

Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie

Technische Universität München

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe)

Evaluation zweier fluoreszenzbasierter Zellmarkierungsmethoden zur Visualisierung von osteoblastischen Zellen auf ossären Oberflächen für zukünftige Migrationsdetektion.

Antonia Anna Pauline Thiel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende/-r der Dissertation:

1. Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe

2. Priv.-Doz. Dr. Marc Hanschen

Die Dissertation wurde am 24.06.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.02.2020 angenommen.

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1. Zusammenfassung	6
2. Einführung	8
2.1 Einleitung.....	8
2.1.1 Der Knochen.....	8
2.1.1.1 Funktionen des Knochens	8
2.1.1.2 Anatomischer Aufbau	9
2.1.1.3 Histologischer Aufbau.....	9
2.1.2 Knochenzellen	10
2.1.2.1 Osteoblasten	10
2.1.2.2 Osteozyten	13
2.1.2.3 Bone lining cells	13
2.1.2.4 Osteoklasten	14
2.1.3 Bone remodeling	16
2.1.3.1 Die Basic metabolic unit	16
2.1.3.2 Phasen des Bone remodeling.....	18
2.1.3.3 Regulationsmechanismen	19
2.1.4 Migration.....	20
2.1.4.1 Chemotaxis	21
2.1.4.2 Oberflächen als Landmarken.....	22
2.1.5 Untersuchungsmethoden osteoblastärer Migration	23
2.1.6 Neues <i>in vitro</i> Migrationsmodell	26
2.2 Hypothese	28
2.3 Aufgabenstellung.....	29
2.3.1 Evaluation der Fluoreszenzfarbstoffklassen.....	29
2.3.2 Evaluation des Einflusses der Label auf die Genexpression	29
2.3.3 Validierung fluoreszenzbasierter Zellmarkierung auf ossären Oberflächen.....	30
3. Material.....	31
3.1 Zellkultur	31
3.2 Zellreihen.....	32
3.3 Fluoreszenzfarbstoffe	32
3.4 Toxizitätsanalyse	32
3.5 RNA Extraktion	33
3.6 PCR und RT-Reaktion	33
3.7 Primer.....	34
3.8 Knochenmaterial.....	34

3.9	Laborgeräte, Software und Werkzeuge.....	35
4.	Methoden.....	36
4.1	Zellreihen.....	36
4.2	Subkultivierung.....	36
4.3	Zellzählung.....	37
4.4	Fluoreszenzfärbung.....	38
4.4.1	Färbung mit CellTracker™.....	38
4.4.1.1	Färbung adhärenter Zellen.....	38
4.4.1.2	Färbung von Zellen in Suspension.....	38
4.4.2	Färbung mit Qtracker®.....	39
4.4.2.1	Färbung adhärenter Zellen.....	39
4.4.2.2	Färbung von Zellen in Suspension.....	39
4.5	Fluoreszenzmikroskopie.....	41
4.5.1	Native Zellen.....	41
4.5.2	Fixierte Zellen.....	42
4.5.3	Analyse der Färbung mittels Mikroskopie.....	42
4.6	Toxizitätsnachweis.....	43
4.6.1	WST-1 Test.....	43
4.7	RNA-Extraktion.....	45
4.7.1	Vorbereitung.....	45
4.7.2	Durchführung.....	45
4.8	RNA-Transkription.....	46
4.9	Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (QRT-PCR).....	47
4.9.1	Grundlagen.....	47
4.9.2	Durchführung.....	48
4.9.3	Datenanalyse.....	49
4.10	Time-Label-Loss.....	50
4.11	Knochenmodell.....	50
4.11.1	Präparation.....	50
4.11.2	Demineralisation.....	51
4.11.3	Sterilisation.....	52
4.12	Mikroskopie auf dem Knochen.....	52
4.12.1	Vorbereitung.....	52
4.12.2	Mikroskopie.....	52
4.13	Statistische Auswertung.....	53
5.	Ergebnisse.....	54
5.1	Evaluation der Fluoreszenzfarbstoffklassen.....	54
5.1.1	Primäre humane Osteoblasten.....	54
5.1.1.1	CellTracker™.....	54
5.1.1.2	Qtracker®.....	61
5.1.2	MG-63 Zellen.....	68
5.1.2.1	CellTracker™.....	69
5.1.2.2	Qtracker®.....	76

5.1.3	Identifikation geeigneter Label	81
5.2	Untersuchung des Einflusses der Label auf die Genexpression.....	83
5.2.1	Änderung der Genexpression in MG-63 Zellen	84
5.2.2	Änderung der Genexpression in primären humanen Osteoblasten	85
5.3	Proliferationsbeständigkeit über die Zeit	86
6.	Diskussion	89
6.1	Zusammenfassung	89
6.2	Diskussion der verwendeten Methoden	89
6.3	Diskussion der Ergebnisse	94
6.3.1	Ergebnisse in Bezug auf Hypothese 1	94
6.3.2	Ergebnisse in Bezug auf Hypothese 2	98
6.3.3	Ergebnisse in Bezug auf Hypothese 3	99
6.3.4	Ergebnisse in Bezug auf Hypothese 4	101
6.4	Limitationen des neuen <i>in vitro</i> Modells	102
6.5	Implementierung der Ergebnisse in das neue <i>in vitro</i> Untersuchungsmodell	104
7.	Literaturverzeichnis.....	106
8.	Danksagung	115

