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten in Filtereinsätzen

Reichl und Müller-Goymann (2001) kultivierten ein organotypisches Kornea-Konstrukt in vitro aus porcinen Zellen. Der Versuchsaufbau erfolgte in Transwell[®]-Filtereinsätzen (Costar, Fernwald). Die Filter der Einsätze, bestehend aus Polycarbonat, wurden im ersten Schritt mit einem azellulären Kollagengel beschichtet. Hierauf wurden anschließend Endothelzellen gesät. Nach Ausbildung eines Monolayers wurde mit einem Kollagengel, das Fibroblasten enthielt, überbeschichtet. Die Kultivierung erfolgte submers, indem die Kultur vollständig mit Medium

bedeckt wurde. Korneale Epithelzellen wurden im letzten Schritt auf die Oberfläche des Kollagengels gesät. Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurde der Transwell®-Filtereinsatz aus der Vertiefung der Zellkulturplatte angehoben und das Konstrukt 14 Tage an der Luft-Medium-Grenze kultiviert, bis es zur Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels kam. Mit spezifischen Markern konnten die drei eingesetzten kornealen Zelltypen identifiziert werden. Immunzytochemisch wurden einerseits Epithelzellen mit einem Antikörper gegen Zytokeratine und andererseits Endothelzellen und Fibroblasten mit einem Antikörper gegen Vimentin markiert. Es bildete sich ein dreidimensionales organotypisches Kornea-Äquivalent. Dieses Kornea-Modell wurde zur Untersuchung von Permeationsbarriereigenschaften in der Augenheilkunde verwendet (Reichl und Goymann 2003; Reichl et al., 2004; Tegtmeyer et al., 2004).

In einem ähnlichen Modell kokultivierten Martins-Green et al. (2005) Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten in Transwell®-Filtereinsätzen (Costar, Fernwald). Im ersten Schritt wurden Fibroblasten in einer Kollagenlösung in die Filtereinsätze eingesät. Nach Polymerisation des Kollagens wurden humane mikrovaskuläre Endothelzellen auf die Oberfläche des Gels gesät. Nachdem die Endothelzellen adhärent waren, wurde das Medium abgesaugt und eine zweite Schicht einer Kollagenlösung mit Fibroblasten auf die Endothelzellen gesät. Im letzten Schritt folgte das Einsäen von Keratinozyten. Es wurde jeweils in die obere und untere Kammer des Filtereinsatzes ein zellspezifisches Medium gegeben. Letztlich erfolgte die weitere Kultivierung der Keratinozyten an der Luft-Medium-Grenze. Die immunhistochemische Markierung von Kollagen Typ IV an histologischen Schnitten erwies die Ausbildung einer Basalmembran-ähnlichen Struktur an der dermo-epidermalen Zone. Mittels spezifischer Antikörper konnten Keratinozyten unterschiedlicher Differenzierungsstufen dargestellt werden. Zytokeratin 14 wurde, ähnlich der Gegebenheit in vivo, von Keratinozyten der Basalschicht exprimiert. Zytokeratin 16, das in vivo während der Hyperproliferation und in der Wundheilung von aktivierten Keratinozyten in allen Schichten der Epidermis exprimiert wird, wurde hier ausschließlich von den superfizialen Zellen exprimiert. Mittels Phasenkontrastmikroskopie wurde ein endotheliales Netzwerk von Kapillar-ähnlichen Strukturen beobachtet. Dieses wurde mit einem Antikörper gegen PECAM-1 positiv markiert.

Ponec et al. (2004) untersuchten die Bildung Kapillar-ähnlicher Strukturen aus humanen dermalen Endothelzellen (hDMVEC) unter standardisierten Bedingungen in vitro. Hierfür rekonstruierte die Arbeitsgruppe ein Haut-Äquivalent im indirekten dreidimensionalen Modell mit

epidermalem und dermalem Kompartiment in serumfreiem Medium. Die unterschiedlichen Zelltypen wurden aus Hautbiopsien isoliert. Die Transwell®-Filtereinsätze wurden mit der Unterseite nach oben in die Vertiefungen der Kulturplatten gebracht. Eine Suspension aus Human Dermal Microvascular Endothelial Cells (hDMVEC) und Fibroblasten wurde hierauf gesät und über 2 Stunden lang bis zur Adhärenz kultiviert. Anschließend wurde der Filtereinsatz mit der Unterseite nach unten wieder in die Vertiefung eingesetzt. Keratinozyten wurden auf die Oberfläche der Filtermembran eingesät und 9 Tage lang in Medium kultiviert. Eine dreiwöchige Kultivierungsperiode erfolgte an der Luft-Medium-Grenze. Das Kultivierungsmedium wurde mit VEGF und bFGF angereichert. Mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops konnte ein dreidimensionales Netzwerk aus Kapillar-ähnlichen Strukturen beobachtet werden. Endothelzellen wurden mit einem Antikörper gegen von-Willebrand-Faktor (vWF) im gesamten dermalen Anteil des Äquivalents positiv markiert. Die generierte Epidermis bestand aus 6 bis 10 Zelllagen (Ponec et al., 2002; Ponec, 2002). In den suprabasalen Schichten zeigte sich eine positive Markierung differenzierender Keratinozyten gegen Zytokeratin 10, ähnlich in vivo. Zellen der Basalschicht wurden mit dem Antikörper gegen Zytokeratin 15 positiv markiert.

3 Material

3.1 Zellen

Für alle Kokulturen dieser Arbeit wurden mikrovaskuläre Endothelzellen und epidermale Keratinozyten tierischen Ursprungs verwendet. Endothelzellen kleiden das gesamte Blutgefäßsystem aus und bilden dabei mit dem subendothelialen Bindegewebe die Tunica interna. Die Kapillaren der Endstrombahn bestehen aus den Endothelzellen und einer Basalmembran. Die Keratinozyten hingegen sind Zellen des äußersten Kompartiments der Haut, der Epidermis, einem mehrschichtig verhornten Plattenepithel, das über die Basalmembran mit der Dermis verankert ist. Endothelzellen und Keratinozyten sind somit Epithelzellen völlig unterschiedlicher Herkunft und kontaktieren physiologischerweise nicht direkt miteinander. Zur Unterscheidung beider Zelltypen in den Kokulturen wurde jeweils ein Antikörper gegen ein Zytokeratin verwendet, da Zytokeratine für Epithelien in einem spezifischen Muster erscheinen und daher als zuverlässige Marker für deren Differenzierung dienen (Kitahara und Ogawa, 1994; Tomlinson et al., 2004).

Alle Untersuchungen dieser Arbeit, die im Kapitel 3 beschrieben werden, wurden in drei Ansätzen wiederholt.

3.1.1 Endothelzellen

Die in den Kokulturen eingesetzten mikrovaskulären Endothelzellen stammen aus dem bovinen Corpus luteum im Stadium der Anbildung. Die Zellen wurden bereits im Rahmen anderer Arbeiten in der Forschungsgruppe um Plendl identifiziert und untersucht (Plendl, 1997; Budde, 1999; Fuchs-Schönleber, 1999; Schuster, 2002; Bahramsoltani, 2003; Lienau, 2003; Kässmeyer, 2006). Die Identifizierung der Endothelzellen erfolgte anhand der in vitro-Aufnahme von acetyliertem Low Density Lipoprotein (acLDL), der immunhistochemischen Lokalisation des von Willebrand-Faktors (vWF) und des Nachweises der zellulären Bindung des Bandeiraea simplicifolia Agglutinin I (BS-I). Im Rahmen dieser Arbeit wurden mikrovaskuläre Endothelzellen der Passage 9 verwendet. Zur Identifizierung der mikrovaskulären Endothelzellen in den direkten Kokulturen wurde ein Antikörper gegen Zytokeratin 19 (CK19) eingesetzt.

3.1.2 Keratinozyten

Die für diese Arbeit verwendeten Keratinozyten wurden in der Arbeitsgruppe um Mülling aus der Epidermis von Klauen geschlachteter Rinder isoliert (Nebel, 2005; Hoffmann, 2006). Für die Charakterisierung der isolierten Zellen wurden im Rahmen eines ELISA monoklonale Antikörper gegen saure/basische Zytokeratine AE1 und AE3 verwendet. Die Kreuzreaktion der Antikörper

gegen diese Zytokeratine mit Zellen der bovinen Klauenepidermis wurde bereits in den Untersuchungen von Nebel (2005) beschrieben. Für die verschiedenen Untersuchungen in dieser Arbeit wurden Keratinozyten der Passage 4 verwendet. Der Einsatz des primären Antikörpers gegen Zytokeratin 14 (CK14) diente der Identifikation von basalen Keratinozyten in allen direkten Kokulturen.

3.2 Kulturmedien

Für die Anzucht der beiden Zellarten in Monokultur wurden entsprechend den speziellen Anforderungen der jeweiligen Epithelzelltypen zwei unterschiedliche Kulturmedien eingesetzt. Die Kultivierung der Endothelzellen in Monokultur erfolgte in dem Selektivmedium P₀ während für die Kultivierung der Keratinozyten das Selektivmedium Quantum 286 (PAA Laboratories, Cölbe) gewählt wurde. Für die Kokulturen hingegen wurde schließlich ein Kulturmedium eingesetzt, das für die Ernährung beider Epithelzelltypen gleichermaßen geeignet war. Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM (Fa. Sigma, Taufkirchen), ist ein kommerziell erhältliches Medium, mit Glukose, L-Glutamin und Natriumbikarbonat, dem 10 % fetales bovines Serum (FBS) (Fa. Sigma, Taufkirchen) und 2 % Kanamycin (5 mg/ml, Fa. Biochrom, Berlin) zugesetzt wurde. Im Folgenden wird das für die Kokulturen verwendete Nährmedium als DMEM+ bezeichnet.

3.2.1 Medien, Medienzusätze und Lösungen

Lösungen	Hersteller
Bacto Gelatine	Difco Laboratories, Detroit, USA
BME-Vitamine	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Collagen G	Biochrom AG, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	ICN Biomedicals, Eschwege
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)	Schubert & Weiss GmbH, München

Fetales Bovines Serum (FBS)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Heparin-Lösung (0,25 %)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Kanamycin 2 %	Biochrom AG, Berlin
L-Glutamin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom AG, Berlin
Nährmedium Quantum 286 (U15-818)	PAA Laboratories, Cölbe
S180-konditioniertes Medium	siehe unten
Trypanblaulösung	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

S180-konditioniertes Medium

Murine Sarkomzellen (zur Verfügung gestellt von Prof. R. Auerbach, University of Wisconsin, Madison/USA) wurden bis zum Farbumschlag in DMEM+ kultiviert. Nach dem Absaugen wurde das Medium 5 min bei 1050 U zentrifugiert und der Überstand mit speziellen Filtern (0,2 µm) steril filtriert. Das so gewonnene konditionierte Medium wurde anschließend bis zur Verwendung bei -20°C tiefgefroren.

3.2.2 Verwendete Nährmedien

Zellkultur	Kulturmedium
Endothelzellen	P ₀
Keratinocyten	Quantum 286
Kokulturen	DMEM+

3.2.3 Zusammensetzung des Selektivmediums P₀

Komponente	Menge
BME-Vitamine	0,5 ml
Heparin-Lösung (0,25 %)	0,5 ml
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS; 2,5 mg/ml)	1,0 ml
Fetales Bovines Serum (FBS)	5,0 ml
S180-konditioniertes Medium	10,0 ml
DMEM+	ad 50 ml

3.2.4 Zusammensetzung des Selektivmediums Quantum 286 (PAA Laboratories, Cölbe)

Komponente	Menge
Kanamycin 2 %	1,0 ml
Quantum 286	ad 50 ml

3.2.5 Zusammensetzung des Erhaltungsmediums DMEM+

Komponente	Menge
L-Glutamin	0,5 ml
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	0,5 ml
Fetales Bovines Serum (FBS)	5,0 ml
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	ad 50 ml

3.3 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Deckgläser, rund (Ø 12 mm)	Carl Roth, Karlsruhe
Einwegskalpell	Lehnecke, Schortens
Kanülen	Lehnecke, Schortens
Gewebekulturröhrchen 5 ml	Zefa Labortechnik, Harthausen
Kryoröhrchen	Dunn Labortechnik, Asbach
Membranfilter Easypet (steril 0,45 µm)	Eppendorf, Hamburg
Objektträger (76x26 mm)	Carl Roth, Karlsruhe
Millicell [®] -Zellkulturplatten-Einsätze: Millicell [®] -PCF (Ø 12 mm) Millicell [®] -HA (Ø 12 mm) Millicell [®] -CM (Ø 12 mm)	Millipore GmbH, Eschborn

Material

Millicell®-PET (Ø 12 mm)	
Pasteurpipetten	Th. Geyer, Berlin
Pipettenspitzen	Carl Roth, Karlsruhe
Serologische Einwegpipetten	Carl Roth, Karlsruhe
Spitzen (10 ml)	Lehnecke, Schortens
Zellkulturschalen: 6-Lochplatten (pro Vertiefung: Ø 34,6 mm) 24-Lochplatte (pro Vertiefung: Ø 15,5 mm)	Iwaki, Tokio, Japan
Zentrifugenröhrchen 15 ml Zentrifugenröhrchen 50 ml	Carl Roth, Karlsruhe
3D Collagen Cell Culture System	Chemicon International, Schwalbach

3.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav H+P Varioclav Typ 250T	Schembera, München
Begasungsbrutschrank Memmert INCO 2	Memmert, Schwabach
Dampfsterilisator H+P Varioclav 25T H+P	Labortechnik, München
Digitalkamera (DXM 1200)	Nikon GmbH, Düsseldorf
Invert-Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Neubauer Zählkammer	GLW, Würzburg

Pipette	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf, Hamburg
Reinraumwerkbank (BDK-S100)	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl Genkingen
Stickstofftank (GT 38)	Air Liquide Kryotechnik, Düsseldorf
Transmissionselektronenmikroskop (EM 10CR)	Zeiss, Jena
Ultramikrotom (Ultracut S)	Fa. Reichert-Jung, Wien, Österreich
Vakuumpumpe Laboport	KNF Neuberger, Freiburg
Wasserbad (1083)	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zentrifuge Variofuge RF	Heraeus Sepatech, Osterode

3.5 Immunzytochemie

3.5.1 Primärantikörper zur Markierung von Endothelzellen und Keratinozyten in den direkten Kokulturen

Primärantikörper	Hersteller
Monoklonaler Antikörper Maus anti-Schaf-CK19 (Endothelzellen)	DAKO Diagnostika, Hamburg
Monoklonaler Antikörper Maus anti-Schaf-CK14 (Keratinozyten)	Serotec, Düsseldorf

3.5.2 Immunreagenzien, Chemikalien

Komponente	Hersteller
Azeton	Biesterfeld, Dahlwitz-Hoppegarten
3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid Tabletten (DAB)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Glyzerin-Gelatine	Th. Geyer, Berlin
Hämalaun nach Meyer	Fluka-Chemie, Buchs, Schweiz
Mausserum, IgG1	DAKO Diagnostika, Hamburg
Methanol	Th. Geyer, Berlin
PBS	Biochrom AG, Berlin
Proteinblockierungsreagenz, serumfrei	DAKO Diagnostika, Hamburg
Sekundär-Antikörper Schaf anti-Maus, Biotin-konjugiert	Chemicon International, Schwalbach
StreptABComplex/HRP	DAKO Diagnostika, Hamburg
TRIS-Puffer	Fluka-Chemie, Buchs, Schweiz

3.6 Transmissionselektronenmikroskopie

3.6.1 Verbrauchsmaterialien

Komponente	Hersteller
Beemkapseln	Plano, Marburg
Kupfergrids	Plano, Marburg
Kodak Electron Mikroscope Film (4489)	Kodak, Stuttgart

3.6.2 Chemikalien

Komponente	Hersteller
Agar	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Azur-II-Lösung (1 %-ig)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Borax-Lösung (1 %-ig)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
DDSA (2-Dodecenylsuccinic-Acid-Anhydride)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DMP-30 (2,4,6 Tri (dimethylaminomethyl) Phenol)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Epon-Glycidether Methanol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glutaraldehyd	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Kaliumferrocyanid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Methylenblau	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

Material

MNA (Methyl Nacid Anhydride)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Osmiumtetroxid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Propylenoxid	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg

4 Methoden

4.1 Kultivierungsbedingungen

Nach dem Auftauen erfolgte die Kultivierung der Zellen in einem CO₂-Begasungsbrutschrank Typ INCO 2 (Fa. Memmert, Schwabach) im offenen System bei 37°C mit 5 % CO₂ und Wasserdampfsättigung. Alle Zellkulturarbeiten fanden unter einer sterilen Reinraumwerkbank unter standardisierten Bedingungen statt. Die Kulturmedien wurden zweimal wöchentlich gewechselt. Die Medien frisch aufgetauter Zellen wurden zunächst an zwei aufeinander folgenden Tagen gewechselt und anschließend zweimal pro Woche.

4.2 Kultivierungsgefäße

Für die Anzucht von Endothelzellen und Keratinozyten in Monokulturen wurden zunächst sterile 6-Lochplatten (Fa. Iwaki, Tokio, Japan) verwendet, deren Vertiefungen einen flachen Boden und einen Durchmesser von 34,6 mm aufwiesen. Die direkte Kokultivierung der Zellen erfolgte einerseits in 24-Lochplatten (Fa. Iwaki, Tokio, Japan) mit einem Durchmesser von 15,5 mm und andererseits in Millicell®-Zellkulturplatten-Einsätzen (Millipore GmbH, Eschborn), die ihrerseits in 24-Lochplatten (Fa. Iwaki, Tokio, Japan) eingesetzt werden konnten (Abbildung 1 und 2).



Abbildung 1:

Millicell®-Zellkulturplatten-Einsätze in einer 24-Lochplatte (Millipore GmbH, Eschborn)

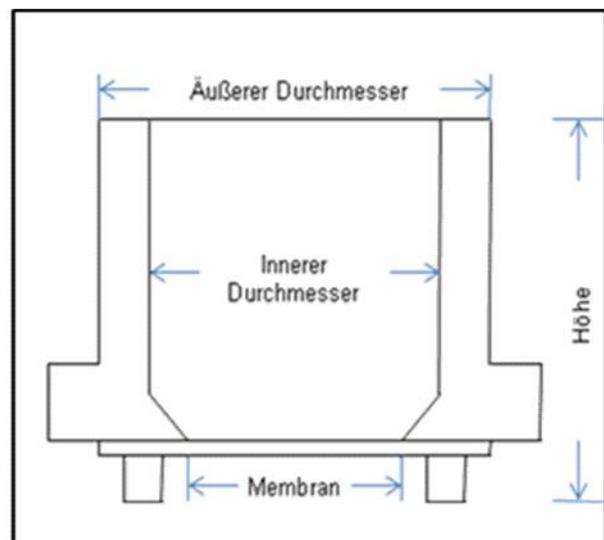


Abbildung 2:

Schematische Darstellung eines Millicell®-Zellkulturplatten-Einsatzes

4.3 Dokumentation

Die Dokumentation der Untersuchungsbefunde innerhalb des Zellkulturlabors erfolgte mittels eines Invert-Mikroskops vom Typ Olympus CKX 14 (Olympus, Hamburg) und einer an dieses Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera Camedia (C-40402-ZOOM Olympus, Hamburg). Anschließend folgte eine digitale Bildarchivierung.

4.4 Subkultivierung

Nach Heranwachsen einer Zellkultur zu einem konfluenten Monolayer erfolgte die Subkultivierung. Zunächst wurde das Medium von dem Zellmonolayer abgesaugt, anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Um die Zellen vom Boden des Kultivierungsgefäßes ablösen zu können, wurden einige Tropfen Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 g porcines Trypsin + 0,2 g EDTA x Na/l HBSS, Fa. Sigma, Taufkirchen) dazu gegeben. Unter dem Invert-Mikroskop wurde das Ablösen der Zellen kontrolliert. Die Enzymeinwirkung wurde durch die Zugabe von Medium gestoppt. Im Folgenden wurden die Zellen trituriert bis eine vollständige Vereinzelnung der Zellen im Medium stattfand. Anschließend wurden die Zellen auf zwei neue Kultivierungsgefäße aufgeteilt.

4.5 Kryokonservierung

Nach dem Passagieren wurde ein Teil der Zellen eingefroren. Hierfür musste zunächst das Einfriermedium hergestellt werden. Dieses setzte sich zusammen aus dem für die jeweilige Zellkultur entsprechenden Kulturmedium und 10 % DMSO (Fa. ICN Biomedicals, Eschwege). Die Zellen wurden nach dem Triturieren zunächst in einem Zentrifugenröhrchen in 10 ml Medium zentrifugiert (10 min, 1050 U/min, Raumtemperatur). Der Überstand wurde abgesaugt und das zurückbleibende Zellpellett wurde in dem vorbereiteten Einfriermedium resuspendiert. Die Vitalität der Zellen wurde mittels Trypanblau-Lösung überprüft. Anschließend wurden die Zellen rasch in Kryoröhrchen (Fa. Dunn Labortechnik, Asbach) pipettiert und zuerst bei -70°C im Tiefkühlschrank für maximal zwei Wochen eingefroren. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte in einem Tank mit flüssigem Stickstoff bei -196°C. Das kryokonservierte Untersuchungsmaterial wurde über eine spezielle Anwendungssoftware, dem Win Freeze[®]-Programm von Marco Manago und Jasmin Lienau, Berlin, verwaltet

4.6 Auftauen der Zellkulturen

Das Auftauen eingefrorener Kulturen erfolgte indem die Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und in ein Wasserbad (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) bei 37°C

überführt wurden. Die Zellen wurden anschließend vorsichtig in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Medium pipettiert und zentrifugiert (10 min, 1050 U/min, Raumtemperatur). Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellett resuspendiert und schließlich in ein Kultivierungsgefäß ausgesät. 24 Stunden nach dem Aussäen erfolgte der erste Mediumwechsel.

4.7 Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte in einem Hämozytometer nach Neubauer (Neubauer Zählkammer, Fa. GLW, Würzburg). Die Zellen wurden, wie im Rahmen der Subkultivierung, mit Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst, mit PBS gewaschen, zentrifugiert (10 min, 1050 U/min, Raumtemperatur) und das Zellpellett in 1 ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in das Hämozytometer nach Neubauer gefüllt und mittel eines Phasenkontrastmikroskops ausgezählt. Hierzu wurden die Zellen aus vier Quadraten gezählt und der Mittelwert errechnet. Zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension wurde folgende Formel angewendet:

$$\text{Zellzahl/ml} = n \times 10^4/\text{ml}$$

(n = Mittelwert der Zellzahl in den vier ausgezählten Quadraten)

4.8 Kultivierungstechniken

4.8.1 Pilotstudie 1: Zellkulturplatten-Beschichtung

Für die Beschichtung der kommerziell erhältlichen Zellkulturplatten (Fa. Iwaki, Tokio, Japan) standen eine Gelatinelösung (Bacto Gelatine, 1,5 % in PBS, Difco Laboratories, Detroit) und eine Kollagenlösung (Collagen G, Biochrom AG, Berlin) zur Verfügung. Es war zunächst zu untersuchen, welche der beiden Lösungen eine optimale Zelladhäsion und Proliferation beider Zellarten auf dem Kulturschalenboden gewährleistet. Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Kollagenlösung wurde Collagen G (Biochrom AG, Berlin) in einem Verhältnis 1:1 mit demineralisiertem H₂O gemischt.

Für die Beschichtung der Kulturschalenböden wurden jeweils 0,5 ml der beiden unterschiedlichen Lösungen auf 24-Lochplatten (Fa. Iwaki, Tokio, Japan) gegeben und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Hierauf wurden die Zellen jeweils in Monokultur parallel auf mit Gelatine und Kollagen beschichteten Kulturplatten eingesät. Für die Kultivierung der Zellen wurden jeweils die Selektivmedien P₀ für die Endothelzellen und Quantum 286 für die

Keratinocyten eingesetzt. Ausgehend von der ausplattierten Zelldichte von jeweils 3×10^4 Zellen, wurde die Proliferationsrate von Endothelzellen und Keratinocyten über einen Zeitraum von fünf Tagen ermittelt und verglichen (Tabelle 1).

	EC-C	EC-G	K-C	K-G
Tag 1	$5,7 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$	$4,8 \times 10^4$
Tag 2	$7,2 \times 10^4$	$7,2 \times 10^4$	$10,4 \times 10^4$	$9,9 \times 10^4$
Tag 3	$9,0 \times 10^4$	$10,2 \times 10^4$	$12,6 \times 10^4$	$14,7 \times 10^4$
Tag 4	$8,2 \times 10^4$	$8,9 \times 10^4$	$13,1 \times 10^4$	$12,6 \times 10^4$
Tag 5	$9,4 \times 10^4$	$11,3 \times 10^4$	$13,5 \times 10^4$	$15,4 \times 10^4$

Tabelle 1:

Ermittlung der Proliferationsrate von Endothelzellen (EC) und Keratinocyten (K) auf Gelatine (G) oder Kollagen (C)- Beschichtung

Aus dieser Untersuchung ging hervor, dass sowohl die Kollagen- als auch die Gelatinelösung gleichermaßen gut geeignet waren als Beschichtung der Zellkulturplatten zur Kultivierung sowohl für die Endothelzellen als auch für die Keratinocyten. Daraus resultierend wurde für die Entwicklung eines organotypischen Kokultur-Modells eine Beschichtung ausschließlich mit Kollagen gewählt.

Im Folgenden wird die direkte Kokultivierung von Endothelzellen und Keratinocyten auf Glasplättchen mit einer Kollagenbeschichtung beschrieben.

4.8.2 Direkte Kokultivierung auf Glasplättchen mit Kollagenbeschichtung

Um erstmals den Effekt von Keratinozyten auf Endothelzellen und Angiogenese im bovinen System *in vitro* zu untersuchen, wurden auf der Basis der wenigen existierenden Modelle neuartige Kokultur-Systeme für diese beiden bovinen Zellpopulationen entwickelt und getestet. Bei der Erforschung der dafür am besten geeigneten Systeme in dieser Arbeit wurden unterschiedliche Pilotstudien durchgeführt, die nachfolgend beschrieben werden.

Für die Untersuchung der zellulären Interaktion zwischen Endothelzellen und Keratinozyten *in vitro*, wurde eine direkte Methode der Kokultivierung auf Glasplättchen getestet und mit Hilfe der Immunzytochemie untersucht.

Nach dem Auftauen erfolgte zunächst die monokulturelle Kultivierung von Endothelzellen und Keratinozyten. Endothelzellen wurden auf mit Collagen G (Biochrom AG, Berlin) beschichteten 6-Lochplatten (Fa. Iwaki, Tokio, Japan) gesät und mit dem Selektivmedium P₀ gefüttert. Für die Anzucht der Keratinozyten in Monokultur unter standardisierten Bedingungen war eine Beschichtung der Zellkulturplatten nicht notwendig, da diese eine stabile Adhärenz und eine deutliche Proliferation auf den unbeschichteten Kulturschalenböden aufwiesen. Das Selektivmedium Quantum 286 (PAA Laboratories, Cölbe) wurde als spezifisches Nährmedium für mehrschichtige Plattenepithelien verwendet. Ein Mediumwechsel der Monokulturen wurde zweimal pro Woche durchgeführt.

Nach Erreichen subkonfluenter Monokulturen konnten die Zellen schonend vom Untergrund der Kulturplatten abgelöst, in frischem Medium suspendiert und in der Zählkammer nach Neubauer gezählt werden. Die in den 24-Lochplatten (Fa. Iwaki, Tokio, Japan) eingesetzten und mit einer zellfreien Kollagenlösung beschichteten sterilen Glasplättchen (Deckgläser, Ø12 mm) wurden nach einstündiger Inkubationszeit aus dem Brutschrank entnommen. Die mikrovaskulären Endothelzellen wurden mit den Keratinozyten für die immunzytochemischen Untersuchungen in drei verschiedenen direkten Kokultur-Systemen auf mit Kollagenlösung beschichteten Glasplättchen über einem Zeitraum von jeweils vier Wochen kokultiviert. DMEM+ wurde als Medium für alle Kokulturen eingesetzt. Der Wechsel des Mediums erfolgte zweimal wöchentlich. Die Kokulturen wurden in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System inkubiert. Die Bebrütungstemperatur betrug 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 5 %.

4.8.2.1 Direktes Kokultur-System 1 (K+E)

Für das direkte Kokultur-System 1 wurden Keratinozyten drei Tage lang bis zum Erreichen der Subkonfluenz auf mit Kollagenlösung beschichteten Glasplättchen (Deckgläser, Ø12 mm) in 24-Lochplatten (Fa. Iwaki, Tokio, Japan) mit dem Selektivmedium Quantum 286 kultiviert. Anschließend wurden Endothelzellen in Medium suspendiert und in einer Dichte von 3×10^4 Zellen pro Vertiefung auf die subkonfluenten Monolayer aus Keratinozyten gesät. Die Langzeitkultivierung der Kokulturen von insgesamt vier Wochen erfolgte mit DMEM+ als Nährmedium (Abbildung 3).

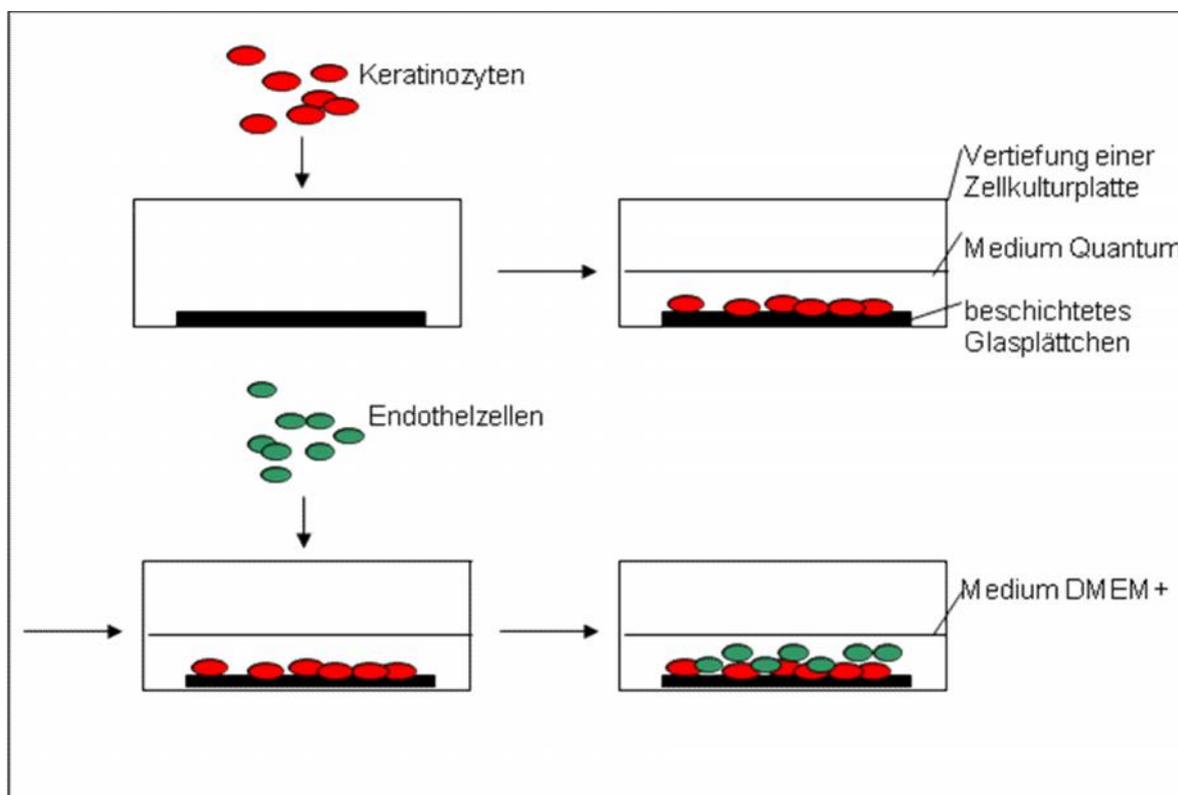


Abbildung 3: Direktes Kokultur-System 1 (K+E)

4.8.2.2 Direktes Kokultur-System 2 (E+K)

Auf mit Kollagenlösung beschichteten Glasplättchen in 24-Lochplatten wurden Endothelzellen über einen Zeitraum von fünf Tagen bis zur Bildung eines subkonfluenten Monolayers in dem Selektivmedium P_0 kultiviert. Hierauf wurden 2×10^4 Keratinozyten in Suspension pro Vertiefung auf die Monolayer gesät und über einen Zeitraum von vier Wochen in DMEM+ kultiviert (Abbildung 4).

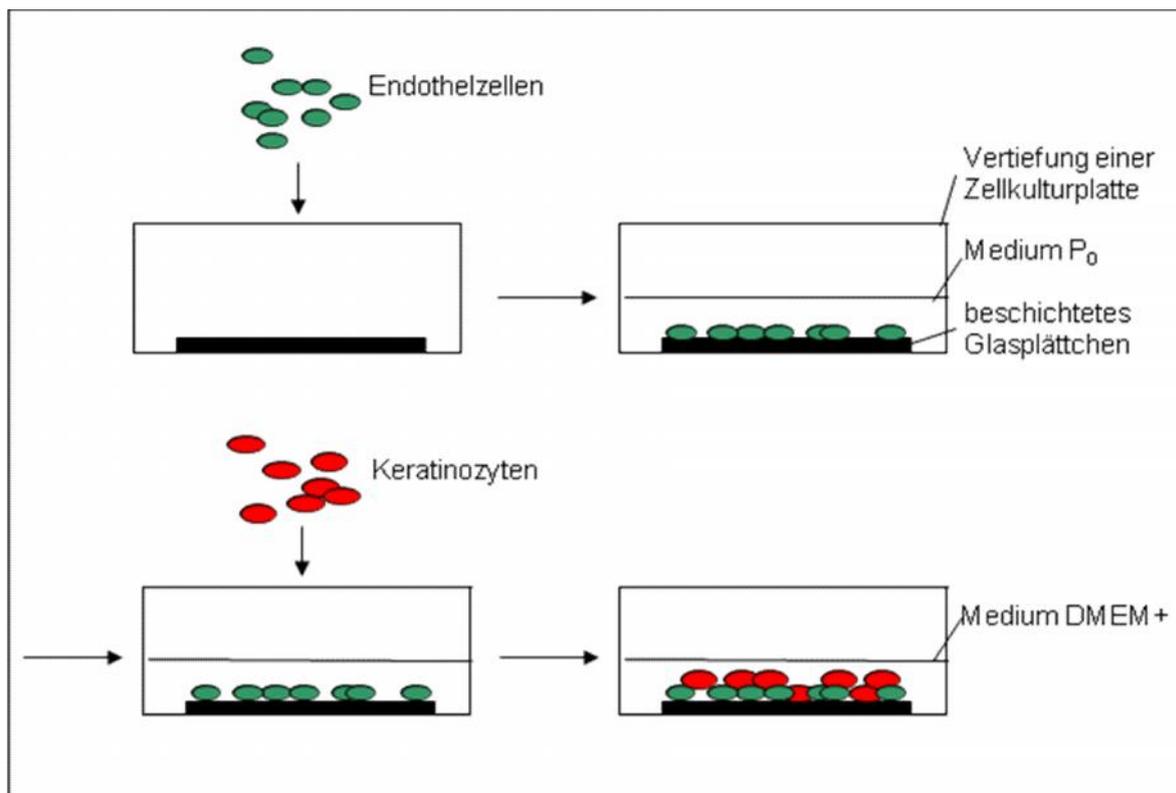


Abbildung 4: Direktes Kokultur-System 2 (E+K)

4.8.2.3 Direktes Kokultur-System 3 (Suspension)

Im direkten Kokultur-System 3 wurden subkonfluente Monolayer aus Endothelzellen und Keratinozyten jeweils zunächst in Suspension gebracht. Die Zelldichte beider Zellarten wurde mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer (GLW, Würzburg) ermittelt. Für die Kokultivierung von Endothelzellen und Keratinozyten wurde ein Dichteverhältnis von 1:2 (Keratinozyten:Endothelzellen) ermittelt. Es wurden 2×10^4 Keratinozyten und 4×10^4 Endothelzellen mit der Zählkammer nach Neubauer ausgezählt und pro Vertiefung der Kulturplatten auf die mit Kollagen beschichteten Glasplättchen ausplattiert. Das Nährmedium der Kokulturen, DMEM+, wurde zweimal wöchentlich gewechselt (Abbildung 5).

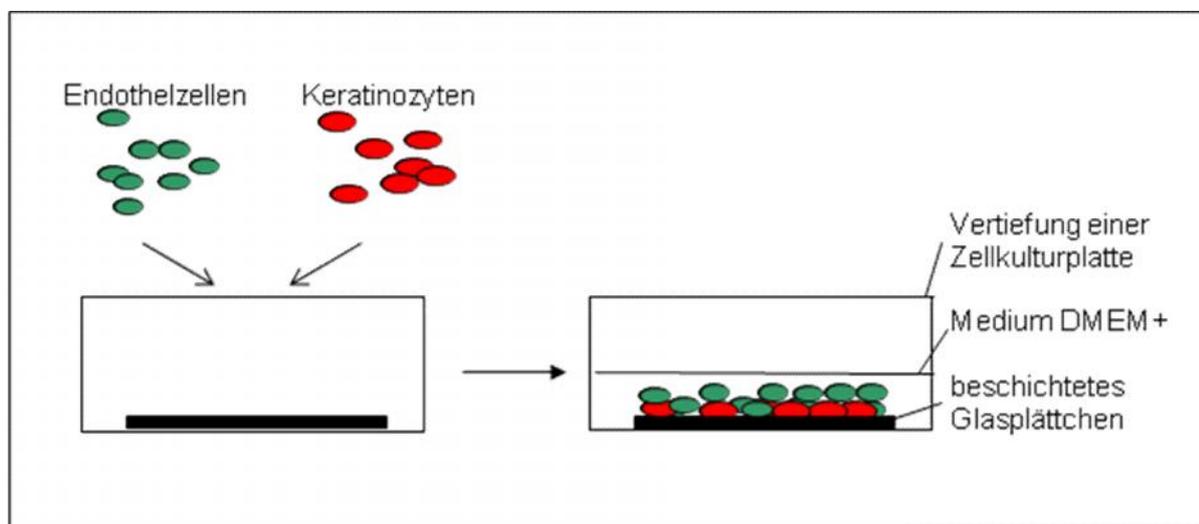


Abbildung 5: Direktes Kokultur-System 3

4.8.3 Pilotstudie 2: Direkte Kokultur in Millicell®-Filtereinsätzen

Um für die Entwicklung eines bovinen organotypischen Kokultur-Systems im zwei- und dreidimensionalen Modell einen geeigneten Zellkulturträger einsetzen zu können, wurden in der zweiten Studie folgende unterschiedlichen Millicell®-Filtereinsätze in ihren Eigenschaften für die direkte Kokultivierung getestet. Die Unterschiede der Filtereinsätze sind in folgender Tabelle zusammengefasst (Tabelle 2). Mit den Millicell®-Filtereinsätzen, in die Filtermembranen mit einer Porengröße von $0,4 \mu\text{m}$ eingelassen sind, konnten die Zellen sowohl von der apikalen als auch von der basolateralen Seite mit Medium versorgt werden. Die Filtereinsätze fördern somit das Wachstum adhärenter Zellen. Durch die Verwendung des Millicell®-Filtereinsatzes entsteht ein zweikammeriges Kultursystem mit einer inneren und einer äußeren Kammer. Die innere

Kammer entspricht dem Filtereinsatz, während die äußere Kammer durch die Vertiefung der Kulturplatte gebildet und durch den verwendeten Filtereinsatz begrenzt wird. In jedem Modell wurden entsprechend den Arbeitsanweisungen des Herstellers 400 µl Medium in die innere Kammer und 600 µl Medium in die äußere Kammer pipettiert (Abbildung 1 und 2).

Millicell®-Einsatz/ Filter-Code	Millicell®-HA (Mixed cellulose ester)	Millicell®-CM (PTFE, Teflon)	Millicell®-PCF (Polycarbonate)
Porengröße (µm)	0,4 µm	0,4 µm	0,4 µm
Durchmesser (mm)	12 mm	12 mm	12 mm
Oberfläche (cm²)	0,6 cm ²	0,6 cm ²	0,6 cm ²
Transparenz	ja	ja	nein

Tabelle 2:

Technische Daten der Millicell®-Filtereinsätze im Vergleich

Alle drei Typen von Millicell®-Filtereinsätzen wurden in die Vertiefungen einer 24-Lochplatte (Fa. Iwaki, Tokio, Japan) eingesetzt. Die Membranen aller Filtereinsätze wurden anschließend mit Gelatinelösung (1,5 % in PBS, Bacto Gelatine) oder Kollagenlösung (Biochrom AG, Berlin) beschichtet und im Brutschrank für 24 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Einsätze mehrmals in PBS gespült. Sowohl Endothelzellen als auch Keratinozyten wurden in unterschiedlichen Zelldichten (1×10^4 bis 3×10^4 Zellen) auf die Filtereinsätze gesät und jeweils mit Selektivmedium (P_0 und Quantum 286) kultiviert. Die Kultivierungsdauer der Monokulturen betrug jeweils insgesamt sieben Tage. Die Medien wurden im regelmäßigen Abstand von zwei Tagen gewechselt.

Da die beiden Membranen der Millicell®-Filtereinsätze Millicell®-HA und Millicell®-CM transparent waren, konnten die Kulturen täglich unter dem Invert-Mikroskop während der Kultivierungsdauer betrachtet werden. Die Untersuchung ergab, dass die Millicell®-Filtereinsätze Millicell®-HA und Millicell®-CM trotz unterschiedlicher Beschichtungen (Gelatinelösung, Kollagenlösung) nicht geeignet waren zur Kultivierung der beiden Zelltypen. Bei der Betrachtung im Invert-Mikroskop

nach 24 Stunden konnte unabhängig trotz steigender Zelldichte sowohl von Keratinozyten als auch Endothelzellen (1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4) ausschließlich eine mäßige Adhäsion der Zellen auf dem Untergrund beobachtet werden. Die Ergebnisse nach täglicher lichtmikroskopischer Untersuchung zeigten, dass sich insbesondere vom Kultivierungstag 1 bis 3 zahlreiche Zellen vom Boden der Kulturplatten ablösten. Die adhärent verbliebenen Zellen kugelten sich bis zum 7. Tag in Kultur ab.

Da die Filtermembranen der Millicell®-PCF nicht transparent waren, konnten an diesen Kulturen keine lichtmikroskopischen Untersuchungen erfolgen. Nach Aussaat der Zellen und täglichem Mediumwechsel ohne lichtmikroskopische Kontrollen wurden nach 7 Kultivierungstagen transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Anhand dieser Untersuchungen konnten dagegen sowohl in den Endothelzellkulturen als auch in den Keratinozytenkulturen über den gesamten Filtereinsatz adhärente Zellen beobachtet werden. Damit waren ausschließlich die Millicell®-PCF für die Kokultivierung von Endothelzellen und Keratinozyten geeignet.

4.8.4 Direkte Kokultur in Millicell®-PCF-Filtereinsätzen mit Kollagenbeschichtung

Millicell®-PCF-Filtereinsätze wurden zunächst in die Vertiefungen von 24-Lochplatten (Fa. Iwaki, Tokio, Japan) gesetzt. Im zweiten Schritt wurden auf die Filtermembranen aller Einsätze 100 µl Kollagenlösung (Biochrom AG, Berlin) gegeben und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Filtermembranen gründlich mit PBS gespült und mit Medium bedeckt, um ein Austrocknen der Beschichtung bis zum Ausplattieren der Zellen zu verhindern. Die Kokulturen wurden mit DMEM+ über einen Zeitraum von vier Wochen kultiviert. Das Medium wurde wöchentlich zweimal gewechselt. Die Inkubation der Kokulturen erfolgte in einem CO₂-Begasungsbrutschrank bei 37°C. Da die Filtermembran der Millicell®-PCF nicht transparent waren, konnten die eingesetzten Zellkulturen während der gesamten Kultivierungsdauer nicht mikroskopisch betrachtet und untersucht werden. Die optimale Zelldichte zur Kokultivierung von Endothelzellen und Keratinozyten wurde in Vorversuchen ermittelt.

4.8.4.1 Direktes Millicell[®]-PCF-System 1 (K+E)

In jeden mit Kollagen beschichteten Millicell[®]-PCF wurden 2×10^4 Keratinozyten ausplattiert und zur Anzucht mit Selektivmedium Quantum 286 kultiviert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden im Brutschrank wurden 3×10^4 Endothelzellen vorsichtig auf die Filtermembran pipettiert. Die Kokulturen wurden mit DMEM+ über einem Zeitraum von vier Wochen kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt (Abbildung 6).

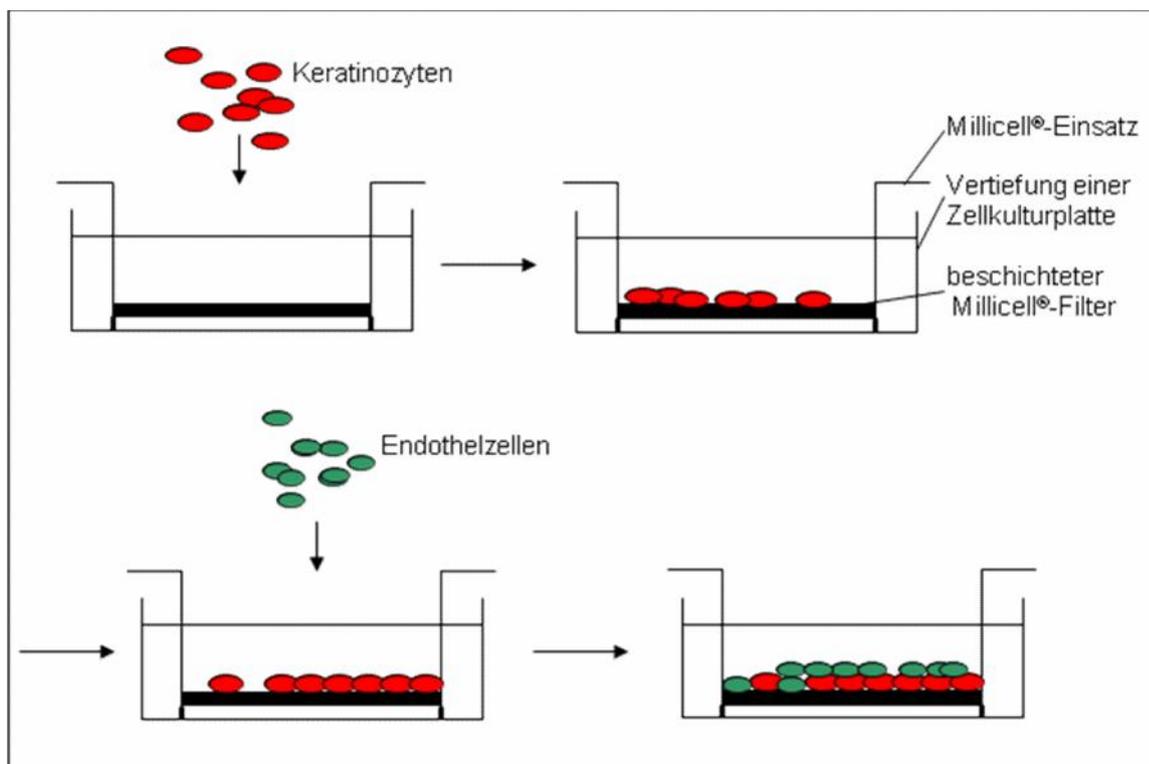


Abbildung 6: Direktes Millicell[®]-PCF-System 1 (K+E)

4.8.4.2 Direktes Millicell®-PCF-System 2 (E+K)

Für die Kultivierung des zweiten Systems wurden 3×10^4 Endothelzellen pro Millicell®-PCF über zwei Tage im Selektivmedium P_0 angezüchtet. Das Medium wurde hier täglich gewechselt. Nach dem zweiten Kultivierungstag wurden 2×10^4 Keratinozyten in jeden Millicell®-PCF pipettiert. Alle Kokulturen wurden nun in DMEM+ über vier Wochen kultiviert (Abbildung 7).

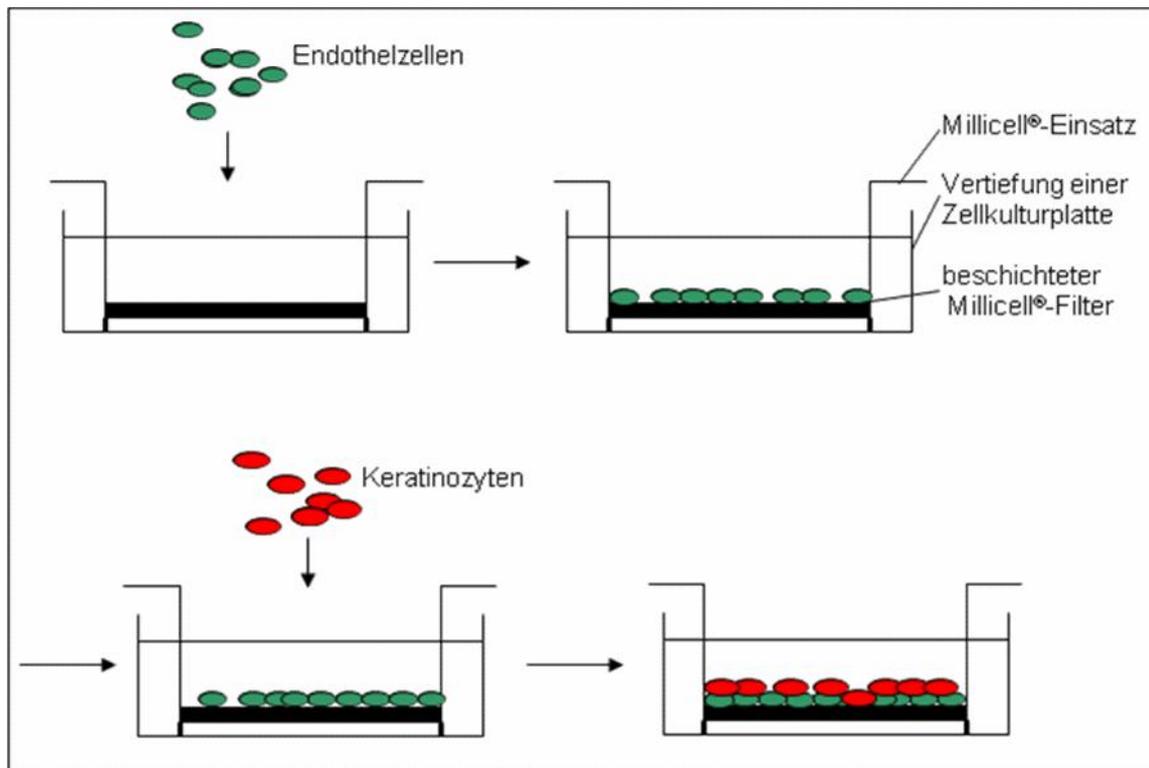


Abbildung 7: Direktes Millicell®-PCF-System 2 (E+K)

4.8.4.3 Direktes Millicell®-PCF-System 3 (Suspension)

Keratinocyten und Endothelzellen wurden in einem Verhältnis von 1:2 kultiviert. Es wurden 2×10^4 Keratinocyten und 4×10^4 Endothelzellen in Suspension gleichzeitig auf die Filtermembranen der Einsätze pipettiert und sofort mit DMEM+ angezuchtet. Die Kultivierungsdauer betrug vier Wochen (Abbildung 8).

