

5.3. Tabellen

5.3.1 Tabellen Kapitel 2

Versuch	Versuchsnummer	Tiere (Anzahl)	Implantatmaterial	Anzahl	Liegezeit	LM-Schnitte frontal	LM-Schnitte sagittal
1993	V93-104I	93-1015 bis 93-1017L (3)	Poly-L-Lysin-OA	5	28d	20	0
	V93-104II	93-1017R bis 93-1019 (3)	HEMA-OA	5	28d	20	0
	V93-104III	93-1020 bis 93-1022 (3)	Indomethacin-OA	3(5)	28d	10	0
1994	V94-123	94-1108 bis 94-1109 (2)	Indomethacin-OA	4	28d	11	2
	V94-124	94-1110 bis 94-1111 (2)	HEMA-OA	4	28d	9	2
	V94-125	94-1112 bis 94-1114 (3)	Poly-L-Lysin-OA	5	28d	15	4
1998	V97-110	97-1055 bis 97-1060 (6)	Poly-L-Lysin-OA	10(11)	84d	16	4
	V98-101	98-1001 bis 98-1006 (6)	HEMA-OA	11	84d	20	4
	V98-102	98-1007 bis 98-1012 (6)	Indomethacin-OA	11	84d	20	4
	V98-103	98-1013 bis 98-1018 (6)	Poly-L-Lysin-OA	11	28d	20	4
	V98-104	98-1019 bis 98-1024 (6)	HEMA-OA	11	28d	20	4
	V98-106	98-1031 bis 98-1036 (6)	Indomethacin-OA	11	28d	20	4
	V98-105	98-1025 bis 98-1030 (6)	Indomethacin-OA	11	7d	20	4
	V98-107	98-1037 bis 98-1042 (6)	Poly-L-Lysin-OA	11	7d	20	4
	V98-108	98-1043 bis 98-1048 (6)	HEMA-OA	11	7d	20	4

Tabelle 2.3.1 Übersicht über die Versuche, Implantatmaterialien und Liegezeiten

Verfahrensschritt	Prozedur	Dauer
1	Immersionsfixation in Formaldehyd nach Lillie, pH 7,4 bei 4°C	4-7 Tage
2	Spülen in Leitungswasser bei Raumtemperatur	über Nacht
3	Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe: 70,80,90,96,100,100% bei Raumtemperatur	je 2x 3 Tage, d.h.nach 3 Tagen Lösungswechsel und weitere 3 Tage in frischer Lösung
4	Einlegen in Äther-Chloroform 1:1 bei Raumtemperatur	2x 3 Tage (wie oben)
5	Einlegen in Äther-Chloroform-Methylmetacrylat 1:1:1 bei Raumtemperatur	2x 3 Tage (wie oben)
6	Einlegen in Methylmetacrylat bei Raumtemperatur	1-7 Tage
7	Einlegen in MMA bei 4°C	2x 1-7 Tage (wie oben)
8	Polymerisierung des MMA in verschließbaren Glasröhrchen im Wasserbad bei 38°C	2-4 Tage
9	Weitere Aushärtung in den geöffneten Glasröhrchen bei Raumtemperatur	über Nacht
Tabelle 2.5.1 Aufarbeitung und Einbettung der LM-Proben		

Verfahrensschritt	Prozedur	Dauer
1	Einweichen in Sörensen-Phosphat-Puffer /Aqua destillata im Verhältnis 1:1 bei Raumtemperatur	5 min
2	Färben mit Giemsa/Sörensen-Phosphat-Puffer im Verhältnis 1:1 bei Raumtemperatur	40 min
3	Spülen mit Sörensen-Phosphat-Puffer /Aqua destillata im Verhältnis 1:1 bei Raumtemperatur	kurz
4	Aqua destillata	kurz
Tabelle 2.5.2 Färbung nach Giemsa		

Verfahrensschritt	Prozedur	Dauer
1	Einweichen in Aqua destillata bei Raumtemperatur	kurz
2	Inkubation mit Silbernitratlösung bei Raumtemperatur	10 min
3	Spülen mit Aqua destillata	3x je 5 min
4	Inkubation mit Soda Formol bei Raumtemperatur	3 min
5	Spülen mit fließendem Leitungswasser	10 min
6	Inkubation mit 5% Natriumthiosulfat bei Raumtemperatur	3 min
7	Spülen mit fließendem Leitungswasser	10 min
8	Färbung mit Paragonlösung bei 60°C / Fuchsin Lösung	15 min
9	Spülen mit Aqua destillata	kurz

Tabelle 2.5.3 Färbung nach von Kossa / Paragon oder Fuchsin

Verfahrensschritt	Prozedur	Dauer
1	Fixieren mit 4% Glutaraldehyd in 0,1M Cacodylatpuffer, pH 7,2 bei 4°C	2 Stunden
2	Spülen mit 0,1M Cacodylatpuffer, pH 7,2 bei 4°C	3x je 5-15 min
3	Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe mit 30,50,70,80,90,96 und 2x 100% bei Raumtemperatur	je 20-30 min
4	Infiltration mit Hexamethyldisilazane (HMDS)	2x je 60 min
5	Lufttrocknung	
6	Entgasung	