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Osteoblastogenese	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Osteoklastogenese	15
Abbildung 3: Schematische Darstellung einer BMU	17
Abbildung 4: Schematische Darstellung des neuen in vitro Untersuchungsmodells, I.	27
Abbildung 5: MG-63 QT grün 10nM, kombiniert	39
Abbildung 6: MG-63 QT grün 10nM, GFP	39
Abbildung 7: MG-63 QT rot 10nM, kombiniert	40
Abbildung 8: MG-63 QT rot 10nM, Texas Red	40
Abbildung 9: MG-63 QT grün 10nM nativ; oben GFP, unten kombiniert	43
Abbildung 10: MG-63 QT grün 10nM fixiert; oben GFP, unten kombiniert	43
Abbildung 11: WST-1 Test nach 4 Stunden Inkubation	44
Abbildung 12: Ergebnis einer QRT-PCR in schematischer Darstellung	49
Abbildung 13: EXACT 300 Bandsäge ohne Knochen	51
Abbildung 14: Präparierte Schweinetibia	51
Abbildung 15: EXACT 300 Bandsäge mit Knochen	51
Abbildung 16: Fertige Knochenscheiben, 1mm Dicke	51
Abbildung 17: Ergebnisse des WST-1 Test für CT und HOB	55
Abbildung 18: Ergebnisse der WST-1 Tests mit HOB nach CT	56
Abbildung 19: Ergebnisse der Färbeanalyse mit HOB nach CT-Arbeitskonzentrationen ..	57
Abbildung 20: Ergebnisse der Färbeanalyse mit HOB nach CT	58
Abbildung 21: HOB mit CT blau 10µM	60
Abbildung 22: HOB mit CT grün 0,1µM	60
Abbildung 23: HOB mit CT rot 0,1µM	60
Abbildung 24: Ergebnisse des WST-1 Test für QT und HOB	62
Abbildung 25: Ergebnisse der WST-1 Tests mit HOB nach QT	63
Abbildung 26: Ergebnisse der Färbeanalyse mit HOB nach QT-Arbeitskonzentrationen ..	64
Abbildung 27: Ergebnisse der Färbeanalyse mit HOB nach QT	65
Abbildung 28: HOB mit QT grün 10nM	67
Abbildung 29: HOB mit CT grün 10µM	67
Abbildung 30: HOB mit QT rot 10nM	68
Abbildung 31: HOB mit CT rot 10 µM	68
Abbildung 32: Ergebnisse des WST-1 Test für CT und MG-63 Zellen	69
Abbildung 33: Ergebnisse der WST-1 Tests mit MG-63 Zellen nach CT	70
Abbildung 34: Ergebnisse Färbeanalyse mit MG-63 nach CT-Arbeitskonzentrationen	71
Abbildung 35: Ergebnisse der Färbeanalyse mit MG-63 Zellen nach CT	72
Abbildung 36: MG-63 Zellen mit CT rot 10µM auf mineralisiertem Knochen	74

Abbildung 37: MG-63 Zellen mit CT rot 10µM auf demineralisiertem Knochen	75
Abbildung 38: Ergebnisse des WST-1 Test für QT und MG-63 Zellen	76
Abbildung 39: Ergebnisse der WST-1 Tests mit MG-63 Zellen nach QT	77
Abbildung 40: Ergebnisse Färbeanalyse mit MG-63 nach QT-Arbeitskonzentrationen.....	78
Abbildung 41: Ergebnisse der Färbeanalyse mit MG-63 Zellen nach QT	79
Abbildung 42: Ergebnisse der QRT-PCR mit MG-63 Zellen	84
Abbildung 43: Ergebnisse der QRT-PCR mit HOB.....	85
Abbildung 44: Proliferationsbeständigkeit der MG-63 Zellen	87
Abbildung 45: Proliferationsbeständigkeit der primären humanen Osteoblasten	87
Abbildung 46: Proliferationsbeständigkeit osteoblastischer Zellen	88
Abbildung 47: Schematische Darstellung des neuen in vitro Untersuchungsmodells, II .	104