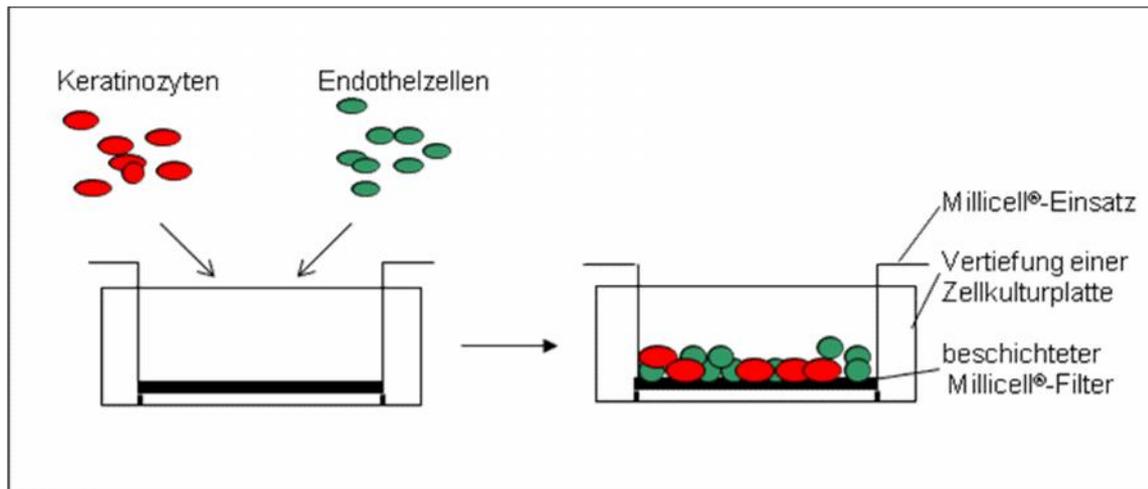


Abbildung 8: Direktes Millicell®-PCF-System 3 (Suspension)

4.8.5 Pilotstudie 3: Indirekte Kokultivierung im Matrix-Modell

Bei der Entwicklung organotypischer Kokultur-Systeme werden die wenigen existierenden Modelle aus dem Bereich der Humanmedizin als wissenschaftliche Grundlagen für die in vitro-Kultivierung boviner Zellen herangezogen und modifiziert. Dabei wird zwischen direkten und indirekten Kultivierungsmethoden unterschieden. Als Basis für die indirekte Kokultivierung diente eine Matrix aus Kollagen (Collagen G, Biochrom AG, Berlin) als Bindegewebs-Äquivalent. Die Zellen wurden schließlich in drei unterschiedlichen Modellen mit Kollagen in Millicell®-PET-Filtereinsätzen (Millipore GmbH, Eschborn) kultiviert. Die Herstellung der Kollagen-Matrix wird im Folgenden beschrieben. Die Ergebnisse der Voruntersuchungen werden im Folgenden in Tabelle 3 aufgeführt.

4.8.6 Herstellung einer Kollagen-Matrix

Für die Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung zur Bildung einer Matrix aus Kollagen (Collagen G, Biochrom AG, Berlin) wurden alle benötigten Reagenzien auf eine Temperatur von +2 bis +8°C gebracht. Zunächst wurden 1 Teil (1 M) Natronlauge und 2 Teile 1 (1 M) HEPES-

Puffer vermischt. Diese Lösung wurde als Lösung A bezeichnet. Die Lösung A wurde anschließend mit dem vom Hersteller empfohlenen 10x DMEM-Medium zu gleichen Teilen gemischt und als Lösung B bezeichnet. Für eine gelungene Gelbildung war der pH-Wert von entscheidender Bedeutung. Der pH-Wert sollte bei 9,8 bis 10,2 liegen und wurde anhand einer zuvor entnommenen Teilmenge durch pH-Messung überprüft. Anschließend wurden 4 ml Collagen G vorsichtig mit 1 ml Lösung B unter Vermeidung der Bildung von Luftblasen gemischt. Der pH-Wert lag jetzt bei ca. 7,5. Die so hergestellte gebrauchsfertige Kollagengellösung konnte nun in ein geeignetes Kulturgefäß pipettiert werden. Die Polymerisierung der Kollagengellösung erfolgte erschütterungsfrei im Brutschrank. Nach 24 Stunden war das Gel fest und klar.

4.8.6.1 Indirektes Millicell[®]-PET-Matrix-System

Als Zellkulturgefäß wurden neuartige Millicell[®]-PET-Filtereinsätze verwendet. Diese unterscheiden sich von den oben genannten Millicell[®]-PCF durch eine transparente Filtermembran und ermöglichen damit eine mikroskopische Untersuchung während der Kultivierung. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass der Einsatz nicht wie oben beschrieben in die Vertiefung der Kulturplatte eingesetzt, sondern in die Vertiefung eingehängt werden kann (Abbildung 9, 10 und 11). Die Kokulturen wurden täglich mittels Invert-Mikroskop untersucht. Für immunzytochemische Untersuchungen wurden die Kokulturen vorsichtig vom Untergrund der Vertiefungen abgelöst und in Agar 100 eingebettet. Von den Proben wurden Semidünnschnitte hergestellt, die auf Objektträger aufgezogen werden konnten.



Abbildung 9:
Millicell® PET-Zellkulturplatten-Einsatz (Millipore GmbH, Eschborn)

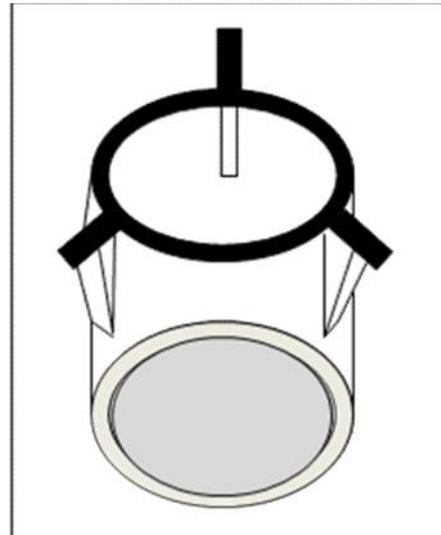


Abbildung 10:
Dreidimensionale Darstellung eines Millicell® PET-Zellkulturplatten-Einsatzes (Millipore GmbH, Eschborn, modifiziert nach Sarcev, 2010)

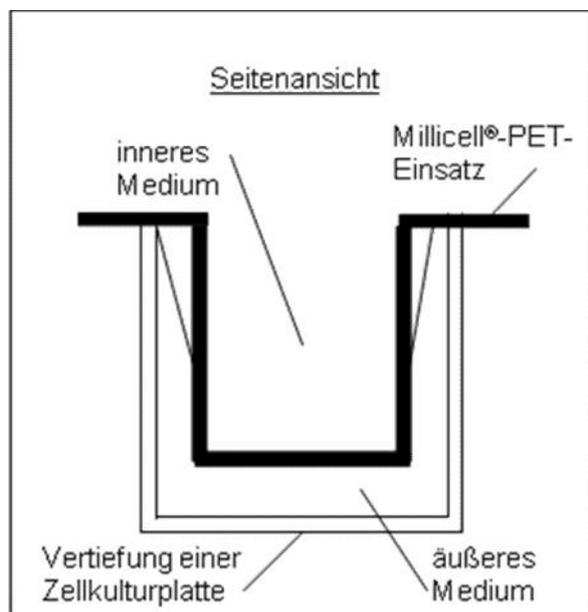
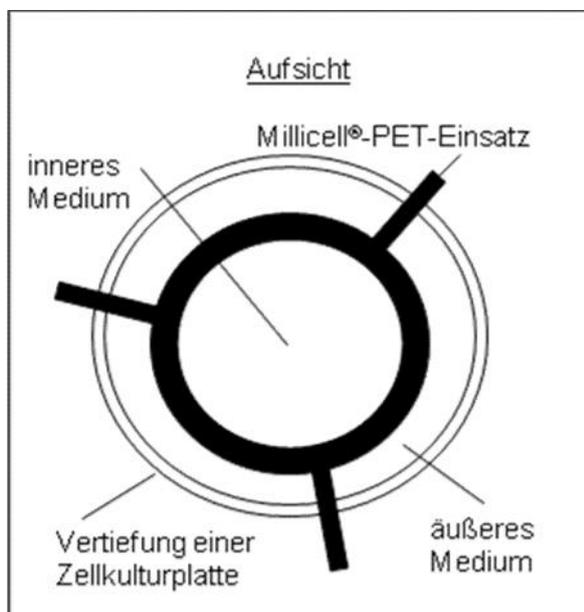


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Auf- und Seitenansicht eines Millicell®-PET-Zellkulturplatten-Einsatzes (Millipore GmbH, Eschborn, modifiziert nach Sarcev, 2010)

4.8.6.2 Indirektes Millicell®-PET-Matrix-System 1

Im ersten Schritt wurden die Millicell®-PET in die Vertiefungen der 24-Lochplatten (Fa. Iwaki, Tokio, Japan) eingehängt. Im zweiten Schritt erfolgte die Aussaat von 2×10^4 Keratinozyten auf die Membranen der Millicell®-PET. Nach einer Kultivierungsdauer von 24 Stunden im Selektivmedium Quantum 286 wurden je $400 \mu\text{l}$ der vorbereiteten gebrauchsfertigen Kollagengellösung (Collagen G, Biochrom AG, Berlin) pro Einsatz pipettiert. Um die Versorgung der Keratinozyten mit Nährstoffen zu sichern, wurden $600 \mu\text{l}$ Medium in die äußere Kammer pipettiert, so dass das Medium durch die Poren der Filtermembranen zu den Zellen diffundieren konnte. Nach erfolgreicher Polymerisierung im Brutschrank war das Gel klar und fest. Es wurden 3×10^4 Endothelzellen je Einsatz auf die polymerisierte Kollagen-Matrix ausgesät. In die innere Kammer wurden je $400 \mu\text{l}$ DMEM+ pipettiert (Abbildung 12).

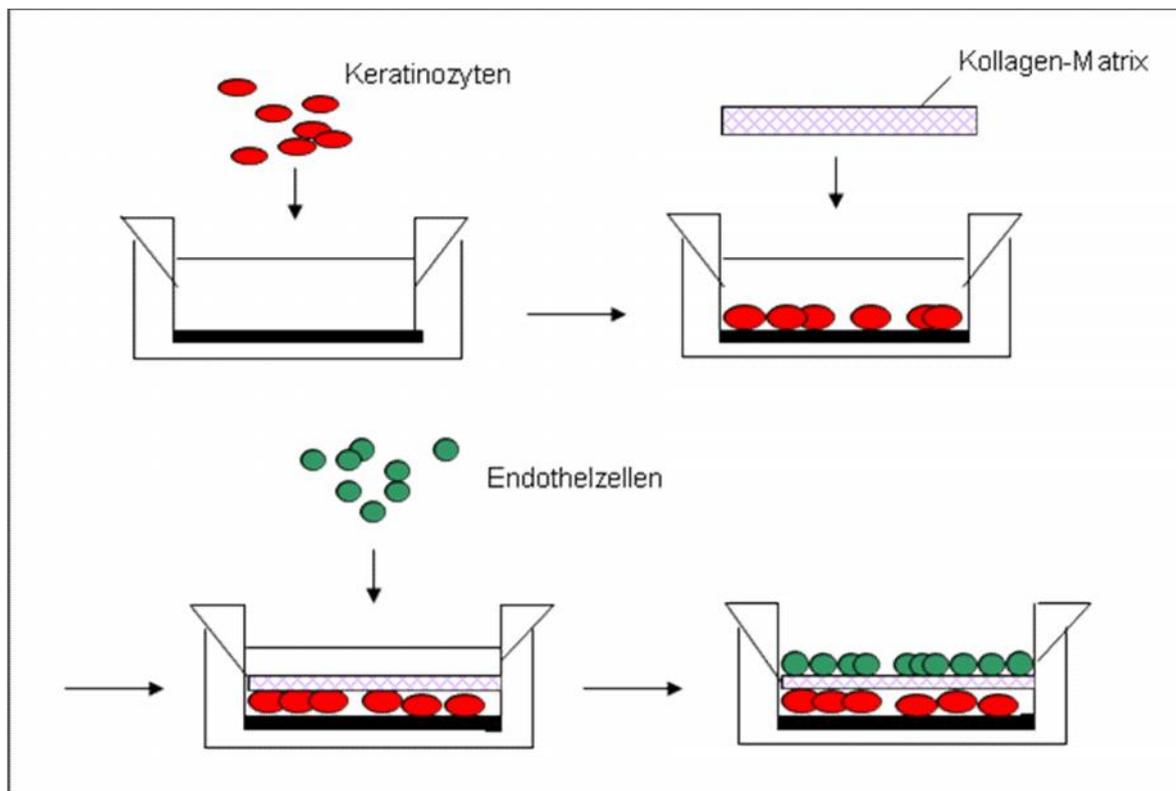


Abbildung 12: Indirektes Millicell®-PET-Matrix-System 1

4.8.6.3 Indirektes Millicell®-PET-Matrix-System 2

In die vorbereiteten Millicell®-PET-Einsätze wurden in Kollagengellösung (Collagen G, Biochrom AG, Berlin) suspendierte 3×10^4 Endothelzellen ausgesät. 400 μ l Selektivmedium P_0 wurden anschließend in die äußere Kammer pipettiert. Nach der Inkubation von 24 Stunden im Brutschrank wurden 2×10^4 Keratinozyten vorsichtig auf die polymerisierte Kollagen-Matrix (Collagen G, Biochrom AG, Berlin) gegeben. Nun konnte wieder in die äußere als auch in die innere Kammer das Nährmedium DMEM+ zur Versorgung der Zellen pipettiert werden (Abbildung 13).

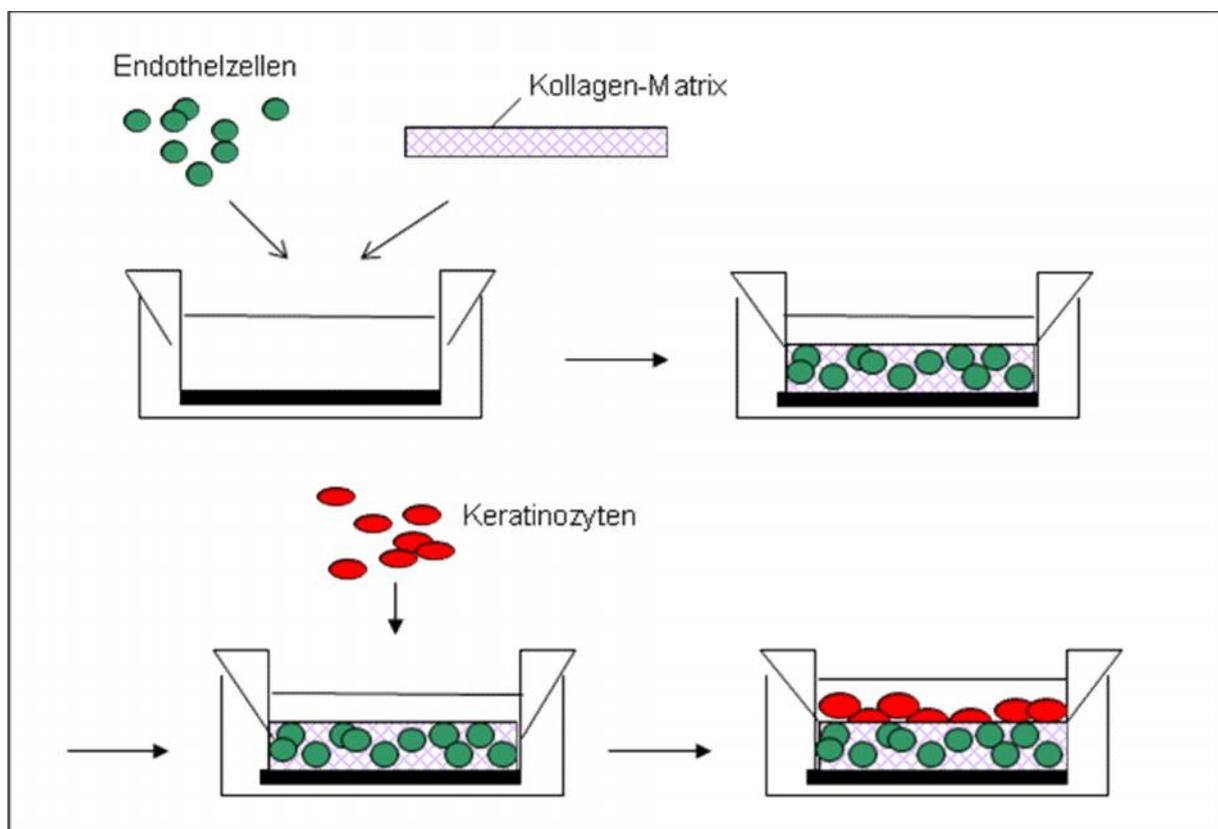


Abbildung 13: Indirektes Millicell®-PET-Matrix-System 2

4.8.6.4 Indirektes Millicell®-PET-Matrix-System 3

Im Millicell®-PET-Matrix-System 3 wurde im Aufbau der Kokultur nach dem Prinzip des Millicell®-PET-Matrix-Systems 1 verfahren, wobei auf die Endothelzellen eine abschließende Schicht einer Kollagen-Matrix (Collagen G, Biochrom AG, Berlin) gegeben wurde. In Selektivmedium Quantum 286 suspendierte 2×10^4 Keratinozyten wurden zunächst in die Millicell®-PET ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden je 400 μl der vorbereiteten gebrauchsfertigen Kollagengellösung (Collagen G, Biochrom AG, Berlin) pro Einsatz pipettiert. Um die Versorgung der Keratinozyten mit Nährstoffen zu sichern, wurden 600 μl Medium in die äußere Kammer pipettiert. Nach Polymerisierung der Kollagen-Matrix (Collagen G, Biochrom AG, Berlin) wurden 3×10^4 Endothelzellen je Einsatz auf die Kollagen-Matrix ausgesät. In die innere Kammer wurden je 400 μl DMEM+ pipettiert. Im Anschluss an eine Kultivierungsdauer von 24 Stunden erfolgte die zweite Beschichtung mit Kollagengellösung (Abbildung 14).

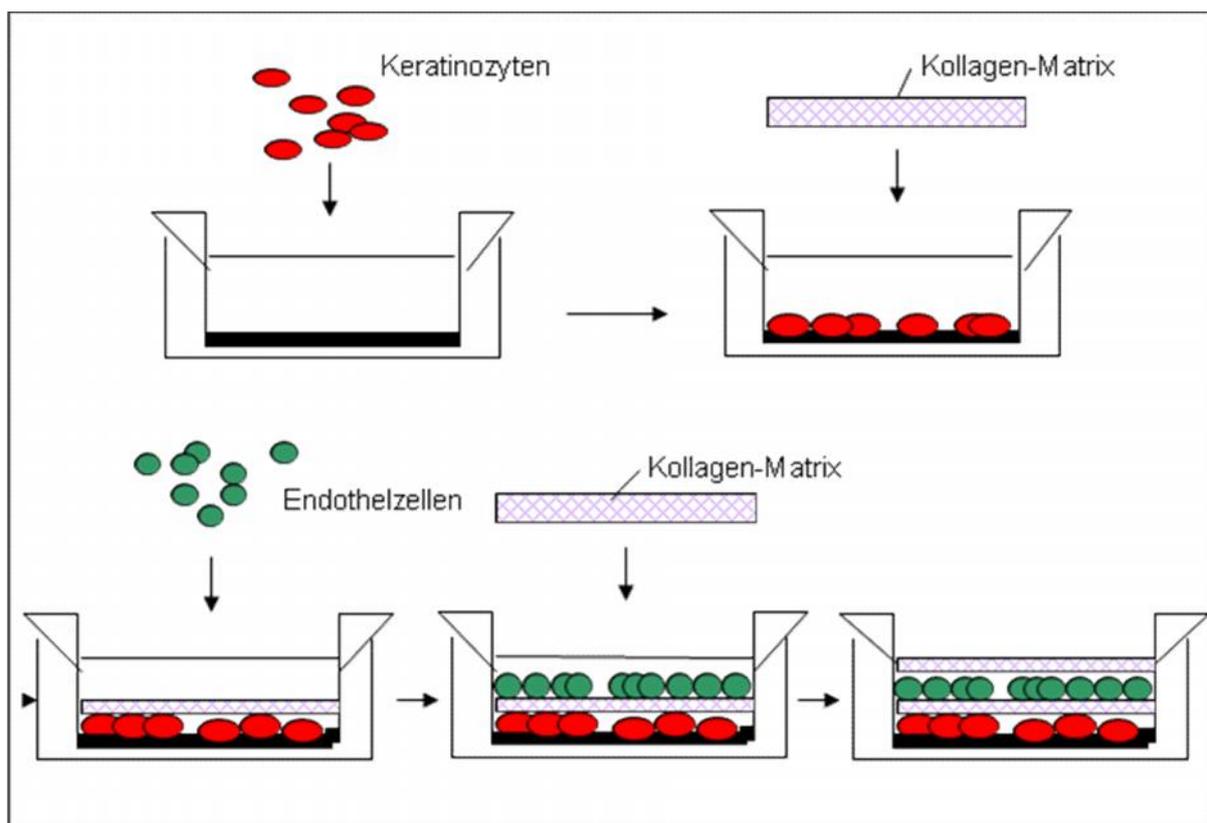


Abbildung 14: Indirektes Millicell®-PET-Matrix-System 3

Millicell®-PET-Matrix-System	Beobachtungen nach 48 Stunden in vitro
Indirektes Millicell®-PET-Matrix-System 1	Bildung von Endothelzell-Kolonien diffus verteilt auf der Kollagen-Matrix einzeln liegende Keratinozyten in abgekugelter Form auf dem Kulturschalenboden
Indirektes Millicell®-PET-Matrix-System 2	einzeln liegende Endothelzellen in Kollagen-Matrix mit langen Zellausläufern zu benachbarten Endothelzellen Keratinozyten in Zellkolonien auf Kollagen-Matrix
Indirektes Millicell®-PET-Matrix-System 3	phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen aufgrund methodischer Problematik nicht durchführbar

Tabelle 3:

Tabellarische Übersicht der phasenkontrastmikroskopischen Untersuchung in den indirekten Millicell®-PET-Matrix-Systemen

Die indirekte Kokultivierung von Endothelzellen und Keratinozyten in Millicell®-PET-Zellkulturplatten-Einsätzen mit einer Kollagen-Matrix (Collagen G, Biochrom AG, Berlin) war aufgrund der nach Herstellerangaben langen Inkubationszeiten der Kollagengellösung nicht für eine Langzeitkultivierung geeignet. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Zellen erfolgten erst nach vollständiger Herstellung der Kokulturen, wie in der Methodik beschrieben, über einen Zeitraum von 48 Stunden in vitro. Desweiteren konnten die hergestellten Semidünnschnitte immunzytochemisch nicht ausgewertet werden, da diese nicht auf den Objektträgern erhalten blieben.

4.8.7 Kollagen-Kit-Modell

Da das Collagen G in Gelform (Collagen G, Biochrom AG, Berlin) aufgrund der beobachteten geringen Zellproliferation zur Langzeitkultivierung von Endothelzellen und Keratinozyten nicht geeignet war, wurde ein Kollagen-Kit (3D Collagen Cell Culture System, Chemicon International, Schwalbach) für die Untersuchungen verwendet. Alle zu verwendenden Reagenzien wurden während der gesamten Vorbereitungszeit unter sterilen Bedingungen auf Eis gekühlt. Im ersten Schritt des Arbeitsvorganges wurden laut Angaben des Herstellers 4 ml

der Kollagenlösung mit 1 ml 5x PBS gründlich gemischt. Im zweiten Arbeitsschritt wurden 125 µl einer Neutralisationslösung hinzu pipettiert und sofort gemischt. Die so hergestellte Lösung wurde auf Eis gekühlt. Der empfohlene pH-Wert der gebrauchsfertigen Lösung lag im neutralen Bereich und spiegelte sich in einer roten Färbung wider. Aufgrund der geringen Materialmengen wurden die Kokulturen in 96-Lochplatten kultiviert. Die Kokulturen wurden in die Vertiefungen der 96-Lochplatten auspipettiert. Es wurden drei verschiedene Kollagen-Kit-Modelle entwickelt. Um das optimale Volumen für das Kollagen-Kit-Modell 1 und 2 zu ermitteln wurden jeweils zwei verschiedene Volumina (50 µl, 100 µl Kollagengellösung) pro Modell verwendet und untersucht. Die Kokulturen wurden mittels Invert-Mikroskop beobachtet. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Kokulturen für immunzytochemische Untersuchungen eingebettet. Hierfür wurden die Kokulturen vorsichtig vom Untergrund der Vertiefungen abgelöst und in Agar 100 eingebettet. Von den Proben wurden Semidünnschnitte hergestellt, die auf Objektträger aufgezogen wurden.

4.8.7.1 Kollagen-Kit-Modell 1

Für das Kollagen-Kit-Modell 1 wurden in die Vertiefungen 50 μ l beziehungsweise 100 μ l gebrauchsfertige Kollagengellösung (3D Collagen Cell Culture System, Chemicon International, Schwalbach) pipettiert. Die Zellkulturplatte wurde anschließend zur Gelbildung des Kollagens für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 1×10^4 Endothelzellen pro Vertiefung auf das Kollagengel ausgesät, in Selektivmedium P_0 kultiviert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Im Folgenden wurden 1×10^4 Keratinozyten pro Vertiefung auf den subkonfluenten Monolayer aus Endothelzellen ausgesät. Die weitere Kultivierung der Zellen wurde in DMEM+ fortgeführt. Die Kultivierungsdauer der Kokulturen betrug drei Tage (Abbildung 15).

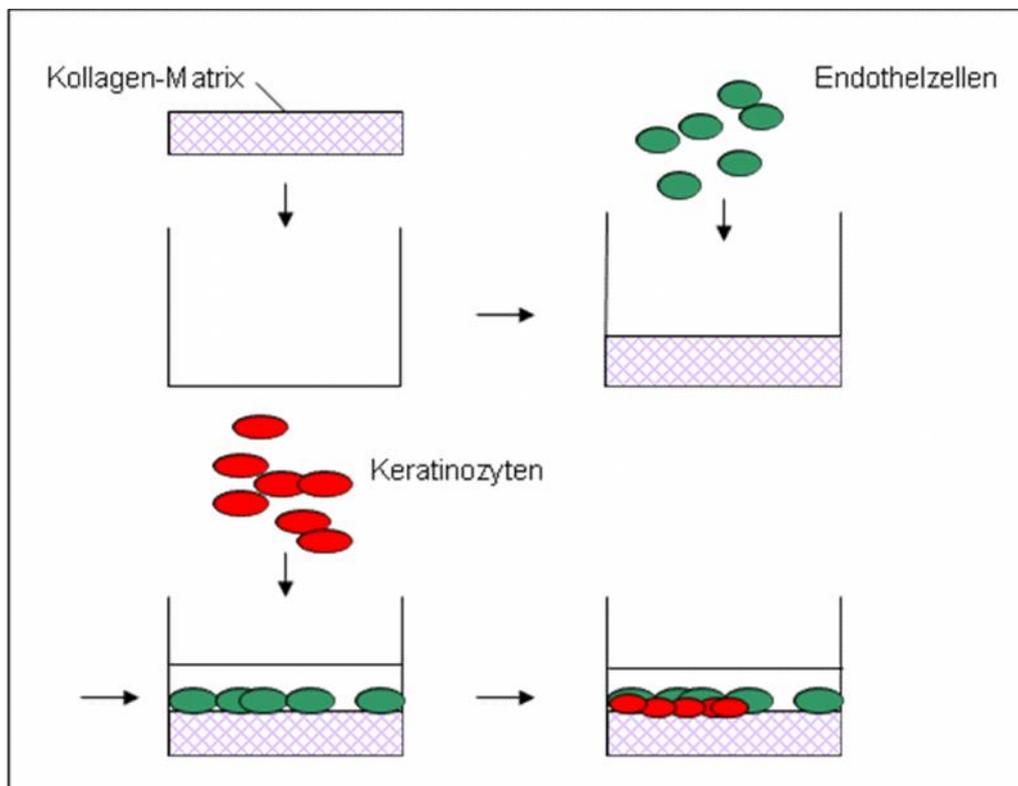


Abbildung 15: Kollagen-Kit-Modell 1

4.8.7.2 Kollagen-Kit-Modell 2

1×10^4 Endothelzellen wurden in 50 μl beziehungsweise 100 μl gebrauchsfertige Kollagengellösung (3D Collagen Cell Culture System, Chemicon International, Schwalbach) suspendiert und zügig in die Vertiefungen der Zellkulturplatte pipettiert. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Zellkulturplatte nach Angaben des Herstellers für 24 Stunden bis zur Gelbildung der Kollagengellösung im Brutschrank belassen. Anschließend wurden 1×10^4 Keratinozyten pro Vertiefung auf das Kollagengel ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in DMEM+ an drei aufeinander folgenden Tagen (Abbildung 16).

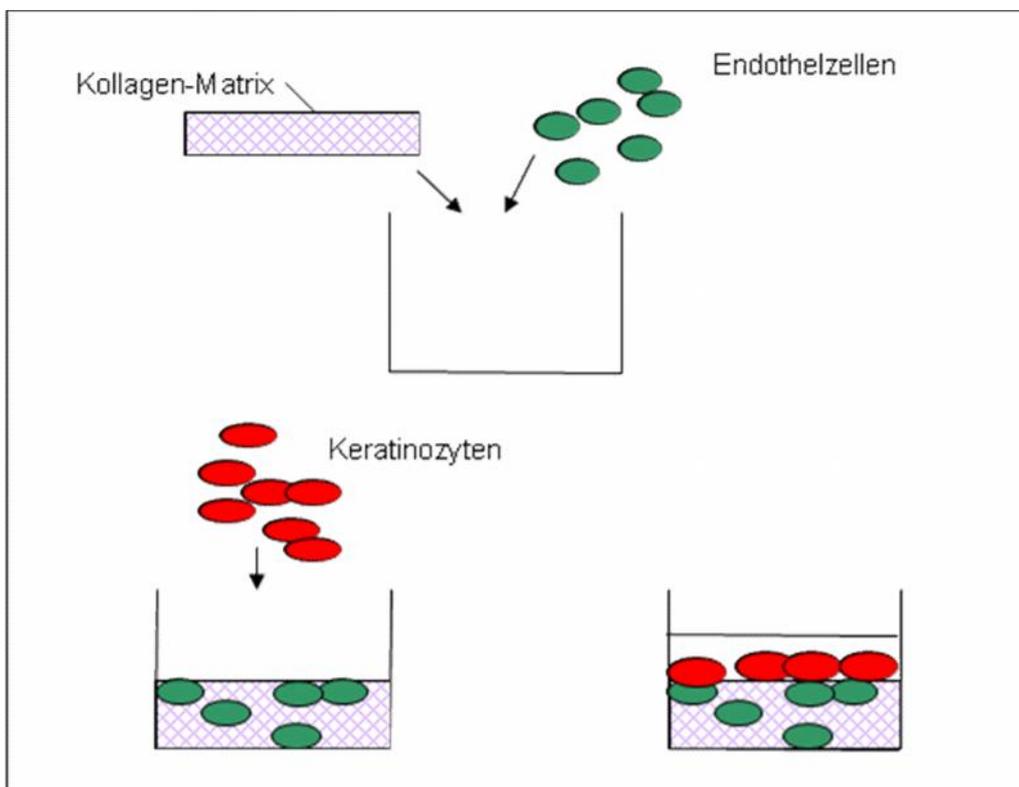


Abbildung 16: Kollagen-Kit-Modell 2

4.8.7.3 Kollagen-Kit-Modell 3

Im Kollagen-Kit-Modell 3 (siehe Abb.3) wurden 50 µl Kollagengellösung (3D Collagen Cell Culture System, Chemicon International, Schwalbach) in die Vertiefungen pipettiert und über 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. 1×10^4 Endothelzellen wurden anschließend auf das Kollagen gel gegeben und in Selektivmedium P_0 kultiviert. Am nächsten Arbeitstag wurden weitere 50 µl Kollagengellösung in die Vertiefung für die Bildung einer zweiten Gelschicht pipettiert. Im letzten Schritt wurden 1×10^4 Keratinozyten auf die zweite abschließende Gelschicht ausgesät und in DMEM+ kultiviert (Abbildung 17).

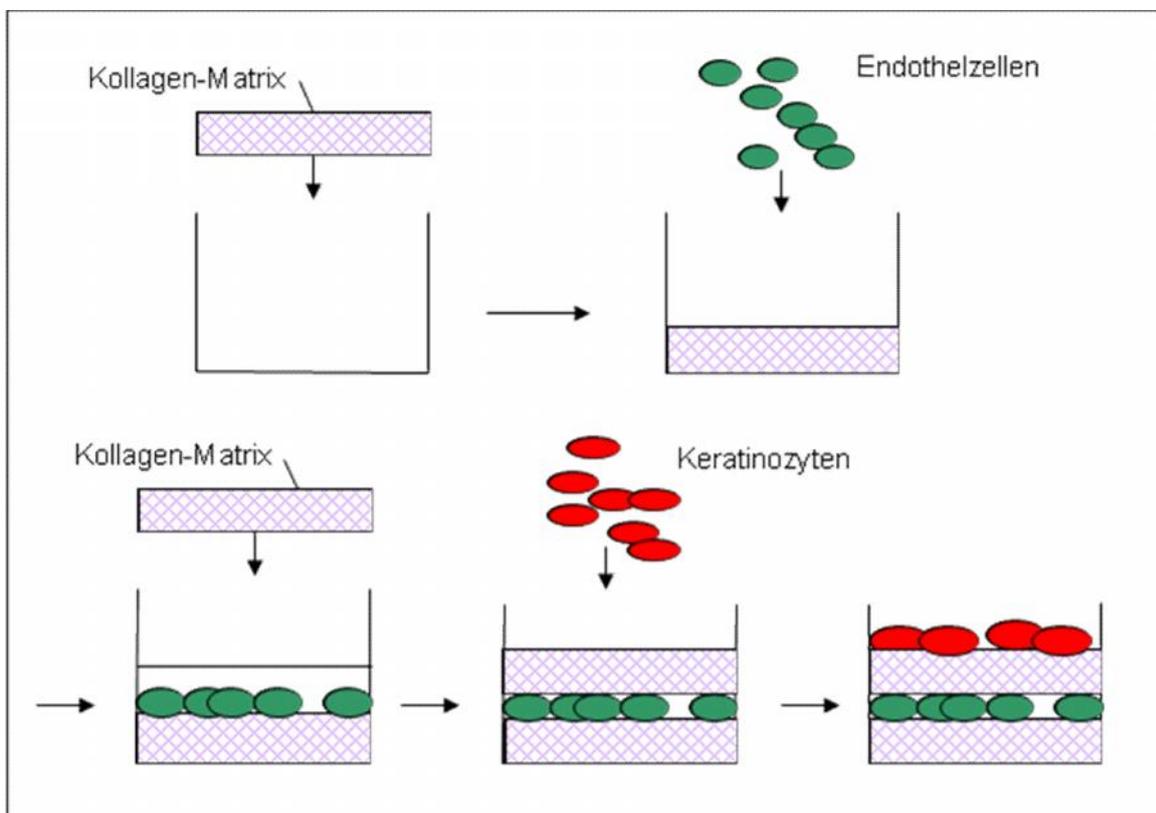


Abbildung 17: Kollagen-Kit-Modell 3

In einer zweiten indirekten Kultivierungsmethode wurden Endothelzellen und Keratinozyten mittels eines handelsüblichen Kollagen-Kits (Chemicon International, Schwalbach) in 96-Lochplatten nach Angaben des Herstellers kokultiviert.

Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden im Folgenden tabellarisch zusammengefasst:

Kollagen-Kit-Modell		Phasenkontrastmikroskopische Beobachtungen der Kulturen nach 48 Stunden in vitro
Kollagen-Kit-Modell 1	50 µl	auf der Kollagen-Matrix Zellkolonien in „Kopfsteinpflaster-Muster“ daneben einzeln liegende längliche Zellen mit Zellausläufern zu benachbarten Zellen
Kollagen-Kit-Modell 1	100 µl	auf der Kollagen-Matrix Zellkolonien in „Kopfsteinpflaster-Muster“ daneben einzeln liegende längliche Zellen, vereinzelt mit Zellausläufern zu benachbarten Zellen
Kollagen-Kit-Modell 2	50 µl/ 100 µl	innerhalb der Kollagen-Matrix einzeln liegende abgekugelte Zellen auf der Kollagen-Matrix längliche Zellen diffus verteilt mit Zellausläufern zu benachbarten Zellen
Kollagen-Kit-Modell 3	50 µl	zwischen der Kollagen-Matrix liegende Zellen in Zellkolonien auf der Kollagen-Matrix längliche Zellen diffus verteilt mit Zellausläufern zu benachbarten Zellen

Tabelle 4:

Phasenkontrastmikroskopische Beobachtungen der Kulturen mittels Invert-Mikroskop

Die Beobachtungen zeigten, dass eine Langzeitkultivierung von Endothelzellen und Keratinozyten im Rahmen dieser Arbeit nicht geeignet war. Die für die immunzytochemischen Untersuchungen hergestellten Semidünnschnitte lösten sich ausnahmslos von den Objektträgern ab, so dass diese nicht für weitere Auswertungen herangezogen werden konnten.

4.9 Phasenkontrastmikroskopie

4.9.1 Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen der direkten Kokulturen auf Glasplättchen

Zur Untersuchung der Zellmorphologie wurden in dieser Arbeit Endothelzellen und Keratinozyten in direkten Kokultur-Systemen, wie im Abschnitt 4.8.2 beschrieben, kultiviert. Hierfür erfolgte die Anzucht der Kokulturen auf mit azellulärer Kollagenlösung (Collagen G, Biochrom AG, Berlin) beschichteten Glasplättchen (Deckgläser, Ø12 mm) unter identischen Laborbedingungen. Die Morphologie der Zellen in den verschiedenen direkten Kokultur-Systemen wurde mittels Phasenkontrastmikroskop untersucht. Für jedes Kokultur-System wurden die Zellen in jeweils vier Vertiefungen von 24-Lochplatten ausgesät. Für die Untersuchung wurden pro Vertiefung drei bis vier Punkte willkürlich ausgewählt. Mittels einer auf dem Objektisch des Invert-Mikroskops fixierten Skalierung konnten diese Punkte bei jeder Untersuchung erneut aufgesucht werden. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer am Mikroskop installierten Digitalkamera.

4.10 Immunzytochemie

4.10.1 Immunzytochemische Untersuchungen der direkten Kokulturen auf Glasplättchen

Immunzytochemische Untersuchungen erfolgten an Kokulturen, die mittels direkter Methode, wie unter 4.8.2 beschrieben, auf mit azellulärer Kollagenlösung (Collagen G, Biochrom AG, Berlin) beschichteten Glasplättchen (Deckgläser, Ø12 mm) in 24-Lochplatten angezüchtet wurden. DMEM+ wurde als Medium für alle Kokulturen eingesetzt. Der Wechsel wurde wöchentlich zweimal durchgeführt. Die immunzytochemische Markierung der mikrovaskulären Endothelzellen erfolgte mit dem Primärantikörper gegen CK19 jeweils in den Kokultur-Systemen 1 (K+E) und 3 (Suspension). Die epidermalen Keratinozyten wurden dagegen mit dem Primärantikörper gegen CK14 ausschließlich im Kokultur-System 2 (E+K) immunzytochemisch markiert (Tabelle 5).

Kokultur-System	Primärantikörper	Verdünnung	Zellen
Direktes Kokultur-System 1 (K+E)	Monoklonaler Antikörper Maus anti-Schaf- CK19	1:100	Endothelzellen
Direktes Kokultur-System 2 (E+K)	Monoklonaler Antikörper Maus anti-Schaf- CK14	1:100	Keratinozyten
Direktes Kokultur-System 3 (Suspension)	Monoklonaler Antikörper Maus anti-Schaf- CK19	1:100	Endothelzellen

Tabelle 5:

Immunzytochemische Markierung von Endothelzellen und Keratinozyten

Die Kokulturen wurden auf mit Kollagen beschichteten Glasplättchen über vier Wochen kultiviert. Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden nach 7, 14, 21 und 28 Tagen die Kokulturen in jeweils vier Vertiefungen verwendet. Bei jeder Untersuchung dienten die Kokulturen in zwei Vertiefungen als Proben 1 und 2. Zur Kontrolle des Detektionssystems wurden die Kokulturen in zwei weiteren Vertiefungen der Kulturplatte als Negativkontrollen mitgeführt. Die Negativkontrolle 1 wurde jeweils mit Normalserum (Serum-Negativkontrolle) und die Negativkontrolle 2 mit PBS (Puffer-Negativkontrolle) anstelle des Primärantikörpers inkubiert.

Zunächst wurde das Medium von den Kokulturen abgesaugt und diese zweimal mit PBS gewaschen. Eisgekühltes Methanol-Aceton (1:1) wurde zur Fixierung 5 bis 10 min auf die Zellen gegeben. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen wiederum zweimal mit PBS gespült. Zur weiteren Fixierung wurden die Zellen in Methanol-H₂O₂ 5 bis 10 min inkubiert und anschließend gründlich mit PBS gespült. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden wurden die Zellen 20 min mit dem Proteinblocker bei Raumtemperatur inkubiert. Für jedes Kokultur-System wurden, nach Absaugen des Proteinblockers, in die Vertiefungen der Proben 1 und 2 jeweils 150 µl Primärantikörper (Anti-CK14/Anti-CK19) mit je einer Konzentration von 1:100 gegeben.

Nach 24 Stunden Inkubation im Dunkeln in einer feuchten Kammer bei 4 bis 8°C wurden die Primärantikörper und PBS beziehungsweise Normalserum abgesaugt. Die Zellen wurden mit

PBS zweimal gespült. Anschließend wurde in jede Vertiefung 150 µl Sekundärantikörper (1:200) gegeben und bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die Zellen mit PBS gespült. Im Folgenden wurden für 30 min 150 µl StreptABC auf die Zellen gegeben und anschließend mit PBS gespült. Zur Anfärbung der mit Antikörper markierten Zellen wurden die Zellkulturen in DAB im Dunkeln inkubiert. Die Inkubationsdauer war individuell unterschiedlich und wurde unter makroskopischer Kontrolle ermittelt. Nach Braunfärbung der markierten Zellen wurde das DAB abgesaugt und die Kokulturen mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellkerne mit Hämalaun nach Meyer für 2 min angefärbt. Nach gründlichem Spülen mit PBS wurden die Glasplättchen mit einer Pinzette aus den Vertiefungen entnommen und mit einem Tropfen Glycerin-Gelatine auf Objektträger gelegt und versiegelt. Die Beurteilung der immunzytochemischen Untersuchungen erfolgte unter dem Phasenkontrastmikroskop (Diaplan, Leitz, Wetzlar). Für die Dokumentation diente eine am Mikroskop installierte Digitalkamera (DXM 1200, Nikon, Düsseldorf) mit angeschlossener Bildbearbeitungssoftware (ACT-1 Version 2.20).

4.11 Transmissionselektronenmikroskopie

4.11.1 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der direkten Kokulturen auf Millicell[®]-PCF-Filtereinsätzen

Um die Morphologie der kultivierten Zellen im Einzelnen betrachten und beurteilen zu können, wurden Endothelzellen und Keratinozyten in Millicell[®]-PCF-Filtereinsätzen (Millipore GmbH, Eschborn) mit einer direkten Methode, wie im Abschnitt 4.8.4 beschrieben, kokultiviert. Die Filtereinsätze waren so geformt, dass sie optimal in die Vertiefungen von 24-Lochplatten eingesetzt werden konnten. Die für alle Kokultur-Systeme verwendeten Filtereinsätze wiesen an der Unterseite drei Stützen auf, so dass ein Abstand zum Untergrund der Kulturplatten blieb. Damit wurde gewährleistet, dass die ausgesäten Zellen sowohl von der Oberseite (apikal) als auch von der Unterseite (basolateral) mit Nährmedium versorgt wurden. Die Membranen der Filtereinsätze wiesen eine Porengröße von 0,4 µm auf. In allen Experimenten wurden die Kokulturen in 24-Lochplatten (Fa. Iwaki, Tokio, Japan) kultiviert. Hierbei wurden zunächst die Filtereinsätze in jeweils 8 Vertiefungen gegeben und anschließend mit Kollagenlösung (Collagen G, Biochrom AG, Berlin) beschichtet. Als Nährmedium für die Kultivierung aller Kokulturen wurde DMEM+ gewählt und dieses wöchentlich zweimal gewechselt. Bei einer Kultivierungsdauer von vier Wochen wurden jeweils nach 7, 14, 21 und 28 Tagen willkürlich

jeweils zwei Filtereinsätze pro Kokultur-System mit einer sterilen Pinzette entnommen und für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen eingebettet.

Hierfür wurde das Medium aus den Vertiefungen beziehungsweise aus den Filtereinsätzen abgesaugt und die Kokulturen anschließend mit PBS (0,01 M, pH 7,4) gespült. Die Filtereinsätze wurden aus den Vertiefungen entnommen und die Membranen vorsichtig mit einem sterilen Skalpell aus den Millicell®-PCF-Filtereinsätzen herausgeschnitten und dreimal für 10 min in mit Cacodylat-Puffer (Cacodylsäure-Natriumsalz-Aqua bidest. 0,1 M, pH 7.2) gefüllte Kulturgefäße gegeben. Nach dem Spülen wurden die Membranen eine Stunde in Karnovsky-Lösung (2 % Paraformaldehyd und 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer) bei 4-8°C im Dunkeln fixiert. Danach wurde die Fixierungslösung abgesaugt und die Kulturgefäße auf einen Schüttler gestellt. Mit Cacodylat-Puffer (0,1 M) wurde dreimal für 10 min bei Raumtemperatur gespült. Zur Nachfixierung und Kontrastierung wurden die Membranen zwei Stunden in einem Gemisch aus 1% Osmiumtetroxid und 1,5 % Kaliumferrocyanat (in 0,1 M Cacodylat-Puffer) bei 4 bis 8°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Membranen erneut ca.10 min in Cacodylat-Puffer (0,1 M) gespült und 24 Stunden im Dunkeln bei 4 bis 8°C in Pufferlösung belassen. Am nächsten Tag wurden die Membranen auf einen Schüttler verbracht und in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 50 %, 70 %, 80 % und 90 % (je 15 min) dehydriert und anschließend zweimal 15 min in reinem Propylenoxid (100 %) inkubiert. Die Membranen wurden zur Einbettung in Epon zunächst über Nacht im Propylen-Epon-Gemisch (1:1) auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation in reinem Epon über Nacht bei 4 bis 8°C im Dunkeln.

Am nächsten Tag wurden die Membranen in je drei gleichgroße Proben zerschnitten und in reines Epon eingebettet. Die Proben wurden bis zum Auspolymerisieren des Kunststoffes in einen Brutschrank bei 65°C gestellt. Nach dem Auspolymerisieren wurden von den Epon-Blöckchen mit dem Ultramikrotom 1 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt, auf Objektträger gezogen, bei 80°C getrocknet und 45 sec mit einigen Tropfen Richardson-Lösung gefärbt. Nach Abspülen der Färbelösung mit Aqua dest. wurden die Proben eingedeckelt und lichtmikroskopisch beurteilt. Die Anfärbung und lichtmikroskopische Voruntersuchung diente der Orientierung für das Anfertigen von Ultradünnschnitten.

Für die ultrastrukturellen Untersuchungen wurden Ultradünnschnitte (60 nm) von geeigneten Proben hergestellt. Diese wurden auf Kupfergrids aufgebracht und mit Uranylacetat (Ultrastain I) und Bleicitrat (Ultrastain II) für jeweils 10 min kontrastiert.

Die Untersuchung der Kokulturen fand am Transmissionselektronenmikroskop (EM 10CR, Zeiss, Jena) statt. Für die Dokumentation wurden Kodak Electron Microscope Filme (Kodak, Stuttgart) verwendet.

5 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche direkte Kokultur-Modelle aus mikrovaskulären Endothelzellen und epidermalen Keratinozyten der Rinderklaue entwickelt und etabliert, um die Zell-Zell-Interaktionen zwischen den beiden Zellpopulationen in vitro untersuchen zu können. Im Vordergrund der in vitro-Untersuchungen standen die morphologische Betrachtung der beiden Zellpopulationen, die immunzytochemische Identifizierung der Zellen in den Kokulturen und schließlich die Charakterisierung der in vitro-Modelle. In den folgenden Kapiteln werden die verschiedenen direkten Kokultur-Modelle hinsichtlich ihrer Unterschiede und Gemeinsamkeiten beschrieben.

5.1 Untersuchung der Morphologie von Endothelzellen und Keratinozyten und deren Interaktion im direkten Kokultur-Modell auf Glasplättchen

Zur Untersuchung der drei direkten Kokultur-Systeme (K+E, E+K, Suspension) wurden alle Zellen auf mit Kollagenlösung beschichteten Glasplättchen in 24-Lochplatten ausgesät. Die Kultivierung der Kokulturen erfolgte in DMEM+. Alle drei Kokultur-Systeme wurden in einem Zeitraum von vier Wochen unter standardisierten Laborbedingungen untersucht.

5.1.1 Phasenkontrastmikroskopische Untersuchung der direkten Kokultur-Modelle auf Glasplättchen

5.1.1.1 Untersuchung des direkten Kokultur-Systems 1 (K+E)

Der Kulturschalenboden war 24 Stunden nach Aussaat vollständig mit Zellen bedeckt. Durch Zusammenlagerungen der langgestreckten Keratinozyten entstanden zahlreiche sternförmige Cluster, die ohne erkennbares Verteilungsmuster in der gesamten Vertiefung verteilt vorkamen. Die Cluster traten über lange Zellausläufer aus ein bis drei parallel aneinander gelagerten langgestreckten Keratinozyten miteinander in Verbindung. Die Endothelzellen, die auf die subkonfluenten Monolayer aus Keratinozyten gesät wurden, waren 24 Stunden nach Einsaat auf dem Kulturschalenboden adhärent und schlossen sich in den zellfreien Bereichen der Vertiefung zwischen den langgestreckten Keratinozytenclustern zu Kolonien aus polygonalen Endothelzellen zusammen (Abbildung 18).