Tabelle 2.5.4 Aufarbeitung der REM - Proben

Verfahrensschritt	Prozedur	Dauer
1	Fixieren mit 4% Glutaraldehyd in 0,1M Cacodylatpuffer, pH 7,2 bei 4°C	2 Stunden
2	Spülen mit 0,1M Cacodylatpuffer, pH 7,2 bei 4°C	3x je 5-15 min
3	Fixieren mit 1% OsO ₄ in 0,1M Cacodylatpuffer bei 4°C	60-90 min
4	Spülen mit 0,1M Cacodylatpuffer, pH 7,2 bei 4°C	3x je 5-15 min
5	Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe: 70,80,90,96,100,100% bei Raumtemperatur	je 15-30 min
6	Infiltration mit Propylenoxid(PO) bei Raumtemperatur	2x je 15 min
7	Infiltration mit PO/Epon im Verhältnis 3:1 bei Raumtemperatur	30-60 min
8	Infiltration mit PO/Epon im Verhältnis 1:1 bei Raumtemperatur	30-60 min
9	Infiltration mit PO/Epon im Verhältnis 1:3 bei Raumtemperatur	über Nacht
10	Infiltration mit Epon	2x je 1-2 Stunden

Tabelle 2.5.5 Aufarbeitung und Einbettung der TEM-Proben

Name	Herkunft	Restriktionsenzym Anti-Sense	Transkriptionspromoter Anti-Sense	Restriktionsenzym Sense	Transkriptionspromoter Sense	Größe in kb	Hydrolysezeit
a1-Procollagen Plasmid Nr. 168	PD Dr. Herbst Inst. f. Pathologie Uni Münster, ehemals UKBF	Hind III	T 7	EcoR I	Sp 6	1,3	52 min
TGF β1 Plasmid Nr. 226	PD Dr. Herbst s.o.	EcoR I	Sp 6	Hind III	T 7	0,6	45 min
IL-1β	ATCC	EcoR I	Sp 6	Hind III	T 7	0,55	45 min
mOP	Dr. Neo, Japan	EcoR V	Sp 6	BamH I	T 7	1	52 min
bON	Dr. Neo, Japan	Hind III	T 7	BamH I	T 3	1,55	52 min

Tabelle 2.5.6 cDNA Fragmente zur Herstellung der ISH-Sonden

Verfahrensschritt	Prozedur	Dauer
1	10,0µl DEPC-H ₂ O 2,5µl Restriktionsenzym-Puffer 17,5µl Plasmid-DNA 1mg/ml 3,0µl Restriktionsenzym (Hind III, EcoRI oder anderes) in ein Eppendorf-Tube geben, vorsichtig mischen und kurz zentrifugieren	
2	Im Wasserbad bei 37°C inkubieren	24 h
4	Überprüfung der Linearisierung mittels Minigel	
5	1/10 Volumina (3,3µl) 3M Na-Acetat (pH 6,0) und 2 Volumina (72,6µl) 100% Ethanol (-20°C) hinzugeben	
6	dann Präzipitation bei -80°C	mind. 30 min / bis über Nacht
7	Zentrifugieren (+4°C, 13.000 rpm)	30 min
8	Überstand abgießen, Pellet überprüfen	
9	Hinzugabe von 750,0µl 70% Ethanol (-20°C)	
10	Zentrifugieren (+4°C, 13.000 rpm)	5-10 min
11	Überstand abgießen, Pellet überprüfen	
12	Trocknung an der Luft oder im Wärmeschrank	ca. 10 min
13	Resuspension mit 20,0µl DEPC-H ₂ O	
14	Lagerung bei -20°C	

Tabelle 2.5.7 Linearisierung der Plasmide

Verfahrensschritt	Prozedur	Dauer
1	15,0µl DEPC-H ₂ O 6,0µl 5x Transkriptions-Puffer 1,5µl RNasin (RNase-Inhibitor) 1,0µl Digoxigenin-UTP 3,0µl NTP (ATP + GTP + CTP + Depc-H ₂ O) 1,0µl DNA (linearisiertes Plasmid) 1mg/ml in ein Eppendorf-Tube geben, vorsichtig mischen (kurz vortexen)	
2	2,5µl RNA-Polymerase (z.B. T7, SP6) hinzufügen	
3	Im Wasserbad bei 37°C inkubieren	2 h
4	0,5µl RNA-Polymerase (z.B. T7, SP6) hinzufügen	
5	Im Wasserbad bei 37°C inkubieren	0,5-1 h
6	5,0µl Hefe-t-RNA (Yeast RNA) 0,5µl RNasin (RNase-Inhibitor) 0,5µl DNase I (entfernt Rest-DNA)	
7	Im Wasserbad bei 37°C inkubieren	8 min
8	6,0µl 3M Na-Acetat (pH 6,0) hinzufügen und 250µl 100% Ethanol (-20°C)	
9	Präzipitation bei -80°C	30 min / bis über Nacht
10	Zentrifugieren (+4°C, 13.000 rpm)	30 min
11	Überstand abgießen, Pellet überprüfen	
12	Hinzugabe von 750,0µl 70% Ethanol (-20°C)	
13	Zentrifugieren (+4°C, 13.000 rpm)	5-10 min
14	Überstand abgießen, Pellet überprüfen	
15	Trocknung an der Luft oder im Wärmeschrank	ca. 10 min
16	Resuspension mit 20,0µl DEPC-H ₂ O	
17	Lagerung bis zur Durchführung der alkalischen Hydrolyse bei -20°C	

Tabelle 2.5.8 Transkription mit Digoxigenin markiertem UTP

Verfahrensschritt	Prozedur	Dauer
1	50µl Transkriptionsprodukt und 50µl Hydrolysepuffer (= HP) in ein Eppendorf-Tube geben	
2	Im Wasserbad bei 60°C inkubieren, bei α1-Procollagen	52 min
3	100µl Stop-Puffer (= SP) 20µl 3M Na-Acetat (pH 6,0) und 440µl 100% Ethanol (-20°C) hinzugeben	
4	dann Präzipitation bei -80°C	mind. 30 min/ bis über Nacht
5	Zentrifugieren (+4°C, 13.000 rpm)	30 min
6	Überstand abgießen, Pellet überprüfen	
7	Hinzugabe von 750,0µl 70% Ethanol (-20°C)	
8	Zentrifugieren (+4°C, 13.000 rpm)	5-10 min
9	Überstand abgießen, Pellet überprüfen	
10	Trocknung an der Luft oder im Speed-Vac	ca. 10 min
11	Resuspension mit 30,0µl DEPC-H ₂ O	
12	Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei -80°C	
Tabelle 2.5.9 Alkalische Hydrolyse		