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In der Zellkultur verwendete Materialien	31
Tabelle 2: Verwendete Zellreihen	32
Tabelle 3: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe	32
Tabelle 4: Bezeichnung der verwendeten Farbstoffe im Text.....	32
Tabelle 5: Für die Toxizitätsanalyse verwendete Materialien	32
Tabelle 6: Für die RNA-Extraktion verwendete Materialien	33
Tabelle 7: Für die PCR und RT-Reaktion verwendete Materialien	33
Tabelle 8: Verwendete Primer.....	34
Tabelle 9: Zur Demineralisation verwendete Materialien.....	34
Tabelle 10: Verwendete Laborgeräte und Werkzeuge	35
Tabelle 11: Verwendete Zellreihen und ihre Medien	36
Tabelle 12: Verwendete Arbeitskonzentrationen nach Fluoreszenzfarbstoffen	40
Tabelle 13: Verwendete Mengen Färbemedium in µl nach Kulturgefäß	40
Tabelle 14: Verwendete Filtersätze.....	41
Tabelle 15: Verwendete Objektive mit Vergrößerung und Phasenkontrast.....	42
Tabelle 16: In der QRT-PCR amplifizierte Gene mit Gensymbolen.....	48
Tabelle 17: Verwendeter Temperatur-Zyklus der QRT-PCR	48
Tabelle 18: Ergebnisse der Evaluation für CT und HOB im Überblick.....	59
Tabelle 19: Ergebnisse der Evaluation für HOB im Überblick.....	66
Tabelle 20: Ergebnisse der Evaluation für CT und MG-63 Zellen im Überblick	73
Tabelle 21: Ergebnisse der Evaluation für MG-63 Zellen im Überblick.....	80
Tabelle 22: Matrix zur Identifikation geeigneter Label für osteoblastische Zellen	81
Tabelle 23: Geeignete Label für osteoblastische Zellen.....	82
Tabelle 24: Amplifizierte Gene und ihre Funktion.....	83

Abkürzungsverzeichnis

ACTB	Actinbeta 1
BGLAP	Osteokalzin
BLC	Bone lining cell
BMP	Bone morphogenetic protein
BMSC	Bone marrow-derived mesenchymal stem cells
BMU	Basic metabolic unit
BSP	Bone sialoprotein
CCK-8	Cell counting kit-8
CCND1	Cyclin D1
cDNA	Komplementäre DNA
COL1A1	Kollagen Typ1 A1
Ct	Threshold-cycle-Wert
CT	CellTracker™
Cx43	Connexin 43
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
Dlx5	Distal-less homeobox 5
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FGF	Fibroblast growth factor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
HOB	Primäre humane Osteoblasten
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LOX	Lysyl Oxidase
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MIRNA	Mikro RNA
MMP-9	Matrix-Metalloprotease-9
MSC	Mesenchymale Stammzelle
OC	Osteokalzin
OPG	Osteoprotegerin
Osx	Osterix
PAA	Peressigsäure
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PTH	Parathormon
QDot	Quantum Dot
QRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

QT..... Qtracker®
RANK.....*Receptor activator of nuclear factor-κB*
RANKL.....*Receptor activator of nuclear factor-κB ligand*
RNA..... *Ribonukleinsäure*
rpm *Rounds per minute*
RT *Reverse Transkription*
Runx2*Runt-related transcription factor 2*
Sox9 *SRY related HMG box -9*
TGF-β *Transforming growth factor beta*
TNF-α *Tumor Nekrose Faktor alpha*

1. Zusammenfassung

Das Bone remodeling – ein kontinuierlicher Umbauprozess im adulten Knochen – ist wichtiger Bestandteil der physiologischen Knochenvorgänge und dient unter anderem der Anpassung der Knochenstruktur an veränderte Belastungsverhältnisse sowie der Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase. Es ist ein hoch komplexer Prozess, der in der Basic metabolic unit (BMU) stattfindet und an welchem verschiedene Zellen des Knochens, unter anderem Osteoblasten, beteiligt sind. Die Migration von Osteoblasten in der BMU ist ein wichtiger Vorgang während des Bone remodeling. Für ein besseres Verständnis von physiologischen und pathologischen Entwicklungen in diesem Prozess sind weitere Erkenntnisse zum Bewegungsverhalten von Osteoblasten essenziell. Die aktuell gängigen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungsmodelle zur Migration von Knochenzellen sind nicht ausreichend geeignet, um insbesondere die ossäre Oberfläche als Einflussfaktor auf das Migrationsverhalten von Osteoblasten zu untersuchen. Ziel dieser Arbeit war es daher, Farbstoffe zweier Fluoreszenzfarbstoffklassen auf ihre Anwendbarkeit in einem neuen *in vitro* Modell zur Visualisierung und Analyse der Migration von osteoblastischen Zellen auf planaren ossären Oberflächen unterschiedlichen Mineralisationsgrades hin zu evaluieren.

Zu diesem Zweck wurden primäre humane Osteoblasten und MG-63 Zellen mit verschiedenen Farbstoffen und Konzentrationen zweier Fluoreszenzfarbstoffklassen, CellTracker™ und Qtracker®, gefärbt und die Effizienz und Toxizität der Färbungen mittels Mikroskopie und WST-1 Test ermittelt. Eine QRT-PCR untersuchte den Einfluss geeigneter Label auf die relative Genexpression der osteoblastischen Zellen und die Möglichkeit einer molekularen Toxizität. Hierfür wurden insgesamt vier für reife Osteoblasten charakteristische Gene wie Kollagen Typ1 A1 und Osteokalzin analysiert. Um die Proliferationsbeständigkeit der Zellen zu untersuchen, wurde der Verlust der Label und die Anzahl der Zellen in Kultur über die Zeit mikroskopisch dokumentiert und quantifiziert. Durch die Mikroskopie gefärbter Zellen auf mineralisierten und demineralisierten planaren ossären Oberflächen wurden die Label auf ihre Anwendung im skizzierten *in vitro* Modell evaluiert.