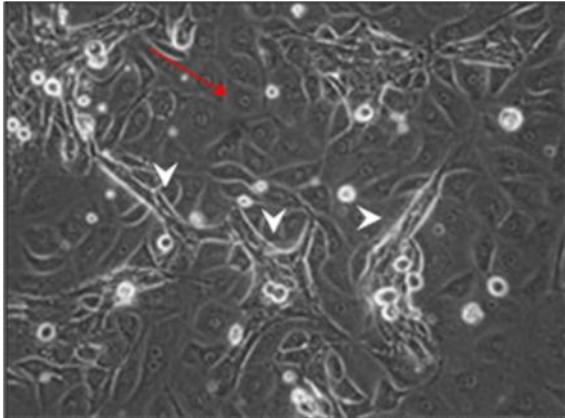


Abbildung 18: Direktes Kokultur-System 1 (K+E) nach 24 Stunden in Kultur

Zusammenlagerung langgestreckter Keratinozyten in sternförmige Cluster mit Ausbildung von Zellausläufern zu benachbarten Clustern (*weiße Pfeilspitzen*). Auf dem Kulturschalenboden adhären polygonale Endothelzellen in Kolonien zwischen Keratinozytenclustern (*roter Pfeil*). Phasenkontrastmikroskopie x 160

Im weiteren Verlauf der Untersuchung vergrößerten sich bis zum 2. Tag *in vitro* die Keratinozytencluster zunehmend. Gleichzeitig bildeten sich die einzelnen Zellausläufer durch Auftreten weiterer langgestreckter Keratinozyten zu breiten Zellstraßen um. Innerhalb dieser Zellstraßen konnten durch die dichte Zusammenlagerung der Keratinozyten keine einzelnen Zellen beurteilt werden. Polygonale Endothelzellen lagerten sich zwischen den Zellstraßen aus Keratinozyten zu Kolonien zusammen. Benachbarte Endothelzellkolonien kommunizierten über einzelne längliche Endothelzellen. Die den Keratinozytenclustern direkt angrenzenden Endothelzellen waren charakterisiert durch eine längliche Zellform und zahlreiche Mitosen (Abbildung 19).

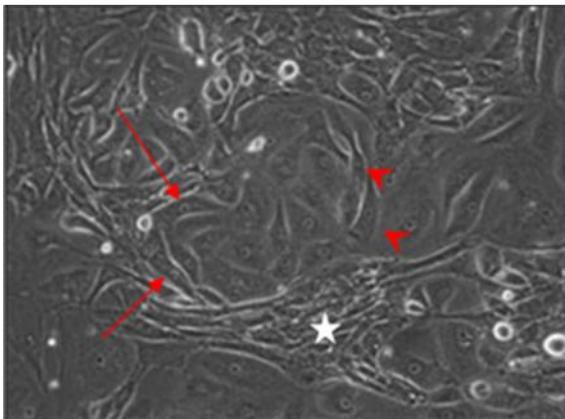


Abbildung 19: Direktes Kokultur-System 1 (K+E) nach 2 Tagen in Kultur

Untereinander kommunizierende Zellstraßen aus langgestreckten Keratinozyten (*Stern*). An den Keratinozyten direkt angrenzende proliferierende längliche Endothelzellen (*rote Pfeile*). Benachbarte Endothelzellkolonien kommunizieren über einzelne längliche Endothelzellen (*rote Pfeilspitzen*). Phasenkontrastmikroskopie x 160

Nach 7 Tagen in Kultur konnten zunehmend längliche Endothelzellen mit der Ausbildung von Zellausläufern in linearer Anordnung am Randbereich der Zellstraßen aus Keratinozyten beobachtet werden. Innerhalb der Zellkolonien waren hauptsächlich polygonale Endothelzellen zu erkennen (Abbildung 20, Abbildung 38/A).

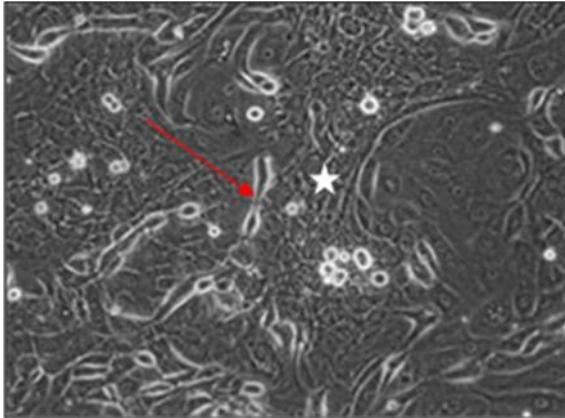


Abbildung 20: Direktes Kokultur-System 1 (K+E) nach 7 Tagen in Kultur

Im Randbereich der Zellstraßen aus Keratinozyten (*Stern*) zunehmend längliche Endothelzellen in linearer Anordnung (*roter Pfeil*). Phasenkontrastmikroskopie x 100

Wenige Endothelzellen lösten sich aus ihrem Zellverband und wanderten bis zum 14. Kultivierungstag über die Keratinozyten und bildeten auf den Zellstraßen erneut Kolonien. Die Keratinozyten behielten hierbei ihre Adhärenz zum Kulturschalenboden. Endothelzellkolonien waren untereinander durch einzelne Endothelzellen mit deutlich länglicher Gestalt verbunden. Die endothelialen Zellausläufer schienen die am Kulturschalenboden adhärennten Keratinozyten zu überbrücken. Innerhalb der Endothelzellkolonien, die auf den Keratinozytenclustern adhärennt waren, bildeten sich ringförmige Strukturen aus länglichen Zellen. Die Areale innerhalb dieser ringförmigen Strukturen waren zellfrei (Abbildung 21, Abbildung 38/B).

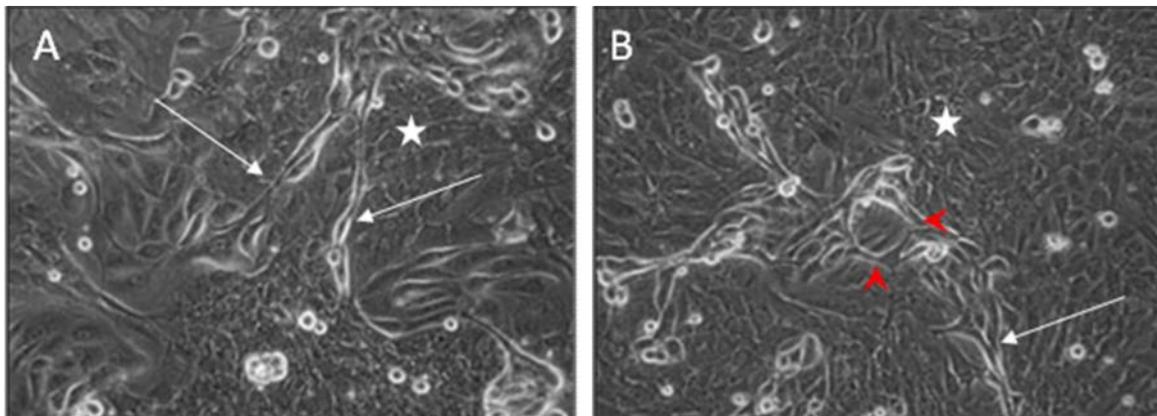


Abbildung 21: Direktes Kokultur-System 1 (K+E) nach 14 Tagen in Kultur

A-B: Endothelzellen wandern auf Keratinozytencluster (*Sterne*) und bilden Kolonien. Zellausläufer aus einzelnen länglichen Endothelzellen (*weiße Pfeile*) verbinden benachbarte Endothelzellkolonien. **B:** Innerhalb der Kolonien geformte ringförmige Strukturen (*rote Pfeilspitzen*). Phasenkontrastmikroskopie A und B x 160

Durch weitere Migration dehnten sich die aus Keratinozyten geformten Zellstraßen bis zum 16. Kultivierungstag sowohl in der Peripherie als auch in der Mitte der Vertiefungen räumlich aus und dominierten somit das Zellbild durch Ausbildung eines subkonfluenten Zellrasens. Die auf dem Kulturschalenboden adhären und über Zellausläufer in Verbindung stehenden Endothelzellkolonien wanderten aufeinander zu. Im Randbereich der Endothelzellkolonien kam es zu einer ausgeprägten Abkuglung von Endothelzellen. Zahlreiche Zellen schwammen zu diesem Zeitpunkt der Kultivierung frei im Medium. In wenigen Tagen fand ein stetiger Umbauprozess statt, der durch die Verkleinerung der Endothelzellkolonien gekennzeichnet war (Abbildung 22, Abbildung 38/C).

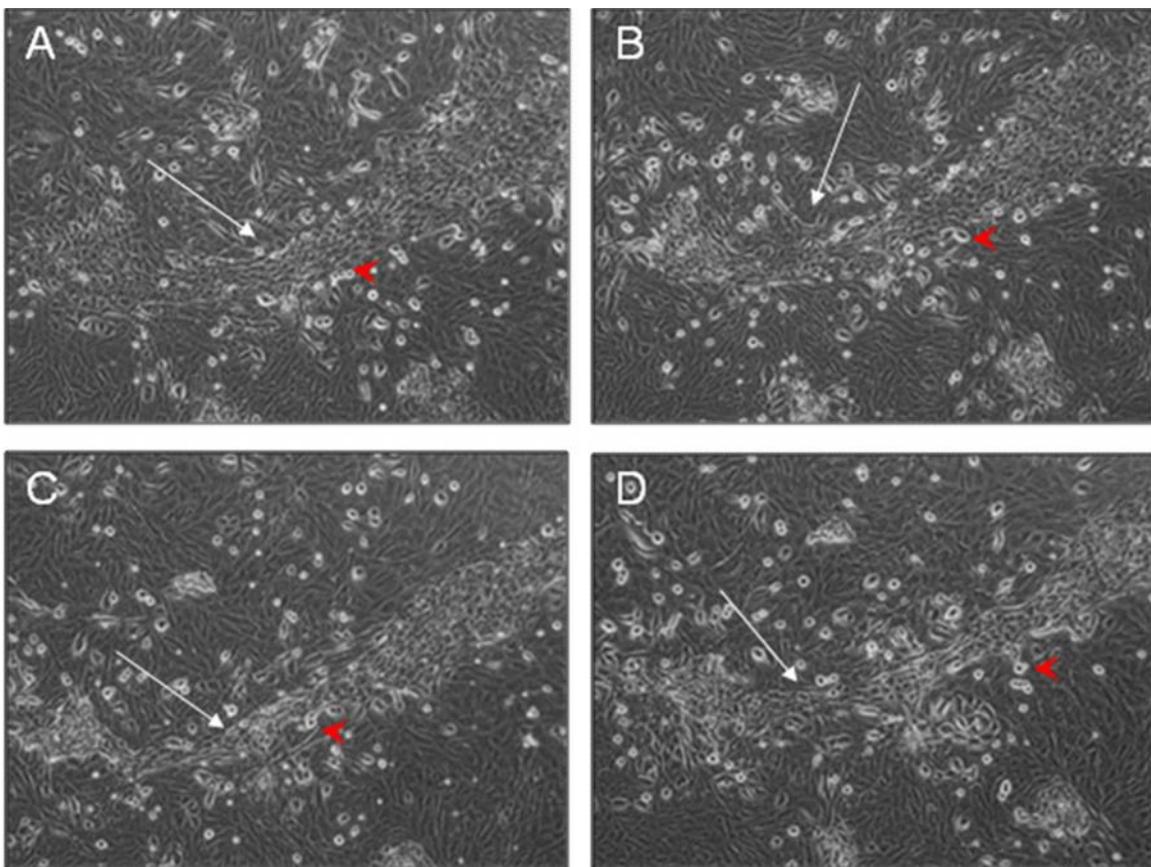


Abbildung 22: Direktes Kokultur-System 1 (K+E), ab dem 20. Tag in Kultur

A-D: Nach 20 Kultivierungstagen verkleinerten sich die Endothelzellkolonien stetig (*weiße Pfeile*). An den Kontaktzonen zu den Keratinozyten kugelten sich Endothelzellen zunehmend ab (*rote Pfeilspitzen*). **B:** 21 Tage in Kultur. **C:** 23 Tage in Kultur. **D:** 24 Tage in Kultur. Phasenkontrastmikroskopie A-D x 100

Am 28. Tag in Kultur traten vereinzelt zellfreie Lücken auf dem Kulturschalenboden auf, die sich räumlich zunehmend ausdehnten. Keratinozyten gliederten sich in ein zelluläres Netzwerk aus kommunizierenden Clustern ein, die über ein weit verzweigtes, eindimensionales Gerüst aus Zellausläufern miteinander in Verbindung standen. Die Endothelzellen waren nunmehr ausschließlich auf den Clustern der Keratinozyten adhärent und schlossen sich in dichte Kolonien zusammen (Abbildung 38/D). Innerhalb der Kolonien waren ringförmige Strukturen, die ein zellfreies Areal umschlossen, aus mindestens zwei länglichen Endothelzellen zu erkennen. Auf dem Kulturschalenboden konnten keine adhärennten Endothelzellen mehr beobachtet werden. Nach der vierwöchigen Kultivierung hatten die Zellen eine mehrlagige Kokultur ausgebildet (Abbildung 23).

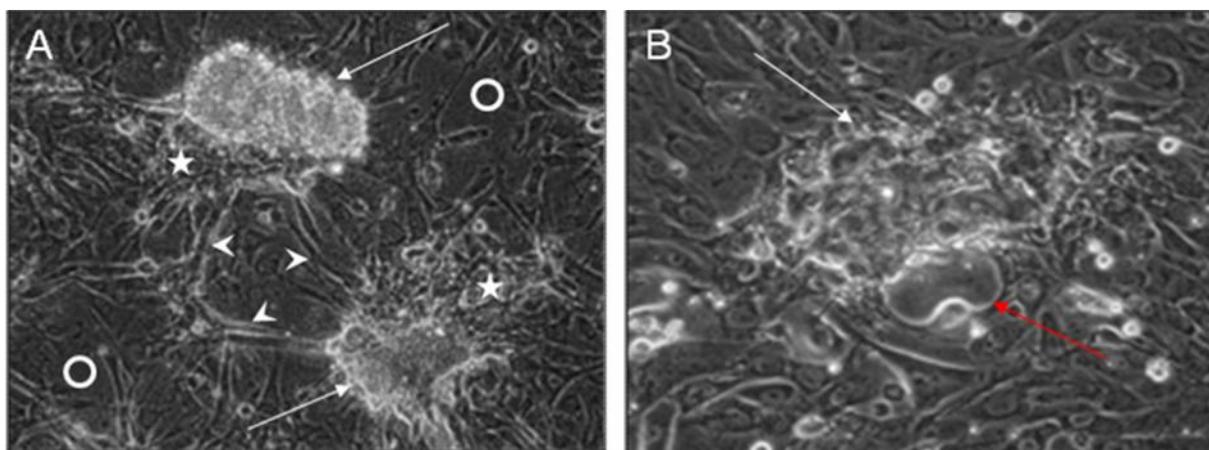


Abbildung 23: Direktes Kokultur-System 1 (K+E) nach 28 Tagen in Kultur

A: Ausbildung einer mehrschichtigen Zellkultur nach 28 Tagen. Zellfreie Lücken auf dem Kulturschalenboden (*Kreise*). Über Zellausläufer (*weiße Pfeilspitzen*) kommunizierende Cluster aus Keratinozyten (*weiße Sterne*). Auf den Keratinozytenclustern adhärennte Endothelzellkolonien (*weiße Pfeile*). **B:** In der Endothelzellkolonie (*weißer Pfeil*) geformte ringförmige Struktur (*roter Pfeil*). Phasenkontrastmikroskopie A x 160, B x 200

5.1.1.2 Untersuchung des direkten Kokultur-Systems 2 (E+K)

Nach 24 Stunden Kultivierungszeit war der Kulturschalenboden vollständig mit einem konfluenten Zellrasen bedeckt. Polygonale und längliche Endothelzellen bildeten zunächst einen subkonfluenten Monolayer, der charakterisiert war durch die Ausbildung von Endothelzellkolonien, die diffus über den Kulturschalenboden verteilt waren. Einzelne Endothelzellkolonien bestanden aus mindestens vier parallel aneinander gelagerten Endothelzellen. Untereinander kontaktierten die Endothelzellkolonien über einzelne langgestreckte Zellausläufer. Die Keratinozyten gruppieren sich nach Aussaat zwischen den

Endothelzellkolonien zu dichten sternförmigen Zellclustern. Einzelne Zellen in diesem Zellverband waren phasenkontrastmikroskopisch nicht zu differenzieren. Es entstand eine einlagige konfluente Kokultur (Abbildung 24).

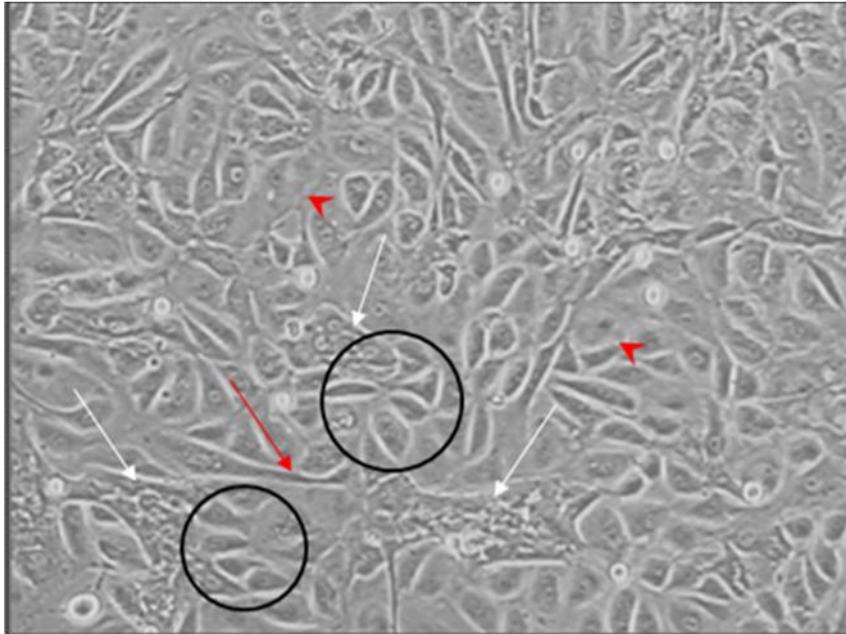


Abbildung 24: Direktes Kokultur-System 2 (E+K) nach 24 Stunden in Kultur

Endothelzellkolonien aus mindestens vier zusammengelagerten Endothelzellen (*Ring*). Länggestreckte Endothelzellen bilden die Verbindung zu benachbarten Kolonien (*roter Pfeil*). Sternförmige Cluster aus Keratinozyten (*weiße Pfeile*). Vereinzelt auftretende große runde Endothelzellen (*rote Pfeilspitzen*). Phasenkontrastmikroskopie x 100

Die Anzahl und der Umfang der aus Keratinozyten bestehenden Cluster nahmen im weiteren Verlauf der Kultivierung bis zum 3. Tag deutlich zu. Die Cluster breiteten sich sternförmig mit zum Teil frei endenden Zellausläufern aus. Dicht benachbarte Cluster nahmen über diese Zellausläufer miteinander Verbindung auf. Die an den Zellausläufern der Keratinozyten angrenzenden Endothelzellen wiesen hauptsächlich eine längliche Zellform auf. Im Folgenden konnte beobachtet werden, dass die zelluläre Entwicklung sowohl der Keratinozyten als auch die der Endothelzellen von Bereichen ausging, in denen beide Zelltypen in unmittelbarem Kontakt zueinander lagen (Abbildung 25).

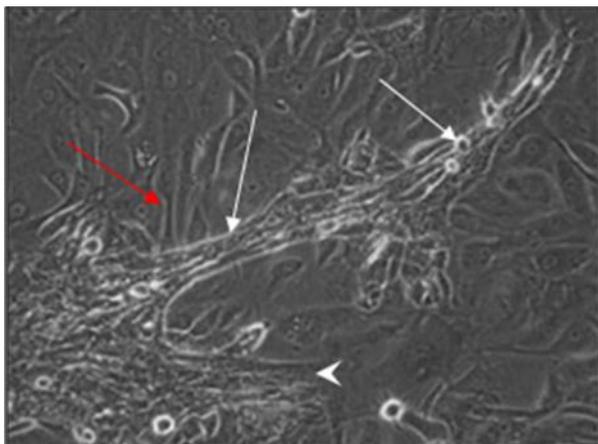


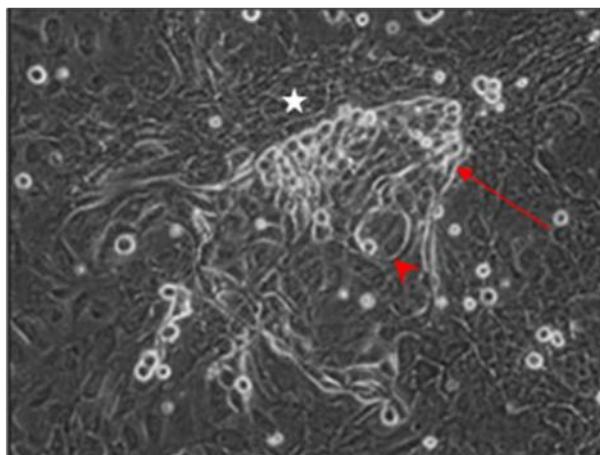
Abbildung 25: Direktes Kokultur-System 2 (E+K) nach 3 Tagen

Parallel aneinander gelagerte Zellausläufer aus langgestreckten Keratinozyten (*weiße Pfeile*) verbinden benachbarte sternförmige Keratinozytencluster. Zum Teil frei endende Zellausläufer (*weiße Pfeilspitze*). Längliche Endothelzellen im Randbereich der Keratinozyten (*roter Pfeil*). Phasenkontrastmikroskopie x 200

Die von den zahlreichen Clustern ausgehenden Zellausläufer verbreiterten sich vom 6. bis 10. Kultivierungstag zu dichten Zellstraßen (Abbildung 41/A). Bereits zu diesem Zeitpunkt war eine phasenkontrastmikroskopische Differenzierung der beteiligten Zellen nicht mehr möglich. Vereinzelt traten zwischen den Endothelzellkolonien auch Endothelzellen runder Gestalt auf. Entlang der Zellstraßen und der Peripherie der Keratinozytencluster lagerten sich hauptsächlich längliche Endothelzellen linear aneinander. Vereinzelt formierten sich innerhalb der Kolonien ringförmigen Strukturen mit einem zentralen zellfreien Areal aus länglichen Endothelzellen (Abbildung 26).

Abbildung 26: Direktes Kokultur-System 2 (E+K), 6 bis 10 Tage nach Einsaat

Ausbildung breiter Zellstraßen aus Keratinozyten (*Stern*). Ausbildung von Endothelzellkolonien (*roter Pfeil*). Innerhalb der Endothelzellkolonien entstandene ringförmige Strukturen aus länglichen Zellen (*rote Pfeilspitze*). Phasenkontrastmikroskopie x 100



Ab dem 14. Kultivierungstag hatte sich ein subkonfluenten Zellrasen aus Keratinozyten ausgebreitet. Phasenkontrastmikroskopisch waren einzelne Zellen durch eine augenscheinliche Auflockerung des Zellverbands zu erkennen. Die Keratinozyten waren nun gekennzeichnet durch eine polygonale Gestalt mit großem rundem Zellkern. Die Endothelzellkolonien waren

sowohl auf dem Kulturschalenboden als auch auf Keratinozytenclustern zu finden. Die Endothelzellkolonien auf den Keratinozytenclustern verdichteten sich, so dass einzelne Endothelzellen nicht zu differenzieren waren. Im Randbereich ihrer Kolonien kugelten sich die Endothelzellen stellenweise ab. Vereinzelt bildeten längliche Endothelzellen innerhalb ihrer Kolonie ringförmige Strukturen aus (Abbildung 41/B). Die zwischen den polygonalen Keratinozyten des subkonfluenten Zellrasens liegenden Endothelzellkolonien waren dagegen charakterisiert durch Zellen länglicher Gestalt. Die einzelnen Endothelzellkolonien kontaktierten über lange einzelne Zellausläufer. Hierbei wurden die Keratinozyten von den endothelialen Zellausläufern überbrückt (Abbildung 27 und 28).

Abbildung 27: Direktes Kokultur-System 2 (E+K), 14 Tage nach Einsaat

A: Auf den Keratinozytenclustern (*Stern*) in Kolonien zusammen geschlossene Endothelzellen (*rote Pfeile*). Zwischen den polygonalen Keratinozyten des Zellrasens (*weißer Pfeil*) lokalisierte Endothelzellkolonien mit Zellen länglicher Gestalt in ringförmiger Struktur (*weiße Pfeilspitze*). Über längliche Zellausläufer verbundene Endothelzellkolonien (*rote Pfeilspitzen*). Phasenkontrastmikroskopie x 100

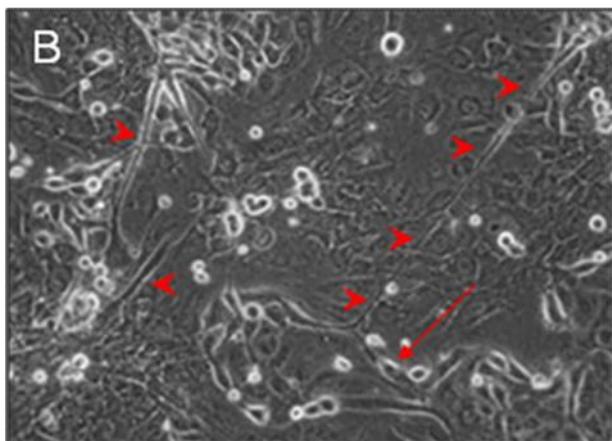
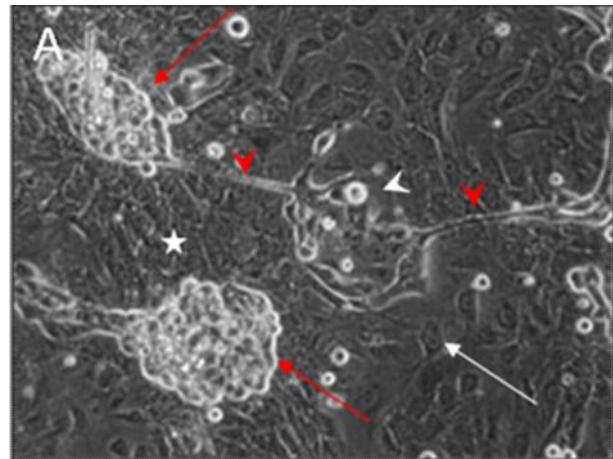


Abbildung 28: Direktes Kokultur-System 2 (E+K) nach 14 Tagen in Kultur

B: Zwischen polygonalen Keratinozyten lokalisierte Endothelzellkolonien (*roter Pfeil*), die untereinander durch Zellausläufer verbunden sind (*rote Pfeilspitzen*). Phasenkontrastmikroskopie x 100

In diesem Beobachtungszeitraum konnten des Weiteren vereinzelt auf den Keratinozyten ringförmige Strukturen aus zwei oder mehreren länglichen zirkulär angeordneten Endothelzellen beobachtet werden. Die einzelnen Zellkörper waren hierbei deutlich zu erkennen. Die innerhalb der ringförmigen Strukturen begrenzten Areale waren zellfrei (Abbildung 29).

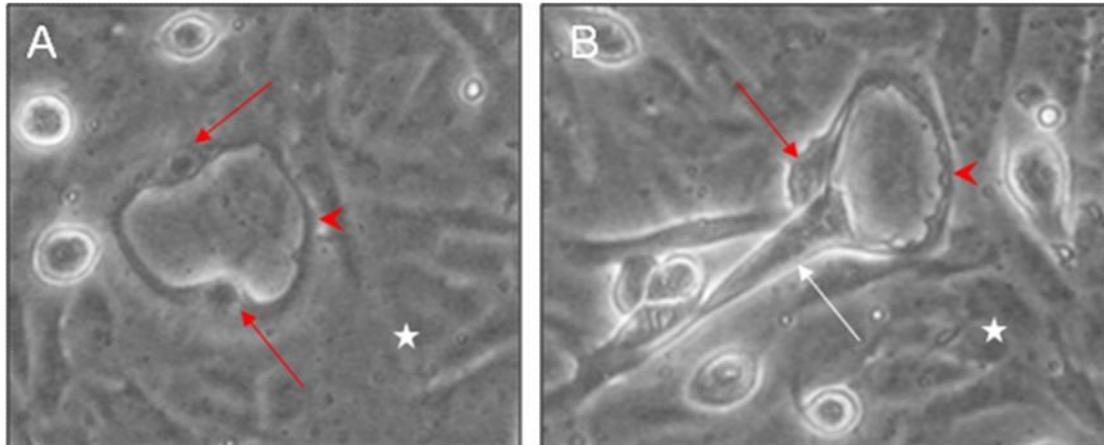


Abbildung 29: Direktes Kokultur-System 2 (E+K) nach 14 Tagen

A-B: Auf Keratinozyten (*Sterne*) gebildete ringförmige Strukturen (*rote Pfeilspitzen*) aus ein oder mehreren Endothelzellen. Deutlich dargestellte Zellkörper der Endothelzellen (*rote Pfeile*). Länglicher Zellausläufer einer Endothelzelle (*weißer Pfeil*). Phasenkontrastmikroskopie x 200

In der Zeit vom 23. bis zum 26. Kultivierungstag verkleinerten sich alle Endothelzellkolonien im gesamten Bereich der Vertiefung der Kulturschale zu runden Zellansammlungen. Diese waren ausschließlich auf den Keratinozyten adhären. Zwischen den Zellansammlungen waren keine Zellausläufer mehr zu beobachten (Abbildung 41/C). Ab dem 28. Tag nach Einsaat kam es zur Ausbildung einer mehrlagigen Kokultur. Durch die phasenkontrastmikroskopische Betrachtung konnte die Ausbildung einer mindestens zweilagigen Zellschicht aus Keratinozyten verifiziert werden. Die unterste Schicht war charakterisiert durch einen subkonfluenten Zellrasen aus Keratinozyten mit zellfreien Lücken am Kulturschalenboden. Die auf der oberen Zellschicht aus Keratinozyten adhären Endothelzellkolonien waren gekennzeichnet durch ihre rundliche Clusterbildung (Abbildung 30).

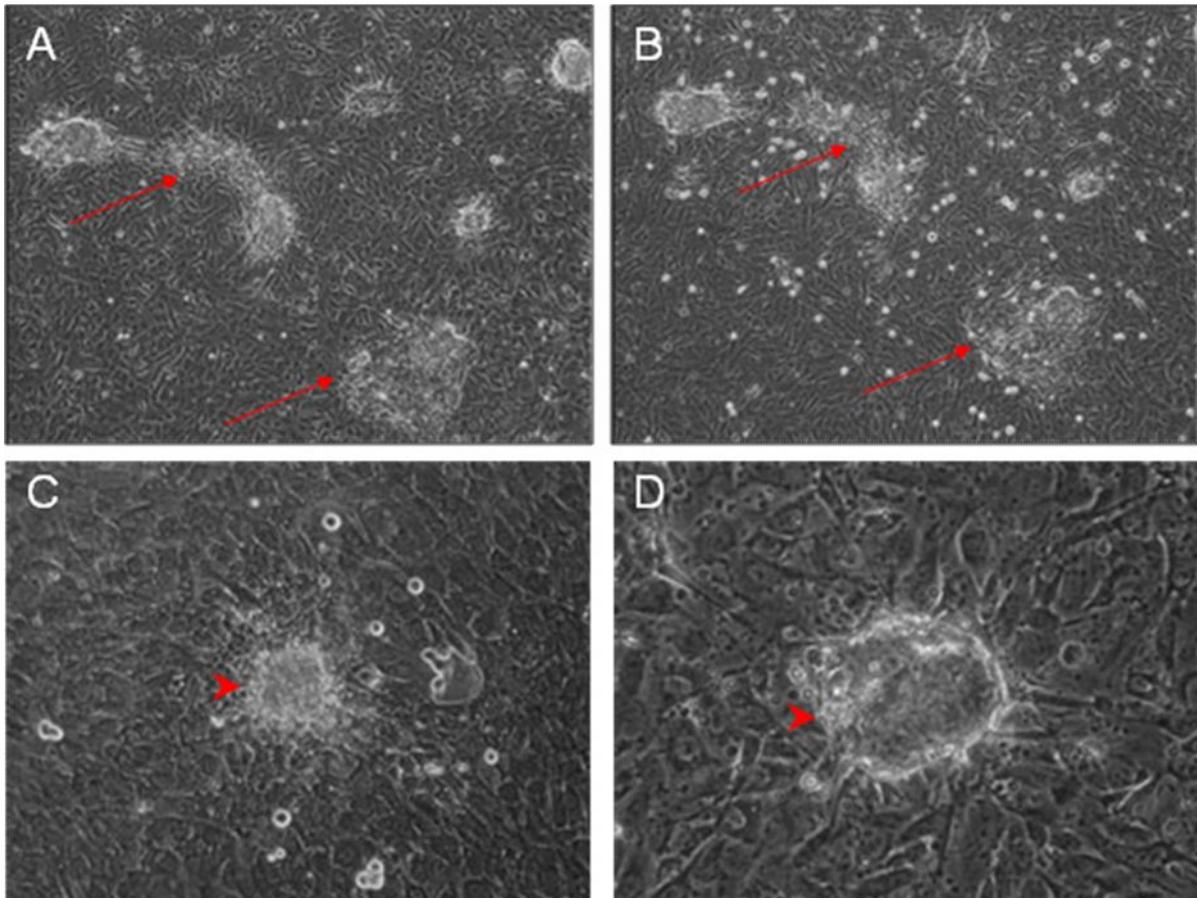


Abbildung 30: Direktes Kokultur-System 2 (E+K) nach 23 bis 28 Tagen in Kultur

A-B: 23 bis 24 Tage nach Einsaat. Sich verkleinernde Endothelzellkolonien (*rote Pfeile*). **C-D:** 25 bis 26 Tage nach Einsaat. Endothelzellkolonien charakterisiert durch rundliche Clusterbildung (*rote Pfeilspitzen*). Phasenkontrastmikroskopie A und B x 100, C x 160, D x 200

Des Weiteren waren nach 28 Tagen *in vitro* auf dem Zellrasen aus Keratinozyten zweierlei aus Endothelzellen bestehende Strukturen sichtbar. Zum einen wurden aus zwei bis fünf zirkulär angeordneten länglichen Endothelzellen formierte ringförmige Strukturen mit zellfreiem Inneren sichtbar. Zum anderen waren zahlreiche ringförmige Strukturen auf dem Zellrasen zu finden, deren äußerer Ring begrenzt wurde von mindestens fünf länglichen Endothelzellen. Innerhalb der ringförmigen Struktur konnte eine Anhäufung von Zellen oder Zelldetritus beobachtet werden (Abbildung 31, Abbildung 41/D).

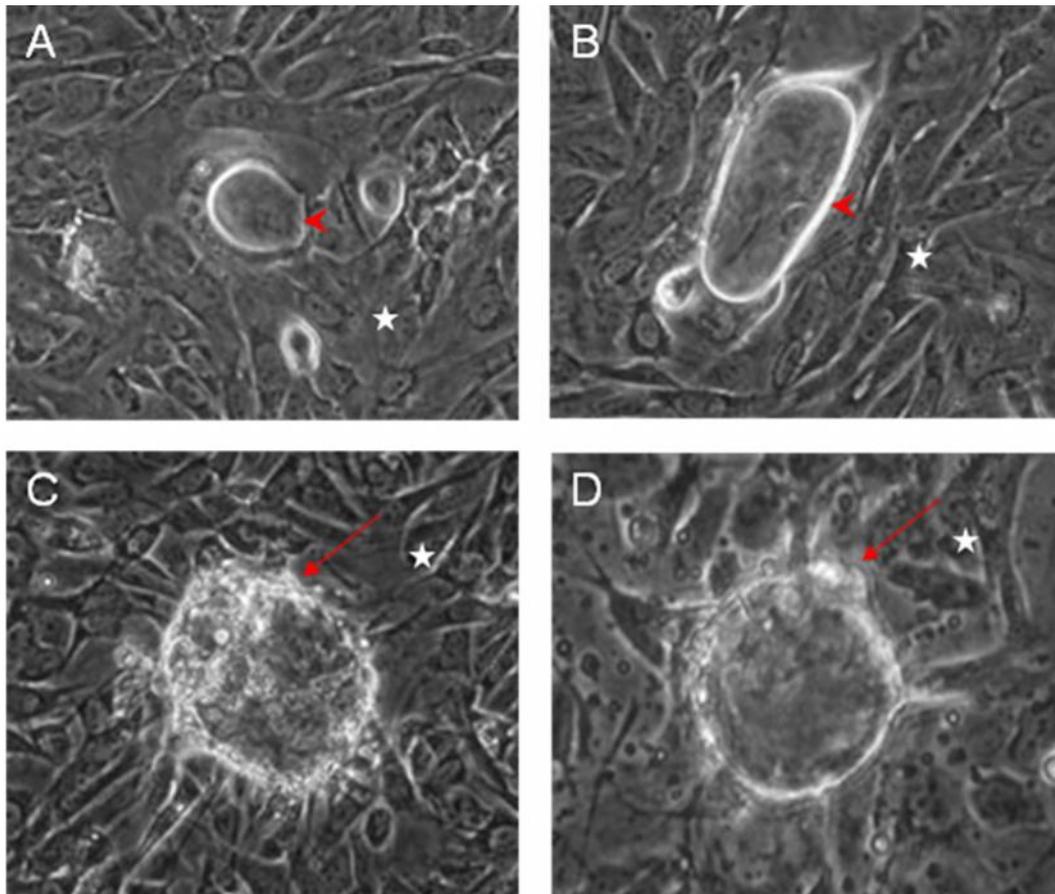


Abbildung 31: Direktes Kokultur-System 2 (E+K) nach 28 Tagen in Kultur

A-D: Ringförmige Strukturen aus Endothelzellen auf Keratinozytenzellrasen (*Sterne*). **A-B:** Ringbildende Endothelzellen als solide Struktur mit zellfreiem Inneren (*rote Pfeilspitzen*). **C-D:** Ringförmige Struktur aus mehreren länglichen Zellen mit Zellen oder Zelldetritus angefülltem Inneren (*rote Pfeile*). Phasenkontrastmikroskopie x 200

5.1.1.3 Untersuchung des direkten Kokultur-Systems 3 (Suspension)

24 Stunden nach Kultivierungsbeginn entstand bereits ein subkonfluenten Monolayer aus polygonalen Endothelzellen. Langgestreckte Keratinozyten schlossen sich zu dichten Zellclustern innerhalb des subkonfluenten Monolayers zusammen, die untereinander nicht in Verbindung standen. Aufgrund ihrer dichten Lagerung waren innerhalb der Cluster keine einzelnen Zellen zu differenzieren. Der Kulturschalenboden war zu diesem Zeitpunkt vollständig mit Zellen bedeckt (Abbildung 32).

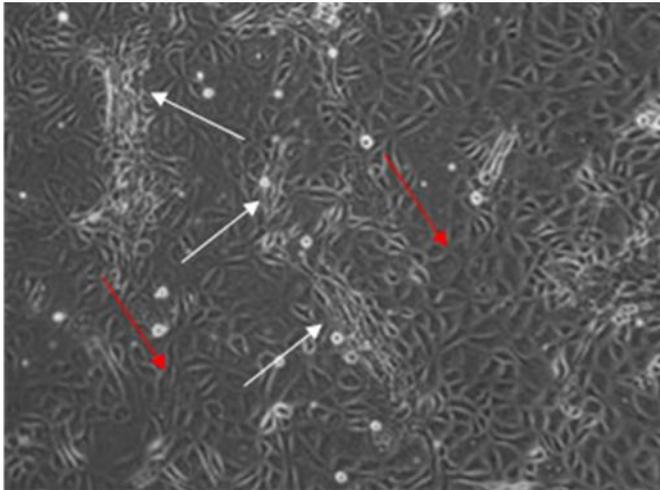


Abbildung 32: Direktes Kokultur-System 3 (Suspension) nach 24 Stunden

Ausbildung eines subkonfluenten Monolayers aus polygonalen Endothelzellen (*rote Pfeile*). Diffus verteilte längliche bis sternförmige Cluster aus Keratinozyten (*weiße Pfeile*). Phasenkontrastmikroskopie x 100

Im Folgenden dehnten sich die Keratinozytencluster sternförmig in der gesamten Vertiefung der Kulturschale deutlich aus. Gleichzeitig formierten sich Zellausläufer, die sich zu benachbarten Clustern hin ausbreiteten. Einige Zellausläufer endeten zu diesem Zeitpunkt der Inkubation frei. Die polygonalen Endothelzellen bildeten zwischen den Keratinozytenclustern Zellkolonien und lagerten sich ebenfalls entlang der Zellausläufer an. Innerhalb des Zellrasens traten vereinzelt Endothelzellen mit runder Gestalt auf (Abbildung 33).

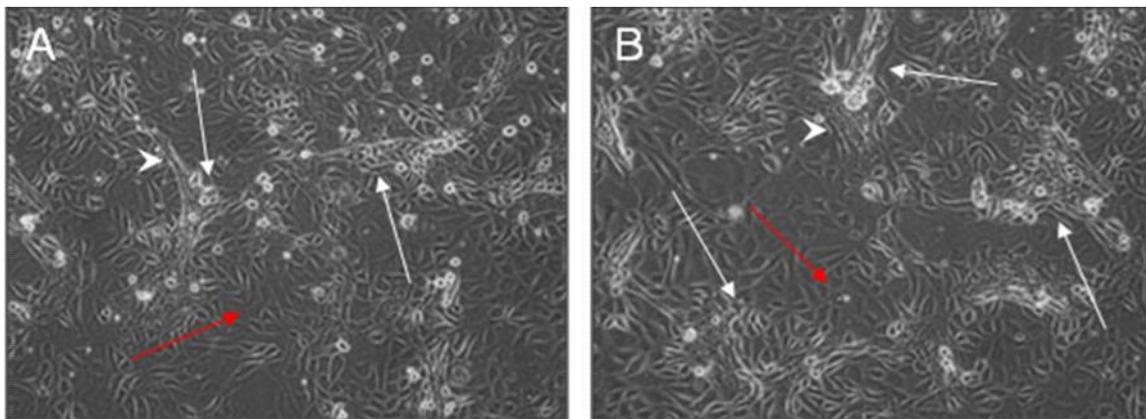


Abbildung 33: Direktes Kokultur-System 3 (Suspension) nach 2 Tagen in Kultur

A-B: Längliche und sternförmige Keratinozytencluster diffus verteilt (*weiße Pfeile*). Zellausläufer aus Keratinozyten (*weiße Pfeilspitzen*). Kolonien aus adhärenenten polygonalen Endothelzellen (*rote Pfeile*). Phasenkontrastmikroskopie x 100

Nach 5 Tagen in Kultur lagerten sich zahlreiche Keratinozyten-Zellausläufer parallel aneinander und bildeten breite Zellstraßen aus, über die benachbarte Keratinozytencluster kommunizierten. Endothelzellen orientierten sich an den Zellstraßen aus Keratinozyten und wanderten auf diese zu. An den Keratinozyten direkt benachbarte polygonale Endothelzellen streckten ihre Zellform und lagerten sich entlang der Keratinozytencluster linear an (Abbildung 34, Abbildung 43/A).

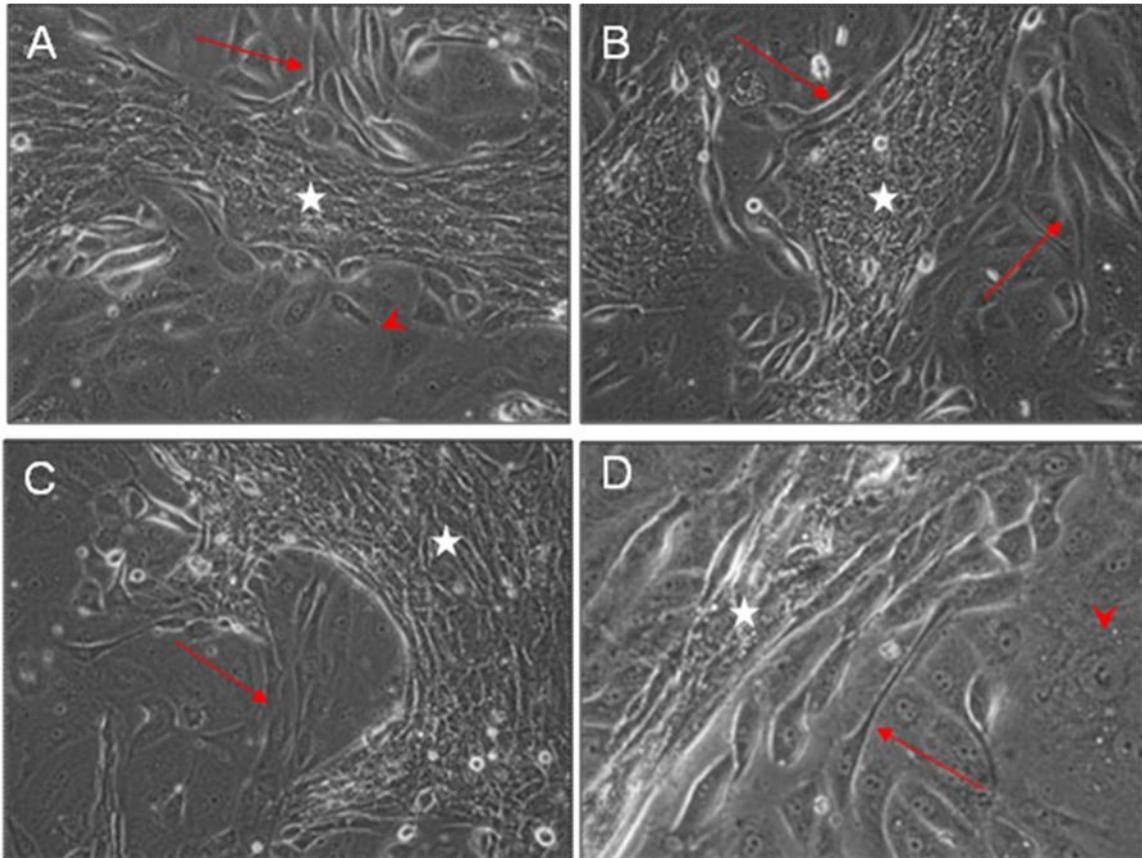


Abbildung 34: Direktes Kokultur-System 3 (Suspension), 5 Tage nach Einsaat

A-D: Zwischen Keratinozytenclustern verbreiterte Zellstraßen (*Sterne*). Den Keratinozyten direkt benachbarte Endothelzellen mit länglicher Zellform (*rote Pfeile*). **A** und **D:** Innerhalb der Endothelzellkolonien lokalisierte runde Endothelzellen (*rote Pfeilspitzen*). Phasenkontrastmikroskopie A, B, C x 100, D x 200

Bereits bis zum 14. Kultivierungstag wurde das Zellbild in der gesamten Vertiefung von den Keratinozyten dominiert. Die Cluster nahmen an Umfang zu und bewegten sich räumlich aufeinander zu, während keine weiteren Zellausläufer mehr gebildet wurden. Die direkt benachbarten Endothelzellkolonien wurden von den Zellstraßen aus Keratinozyten umschlossen. Im Randbereich der Keratinozyten direkt lokalisierten Endothelzellen waren nun

charakterisiert durch eine kugelige Zellform (Abbildung 43/B). Innerhalb der Endothelzellkolonien wurden ringförmige Strukturen aus länglichen Endothelzellen beobachtet (Abbildung 35).

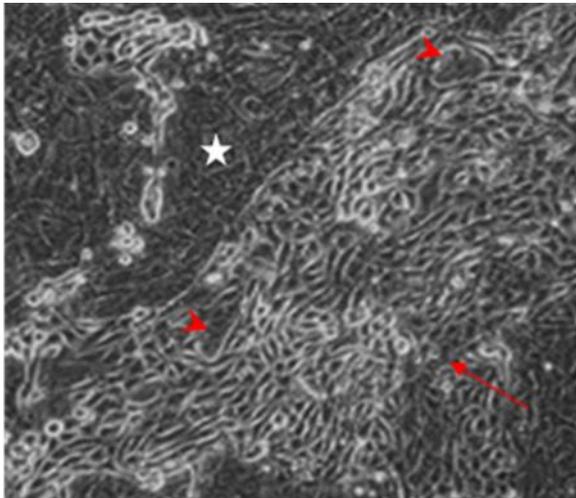


Abbildung 35: Direktes Kokultur-System 3 (Suspension) nach 14 Tagen in Kultur

Sich verdichtende Endothelzellkolonien (*roter Pfeil*). Innerhalb der Endothelzellkolonien geformte ringförmige Strukturen aus länglichen Zellen (*rote Pfeilspitzen*). Zellrasen aus Keratinozyten (*Stern*). Phasenkontrastmikroskopie x 200

Nach 21 Tagen Inkubation verkleinerten sich die Endothelzellkolonien auf dem Kulturschalenboden. Die Endothelzellen wanderten dabei aufeinander zu und bildeten überbrückende Zellausläufer aus einzelnen länglichen Einzelzellen zu direkt benachbarten Zellkolonien aus (Abbildung 43/C). Im Randbereich der Endothelzellkolonien und damit an den Keratinozyten angrenzende Zellen rundeten sich allmählich ab (Abbildung 36).

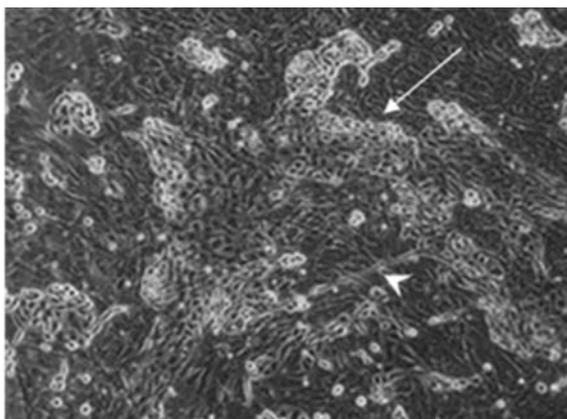


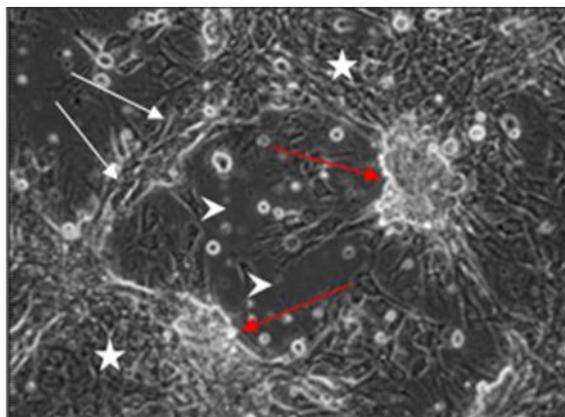
Abbildung 36: Direktes Kokultur-System 3 (Suspension) nach 21 Tagen in Kultur

Verkleinerung der Endothelzellkolonien in der gesamten Vertiefung (*weißer Pfeil*). Gleichzeitig migrieren Endothelzellen aufeinander zu. Ausbildung länglicher Zellausläufer zwischen benachbarten Endothelzellkolonien (*weiße Pfeilspitze*). Phasenkontrastmikroskopie x 100

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen hatte sich bis zum 28. Kultivierungstag eine mehrlagige Kokultur ausgebildet. Auf dem Kulturschalenboden konnten phasenkontrastmikroskopisch adhärenzte Keratinozyten beobachtet werden. Charakteristisch für diese Kokultur waren zellfreie Lücken auf dem Kulturschalenboden. Die darüber liegende Zelllage bestand aus einem Netzwerk aus Keratinozyten, das gekennzeichnet war durch miteinander über Zellausläufer kommunizierende Keratinozytencluster. Die Endothelzellen schlossen sich in Zellkolonien zusammen und waren ausschließlich auf den Keratinozytenclustern adhärenz. Einzelne Endothelzellen in den Kolonien waren phasenkontrastmikroskopisch nicht erkennbar (Abbildung 37, Abbildung 43/D).