Verfahrensschritt	Prozedur	Dauer	Erklärung
1	Einbringen der Objektträger mit Schnitt in eine Glasküvette		
2	Einweichen in Xylol	30 min	Entparaffinisieren
3	Xylol Lösungswechsel	20 min	
4	Einweichen in Aceton	10 min	
5	100% Ethanol	2 min	
6	90% Ethanol	2 min	Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe
7	70% Ethanol	2 min	
8	30% Ethanol	2 min	
9	1x PBS	10 min	Waschen
10	0,2N HCl	20 min	Denaturierung basischer Proteine /Inaktivierung der alkalischen Phosphatase
11	1x PBS	2 min	Waschen
12	0,375 mg/ml Pronase/1x PBS (3 Teile : 100 ml)	10 min	Auflösung durch Fixierung entstandener unerwünschter Vernetzungen von Zellstrukturen
13	0,1 M Glycin/1x PBS	30 sec	Inaktivierung der Pronase
14	1x PBS	1 min	Waschen
15	1x PBS Lösungswechsel	1 min	
16	4% PFA/1x PBS (+4°C)	20 min	Refixierung
17	1x PBS	3 min	Waschen
18	0,25% Essigsäureanhydrid/0,1 M Triethanolamin (250 µl : 100 ml)	10 min	Acetylierung
19	1x PBS	5 min	Waschen
20	30% Ethanol	2 min	Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe
21	70% Ethanol	2 min	
22	90% Ethanol	2 min	
23	100% Ethanol	2 min	
24	Trocknung der Objektträger	0,5-2 h	
	In Eppendorf-Tube Hybridisierungslsg. vorbereiten:		
	nicht-radioaktive ISH	Proben-Mix	radioaktive ISH
25	3,125µl Formamid		3,125µl Formamid
26	0,4µl Digoxigenin-RNA-Sonde		300.000cpm 35S-RNA-Sonde (ca.0,4µl)
27	2,725µl DEPC-H ₂ O		2,725µl DEPC-H ₂ O
28	zusammenfügen und für 30 sec. im Wasserbad bei 80°C erhitzen, dann		
29	18,75µl Hybridierungs-Mix hinzugeben, niedrig vortexen		
30	25µl Hybridisierungslsg. blasenfrei auf jeden Schnitt aufbringen und mit Parafilm abdecken		
31	Objektträger in Plastikschaale geben, 50 ml 50% Formamid dazu geben und in PVC-Folie einschweißen		
32	Inkubation bei + 52°C im Wärmeschrank	mind. 16 h	Hybridisierung

Tab. 2.5.10 In-Situ-Hybridisierung 1. Tag (RNase-frei)

Verfahrensschritt	Prozedur	Dauer	Erklärung
1	Parafilm von den Objektträgern entfernen		
2	50% Formamid/2x SSC (+ 52°C)	30 min	Waschen
3	1x TES, pH 7,5 (+ 37°C)	10 min	
4	RNase/1x TES (+ 37°C) [x ml 1xTES + 2x µl RNase]	30 min	Entfernung unspezifisch an das Gewebe gebundener Sonde
5	1x TES, pH 7,5 (+ 37°C)	30 sec	Waschen
6	2x SSC (+ 52°C)	5 min	Waschen
7	2x SSC (+ 52°C) Lösungswechsel	5 min	
8	0,2x SSC (+ 52°C)	5 min	
10	1x TBS	5 sec	Waschen
11	1x TBS Lösungswechsel	20 sec	
12	1x TBS Lösungswechsel	20 sec	
13	Antikörperlösung ansetzen (1ml = 990µl RPMI, pH 7,5 + 10µl Anti-Dig-Fab-Fragment)		Bindung von mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörpern an Digoxigenin
14	Auf jeden Schnitt mindestens 100µl Antikörperlsg. aufbringen		
15	Inkubation im Dunkeln und bei RT (grauer Kasten mit Deckel)	30 min	
16	1x TBS	20 sec	Auswaschen un spez. gebund. Antikörper
17	1x TBS Lösungswechsel	20 sec	
18	Entwickler ansetzen pro 100ml:		
19	A.) 70ml 1x E-Puffer		
20	A.) 25ml Propandiol		
21	A.) 40mg Levamisol		
22	B.) 50mg Na-AS-Bi-P ₂₅		
23	B.) 0,6ml Dimethylformamid (DMF)		
24	C.) 20mg NaNO ₃		
25	C.) 0,5ml H ₂ O		
26	C.) 0,2ml Neufuchsin		
27	Lsg. C in Lsg. A geben, mit Rührer gut vermischen, dann Lsg. B hinzufügen und pH mit HCl auf 8,8 einstellen, sofort verwenden		
28	Entwicklung auf dem Schüttler	30 min	Rote Farbreaktion
29	Waschen in deionisiertem Wasser	2 min	Waschen
30	Kernfärbung mit Meyers Hämalaun	10 sec	Gegenfärbung
31	Fließendes Leitungswasser	3-5 min	Bläuen
32	Eindeckeln mit erwärmter (45°C) Kaisers Glyceringelantine, Aushärtung bei Raumtemperatur abwarten		

Tab. 2.5.11 Nichtradioaktive ISH 2. Tag (nicht RNase-frei)