Die osteoblastischen Zellen ließen sich mit beiden Farbstoffklassen färben und mikroskopisch darstellen. Die Farbstoffe zeigten dabei die für sie typischen Färbemuster. Für primäre humane Osteoblasten zeigte sich insgesamt eine konzentrationsabhängige Toxizität der CellTracker™ ($R^2_{\text{insgesamt}} = 0,26 \pm 0,06$) und Qtracker® ($R^2_{\text{insgesamt}} = 0,62 \pm 0,1$), für MG-63 Zellen hingegen nicht. Auf Grund der schlechteren Färbefizienz in der visuell-mikroskopischen Analyse und der signifikanten Toxizität ergaben sich für die Qtracker® weniger geeignete Label als für die CellTracker™. In der Farbstoffklasse der CellTracker™

empfehlte sich insbesondere CT rot durch ein kräftiges Fluoreszenzsignal, eine sehr gute Darstellung der Zellen und einen geringen Anteil an Hintergrundfluoreszenz. Von den geeigneten Labeln zeigte CT rot 0,1µM keine, CT rot 10µM bei maximal 25% und CT blau 10µM bei mindestens 25% der in der QRT-PCR bestimmten Marker eine signifikante Reduktion der relativen Genexpression. Den Ergebnissen zur Folge scheint es daher, neben der klassischen zellulären Toxizität, auch eine molekulare Toxizität der Farbstoffe zu geben. Interessanterweise wurden auch signifikante Steigerungen der relativen Genexpression in gefärbten Zellen nachgewiesen. Eine Erklärung hierfür fand sich in der vorliegenden Studie nicht.

Die Visualisierung von osteoblastischen Zellen mit CT blau 10µM und CT rot 0,1µM war durchschnittlich 5,5±0,5 Tage möglich. CT rot 10µM ermöglichte dagegen mit 14 Tagen eine signifikant ($p < 0,05$) längere Visualisierung von MG-63 Zellen. Der Einfluss der Inkubationszeit auf die Visualisierungsdauer wurde hierbei nicht untersucht. In der Mikroskopie gefärbter Zellen auf planar ossären Oberflächen unterschiedlicher mineralischer Komposition erlaubte das Labeling eine sehr gute Visualisierung und fluoreszenzbasierte Zellmarkierung. Darüber hinaus waren keine Unterschiede in Bezug auf Zellmorphologie, -vitalität oder -adhäsion zwischen den beiden Knochenoberflächen zu beobachten. Die Verwendung einer 20-fachen oder 32-fachen Vergrößerung und einer Zelldichte von 50.000 Zellen/cm² schienen für die Zeitrafferaufnahmen geeignete Parameter.

Die Implementierung der Ergebnisse dieser Arbeit in das neue *in vitro* Modell ermöglicht es, dieses zukünftig zur Beantwortung von Forschungsfragen mit Bezug auf die Migration von Osteoblasten auf planaren ossären Oberflächen verwenden zu können.

2. Einführung

2.1 Einleitung

2.1.1 Der Knochen

Der postnatale Knochen ist eines der vielfältigsten Gewebe des menschlichen Körpers. Er kann sich hinsichtlich Entstehung, Morphologie, Größe, Form und Funktion deutlich unterscheiden.

In der Embryonalphase entwickelt sich der Knochen entweder aus mesenchymalem Bindegewebe zu Geflechtknochen (desmale Ossifikation, z.B. Schädelknochen) oder aus zuvor gebildetem Knorpelgewebe zu Lamellenknochen (chondrale Ossifikation, z.B. Tibia). Morphologisch differenziert man zwischen der Substantia spongiosa und der Substantia compacta (*siehe Anatomie*). Nach ihrer Form kann man Knochen noch in unterschiedliche Kategorien untergliedern: Ossa longa oder lange Röhrenknochen (z.B. Femur oder Humerus), Ossa plana oder platte Knochen (z.B. Skapula oder Sternum), Ossa brevia (z.B. Handwurzelknochen), Ossa pneumatica oder pneumatisierte Knochen (z.B. Maxilla) und Ossa semisamoidea oder Sesamknochen (z.B. Patella). Beschrieben werden noch Ossa irregularia, die keiner der oben genannten Kategorien zugeordnet werden können.

2.1.1.1 Funktionen des Knochens

Darüber hinaus erfüllt der Knochen unterschiedliche anatomische sowie physiologische Funktionen im menschlichen Körper. Zum einen dient er als Skelett der Formgebung, ist also für die charakteristische menschliche Figur maßgebend. Zum anderen ermöglicht er über seine Stützfunktion den aufrechten Gang. Besonders empfindliche Organe des menschlichen Körpers, wie zum Beispiel das Gehirn oder das Rückenmark, sind von Knochen umgeben und werden von ihnen geschützt. Außerdem spielt der Knochen eine Rolle im Hormonhaushalt des Menschen und dient als Speicher von Calcium und Phosphat. Für den Bewegungsapparat sind Knochen als Ursprungs- und Ansatzpunkte für Muskeln, Sehnen und Bänder entscheidend. Und nicht zuletzt hat das Knochenmark als blutbildendes Organ Einfluss auf viele physiologische Vorgänge im menschlichen Körper.