Abbildung 37: Direktes Kokultur-System 3 (Suspension) nach 28 Tagen

Ausbildung einer mehrlagigen Kokultur. Auf dem Kulturschalenboden adhärenzte Keratinozyten. Zellfreie Lücken auf dem Kulturschalenboden (*weiße Pfeilspitzen*). Netzwerk aus Keratinozytenclustern (*Sterne*), die durch Ausläufer miteinander kommunizieren (*weiße Pfeile*). Auf den Keratinozytenclustern adhärenzte dichte Endothelzellkolonien (*rote Pfeile*). Phasenkontrastmikroskopie x 160



5.2 Immunzytochemische Untersuchungen zum Nachweis von CK14 und CK19 in Keratinozyten und Endothelzellen im direkten Kokultur-System

Für die weiterführenden Untersuchungen der direkten Kokultur-Modelle wurden nach 7, 14, 21 und 28 Tagen die auf Glasplättchen kultivierten Kokulturen als Proben 1 und 2 aus zwei Vertiefungen entnommen. Die Kokulturen aus zwei weiteren Vertiefungen wurden als Negativkontrollen mitgeführt. Die erste Negativkontrolle wurde mit Mausserum und die zweite mit PBS-Puffer anstelle des Primärantikörpers inkubiert. Für jedes Kokultur-Modell wurde zur Zellcharakterisierung der Epithelzellen jeweils ein spezifischer Marker verwendet. Für die spezifische Markierung von Endothelzellen in den Kulturen wurde ein Primärantikörper gegen CK19 gewählt. Die Expression von CK19 differenziert sie eindeutig von den Keratinozyten. Zur Markierung der Keratinozyten kam ein Primärantikörper gegen CK14 zum Einsatz. In den Kokultur-Modellen 1 (K+E) und 3 (Suspension) wurden jeweils Endothelzellen mit Anti-CK19

markiert. Ausschließlich im Kokultur-Modell 2 (E+K) wurde Anti-CK14 zur Detektierung von Keratinozyten eingesetzt. Repräsentativ für die Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchungen in den Kokulturen wurde pro Woche jeweils ein lichtmikroskopisches Bild aufgeführt.

Die Beschreibungen der Farbtintensität in den immunzytochemischen Untersuchungen erfolgten anhand semiquantitativer Beurteilung. Hierbei bedarf es einer nachfolgenden Verifizierung. Im Allgemeinen war die Differenzierung der Farbtintensität unter anderem von der Zellform der zu untersuchenden Zellen abhängig. Aufgewölbte dicht benachbarte Zellen zeigten vergleichsweise eine deutlich stärkere Farbtintensität. Die semiquantitative Auswertung der Markierung wird in folgender Tabelle aufgeführt:

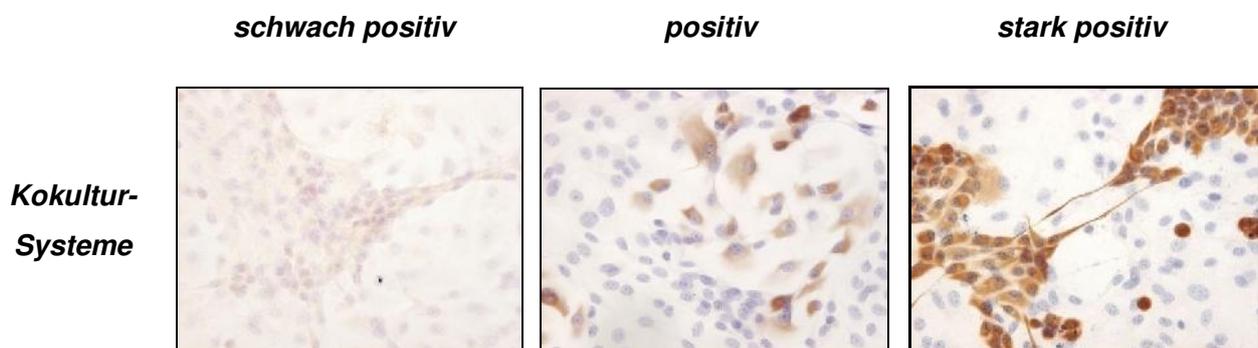


Tabelle 6:

Semiquantitative Auswertung der immunzytochemischen Markierung

5.2.1 Immunzytochemische Markierung mit Anti-CK19 in mikrovaskulären Endothelzellen im direkten Kokultur-System 1 (K+E)

Im direkten Kokultur-System 1 (K+E) zeigte der Endothelzellen markierende monoklonale Primärantikörper im gesamten Zytoplasma eine positive Reaktion für CK19. In Zellkernnähe war regelmäßig die höchste Konzentration zu beobachten, wobei der Zellkern selbst nicht angefärbt wurde. Ebenso waren von den Zellen ausgehende Ausläufer deutlich positiv markiert. Keratinozyten wurden hierbei im Kokultur-System 1 (K+E) nicht positiv angefärbt (Abbildung 38).

Den phasenkontrastmikroskopischen Untersuchungen entsprechend erfolgte nach 7 Kultivierungstagen die Bildung breiter Zellstraßen zwischen den kommunizierenden Keratinozytenclustern. Die langgestreckten, dicht aneinander gelagerten Keratinozyten wiesen

jeweils einen ovalen Zellkern auf. Zwischen den Zellstraßen schlossen sich die positiv markierten polygonalen Endothelzellen in Kolonien zusammen. Anhand der lichtmikroskopischen Analysen konnten in den Endothelzellen Stadien der Mitose beobachtet werden (Abbildung 38/A). Die am äußeren Rand der Kolonien lokalisierten Endothelzellen lagen benachbarten Keratinozyten an und fielen durch ihre längliche Zellform auf (Abbildung 20). Ab dem 14. Kultivierungstag bildeten aufgewölbte Endothelzellen ab diesem Zeitpunkt der Inkubation vereinzelt innerhalb ihrer Kolonien ringförmige Strukturen aus (Abbildung 21/B). Diese fielen immunzytochemisch durch eine stark positive Reaktion auf. Die ringförmigen Strukturen waren gekennzeichnet durch die Aneinanderlagerung von mindestens fünf Zellen unter Bildung eines zentralen zellfreien Areals (Abbildung 38/B). Ab dem Kultivierungstag 21 nahmen die im Randbereich zu den Keratinozyten liegenden Endothelzellen eine runde Gestalt an (Abbildung 22/B). Die abgerundeten Endothelzellen zeigten eine vergleichsweise stärkere positive Markierung (Abbildung 38/C). Bis zum 28. Kultivierungstag entstand eine mehrschichtige Kokultur, deren Kulturschalenboden zellfreie Lücken aufwies. Die positiv markierten Endothelzellen lagerten sich zu dichten Zellkolonien zusammen (Abbildung 23, Abbildung 38/D).

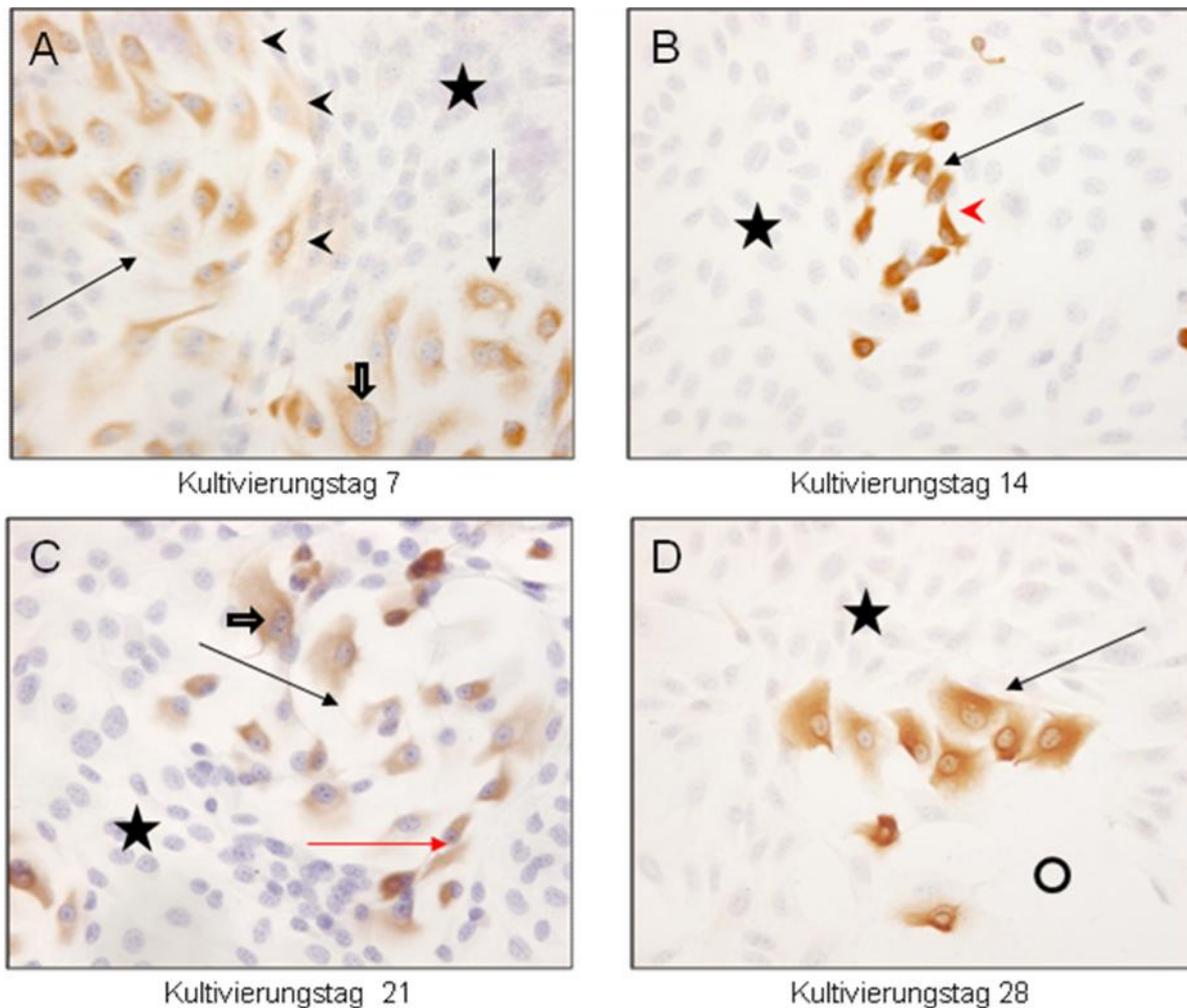


Abbildung 38: Immunzytochemischer Nachweis von CK19 in Endothelzellen im direkten Kokultur-System 1 (K+E)

A-D: Deutliche Markierung von polygonalen Endothelzellen (*schwarze Pfeile*) mit Anti-CK19 in allen Kulturen im Vergleich zu dicht gelagerten, langgestreckten, nicht markierten Keratinozyten (*Sterne*). **A:** Langgestreckte, dicht aneinandergelagerte Keratinozyten bilden breite Zellstraßen aus (*Stern*). Direkt an Keratinozyten gelagerte längliche Endothelzellen (*schwarze Pfeilspitzen*). Mitose (*Blockpfeil*). **B:** Stark positive intrazytoplasmatische Reaktion für CK19 in Endothelzellen linearer Anordnung. Bildung einer ringförmigen Struktur (*rote Pfeilspitze*). **C:** Positiv markierte Endothelzellkolonien. Entlang der Keratinozyten gelagerte Endothelzellen kugeln sich zunehmend ab (*roter Pfeil*). Mitose (*Blockpfeil*). **D:** Endothelzellkolonie umgeben von Keratinozyten. Zellfreie Lücken auf dem Kulturschalenboden (*Kreis*). Lichtmikroskopie x 100

5.2.1.1 Kontrollen

Für repräsentative Aussagen zu den immunzytochemischen Untersuchungen wurden Kontrollen des Detektionssystems gleichzeitig mit den Proben durchgeführt. Hierbei erfolgte die Inkubation

mit Mausserum (Serum-Negativkontrolle) beziehungsweise mit PBS-Puffer (Puffer-Negativkontrolle) anstelle des Primärantikörpers.

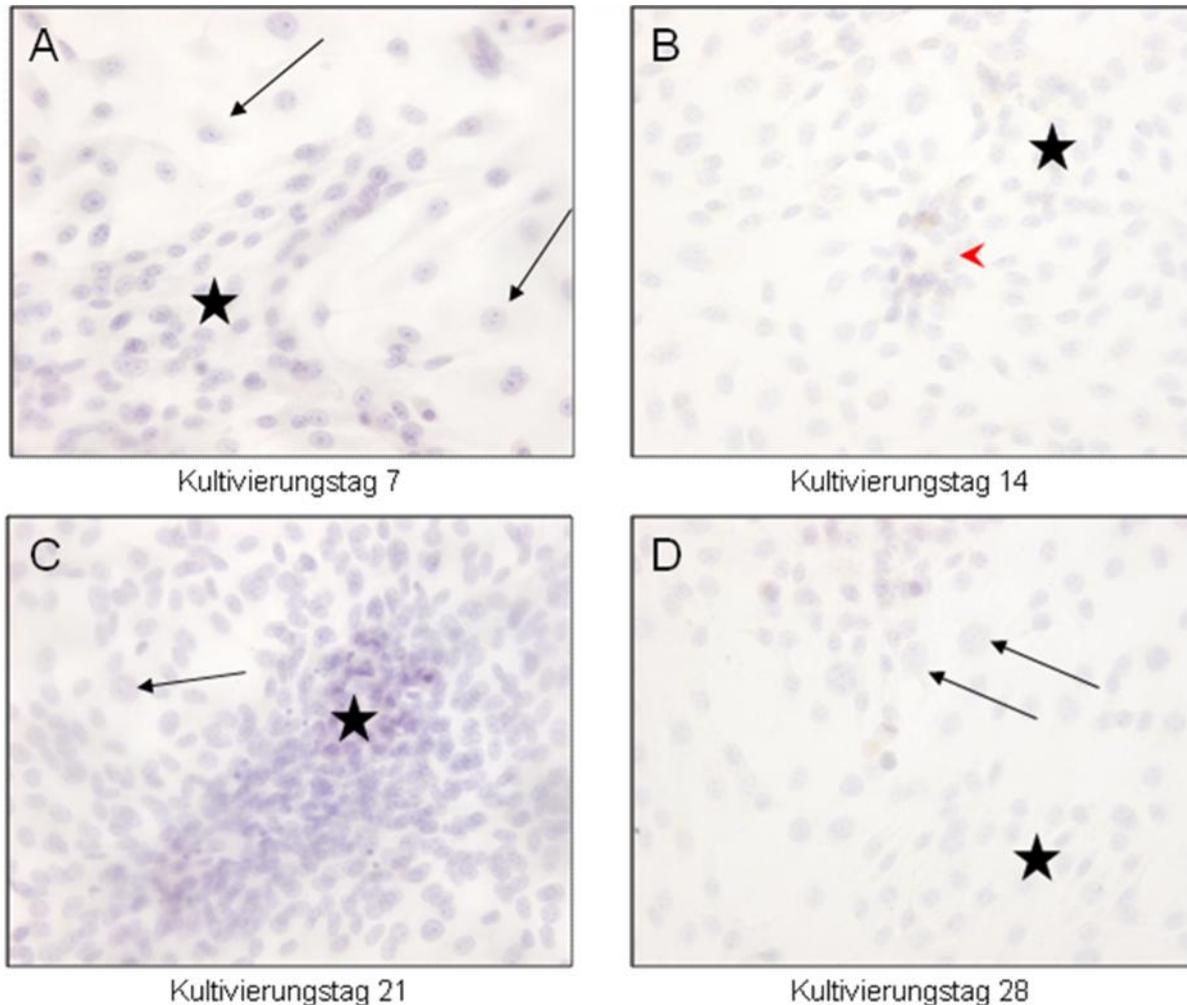


Abbildung 39: Darstellung der Puffer-Negativkontrollen im Kokultur-System 1 (K+E)

A, C und **D**: Die Zellen zeigen keine unspezifischen Bindungsreaktionen. Langgestreckte Keratinozyten mit ovalen Zellkernen (*Sterne*). Polygonale Endothelzellen mit großen runden Zellkernen (*schwarze Pfeile*). **B**: Bildung einer ringförmigen Struktur (*rote Pfeilspitze*). Hier geringgradige unspezifische Reaktion ringbildender Endothelzellen zu erkennen. Dicht gelagerte Keratinozyten (*Stern*). Lichtmikroskopie x 100

Für die Darstellung der Negativkontrollen in dieser Arbeit wurden exemplarisch Puffer-Negativkontrollen gewählt (Abbildung 39). Die Differenzierung von Endothelzellen und Keratinozyten in Hämalaunfärbung erfolgte anhand morphologischer Kriterien. Nach

semiquantitativer Beurteilung wiesen, wie in Abbildung 39/B dargestellt, ausschließlich dicht gelagerte ringbildende Endothelzellen eine geringgradige unspezifische Reaktion auf.

5.2.2 Immunzytochemische Markierung mit Anti-CK14 in epidermalen Keratinozyten im direkten Kokultur-System 2 (E+K)

CK14 konnte immunzytochemisch in den Keratinozyten und interdigitierenden Zellausläufern jeder Kultur nachgewiesen werden. Die Markierung der Zellen zeigte ein diffuses Verteilungsmuster innerhalb des Zytoplasmas (Abbildung 41). Die Endothelzellen, die morphologisch von den Keratinozyten zu differenzieren waren, zeigten in der gesamten Kokultur eine schwach positive Markierung. Endothelzellen in Monokultur wurden in den im Vorfeld durchgeführten immunzytochemischen Untersuchungen nicht positiv mit Zytokeratin 14 markiert. Eine mehrmalige Wiederholung der Untersuchungen mit Zytokeratin 14 sicherte die Ergebnisse ab. Als Positivkontrolle wurde CK14 an der murinen Haut getestet (Abbildung 40).

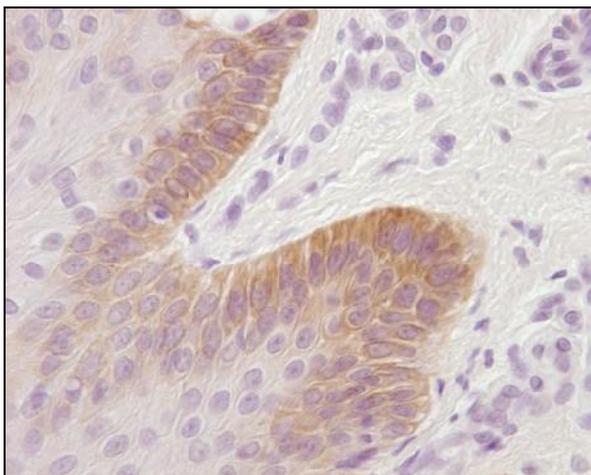


Abbildung 40: Positivkontrolle

Darstellung der Positivkontrolle von CK14 in den basalen Keratinozyten an der murinen Haut. Lichtmikroskopie x 100

Entsprechend der Phasenkontrastmikroskopie bildeten sich bis zum 7. Tag in vitro zwischen den benachbarten Keratinozytenclustern breite Zellstraßen aus (Abbildung 26). Die polygonalen Endothelzellen lagerten sich in Kolonien zwischen den positiv markierten Zellstraßen aus Keratinozyten an. Ebenso zeigten die Endothelzellen eine schwach positive Markierung (Abbildung 41/A). Ab dem 14. Kultivierungstag bildeten Endothelzellen innerhalb ihrer Zellkolonien ringförmige Strukturen mit zellfreiem Inneren aus mehreren länglichen aneinander gelagerten Zellen (Abbildung 29). Die Ringstruktur bildenden Endothelzellen zeigten eine schwach positive Reaktion und wurden vermutlich durch positiv markierte Keratinozyten begrenzt (Abbildung 41/B). Die Keratinozyten bildeten ab dem 21. Kultivierungstag einen subkonfluenten Zellrasen aus (Abbildung 30, Abbildung 41/C). Ab dem 28. Tag fielen die

schwach positiv markierten Keratinozyten durch eine polygonale Zellform auf. Die Endothelzellen bildeten innerhalb der Kolonien vereinzelt ringförmige Strukturen aus (Abbildung 31, Abbildung 41/D).

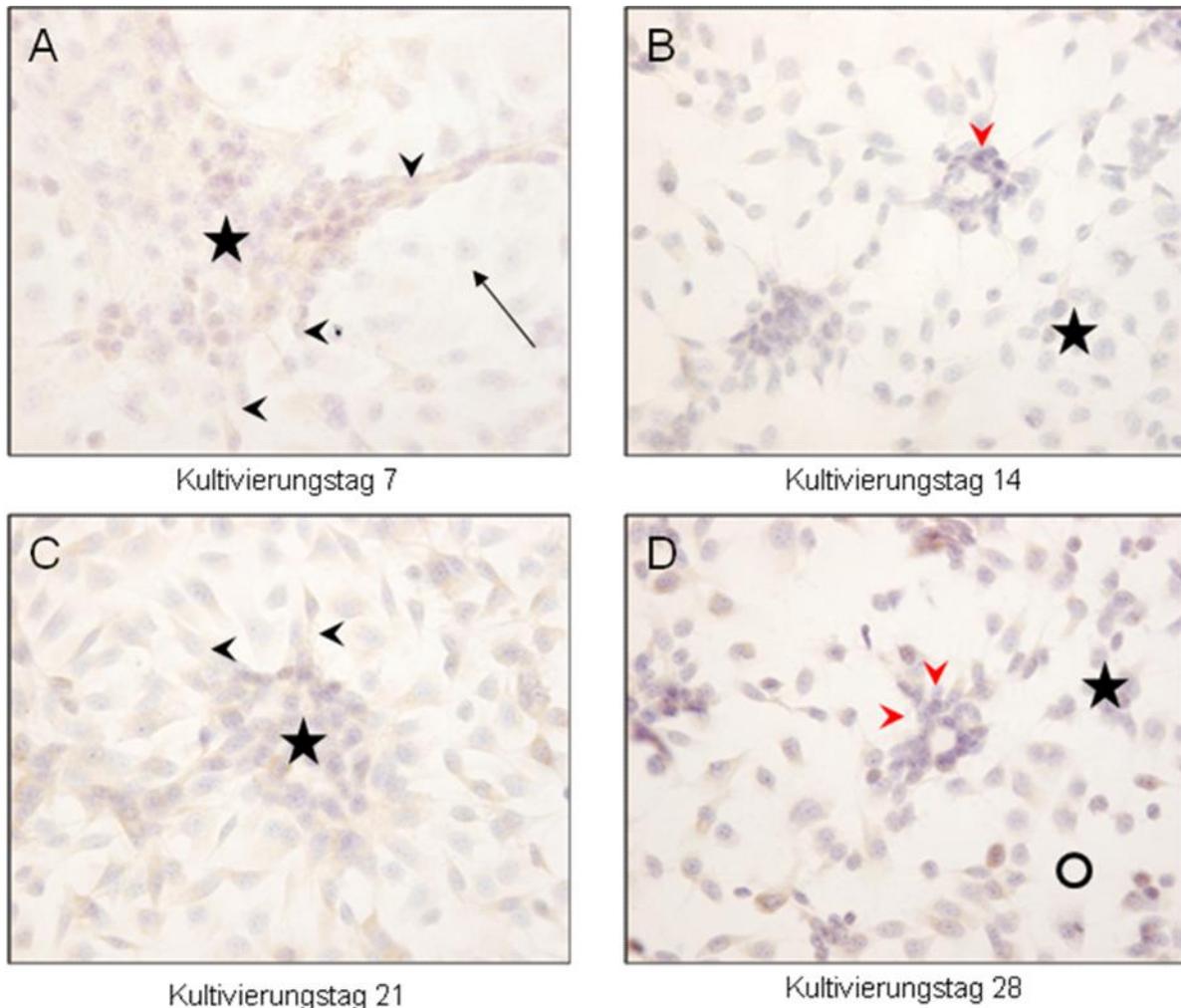


Abbildung 41: Immunzytochemischer Nachweis von CK14 in Keratinozyten im direkten Kokultur-System 2 (E+K) in vitro

A-D: Schwach positive Markierung des CK14 in Keratinozyten aller Kulturen des Kokultur-Systems 2 (*Sterne*). **A:** Von Keratinozytenclustern ausgehende Zellstraßen reagieren schwach immunopositiv (schwarze *Pfeilspitzen*). Schwach positive adhärenente polygonale Endothelzellen direkt benachbart an Keratinozytenzellstraßen (*schwarzer Pfeil*). **B:** Die in Zellkolonien zusammen geschlossenen Endothelzellen bilden ringförmige Strukturen aus (*rote Pfeilspitze*). **C:** Bildung eines subkonfluenten Zellrasens aus Keratinozyten. **D:** Diffuse Verteilung schwach immunopositiver Keratinozyten auf dem Kulturschalenboden (*Stern*) unter Entstehung zellfreier Lücken (*Kreis*). Ringförmige Struktur aus Endothelzellen (*rote Pfeilspitzen*). Lichtmikroskopie x 100

5.2.2.1 Kontrollen

Parallel zu den eigentlichen immunzytochemischen Untersuchungen wurden Negativkontrollen durchgeführt und anstelle des Primärantikörpers mit Mausserum (Serum-Negativkontrolle) beziehungsweise mit PBS-Puffer (Puffer-Negativkontrolle) inkubiert. Für die Darstellung der Negativkontrollen in dieser Arbeit wurden exemplarisch Puffer-Negativkontrollen gewählt. Die Zellen wiesen in den Puffer-Negativkontrollen keine unspezifischen Bindungen auf. Keratinozyten und Endothelzellen wurden anhand morphologischer Beurteilung differenziert (Abbildung 42).

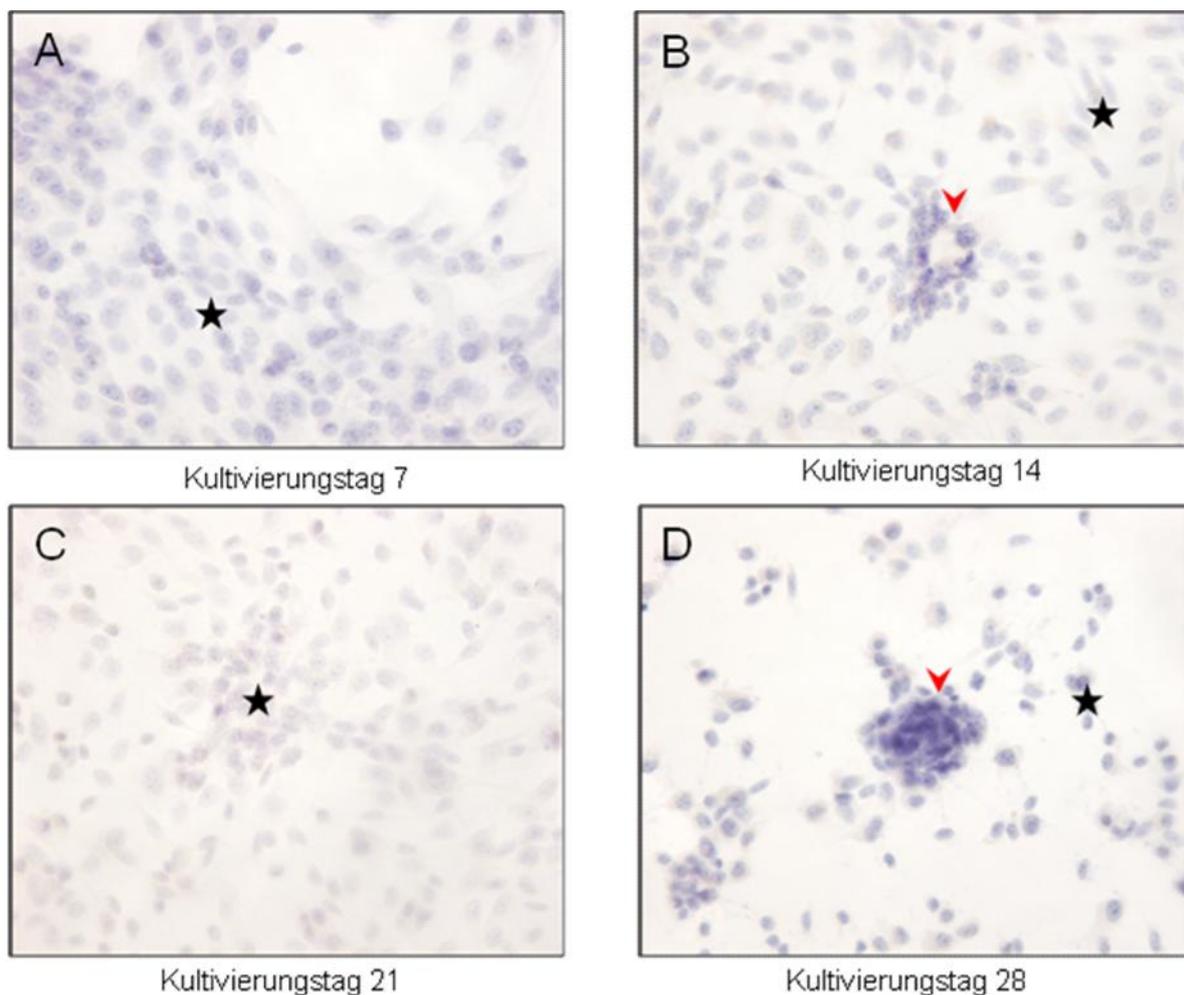


Abbildung 42: Puffer-Negativkontrollen im direkten Kokultur-System 2 (E+K) in vitro

A-D: Darstellung der Zellen ohne unspezifische Bindungsreaktionen in allen Puffer-Negativkontrollen. Durch ovale Zellkerne charakterisierte Keratinozyten (*Sterne*). **B:** Darstellung einer Ringstruktur aus dicht zusammen gelagerten Zellen (*rote Pfeilspitze*). **D:** Zellhaufen aus dicht gelagerten Zellen (*rote Pfeilspitze*). Lichtmikroskopie x 100

5.2.3 Immunzytochemische Markierung mit Anti-CK19 in mikrovaskulären Endothelzellen im direkten Kokultur-System 3 (Suspension)

Zytokeratin 19 konnte erfolgreich als Marker für Endothelzellen im direkten Kokultur-System 3 (Suspension) nachgewiesen werden. Hierbei war eine diffuse Verteilung des Antigens innerhalb des Zytoplasmas zu erkennen. Keratinozyten wurden nicht positiv angefärbt.

In der Phasenkontrastmikroskopie konnte dargestellt werden, dass sich bereits ab dem 5. Kultivierungstag breite Zellstraßen aus dicht gelagerten Keratinozyten mit ovalen Zellkernen ausbildeten. Den Keratinozyten benachbarte Endothelzellen wiesen eine längliche Zellform auf (Abbildung 34). Insgesamt zeigten die Endothelzellen eine deutlich immunopositive Reaktion für CK19 (Abbildung 43/A). Nach 14 Tagen in vitro kugelten sich die im Randbereich der Cluster lokalisierten positiv markierten Endothelzellen zunehmend ab (Abbildung 35, Abbildung 43/B). Am Kultivierungstag 21 und 28 konnte im Vergleich zu den Untersuchungen vom 7. und 14. Tag eine stark positive intrazytoplasmatische Reaktion für CK19 in den Endothelzellen aufgrund ihrer aufgewölbten Zellform beobachtet werden (Abbildung 43/C und D). Die Endothelzellen waren bis zum 21. Tag über die Keratinozytencluster migriert und bildeten Zellkolonien auf den Keratinozyten. Langgestreckte Zellausläufer stellten eine Verbindung zwischen den Endothelzellkolonien dar und überbrückten hierbei die am Kulturschalenboden adhärenen Keratinozyten (Abbildung 36, Abbildung 43/C). Am 28. Kultivierungstag entstand eine mehrschichtige Kokultur mit zellfreien Lücken auf dem Kulturschalenboden. Die Endothelzellen blieben ausschließlich auf den Keratinozyten adhären und schlossen sich zu dicht gelagerten Zellkolonien zusammen (Abbildung 37, Abbildung 43/D).

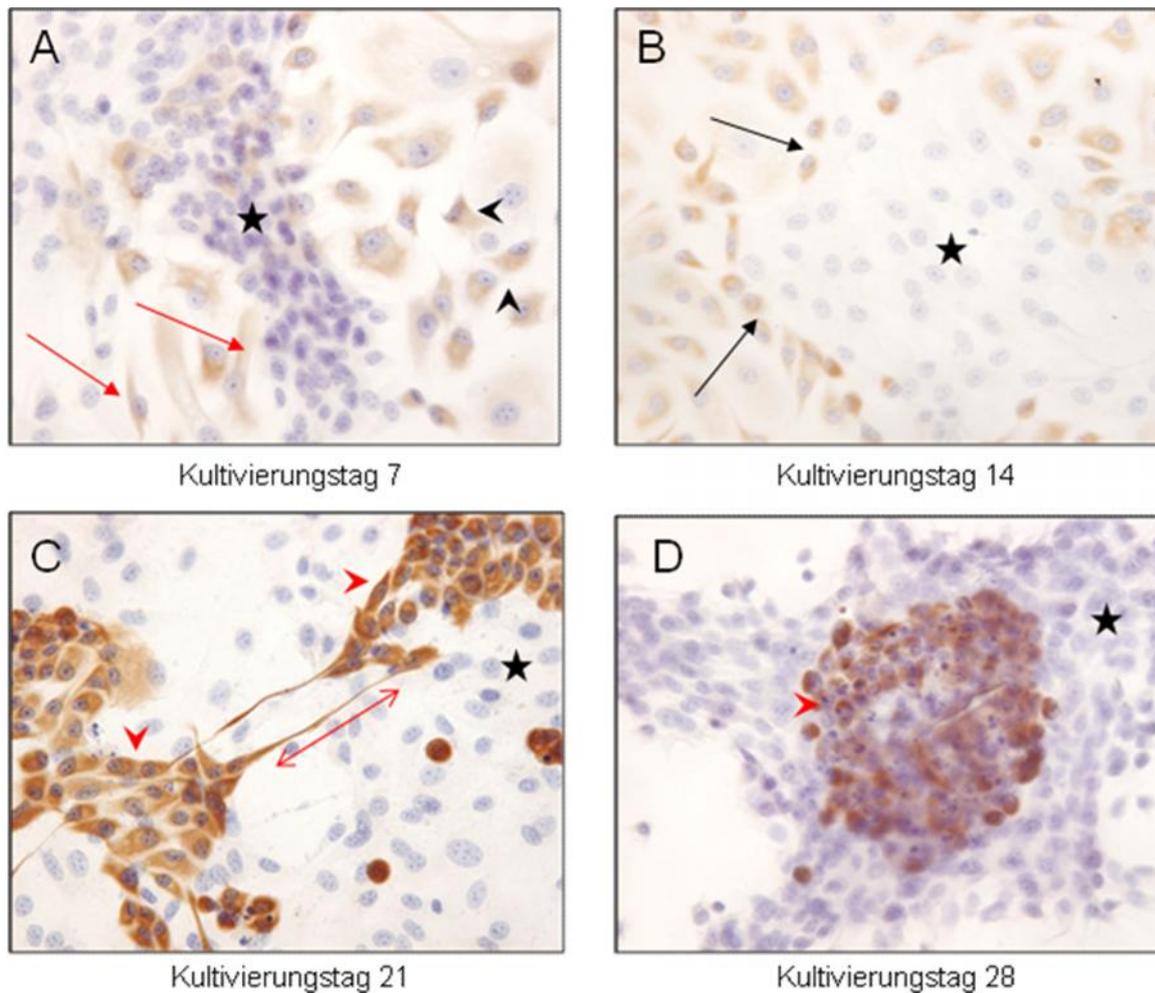


Abbildung 43: Immunzytochemischer Nachweis von CK19 in Endothelzellen im direkten Kokultur-System 3 (Suspension) in vitro

A-D: Immunopositive Reaktion von Endothelzellen in allen Kulturen des direkten Kokultur-Systems 3 (Suspension). **A:** Von Zellstraßen aus Keratinozyten (*Stern*) überbrückte immunopositive polygonale Endothelzellen in Zellkolonien (*schwarze Pfeilspitzen*). Den Keratinozyten direkt benachbarte längliche Endothelzellen (*rote Pfeile*). **B:** Direkt an Keratinozytencluster (*Stern*) lokalisierte positiv markierte kugelige Endothelzellen (*schwarze Pfeile*). **C:** Endothelzellen migrieren über Keratinozytencluster (*Stern*) und formieren sich auf diesen zu Zellkolonien (*rote Pfeilspitzen*). Endothelzellkolonien kontaktieren untereinander über Zellausläufer von bis zu 240 μm Länge. Diese Endothelzellen zeigen eine stark positive Antikörperreaktion. **D:** Auf Keratinozytencluster (*Stern*) adhärente stark immunopositive dicht gelagerte Endothelzellkolonie (*rote Pfeilspitze*). Lichtmikroskopie x 100

5.2.3.1 Kontrollen

Parallel zu den eigentlichen immunzytochemischen Untersuchungen wurden Negativkontrollen durchgeführt. Die Proben wurden anstelle eines Primärantikörpers mit Mausserum (Serum-

Negativkontrolle) beziehungsweise mit PBS-Puffer (Puffer-Negativkontrolle) inkubiert. Für die Darstellung der Kontrollen wurden Puffer-Negativkontrollen gewählt. In den Kontrollen wurden keine unspezifischen Bindungsreaktionen beobachtet. Die Differenzierung zwischen Keratinozyten und Endothelzellen erfolgte anhand morphologischer Kriterien (Abbildung 44).

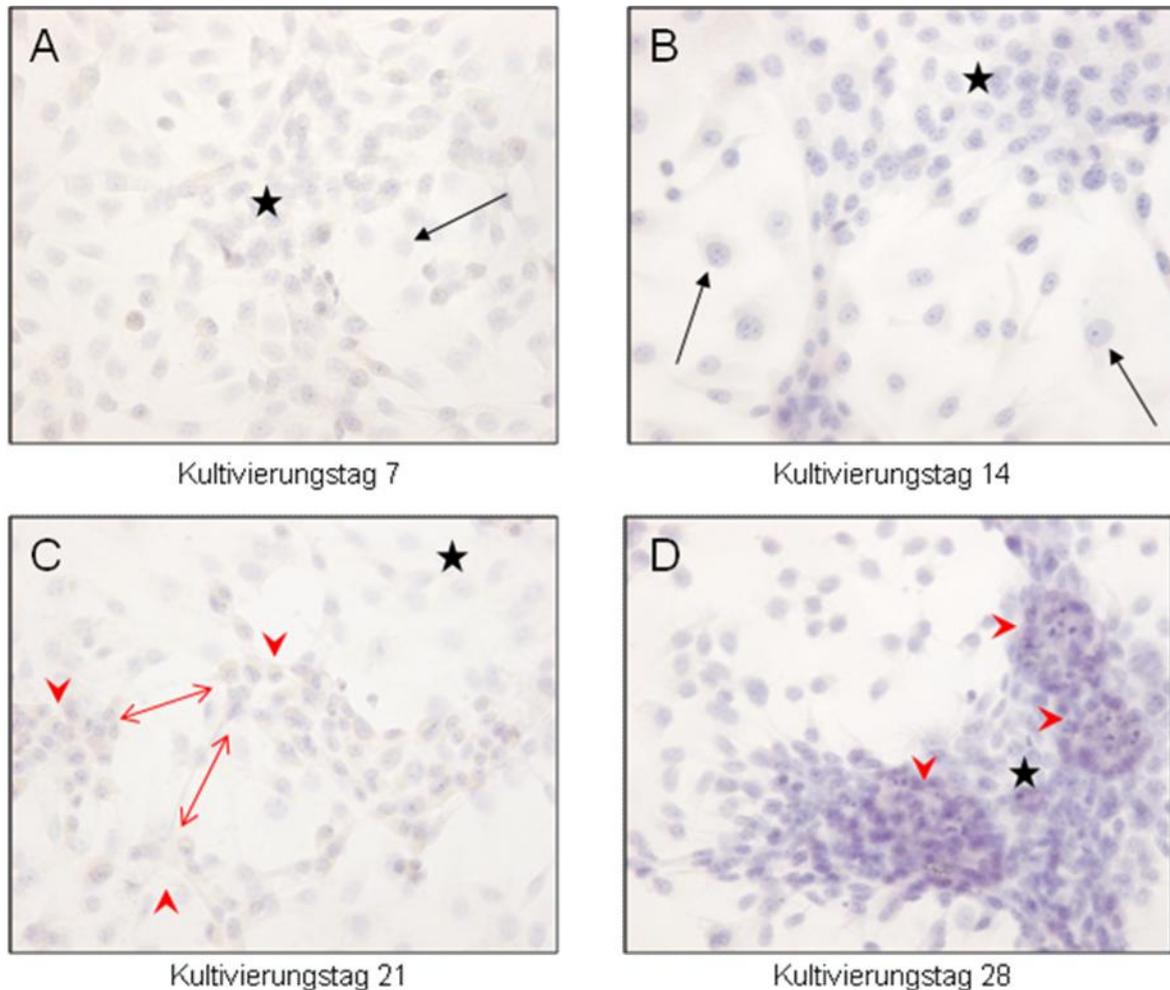


Abbildung 44: Puffer-Negativkontrollen im direkten Kokultur-System 3 (Suspension) in vitro

A-D: Darstellung der Puffer-Negativkontrollen im direkten Kokultur-System 3 (Suspension). Die Kulturen zeigen keine unspezifischen Markierungen. **A-B:** In Zellstraßen dicht zusammen gelagerte Keratinozyten mit ovalen Zellkernen (*Sterne*). Polygonale Endothelzellen gekennzeichnet durch große runde Zellkerne (*schwarze Pfeile*). **C:** Auf Keratinozyten (*Stern*) lokalisierte und über Zellausläufer kommunizierende Zellkolonien aus Endothelzellen (*rote Pfeilspitzen*). **D:** Endothelzellkolonien (*rote Pfeilspitzen*) auf Keratinozyten (*Stern*). Lichtmikroskopie x 100

5.3 Histologische Untersuchung der direkten Millicell[®]-PCF-Systeme

Zur weiterführenden morphologischen Analyse der drei unterschiedlichen direkten Kokultur-Modelle in den Millicell-PCF[®]-Filtereinsätzen wurden von den Kulturen histologische Präparate hergestellt, die nach Richardson gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht wurden.

In den frühen Phasen der Kultivierung ist die morphologische Differenzierung zwischen Endothelzellen und Keratinozyten nicht eindeutig möglich. Daher erfolgte die Differenzierung der Zellen basierend auf dem Versuchsaufbau des jeweiligen Kokultur-Systems (s. 4.8.4.1-4.8.4.3). In den späteren Phasen der Kultivierung war eine morphologische Differenzierung der Zellen nach semiquantitativer Auswertung möglich.

5.3.1 Semidünnschnitte des direkten Millicell[®]-PCF-Systems 1 (K+E)

Nach 7 Tagen in Kultur bedeckten Endothelzellen und Keratinozyten den Boden des Filtereinsatzes lückenlos. Langgestreckte Keratinozyten wuchsen auf dem Filterboden adhärent und bildeten ein bis zwei Zellschichten aus. Die Zellkerne der Keratinozyten waren schmal und langgestreckt. Die spindelförmigen Zellenden der Keratinozyten überlappten sich jeweils. Die Endothelzellen wiesen jeweils einen großen ovalen Zellkern auf und waren hauptsächlich auf den Keratinozyten adhärent. Vereinzelt konnten Endothelzellen auch auf dem Filterboden wachsend beobachtet werden (Abbildung 45).

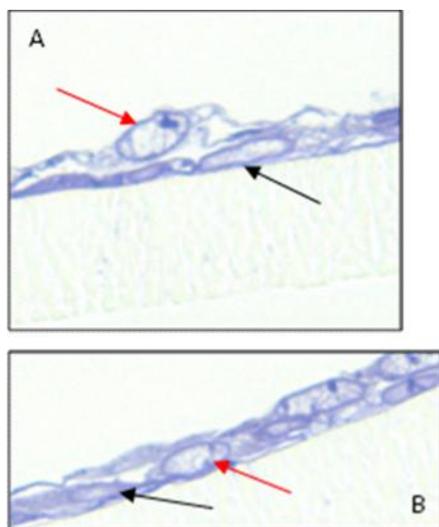


Abbildung 45: Histologische Untersuchung des direkten Millicell[®]-PCF-Systems 1 (K+E) nach 7 Tagen in vitro

A: Vollständig durch Keratinozyten (*schwarzer Pfeil*) und Endothelzellen (*roter Pfeil*) bedeckte Filtermembran. **B:** Auf der Filtermembran vereinzelt vorkommende adhärente Endothelzelle (*roter Pfeil*) neben langgestreckten Keratinozyten (*schwarzer Pfeil*). Lichtmikroskopie A, B x 160

Bis zum 14. Tag in vitro wurden ovale bis längliche Endothelzellen mit großen ovalen Zellkernen beobachtet. Die Zelloberfläche variierte von glatt bis unregelmäßig geformt. Längliche

Endothelzellen lagerten sich teilweise linear aneinander und kontaktierten dabei über lange Zellausläufer miteinander. Langgestreckte Keratinozyten bedeckten in Form eines zwei- bis dreilagigen Zellrasens den gesamten Boden des Filtereinsatzes (Abbildung 46).

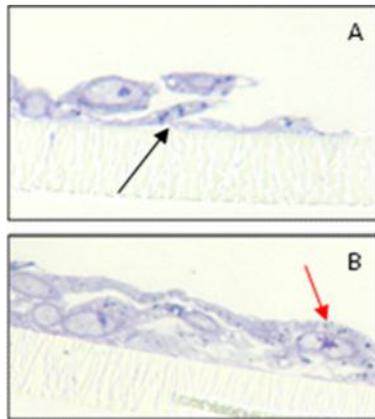


Abbildung 46: Histologische Untersuchung des direkten Millicell®-PCF-Systems 1 (K+E) am 14. Tag in vitro

A: Sich über Zellenden überlappende langgestreckte Keratinozyten (*schwarzer Pfeil*). **B:** Linear aneinander gelagerte Endothelzellen charakterisiert durch große ovale Zellkerne (*roter Pfeil*). Lichtmikroskopie A und B x 100

Bis zum 21. Tag stellten sich langgestreckte Keratinozyten weiterhin in einem zwei- bis dreilagigen Zellrasen dar. Die Endothelzellen waren ausschließlich auf dem Keratinozyten-Zellrasen adhären und schlossen sich in Zellhaufen zusammen (Abbildung 47).

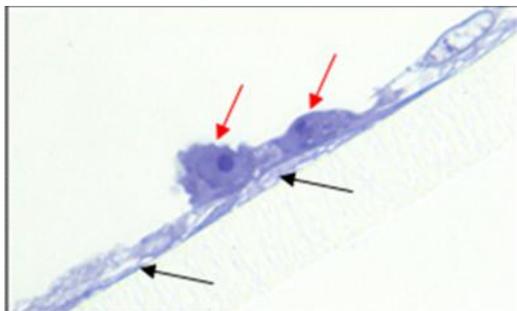


Abbildung 47: Histologische Untersuchung des direkten Millicell®-PCF-Systems 1 (K+E) nach 21 Tagen

Zellhaufen aus Endothelzellen mit ovalem Zellkern und peripher gelegenem Nukleolus (*rote Pfeile*) auf langgestreckten Keratinozyten (*schwarze Pfeile*). Lichtmikroskopie x 160

Auch nach 28 Tagen in vitro bedeckten langgestreckte Keratinozyten den Filter in zwei bis drei Zelllagen. Die Endothelzellen waren ausschließlich in begrenzten Bereichen auf dem Filter adhären. Stellenweise konnten auf dem Filter zellfreie Areale beobachtet werden (Abbildung 48).

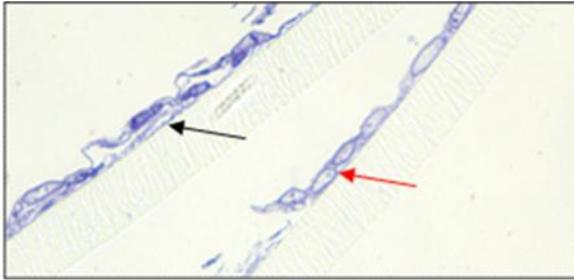


Abbildung 48: Histologische Untersuchung des direkten Millicell®-PCF-Systems 1 (K+E) nach 28 Tagen

Zwei bis drei Zellschichten langgestreckter Keratinozyten (*schwarzer Pfeil*). Vereinzelt auftretende linear angeordnete Endothelzellen auf dem Filter (*roter Pfeil*). Lichtmikroskopie x 100

5.3.2 Semidünnschnitte des direkten Millicell®-PCF-Systems 2 (E+K)

Endothelzellen und Keratinozyten wuchsen im direkten Millicell®-PCF-System 2 (E+K) nach 7 Tagen *in vitro* bereits in einer mehrlagigen Kokultur. Im Gegensatz zum Versuchsaufbau, nach dem zunächst Endothelzellen auf dem Filterboden kultiviert wurden und Keratinozyten nach 24 Stunden in Suspension ausgesät wurden, bedeckten nach rein semiquantitativer Beurteilung langgestreckte Keratinozyten den Boden des Filters vollständig und bildeten dabei einen konfluenten Zellrasen. Die darüber lokalisierten länglichen Endothelzellen waren gekennzeichnet durch große ovale Zellkerne und wurden hierbei augenscheinlich von den langgestreckten Keratinozyten unterwandert (Abbildung 49).

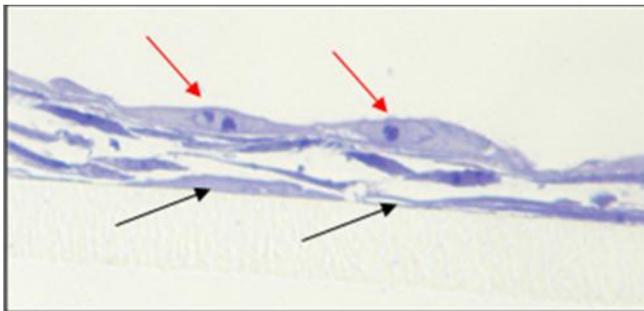


Abbildung 49: Histologische Untersuchung des direkten Millicell®-PCF-Systems 2 (E+K) nach 7 Tagen

Langgestreckte Keratinozyten in einem mehrlagigen Zellrasen auf dem Filter wachsend (*schwarze Pfeile*). Längliche Endothelzellen mit ovalen Zellkernen in linearer Anordnung (*rote Pfeile*). Lichtmikroskopie A x 160

Auf der zum Medium gerichteten obersten Zellreihe der Keratinozyten lagerten sich nach 14 Tagen *in vitro* längliche Endothelzellen in mindestens einer Zellschicht linear aneinander. Die Oberfläche der Zellen war bei allen charakterisiert durch deutliche Einfaltungen. Die langgestreckten Keratinozyten zeichneten sich durch die Bildung eines mehrlagigen auf dem Filter adhärenen Zellrasens aus (Abbildung 50).