Verfahrensschritt	Prozedur	Dauer	Erklärung
1	Parafilm von den Objektträgern entfernen		
2	50% Formamid; 1/10"10xSalze"; 10mM DTT; 1x Denhardt's (+ 54°C)	30 min	Waschen
3	50% Formamid; 1/10"10xSalze"; 10mM DTT; 1x Denhardt's / Lösungswechsel (+ 54°C)	4,5 h	
4	1x TES, pH 7,5 (+ 37°C)	2x 10 min	
5	RNase/1x TES (+ 37°C) [x ml 1xTES + 2x µl RNase]	30 min	Entfernung un spez. an Gewebe gebundener Sonde
6	1x TES, pH 7,5 (+ 37°C)	2x 15 min	Waschen
7	2x SSC (+ 52°C) / Lösungswechsel	2x 10 min	
8	0,1x SSC (+ 52°C) / Lösungswechsel	2x 10 min	
9	30% Ethanol	2 min	Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe
10	70% Ethanol	2 min	
11	90% Ethanol	2 min	
12	100% Ethanol	2 min	
13	Trocknung der Objektträger	2 h	
14	Autoradiographie: Verfahrensschritte bis zur Entwicklung/Fixierung in absoluter Dunkelheit		
15	G-5 Fotoemulsion (Ilford) 43°C	10 ml	
16	0,6M Ammoniumacetat 43°C	10 ml	
17	mischen, bei 43°C ruhen lassen	15 min	
18	Objektträger darin blasenfrei dippen	je ca. 2 sec	
19	Überschuß auf Zellstoff abtropfen lassen		
20	Trocknung senkrecht im Ständer	2 h	
21	Einsortieren in lichtdichte Plastikboxen mit Kalziumchlorid als Exsikkator, lichtdicht mit Aluminiumfolie umwickeln, bei 4°C lagern.		
22	Nach Ablauf der gestaffelten autoradiographischen Expositionszeiten (je nach Sonde, Fotoemulsion, etc.) Entnahme aus dem Kühlschrank		
23	Angleichung an Raumtemperatur	30 min	
24	Entwicklung in Dunkelkammer		
25	Entwicklerlösung Kodak D 19/Aqua dest. 1:1(v:v)	3 min	alle 30s bewegen
26	Essigsäure 1% (mit Aqua dest. verdünnt)	1 min	
27	Kodak Fixierer 3000 Lösung A/Aqua dest. (1:4(v:v))	10 min	
28	Spülen in fließendem Leitungswasser	30 min	
29	Gegenfärbung mit Hämalaun	1 min	
30	Fließendes Leitungswasser	2 min	Bläuen
31	Gegenfärbung mit Eosin	5 sec	
32	30% Ethanol	30 sec	Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe
33	70% Ethanol	30 sec	
34	90% Ethanol	30 sec	
35	100% Ethanol	1 min	
36	Xylol	1 min	
37	aus dem Xylol direkt mit einem Tropfen Corbit-Balsam eindeckeln		

Tab. 2.5.12 Radioaktive ISH 2. Tag mit Autoradiographie/Entwicklung

Reagenz	Inhaltsstoffe	Menge
Formalin nach Lillie	Formaldehydkonzentrat (Merck® 104002) Aqua destillata	100ml 400ml
Methylmetacrylat	Merck® 800590	
MMA	Methylmetacrylat Phthalsäuredibutylester (Merck® 800919) alpha-alpha-azo-iso-Butyronitril (Merck® 12431)	900ml 90ml 15g
Silbernitratlösung 5%	Silbernitrat (Merck® 1512) Aqua destillata	5g 100ml
Soda Formol	Natrium Carbonat (Merck® 6392) Aqua destillata Formaldehydkonzentrat (Merck® 104002)	5g 75ml 25ml
5% Na-Thiosulfat	Natrium-thiosulfat-pentahydrat (Merck® 6516) Aqua destillata	5ml 95ml
Paragon-Lösung	Toluidin-Blau (Merck® 1273) basisches Fuchsin (Merck® 15973) 30% Ethanol (wäßrig)	0,8g 0,2g 100ml
Fuchsin-Lösung	Hausmarke	
Giemsa-Lösung	Giemsa-Lösung (Merck® 9204)	
Cacodylatpuffer 0,2M, pH 7,2	Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat (Merck® 820670) Aqua destillata	21,4g lösen, pH einstellen, auf 500ml auffüllen
Cacodylatpuffer 0,1M, pH 7,2	Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat (Merck® 820670) Aqua destillata	21,4g lösen, pH einstellen, auf 1000ml auffüllen
Glutaraldehyd-Lösung 4%	Glutaraldehyd 25% (Sigma® G 5882) Aqua destillata Cacodylatpuffer 0,2M	16ml 34ml 50ml
HMDS	Hexamethyldisilazane (Sigma® H 4875)	
Osmiumtetroxid (OsO ₄) 1%	Osmiumtetroxid (Sigma® 05500) Aqua destillata Cacodylatpuffer 0,1M, pH 7,2	1g 24ml 72ml
Propylenoxid	Propylenoxid (Merck® 12429)	
Epon-Stammlösung I	Glycid Ether 100 (Serva® 21045) Dodecenybersteinsäureanhydrid (Serva® 20755)	62ml 100ml
Epon-Stammlösung II	Glycid Ether 100 (Serva® 21045) Methylnadicanhydrid (Serva® 29452)	100ml 89ml
Epon	Epon-Stammlösung I Eponstammlösung II DMP-30 (Serva® 36975)	60ml 40ml 1,5ml
Merck®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	
Serva®	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	
Sigma®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	

Tabelle 2.5.13 Verwendete Reagenzien zur Aufarbeitung für Licht-/Elektronenmikroskopie