Trotz der vielen Unterschiede ist der anatomische Aufbau des Knochens weitgehend identisch.

2.1.1.2 Anatomischer Aufbau

Das Skelett besteht hauptsächlich aus zwei makroskopisch unterschiedlichen Knochentypen, dem kortikalen und dem spongiösen Knochen. Kortikaler Knochen findet sich vor allem in den langen Röhrenknochen der Extremitäten und macht insgesamt etwa 80% des Skeletts aus (Eriksen et al., 1993). Spongiöser Knochen kommt dagegen vor allem in Wirbelkörpern und den Beckenknochen vor, macht etwa 20% des Skeletts aus und ist wesentlich stoffwechselaktiver als kortikaler Knochen (Eriksen et al., 1993). Anteilig finden sich beide Typen in allen Knochen des menschlichen Körpers.

Der Knochen ist aus vier Anteilen aufgebaut. Die äußerste Hülle des Knochens wird vom Periost, der sog. Knochenhaut, gebildet. Es überzieht alle Anteile des Knochens inklusive der Ansatzstellen von Bändern und Sehnen bis auf die mit Knorpel oder Synovialmembran überzogenen Gelenkanteile. Das Periost besteht aus zwei straffen Bindegewebsschichten, dem Stratum osteogenicum und dem Stratum fibrosum, ist gut vaskularisiert, neural innerviert und dient der Ernährung und Regeneration des Knochens. Unter dem Periost liegt dicht strukturierter, kortikaler Knochen, welcher der Stabilität des Knochens dient. Im Inneren liegt die als Spongiosa bezeichnete Schicht aus spongiösem Knochen. Sie besteht aus einem Geflecht aus Knochenbälkchen, den sog. Trabekeln. Diese maximieren die mechanischen Eigenschaften des Knochens, indem sie ihre Struktur an anhaltende mechanische Beanspruchungen anpassen (Eriksen et al., 1993). Mit ihren schwammartigen Verzweigungen bilden sie außerdem die Markhöhle des Knochens und sind mit Endost ausgekleidet. In der Markhöhle, also dem Raum zwischen den Trabekeln, findet sich das Knochenmark als blutbildendes Organ (Spaniel-Borowski, 2007).

2.1.1.3 Histologischer Aufbau

Der Knochen selbst besteht aus der Knochengrundsubstanz, auch extrazellulärer Matrix oder Knochenmatrix genannt, und den Knochenzellen (siehe 2.1.2). Die Knochengrundsubstanz setzt sich aus organischen (35%) und anorganischen (65%) Bestandteilen zusammen. Zu den organischen Bestandteilen gehören Kollagen Typ I, adhäsive Glykoproteine (Osteokalzin, Osteonektin und Osteopontin) und Proteoglykane. Die anorganischen Bestandteile werden aus Hydroxylapatit und verschiedenen Ionen wie Magnesium und Fluor gebildet. Bei der Entstehung von Hydroxylapatit kommt es zur Hydroxylierung von Calciumphosphatsalzen, die sich an die Kollagenfibrillen anlagern und den Knochen druckfest machen. Je nach räumlicher Anordnung oder Zusammensetzung der Knochenmatrix können zwei Knochengewebe unterschieden werden: Geflechtknochen und Lamellenknochen.

Geflechtknochen entsteht postnatal bei der desmalen Ossifikation und wird auch als primärer Knochen bezeichnet. Sein geflechtartig angeordnetes Grundgerüst ist weniger mineralisiert und hat einen höheren Wassergehalt, was ihn biege- und zugfest macht. Bei ausgewachsenen Menschen findet er sich beispielsweise noch an den Schädelnähten. Lamellenknochen dagegen entsteht erst sekundär nach Abbau von Geflechtknochen, ist hoch organisiert und bildet das Knochengewebe des kortikalen Knochens. Seine Grundeinheit, das Osteon, besteht aus einem im Zentrum liegenden Havers-Kanal mit dem Havers-Blutgefäß und begleitenden Nervenfasern. Der Zentralkanal wird von etwa 4-20 konzentrisch verlaufenden Lamellen umgeben, die hauptsächlich von Kollagen Typ 1 gebildet werden. Die Kollagenfasern ordnen sich in den Lamellen spiralförmig und parallel zueinander mit einem schrägen Steigungswinkel an. Zwischen und in den Lamellen liegen Osteozyten in Lakunen und stehen über ihre Gap Junctions (Zell-Zell-Verbindungen) in Kontakt mit ihrer Umgebung. Eine Linea cementalis schließt das Osteon nach außen ab (Spaniel-Borowski, 2007).

2.1.2 Knochenzellen

Die Zellen des Knochens entwickeln sich im Wesentlichen aus zwei Zelllinien – einer osteoblastischen und einer osteoklastischen – und unterscheiden sich in ihrem Ausgangspunkt. Zellen der osteoblastischen Linie entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen, Zellen der osteoklastischen Linie dagegen aus hämatopoetischen Stammzellen. Beide Prozesse sind komplex und unterliegen noch der aktuellen Forschung, weshalb ein klarer Ablauf der Differenzierungsvorgänge heute noch schwer zu skizzieren ist. Vereinfacht dargestellt, entwickelt sich in der osteoblastischen Linie eine mesenchymale Stammzelle zunächst zum Osteoblasten. Aus diesem differenzieren sich dann Bone lining cells und Osteozyten. Osteoklasten entwickeln sich über verschiedene Vorstufen aus hämatopoetischen Stammzellen. Im Knochen sind die Übergänge zwischen den einzelnen Differenzierungsstufen nicht stringent und eine klare Abgrenzung voneinander schwierig.