Abbildung 50: Histologische Untersuchung des direkten Millicell®-PCF-Systems 2 (E+K), 14 Tage in vitro

Auf der obersten Zellschicht aus Keratinozyten (*schwarzer Pfeil*) liegende längliche Endothelzellen in einer einzelnen Zellschicht (*roter Pfeil*). Lichtmikroskopie x 100



Die am Tag 21 und Tag 28 der Inkubation angefertigten Präparate zeigten eine mehrlagige Zellstruktur. Die zum Filter gekehrte Unterseite der Struktur wurde begrenzt durch langgestreckte Keratinozyten, die in mehreren Zellschichten auf dem Filter wuchsen. Zum Medium hin wurde die Zellstruktur begrenzt durch eine einzelne Zellschicht länglicher bis polygonaler Endothelzellen. Der mittlere Abschnitt der Zellstruktur war insgesamt gekennzeichnet durch ein Netzwerk aus reich verzweigten, hauptsächlich längs orientierten Zellkörpern und deren Zellkernen und Zellorganellen. Zwischen den angeschnittenen Zellkörpern zeigten sich extrazelluläre Spalträume, die mit fibrillärem Material angefüllt waren (Abbildung 51).

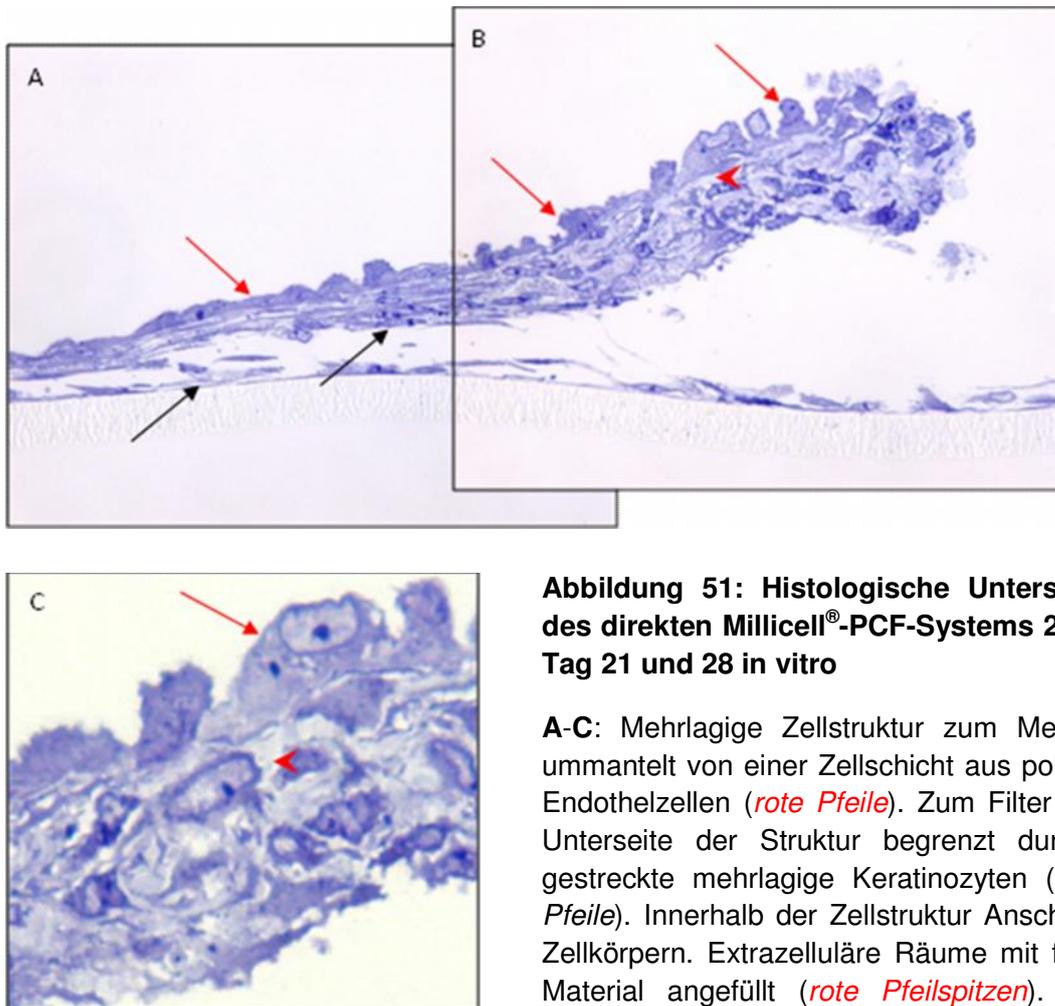


Abbildung 51: Histologische Untersuchung des direkten Millicell®-PCF-Systems 2 (E+K), Tag 21 und 28 in vitro

A-C: Mehrlagige Zellstruktur zum Medium hin ummantelt von einer Zellschicht aus polygonalen Endothelzellen (*rote Pfeile*). Zum Filter gekehrte Unterseite der Struktur begrenzt durch langgestreckte mehrlagige Keratinozyten (*schwarze Pfeile*). Innerhalb der Zellstruktur Anschnitte von Zellkörpern. Extrazelluläre Räume mit fibrillärem Material angefüllt (*rote Pfeilspitzen*). **C:** Bildausschnitt aus B. Lichtmikroskopie A und B x 100, C x 200

5.3.3 Semidünnschnitte des direkten Millicell®-PCF-Systems 3 (Suspension)

Der Filter des Millicell-PCF®-Filtereinsatzes wurde bereits nach einer Woche in vitro lückenlos von Zellen bedeckt. Nach semiquantitativer Beurteilung waren auf dem Filtereinsatz größtenteils langgestreckte sich überlappende Keratinozyten adhärent, die sich in drei bis vier Zelllagen darstellten. Die Endothelzellen lagerten sich auf der oberen Keratinozyten-Zelllage in einer einzelnen subkonfluenten Zellschicht linear an. Damit orientierten sich die Endothelzellen zum Medium aus (Abbildung 52).

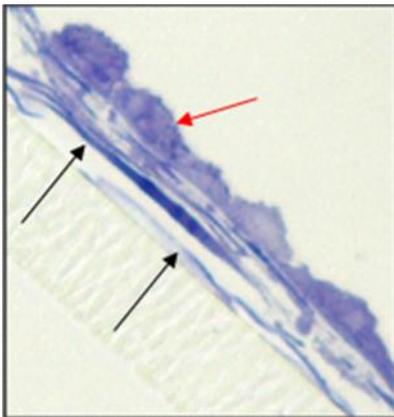


Abbildung 52: Histologische Untersuchung des direkten Millicell®-PCF-Systems 3 (Suspension) nach 7 Tagen in vitro

Langgestreckte Keratinozyten bedecken den Filter vollständig in mehreren Zellschichten (*schwarze Pfeile*). Polygonale Endothelzellen in subkonfluentem Zellrasen auf der obersten Zellschicht aus Keratinozyten (*roter Pfeil*). Lichtmikroskopie x 200

Die Oberfläche der Endothelzellen war unregelmäßig geformt. Über lange sich teilweise überlappende Zellausläufer standen die Endothelzellen untereinander in Verbindung. Zytoplasmatisch zeigten die Endothelzellen jeweils einen länglichen Zellkern mit peripher gelegenen Nucleolus. Die Keratinozyten lagen dem Filter auf und waren dabei in mehreren Zellschichten angeordnet. Vereinzelt wanderten am 14. Tag der Untersuchung in vitro langgestreckte Keratinozyten über die Endothelzellen hinweg (Abbildung 53).

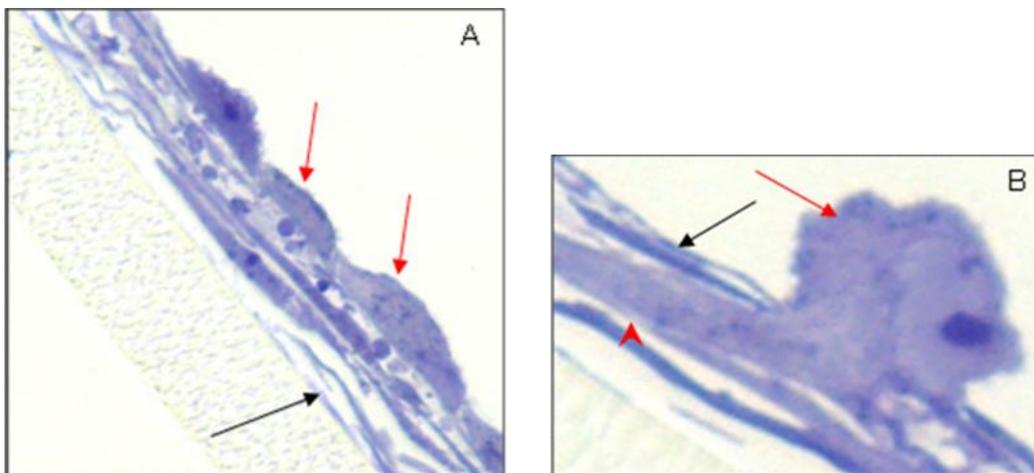


Abbildung 53: Histologische Untersuchung des direkten Millicell®-PCF-Systems 3 (Suspension) nach 14 Tagen

A: Zum Medium gerichtete längliche Endothelzellen in einer Zellschicht (*rote Pfeile*) auf langgestreckten Keratinozyten (*schwarzer Pfeil*). **B:** Vereinzelt über Endothelzellen (*rote Pfeilspitze*) migrierte langgestreckte Keratinozyten (*schwarzer Pfeil*). Zum Medium gerichtete polygonale Endothelzelle (*roter Pfeil*). Lichtmikroskopie A x 100, B x 200

Zwischen der endothelialen Zellschicht und den darunterliegenden langgestreckten Keratinozyten stellte sich nach 21 Tagen in Kultur ein durchgängiger extrazellulärer mit fibrillärem Material angefüllter Spaltraum dar. Zellfragmente konnten in den extrazellulären Spalträumen nicht entdeckt werden. Die Zellkerne der Endothelzellen richteten sich in den Anschnitten zur abluminalen Seite aus. Vereinzelt traten deutlich weniger angefärbte, mit zahlreichen zytoplasmatischen Granula gefüllte Endothelzellen auf (Abbildung 54).

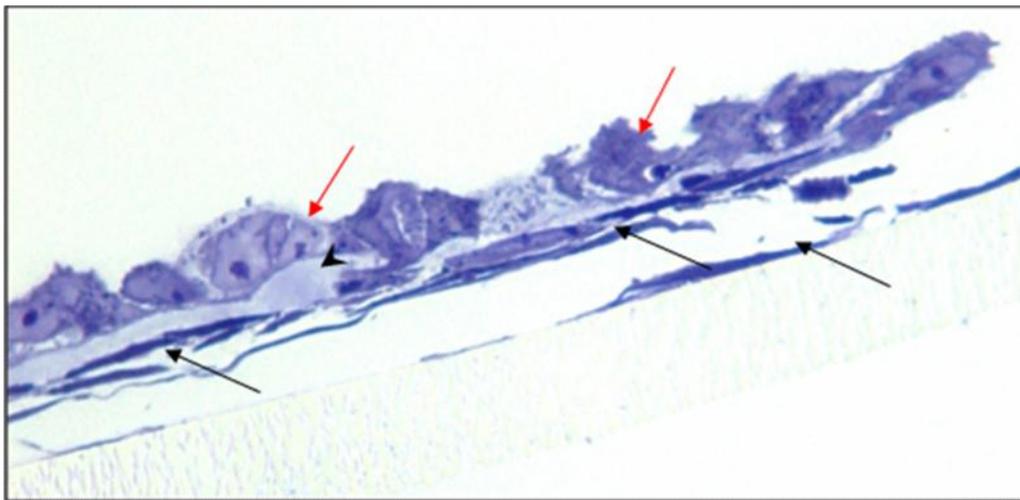


Abbildung 54: Histologische Untersuchung des direkten Millicell-PCF®-Systems 3 (Suspension) nach 21 Tagen in vitro

Keratinozyten in mehreren Zellschichten auf dem Filter (*schwarze Pfeile*). In Kolonien aneinander gelagerte polygonale Endothelzellen (*rote Pfeile*). Zwischen den Endothelzellen und den langgestreckten Keratinozyten (*schwarzer Pfeil*) erweiterter Interzellularraum mit fibrillärem Material (*schwarze Pfeilspitze*). Lichtmikroskopie x 160

Bis zum 28. Tag wuchsen die Endothelzellen mehrlagig. In den meist abgerundeten Zellen bildeten sich intrazytoplasmatische Vakuolen, deren Lumen mit einem fibrillärem Material gefüllt war. Vereinzelt fiel ein durch mindestens zwei Zellen der Endothelzellkolonien geformter optisch leerer extrazellulärer Spaltraum auf. Der zwischen den Zellschichten aus Endothelzellen und Keratinozyten gebildete deutlich erweiterte und mit fibrillärem Material angefüllte Interzellularraum erstreckte sich nun durchgängig über die gesamte Fläche der Endothelzellkolonie (Abbildung 55).

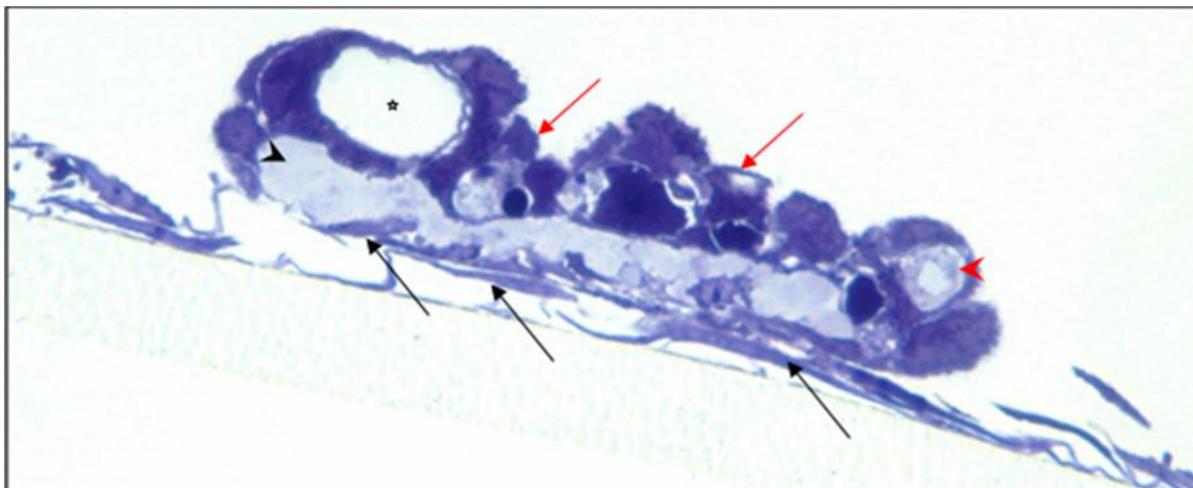


Abbildung 55: Histologische Untersuchung des direkten Millicell®-PCF-Systems 3 (Suspension) nach 28 Tagen in vitro

Endothelzellkolonie auf langgestreckten Keratinozyten. Anschnitt eines optisch leeren extrazellulären Hohlraums (*Stern*) gebildet durch mindestens zwei Endothelzellen. Mit fibrillärem Material gefüllte intrazelluläre Vakuole in einer Endothelzelle (*rote Pfeilspitze*). Zwischen mehrlagig angeordneten Endothelzellen (*rote Pfeile*) und langgestreckten Keratinozyten (*schwarze Pfeile*) gebildeter erweiterter Interzellularraum mit fibrillärem Material. Lichtmikroskopie x 160

5.4 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der direkten Kokulturen in Millicell®-PCF-Filtereinsätzen

Für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen der drei direkten Kokultur-Modelle wurden Endothelzellen und Keratinozyten auf mit Kollagen beschichteten Millicell®-PCF-Filtereinsätzen in dem Nährmedium DMEM+ kultiviert.

5.4.1 Ultrastruktur des direkten Millicell®-PCF-Systems 1 (K+E)

Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen an den in Millicell®-PCF-Filtereinsätzen inkubierten Kokulturen erfolgte eine exemplarische Beurteilung der morphologischen Differenzierung zwischen Endothelzellen und Keratinozyten nach semiquantitativer Beurteilung. Nach 7 Tagen in Kultur war der Filterboden vollständig mit Zellen bedeckt. Die auf dem Filterboden adhärennten langgestreckten, dicht aneinander geordneten Zellen wurden infolge des Versuchsaufbaus des Kokultur-Systems als Keratinozyten identifiziert. Charakteristisch waren hierbei ihre sich überlappenden langen Zellausläufer. Insgesamt bedeckten die Keratinozyten den Filterboden fast vollständig in ein bis zwei Zelllagen. Die Endothelzellen, die gekennzeichnet waren durch eine längliche Gestalt mit großem ovalem Zellkern, lagen den

langgestreckten Keratinozyten in einer Zellschicht direkt auf. Die Oberfläche des Zellkerns und der Plasmamembran erschien in beiden Zelltypen glatt und gleichmäßig. Die Mitochondrien vom Crista-Typ und Lysosomen waren in Endothelzellen und Keratinozyten vor allem in der Peripherie anzutreffen. Raves endoplasmatisches Retikulum war in den Zellen zahlreich vertreten und verteilte sich gleichmäßig im feingranulierten Zytoplasma. Zahlreiche Golgi-Felder waren besonders in Zellkernnähe lokalisiert. Multilamelläre Körperchen und vereinzelt auftretende multivesikuläre Körperchen konzentrierten sich besonders in der Peripherie. Ribosomen und Polyribosomen konnten in gleichmäßiger Verteilung im Zytoplasma beobachtet werden (Abbildung 56).

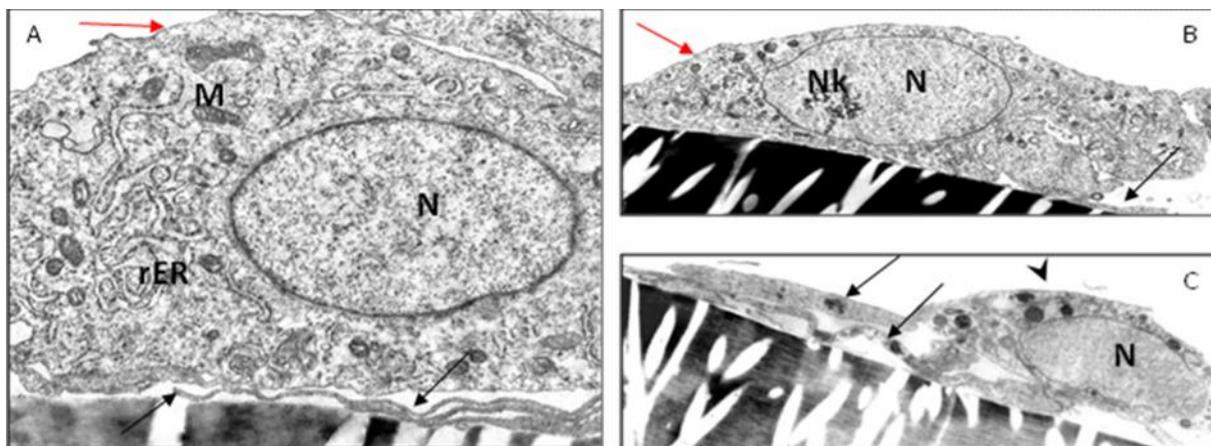


Abbildung 56: Ultrastruktur des direkten Millicell[®]-PCF-Systems 1 (K+E), 7 Tage in Kultur

A-B: Zellausläufer adhärenter Keratinozyten auf dem PCF[®]-Filter (*schwarze Pfeile*). Auf den Keratinozyten-Zellausläufern liegende Endothelzellen (*rote Pfeile*). In den Endothelzellen sind zahlreiche Organellen zu beobachten. **C:** Keratinozyten (*schwarze Pfeilspitze*) mit sich überlappenden langgestreckten Zellausläufern (*schwarze Pfeile*). Mitochondrien (*M*), raues endoplasmatisches Retikulum (*rER*), Nukleus (*N*), Nukleolus (*Nk*). TEM A x 12.500, B x 3.150, C x 4.000

Nach 14 Tagen in Kultur waren vereinzelte zum Medium gerichtete Endothelzellen vorhanden, die durch eine polygonale Zellform mit einem euchromatischen ovalen bis runden Zellkern, in dem ein Nukleolus sichtbar war, charakterisiert wurden. Diese waren auf den langgestreckten Keratinozyten adhären. Die Plasmamembran aller Endothelzellen zeigte zahlreiche fingerförmige Zellfortsätze unterschiedlicher Länge. Das Zytoplasma der Endothelzellen erschien durch paraplastische Einschlüsse feingranuliert. Die Zellkerne waren meist gelappt mit mehr oder weniger tiefen Einkerbungen. Keratinozyten konnten durch ihre langgestreckte

Zellform und ihren langgestreckten euchromatischen Zellkern von den Endothelzellen differenziert werden. Sie lagen auf dem Filterboden in ein bis zwei Zellschichten. Die Zellenden der Keratinozyten überlappten sich dabei jeweils charakteristisch. An einzelnen Stellen wanderten die Zellausläufer der Keratinozyten in die Poren des Filters. Zwischen benachbarten Keratinozyten und Endothelzellen konnten erstmals punktförmige Kontaktstellen beobachtet werden, die einen deutlich erweiterten Interzellularraum begrenzen.

Ribosomen und Polyribosomen sowie Glykogengranula waren im gesamten Zytoplasma beider Zelltypen verteilt. Die im Folgenden beschriebenen Zellorganellen wurden in beiden Zelltypen beobachtet. Mitochondrien vom Crista-Typ zeigten sich insbesondere in Kernnähe und in der Peripherie unmittelbar an der Plasmamembran. Ebenso wurden Lysosomen unterschiedlicher Gestalt (rund, oval, keulenförmig) beobachtet. Raus endoplasmatisches Retikulum war vor allem in Zellkernnähe aber auch im restlichen Zytoplasma gleichmäßig verteilt. Neben dem rauen endoplasmatischen Retikulum waren ebenfalls zahlreiche Golgi-Felder in Zellkernnähe aufzufinden. Vakuolen unterschiedlicher Größe zeigten sich im gesamten Zytoplasma verteilt. Multivesikuläre Körperchen konnten sowohl in der Peripherie der Zellkörper als auch in Zellkernnähe beobachtet werden (Abbildung 57).

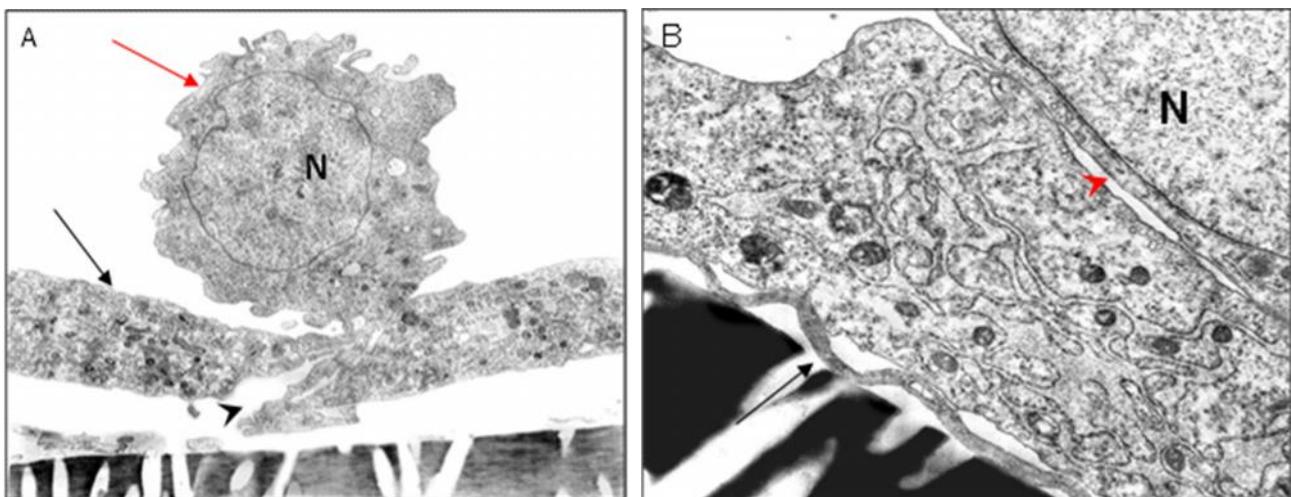


Abbildung 57: Ultrastruktur des direkten Millicell[®]-PCF-Systems 1 (K+E), 14 Tage in Kultur

A: Auf langgestreckten Keratinozyten (*schwarzer Pfeil*) adhären polygonale Endothelzelle (*roter Pfeil*). Interzellularraum zwischen zwei sich überlappenden Keratinozyten (*schwarze Pfeilspitze*). **B:** Deutlich erweiterter Interzellularraum zwischen Keratinozyt und Endothelzelle (*rote Pfeilspitze*). Langgestreckter Zellausläufer eines Keratinozyten auf dem Filter (*schwarzer Pfeil*). Nukleus (*N*). TEM A x 5.000; B x 12.500

Nach 21 Tagen der Kultivierung bildeten langgestreckte Keratinozyten zwei bis drei Zelllagen auf dem Filter. Endothelzellen schlossen sich nun auf den Zelllagen aus Keratinozyten in Zellansammlungen aus mindestens vier polygonalen Zellen zusammen. Zwischen Endothelzellen und Keratinozyten zeichnete sich stets ein erweiterter Interzellularraum ab, in den zahlreiche Zellfortsätze der Endothelzellen hineinragten. Dieser Interzellularraum dehnte sich teilweise über die Länge mehrerer Zellkörper aus (Abbildung 58).

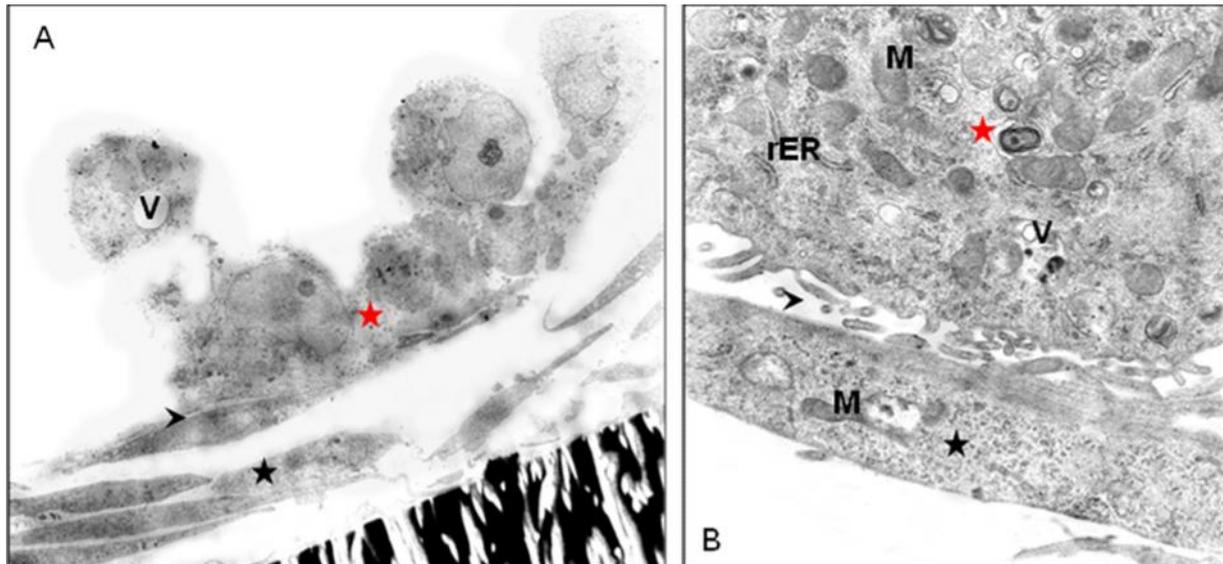


Abbildung 58: Ultrastruktur des direkten Millicell®-PCF-Systems 1 (K+E), 21 Tage in Kultur

A: Ausbildung eines mehrlagigen Zellrasens aus langgestreckten Keratinozyten (*schwarzer Stern*) auf dem Filter. In Zellansammlung gruppierte polygonale Endothelzellen (*roter Stern*) auf den Keratinozyten. Bildung von Vakuolen (V) in den Endothelzellen. Erweiterter Interzellularraum zwischen Keratinozyten und Endothelzellen (*Pfeilspitze*). **B:** In den Interzellularraum ragende Fortsätze unterschiedlicher Länge und Form von Endothelzelle ausgehend (*Pfeilspitze*). Endothelzelle (*roter Stern*) mit Vakuolen (V), rauem endoplasmatischem Retikulum (*rER*) und Mitochondrien (*M*). Keratinozyt (*schwarzer Stern*). TEM A x 1.600, B x 12.500

Bei den Untersuchungen am 28. Kultivierungstag dominierten Zellansammlungen dicht angeordneter Endothelzellen, die auf dem mehrlagigen Zellrasen aus langgestreckten, parallel angeordneten Keratinozyten lokalisiert waren. Während das Profil der Plasmamembran der Keratinozyten insgesamt glatt erschien, zeichnete sich die Plasmamembranoberfläche der Endothelzellen durch zahlreiche Mikrovilli-ähnliche Zellfortsätze und fingerförmige Ausstülpungen unterschiedlicher Größe aus. In den erweiterten Interzellularraum zwischen

benachbarten Endothelzellen ragten Zellfortsätze hinein, die einander überlappten. In diesen Interzellularräumen befanden sich teils homogenes Material sowie Zellfragmente und elektronenoptisch leere Räume. Zwischen Keratinozyten und Endothelzellen zeigte sich stets ein erweiterter mit homogenem Material angefüllter Interzellularraum, in den ausschließlich die Zellfortsätze der Endothelzellen hineinragten (Abbildung 59).

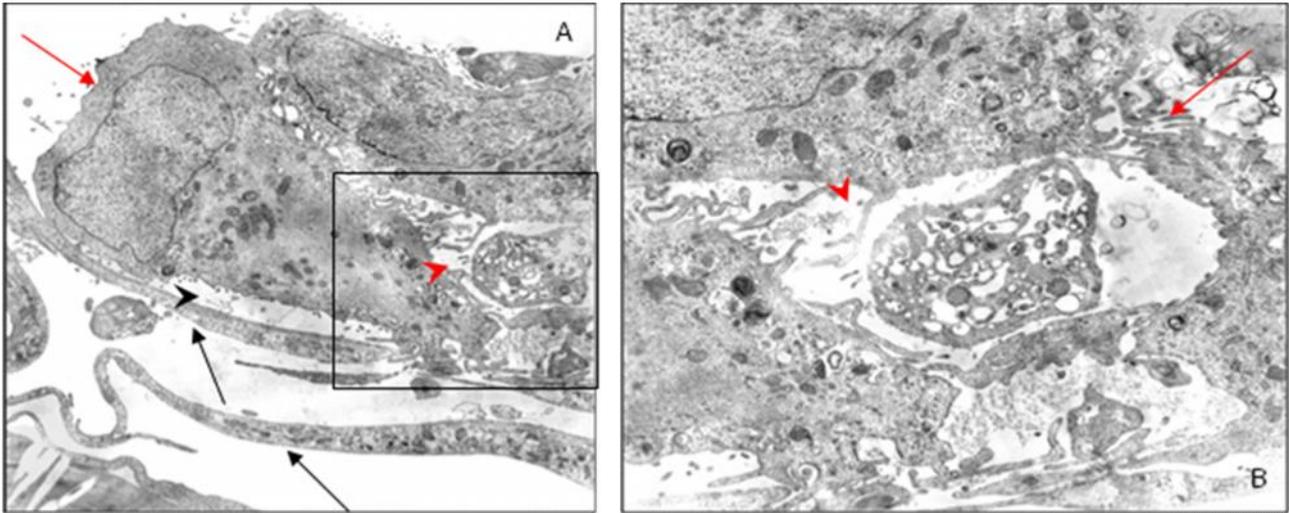


Abbildung 59: Ultrastruktur des direkten Millicell[®]-PCF-Systems 1 (K+E), 28 Tage in Kultur

A: Zellansammlung aus Endothelzellen (*roter Pfeil*) auf mehrlagigem Zellrasen aus langgestreckten Keratinozyten (*schwarze Pfeile*). Erweiterter interzellulärer Spaltraum zwischen Endothelzellen und Keratinozyten (*schwarze Pfeilspitze*). Interzellularraum zwischen benachbarten Endothelzellen (*rote Pfeilspitze*). **B:** Bildausschnitt aus A. Interzellularraum zwischen Endothelzellen (*rote Pfeilspitze*). Überlappende Zellfortsätze benachbarter Endothelzellen (*roter Pfeil*). TEM A x 1.600, B x 8.000

Des Weiteren konnten durch mindestens zwei Endothelzellen begrenzte Hohlräume beobachtet werden. Diese Hohlräume waren teils mit Zellfragmenten angefüllt, teils elektronenoptisch leer. Die gelappten Zellkerne befanden sich jeweils in der Peripherie der Zellen. Wie in früheren Stadien beschrieben, war auch hier das Profil gekennzeichnet durch tiefe Einkerbungen (Abbildung 60).

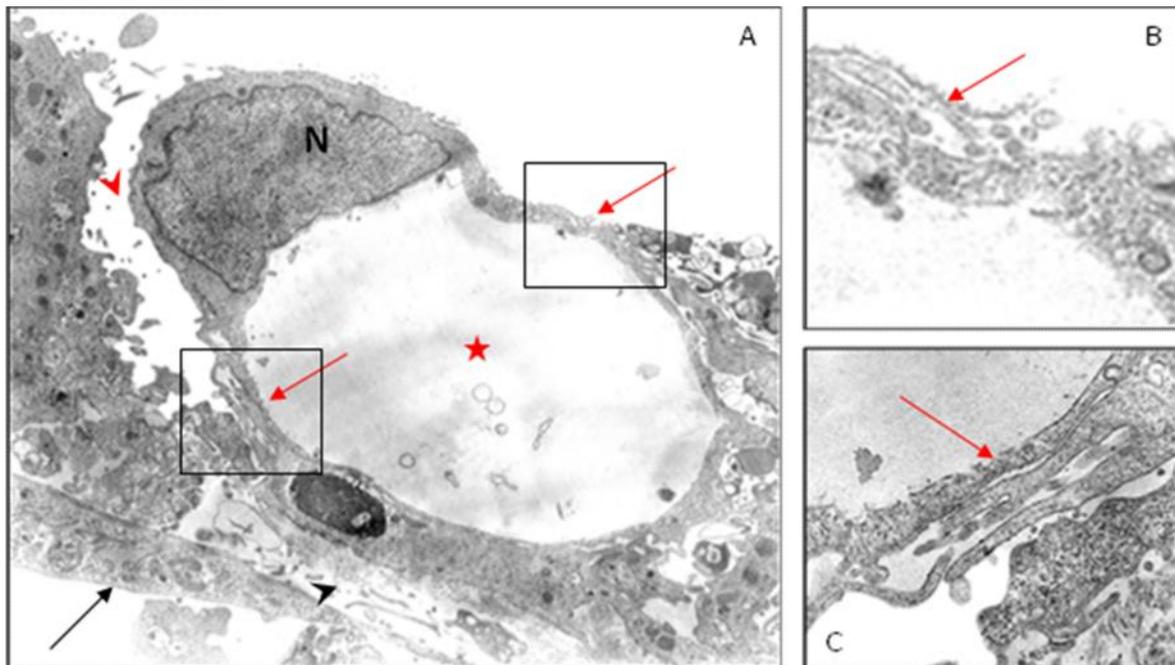


Abbildung 60: Ultrastruktur des direkten Millicell®-PCF-Systems 1 (K+E), 28 Tage in Kultur

A: Durch überlappende Zellenden benachbarter Endothelzellen (*rote Pfeile*) begrenzter Hohlraum mit Zellfragmenten gefüllt (*roter Stern*). Interzellularraum zwischen Endothelzellen (*rote Pfeilspitze*). Zwischen Keratinozyten (*schwarzer Pfeil*) und Endothelzellen erweiterter Interzellularspalt mit homogenem Material (*schwarze Pfeilspitze*). Zellkern (N). **B-C:** Bildausschnitt aus A. TEM A x 5.000

5.4.2 Ultrastruktur des direkten Millicell®-PCF-Systems 2 (E+K)

Bei den transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen an Millicell®-PCF-Filtereinsätzen nach 7 Tagen in Kultur zeigten die Keratinozyten eine langgestreckte Gestalt mit länglichem Zellkern und deutlich langgestreckten Zellausläufern unter Bildung eines zweilagigen Zellrasens auf dem Filterboden. Die Keratinozyten waren im Gegensatz zum Versuchsaufbau auf dem Filtereinsatz adhären und bedeckten die Oberfläche der Filtermembran fast vollständig. Die Endothelzellen wurden nach Einsaat augenscheinlich von den Keratinozyten unterwandert. Sie besaßen eine polygonale bis längliche Zellform sehr einheitlicher Größe und bildeten eine einzelne Zellschicht auf den am Filter adhären Keratinozyten. Zwischen den Endothelzellen und den Keratinozyten zeichnete sich ein erweiterter Interzellularraum ab. Die zum Medium gerichtete Oberfläche der Endothelzellen war gekennzeichnet durch tiefe Einfaltungen und fingerförmige Ausstülpungen der Plasmamembran. Der Zellkern jeder dieser Zellen war gleichermaßen gefaltet und enthielt jeweils einen Nukleolus. Die Zellkerne waren oval und

euchromatisch. Das Zytoplasma erschien feingranuliert und zeigte eine große Anzahl an Ribosomen und Polyribosomen. Die Verteilung der Zellorganellen im Zytoplasma der Endothelzellen war gekennzeichnet durch deren Ansammlung in Kernnähe und der Zellperipherie. Mitochondrien vom Crista-Typ waren hierbei zahlreich vertreten. Raues endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Felder waren insbesondere in der Peripherie lokalisiert. Die Zisternen der Golgi-Felder hatten ein erweitertes Lumen. Lysosomen traten in Gruppen auf. Vereinzelt waren multivesikuläre Körperchen zu beobachten. Die langgestreckten Keratinozyten hatten eine glatte Oberfläche und einen länglichen Zellkern. Im feingranulierten Zytoplasma der Keratinozyten konzentrierten sich die Zellorganellen hauptsächlich in der Peripherie, ganz besonders in den Zellausläufern. Ribosomen und Polyribosomen waren im gesamten Zytoplasma gleichmäßig verteilt. Mitochondrien vom Crista-Typ und raues endoplasmatisches Retikulum konzentrierten sich in großer Anzahl an den Zellpolen. In Kernnähe zeigten sich Golgi-Felder mit weiten Zisternen. Wenige multilamelläre und multivesikuläre Körperchen waren in der Peripherie zu sehen (Abbildung 61).

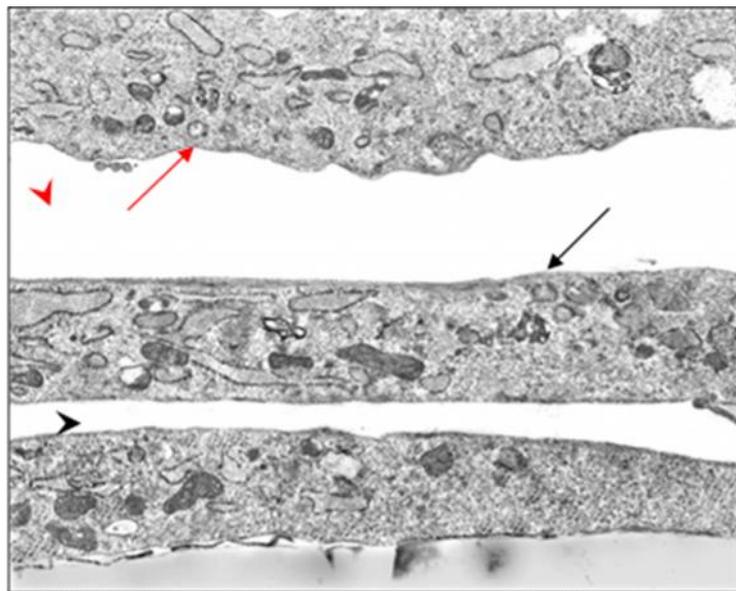


Abbildung 61: Ultrastruktur des direkten Millicell[®]-PCF-Systems 2 (E+K), 7 Tage in Kultur

Auf dem Filter adhärente Keratinozyten mit langgestreckter Zellform in zwei Zellschichten (*schwarzer Pfeil*). Zwischen den Keratinozyten dargestellter Interzellularraum (*schwarze Pfeilspitze*). Von Keratinozyten unterwanderte Endothelzellen mit unregelmäßiger Zelloberfläche (*roter Pfeil*). Interzellularraum zwischen Endothelzelle und Keratinozyt (*rote Pfeilspitze*). TEM x 3.150

Nach 14 Tagen in Kultur bildete sich auf der Filtermembran ein zwei- bis dreilagiger Zellrasen aus langgestreckten Keratinozyten, deren Zellausläufer sich überlappten. Deren Profil war charakterisiert durch geringgradige Einfaltungen der Plasmamembran. Die Endothelzellen fielen durch eine längliche Gestalt auf und ordneten sich auf den Keratinozyten in einer einzelnen Zellschicht linear aneinander an. Die zum Medium gerichtete Oberfläche der Endothelzellen und das Profil der Zellkerne fielen durch Einfaltungen der Plasmamembran auf. In die erweiterten Interzellularräume, die zwischen benachbarten Endothelzellen entstanden, ragten zahlreiche fingerförmige Ausstülpungen hinein. Ebenso konnten zwischen den Endothelzellen und den Keratinozyten erweiterte Interzellularräume beobachtet werden, die mit homogenem Material angefüllt waren. Sowohl in den Keratinozyten als auch in den Endothelzellen konnten multivesikuläre und multilamelläre Körperchen dargestellt werden (Abbildung 62).

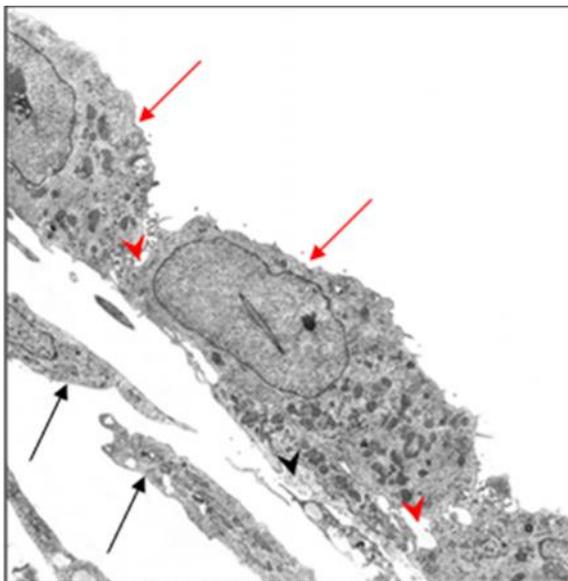


Abbildung 62: Ultrastruktur des direkten Millicell®-PCF-Systems 2 (E+K), 14 Tage in Kultur

Endothelzellen (*rote Pfeile*) in linearer Anordnung unter Ausbildung von Interzellularräumen zwischen dicht benachbarten Endothelzellen (*rote Pfeilspitzen*). Langgestreckte Keratinozyten (*schwarze Pfeile*). Interzellulärer Spaltraum zwischen den Endothelzellen und den Keratinozyten (*schwarze Pfeilspitze*). TEM x 3.150

Nach einer Inkubation von 21 Tagen formten benachbarte Endothelzellen durch Biegung ihrer Zellkörper einschließlich ihrer gelappten Zellkerne und Vereinigung der Zellenden einen zentralen Hohlraum. Innerhalb des Hohlraumes ragten fingerförmige Ausstülpungen der Plasmamembran unterschiedlicher Größe hinein, die sich wiederum breitflächig überlappten. In den Ausstülpungen der Endothelzellen wurden multivesikuläre Körperchen beobachtet. Die zu den langgestreckten Keratinozyten gekehrte Seite der endothelialen Plasmamembran war gekennzeichnet durch tiefe Einfaltungen. Der erweiterte Interzellularraum zwischen Endothelzellen und Keratinozyten war mit einem homogenen Material angefüllt (Abbildung 63).

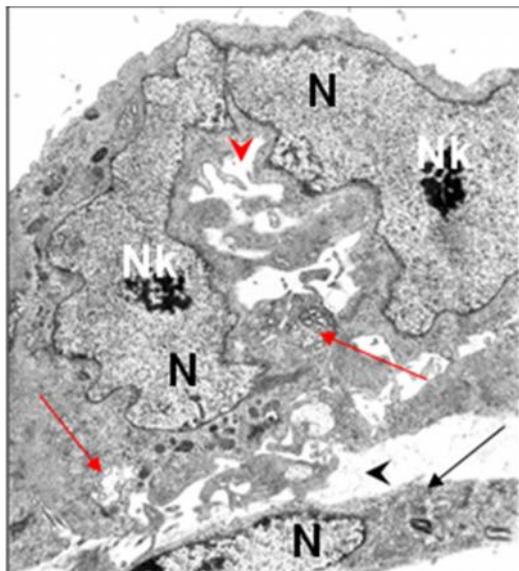


Abbildung 63: Ultrastruktur des direkten Millicell®-PCF-Systems 2 (E+K), 21 Tage in Kultur

Benachbarte Endothelzellen formen durch Biegung ihrer Zellkörper einschließlich ihrer Zellkerne und Vereinigung der Zellenden einen zentralen Hohlraum in den fingerförmige Ausstülpungen der Plasmamembran hineinragen (*rote Pfeilspitze*). Erweiterter mit homogenem Material gefüllter Interzellularraum (*schwarze Pfeilspitze*) zwischen Endothelzellen und langgestreckten Keratinozyten (*schwarzer Pfeil*). Multivesikuläre Körperchen (*rote Pfeile*), Nukleus (N), Nukleolus (Nk). TEM x 6.300

Zwischen dem 21. Und 28. Kultivierungstag dominierten mehrlagige Zellansammlungen aus Endothelzellen, die auf den Zelllagen aus langgestreckten Keratinozyten lagerten. Die Zellansammlungen ließen sich morphologisch in drei Abschnitte unterteilen:

1. Der zum Medium hin ausgerichtete oberste Abschnitt der Zellansammlung wurde gebildet durch eine einschichtige Zellreihe aus länglichen bis polygonalen Endothelzellen unterschiedlichen Umfangs und Oberflächenform. Deren Zelloberfläche war bestimmt durch tiefe Einfaltungen und zahlreiche Mikrovilli-ähnlichen Fortsätze. Zwischen den Zellen bildeten sich Interzellularräume, in die Fortsätze hineinragten. Der Übergang zum zweiten Abschnitt bestand aus einem erweiterten Extrazellularraum, der mit fibrillärem Material angefüllt war.
2. Der zweite Abschnitt der Zellansammlung bestand aus einem Netzwerk reich verzweigter mehrlagiger hauptsächlich länglich orientierter Zellkörper mit erweitertem Extrazellularraum. Deren Zellkerne und Zellorganellen stellten sich in unregelmäßiger Verteilung dar. Zwischen den angeschnittenen Zellkörpern zeigten sich extrazelluläre Spalträume, die mit fibrillärem Material angefüllt waren. Teilweise stellten sich elektronenoptisch leere interzelluläre Spalträume da, in die Zellfortsätze hineinragten.
3. Der nächste Abschnitt der Zellansammlung wurde bestimmt durch eine Zellreihe länglicher Endothelzellen mit großen ovalen Zellkernen, die eine charakteristische Einfaltung der Zellkernoberfläche aufwiesen. Die Zellansammlung wurde durch mehrlagige langgestreckte Keratinozyten von der Filtermembran begrenzt. Zwischen der Zellreihe aus länglichen Endothelzellen und den darunter liegenden langgestreckten Keratinozyten stellte sich ein mit homogenem Material gefüllter Interzellularraum dar (Abbildung 64 und 65).