Reagenz	Inhaltsstoffe	Menge
Aqua bidest	Hausmarke	
Ethanol 100%	DAB 9 Hausmarke	
Ethanol 90%, 70% und 30% wurden mit DEPC-Wasser angesetzt		
Diethylpyroxycarbonat (DEPC)	SIGMA [®] D-5758	
DEPC-Wasser	Aqua destillata DEPC (Sigma [®] D 5758) danach bei 130°C	500ml 500µl autoclavieren
Restriktionsenzyme und entsprechende Puffer (EcoRI, HindIII, BamH1) GIBCO-BRL [®]		
3M Natriumacetat pH 6,0	Natriumacetat (Merck [®])	24,61g
	Aqua bidest mit Eisessig (konz. Essigsäure) pH 6,0 einstellen	ad 100ml ca. 750µl
	DEPC hinzufügen und autoclavieren	0,1ml
1x TAE-Puffer pH 7,5	TRISMA Base (Sigma [®] T-1503)	2,8g
	0,5 M EDTA (Sigma [®]) Essigsäure Aqua deionisiert	1ml 500µl ad 500ml
Agarose-Minigel	Agarose (GIBCO-BRL [®])	1g
	in 1x TAE-Puffer in Mikrowelle 600W 2 min. erhitzen	100ml
	Ethidiumbromid-Lösung 10mg/ml (Serva [®]) nach Abkühlung auf 40°C hinzufügen	2µl
³⁵ S-UTP	37MBq (New England Nuclear, DuPont NEN, NEG 039 H)	
Digoxigenin-UTP	Boehringer [®] 1209256	
RNA-Polymerasen	T3, T7, Sp6 (GIBCO-BRL [®])	
RNAasin	rekombinanter plazentarer Ribonuclease Inhibitor (Promega [®])	
0,1M DTT	Dithiothreitol (DTT) BIOMOL [®] 04010	154mg
	DEPC-Wasser	ad 10ml
3x NTP 10mM	rATP (Pharmacia [®] 27-2056-01) 100mM Stammlösung	1µl
	CTP (Pharmacia [®] 27-2066-01) 100mM Stammlösung	1µl
	GTP (Pharmacia [®] 27-2076-01) 100mM Stammlösung	1µl
	DEPC-Wasser	7µl
Hefe-tRNA	GIBCO-BRL [®] 15401-029	
DNase I	RNase frei, (25mg/µl) RQ1 (Promega [®] M6102)	
Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol "Ultrapure"	GIBCO-BRL [®] 155933-023 UA	
1M Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃ (Merck [®] 1.06329.0500E)	0,84g
	DEPC-Wasser, bei -20°C lagern in 1ml Aliquots	10ml
1M Natriumcarbonat	Na ₂ CO ₃ (Merck [®] 1.06392.0500)	1,06g
	DEPC-Wasser	10ml
	pH 10,2 mit 1M NaHCO ₃ einstellen, bei -20°C lagern	ca. 3-4ml
Hydrolyse-Puffer (80mM NaHCO ₃ /120mM Na ₂ CO ₃ / 10mM DTT)	1M NaHCO ₃	80µl
	1M Na ₂ CO ₃	120µl
	0,1M DTT	100µl
	DEPC-Wasser, bei -20°C lagern in 1ml Aliquots	700µl
Stopp-Puffer	3M Natriumacetat	66µl
	Essigsäure 100%	10µl
	0,1M DTT	100µl
	DEPC-Wasser, bei -20°C lagern in 1ml Aliquots	824µl

Tabelle 2.5.14.1 Reagenzien für die Herstellung der cRNA-Sonden

Reagenz	Inhaltsstoffe	Menge
EDTA 10%, pH 7,4	Ethylendiamintetraessigsäure (Serva® 11278) 1x PBS	50g ad 500ml
APES 2% in Ethanol	Aminopropyltriethoxysilan (Sigma®) Ethanol 100%	2ml 98ml
APES/Glutaraldehyd aktivierte Glasobjekträger	2% APES in Ethanol / DEPC-Wasser (1:1, v:v)	3h
	Waschen in Ethanol 100%	3x 1 min
	bei 52°C trocknen	über Nacht
	5% Glutaraldehyd in DEPC-Wasser	6h
	Waschen in DEPC-Wasser	3x 15 min
	bei 52°C trocknen	ca. 2 Tage
	staubfrei lagern. Mengenrelation: pro gefüllter Küvette (ca. 12-15 OT)	ca. 100ml
Xylol	Hausmarke	
Aceton	Hausmarke	
PBS 10x (Phosphate buffered saline), RNase frei	NaCl (Merck® 104002)	38g
	NaH ₂ PO ₄ (Merck® 106370)	6,22g
	Na ₂ HPO ₄ (Merck® 106587)	3,8g
	DEPC (Sigma® D 5758)	500µl
	Aqua destillata	500ml
	danach	autoklavieren
PBS 1x, RNase-frei pH 7,2	10x PBS	50ml
	DEPC-Wasser	450ml
	danach pH mit 1N NaOH auf 7,2 einstellen	ca. 15-17ml
Paraformaldehyd 4% in PBS	Paraformaldehyd (Merck® 104005) 1x PBS RNase-frei	40g 1000ml
	lichtgeschützt bei ca. 90°C Rühren bis Lösung klar, nach Abkühlen pH mit 1N HCL auf 7,0 einstellen; lichtgeschützt bei 4°C lagern	
HCL-Lösung 0,2N	1 N HCL-Lösung (Merck® 1.09057.1006)	100ml
	DEPC-Wasser	400ml
Pronase	Pronase (Boehringer® 165921) DEPC-Wasser	125mg ad 10ml
	4h bei 37°C Vorverdauen zur Inaktivierung kontaminierender Enzyme (RNasen)	
	in 1000µl Aliquots (12,5mg/ml), entspricht 1 Teil, bei -80° lagern	
Glycin 1M/1x PBS pH 7,4	Glycin (Serva® 23390)	37,5g
	1x PBS auffüllen auf DEPC	500ml 0,5ml
	autoclavieren und pH mit NaOH auf 7,4 einstellen, bei 4°C lagern	
Glycin 0,1M/1x PBS pH 7,4	Glycin 1M/1x PBS	50ml
	1x PBS	450ml
	danach pH mit NaOH auf 7,4 einstellen, bei 4°C lagern	
Triethanolamin 0,1M pH 8,5	Triethanolamin Base (Sigma® T-1377)	6,65ml
	DEPC-Wasser	450ml
	pH 8,0 mit 1N HCL einstellen, mit DEPC-Wasser auf 500ml auffüllen	
Triethanolamin 0,1M/ Essigsäureanhydrid 0,25%	0,1M Triethanolamin	100ml
	Essigsäureanhydrid (Merck® 100041), unmittelbar vor Gebrauch hinzufügen	250µl