2.1.2.1 *Osteoblasten*

Osteoblasten bilden mit 4-6% der Gesamtzellzahl im Knochen nur eine kleine Gruppe, spielen aber auf Grund ihrer verschiedenen Funktionen eine zentrale Rolle im Knochenhaushalt. Ähnlich zu anderen Bindegewebszellen wie Fibroblasten, stammen Osteoblasten von einer gemeinsamen pluripotenten mesenchymalen Stammzelle (MSC) ab (Aubin, 2008). Die Differenzierung von Osteoblasten ist ein komplexer und bis heute nicht restlos verstandener Prozess, der verschiedene, zeitlich hintereinander geschaltete Stadien beinhaltet. Für jedes Stadium ist die Expression spezifischer Gene notwendig, die wiederum der Kontrolle von pro-osteogenetischen Signalwegen unterliegen. Im Folgenden

und in Abbildung 1 werden die einzelnen Schritte der Osteoblastogenese überblicksmäßig dargestellt. Zunächst entwickelt sich aus der MSC ein Osteochondroprogenitor. Dieser Schritt wird unter anderem von Sox9, Bone morphogenetic protein (BMPs) und Wnt-Signalwegen wesentlich mitbestimmt, da sie die Transkription osteoblastogenetischer Faktoren wie Runx-related transcription factor 2 (Runx2), Distal-less homeobox 5 (Dlx5) und Osterix (Osx) stimulieren und adipogenetische Transkriptionsfaktoren inhibieren (Bennett et al., 2005; Celil & Campbell, 2005; Grabowski, 2015), was zu einer Differenzierung der MSC hin zum Osteoblasten führt. Weitere Signalwege beinhalten Fibroblast Growth Factor (FGF), Mikro RNAs (MIRNAs) und Connexin 43 (Cx43) (Capulli et al., 2014). Die Expression der bereits erwähnten Transkriptionsfaktoren Runx2, Dlx5 und Osx und noch weiterer ist essentiell für die Osteoblastogenese. Eine Deletion von Runx2 führte beispielweise bei Mäusen zu einem Skelett, bestehend aus Chondrozyten und Knorpel, aber ohne knöchernen Anteile (Komori et al., 1997). Runx2, Dlx5 und Osx definieren gleichzeitig das Osteo-chondroprogenitor Stadium der Zelle (Capulli et al., 2014).

Aus diesem Stadium entsteht im nächsten Schritt der Osteoprogenitor und anschließend der Präosteoblast, welcher bereits eine alkalische Phosphatase besitzt und Proteine der Knochenmatrix sezerniert (Capulli et al., 2014). Charakteristisch für die letzte Phase der Differenzierung und damit den Übergang zum reifen Osteoblasten ist eine hohe Expression der Knochenmatrixproteine Osteokalzin (OC), Bone sialoprotein (BSP I und II) sowie Kollagen Typ 1. Hier muss angefügt werden, dass die Osteoblastogenese kein homogener Prozess ist und es durchaus Abweichungen zu dem oben beschriebenen Muster gibt (Aubin, 2008). Ebenso besteht keine Homogenität in der Gruppe der reifen Osteoblasten. Verschiedene *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen (Candelieri et al., 2001; Liu et al., 1997) zeigten eine große Vielfalt in der Expression von Markern bei Zellen, die als reife Osteoblasten bezeichnet wurden.