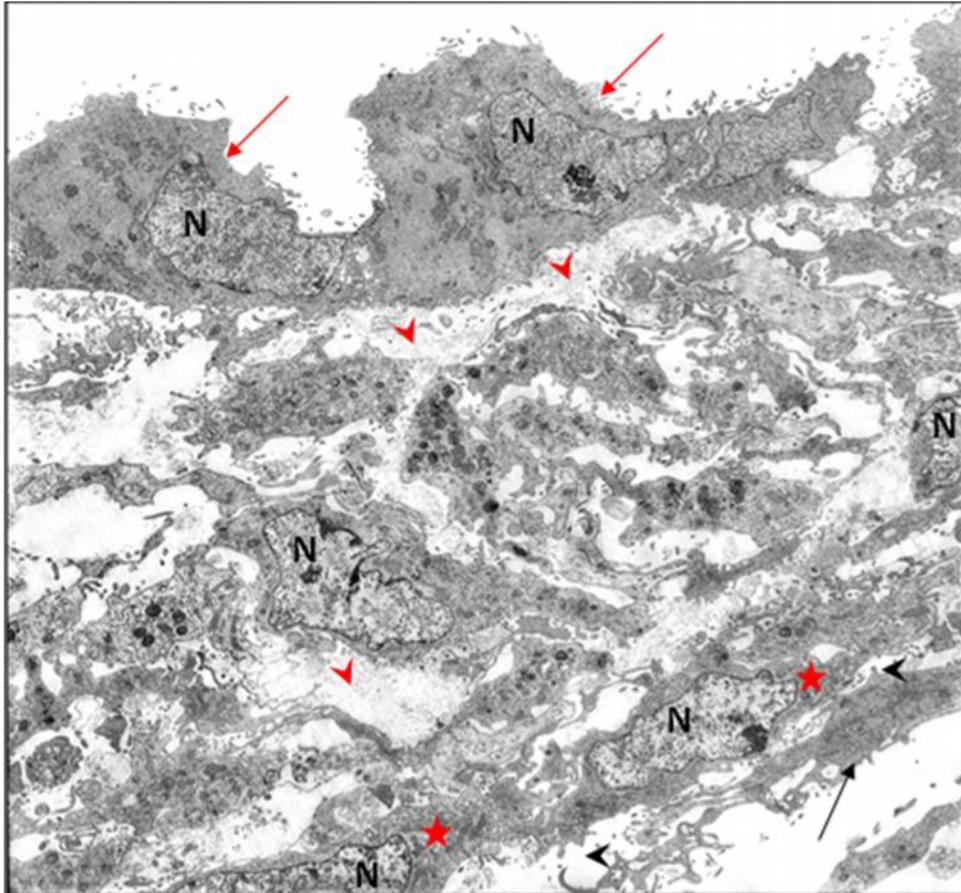


Abbildung 64: Ultrastruktur des direkten Millicell®-PCF-Systems 2 (E+K), 21 bis 28 Tage in Kultur

Mehrlagige Zellansammlung aus Endothelzellen auf einem mehrlagigen Zellrasen aus langgestreckten Keratinozyten (*schwarzer Pfeil*). Zum Medium gerichtete endotheliale Zellreihe (*rote Pfeile*). Erweiterter Extrazellulärraum mit fibrillärem Material (*rote Pfeilspitzen*) zwischen Anschnitten von einem Netzwerk aus reich verzweigten Zellen. Zu Keratinozyten begrenzende Zellreihe aus länglichen Endothelzellen (*rote Sterne*). Zwischen Endothelzellen und Keratinozyten entstandener Interzellularraum mit homogenem Material (*schwarze Pfeilspitzen*). Nukleus (N). TEM x 2.000

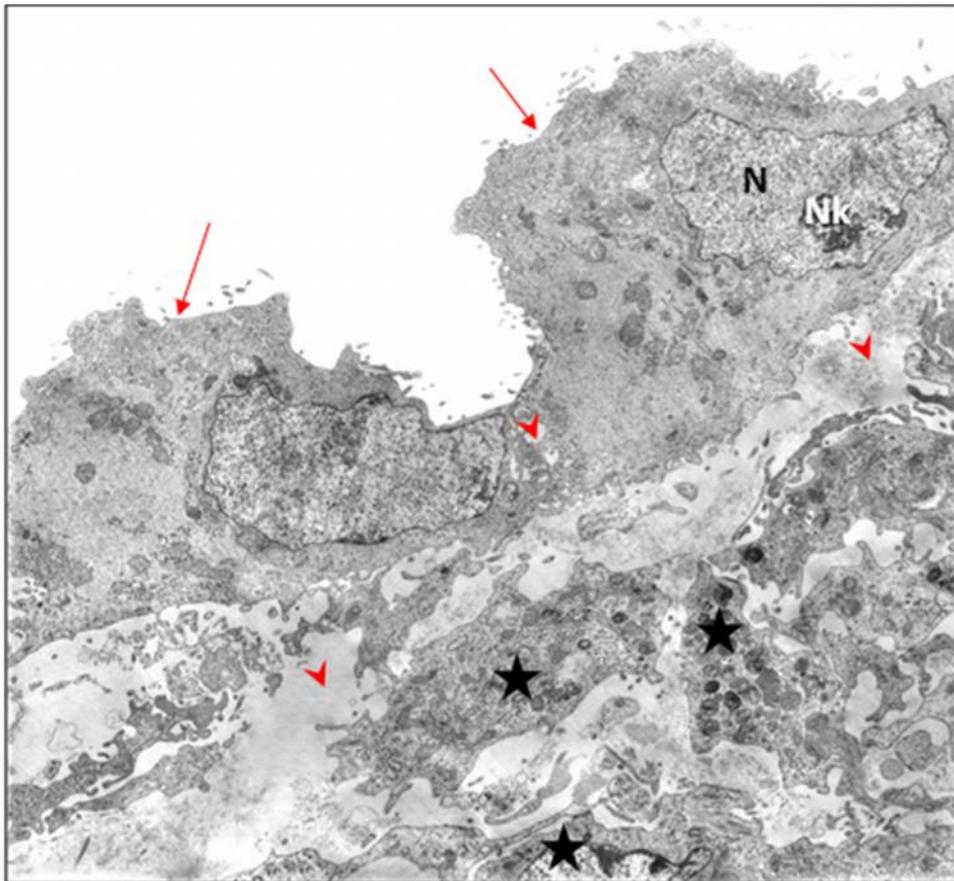


Abbildung 65: Ultrastruktur des direkten Millicell[®]-PCF-Systems 2 (E+K), 21 bis 28 Tage in Kultur

Längliche bis polygonale Endothelzellen mit deutlichen Einfaltungen der Plasmamembran begrenzen die Zellansammlung zum Medium hin (*rote Pfeile*). Erweiterter Interzellularraum, in den zahlreiche Mikrovilli-ähnliche Zellfortsätze hineinragen, mit extrazellulärem Material angefüllt (*rote Pfeilspitzen*). Anschnitte von Zellkörpern, Zellkernen und Zellorganellen (*Sterne*). Nucleus (N), Nucleolus (Nk). TEM x 3.150

5.4.3 Ultrastruktur des direkten Millicell[®]-PCF-Systems 3 (Suspension)

Nach 7 Tagen in vitro bildeten langgestreckte Keratinozyten einen fünf- bis sechslagigen Zellrasen aus. Die Oberfläche der Plasmamembran und des großen länglichen Zellkerns war glatt. In jedem chromatinreichen Zellkern kam ein Nucleolus vor. Das Zytoplasma erschien feingranuliert und enthielt zahlreiche Organellen. Darunter fielen vor allem hauptsächlich Ribosomen und Polyribosomen auf. Des Weiteren kam raues endoplasmatisches Retikulum mit erweiterten Zisternen vor. Große multivesikuläre und multilamelläre Körperchen waren überwiegend an den Zellpolen beziehungsweise in den Zellausläufern aber auch in Kernnähe

lokalisiert. Nur wenige Mitochondrien vom Crista-Typ konzentrierten sich in Zellkernnähe. Gleichzeitig konnten zahlreiche Golgi-Felder und Lysosomen in Zellkernnähe beobachtet werden. Im Hinblick auf Vorkommen und Verteilung der Zellorganellen konnten Keratinozyten und Endothelzellen nicht voneinander unterschieden werden (Abbildung 66).

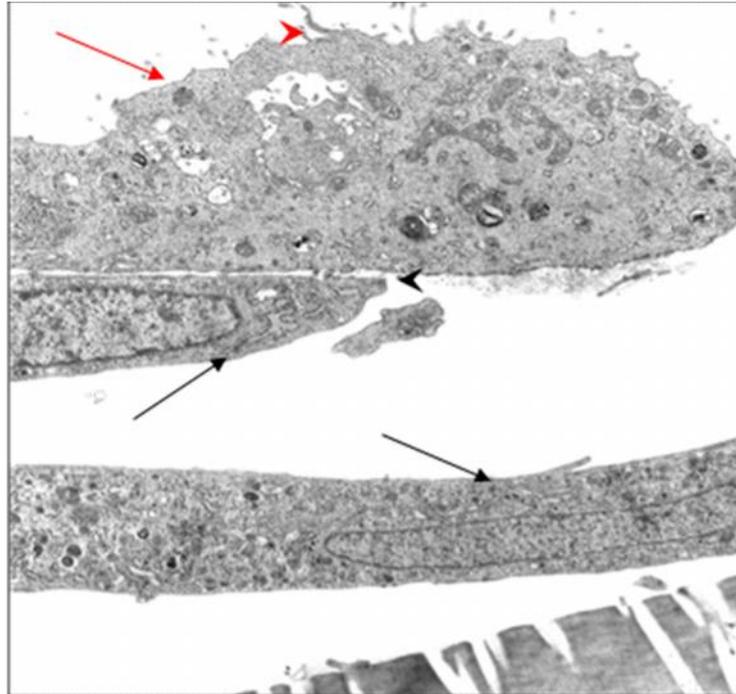


Abbildung 66: Ultrastruktur des direkten Millicell®-PCF-Systems 3 (Suspension) nach 7 Tagen in Kultur

Mehrlagige langgestreckte Keratinozyten liegen dem Filterboden breitflächig auf (*schwarze Pfeile*). Polygonale Endothelzelle liegt den Keratinozyten auf (*roter Pfeil*). Dem Medium zugekehrte Oberfläche der Endothelzelle gekennzeichnet durch zahlreiche fingerförmige Zellfortsätze unterschiedlicher Länge (*rote Pfeilspitze*). Interzellularraum zwischen Endothelzellen und Keratinozyten mit homogenem Material (*schwarze Pfeilspitze*). TEM x 5.000

Polygonale bis längliche Endothelzellen lagerten auf den Keratinozyten. Das Profil der Endothelzellen war gekennzeichnet durch starke Einfaltungen und zahlreiche Mikrovilli-ähnliche Fortsätze, die hauptsächlich an der zum Medium gekehrten Zelloberfläche zu beobachten waren. Die den Keratinozyten zugewandte Seite der Zellmembran erschien glatt. Zwischen Endothelzellen und Keratinozyten zeichnete sich ein mit homogenem Material angefüllter Interzellularraum ab (Abbildung 67).

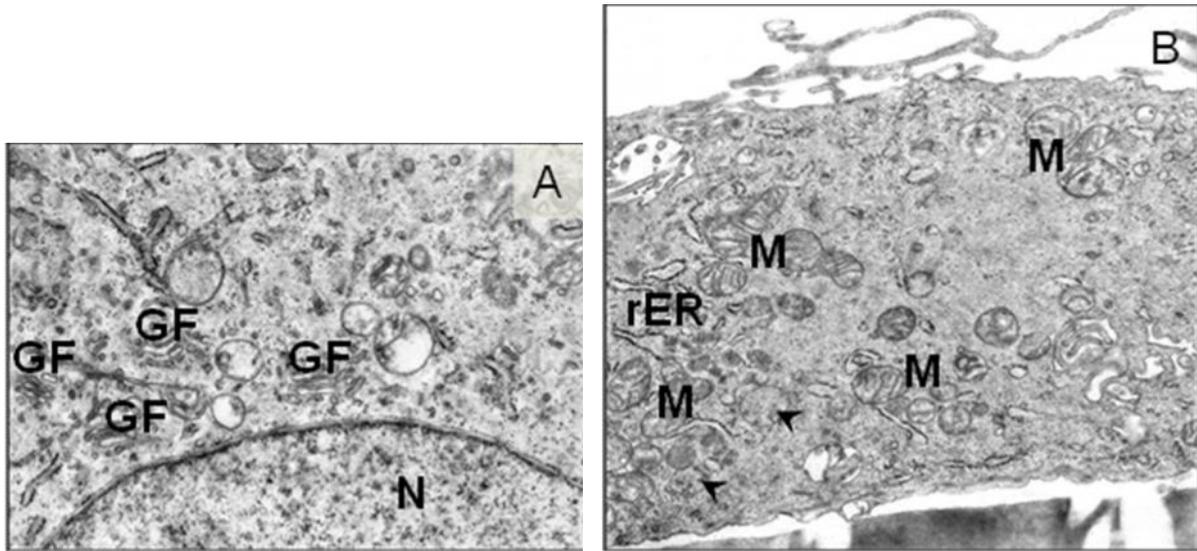


Abbildung 67: Ultrastruktur des direkten Millicell®-PCF-Systems 3 (Suspension), 7 Tage in Kultur

A: Zahlreiche Golgi-Felder (*GF*) in Zellkernnähe in Keratinozyten. Nukleus (*N*). **B:** Im Zytoplasma der Endothelzellen erkennbare Mitochondrien (*M*), raues endoplasmatisches Retikulum (*rER*) und multivesikuläre Körperchen (*schwarze Pfeilspitzen*). TEM A x 25.000, B x 10.000

Nach 14 Tagen in Kultur wies jeder Keratinozyt eine langgestreckte Gestalt mit langgestrecktem Zellkern auf. Die Zelloberfläche erschien glatt mit geringgradigen Unregelmäßigkeiten. Zwischen den Keratinozyten wurden gleichmäßige Interzellularräume beobachtet. Raues endoplasmatisches Retikulum konnte an den Zellpolen der Keratinozyten beobachtet werden. Im Zytoplasma zeigten sich zahlreiche Mitochondrien vom Crista-Typ. Auf den mehrlagigen Keratinozyten lagerten polygonale Endothelzellen, deren zum Medium gerichtete Zelloberfläche gekennzeichnet war durch starke Einfaltungen und die Ausbildung von zahlreichen Zellfortsätzen. An den Zellpolen der Endothelzellen waren sowohl multivesikuläre und multilamelläre Körperchen zu finden. Die den Keratinozyten zugewandte Seite der endothelialen Zelloberfläche erschien vergleichsweise glatt. Zwischen den Endothelzellen und den Keratinozyten entstand ein schmaler Interzellularräum, der angefüllt war mit homogenem Material (Abbildung 68).

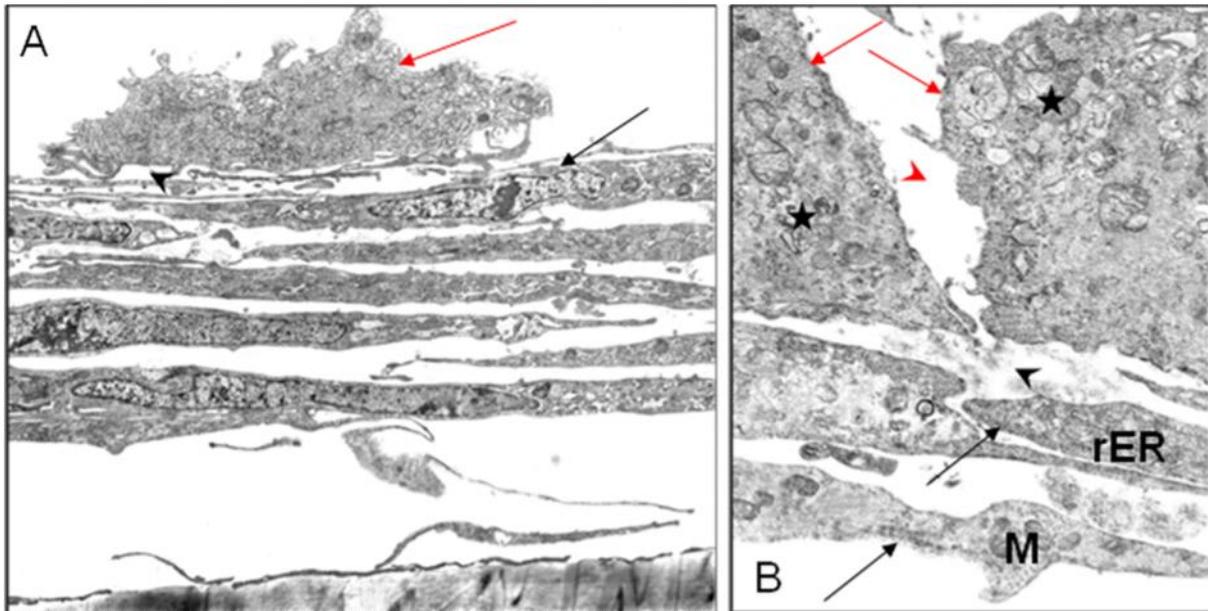


Abbildung 68: Ultrastruktur des direkten Millicell[®]-PCF-Systems 3 (Suspension), 14 Tage in Kultur

A: Erweiterter Interzellularraum (*schwarze Pfeilspitze*) zwischen Endothelzellen (*roter Pfeil*) und Keratinozyten (*schwarzer Pfeil*). **B:** An den Zellpolen der Endothelzellen (*rote Pfeile*) erkennbare multivesikuläre und multilamelläre Körperchen (*Sterne*). Interzellularraum zwischen Endothelzellen und Keratinozyten mit homogenem Material (*schwarze Pfeilspitze*). Mehrlagige Keratinozyten (*schwarze Pfeile*). Raues endoplasmatisches Retikulum (*rER*) und Mitochondrien (*M*) in Keratinozyten. TEM A x 4.000, B x 8.000

Die Ergebnisse der Untersuchungen nach 21 Tagen zeigten Zellansammlungen von Endothelzellen, die auf der mehrlagigen Zellschicht aus Keratinozyten lagerten. In die interendothelialen Räume ragten Mikrovilli-ähnliche Fortsätze. Die Zellen innerhalb des Zellverbandes zeigten eine deutliche Zunahme an multivesikulären und multilamellären Körperchen besonders in Zellkernnähe und in der Peripherie. Mitochondrien vom Crista-Typ waren, wie in den Zellen jüngerer Stadien, zahlreich vertreten. In der Peripherie konnten zahlreiche Polyribosomen und raues endoplasmatisches Retikulum beobachtet werden (Abbildung 69).

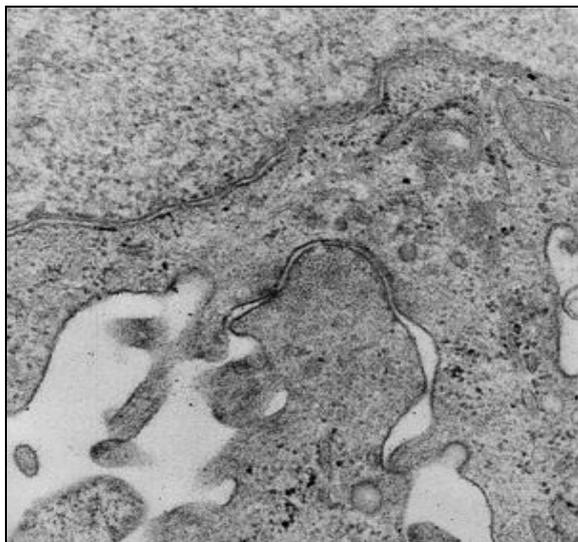
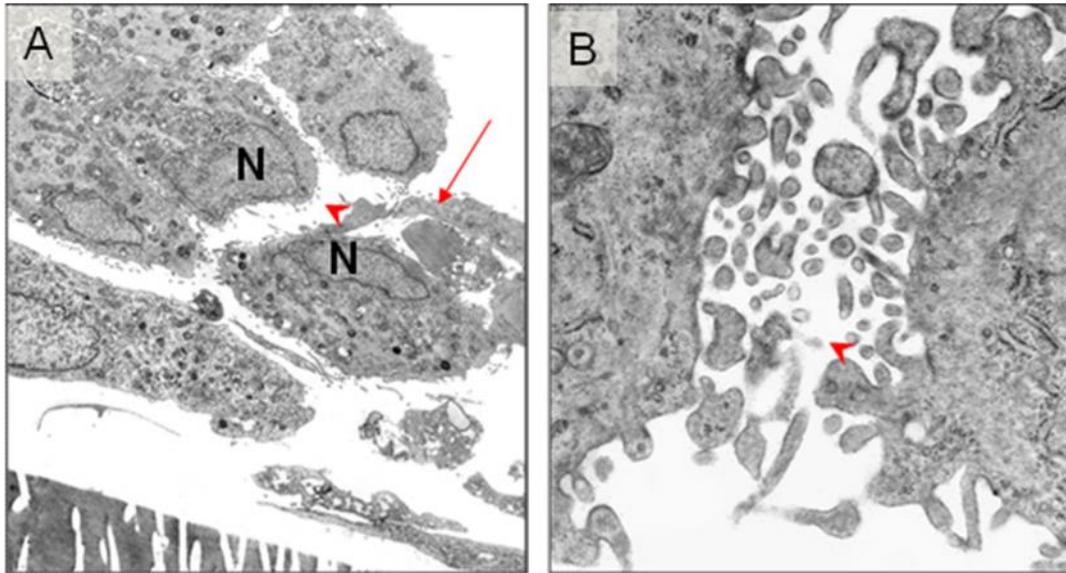
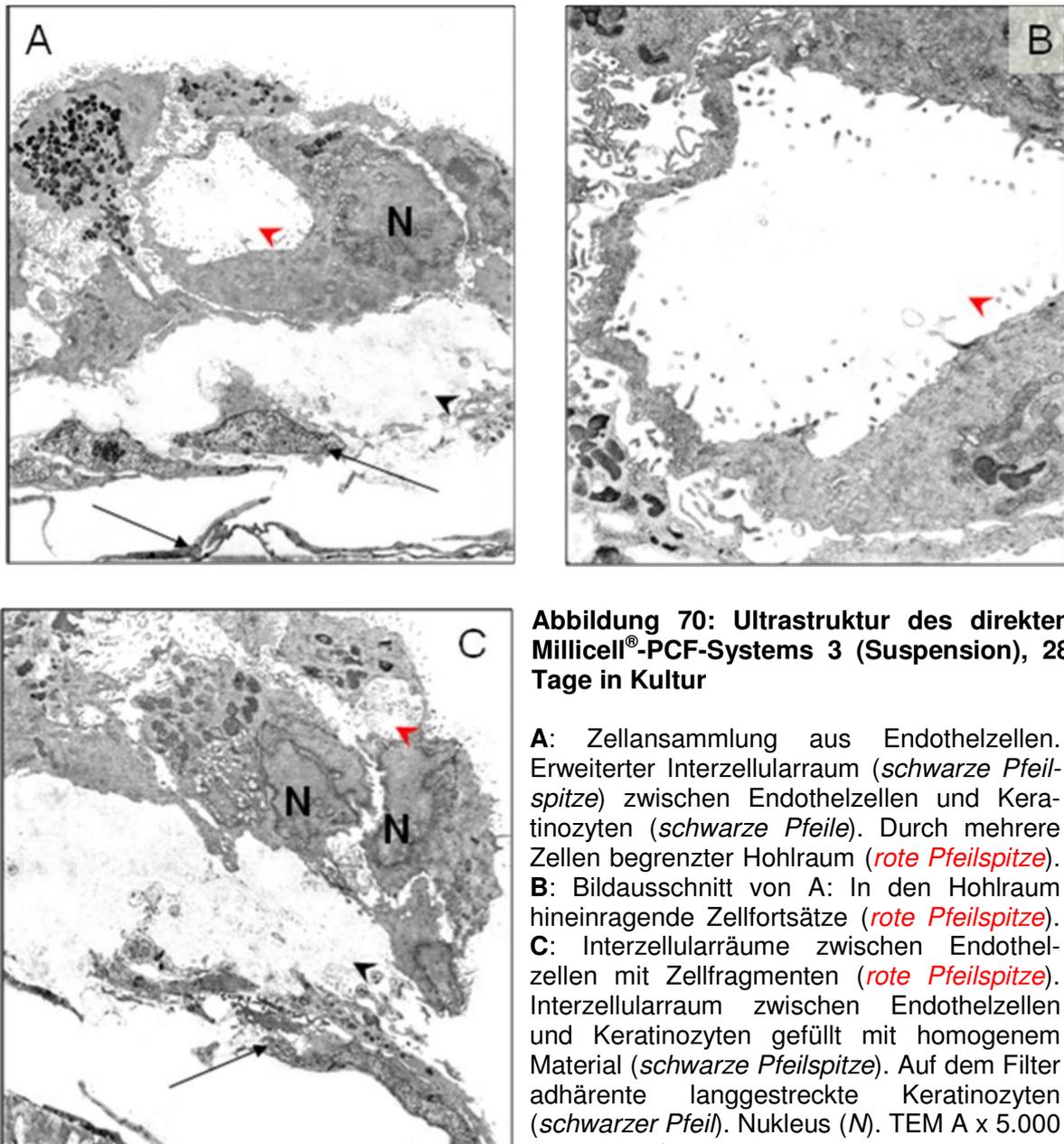


Abbildung 69: Ultrastruktur des direkten Millicell[®]-PCF-Systems 3 (Suspension), 21 Tage in Kultur

A: Zellansammlung aus Endothelzellen (*roter Pfeil*). In den Interzellularraum zwischen Endothelzellen hineinragende Mikrovilli-ähnliche Zellfortsätze (*rote Pfeilspitze*). **B:** Zahlreiche Zellfortsätze unterschiedlicher Form und Größe in den Interzellularraum zwischen benachbarten Endothelzellen hineinragend (*rote Pfeilspitze*). Nukleolus (N). TEM A x 2.500, B x 16.000

Links: Zwischen den Keratinozyten gebildete desmosomale Verankerungen. TEM x 20.000

Die Endothelzellen zeigten am 28. Kultivierungstag intrazelluläre Vakuolen. Innerhalb einzelner Zellen des Zellverbandes vergrößerten sich die Vakuolen zu einem Hohlraum, in den einige Zellfortsätze hineinragten. Die Endothelzellen zeigten jeweils einen stark gelappten Zellkern, der an der Zellperipherie lokalisiert war. Lysosomen unterschiedlichen Umfangs dominierten unter den Zellorganellen (Abbildung 70).



In der folgenden Tabelle werden die Ergebnisse der morphologischen Charakteristika und die Anordnung der Endothelzellen und Keratinozyten in den verschiedenen direkten Kokultur-Systemen dargestellt:

Ta- ge	Glasplättchen-Kokultur			Filtereinsatz-Kokultur		
	Modell 1	Modell 2	Modell 3	Modell 1	Modell 2	Modell 3
1-5	EC-Kolonien; sternförmige K-Cluster (Abb.18)	EC-Kolonien; sternförmige K-Cluster (Abb.24)	EC-Kolonien; sternförmige K-Cluster (Abb.32)			
6-10	Zellstraßen aus K; längliche EC im Randbereich zu K (Abb.20)	Zellstraßen aus K; längliche EC im Randbereich zu K; ringförmige Strukturen (Abb.26)	Zellstraßen aus K; längliche EC im Randbereich zu K (Abb.34)	1-2-lagige K; Zellschicht aus EC auf K (Abb.56)	mehrlagige K; Zellschicht aus EC auf K (Abb.61)	mehrlagige K; Zellschicht aus EC auf K (Abb.66)
11-15	Ausbildung ringförmiger Strukturen (Abb.21)	Ausbildung ringförmiger Strukturen (Abb.29)	Ausbildung ringförmiger Strukturen (Abb.35)	2-3-lagige K; Zellschicht aus EC auf K (Abb.57)	mehrlagige K; EC-Zellschicht auf K (Abb.62)	mehrlagige K; EC-Zellschicht auf K (Abb.68)
16-20						
21-25	subkonfluenter Zellrasen aus K; EC-Kolonien auf K (Abb.22)	subkonfluenter Zellrasen aus K; EC-Kolonien auf K (Abb.30)	subkonfluenter Zellrasen aus K; EC-Kolonien auf K (Abb.36)	2-3-lagige K; Zellkolonie aus EC auf K (Abb.58)	mehrlagige Zellstruktur aus K und EC (Abb.64)	Interzellularräum zw. EC und K (Abb.69)
26-28	mehrschichtige Kokultur; EC-Kolonien auf K; ringförmige Strukturen (Abb.23)	mehrschichtige Kokultur; EC-Kolonien auf K; ringförmige Strukturen (Abb.31)	mehrschichtige Kokultur; Kolonien aus EC auf K (Abb.37)	2-3 lagige K, EC-Kolonien; aus EC gebildete Hohlräume (Abb.60)	mehrlagige Zellstruktur aus K und EC (Abb.65)	Interzellularräum zw. EC und K; aus EC gebildete Hohlräume (Abb.70)

Tabelle 7:

Tabellarischer Vergleich der morphologischen Charakteristika und Anordnung der Endothelzellen und Keratinozyten in den verschiedenen direkten Kokultur-Systemen

6 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, erstmals ein direktes Kokultur-Modell in vitro aus epidermalen Keratinozyten, die aus der Rinderklaue gewonnen wurden, gemeinsam mit bovinen mikrovaskulären Endothelzellen zu etablieren. Diese beiden Zelltypen spielen eine Schlüsselrolle sowohl in der physiologischen als auch in der pathologisch veränderten Funktion der Klaue. Ein in vitro-Modell dieser Zellpopulationen ermöglicht die Erforschung ihrer Interaktionen, die nach derzeitigem Kenntnisstand eine entscheidende Rolle für die Entwicklung von Klauenerkrankungen, insbesondere der Klauenrehe, spielen. Die Interaktionen zwischen Endothelzellen und Epidermiszellen dürften in der Initialphase der Klauenrehe zu den Schlüsselmechanismen gehören. Ein Verständnis dieser lokalen Ereignisse im Klauengewebe würde einen großen Vorsprung in unserem Wissen und Verstehen der Klauenrehe bedeuten. Die hier entwickelten Modelle bilden als ein leistungsfähiges Werkzeug die Grundlage für erfolgversprechende weiterführende Forschungsarbeit.

Die hier verwendeten Keratinozyten aus der Rinderklaue wurden innerhalb der Arbeitsgruppe um Mülling bereits hinreichend charakterisiert und für die Entwicklung und den experimentellen Einsatz eines organotypischen in vitro-Modells der Rinderklaue verwendet (Nebel, 2005; Hoffmann, 2006). Die mikrovaskulären Endothelzellen wurden innerhalb der Arbeitsgruppe um Plendl aus dem Corpus luteum des Rindes isoliert, charakterisiert und in verschiedenen in vitro-Angiogenese-Modellen eingesetzt (Plendl et al., 1996; Plendl, 1997; Fuchs-Schoenleber, 1999; Schuster, 2002; Bahramsoltani, 2003; Kässmeyer, 2006). Das Ovar, insbesondere das Corpus luteum, ist ebenso wie die Haut eines der wenigen Organe, das auch physiologischerweise postnatal eine zyklische Angiogenese aufweist. Nach Etablierung des direkten Kokultur-Modells wurden die Zellen für einen Zeitraum von 4 Wochen kultiviert und in regelmäßigen Abständen licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Eine immunozytologische Markierung mit spezifischen Zytokeratinen ergänzte die Untersuchungen, um Keratinozyten und Endothelzellen in den etablierten in vitro-Modellen auch in frühen Stadien voneinander abgrenzen zu können. Die direkte Kokultivierung in vitro wurde in drei verschiedenen, selbst entwickelten Kultivierungsansätzen vorgenommen, die es jeweils ermöglichten, die Wechselwirkungen zwischen beiden Zelltypen zu untersuchen.

Ein bovines Kokultur-Modell in vitro zur Untersuchung der zellulären Wechselwirkung von Endothelzellen und Keratinozyten des Rindes stand bisher nicht zur Verfügung. In der vorliegenden Studie erwies sich die direkte Kokultivierung von bovinen Endothelzellen und

Keratinocyten als geeignet, die Veränderungen der Zellmorphologie epidermaler Keratinocyten und endothelialer Zellen und deren Anordnung zu analysieren.

Bovine Endothelzellen und Keratinocyten spielen insbesondere in pathologischen Prozessen wie Klauenerkrankungen, wenn auch auf sehr unterschiedliche Weise, eine entscheidende Rolle. Gleichzeitig ist ihre gegenseitige zelluläre Interaktion in der Pathogenese der akuten Klauenrehe unumstritten. Die in dieser Arbeit entwickelten Kokultur-Systeme ermöglichen es, ohne den Einfluss äußerer Faktoren, die Mechanismen und gegenseitigen Effekte von Endothelzellen und Keratinocyten unter standardisierten Bedingungen *in vitro* zu untersuchen. Damit soll eine Grundlage zur Erforschung der Pathogenese des Klauenrehe-Komplexes geschaffen werden.

6.1 Grundlagen zur *in vitro*-Kultivierung von Endothelzellen und Keratinocyten und deren Praxisrelevanz

In der Humanmedizin stehen unterschiedliche kutane *in vitro*- und *in vivo*-Modelle zur Verfügung. Dabei werden, abhängig von der jeweiligen Fragestellung, verschiedene direkte und indirekte Methoden der Kokultivierung von Endothelzellen und Keratinocyten in Kombination mit Fibroblasten für die Etablierung humaner Haut-Äquivalente im Rahmen des Tissue engineering beschrieben. In der Literatur wird die Kokultur von Endothelzellen, Keratinocyten und Fibrozyten sowohl humanen (Ponec et al., 2004; Martins-Green et al., 2005; Li et al., 2009) als auch tierischen Ursprungs (Vernon und Gooden, 2002) beschrieben. Haut-Äquivalente sind ein wichtiger Bestandteil bei den Untersuchungen physiologischer Prozesse der Haut, der Wundheilung (Turchi et al., 2002) und der Pathogenese von Hauterkrankungen. Abhängig von der Fragestellung wurden spezifische Kultivierungsmethoden gewählt und weitere Zellpopulationen, vor allem Fibrozyten, als Bestandteil des dermalen Kompartiments in die Kokultur mit eingebracht. Die kutanen *in vitro*-Modelle erlauben grundlegende Untersuchungen von dermo-epidermalen Interaktionen unter standardisierten Bedingungen und den Einsatz von pharmakologischen Substanzen (Hinterhuber et al., 2002). Die kutanen Haut-Modelle aus der Humanmedizin wurden als Grundlagen für diese Arbeit herangezogen, da es sich bei der Rinderklaue um eine Modifikation der äußeren Haut mit prinzipiell gleichem Aufbau und entsprechenden Zellpopulationen handelt. Obwohl die Modifikation charakterisiert ist durch eine massive Zunahme der epidermalen Zelllagen und der Entwicklung einer dicken Hornschicht, unterscheiden sich die wesentlichen strukturellen und zellulären Merkmale der Klauenepidermis nicht von denen der Epidermis der äußeren Haut.

In der Dermis der behaarten Haut und auch im Ovar finden physiologischerweise eine zyklische Angiogenese und Antiangiogenese statt. Im adulten Organismus spielt die Angiogenese eine herausragende Rolle in den physiologischen Prozessen der Reproduktion. Andere Formen der Angiogenese werden im adulten Organismus während der Wundheilung oder in pathologischen Prozessen wie Tumorwachstum beobachtet. Endothelzellen spielen in der Angiogenese eine zentrale Rolle. Dabei wird die angiogene Kaskade nicht nur beeinflusst durch die Interaktion zwischen Endothelzellen und der umgebenden Matrix, sondern auch durch die Wechselwirkung mit den benachbarten Zellen in ihrer Umgebung.

In der bovinen Klaue ist die pododermale Angiogenese, das Sprossen funktionaler Blutkapillaren aus bereits bestehenden Blutgefäßen, für die Aufrechterhaltung physiologischer Vorgänge ebenso wie für pathologische Prozesse maßgebend (Hirschberg et al., 2001). Eine weitere Form der Remodellierung des Blutgefäßsystems ist die Intussuszeption, die in der bovinen Klaue während des Wachstums in Form einer Angioadaptation des Blutgefäßsystems infolge mechanischer Beanspruchung des Klauengewebes auftritt (Augustin, 2001; Hirschberg und Plendl, 2005). Sowohl die Sprossung als auch die Intussuszeption spielen für die Entwicklung und für die funktionale Angioadaptation der Rinderklaue an innere metabolische und äußere physikalische und chemische Einflüsse eine herausragende Rolle.

Dermis und Epidermis der Rinderklaue sind durch den Papillarkörper eng miteinander verbunden. Das oberflächliche dermale Blutgefäßsystem bildet ein dichtes Kapillarnetzwerk, das sich direkt unterhalb der Basalmembran befindet und für die Ernährung der lebenden Keratinozyten der gefäßlosen Epidermis verantwortlich ist. Dabei werden die lebenden Keratinozyten per diffusionem mit Nährstoffen versorgt. Die Epidermis bietet der darunterliegenden Dermis eine formgebende Schutzfunktion.

Wirken einer oder mehrere angiogene Stimuli im Laufe regenerativer aber auch pathologischer Prozesse auf das dermale Blutgefäßsystem ein, wird die angiogene Kaskade induziert (Bushman et al., 2002; Velasco und Lange-Asschenfeldt, 2002). Eine Störung der Hämodynamik in der pododermalen Mikrozirkulation des Kapillarbetts in der Rinderklaue ist vermutlich für die Pathogenese der akuten Klauenrehe verantwortlich. Die Folge ist eine Minderversorgung der Endstrombahn und damit eine Endothelschädigung durch Ischämie. Aus der in der Klauenlederhaut entstandenen Gewebeschädigung durch Hypoperfusion resultieren schließlich in der gefäßlosen Epidermis degenerative Veränderungen (Mülling und Lischer, 2002). Nach Nuss und Steiner (2004) führt eine vermehrte Belastung der Lederhaut zu einer erhöhten Stoffwechselrate, die wiederum eine gesteigerte Aktivität der Epidermiszellen bedingt. Hypoperfusion und die daraus resultierende Hypoxie induzieren die Bildung und Sekretion von

angiogenen Wachstumsfaktoren wie beispielsweise dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) aus epidermalen Keratinozyten. Dies deutet auf ein komplexes Zusammenspiel von Epidermis und den in der Dermis eingebetteten Blutkapillaren hin.

Um die Integrität und die Funktion der Rinderklaue, wie auch die der äußeren Haut, wiederherzustellen, wird ein dynamischer Prozess in Gang gesetzt, der charakterisiert ist durch ein Zusammenspiel von zellulären und molekularen Interaktionen. Bei der in vitro-Kultivierung von Haut-Äquivalenten in der Humanmedizin zum Studium der Wundheilung, werden vergleichbare Vorgänge beobachtet. Maßgebend ist dabei auch die Produktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen für die autokrine und parakrine Stimulation der Zellen und somit die Proliferation der Keratinozyten und die Synthese einer Basalmembran. Auf Kollagengel basierende organotypische Kokulturen sind maßgebend im Bereich der Erforschung dermo-epidermaler Interaktionen in Bezug auf die epidermale Regeneration und Morphogenese und in vitro-Angiogenese. In der vorliegenden Arbeit wurden drei unterschiedliche Ansätze zur in vitro-Kokultivierung von bovinen Endothelzellen und Keratinozyten entwickelt, um deren Wachstumsverhalten, Differenzierung sowie gegenseitige Interaktion beurteilen zu können.

6.2 Entwicklung eines Kokultur-Modells in vitro aus mikrovaskulären Endothelzellen und epidermalen Keratinozyten

Für die Entwicklung und Etablierung eines geeigneten Kokultur-Modells in vitro aus bovinen Endothelzellen und Keratinozyten wurden folgende Parameter berücksichtigt:

- 1) Zusammensetzung des Nährmediums,
- 2) geeignetes Kulturgefäß, insbesondere geeignete Beschichtung (Adhärenz),
- 3) Einsaatdichte von Keratinozyten und Endothelzellen,
- 4) Dauer der Vorkultivierung.

Für die direkte Kokultivierung wurden zunächst definierte Kulturbedingungen festgelegt. In Vorversuchen wurden zur Optimierung der in vitro-Kultivierung von Endothelzellen und Keratinozyten die folgenden Parameter analysiert und dann die als optimal identifizierten Werte für die drei in vitro-Modelle verwendet.

Die Temperatur der äußeren bovinen Haut liegt unter physiologischen Bedingungen bei 33°C. Nebel (2004) kultivierte bovine Keratinozyten bei 37°C, was der normalen Körpertemperatur entspricht, und 34°C, der Temperatur der äußeren Haut, die durch äußere Einflüsse variiert. Es konnten nach paralleler Kultivierung bei diesen unterschiedlichen Temperaturen von 37°C und

34°C keine Unterschiede in Proliferation und Differenzierung der Zellen beobachten werden (Nebel, 2004). Da die Klauenepidermis charakterisiert ist durch ein Stratum corneum mit einer Dicke von 1 cm und einem Stratum spinosum von bis zu 70 Zelllagen, ist anzunehmen, dass äußere Temperaturunterschiede keinen großen Einfluss auf Proliferation und Differenzierung lebender Keratinozyten der Klauenepidermis ausüben. Da die mikrovaskulären Endothelzellen in den eigenen Voruntersuchungen *in vitro* sensibler auf Temperaturschwankungen reagierten, wurden die Kokulturen daher bei 37°C inkubiert.

Für die Anzucht der Keratinozyten in Monokultur wurde Quantum 286 (PAA Laboratories, Cölbe), ein kommerziell erhältliches Spezialmedium für Epithelzellen, verwendet (Nebel, 2004). Dieses Nährmedium zählt zu den serumhaltigen Medien, das ausgewählte Serumbestandteile enthält. Endothelzellen wurden dagegen zur Anzucht in Monokultur in dem Selektivmedium P₀ inkubiert. Diesem Medium wurden im Labor der Arbeitsgruppe um Plendl unter standardisierten Bedingungen 10 % FBS und weitere definierte Supplemente, einschließlich proangiogener Faktoren, zugesetzt. Die Endothelzellen werden durch das Selektivmedium P₀ und die in diesem Medium enthaltenen Komponenten zur Angiogenese stimuliert (Bahramsoltani, 2003). Die oben genannten beiden Selektivmedien (Quantum 286, P₀) wurden lediglich in der Vorkultivierung der Monokulturen über 24 Stunden verwendet, um eine optimierte Zelladhäsion und Proliferation zu erzielen. Für die Kokultivierung von Endothelzellen und Keratinozyten wurde das für epitheliale Zellen geeignete Erhaltungsmedium DMEM+ verwendet. Wie unter 3.2 beschrieben, wurde das Nährmedium DMEM (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen) mit 10 % FBS supplementiert. Dem Kulturmedium wurden darüber hinaus keine Wachstumsfaktoren zugesetzt. Der Vorteil serumhaltiger Medien ist eine positive Wirkung auf die Zelladhäsion und eine verstärkte Proliferation der Zellen. Nebel (2004) verwendete für die Zellisolierung epidermaler boviner Keratinozyten serumhaltige Medien und konnte nach eigenen quantitativen Auswertungen wesentlich höhere Zellzahlen von bovinen Keratinozyten erreichen. Serumhaltige Nährmedien werden ebenfalls von anderen Autoren für die Anzucht organotypischer Kokulturen verwendet (Maas-Szabowski et al., 2001; Stark et al., 2004). Dagegen eignen sich serumfreie Medien speziell für die gezielte Supplementierung von Wachstumsfaktoren. Hierbei ist die Untersuchung der Wirkung der einzelnen Faktoren möglich, da die Bestandteile serumfreier Medien definiert sind und dadurch unerwünschte Wechselwirkungen mit nicht bekannten Medienbestandteilen ausgeschlossen werden können. Da die Zielsetzung dieser Arbeit die Etablierung eines Kokultur-Modells ohne den Einsatz von Wachstumsfaktoren war, wurde für die Inkubation der Zellen ein serumhaltiges Nährmedium verwendet.

Um die Adhäsion der Zellen zu optimieren und somit geeignete Voraussetzungen für eine organotypische Kokultur zu schaffen, wurden die Oberflächen der Glasplättchen und die der Millicell-PCF®-Filtereinsätze mit Kollagen Typ I (Collagen G, Biochrom Berlin), einer Komponente der interstitiellen Matrix, beschichtet. Während der Langzeitkultivierung sollte mit Hilfe der Beschichtung der Kulturgefäßoberflächen eine konstante Zellanheftung gewährleistet sein. Des Weiteren beeinflusst der Kollagen Typ der extrazellulären Matrix die zelluläre Entwicklung und Differenzierung *in vitro*. In Modellen der *in vitro*-Angiogenese wiesen auf Kollagen Typ I oder Typ III kultivierte Endothelzellen ausschließlich eine Proliferation auf, während auf Kollagen Typ IV oder Typ V ausgesäte Endothelzellen Kapillar-ähnliche Strukturen mit Lumen ausbildeten (Madri und Williams, 1983; Dye et al., 2004). Kollagen Typ I ist mengenmäßig ein wesentliches Strukturprotein der Dermis und zeigt insbesondere eine hohe mechanische Stabilität (Wehrhan et al., 2010). Alle Kokulturen wurden auf beschichteten Glasplättchen in 24-Lochplatten kultiviert. Die beiden Vorteile in der Verwendung von Glasplättchen lagen darin, dass diese einerseits transparent sind, somit gut geeignet waren für phasenkontrastmikroskopische Analysen, und diese andererseits für die immunzytochemischen Untersuchungen leicht aus den Vertiefungen der Kulturplatten entnommen werden konnten. Millicell-PCF®-Filtereinsätze eigneten sich gut zur Anzucht von Kokulturen, da die auf der Filtermembran ausgesäten Zellen sowohl von der Oberseite als auch von der Unterseite mit Nährmedium versorgt werden konnten. Da die Filtermembranen der Millicell-PCF® nicht transparent waren, konnten an diesen Kokulturen keine phasenkontrastmikroskopischen Kontrollen erfolgen. Während der Anzucht und des Mediumwechsels war demzufolge äußerste Vorsicht in der Handhabung mit den Zellkulturen geboten. Für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten die in den Filtereinsätzen gespannten Membranen vorsichtig herausgeschnitten und eingebettet werden. Auf den beschichteten Oberflächen der Glasplättchen und der Millicell-PCF®-Filtereinsätze zeigten sowohl Endothelzellen als auch Keratinozyten eine rasche und stabile Zelladhäsion.

6.3 Etablierung einer Methodik zur Kokultivierung von Endothelzellen und Keratinozyten im direkten Modell

Die direkte *in vitro*-Kokultivierung von mikrovaskulären Endothelzellen und epidermalen Keratinozyten bovinen Ursprungs erfolgte unter denselben standardisierten Kultivierungsbedingungen in drei unterschiedlichen Ansätzen, die in der vorliegenden Arbeit als Kokultur-System 1 (K+E), Kokultur-System 2 (E+K) und Kokultur-System 3 (Suspension) bezeichnet wurden. Im Kokultur-System 1 (K+E) wurden die Keratinozyten bis zur Subkonfluenz

kultiviert. Anschließend wurden suspendierte Endothelzellen auf die Monolayer gesät. Dagegen wurden im Kokultur-System 2 (E+K) die Endothelzellen bis zur Bildung eines subkonfluenten Monolayers kultiviert. Suspendierte Keratinozyten wurden anschließend auf die endothelialen Monolayer gesät. Im Kokultur-System 3 (Suspension) wurden suspendierte Endothelzellen und Keratinozyten gleichzeitig in Kultur gegeben. Alle drei Kokultur-Systeme wurden jeweils auf mit Kollagen beschichteten Glasplättchen und Millicell®-PCF-Filtereinsätzen inkubiert.

Im Kokultur-System 1 (K+E) wurde zunächst ein subkonfluenter Monolayer aus Keratinozyten auf den beschichteten Kulturgefäßoberflächen kultiviert, der im weiteren Sinne die Aufgabe eines „feeder-layers“ erfüllen sollte. Zu untersuchen war, ob bereits adhärenz im subkonfluenten Monolayer liegende Keratinozyten einen Einfluss auf die Adhärenz und folgende Differenzierung der Endothelzellen ausübten. Im umgekehrten Fall war im Kokultur-System 2 (E+K) zu untersuchen, inwieweit Keratinozyten im Zuge ihrer Adhärenz und Migration auf bereits in subkonfluenter Monokultur befindende Endothelzellen Einfluss nehmen. Das Ziel der Untersuchungen im Kokultur-System 3 (Suspension) war darüberhinaus zu beobachten, wie Endothelzellen und Keratinozyten, die zum selben Zeitpunkt in Kultur gebracht wurden, sich in der Adhärenz und Differenzierung gegenseitig beeinflussen. Die Einsaat der Zellen im Kokultur-System 3 erfolgte in Suspension, somit wurde eine zufällige Verteilung der beiden Zelltypen auf dem Boden der Kulturgefäßoberfläche erreicht.

Die morphologischen Veränderungen der auf Glasplättchen inkubierten Kokultur-Systeme 1 (K+E), 2 (E+K) und 3 (Suspension) wurden anhand täglicher phasenkontrastmikroskopischer Untersuchungen über vier Wochen verfolgt. Einmal wöchentlich wurden an den auf beschichteten Glasplättchen inkubierten Kokulturen immunzytochemische Untersuchungen durchgeführt. Die immunzytochemische Identifizierung der kultivierten Epithelzellen war für die Interpretation der Ergebnisse und die Beurteilung der Funktionalität der drei unterschiedlichen Kokultur-Systeme notwendig. Die phasenkontrastmikroskopischen Beobachtungen konnten mit den Ergebnissen dieser Analysen verglichen und bestätigt werden. Sowohl die Endothelzellen als auch die Keratinozyten zeichneten sich in den Kokultur-Systemen jeweils durch charakteristische morphologische Eigenschaften aus.

Die Zellen aus den in Millicell®-PCF-Filtereinsätzen kultivierten Kokultur-Systemen wurden transmissionselektronenmikroskopisch untersucht. Dabei war eine morphologische Differenzierung von Endothelzellen und Keratinozyten in den frühen Stadien der Kokultivierung schwierig, da es sich bei beiden Zelltypen um noch wenig differenzierte Epithelzellen handelte. Anhand des charakteristischen Versuchsaufbaus des Kokultur-Systems 1 (K+E) und des Kokultur-Systems 2 (E+K) konnten die Zelltypen jedoch in entsprechender Lokalisation erwartet

werden. In den späten Stadien der Kokultivierung konnten die Epithelzellen schließlich aufgrund morphologischer Charakteristika eindeutig differenziert werden. Immunzytochemische Kontrollen konnten hierbei nicht durchgeführt werden, da die erforderlichen Filtermembranen für histologische Untersuchungen nicht geeignet waren.

Mit den transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen an den aus Millicell[®]-PCF-Filtereinsätzen hergestellten Schnitten konnte gezeigt werden, dass die Zellen in allen drei Kokultur-Systemen dreidimensional wuchsen. Ein dreidimensionales in vitro-Modell entspricht einem organotypischen Kokultur-System, in dem die räumliche Anordnung der Zellen, die Zellmorphologie sowie die Differenzierung untersucht und mit der in vivo Situation verglichen werden kann. Darüber hinaus stellt es ein geeignetes in vitro-Modell zur Beobachtung funktionell maßgeblicher Zellbestandteile der bovinen Klaue dar. Ein interessanter Unterschied zwischen den auf Glasplättchen und den in Millicell[®]-PCF-Filtereinsätzen kultivierten Kokultur-Systemen ist, dass die Zellen aufgrund der für das Medium durchlässigen Membran der Millicell[®]-PCF von zwei Seiten ernährt werden können. Somit konnte eine gleichmäßige Ernährung aller Zellen in Kokultur mit dem Nährmedium erzielt werden. Die Membranen wiesen im Vergleich zu den Glasplättchen ebenfalls eine konstante Stabilität auf und waren somit gut geeignet für die Langzeitkultivierung.

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

Endothelzellen und Keratinozyten waren nach 24 Stunden in vitro unabhängig vom Versuchsaufbau in allen drei direkten Kokultur-Systemen auf den mit Kollagen Typ I beschichteten Glasplättchen adhärent. Es zeigten sich in allen drei Kokulturen innerhalb der ersten fünf Kultivierungstage morphologische Charakteristika der Endothelzellen und Keratinozyten und ein spezifisches Verteilungsmuster der Zellen. Dabei wiesen die Keratinozyten langgestreckte Zelleiber mit Ausbildung von Zellausläufern auf. Aufgrund des Bestrebens nach engem Kontakt zueinander, lagerten sie sich parallel aneinander und bildeten einschichtige sternförmige Cluster auf den beschichteten Glasplättchen aus. An den Rändern der Cluster liegende Zellen bildeten längere, gut sichtbare Zellfortsätze. Ausschließlich die Endothelzellen zeigten das für Epithelzellen typische Kopfsteinpflaster-ähnliche Aussehen. Die Endothelzellen lagerten sich in Kolonien zusammen, verteilt über die gesamte Oberfläche der Kulturschale zwischen den Keratinozytenclustern. Den Keratinozytenclustern, vor allem in den Bereichen der Zellausläufer, benachbarte Endothelzellen wiesen nach 24 Stunden in vitro eine

längliche Zellform auf. Da das zelluläre Verteilungsmuster nach 24 Stunden *in vitro* in allen Kokulturen vergleichbar war, schien die Vorinkubation der Zellen mit ihrem jeweiligen Selektivmedium in den Kokultur-Systemen 1 (K+E) und 2 (E+K) keinen Einfluss auf die nachfolgende Kokultivierung auszuüben. Bereits ab dem zweiten Tag konnten Endothelzellen innerhalb der Kolonien, die Zellausläufer gebildet hatten, anhand ihrer langgestreckten Gestalt identifiziert werden. Bahramsoltani (2003) beschreibt in ihrer Arbeit Stadien der *in vitro*-Angiogenese, in denen Endothelzellen im Stadium 2 (Aussprossung nach 15 Tagen, frühe Phase) charakterisiert sind durch die Bildung von Zellausläufern, nachdem diese einen konfluenten Monolayer ausgebildet hatten.