Tabelle 2.5.14.2 Reagenzien zur Vorbereitung der Paraffinschnitte für die Hybridisierung

Reagenz	Inhaltsstoffe	Menge
Tris-HCL 1M	TRISMA Hydrochloride (Sigma® T-3253) DEPC-Wasser	79g ad 500ml
Tris-Base 1M	TRISMA Base (Sigma® T-1503) DEPC-Wasser	60,7g ad 500ml
Tris-Puffer 1M pH 7,6	1M Tris-HCL 1M Tris-Base	Mischen bis pH 7,6 erreicht.
NaCl 5M	NaCl (Merck® 104002) DEPC Aqua bidest über Nacht inkubieren, dann autoklavieren	146g 500µl ad 500ml
EDTA 0,5M pH 8,0	Ethylendiamintetraessigsäure (Serva® 11278) DEPC Aqua bidest Die Lösung wird mit einem Heiz-/Magnetrührer bei 60°C unter Zusatz von ca. 20 Plätzchen NaOH (Natriumhydroxid Plätzchen Merck 1.06498.0500) hergestellt, über Nacht mit DEPC inkubiert, dann autoklaviert	73,1g 500µl ad 500ml
Natrium-Di-Hydrogenphosphat 1M	NaH ₂ PO ₄ (Merck® 106370) DEPC Aqua bidest über Nacht inkubieren, dann autoklavieren	65,4g 500µl ad 500ml
Di-Natriumhydrogenphosphat 1M	Na ₂ HPO ₄ (Merck® 106587) DEPC Aqua bidest über Nacht inkubieren, dann autoklavieren	89g 500µl ad 500ml
Natriumphosphat (NaPO ₄) 1M	1M NaH ₂ PO ₄ 1M Na ₂ HPO ₄	Mischen bis pH 6,8 erreicht.
10x "Salze"	5M NaCl 1M NaPO ₄ 0,5M EDTA Tris-Puffer DEPC-Wasser 100x Denhardt's Lösung (Denhardt's Sol. lyop. powder Sigma® D-9905), erst unmittelbar vor Gebrauch ansetzen	300ml 50ml 50ml 50ml 45ml 5ml
Dextran-Sulfat 50%	Dextransulfat Na-Salz (Pharmacia® 17.0340.01) DEPC-Wasser bei 50-60°C im Wasserbad lösen, bei -20°C lagern	25g ad 50ml
Formamid deionisiert	Formamid Ionenaustauscher AG 501 X 8 D Resin (Bio Rad 142-6425) für 24 h inkubieren, danach filtrieren	400ml 40g
Hybridisierungs-Mix-H (nach PD Dr. Herbst, Inst. f. Pathologie, Universität Münster, ehemals UKBF)	Formamid (deionisiert) 50% Dextran-Sulfat (80°C Wasserbad) Hefe-t-RNA (50mg/ml) 10x Salze 0,1M DTT ergibt 1000µl, Lagerung bei -20°C	500µl 250µl 25µl 125µl 100µl
Proben-Mix-H für radioaktiv- markierte Sonden (nach PD Dr. Herbst)	Formamid deionisiert DTT 35S markierte Sonde	50% 10mM 300.000cpm
Proben-Mix-H für Dioxigenin- markierte Sonden (nach PD Dr. Herbst)	Formamid (deionisiert) markierte RNA-Probe DEPC-Wasser zusammenfügen und für 30s im Wasserbad bei 80°C erhitzen	3,125µl 0,4µl 2,725µl
Hybridisierungsgemisch	Hybridisierungs-Mix und Proben-Mix im Verhältnis 4:1	
Kammerlösung	50% Formamid in DEPC-Wasser	

Tabelle 2.5.14.3 Reagenzien für die Hybridisierung

Reagenz	Inhaltsstoffe	Menge
Posthybridisierungs- Waschlösung	Formamid	250ml
	2x SSC	250ml
TES 1x Puffer/Waschlösung pH 7,5	1M Tris-HCL (pH 7,5)	5ml
	0,5M EDTA	1ml
	5M NaCl	50ml
	Aqua bidest	444ml
pH-Kontrollieren und ggfs. mit NaOH/HCL korrigieren		
RNase A	RNase A (Boehringer® 109169)	100mg
	DEPC-Wasser	10ml
Aliquotieren zu 1ml, dann 2 min bei 100°C kochen (zerstört kontaminierende Enzyme/DNasen)		
RNase A-Lösung (20µg/ml)	RNase A	1ml
	1x TES	500ml
Standard Saline Concentrate (SSC) 2x pH 7,0	NaCl	8,76g
	Tri-Natriumcitrat-dihydrat (Merck® 1.06448.1000)	4,4g
	pH 7,0 mit 1N NaOH einstellen	
SSC 0,2x pH 7,0	2x SSC	50ml
	Aqua bidest	450ml
TBS 1x pH 7,4	Tris-Base	4,5g
	Tris-HCL	34,25g
	NaCl	43,9g
	Aqua bidest	ad 5000ml