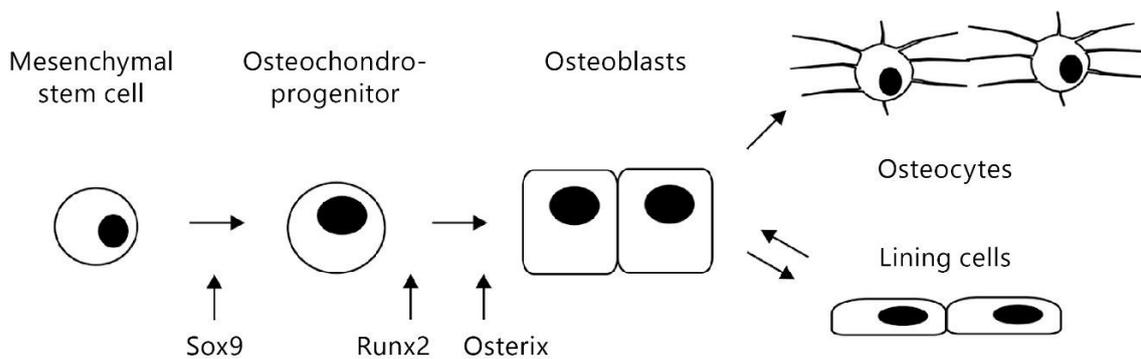


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Osteoblastogenese

Diese Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Differenzierung von Osteoblasten. Aus einer multipotenten Vorläuferzelle, der mesenchymalen Stammzelle (Mesenchymal stem cell), entwickelt sich u.a. durch den Einfluss von Sox9 ein Osteochondroprogenitor (Osteochondroprogenitor), welcher sowohl Osteoblasten, als auch Chondrozyten bilden kann. Unter dem Einfluss verschiedener Transkriptionsfaktoren – im Wesentlichen Runx2 und Osterix – findet die Weiterentwicklung zum Osteoblasten (Osteoblasts) statt. Osteoblasten wiederum können sich darüber hinaus zu Osteocytos (Osteocytes) oder Bone lining cells (Lining cells) differenzieren. Diese Abbildung wird mit freundlicher Genehmigung von Grabowski (2015) verwendet.

Auch die Funktionen von Osteoblasten sind vielfältig. Zum einen sind sie für die Bildung von neuer Knochengrundsubstanz zuständig, die die Deposition und die Mineralisation von Knochengrundsubstanz umfasst. Im ersten Schritt werden Kollagen Typ 1, nicht-kollagene Proteine wie Osteokalzin, Bone sialoprotein II und Osteopontin und Proteoglykane wie Decorin oder Biglykan sezerniert. Diese neue, nicht mineralisierte Knochenmatrix wird als Osteoid bezeichnet. Im zweiten Schritt erfolgt die Mineralisation, deren Ablauf noch nicht gänzlich erforscht ist. Bekannt ist allerdings, dass in einem der ersten Schritte Hydroxyapatitkristalle aus Calcium und Phosphat gebildet und anschließend in den extrazellulären Raum freigesetzt werden. Diese lagern sich dann zwischen den Kollagenfibrillen ein und der Knochen härtet aus. Des Weiteren regulieren Osteoblasten die Entwicklung von Osteoklasten aus Prä-Osteoklasten über den RANKL/RANK-Signalweg und parakrine Faktoren wie Interleukin-1 β und Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α) mit.

In neueren Studien konnte auch die Funktion des Knochens als endokrines Organ herausgestellt werden, wobei vor allem das unter anderem von Osteoblasten produzierte Osteokalzin eine Rolle zu spielen scheint. In seiner karboxylierten Form hat es eine hohe Affinität zu Hydroxyapatit und wird in die Knochenmatrix eingelagert. In decarboxylierterem Zustand, zum Beispiel nach Knochenresorption, hat es eine geringere Affinität zu Hydroxyapatit, wird also nicht mehr im Knochen gebunden und kann so zu seinen Zielorganen gelangen. Als Zielorgane wurden bis dato das Pankreas, der Hoden und das Fettgewebe identifiziert, auf welche Osteokalzin in unterschiedlicher Weise Einfluss nimmt (Ferron et al., 2008; Lee et al., 2007; Oury et al., 2011).

Neben der Apoptose gibt es für Osteoblasten zwei Differenzierungsmöglichkeiten. Sie können sich zu Osteozyten oder Bone lining cells differenzieren.

2.1.2.2 Osteozyten

Osteozyten sind mit 90-95% die größte Gruppe der Knochenzellen und mit einer Lebensspanne von bis zu 25 Jahren auch die langlebigsten Zellen (Capulli et al., 2014; Klein-Nulend & Bonewald, 2008). Sie entstehen aus reifen Osteoblasten, die, von ihrem eigenen Osteoid umgeben, zu Osteozyten differenzieren. Reife Osteozyten liegen dann als sternförmige Zellen eingeschlossen im lakunokanalikulären Netzwerk des Knochens. Die genauen Mechanismen, die hinter der Differenzierung reifer Osteoblasten zu Osteozyten stehen, sind noch nicht vollständig erforscht. Eine Rolle in diesem Prozess scheint beispielsweise der Osteoblasten stimulierende Faktor-1 (OSF-1) (Tezuka et al., 1990) zu spielen, welcher von den Osteozyten produziert, die Rekrutierung und Differenzierung von Osteoblasten anregt (Imai et al., 1998). Die in den Lakunen des Knochens eingeschlossenen, reifen Osteozyten stehen über eine Vielzahl von Zellfortsätzen untereinander und mit anderen Zelltypen oder dem extraossären Raum in Kontakt. Die Zellfortsätze durchdringen die Knochenmatrix dabei in Form von kleinen Kanälen, den sogenannten Kanalikuli, und können in ihrer Länge verändert werden. An den Spitzen der Fortsätze stehen die Zellen über gap junctions in Verbindung (Doty, 1981). Zusätzlich gibt es noch Teilkanäle (Goodenough & Paul, 2003), die entlang der Zellkörper und Dendriten ebenfalls am Austausch zwischen den Zellen beteiligt sind. Die Osteozyten bilden damit sowohl ein extrazelluläres als auch ein intrazelluläres Kommunikationsnetzwerk. Lange wurden Osteozyten als scheinbar metabolisch inaktive Zellen vernachlässigt. Deren Erforschung in den letzten Jahren hat ihre Rolle als entscheidende Regulatoren der Homöostase von Knochen und Mineral gezeigt (Dallas et al., 2013; Nakashima et al., 2011). Sie sind beteiligt am Phosphathaushalt und der Kontrolle des Knochenumbaus, dienen als mechanosensorische Zellen der Anpassung des Skeletts an mechanische Belastungen und verwalten das Kalziumreservoir des Knochens (Dallas et al., 2013). Über die Produktion von Sclerostin können sie die Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten beeinflussen (Jilka et al., 2008).