In den eigenen Untersuchungen ging die rasche Migration der Keratinozyten von den einzelnen Zellausläufern am Rand der sternförmigen Cluster aus, die sich nach benachbarten Keratinozytenclustern orientierten. Somit entstanden innerhalb der ersten Woche *in vitro* breite einschichtige Zellstraßen aus Keratinozyten, die auf dem Kulturschalenboden diffus verteilte Cluster miteinander verbanden. In diesem Zeitraum lagerten sich in allen drei Kulturen zunehmend längliche Endothelzellen in linearer Anordnung im Randbereich der Keratinozyten an. Die lineare Aneinanderreihung kann dem Stadium 5 der *in vitro*-Angiogenese (lineare Aneinanderreihung nach 4 Wochen, frühe Phase) zugeordnet werden (Bahramsoltani, 2003). Ausschließlich im Kokultur-System 2 (E+K) konnten erstmals nach 6 Tagen *in vitro* ringförmige Strukturen aus länglichen Endothelzellen beobachtet werden. Es ist zu vermuten, dass in dieser Kokultur die im subkonfluenten Monolayer liegenden Endothelzellen durch die in Suspension eingesäten Keratinozyten während ihrer Proliferation einen angiogen stimulierenden Effekt erhielten. Erst ab der zweiten Kultivierungswoche wurden auch in den Kokultur-Systemen 1 (K+E) und 3 (Suspension) ringförmige Strukturen aus drei bis vier länglichen Endothelzellen beobachtet.

Die Keratinozyten formten ausgehend von den Zellstraßen einen subkonfluenten Monolayer auf dem Kulturschalenboden und zeigten eine stabile Zelladhärenz auf dem mit Kollagen beschichteten Kulturschalenboden. Die Keratinozyten des subkonfluenten Monolayers wiesen nun ein typisches Kopfsteinpflaster-ähnliches Aussehen auf. Die von Endothelzellen geformten Kolonien konzentrierten sich punktuell auf Bereiche auf dem subkonfluenten Monolayer aus Keratinozyten und kommunizierten untereinander über Zellausläufer langgestreckter Endothelzellen. Dabei zogen die endothelialen Zellausläufer über die Keratinozyten hinweg. Die aus Endothelzellen geformten Kolonien verkleinerten sich nach semiquantitativer Betrachtung in ihrem Umfang nach 21 Tagen *in vitro*. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass die Endothelzellkolonien durch schneller wachsende Keratinozyten verdrängt wurden. Nach 28

Tagen in Kultur konzentrierten sich die endothelialen Kolonien ausschließlich auf den Clustern der obersten Zellschicht aus Keratinozyten. Ausschließlich in Kokultur-System 1 (K+E) und 2 (E+K) konnten auch noch nach 28 Tagen in Kultur ringförmige Strukturen innerhalb der Kolonien aus Endothelzellen beobachtet werden. Insbesondere im Kokultur-System 2 (E+K) stellten sich ringbildende Endothelzellen als solide Struktur mit zellfreiem Inneren dar. Diese Befunde entsprechen den Beobachtungen Kässmeyers (2006) an in vitro kultivierten mikrovaskulären Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum aus verschiedenen Stadien. Hierbei zeigten sich verschiedene Modi der in vitro-Gefäßbildung, die einerseits als „klassische“ Angiogenese und andererseits als Vaskulogenese-ähnlich eingestuft wurden (Kässmeyer und Plendl, 2009).

In allen drei direkten Kokulturen entstand eine mehrschichtige Kokultur. Dabei konnten unterschiedlich stark differenzierte Bereiche beobachtet werden. Auf dem Kulturschalenboden zeichneten sich zellfreie Areale zwischen unvollständig gestreckten einschichtigen Keratinozyten ab. Darauf folgte ein Netzwerk aus Clustern langgestreckter Keratinozyten, die über lange Zellausläufer miteinander kommunizierten. In dieser Zellschicht waren die Zellgrenzen der einzelnen Keratinozyten-Zelleiber eindeutig auszumachen. Auf den verbliebenen Clustern aus Keratinozyten bildeten sich Bereiche mit Zellansammlungen polygonaler wenig differenzierter Endothelzellen, deren einzelne Zelleiber aufgrund ihrer großen Anzahl und dichten Lage nicht mehr eindeutig abgrenzbar waren. Charakteristisch für die Keratinozyten in allen drei Kokulturen war ihre Adhärenz auf dem mit Kollagen Typ I beschichteten Glasplättchen, während die Endothelzellen auf die Keratinozyten migrierten und somit ihre Zelloberfläche zum umspülenden Medium hin orientierten. Dabei kam es zur strukturellen Abgrenzung von epidermalen Keratinozyten und mikrovaskulären Endothelzellen. Zu keinem Zeitpunkt konnte eine zufällige Vermischung der Zellen beobachtet werden. Die Keratinozyten orientieren sich an der Matrix-Komponente Kollagen Typ I, während die mikrovaskulären Endothelzellen gemäß ihrer eigentlichen Funktion sowohl den Kontakt zum Medium als auch zu den umgebenden Zellen (Perizyten, vascular smooth muscle cells etc.) suchten. Die Endothelzellen zeigten also dementsprechend eine inverse Orientierung im Vergleich zur in vivo-Situation, wie es schon von vielen Autoren für die in vitro-Angiogenese beschrieben wurde (Fuchs-Schoenleber, 1999; Schuster, 2000; Bahramsoltani, 2003).

6.4.1 Angiogenese-artige Merkmale an mikrovaskulären Endothelzellen in den Kokultur-Systemen auf Glasplättchen

In der vorliegenden Arbeit wurde für alle direkten Kokultur-Systeme ein Nährmedium verwendet, das keine proangiogenen Wachstumsfaktoren enthielt. Ausschließlich in der Anzucht der mikrovaskulären Endothelzellen für das Kokultur-System 2 (E+K) wurde das Selektivmedium P₀ mit Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS) supplementiert (s. 3.2.3). Im Verlauf der Langzeitkultivierung konnten in allen drei direkten Kokultur-Systemen charakteristische angiogene Veränderungen der Endothelzellen beobachtet werden, die von einem subkonfluenten endothelialen Monolayer ausgingen. Nach 24 Stunden in vitro zeigten die Endothelzellen in allen drei direkten Kokultur-Systemen (K+E, E+K, Suspension) das für Epithelzellen typische Kopfsteinpflaster-Muster. In den ersten 10 Tagen in vitro waren die den Keratinozyten direkt angrenzende Endothelzellen charakterisiert durch eine langgestreckte Zellform. Hauptsächlich im Randbereich der Keratinozyten fand eine initiale lineare Aneinanderreihung länglicher Endothelzellen statt. Des Weiteren kam es zur Ausbildung endothelialer Zellausläufer. Mit Streckung der Zellform und Ausbildung langer Zellausläufer zeigten die Endothelzellen typische morphologische Merkmale der Migration. Dieser Prozess konnte verteilt über die gesamte Kulturschale beobachtet werden. Eine alternative Erklärung für die beobachteten Angiogenese-Stadien würden in der Endothelzellkultur vorhandene Progenitorzellen liefern, wie auch von Käsmeyer und Plendl (2009) beschrieben. Die Angiogenese ist charakterisiert durch die Migration, Proliferation von Endothelzellen und Ausbildung tubulärer Strukturen (Patan, 2000). Nach Ausprunk und Folkman (1977) führt die auf die Migration folgende Proliferation der Endothelzellen zur Verlängerung des gebildeten endothelialen Sprosses. Im in vitro-Modell wird in dieser Kultivierungsphase die kaskadenartige Ausbildung Kapillar-ähnlicher Strukturen beobachtet (Bahramsoltani, 2003). Linear aneinander gereihte Endothelzellen in vitro können mit in vivo geformten endothelialen Zellsprossen verglichen werden. Stets zeigten sich die zunächst im Kopfsteinpflaster-Muster liegenden Endothelzellen in linearer bis zirkulärer Anordnung in direkter Nachbarschaft mit den Keratinozyten und zeigten somit Stadien der angiogenen Kaskade in vitro auf. Diese Beobachtung läßt einen angiogenen Effekt durch die Kokultivierung mit den Keratinozyten vermuten. In den lichtmikroskopischen Analysen des Kokultur-Systems 2 (E+K) wurden bereits nach 6 Tagen in vitro mikrovaskuläre Endothelzellen beobachtet, die innerhalb der gebildeten Endothelzellkolonien beziehungsweise nach einer initialen linearen Aneinanderreihung ringförmige Strukturen ausbildeten. Diese ringförmigen Strukturen entstanden aus mehreren länglichen Endothelzellen, die sich aus der Kolonie lösten. Die beobachteten ringförmigen

Strukturen wiesen ein zentrales zellfreies Inneres auf. Des Weiteren deutet dies auf eine starke angiogene Aktivität der hier inkubierten Endothelzellen hin. Die Bildung endothelialer Strukturen mit zentralen Lumina werden *in vitro* als Kapillar-ähnliche Strukturen beschrieben (Folkman und Haudenschild, 1980b). Der Prozess der *in vitro*-Lumenbildung wurde auch schon von anderen Autoren beschrieben (Bayless et al, 2000; Bayless und Davis, 2002). Möglicherweise verfügen diese Zellen bereits über gewebespezifische Charakteristika. Dennoch spricht das vereinzelte Auftreten von ringförmigen Strukturen auch dafür, dass es sich um Endothelzellen unterschiedlicher Differenzierungsgrade handelt.

In dem von Lienau et al. (2005) etablierten *in vitro*-Modell der Angiogenese humaner Endothelzellen werden die Stadien 0 bis 4 der angiogenen Kaskade beschrieben (Stadium 0: Proliferation der Endothelzellen, Stadium 1: Subkonfluent bis konfluent Monolayer, Stadium 2: Lineare Aneinanderreihung und Ringbildung, Stadium 3: Bildung Kapillar-ähnlicher Strukturen mit einem zentralen Lumen planar zum Kulturschalenboden, Stadium 4: Organisation eines dreidimensionalen Netzwerkes Kapillar-ähnlicher Strukturen mit einem zentralen Lumen mit Remodeling). In den phasenkontrstmikroskopischen Untersuchungen konnten nach semiquantitativer Betrachtung die beobachteten morphologischen Veränderungen der Endothelzellen den Stadien 0 bis 3 zugeordnet werden. Im Gegensatz zu bisher etablierten Angiogenese-Modellen *in vitro* mit bovinen mikrovaskulären Endothelzellen kam es in den eigenen Untersuchungen nicht zur Ausbildung eines Netzwerkes aus aneinander gereihten Endothelzellen, wie es beispielsweise von Bahramsoltani (2003) beschrieben wurde. Dennoch lösten sich die Endothelzellen in den eigenen Untersuchungen vollständig vom Zellboden ab.

Im Kokultur-System 1 (K+E) schlossen sich die Endothelzellen auf den Keratinozyten in Zellkolonien zusammen. Innerhalb dieser Endothelzellkolonien bildeten sich ringförmige Strukturen aus mindestens zwei länglichen Endothelzellen aus, die ein zellfreies Inneres umschlossen. Charakteristisch für die Endothelzellen im Kokultur-System 2 (E+K) war die Formierung einzelner diffus auftretender ringförmiger Strukturen aus zwei oder mehreren länglichen, zirkulär angeordneten Endothelzellen. Im Kokultur-System 3 (Suspension) zeigten sich ebenfalls, wie im Kokultur-System 1 (K+E), innerhalb der Endothelzellkolonien ringförmige endotheliale Strukturen. In allen drei Kokultur-Systemen kommunizierten benachbarte Endothelzellkolonien über lange Zellausläufer miteinander. Insbesondere das Kokultur-System 2 (K+E) eignet sich für das Studium der endothelialen Differenzierung *in vitro*.

6.5 Immunzytochemische Differenzierung von Endothelzellen und Keratinozyten in den Kokultur-Systemen auf Glasplättchen

In jedem epithelialen Gewebe exprimieren die Zellen ein charakteristisches Zytokeratinmuster, welches dem Differenzierungsgrad und der Funktion der jeweiligen Epithelzelle zugeordnet werden kann. Daher ermöglicht die immunzytochemische Markierung spezifischer Zytokeratine die Charakterisierung von Epithelzellen. Die auf Glasplättchen kultivierten Kokultur-Systeme wurden für immunzytochemische Analysen herangezogen, insbesondere um die morphologische Identifizierung der beiden genutzten Zelltypen zusätzlich durch Immunlokalisation „typischer“ Zytokeratine untermauern zu können. Hierfür erfolgte der immunzytochemische Nachweis von Zytokeratin 14 (CK14) als Marker für basale Keratinozyten im Kokultur-System 2 (E+K) und Zytokeratin 19 (CK19) in den Endothelzellen im Kokultur-System 1 (K+E) und 3 (Suspension).

Bei CK14 handelt es sich um ein primäres Zytokeratin, das in vivo typischerweise in Basalzellen und Suprabasalzellen aus mehrschichtigen Plattenepithelien exprimiert wird. Insbesondere die Zellen des Stratum basale der gesunden Klauenepidermis weisen in vivo CK14 auf (Hendry et al., 2001). In organotypischen Zellkulturen kann CK14 ebenfalls in basalen Zelllagen nachgewiesen werden (Nebel, 2004). Allerdings machen neuere Untersuchungen deutlich (Sun, 2006), dass Epithelzellen in der in vitro-Kultur häufig Charakteristika der ursprünglichen gewebs- beziehungsweise ortstypischen Differenzierung verlieren: so kann sich unter anderem auch das exprimierte Zytokeratinmuster verändern. In der Gewebs-Positivkontrolle konnte eine spezifische und eindeutige Immunlokalisation des Primärantikörpers gegen CK14 in den Basal- und Suprabasalzellen der murinen Haut dargestellt werden. In den immunzytochemischen Untersuchungen zeigten die Keratinozyten in allen untersuchten Proben des Kokultur-Systems 2 (E+K) eine wenig intensive Markierung mit dem Antikörper gegen CK14. Nach subjektiver Betrachtung blieb dabei die Reaktionsintensität der Keratinozyten gegenüber CK14 über den gesamten Zeitraum der Untersuchung trotz voranschreitender Differenzierung konstant. Darüber hinaus konnte ebenfalls eine äußerst geringgradige Reaktion aller Endothelzellen in der Kokultur gegen CK14 beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass sowohl die Keratinozyten als auch die Endothelzellen das Expressionsmuster ihrer Zytokeratine während der in vitro-Kokultivierung verändert hatten und damit nicht mehr ihr spezifisches epitheliales Expressionsmuster aufwiesen. Bei der Subkultivierung von Keratinozyten in vitro konnte beobachtet werden, dass die Zellen ihre gewebespezifische Differenzierung ähnlich wie in vivo verlieren (Sun, 2006). Eine zusätzliche immunzytologische Untersuchung der Keratinozyten in den verschiedenen verwendeten Kokultur-Systemen auf weitere Zytokeratine

wäre wünschenswert, konnte aber in dieser Studie aus Zeit- und Kostengründen nicht geleistet werden. Hierbei wäre insbesondere der Nachweis von CK 6 und CK 16 interessant, die Keratinozyten im sogenannten „aktivierten“ Zustand charakterisieren. Aktivierte Keratinozyten sind migratorisch und hyperproliferativ und sezernieren extrazelluläre Matrixkomponenten (Freedberg et al., 2001). In vivo findet dies assoziiert mit der Wundheilung und vielen pathologischen Prozessen statt; der aktivierte Zustand lässt sich aber auch häufig bei der in vitro-Kultivierung von Keratinozyten nachweisen (Freedberg et al., 2001; Sun, 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden dermale mikrovaskuläre Endothelzellen mit dem Antikörper gegen Zytokeratin 19 (CK19) markiert. CK19 dient zur Markierung von Endothelzellen besonders kleiner Blutgefäße. Nach Birkner et al. (2004) gilt CK19 in humanen Geweben als ein Marker für undifferenzierte epidermale Stammzellen unverhornter Epithelien. Ebenso tritt es in Zellen luminaler Epithelien auf. Im engeren Sinne ist CK19 nicht zylinderepithelspezifisch, da es unter normalen Bedingungen auch in mehrreihigen Epithelien und Basalzellen vorkommt. Des Weiteren scheint CK19, im Vergleich zu anderen Zytokeratinen einschichtiger Epithelien, mit CK14 genetisch eng verwandt zu sein (Stasiak et al., 1989).

Die immunzytochemischen Ergebnisse konnten mit den Ergebnissen der Phasenkontrastmikroskopie verglichen werden und bestätigten somit die morphologischen Beobachtungen der phasenkontrastmikroskopischen Analysen. Durch die immunzytochemische Markierung mit dem Antikörper gegen CK19 konnten die mikrovaskulären Endothelzellen in den Kokultur-Systemen 1 (K+E) und 3 (Suspension) identifiziert werden. Die Endothelzellen zeigten insgesamt eine nach subjektiver Beurteilung intensive Reaktion. In den auf Glasplättchen kultivierten Endothelzellen zeigte sich in der zweidimensionalen lichtmikroskopischen Darstellung, nach Proliferation und Migration der Zellen, die Bildung von Zellausläufern und ringförmigen Strukturen (Bahramsoltani, 2003; Kässmeyer, 2006).

In der Zellkultur können Zellen, die Kontakt mit der Haftmatrix, -in diesem Falle die beschichtete Zellkulturschale-, aufnehmen, als basale Zellen bezeichnet werden. Zellen, die sich in der zweiten oder in einer höheren Zellschicht befinden und damit charakterisiert sind durch Zell-Zell-Kontakte, können dagegen als suprabasal definiert werden. Sie sind somit in den Differenzierungsprozess eingetreten.

6.6 Direkte Kokultur-Systeme in Millicell®-PCF-Filtereinsätzen

In den transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen der dreidimensionalen in vitro Kokultur-Systeme zeigten die Endothelzellen und Keratinozyten unterschiedliche Differenzierungsgrade. Ein herausragender Befund in der Kokultivierung war die Bildung

Kapillar-ähnlicher Strukturen (Folkman und Haudenschild, 1980b). Zwischen den Endothelzellen und Keratinozyten kam es zur Kompartimentierung, in Form eines erweiterten extrazellulären Spaltraums mit Ablagerung extrazellulären Materials.

In allen Epithelzellen, sowohl Endothelzellen als auch Keratinozyten, konnte eine große Anzahl intakter und gut entwickelter Mitochondrien und Golgi-Felder dargestellt werden. Dies deutete auf eine hohe Vitalität und Stoffwechselaktivität hin. Die für das Erscheinungsbild der Keratinozyten typischen Desmosomen konnten ebenso in den eigenen Untersuchungen beobachtet werden, was auf ein gewebespezifisches Differenzierungsmerkmal unter den gegebenen Kulturbedingungen in dieser Arbeit schließen lässt. Desmosomen stellen adhäsive Zellverbindungen dar, die für eine mechanische Stabilität im Gewebe sorgen (Green und Gaudry, 2000). Bis zur vierten Kultivierungswoche bildeten die Keratinozyten mehrere Zellschichten auf den mit Kollagen Typ I beschichteten Filtermembranen aus, die im Verlauf der Langzeitkultivierung eine konstante Adhärenz aufzeigten. Die Keratinozyten wiesen eine langgestreckte Zellform mit länglichen Zellkernen auf. Des Weiteren überlappten sich die Zellenden innerhalb der Zelllagen. Auch ohne die Anwesenheit von Fibroblasten können in einer *in vitro* angezüchteten Epidermis zwei bis drei Zelllagen lebender Zellen mit einem schmalen Stratum corneum beobachtet werden (El-Ghalbzouri et al. 2002b). Die hier kultivierten Keratinozyten waren charakterisiert durch eine unvollständige Differenzierung, die vermutlich auf suboptimale Kultivierungsbedingungen hinsichtlich des Nährmediums zurückzuführen sind.

In der vorliegenden Arbeit waren die Endothelzellen hauptsächlich auf den Zellschichten aus Keratinozyten adhärent und somit den entstandenen Scherkräften des Mediums *in vitro* ausgesetzt. Die Keratinozyten dagegen wurden durch die Filtermembran und die darüber liegenden Endothelzellen von diesen Scherkräften weitestgehend abgeschirmt. Die vom Medium umspülten Endothelzellen zeigten im Verlauf der Langzeitkultivierung einen hohen Differenzierungsgrad, indem sie verschiedene Stadien der *in vitro*-Angiogenese durchliefen. Die dem Medium abgewandte Seite der Endothelzellen und damit den Keratinozyten zugerichtete Seite war stets charakterisiert durch einen mit extrazellulärem Material gefüllten erweiterten Interzellularraum. Interpretieren lässt sich diese Beobachtung mit der Kompartimentierung der epidermalen Keratinozyten und mikrovaskulären Endothelzellen und die Bildung einer extrazellulären Matrix. Zellkontakte beziehungsweise Adhäsionsmoleküle zwischen Endothelzellen und Keratinozyten konnten in den Untersuchungen zu keinem Zeitpunkt dargestellt werden. Es konnte in den transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen kein Hinweis auf die für die Verankerung in der Basalmembran und Verbindung zur

extrazellulären Matrix typische Ausbildung von Hemidesmosomen gefunden werden. Die Polarität des Epithels wird in vivo charakterisiert durch die Ausbildung von Hemidesmosomen (Andriani et al., 2003). Bekanntermaßen ist die dermo-epidermale Verankerung unerlässlich für die Synthese einer Basalmembran. Des Weiteren wird postuliert, dass der Zellkontakt zu dermalen Fibrozyten entscheidend ist für eine typische Differenzierung der Keratinozyten (Andriani et al., 2003). Des Weiteren stellt die Basalmembran eine dynamische Struktur dar, die stetigen Umbauprozessen zwischen Dermis und Epidermis unterliegt. Allerdings konnte beobachtet werden, dass auf mit Kollagen beschichteten Kultivierungsgefäßen angezüchtete Keratinozyten keine spezifische Basalmembran ausbilden (Watt, 1988). Demzufolge ließe sich die unvollständige Differenzierung der Keratinozyten erklären. Denn die Ausprägung und reguläre Anordnung einer Basalmembran im Verlauf der physiologischen Morphogenese epidermaler Zellen korreliert mit den homöostatischen Bedingungen in der Epidermis.

Trotz fehlender Supplementierung an wachstumsstimulierenden Faktoren im Nährmedium konnten in diesen Langzeitmodellen Angiogenese-artige Strukturen aus Endothelzellen nachgewiesen werden, was auf eine regulatorische Interaktion zwischen Endothelzellen und Keratinozyten hindeutet. Histologische Analysen konnten aufgrund mangelnder praktischer Umsetzbarkeit nicht durchgeführt werden. Das Abschwimmen der Proben von den Objektträgern beziehungsweise der Zellkulturen von den Filtereinsätzen deutet auf eine, trotz Beschichtung mit Kollagen Typ I, schwache Verankerung der epidermalen Zellen auf der Kulturgefäßoberfläche hin (Stark et al., 2004). Durch die Adhäsion der Keratinozyten auf dem Kulturschalenboden und die über die Keratinozyten gewanderten Endothelzellen ging vermutlich die polare Organisation der Keratinozyten verloren. Dieses Phänomen hat vermutlich einen großen Einfluss auf ein gewebespezifisches Wachstum und die Zelldifferenzierung. In vivo kontaktieren epidermale Zellen nicht mit dermalen Endothelzellen. Diese beiden Zellpopulationen sind physiologischerweise durch die dermo-epidermale Zone voneinander getrennt. Dies kann eine Erklärung für das modifizierte Wachstum und die morphologischen Veränderungen beider Zelltypen sein.

6.7 Morphologische Charakteristika und Differenzierung der epidermalen Keratinozyten und mikrovaskulären Endothelzellen in den drei direkten Kokultursystemen 1 (K+E), 2 (E+K) und 3 (Suspension) in Millicell®-PCF-Filtereinsätzen

In den transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Endothelzellen nach ihrer Morphologie und Lokalisation von den Keratinozyten unterschieden.

In den drei direkten Kokultur-Systemen zeigte sich unabhängig vom Kultivierungsansatz in den ersten 14 Tagen annähernd dasselbe Zellbild. Auf mehrlagigen langgestreckten auf dem Filterboden adhärenen Keratinozyten war eine Zellschicht aus länglichen Endothelzellen lokalisiert. Die Keratinozyten aller drei direkten Kokultur-Systeme wuchsen stets in mindestens zwei bis drei Zellschichten in den Millicell®-PCF-Filtereinsätzen. Charakteristisch für die in diesen Kokulturen angezüchteten Keratinozyten war die langgestreckte Zellform mit Ausbildung von Zellausläufern. Rheinwald und Green (1997) beobachteten in ihren Untersuchungen Kolonien aus mehreren Zellschichten abgeflachter Keratinozyten. Untereinander waren die Keratinozyten durch Desmosomen miteinander verbunden. Desmosomen, adhäsive zelluläre Haftstrukturen, sorgen für die mechanische Belastbarkeit von Geweben (Green und Gaudry, 2000). Nach Watt (1988) stellen sich die durch Desmosomen verankerten Zellen des Stratum spinosum in vitro in flacher Zellform und länglichen zur Längsachse orientierten Zellkernen dar. Diese Befunde konnten auch in den eigenen Ergebnissen beobachtet werden. Eine strukturierte organotypische Epidermis wurde allerdings unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen in den Kokulturen nicht ausgebildet. Auch Nebel (2004) beobachtete bei den in vitro kultivierten Keratinozyten in Monokultur die Ausbildung weniger Zellschichten und eine unvollständige Differenzierung der Zellen. Für die unvollständige Differenzierung der Zellen gibt es mehrere Ursachen. Nach El-Ghalbzouri et al. (2002b) findet eine spezifische Differenzierung von Keratinozyten ausschließlich bei Supplementierung des Nährmediums mit entsprechenden Wachstumsfaktoren statt. In Monokultur angezüchtete Keratinozyten bilden eine Epidermis aus zwei bis drei Zellschichten lebender Zellen aus. Diese Befunde sind mit den eigenen Untersuchungen vergleichbar. Nach Andriani et al. (2003) ist der Kontakt zu Fibrozyten für die Ausbildung spezifischer morphologischer Merkmale, wie die Ausprägung einer Basalmembran, ausschlaggebend. Eine Basalmembran wird dabei auch bei auf Kultivierungsgefäßen angezüchteten Keratinozyten nicht gebildet. Die nach Merker (1994) für die Basalmembran charakteristischen Hemidesmosomen waren ebenso wie eine Basalmembran in den Kokulturen nicht sichtbar. Dabei ist die Verbindung der Keratinozyten an die extrazelluläre Matrix der Basalmembran für die Polarisierung entscheidend. Auch in vivo herrschende Druck- und Zugbelastungen, die in vitro fehlen, bedingen die Ausprägung einer spezifischen polaren Organisation der Zellen. Die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass die im Verlauf der in vitro-Kultivierung angezüchtete mehrlagige Zellschicht aus Keratinozyten charakteristische Merkmale eines Stratum spinosum aufwies.

In vivo weisen die gefäßauskleidenden Endothelzellen, dem Blutfluss entsprechend, eine eher langgestreckte Morphologie auf, wodurch die Reibung an der apikalen Membran reduziert wird.

Zu berücksichtigen ist, dass die Endothelzellen in dem hier entwickelten in vitro-Modell unter nahezu statischen Bedingungen kultiviert wurden, so dass eine entsprechende spezifische Ausrichtung der Zellen zunächst nicht zu erwarten war. Im Zytoplasma der Zellen konnten zahlreiche Mitochondrien vom Crista-Typ I beobachtet werden. Das Vorkommen einer hohen Konzentration elektronendichter Mitochondrien vom Crista-Typ I lässt auf einen hohen Energieumsatz der Zellen schließen. Zwischen den Endothelzellen und Keratinozyten fand bereits in der frühen Phase der Kultivierung eine Kompartimentierung mit Ausbildung eines erweiterten Interzellularraumes statt. Des Weiteren konnte die Ablagerung extrazellulären Materials in dem erweiterten Interzellularraum beobachtet werden. Zwischen benachbarten Endothelzellen waren im Vergleich dazu keine Ablagerungen extrazellulären Materials zu erkennen.

Während die Zellmembran der Endothelzellen des Kokultur-Systems 1 (K+E) nach 7 Tagen in vitro zu allen Seiten glatt erschien, wies die zum Medium gerichtete Zellmembran der Endothelzellen in den Kokultur-Systemen 2 (E+K) und 3 (Suspension) zahlreiche fingerförmige beziehungsweise Mikrovilli-ähnliche Ausstülpungen auf. Die Oberflächenmodifikationen spiegelten sich in der Form der Zellkerne wider. Die den Keratinozyten zugewandte endotheliale Zelloberfläche erschien dagegen vergleichsweise glatt. Ausstülpungen der endothelialen Zellmembran in Form von Mikrovilli werden in vivo ausschließlich auf der luminalen Seite der Endothelzellen beobachtet (Fawcett, 1977). Die basale Zelloberfläche hingegen ist in vivo charakterisiert durch die Sekretion fibrillären Materials (Schwartz, 2001). Die Polarisierung der Endothelzellen während der Angiogenese ist ein Kennzeichen für den Grad ihrer Differenzierung. Dabei ist die Bildung einer basalen und einer luminalen Zelloberfläche abhängig vom zellulären Kontakt zu unterschiedlichen Kompartimenten, dem Blut und der extrazellulären Matrix (Haller und Kübler, 1999). In vitro ist die eindeutige Bestimmung der Polarität der Endothelzellen aufgrund unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen in verschiedenen Studien schwierig (Lienau et al., 2005).

Die Endothelzellen der drei direkten Kokultur-Systeme wiesen nach 14 Tage in vitro eine Polarisierung auf, die dadurch gekennzeichnet war, dass die zum Medium zugewandte Zelloberfläche Charakteristika der luminalen Seite in Form von Mikrovilli-ähnlichen Ausstülpungen aufzeigte. Gleichzeitig differenzierte sich die den Keratinozyten zugewandte Zelloberfläche zur basalen Seite mit Sekretion und Ablagerung fibrillären Materials in den zwischen den Endothelzellen und den Keratinozyten dargestellten interzellulären Spaltraum. Durch diese morphologischen Merkmale war eine Charakterisierung einer luminalen und basalen Seite der Endothelzellen, ähnlich der in vivo-Situation, möglich. Zahlreiche

Mitochondrien vom Crista-Typ I, die für einen hohen Energieumsatz der Zellen kennzeichnend sind, kamen in Zellkernnähe und der Zellperipherie vor. Andere Zellorganellen wie endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Felder waren gleichmäßig im Zytoplasma verteilt.

Nach 21 Tagen Kultivierung wiesen die untersuchten Endothelzellen in allen drei direkten Kokultur-Systemen eine polygonale bis runde Zellform auf und schlossen sich auf den langgestreckten Keratinozyten in Kolonien zusammen. In dieser Phase der Kultivierung konnten zwischen benachbarten Endothelzellen der Kolonien erweiterte Interzellularräume dargestellt werden. Die interendothelial zugewandten Zelloberflächen waren gekennzeichnet durch zahlreiche Zellfortsätze, die in diese Interzellularräume hineinragten. Das Auftreten von Ausstülpungen der Zellmembran in die interendothelialen Spalträume deutete auf eine Differenzierung der Zelloberfläche zur luminalen Seite. Dadurch differenzierte sich vermutlich die dem Medium zugewandte Seite der Zellen zur basalen Seite. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen von fibrillärem Material an der zum Medium zugewandten Zelloberfläche der Endothelzellen wäre, dass dieses durch den Wechsel des Nährmediums entfernt wurde. Intrazelluläre Vakuolen konnten in hoher Anzahl im Zytoplasma der Endothelzellen beobachtet werden.

In den transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen der Kokultur-Systeme 1 (K+E) und 3 (Suspension) dominierten nach 28 Tagen die in Kolonien organisierten Endothelzellen durch Ausbildung von Hohlräumen. Als morphologisches Merkmal für die luminalen Seite der Zellen ragten zahlreiche Zellfortsätze in die Hohlräume hinein. Die Anzahl der Mitochondrien nahm bis zum Zeitpunkt der Untersuchungen am 28. Tag *in vitro* ab. Hingegen waren rauhes endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Felder nur noch in einzelnen Endothelzellen zu beobachten. In dieser Kultivierungsphase wird eine geringe Syntheserate der Zellen deutlich. Die Endothelzellen des Kokultur-Systems 2 (E+K) formierten nach 28 Tagen mehrlagige Kolonien, in denen zwischen den hauptsächlich längs orientierten endothelialen Zellen erweiterte Interzellularräume zu erkennen waren. Innerhalb dieser Spalträume waren Anschnitte hinein gewanderter Zellen zu erkennen. Die erweiterten Interzellularräume waren teils mit fibrillärem Material gefüllt oder elektronenoptisch leer. Möglicherweise kam es hier zum Einwandern von Endothelzellen mit extrazellulärer Matrix in bereits bestehende interendotheliale Lumina. Diese Beobachtung könnte für den Mechanismus der Intussuszeption sprechen (Patan, 2000).

6.8 Dermo-epidermale Interaktion

Die zelluläre Interaktion zwischen Dermis und Epidermis wird durch die Wechselwirkung zwischen den Zellen, die voneinander durch die Basalmembran getrennt sind, beeinflusst. Proliferation und Differenzierung der Zellen werden durch epithelial-mesenchymale Interaktionen beeinflusst (Maas-Szabowski et al., 2005). Sowohl Endothelzellen in den dermalen Gefäßen als auch epidermale Keratinozyten setzen in vivo als auch in vitro Wachstumsfaktoren frei, die ihr eigenes Wachstum aber auch die Proliferation anderer Zelltypen regulieren. Die dermo-epidermale Kommunikation wird dabei hauptsächlich über autokrine und parakrine Wege bestimmt. Die sowohl von Endothelzellen als auch Epithelzellen produzierten Bestandteile der Basalmembran stellen nicht nur eine Stützfunktion der Gewebe dar, sondern dienen ebenso als Leitstruktur für die Migration und Differenzierung der Zellen. Wesentliche Strukturproteine der Basalmembran der Haut sind Kollagen Typ I, III und IV. Der in den Kokultur-Systemen stets dargestellte Interzellularraum zwischen den Endothelzellen und Keratinozyten zeigt unabhängig vom Kultivierungsansatz eine eindeutige Kompartimentierung der Zelltypen. In folgenden Arbeiten wäre zu untersuchen auf welchem regulatorischen Weg eine molekulare Interaktion zwischen den Zelltypen stattfindet. Es stellt sich die Frage, ob die in der Zellkultur proliferierenden epidermalen Keratinozyten den proangiogenen Wachstumsfaktor VEGF sezernieren und dieser wiederum die Bildung angiogener Strukturen stimulieren (Supp et al., 2002; Rossiter et al., 2004; Rochon et al., 2010). Eigene Untersuchungen in der Arbeitsgruppe um Plendl konnten den VEGF-Rezeptor 2 (flk-1, KDR) immunohistochemisch sowohl in epidermalen Basal- und Spinosazellen als auch in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen der Rinderklaue nachweisen (Hirschberg und Plendl, 2004).

6.9 Angiogenese-artige Merkmale an mikrovaskulären Endothelzellen in den Kokultur-Systemen in Millicell[®]-PCF-Filtereinsätzen

Zur Untersuchung angiogener Strukturen in den direkten Kokultur-Systemen erfolgte die Beurteilung der Ultrastruktur der Endothelzellen nach 7, 14, 21 und 28 Tagen in vitro.

Nach sieben Tagen in vitro waren die den Keratinozyten benachbarte Endothelzellen in allen drei direkten Kokultur-Systemen von länglicher Gestalt mit ovalem Zellkern und langen Zellausläufern. Diese lagerten sich in einer Endothelzellreihe aneinander und waren hauptsächlich auf den langgestreckten Zellkörpern der Keratinozyten und deren Zellausläufern adhärent. In den eigenen Untersuchungen teilt Bahramsoltani (2003) den Ablauf der angiogenen Kaskade in vitro in acht Stadien ein. Dabei werden längliche Endothelzellen in das

Stadium 2 bis 3 der in vitro-Angiogenese, dem Stadium der Aussprossung (frühe und späte Phase), eingestuft.

In den Kokultur-Systemen 1 (K+E), 2 (E+K) und 3 (Suspension) zeigten die Endothelzellen auch nach 14 Tagen eine längliche Zellform mit einem großen ovalen Zellkern und formierten sich in einer Zellreihe auf den Keratinozyten. Vereinzelt vorkommende Endothelzellen zeigten eine polygonale Gestalt mit jeweils einem runden bis ovalen Zellkern. Nach der Ausbildung von Zellausläufern beginnt im Stadium 4 bis 5 der Angiogenese in vitro die lineare Aneinanderreihung dieser Zellen (Bahramsoltani, 2003).

Die Bildung von Endothelzellkolonien in dreidimensionaler Struktur nach 21 Tagen lässt auf eine Ablösung der im subkonflenten Monolayer wachsenden Endothelzellen schließen. Bahramsoltani (2003) beschreibt im Stadium 6 der in vitro-Angiogenese (Netzwerkbildung) die Bildung eines durch Aneinanderreihung der Zellreihen entstandenen Netzwerks. Die Kolonien bildenden Endothelzellen waren charakterisiert durch peripher gelegene intrazytoplasmatische Vakuolen. Die Vakuolen waren teilweise mit fibrillärem Material gefüllt. Die Verschmelzung intrazytoplasmatischer Vakuolen kann der Ursprung eines neuen Lumens darstellen, bestehende Lumina können durch Sekretion des Vakuoleninhalts vergrößert werden (Folkman und Haudenschild, 1980b).

Nach 28 Tagen in vitro bildeten sich innerhalb der Endothelzellkolonien des Kokultur-Systems 1 (K+E) und 3 (Suspension) durch mindestens zwei Endothelzellen begrenzte Hohlräume. Diese waren teils mit Zellfragmenten gefüllt, teils elektronenoptisch leer. Dabei überlappten sich die Zellenden der zwei benachbarten Endothelzellen. Ähnliche morphologische Veränderungen wurden innerhalb der Endothelzellkolonien des Kokultur-Systems 2 (E+K) bereits nach 21 Tagen in vitro beobachtet. Dabei konnte ein durch Biegung der Zellkörper zweier benachbarter Endothelzellen und der Überlappung der Zellenden entstehender zentraler Hohlraum dargestellt werden. In diese Hohlräume ragten zahlreiche Mikrovilli-ähnliche Zellfortsätze hinein. Gleichzeitig war innerhalb der Hohlräume die Ablagerung einzelner Zellfragmente zu erkennen (Meyer et al., 1997). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich hierbei um die frühe Phase einer Lumenbildung handelt.

6.9.1 Lumenbildung im Kokultur-System 1 (K+E), Kokultur-System 2 (E+K) und Kokultur-System 3 (Suspension) im Millicell®-PCF-Filtereinsatz

In den eigenen Untersuchungen bildeten die mit epidermalen Keratinozyten kokultivierten mikrovaskulären Endothelzellen charakteristische angiogene Strukturen in vitro aus.

Die Endothelzellen der Kokultur-Systeme 1 (K+E) und 3 (Suspension), die nach 28 Tagen transmissionselektronenmikroskopisch untersucht wurden, organisierten sich in Zellkolonien zusammen. Innerhalb der Zellkolonien konnten durch überlappende Zellenden benachbarter Endothelzellen begrenzte Hohlräume dargestellt werden. Zellfortsätze unterschiedlicher Länge ragten in die neu entstanden Hohlräume hinein. Im Inneren der Hohlräume konnten lumenständige Zellfragmente beobachtet werden. Im Kokultur-System 2 (E+K) konnte die initiale Bildung eines Lumens durch Erweiterung eines interendothelialen Spaltraums, wie oben beschrieben, bereits nach 21 Tagen *in vitro* beobachtet werden. Folkman und Haudenschild (1980b) beschrieben Endothelzellen mit intrazytoplasmatischen Vakuolen und postulierten die Lumenbildung durch Verschmelzung der Vakuolen benachbarter Zellen. Dabei kann das entstandene Lumen allerdings nur von einer einzelnen Endothelzelle begrenzt sein. Eine weitere Form der Lumenisierung ist die Vereinigung der Vakuolen mit interzellulären Spalträumen, die dadurch erweitert werden und schließlich ein Lumen bilden (Meyer et al., 1997). Eine mögliche Ursache für die Lumenbildung innerhalb der Endothelzellkolonien wäre die Ausschleusung intrazytoplasmatischer Vakuolen in den interendothelialen Spaltraum. Durch Apoptose der Zellen im Inneren erfolgt die Erweiterung des Lumens, das zur Ablagerung von Zellfragmenten führt (Meyer et al., 1997).

6.10 Einsatz der Kokultur-Systeme in der Erforschung der Pathomechanismen der Klauenrehe und der Hufrehe

In der Veterinärmedizin steht bisher weder ein bovines noch ein equines *in vitro*-Modell zur Untersuchung der Zell-Zell-Interaktion zwischen Endothelzellen und Keratinozyten zur Verfügung. Der Einsatz der hier etablierten direkten *in vitro*-Modelle ermöglicht die Erforschung der Zell-Zell-Interaktion zwischen mikrovaskulären Endothelzellen und epidermalen Keratinozyten hinsichtlich ihres Einflusses auf Proliferation und Zelldifferenzierung. Die Ergebnisse derartiger Untersuchungen können dazu beitragen, die Pathogenese von Klauenerkrankungen und einzelne Pathomechanismen insbesondere in den frühen Stadien der Rehe bei Rind und auch beim Pferd besser zu verstehen. Für die Proliferation, Differenzierung und die Gewebemöostase der Epidermis ist die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff durch das pododermale mikrovaskuläre System von entscheidender Bedeutung. Insbesondere das Kapillarbett der Klauenlederhaut wird durch Mechanismen der Angioadaptation an die jeweiligen aktuellen Stoffwechselbedingungen und mechanischen Belastungen, sowohl die der Dermis als auch die der nicht vaskularisierten Epidermis, angepasst. Des Weiteren wird ein

proangiogener Effekt der Keratinozyten auf die Endothelzellen durch die Sezernierung von VEGF vermutet (Ponec et al., 2004; Wilgus et al., 2005; Rochon et al., 2010).

In vitro-Systeme stehen im Mittelpunkt biologischer Grundlagenforschung von regulatorischen Prozessen der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion. In der Vergangenheit wurden im Rahmen des Tissue engineering organotypische Kokulturen auf der Basis einer mit Fibroblasten besiedelten extrazellulären Matrix entwickelt, die die Bildung Kapillar-ähnlicher Strukturen und eine gewebespezifische epidermale Differenzierung in vitro ermöglichen (Liu et al., 2008; Lugo et al., 2010). Dabei basieren die zur Generierung von sogenannten Haut-Äquivalenten verwendeten in vitro-Modelle teils auf die Substitution von proangiogenen Wachstumsfaktoren und teils auf Komponenten der extrazellulären Matrix, die einen nachweislich regulatorischen Einfluss auf die Proliferation und gewebespezifische Differenzierung ausüben.

Die phasenkontrastmikroskopischen und ultrastrukturellen Untersuchungen aller Kokultur-Systeme ergaben, dass in diesen Modellen charakteristische Strukturen definierter angiogener Stadien von Endothelzellen gebildet wurden. In dem auf Glasplättchen kultivierten Kokultur-System 2 (E+K) konnten bereits nach einer Woche Inkubation aus Endothelzellen formierte ringförmige Strukturen beobachtet werden. Die endothelialen Strukturen waren hierbei charakterisiert durch die zirkuläre Anordnung von zwei oder mehreren länglichen Endothelzellen. Daher erscheint das direkte Kokultur-System 2 (E+K) besonders geeignet zum Studium der endothelialen Differenzierung in vitro. Die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen der in Filtereinsätzen inkubierten Kokultur-Systeme zeigten alle eine gute Eignung für die Analysen der Zell-Zell-Interaktion zwischen Endothelzellen und Keratinozyten. Insbesondere die Kokultur-Systeme 1 (E+K) und 3 (Suspension) ermöglichen die Untersuchungen der endothelialen Lumenbildung in vitro. Die in dieser Arbeit entwickelten in vitro-Modelle sind des Weiteren für die Untersuchungen regulatorischer Mechanismen geeignet. Mit diesen unterschiedlichen Versuchsansätzen lässt sich insbesondere der Einfluss einzelner Wachstumsfaktoren auf mikrovaskulären Endothelzellen und epidermalen Keratinozyten untersuchen.

Die hier vorgestellten direkten Kokultur-Systeme bieten ebenso die Grundlage für Untersuchungen an anderen Tierarten, wie beispielsweise für die Erforschung der initialen Pathomechanismen der Rehe im Hufgewebe. Die in den ersten 24 – 48 h ablaufenden initialen Ereignisse und Mechanismen, die zu irreversiblen Gewebeschäden im Huf führen, verstehen wir nach wie vor nur unvollständig. Der derzeitige wissenschaftliche Kenntnisstand belegt eindeutig eine herausragende Rolle des Gefäßsystems im Sinne von Mikrozirkulations- und Perfusionsstörungen aber auch direkte Schädigungen und mögliche Aktivierung von

Endothelzellen (Bailey et al, 2004; Moore et al., 2004; Eades, 2010). Wie und in welchem Umfang die Endothelzellen und Keratinozyten interagieren und welche Rolle diese Interaktion in der frühen Pathogenese spielt, ist jedoch weitestgehend unbekannt. Hier bietet sich wie auch in der oben beschriebenen Erforschung der Pathogenese der Klauenrehe ein aus tierschützerischen und ökonomischen Aspekten bedeutendes und wissenschaftlich attraktives und erfolgversprechendes Forschungsgebiet für den Einsatz der Kokultur-Systeme.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden drei direkte in vitro-Kokultur-Modelle aus Endothelzellen und Keratinozyten, die das Studium der Zell-Zell-Interaktion ermöglichen, entwickelt und etabliert. Im Fokus der Untersuchungen standen des Weiteren die Identifizierung der Zelltypen und eine morphologische Charakterisierung. Die zelluläre Interaktion zwischen den Keratinozyten und den Endothelzellen ist vor allem für die Gewebemöostase im bovinen Zehenendorgan von entscheidender Bedeutung und nimmt somit in der Pathogenese von Klauenerkrankungen eine zentrale Stellung ein.

Hierfür wurden die direkten Kokulturen unter denselben standardisierten Kultivierungsbedingungen in drei unterschiedlichen Ansätzen zusammengeführt, die im Rahmen dieser Arbeit als Kokultur-System 1 (K+E), Kokultur-System 2 (E+K) und Kokultur-System 3 (Suspension) benannt wurden. Im Kokultur-System 1 (K+E) wurde zunächst ein subkonfluenten Monolayer aus Keratinozyten auf den mit Kollagen Typ I beschichteten Kulturgefäßoberflächen kultiviert, der im weiteren Sinne die Aufgabe eines „feeder layers“ erfüllen sollte. Zu untersuchen war, ob bereits adhärenz im subkonfluenten Monolayer liegende Keratinozyten einen Einfluss auf die Adhärenz und folgende Differenzierung der Endothelzellen ausübten. Im umgekehrten Fall war im Kokultur-System 2 (E+K) zu untersuchen, inwieweit Keratinozyten im Zuge ihrer Adhärenz und Migration auf die Differenzierung bereits in subkonfluenten Monokultur befindende Endothelzellen Einfluss nehmen. Das Ziel der Untersuchungen im Kokultur-System 3 (Suspension) war zu beobachten, wie Endothelzellen und Keratinozyten, die zum selben Zeitpunkt in Kultur gebracht wurden, sich in der Adhärenz und Differenzierung gegenseitig beeinflussen. Die Einsaat der Zellen im Kokultur-System 3 erfolgte in Suspension, somit wurde eine zufällige Verteilung der Zelltypen auf dem Boden der Kulturgefäßoberfläche erreicht. Die Kokulturen wurden im Langzeitmodell jeweils auf beschichteten Glasplättchen beziehungsweise Millicell®-PCF-Filtereinsätzen phasenkontrastmikroskopisch beziehungsweise transmissionselektronenmikroskopisch angezüchtet. Die Kultivierung aller Kokultur-Systeme erfolgte in dem Erhaltungsmedium DMEM+. Gemäß des Versuchsaufbaus der Kokultur-Systeme 1 (K+E) und 2 (E+K) wurden die Keratinozyten und die Endothelzellen in Monokultur jeweils über 24 Stunden in dem entsprechenden Selektivmedium inkubiert (s. 3.2).

In allen direkten Kokultur-Systemen konnten Endothelzellen und Keratinozyten erfolgreich kokultiviert werden. Die Endothelzellen zeigten in allen Kokultur-Systemen Angiogenese-artige Strukturen, die den charakteristischen Merkmalen in Form der Aussprossung, linearer

Aneinanderreihung und der Ausbildung Kapillar-ähnlicher Strukturen *in vitro* ähneln (Stadien-Einteilung gemäß Bahramsoltani, 2003; Käßmeyer, 2006). Die unvollständig differenzierten Keratinozyten zeigten eine stabile Adhärenz auf den mit Kollagen Typ I, einer Komponente der interstitiellen Matrix, beschichteten Glasplättchen und Millicell[®]-PCF-Filtereinsätzen. Charakteristisch für die Keratinozyten der Kokultur-Systeme 1 bis 3 (K+E, E+K, Suspension) war die Bildung einer mehrlagigen Zellschicht. Nach der vierwöchigen Langzeitkultivierung entstand in allen Kokultur-Systemen eine mehrlagige Kokultur aus Endothelzellen und Keratinozyten.

Durch die immunzytochemische Markierung mit einem Antikörper gegen Zytokeratin 14 (CK14) wurden die epidermalen Keratinozyten im Kokultur-System 2 (E+K) identifiziert. Ein Antikörper gegen Zytokeratin 19 (CK19) diente als Marker für die mikrovaskulären Endothelzellen in den auf Glasplättchen kultivierten Kokultur-Systemen 1 (E+K) und 3 (Suspension).

In den transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgte die Identifizierung der Endothelzellen und Keratinozyten in der frühen Phase der Kultivierung anhand der Lokalisation der Zellen gemäß des Versuchaufbaus des entsprechenden Kokultur-Systems, während in der späten Phase der Kultivierung spezifische morphologische Merkmale eine Identifizierung und Charakterisierung der Zellen ermöglichten. Dabei wurden innerhalb endothelialer Zellkolonien in den Kokultur-Systemen 1 (E+K) und 3 (Suspension) Lumen umschließende Kapillar-ähnliche Strukturen aus Endothelzellen beobachtet. Die durch überlappende Zellenden benachbarter Endothelzellen formierten Hohlräume waren teils mit Zellfragmenten oder elektronenoptisch leer. Im Kokultur-System 2 (E+K) formierten die Endothelzellen eine mehrlagige Zellansammlung, die gekennzeichnet war durch ein Netzwerk aus reich verzweigten Zellen. Des Weiteren zeigten sich Anzeichen für intussuszeptionelle Remodellierung der entstandenen Hohlräume. Die Keratinozyten bildeten in allen Kokultur-Systemen (E+K, K+E, Suspension) eine mehrlagige Zellschicht aus, auf denen die Endothelzellkolonien lokalisiert waren. Charakteristisch für die Keratinozyten war ihre stabile Adhärenz auf den beschichteten Filtermembranen. Transmissionselektronenmikroskopisch konnte eine eindeutige Kompartimentierung durch Ausbildung eines erweiterten mit fibrillärem Material gefüllten extrazellulären Spaltraums zwischen den Endothelzellen und den Keratinozyten beobachtet werden.