Tabelle 2.5.14.4 Reagenzien für das Post-Hybridisierung-Waschen

Reagenz	Inhaltsstoffe	Menge
Anti-Digoxigenin-Fab- Fragment-Lösung	Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment - Alkal. Phosphatase Konjugat (Boehringer® Mannheim 1333062)	10µl
	1x RPMI (Seromed® 1215)	990µl
pro Schnitt mindestens 100µl aufbringen		
Propandiol 0,2M	Propandiol (2-Amino-2,2-Methyl-Propan-1,3-diol Merck® 801464)	21g
	DEPC-Wasser	1000ml
	bei 4°C lichtgeschützt lagern	
APAAP-Entwicklungspuffer 1x, pH 9,7	NaCl	4,35g
	Tris-HCL	0,75g
	Tris-Base	2,45g
	DEPC-Wasser	ad 500ml
bei 4°C lagern, vor jedem Gebrauch pH kontrollieren		
Neufuchsin-Stammlösung	Neufuchsin (Merck® 4040)	5g
	2N HCL	100ml
Entwicklerlösung A	1x Entwicklungspuffer	350ml
	0,2M Propandiol	125ml
	Levamisol (Sigma® L-9756, bei 4°C lagern)	200mg
Entwicklerlösung B	Naphtol As-Bi-Phosphat (Sigma® N2250)	250mg
	Dimethylformamid (DMF) (Merck® 1.03034.1000)	3,0ml
Entwicklerlösung C	Natriumnitrit (Merck® 102 F-0220)	100mg
	DEPC-Wasser	2,5ml
	Neufuchsin-Lösung	1,0ml
Nach ca. 1min Lösung C in Lösung A geben, mischen, dann Lösung B dazugeben, pH mit 2N HCL auf 8,8 einstellen, filtrieren und sofort verwenden		
Meyers Hämalaunlösung	Merck® Diagnostica	
Kaisers Glyceringelatine	Merck® Mikroskopie	

Tabelle 2.5.14.5 Reagenzien für die Entwicklung der nicht-radioaktiven ISH

Reagenz	Inhaltsstoffe	Menge
Fotoemulsionslösung	G-5 Fotoemulsion (Ilford®)	10ml
	0,6M NH ₄ -Acetat (7,5M NH ₄ -Acetat 0,8ml + Aqua dest. 9,2ml)	10ml
beide auf 43°C erwärmen, blasenfrei mischen, vor Gebrauch 15 min ruhen lassen		
Entwicklungslösung	Kodak D 19 (Kodak® 5027065)	50ml
	Aqua bidest	50ml
Essigsäure	Essigsäure p.a. (Merck® 1.00042.1000)	2ml
	Aqua bidest	ad 200ml
Fixierlösung	Kodak Fixierer 3000 Lösung A (Kodak® 3459775)	50ml
	Aqua bidest	150ml
Eosin-Lösung	1% Eosin Y (Merck® 15935)	200ml
	10% Phloxin B	20ml
	Essigsäure 100%	20ml
	Ethanol 96%	1760ml

Tabelle 2.5.14.6 Reagenzien für die Entwicklung der radioaktiven ISH

BIOMOL®	Biomol GmbH Hamburg, Deutschland
Bio Rad®	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Boehringer®	Boehringer Ingelheim GmbH, Deutschland
GIBCO-BRL®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ilford®	Ilford Imaging Switzerland GmbH, Marly, Schweiz
Kodak®	Kodak GmbH, Stuttgart, Deutschland
Merck®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
New England Nuclear®	DuPont NEN, Boston, MA, USA
Pharmacia®	Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland
Promega®	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Seromed®	Seromed Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Serva®	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Sigma®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Tabelle 2.5.14.7 Hersteller der verwendeten Reagenzien für die In-situ-Hybridisierung

Messparameter	Abkürzung	Angabe / Berechnung
gesamte Implantatoberfläche		entspricht der gesamten Implantatzirkumferenz (Summe aus beurteilbarer + nicht beurteilbarer Implantatoberfläche)
degradierte Implantatoberfläche	ImplDeg	in % der degradierten und intakten (= beurteilbaren) Implantatoberfläche
intakte Implantatoberfläche		unveränderte Implantatoberfläche
beurteilbare Implantatoberfläche		degradierte + intakte Implantatoberfläche
nicht beurteilbare Implantatoberfläche		artifizuell veränderte Oberfläche (ca.10%)
Knochenkontakt gesamt	Kn	Anteil an ges. Implantatoberfläche in %
Knochenkontakt an intakter Oberfläche		
Knochenkontakt an degradierter Oberfläche		
Knochenkontakt an degradierter Oberfläche in % der gesamten degradierten Oberfläche	KnDegPD	Anteil des Knochenkontakts an degradierter Oberfläche in %
Knochenkontakt an degradierter Oberfläche in % des degradierten und intakten Knochenkontaktes	KnDegPDI	Anteil des degradierten Knochenkontakts am gesamten beurteilbaren Knochenkontakt in %
Lokalisation des maximalen Knochenkontaktes (an 4 Implantatseiten)		proximal, distal + frontal Schnitte: medial, lateral / sagittal Schnitte: ventral, dorsal
Osteoidkontakt gesamt	Os	Anteil an ges. Implantatoberfläche in %
Osteoidkontakt an intakter Oberfläche		
Osteoidkontakt an degradierter Oberfläche		
Osteoidkontakt an degradierter Oberfläche in % der gesamten degradierten Oberfläche	OsDegPD	Anteil des Osteoidkontakts an degradierter Oberfläche in %
Osteoidkontakt an degradierter Oberfläche in % des degradierten und intakten Osteoidkontaktes	OsDegPDI	Anteil des degrad. Osteoidkontakts am ges. beurteilbaren Osteoidkontakt in %
Chondroidkontakt gesamt	Ch	Anteil an ges. Implantatoberfläche in %
Chondroidkontakt an intakter Oberfläche		
Chondroidkontakt an degradierter Oberfläche		
Weichgewebekontakt gesamt	Wg	Anteil an ges. Implantatoberfläche in %
Weichgewebekontakt an intakter Oberfläche		
Weichgewebekontakt an degrad. Oberfläche		
Weichgewebekontakt an degradierter Oberfläche in % der gesamten degradierten Oberfläche	WgDegPD	Anteil des Weichgewebekontakts an degradierter Implantatoberfläche in %
Weichgewebekontakt an degradierter Oberfläche in % des degradierten und intakten Weichgewebekontaktes	WgDegPDI	Anteil des degradierten Weichgewebekontakts am gesamten beurteilbaren Weichgewebekontakt in %
Dicke des faserigen Gewebes am Interface	BGW	Dicke an u.g. 4 Implantatseiten wurde gemittelt, Angabe in Mikrometern
Lokalisation der maximalen Bindegewebedicke (an 4 Implantatseiten)		proximal, distal + frontal Schnitte: medial, lateral / sagittal Schnitte: ventral, dorsal
Riesenzellen gesamt (RZ)	RZ/mm	Anzahl pro Millimeter gesamter Implantatoberfläche
Riesenzellen auf degradierter Oberfläche	RZDeg/mm	Anzahl pro Millimeter degradierter Implantatoberfläche
Osteoklastenähnliche Zellen (OCLC)	OCLC/mm	Anzahl pro Millimeter ges. Implantatoberfläche (Kriterien s. Kap. 2.6.2.1.2)
Tabelle 2.6.1 Morphometrische Messparameter der Lichtmikroskopie		

Messparameter	Abkürzung	Angabe / Berechnung
Osteoklastenähnliche Zellen (OCLC) an degradiertes Oberfläche	OCDeg/mm	Anzahl pro Millimeter degradiertes Implantatoberfläche
Fremdkörperriesenzellähnliche Zellen (FKRZ)	FKRZ/mm	Anzahl pro Millimeter ges. Implantatoberfläche (Kriterien s. Kap. 2.6.2.1.2)
Fremdkörperriesenzellähnliche Zellen (FKRZ) an degradiertes Oberfläche	FKDeg/mm	Anzahl pro Millimeter degradiertes Implantatoberfläche
Auslaugung		Messung der Auslaugung an o.g. 4 Implantatseiten mit den entsprechenden Implantatdiametern. Bestimmung der Auslaugung in % des Diameters, Angabe des Mittelwerts
Lakunenanzahl gesamt	Lakges/mm	Anzahl pro Millimeter degrad. u. intakter (= beurteilbarer) Implantatoberfläche
Lakunenanzahl bei Knochen- und Osteoidkontakt	LakKn/mm	Anzahl pro Millimeter degradiertes und intaktes Knochen- u. Osteoidkontaktes
Lakunenanzahl bei Weichgewebekontakt	LakWg/mm	Anzahl pro Millimeter degradiertes und intaktes Weichgewebekontaktes
Lakunenlänge gesamt	LakLges	Lakunenoberflächenlänge (= Länge des Lakunenreliefs auf Implantatoberfläche) aller Lakunen in Mikrometern pro Millimeter beurteilbarer Impl.-Oberfläche
Lakunenlänge bei Knochen- und Osteoidkontakt	LakLKn	Lakunenoberflächenlänge in Mikrometern pro Millimeter degradiertes und intaktes Knochen- u. Osteoidkontaktes
Lakunenlänge bei Weichgewebekontakt	LakLWg	Lakunenoberflächenlänge in Mikrometern pro Millimeter degradiertes und intaktes Weichgewebekontaktes
durchschnittliche Lakunenlänge gesamt	DLakLges	gesamte Lakunenoberflächenlänge / Anzahl aller Lakunen in Mikrometern
durchschnittliche Lakunenlänge bei Knochen(Kn)- und Osteoidkontakt(Os)	DLakLKn	gesamte Lakunenoberflächenlänge in Kontakt mit Knochen+Osteoid / Anzahl der Knochen/Osteoid-Lakunen in μm
durchschnittliche Lakunenlänge bei Weichgewebekontakt (Wg)	DLakLWg	gesamte Lakunenoberflächenlänge in Kontakt mit Weichgewebe / Anzahl der Weichgewebe-Lakunen in Mikrometern
Lakunenfläche gesamt	LakFLges	Lakunenfläche aller Lakunen in Quadratmikrometern pro Millimeter beurteilbarer Implantatoberfläche
Lakunenfläche bei Knochen- und Osteoidkontakt	LakFLKn	Lakunenfläche in Quadratmikrometern pro Millimeter degradiertes und intaktes Knochen- u. Osteoidkontaktes
Lakunenfläche bei Weichgewebekontakt	LakFLWg	Lakunenfläche in Quadratmikrometern pro Millimeter degradiertes und intaktes Weichgewebekontaktes
durchschnittliche Lakunenfläche gesamt	DLakFLges	gesamte Lakunenfläche / Anzahl aller Lakunen in Quadratmikrometern
durchschnittliche Lakunenfläche bei Knochen- und Osteoidkontakt	DLakFLKn	Lakunenfläche in Kontakt mit Knochen+Osteoid / Anzahl der Lakunen in Kontakt mit Knochen+Osteoid in μm^2
durchschnittliche Lakunenfläche bei Weichgewebekontakt	DLakFLWg	Lakunenfläche in Kontakt mit Weichgewebe / Anzahl der Lakunen in Kontakt mit Weichgewebe in μm^2

Tabelle 2.6.1 Fortsetzung Morphometrische Messparameter der Lichtmikroskopie