Resultierend aus den eigenen Beobachtungen scheinen Keratinozyten einen zentralen regulatorischen Einfluss auf die endotheliale Morphogenese auszuüben. Daher sind diese Kokultur-Systeme besonders für weitere Untersuchungen endothelial-epidermaler Regulationsmechanismen geeignet. In künftigen Untersuchungen zur Pathogenese von Klauen-

und Hufrehe verspricht der Einsatz der hier entwickelten Kokultur-Systeme neue Erkenntnisse zu den Mechanismen im Initialstadium der Erkrankung.

8 Summary

Establishment of a direct co-culture model for analysis of interactions between microvascular endothelial cells and epidermal keratinocytes

In the work presented in this thesis three direct in vitro co-culture models of endothelial cells and keratinocytes were developed and established. These models enable studies of cellular interactions between these two cell types. The work focused on identification of the cell types present in culture and a detailed morphological characterization. The cellular interaction between keratinocytes and endothelial cells is of particular relevance for the tissue homeostasis in the bovine claw. Cellular interactions play a key role during the pathogenesis of claw diseases.

The direct co-cultures were assembled using three different technical approaches but under identical standardized culture conditions. The three different approaches are identified as co-culture system 1 (E+K), co-culture system 2 (K+E) and co-culture system 3 (suspension). In the co-culture system 1 (E+K) initially a sub-confluent monolayer of keratinocytes was established on culture dishes coated with collagen type I. This monolayer served as a kind of “feeder-layer” for the endothelial cells seeded subsequently on top of the keratinocytes. The hypothesis tested with this model was that keratinocytes which adhere to the dish as monolayer already have an influence on adhesion and subsequent differentiation of endothelial cells seeded on top. On the other hand the experiments carried out with the co-culture system 2 (K+E) examined if keratinocytes during their migration and adhesion have an influence on endothelial cells that have established a sub-confluent layer already. The aim of the experiments done with the co-culture system 3 (suspension) was to study the mutual influence of endothelial cells and keratinocytes regarding their adhesion and differentiation, when cultured simultaneously. Cell seeding in the co-culture system 3 was done in suspension. Therefore a random distribution of the different cell types on the bottom of the culture dish was accomplished.

The co-cultures were grown for extended periods of time (long term model) on coated glass plates or Millicell[®]-PCF-inserts respectively. Cells were examined using phase contrast microscopy and transmission electron microscopy. A maintenance medium DMEM+ was used for cultivating all co-culture systems. According to the experimental setup of the co-culture systems 1 (K+E) and 2 (E+K), keratinocytes and endothelial cells were incubated in monoculture in the corresponding selective medium for a duration of 24 hours (s. 3.2).

Endothelial cells and keratinocytes were successfully cultured in all three direct co-culture systems. In all systems the endothelial cells displayed angiogenic structures with characteristic features of angiogenesis such as sprouting, linear arrangement, and formation of capillary like structures in vitro (stages according to Bahramsoltani, 2003; Käsmeyer, 2006). The incomplete differentiated keratinocytes showed a stable adhesion to the glass plates and Millicell[®]-PCF-inserts, which were coated with collagen type I, a component of the interstitial matrix. Characteristic for the keratinocytes in co-culture system 1 to 3 (K+E, E+K, suspension) was the creation of a stratified layer. After 4 week long term cultivation a multilayered co-culture of endothelial cells and keratinocytes developed in all three systems.

The immunocytochemical reaction with an antibody to cytokeratin 14 (CK14) identified epidermal keratinocytes in the co-culture system 2 (E+K). An antibody to cytokeratin 19 (CK19) was used as marker for microvascular endothelial cells in the co-culture systems 1 (K+E) and 3 (suspension).

Endothelial cells and keratinocytes were identified by electron microscopic examination in the early stage of cultivation using their localization corresponding to the sequence of seeding in the respective co-culture system as a criterion. During the late stages of cultivation specific morphological criteria enabled the identification and differentiation of these two cell types. Within the endothelial cell colonies in the co-culture systems 1 (E+K) and 3 (suspension) capillary like structures consisting of endothelial cells which enclosed a lumen were detected. The overlapping cell processes of neighbouring endothelial cells surrounded cavities which were either filled with cell fragments resp. fibrous material or were electron lucent. In co-culture system 2 (E+K) the endothelial cells form a multilayered cell cluster, which is characterized by a network of abundant branching cells. Furthermore signs of an intussusceptional remodeling of the cavities were revealed. The keratinocytes build up a stratified layer of cells covered by endothelial cells in all three systems (E+K, K+E, suspension). A stable adhesion on the coated membranes was characteristic for the keratinocytes. Transmission electron microscopic examination clearly showed formation of compartment between endothelial cells and keratinocytes by a dilated intercellular space filled, with fibrillar material.

The results presented here support a central regulatory influence of keratinocytes on the endothelial morphogenesis. Consequently these co-culture systems are suitable for further investigation into the endothelial–epidermal interactions. The use of the developed co-culture systems in future studies of the pathogenesis and pathomechanisms of bovine and equine laminitis has the potential to shed light on the cellular interactions occurring during its initial stages.

9 Abkürzungen

acLDL	acetyliertes Low Density Lipoprotein
BS-I	Bandeiraea simplicifolia Agglutinin I
CK	Zytokeratin
DDSA	2-Dodecenylsuccinic-Acid-Anhydride
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DMEM+	DMEM+L-Glutamin+10 % FBS+Penicillin/Streptomycin
DMP-30	2,4,6 Tri (dimethylaminomethyl) Phenol
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
EDTA	Ethylendiamin Tetraacid
Fa.	Firma
FBS	Fetales Bovines Serum
HE	Hämalaun-Eosin-Färbung
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
LDL	Low Density Lipoprotein
MCGs	membrane coating granules
MCM	membrane coating material
MNA	Methyl Nacid Anhydride
PBS	Phosphate Buffered Saline
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
vWF	von Willebrand-Factor
6-well	Kulturplatte mit 6 Vertiefungen
24-well	Kulturplatte mit 24 Vertiefungen

10 Literaturverzeichnis

Abbas O., Mahalingam M.

Epidermal stem cells: practical perspectives and potential uses.
Br J Dermatol. 161: 228-36 (2009)

Akiyama M., Matsuo I., Shimizu H.

Formation of cornified cell envelope in human hair follicle development.
Br J Dermatol. 146: 968-76 (2002)

Allt G., Lawrenson J.G.

Pericytes: cell biology and pathology. Review.
Cells Tissues Organs. 169: 1-11 (2001)

Andriani F., Margulis A., Lin N., Griffey S., Garlick J.A.

Analysis of microenvironmental factors contributing to basement membrane assembly and normalized epidermal phenotype.
J Invest Dermatol. 120: 923-31 (2003)

Anthauer K., Mülling CH., Budras K.D.

Membrane-coating granules and the intercellular cementing substance (membrane-coating material) in the epidermis in different regions of the equine hoof.
Anat Histol Embryol. 34: 298-306 (2005)

Asahara T., Kawamoto A.

Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis.
Am J Physiol Cell Physiol. 287: C572-9 (2004)

Augustin H.G.

Tubes, branches, and pillars: the many ways of forming a new vasculature.
Circ Res. 89: 645-7 (2001)

Ausprunk D.H., Folkman J.

Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis.
Microvasc Res. 14: 53-65 (1977)

Bader B.L., Jahn L., Franke W.W.

Low level expression of cytokeratins 8, 18 and 19 in vascular smooth muscle cells of human umbilical cord and in cultured cells derived therefrom, with an analysis of the chromosomal locus containing the cytokeratin 19 gene.
Eur J Cell Biol. 47: 300-19 (1988)

Bahramsoltani M.

Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese in vitro. Dissertation.
Fachbereich Veterinärmedizin. Freie Universität Berlin (2003)

Bailey S.R., Marr C.M., Elliott J.

Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horse.

Vet J. 167: 129-42 (2004)

Ballaun C., Weninger W., Uthman A., Weich H., Tschachler E.

Human keratinocytes express the three major splice forms of vascular endothelial growth factor.

J Invest Dermatol. 104: 7-10 (1995)

Bao P., Kodra A., Tomic-Canic M., Golinko M.S., Ehrlich H.P., Brem H.

The role of vascular endothelial growth factor in wound healing.

J Surg Res. 153: 347-58 (2009)

Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M.S., Brem H., Tomic-Canic M.

Growth factors and cytokines in wound healing. Review.

Wound Repair Regen. 16: 585-601 (2008)

Baum C.L., Arpey C.J.

Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. Review.

Dermatol Surg. 31: 674-86 (2005)

Bayless K.J., Davis G.E.

The Cdc42 and Rac1 GTPases are required for capillary lumen formation in three-dimensional extracellular matrices.

J. Cell Sci. 115: 1123-1136 (2002)

Bayless K.J., Salazar R., Davis G.E.

RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the alpha(v)beta(3) and alpha(5)beta(1) integrins.

Am. J. Pathol. 156: 1673-1683 (2000)

Beindorff N., Nagai K., Shirasuna K., Herzog K., Hoeffmann K., Sasaki M., Bollwein H., Miyamoto A.

Vascular changes in the corpus luteum during early pregnancy in the cow.

J Reprod Dev. 56: 263-70 (2010)

Berisha B., Schams D.

Ovarian function in ruminants.

Domest Anim Endocrinol. 29: 305-17 (2005)

Bhushan M., Young H.S., Brenchley P.E., Griffiths C.E.

Recent advances in cutaneous angiogenesis. Review.

Br J Dermatol. 147: 418-25 (2002)

Birkner S., Weber S., Dohle A., Schmahl G., Föllmann W.

Growth and remodeling of primary bovine colon epithelial cells in vitro.

Altern Lab Anim. 32: 555-71 (2004)

Bischoff J.

Cell adhesion and angiogenesis.
J Clin Invest. 100 (11 Suppl): 37-9 (1997)

Black A.F., Berthod F., L'heureux N., Germain L., Auger F.A.

In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent.
FASEB J. 12: 1331-40 (1998)

Black A.F., Hudon V., Damour O., Germain L., Auger F.A.

A novel approach for studying angiogenesis: a human skin equivalent with a capillary-like network. Review.
Cell Biol Toxicol. 15: 81-90 (1999)

Blanpain C., Fuchs E.

Epidermal stem cells of the skin.
Annu Rev Cell Dev Biol. 22: 339-73 (2006)

Bouwstra J.A., Ponc M.

The skin barrier in healthy and diseased state.
Biochim Biophys Acta. 1758: 2080-95 (2006)

Boyce S.T., Supp A.P., Swope V.B., Warden G.D.

Vitamin C regulates keratinocyte viability, epidermal barrier, and basement membrane in vitro, and reduces wound contraction after grafting of cultured skin substitutes.
J Invest Dermatol. 118: 565-72 (2002)

Bragulla H., Hirschberg R.M.

Horse hooves and bird feathers: Two model systems for studying the structure and development of highly adapted integumentary accessory organs—the role of the dermo-epidermal interface for the micro-architecture of complex epidermal structures.
J Exp Zool B Mol Dev Evol. 298: 140-51 (2003)

Bragulla H., Mülling CH.

Veränderungen der Architektur der Hornzellen und des Hornzellverbandes bei Klauen-erkrankungen.
Proc 20th Congress of the European Association of Veterinary Anatomists. 15.-19.08.1994, Zürich/CH, S 43-44 (1994)

Brown L.F., Olbricht S.M., Berse B., Jackman R.W., Matsueda G., Tognazzi K.A., Manseau E.J., Dvorak H.F., Van de Water L.

Overexpression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) and its endothelial cell receptors in delayed hypersensitivity skin reactions.
J Immunol. 154: 2801-7 (1995)

Budde A.

Immunohistochemischer Nachweis der Rezeptoren für Wachstumshormon und Oxytocin im bovinen Ovar. Dissertation.
Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (1999)

Budras K.D., Wünsche A.

Atlas der Anatomie des Rindes
Schlütersche GmbH & Co. KG, Verlag und Druckerei, Hannover (2002)

Burri P.H., Djonov V.

Intussusceptive angiogenesis—the alternative to capillary sprouting. Review.
Mol Aspects Med. 23: 1-27 (2002)

Burri P.H., Hlushchuk R., Djonov V.

Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. Review.
Dev Dyn. 231: 474-88 (2004)

Canavese M., Altruda F., Ruzicka T., Schaubert J.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) in the pathogenesis of psoriasis—a possible target for novel therapies? Review.
J Dermatol Sci. 58: 171-6 (2010)

Carmeliet P.

Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.
Nat Med. 6: 389-95 (2000)

Carmeliet P.

Angiogenesis in life, disease and medicine.
Nature. 438: 932-6 (2005)

Carter K.

Growth factors: the wound healing therapy of the future.
Br J Community Nurs. 8: 15-6, 18-9, 22-3 (2003)

Davis G.E., Black S.M., Bayless K.J.

Capillary morphogenesis during human endothelial cell invasion of three-dimensional collagen matrices.
In Vitro Cell Dev Biol Anim. 36: 513-9 (2000)

Conway E.M., Collen D., Carmeliet P.

Molecular mechanisms of blood vessel growth. Review.
Cardiovasc Res. 49: 507-21 (2001)

Crisan M., Yap S., Casteilla L., Chen C.W., Corselli M., Park T.S., Andriolo G., Sun B., Zheng B., Zhang L., Norotte C., Teng P.N., Traas J., Schugar R., Deasy B.M., Badylak S., Buhring H.J., Giacobino J.P., Lazzari L., Huard J., Péault B.

A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs.
Cell Stem Cell. 3: 301-13 (2008)

Davis J.S., Rueda B.R., Spanel-Borowski K.

Microvascular endothelial cells of the corpus luteum.
Reprod Biol Endocrinol. 1: 89 (2003)

Debus E.S., Schmidt K., Geiger D., Dietz U.A., Thiede A.

Growth factors for preventing amputation in delayed wound healing.
Kongressbd Dtsch Ges Chir Kongr. 118: 829-33 (2001)

Debus E.S., Schmidt K., Ziegler U.E., Thiede A.

The role of growth factors in wound healing.
Zentralbl Chir. 125 Suppl 1: 49-55 (2000)

Dejana E., Spagnuolo R., Bazzoni G.

Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration. Review.

Thromb Haemost. 86: 308-15 (2001)

Detmar M.

The role of VEGF and thrombospondins in skin angiogenesis. Review.

J Dermatol Sci. 24 Suppl 1: 78-84 (2000)

Detmar M., Brown L.F., Berse B., Jackman R.W., Elicker B.M., Dvorak H.F., Claffey K.P.

Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin.

J Invest Dermatol. 108: 263-8 (1997)

Detmar M., Yeo K.T., Nagy J.A., Van de Water L., Brown L.F., Berse B., Elicker B.M., Ledbetter S., Dvorak H.F.

Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells.

J Invest Dermatol. 105: 44-50 (1995)

Djonov V., Baum O., Burri P.H.

Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. Review.

Cell Tissue Res. 314: 107-17 (2003)

Dye J., Lawrence L., Linge C., Leach L., Firth J., Clark P.

Distinct patterns of microvascular endothelial cell morphology are determined by extracellular matrix composition.

Endothelium. 11: 151-67 (2004)

Eades S.C.

Overview of current laminitis research.

Vet Clin North Am Equine Pract. 26: 51-63 (2010)

Ekfalck A., Jones B., Obel N.

Possible importance for laminitis research of recent studies on substances influencing the differentiation of cultured keratinocytes.

Zentralbl Veterinarmed A. 38: 721-7 (1991)

El-Ghalbzouri A., Gibbs S., Lamme E., Van Blitterswijk C.A., Ponc M.

Effect of fibroblasts on epidermal regeneration.

Br J Dermatol. 147: 230-43 (2002a)

El-Ghalbzouri A., Lamme E., Ponec M.

Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis.
Cell Tissue Res. 310: 189-99 (2002b)

Eming S.A., Krieg T., Davidson J.M.

Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms.
J Invest Dermatol. 127: 514-25 (2007)

Fawcett D.W.

Temporäre Differenzierungen und Oberflächenaktivität. In: Atlas zur Elektronenmikroskopie der Zelle (Fawcett D.W., Hrsg.), 394-414. Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien

Ferrara N.

Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Review.
Endocr Rev. 25: 581-611 (2004)

Ferrara N., Gerber H.P.

The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis.
Acta Haematol. 106: 148-56 (2001)

Ferretti A., Boschi E., Stefani A., Spiga S., Romanelli M., Lemmi M., Giovannetti A., Longoni B., Mosca F.

Angiogenesis and nerve regeneration in a model of human skin equivalent transplant.
Life Sci. 73: 1985-94 (2003)

Fischer C., Schneider M., Carmeliet P.

Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis.
Review.
Handb Exp Pharmacol. (176 Pt 2): 157-212 (2006)

Folkman J.

Angiogenesis.
In: Biology of endothelial cells.
1. Auflage. Kluwer Academic Publishers, Boston, (1984)

Folkman J., Haudenschild C.

Angiogenesis in vitro.
Nature. 288: 551-6 (1980a)

Folkman J., Haudenschild C.

Angiogenesis by capillary endothelial cells in culture.
Trans. Ophthalmol. Soc. UK 100: 346-353 (1980b)

Frank S., Hübner G., Breier G., Longaker M.T., Greenhalgh D.G., Werner S.

Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes.
Implications for normal and impaired wound healing.
J Biol Chem. 270: 12607-13 (1995)

Freedberg I.M., Tomic-Canic M., Komine M., Blumenberg M.

Keratins and the keratinocyte activation cycle.

J Invest Dermatol. 116: 633-40 (2001)

Fuchs, E.

Epidermal differentiation and keratin gene expression. Review.

Princess Takamatsu Symp. 24: 290-302 (1994)

Fuchs, C.

Zur mikroskopischen Anatomie der Zehenendorgane von Pferd, Wiederkäuern, Schwein, Hund und Katze-eine vergleichende Literaturstudie. Dissertation.

Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (1993)

Fuchs-Schoenleber T.

Etablierung eines in vitro-Modells des bovinen Corpus luteum. Dissertation.

Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (1999)

Fürst, A.

Makroskopische und mikroskopische Anatomie der Rinderklaue. Dissertation.

Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Zürich (1992)

Garlanda C., Dejana E.

Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. Review.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 17: 1193-202 (1997)

Gerhardt H., Betsholtz C.

Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis.

Cell Tissue Res. 314: 15-23 (2003)

Germain S., Monnot C., Muller L., Eichmann A.

Hypoxia-driven angiogenesis: role of tip cells and extracellular matrix scaffolding.

Curr Opin Hematol. 17: 245-51 (2010)

Ghahary A., Ghaffari A.

Role of keratinocyte-fibroblast cross-talk in development of hypertrophic scar.

Wound Repair Regen. 15 Suppl 1: 46-53 (2007)

Gimbrone M.A. Jr., Cotran R.S., Folkman J.

Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis.

J Cell Biol. 60: 673-84 (1974)

Grazul-Bilska A.T., Johnson M.L., Bilski J.J., Redmer D.A., Reynolds L.P., Abdullah A., Abdullah K.M.

Wound healing: the role of growth factors. Review.

Drugs Today (Barc). 39: 787-800 (2003)

Green K.J., Gaudry C.A.

Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments?

Nat Rev Mol Cell Biol. 1: 208-16 (2000)

Habermehl K.H.

Haut und Hautorgane.

In: Nickel R, Schummer A, Seiferle E (Hrsg). Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Bd. III, 3. Auflage. Verlag Parey, Berlin, 443-570. ISBN 3-8263-3053-6 (1996)

Hackam D.J., Ford H.R.

Cellular, biochemical, and clinical aspects of wound healing. Review
Surg Infect (Larchmt). 3 Suppl 1: 23-35 (2002)

Haller C., Kübler W.

Zellpolarität im Herz-Kreislauf-System.
Z Kardiol. 88: 324-330 (1999)

Hallmann R., Horn N., Selg M., Wendler O., Pausch F., Sorokin L.M.

Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature.
Physiol Rev. 85: 979-1000 (2005)

Harper S.J., Bates D.O.

VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? Review.
Nat Rev Cancer. 8: 880-7 (2008)

Hendry, K.A., Knight, C. H., Rae, M., Galbraith, H., Wilde, C.J.

Basement membrane deterioration in hoof ulceration.
Proc. Of the 12th Int.
Symp. On Lameness in Ruminants, Jan. 9-13, Orlando. (2002)

Heidenreich R., Röcken M. Ghoreschi K.

Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis
Int J Exp Pathol. 90: 232-48 (2009)

Hendry K.A., MacCallum A.J., Knight C.H., Wilde C.J.

Synthesis and distribution of cytokeratins in healthy and ulcerated bovine claw epidermis.
J Dairy Res. 68: 525-37 (2001)

Hewett P.W.

Vascular endothelial cells from human micro- and macrovessels: isolation, characterisation and culture.
Methods Mol Biol. 467: 95-111 (2009)

Hinterhuber G., Marquardt Y., Diem E., Rappersberger K., Wolff K., Foedinger D.

Organotypic keratinocyte coculture using normal human serum: an immunomorphological study at light and electron microscopic levels.
Exp Dermatol. 11: 413-20 (2002)

Hirschberg R.M., Mülling CH., Bragulla H.

Microvasculature of the bovine claw demonstrated by improved micro-corrosion-casting technique.
Microsc Res Tech. 45: 184-97 (1999)

Hirschberg R.M., Mülling CH., Budras K.D.

Pododermal angioarchitecture of the bovine claw in relation to form and function of the papillary body: a scanning electron microscopic study.

Microsc Res Tech. 54: 375-85 (2001)

Hirschberg R.M., Plendl J.

Pododermal angiogenesis and angioadaptation in the bovine claw.

Microsc Res Tech. 66: 145-55 (2005)

Hirschberg R.M., Plendl J.

Pododermal angiogenesis – new aspects of development and function of the bovine claw.

Proc. 13th Int. Symp. & Conf. Lameness in Ruminants, Maribor, Slovenia, 11th – 15th Febr. 2004, B. Zemljic (ed.), 67-69 (2004)

Hirschi K.K., D'Amore P.A.

Pericytes in the microvasculature. Review.

Cardiovasc Res. 32: 687-98 (1996)

Hirschi K.K., D'Amore P.A.

Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. Review.

EXS. 79: 419-28 (1997)

Hoffmann D.

Perfusionskammersysteme zur Entwicklung organotypischer Kokulturen boviner Fibrozyten und Keratinozyten aus der Klaue. Dissertation.

Fachbereich Veterinärmedizin. Freie Universität Berlin (2006)

Hohl D.

Formation of the cornified envelope.

Exp Dermatol. 14: 777-80 (2005)

Holbrook K.A., Hennings H.

Phenotypic expression of epidermal cells in vitro: a review. Review.

J Invest Dermatol. 81 (1 Suppl): 11-24 (1983)

Hojo M., Inokuchi S., Kidokoro M., Fukuyama N., Tanaka E., Tsuji C., Miyasaka M., Tanino R., Nakazawa H.

Induction of vascular endothelial growth factor by fibrin as a dermal substrate for cultured skin substitute.

Plast Reconstr Surg. 111: 1638-45 (2003)

Hudon V., Berthod F., Black A.F., Damour O., Germain L., Auger F.A.

A tissue-engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation in vitro.

Br J Dermatol. 148: 1094-104 (2003)

Hughes S., Chang-Ling T.

Roles of endothelial cell migration and apoptosis in vascular remodeling during development of the central nervous system.
Microcirculation. 7: 317-33 (2000)

Humphrey J.D.

Vascular adaptation and mechanical homeostasis at tissue, cellular, and sub-cellular levels.
Cell Biochem Biophys. 50: 53-78 (2008)

Iivanainen E., Kähäri V.M., Heino J., Elenius K.

Endothelial cell-matrix interactions. Review.
Microsc Res Tech. 60: 13-22 (2003)

Jain R.K., Booth M.F.

What brings pericytes to tumor vessels?
J Clin Invest. 112: 1134-6 (2003)

Jost M., Rodeck U.

Keratinocyte culture in the absence of substrate attachment.
Methods Mol Biol. 289: 23-8 (2005)

Junqueira L.C., Carneiro J., Kelley R.O.

Kreislaufsystem.
In: Histologie (Gratzl M., Hrsg.). 5. Auflage.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 163-187 (2002)

Kässmeyer S.

Gefäßbildung des bovinen Corpus luteum in vitro: Charakterisierung von Endothelzellen und endothelialen Progenitorzellen. Dissertation.
Fachbereich Veterinärmedizin. Freie Universität Berlin (2006)

Kässmeyer S., Plendl J.

Angiogenesis and vasculogenesis in the corpus luteum in vitro.
Clin Hemorheol Microcirc. 41: 83-101 (2009)

Kässmeyer S., Plendl J., Custodis P., Bahramsoltani M.

New insights in vascular development: vasculogenesis and endothelial progenitor cells.
Anat Histol Embryol. 38: 1-11 (2009)

Kitahara T., Ogawa H.

Variation of differentiation in nail and bovine hoof cells.
J Invest Dermatol. 102: 725-9 (1994)

Kumar I., Staton C.A., Cross S.S., Reed M.W., Brown N.J.

Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and its receptors in human surgical wounds.
Br J Surg. 96: 1484-91 (2009)

Lee E.Y., Xia Y., Kim W.S., Kim M.H., Kim T.H., Kim K.J., Park B.S., Sung J.H.

Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF.

Wound Repair Regen. 17: 540-7 (2009)

Lehmann I., Brylla E., Sittig D., Spanel-Borowski K., Aust G.

Microvascular endothelial cells differ in their basal and tumour necrosis factor-alpha-regulated expression of adhesion molecules and cytokines.

J Vasc Res. 37: 408-16 (2000)

Li M.G., Tian X.Y., Chen X.B.

A brief review of dispensing-based rapid prototyping techniques in tissue scaffold fabrication: role of modeling on scaffold properties prediction.

Biofabrication. 1: 032001 (2009)

Liebich H.G., Reese S., Budras K.D.

Allgemeine Körperdecke (Integumentum commune).

In: Liebich HG. (Hrsg.): Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, 4. Auflage. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, 311-330. ISBN 3-7945-2311-3 (2004)

Lienau J.

Etablierung von in vitro-Modellen der Angiogenese muriner und humaner Endothelzellen sowie deren Transfektion mit verschiedenen Plasmidkonstrukten. Dissertation.

Fachbereich Veterinärmedizin. Freie Universität Berlin (2003).

Lienau J., Kaletta C., Teifel M., Naujoks K., Bhoola K., Plendl J.

Morphology and transfection study of human microvascular endothelial cell angiogenesis: an in vitro three-dimensional model.

Biol Chem. 386: 167-75 (2005)

Lischer C., Ossent P.

Das Sohlengeschwür beim Rind: Eine Literaturübersicht.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 114: 13-21 (2001)

Liu P., Deng Z., Han S., Liu T., Wen N., Lu W., Geng X., Huang S., Jin Y.

Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds.

Artif Organs. 32: 925-31 (2008)

Lu Y.G., Wu J.J., Zhang J.Y., Yang G.H., Yang T.

Histologic characteristics of in vitro constructed skin basement membrane.

Zhonghua Shao Shang Za Zhi. 23: 369-71 (2007)

Lugo L.M., Lei P., Andreadis S.T.

Vascularization of the dermal support enhances wound reepithelialization by in situ delivery of epidermal keratinocytes.

Tissue Eng Part A. (2010)

Luttun A., Carmeliet P.

De novo vasculogenesis in the heart.
Cardiovasc Res. 58: 378-89 (2003)

Maas-Szabowski N., Fusenig N.E., Stark H.J.

Experimental models to analyze differentiation functions of cultured keratinocytes in vitro and in vivo.
Methods Mol Biol. 289: 47-60 (2005)

Maas-Szabowski N., Szabowski A., Stark H.J., Andrecht S., Kolbus A., Schropp-Kistner M., Angel P., Fusenig N.E.

Organotypic cocultures with genetically modified mouse fibroblasts as a tool to dissect molecular mechanisms regulating keratinocyte growth and differentiation.
J Invest Dermatol 116: 816-820 (2001)

Madri J.A., Williams S.K.

Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components.
J Cell Biol. 97: 153-65 (1983)

Maierl J., Mülling CH.

Funktionelle Anatomie.
In: Erkrankungen der Klauen und Zehen des Rindes. (Eds.: Fiedler A., Maierl J., Nuss K.)
Schattauer Verlag, Stuttgart (2004)

Man X.Y., Yang X.H., Cai S.Q., Bu Z.Y., Zheng M.

Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on keratinocytes in psoriasis: regulated by calcium independent of VEGF.
J Cell Mol Med. 12: 649-60 (2008)

Martins-Green M., Li Q.J., Yao M.

A new generation organ culture arising from cross-talk between multiple primary human cell types.
Faseb J. 19: 222-4 (2005)

Meyer W.

Haut und Hautorgane.
In: Wissdorf H., Gerhards H., Huskamp B. und Deegen E. (Hrsg.): Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes. 3. Auflage. Schlütersche Verlagsanstalt, Hannover (2009)

Meyer G.T., Matthias L.J., Noack L., Vadas M.A., Gamble J.R.

Lumen formation during angiogenesis in vitro involves phagocytic activity, formation and secretion of vacuoles, cell death, and capillary tube remodeling by different populations of endothelial cells.
Anat Rec. 249: 327-40 (1997)

Merker H.J.

Morphology of the basement membrane. Review.
Microsc Res Tech. 28: 95-124 (1994)

Micali G., Lacarrubba F., Musumeci M.L., Massimino D., Nasca M.R.

Cutaneous vascular patterns in psoriasis.

Int J Dermatol. 49: 249-56 (2010)

Modlich U., Kaup F.J., Augustin H.G.

Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary: blood vessel regression during luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion.

Lab Invest. 74: 771-80 (1996)

Moll R.

Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors.

Veroff Pathol. 142: 1-197 (1993)

Moll R.

Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors.

Subcell Biochem. 31: 205-62 (1998)

Moore R.M., Eades S.C., Stokes A.M.

Evidence for vascular and enzymatic events in the pathophysiology of acute laminitis: which pathway is responsible for initiation of this process in horse?

Equine Vet J. 36: 204-9 (2004)

Mülling CH.

Struktur, Verhornung und Hornqualität in Ballen, Sohle und weißer Linie der Rinderklaue und ihre Bedeutung für Klauenerkrankungen. Dissertation.

Fachbereich Veterinärmedizin. Freie Universität Berlin (1993)

Mülling CH.

Three-dimensional appearance of bovine epidermal keratinocytes in different stages of differentiation revealed by cell maceration and scanning electron microscopic investigation.

Folia Morphol (Warsz). 59: 239-46 (2000)

Mülling CH.

Funktionelle Anatomie der Rinderklaue.

In: Dirksen G., Gründer H.D., Stöber M. (Hrsg.): Innere Medizin und Chirurgie des Rindes,

4. Auflage, Verlag Blackwell, Berlin, Wien, 914-921 (2002)

Mülling CH., Bragulla H., Budras K.D., Reese S.

Strukturelle Faktoren mit Einfluss auf die Hornqualität und Prädilektionsstellen für Erkrankungen an der Fussungsfläche der Rinderklaue.

Schweiz Arch Tierheilk 136: 49-57 (1994)

Mülling CH., Budras K.D.

Der Interzellularkitt (Membrane Coating Material, MCM) in der Epidermis der Rinderklaue.

Wien. Tierärztl. Mschr. 85: 216-223 (1998)

Mülling CH., Budras K.D.

Klaue (Ungula)

In: Budras, K.-D., A. Wünsche: Atlas der Anatomie des Rindes, Kap 2 Hannoversche, Schlütersche, 1 Auflage, 2002, 26 (2002a)

Mülling CH., Budras K.D.

Zehenendorgan, Klaue

in: Budras K.D., Wünsche A.: Anatomie-Atlas Rind, Verlag Schlütersche, Hannover, 24-25 (2002b)

Mülling CH., Lischer C.

Neue Aspekte zur Ätiologie und Pathogenese der Klauenrehe.

Vet-Med Report, Sonderausgabe V4: 12-13 (2002)

Nash L.G., Phillips M.N., Nicholson H., Barnett R., Zhang M.

Skin ligaments: regional distribution and variation in morphology.

Clin Anat. 17: 287-93 (2004)

Nebel U.

In vitro Modelle proliferierender und differenzierender epidermaler Keratinozyten der Rinderklaue. Dissertation.

Fachbereich Veterinärmedizin. Freie Universität Berlin (2005)

Nuss K., Steiner A.

Untersuchung des Bewegungsapparates bei Erkrankungen im Zehenbereich.

In: A. Fiedler, J. Maierl, K. Nuss (Hrsg.), Erkrankungen der Klauen und Zehen des Rindes, S. 63-76. Stuttgart: Schattauer Verlag (2004)

Ossent P., Lischer C.

Theories on the pathogenesis of bovine laminitis.

Proc. VIIIth Int. Symp. On Disorders of the Ruminant Digit and International Conference on Laminitis, Banff, Canada, 207-209 (1994)

Paku S.

Current concepts of tumor-induced angiogenesis.

Pathol Oncol Res. 4: 62-75 (1998)

Patan S.

Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling.

J Neurooncol. 50: 1-15 (2000)

Patan S.

Vasculogenesis and angiogenesis. Review.

Cancer Treat Res. 117: 3-32 (2004)

Peters K., Schmidt H., Unger R.E., Otto M., Kamp G., Kirkpatrick C.J.

Software-supported image quantification of angiogenesis in an in vitro culture system: application to studies of biocompatibility.

Biomaterials. 23: 3413-9 (2002)

Plendl J.

Das Gefäßendothel: organ- und entwicklungsphasenspezifische Heterogenität im in vitro Modell. Habilitationsschrift.

Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (1997)

Plendl J., Neumüller C., Sinowatz F.

Differences of microvascular endothelium in the bovine corpus luteum of pregnancy and the corpus luteum of the estrous cycle.
Biol Cell. 87: 179-88 (1996)

Plendl J., Sinowatz F., Auerbach R.

The heterogeneity of the vascular endothelium. Review.
Anat Histol Embryol. 21: 256-62 (1992)

Ponec M.

Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing. Review.
Adv Drug Deliv Rev. 54 Suppl 1: 19-30 (2002)

Ponec M., Boelsma E., Gibbs S., Mommaas M.

Characterization of reconstructed skin models.
Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 15 Suppl 1: 4-17 (2002)

Ponec M., El Ghalbzouri A., Dijkman R., Kempenaar J., van der Pluijm G., Koolwijk P.

Endothelial network formed with human dermal microvascular endothelial cells in autologous multicellular skin substitutes.
Angiogenesis. 7: 295-305 (2004)

Poole T.J., Finkelstein E.B., Cox C.M.

The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development.
Dev Dyn. 220: 1-17 (2001)

Pouliot R., Robert M., Germain L., Noël-Hudson M., Lindenbaum A., Juhasz J., Auger F.A., Wepierre J.

Influence of endothelial cells on structure, biochemistry and functionality of epidermis reconstructed on synthetic porous membrane.
Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 11: 193-206 (1998)

Poumay Y., Leclercq-Smekens M.

In Vitro models of epidermal differentiation. Review.
Folia Med (Plovdiv). 40: 5-12 (1998)

Pries A.R., Kuebler W.M.

Normal endothelium.
Handb Exp Pharmacol. 176 Pt 1: 1-40 (2006)

Pries A.R., Secomb T.W., Gaehtgens P.

The endothelial surface layer.
Pflugers Arch. 440: 653-66 (2000)

Räber M.

Das Ballenpolster beim Rind. Ein Beitrag zur funktionellen Anatomie der Klaue. Dissertation.
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Zürich (2000)

Räber M., Lischer C., Geyer H., Ossent P.

The bovine digital cushion—a descriptive anatomical study.
Vet J. 167: 258-64 (2004)

Reichl S., Bednarz J., Müller-Goymann C.C.

Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies.
Br J Ophthalmol. 88: 560-5 (2004)

Reichl S., Müller-Goymann C.C.

Development of an organotypic corneal construction as an in vitro model for permeability studies.
Ophthalmologe. 98: 853-8 (2001)

Reichl S., Müller-Goymann C.C.

The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride.
Int J Pharm. 250: 191-201 (2003)

Reynolds L.P., Borowicz P.P., Vonnahme K.A., Johnson M.L., Grazul-Bilska A.T., Wallace J.M., Caton J.S., Redmer D.A.

Animal models of placental angiogenesis. Review.
Placenta. 26: 689-708 (2005)

Rheinwald J.G., Green H.

Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma.
Cell 6, 317-330 (1975)

Ribatti D.

The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review.
Leuk Res. 31: 439-44 (2007)

Ribatti D., Vacca A., Nico B., Ria R., Dammacco F.

Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathways. Review.
Curr Mol Med. 2: 537-43 (2002)

Ribatti D., Vacca A., Presta M.

The discovery of angiogenic factors: a historical review. Review.
Gen Pharmacol. 35: 227-31 (2000)

Ricken A.M., Spänzel-Borowski K., Saxer M., Huber P.R.

Cytokeratin expression in bovine corpora lutea.
Histochem Cell Biol. 103: 345-54 (1995)

Risau W.

Mechanisms of angiogenesis. Review.
Nature. 386: 671-4 (1997)

Rochon M.H., Fradette J., Fortin V., Tomasetig F., Roberge C.J., Baker K., Berthod F., Auger F.A., Germain L.

Normal human epithelial cells regulate the size and morphology of tissue-engineered capillaries. *Tissue Eng Part.16*: 1457-68 (2010)

Rossiter H., Barresi C., Pammer J., Rendl M., Haigh J., Wagner E.F., Tschachler E.

Loss of vascular endothelial growth factor activity in murine epidermal keratinocytes delays wound healing and inhibits tumor formation.

Cancer Res. 64: 3508-16 (2004)

Sacewicz I., Wiktorska M., Wysocki T., Niewiarowska J.

Mechanisms of cancer angiogenesis.

Postepy Hig Med Dosw (Online). 63: 159-68 (2009)

Sarin H.

Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability.

J Angiogenes Res. 2: 14 (2010)

Schatteman G.C., Awad O.

Hemangioblasts, angioblasts and adult endothelial cell progenitors.

Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 276: 13-21 (2004)

Scherberich A., Beretz A. Culture of vascular cells in tridimensional (3-D) collagen: a methodological review.

Therapie. 55: 35-41 (2000)

Schechner J.S., Crane S.K., Wang F., Szeglin A.M., Tellides G., Lorber M.I., Bothwell A.L., Pober J.S.

Engraftment of a vascularized human skin equivalent.

Faseb J. 17: 2250-6 (2003)

Schuster S.

Zelluläre und molekulare Mechanismen der in vitro-Angiogenese: Lichtmikroskopische, elektronenmikroskopische, immunhistochemische und molekular-biologische Untersuchungen. Dissertation.

Fachbereich Veterinärmedizin. Freie Universität Berlin (2002)

Schwartz M.A.

Integrin signaling revisited.

Trends Cell Biol. 11: 466-470 (2001)

Simon J.M.

Hypoxia and angiogenesis.

Bull Cancer. 94 Spec No: 160-5 (2007)

Singer A.J., Clark R.A.

Cutaneous wound healing.

N Engl J Med. 341: 738-46 (1999)

Spanel-Borowski K., Fenyves A.

The heteromorphology of cultured microvascular endothelial cells.
Arzneimittelforschung. 44: 385-91 (1994)

Spanel-Borowski K., Ricken A.M., Saxer M., Huber P.R.

Long-term co-culture of bovine granulosa cells with microvascular endothelial cells: effect on cell growth and cell death.
Mol Cell Endocrinol. 104: 11-9. (1994)

Stark H.J., Szabowski A., Fusenig N.E., Mass-Szabowski N.

Organotypic cocultures as skin equivalents: a complex and sophisticated in vitro system.
Biological Procedures Online 6, 55-60 (2004)

Stasiak P.C., Purkis P.E., Leigh I.M., Lane E.B.

Keratin 19: predicted amino acid sequence and broad tissue distribution suggest it evolved from keratinocyte keratins.
J Invest Dermatol. 92: 707-16 (1989)

Stefanec T.

Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease?
Review.
Chest. 117: 841-54 (2000)

Sternlicht M.D., Werb Z.

How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.
Annu Rev Cell Dev Biol. 17: 463-516 (2001)

Stratman A.N., Malotte K.M., Mahan R.D., Davis M.J., Davis G.E.

Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation.
Blood. 114: 5091-101 (2009)

Sun T.

Altered phenotype of cultured urothelial and other stratified epithelial cells: implications for wound healing. Review.
Am J Physiol Renal Physiol. 291: F9-21 (2006)

Sun Q., Chen R.R., Shen Y., Mooney D.J., Rajagopalan S., Grossman P.M.

Sustained vascular endothelial growth factor delivery enhances angiogenesis and perfusion in ischemic hind limb.
Pharm Res. 22: 1110-6 (2005)

Sun T., Eichner T.R.

Keratin classes: molecular markers for different types of epithelial differentiation.
J Invest Dermatol 81 (1 Suppl), 109-115 (1983)

Supp D.M., Bell S.M., Morgan J.R., Boyce S.T.

Genetic modification of cultured skin substitutes by transduction of human keratinocytes and fibroblasts with platelet-derived growth factor-A.

Wound Repair Regen. 8: 26-35 (2000a)

Supp D.M., Boyce S.T.

Overexpression of vascular endothelial growth factor accelerates early vascularization and improves healing of genetically modified cultured skin substitutes.

J Burn Care Rehabil. 23: 10-20 (2002)

Supp D.M., Supp A.P., Bell S.M., Boyce S.T.

Enhanced vascularization of cultured skin substitutes genetically modified to overexpress vascular endothelial growth factor.

J Invest Dermatol. 114: 5-13 (2000b)

Supp D.M., Wilson-Landy K., Boyce S.T.

Human dermal microvascular endothelial cells form vascular analogs in cultured skin substitutes after grafting to athymic mice.

Faseb J. 16: 797-804 (2002)

Szpaderska A.M., Walsh C.G., Steinberg M.J., DiPietro L.A.

Distinct patterns of angiogenesis in oral and skin wounds.

J Dent Res. 84: 309-14 (2005)

Tamanini C., De Ambrogi M.

Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum.

Reprod Domest Anim. 39: 206-16 (2004)

Tang D.G., Conti C.J.

Endothelial cell development, vasculogenesis, angiogenesis, and tumor neovascularization: an update. Review.

Semin Thromb Hemost. 30: 109-17 (2004)

Tegtmeyer S., Reichl S., Müller-Goymann C.C.

Cultivation and characterization of a bovine in vitro model of the cornea.

Pharmazie. 59: 464-71 (2004)

Tertemiz F., Kayisli U.A., Arici A., Demir R.

Apoptosis contributes to vascular lumen formation and vascular branching in human placental vasculogenesis.

Biol Reprod. 72: 727-35 (2005)

Tilling T., Engelbertz C., Decker S., Korte D., Hüwel S., Galla H.J.

Expression and adhesive properties of basement membrane proteins in cerebral capillary endothelial cell cultures.

Cell Tissue Res. 310: 19-29 (2002)

Tomlinson D.J., Mülling CH., Fakler T.M.

Invited review: formation of keratins in the bovine claw: roles of hormones, minerals, and vitamins in functional claw integrity.
J Dairy Sci. 87: 797-809 (2004)

Tonello C., Vindigni V., Zavan B., Abatangelo S., Abatangelo G., Brun P., Cortivo R.

In vitro reconstruction of an endothelialized skin substitute provided with a microcapillary network using biopolymer scaffolds.
Faseb J. 19: 1546-8 (2005)

Tremblay P.L., Hudon V., Berthod F., Germain L., Auger F.A.

Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice.
Am J Transplant. 5: 1002-10 (2005)

Trompezinski S., Berthier-Vergnes O., Denis A., Schmitt D., Viac J.

Comparative expression of vascular endothelial growth factor family members, VEGF-B, -C and -D, by normal human keratinocytes and fibroblasts.
Exp Dermatol. 13: 98-105 (2004)

Tscheudschilsuren G., Aust G., Nieber K., Schilling N., Spanel-Borowski K.

Microvascular endothelial cells differ in basal and hypoxia-regulated expression of angiogenic factors and their receptors.
Microvasc Res. 63: 243-51 (2002)

Turchi L., Chassot A.A., Rezzonico R., Yeow K., Loubat A., Ferrua B., Lenegrata G., Ortonne J.P., Ponzio G.

Dynamic characterization of the molecular events during in vitro epidermal wound healing.
J Invest Dermatol. 119: 56-63 (2002)

Uitto J., Richard G., McGrath J.A.

Diseases of epidermal keratins and their linker proteins.
Exp Cell Res. 313: 1995-2009 (2007)

Van Hinsbergh V.W., Engelse M.A., Quax P.H.

Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 26: 716-28 (2006)

Van Hinsbergh V.W., Koolwijk P.

Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead.
Cardiovasc Res. 78: 203-12 (2008)

Velasco P., Lange-Asschenfeldt B.

Dermatological aspects of angiogenesis.
Br J Dermatol. 147: 841-52 (2002)

Vernon R.B., Gooden M.D.

New technologies in vitro for analysis of cell movement on or within collagen gels.
Matrix Biol. 21: 661-9 (2002)

Viac J., Palacio S., Schmitt D., Claudy A.

Expression of vascular endothelial growth factor in normal epidermis, epithelial tumors and cultured keratinocytes.
Arch Dermatol Res. 289: 158-63 (1997)

Watt F.M.

Proliferation and terminal differentiation of human keratinocytes in culture.
Biochem Soc Trans 16: 666-668 (1988)

Wehrhan F., Nkenke E., Melnychenko I., Amann K., Schlegel K.A., Goerlach C., Zimmermann W.H., Schultze-Mosgau S.

Skin repair using a porcine collagen I/III membrane—vascularization and epithelization properties.
Dermatol Surg. 36: 919-30 (2010)

Weninger W., Uthman A., Pammer J., Pichler A., Ballaun C., Lang I.M., Plettenberg A., Bankl H.C., Stürzl M., Tschachler E.

Vascular endothelial growth factor production in normal epidermis and in benign and malignant epithelial skin tumors.
Lab Invest. 75: 647-57 (1996)

Wilgus T.A., Matthies A.M., Radek K.A., Dovi J.V., Burns A.L., Shankar R., DiPietro L.A.

Novel function for vascular endothelial growth factor receptor-1 on epidermal keratinocytes.
Am J Pathol. 167: 1257-66 (2005)

Yancopoulos G.D., Davis S., Gale N.W., Rudge J.S., Wiegand S.J., Holash J.

Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Review.
Nature. 407: 242-8 (2000)

Yano K., Brown L.F., Detmar M.

Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis.
J Clin Invest. 107: 409-17 (2001)

Zacchi V., Soranzo C., Cortivo R., Radice M., Brun P., Abatangelo G.

In vitro engineering of human skin-like tissue.
J Biomed Mater Res. 40: 187-94 (1998)

Zietzschmann O.

Das Zehenendorgan der rezenten Säugetiere: Krallen, Nagel, Huf.
Schweiz Arch Tierheilkd 60: 241-272 (1918)

Zoellner H., Höfler M., Beckmann R., Hufnagl P., Vanyek E., Bielek E., Wojta J., Fabry A., Lockie S., Binder B.R.

Serum albumin is a specific inhibitor of apoptosis in human endothelial cells.

J Cell Sci. 109: 2571-80 (1996)

11 Publikationsverzeichnis

Sarcev A., Plendl J., Mülling Ch.

Etablierung eines direkten Kokultur-Modells zur Analyse der Interaktion zwischen mikrovaskulären Endothelzellen und epidermalen Keratinozyten. (Poster)

1. Berliner Doktorandensymposium. 2006

Sarcev A., Plendl J., Mülling Ch.

A direct co-culture challenge model of bovine microvascular endothelial cells and keratinocytes. (Poster)

26. Congress of the European Association of Veterinary Anatomists. Messina/Italy.

Abstr. in: Italian Journal of Anatomy and Embryology: Vol. 3, Suppl.1, S.82

Florenz: Mozzon Guintina S.p.A., Il Sedicesimo, 2006.

Sarcev A., Plendl J., Mülling Ch.

Etablierung eines direkten Kokultur-Modells zur Analyse der Interaktion zwischen mikrovaskulären Endothelzellen und epidermalen Keratinozyten. (Poster)

2. Berliner Doktorandensymposium. 2007

Sarcev A., Plendl J., Mülling Ch.

Etablierung eines direkten Kokultur-Modells zur Analyse der Interaktion zwischen mikrovaskulären Endothelzellen und epidermalen Keratinozyten. (Poster)

5. Berliner Doktorandensymposium. 2010

12 Danksagung

Frau Prof. Dr. Johanna Plendl danke ich für die freundliche Überlassung des Themas dieser Dissertation und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Insbesondere für die stets gewährte fachliche und professionelle Betreuung während der gesamten Dauer der Arbeit, bin ich sehr zu Dank verpflichtet.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Christoph Mülling für seine Unterstützung, fachliche Kompetenz und stets freundliche Hilfestellung beim wissenschaftlichen Arbeiten.

Bei Monika Sachleben bedanke ich mich sehr für ihre ausgezeichnete Arbeit bei der Herstellung und Bearbeitung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen und ihrem professionellen Rat bei technischen Fragen.

Danken möchte ich auch Edith Gröninger für die Unterweisung im Zellkulturlabor, ihre stete freundliche Hilfe und das gute Arbeitsklima.

Für die professionelle Einarbeitung und die Unterstützung bei der Durchführung der immunzytochemischen Untersuchungen und all ihre konstruktiven Vorschläge danke ich Ilona Küster-Krehahn.

Dr. Ruth Hirschberg danke ich besonders für das Korrekturlesen dieser Arbeit, ihre fachlichen Ratschläge und ihre beispiellose Hilfsbereitschaft.

Ebenso danke ich meinen Mitdoktoranden sowie allen Mitarbeitern des Instituts für die gute Zusammenarbeit.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für ihre unermüdliche, liebevolle und großzügige Unterstützung während des Studiums und vor allem während der Erstellung der Doktorarbeit.

Nicht zuletzt danke ich von ganzem Herzen meinem Freund Gil Holten für sein Verständnis, seine unerschöpfliche Geduld und stets motivierenden Worte.

Diese Arbeit wurde teilweise gefördert durch die Europäische Gemeinschaft unter dem Lamecow Project QLK5-CT-200200969. Die Autorin ist alleine verantwortlich und die Arbeit repräsentiert nicht notwendigerweise die Meinung der Europäischen Union.

13 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Berlin, 15.10.2010

Andjela Sarcev