2.1.2.3 Bone lining cells

Bone lining cells (BLC) sind postmitotische, flache Zellen, die inaktive, endostale Knochenoberflächen auskleiden (Miller & Jee, 1987). Sie entwickeln sich aus der Osteoblastenzelllinie, sind also eine der zwei Weiterentwicklungsmöglichkeiten von Osteoblasten (Matic et al., 2016). Trotz ihrer scheinbaren Inaktivität nehmen sie im Knochen verschiedene Funktionen wahr. Als Teil der Zellen der Knochenoberfläche haben

sie eine Barrierefunktion und separieren Flüssigkeiten des Knochens von denen des Interstitiums (Canas et al., 1969; Miller & Jee, 1987). Über Gap Junctions sind sie untereinander und mit Osteozyten verbunden. Verschiedene Studien gaben Hinweise darauf, dass BLCs unter Einfluss von Parathormon (PTH) (Dobnig & Turner, 1995; Kim et al., 2012) oder Östrogen (Bowman & Miller, 1986) *in vivo* proliferieren und zu aktiven Osteoblasten differenzieren können. Neueste Studien haben außerdem gezeigt, dass BLC als osteoblastäre Vorläuferzellen zusätzlich zu MSC *in vivo* dienen können (Matic et al., 2016). BLC bauen außerdem von den Osteoklasten in Resorptionslakunen belassenes Kollagen ab und übernehmen damit einen wichtigen Schritt im Knochenauf- und -abbau (Everts et al., 2002).

2.1.2.4 Osteoklasten

Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen mit einem Durchmesser von bis zu 100µm und bis zu 100 Zellkernen (Spanel-Borowski, 2007). Auch die Osteoklastogenese ist ein komplexer, schrittweise ablaufender Prozess und unterliegt aktuellen Forschungen. Der folgende Abschnitt und Abbildung 2 stellen ihn überblicksartig da. Der Ursprung des Osteoklasten ist eine hämatopoetischen Stammzelle (HSCs) aus dem Knochenmark, die sich zunächst zu einer multipotenten (MPP) und anschließend zu einer oligopotenten Vorläuferzelle (common myeloid progenitor cell, CMP) differenziert. Aus letzterer entwickeln sich Osteoklastenprogenitore, die durch Fusion zu einem reifen Osteoklasten werden.

Die Forschung in den letzten Jahrzehnten hat gezeigt, dass in diesem Prozess vor allem drei Faktoren eine entscheidende Rolle spielen: der Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), der RANKL/RANK-Signalweg und Osteoprotegerin (OPG) (Grabowski, 2015). M-CSF wird von Osteoblasten und Stromazellen produziert, fördert die myeloischen Vorläuferzellen mit dem entsprechenden c-Fms Rezeptor und induziert die Expression von RANK, dem entscheidenden Rezeptor der Osteoklastogenese (Edwards & Mundy, 2011). Receptor activator of nuclear faktor-κB (RANK) ist ein Typ 1 Transmembranrezeptor, der von Osteoklasten exprimiert und durch seinen Liganden, receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL), aktiviert wird (Anderson et al., 1997; Nakagawa et al., 1998). RANKL wiederum findet sich auf der Oberfläche vieler Zellen im Knochen, wobei die RANKL-Expression im Knochengewebe (Osteoblasten, Osteozyten) höher ist (Nakashima et al., 2011). Die Expression von RANKL und damit die Osteoklastogenese unterliegt verschiedenen Einflussfaktoren. Osteotropische Faktoren wie 1,25 Vitamin D₃, PTH und Interleukin-11 können die Expression stimulieren, wohingegen das ebenfalls von den Osteoblasten gebildete OPG als kompetitiver Rezeptor die Wirkung von RANKL inhibiert.

Osteoblasten sind demnach über die Expression von RANKL und die Produktion von OPG entscheidend an der Regulation der Osteoklastogenese beteiligt.

Die Bindung von RANKL an den RANK-Rezeptor aktiviert verschiedene intrazelluläre Signalwege wie den NK- κ B oder MAP-Kinase Signalweg, die letztendlich die Transkription des für die Osteoklastogenese spezifischen Transkriptionsfaktors NFATc1 induzieren (Takayanagi, 2007; Takayanagi et al., 2002). Die Forschung der letzten Jahre hatte immer wieder die Möglichkeit einer RANKL unabhängigen Differenzierung von Osteoklasten zum Gegenstand. Dazu gehörten unter anderem die Lysyl Oxidase (LOX) (Cox et al., 2015) und TNF- α (Azuma et al., 2000; Kobayashi et al., 2000) als mögliche Signalgeber. Kontroverse Ergebnisse deuten allerdings darauf hin, dass auch in diesen Signalwegen RANKL eine Rolle spielt (Tanaka, 2017).

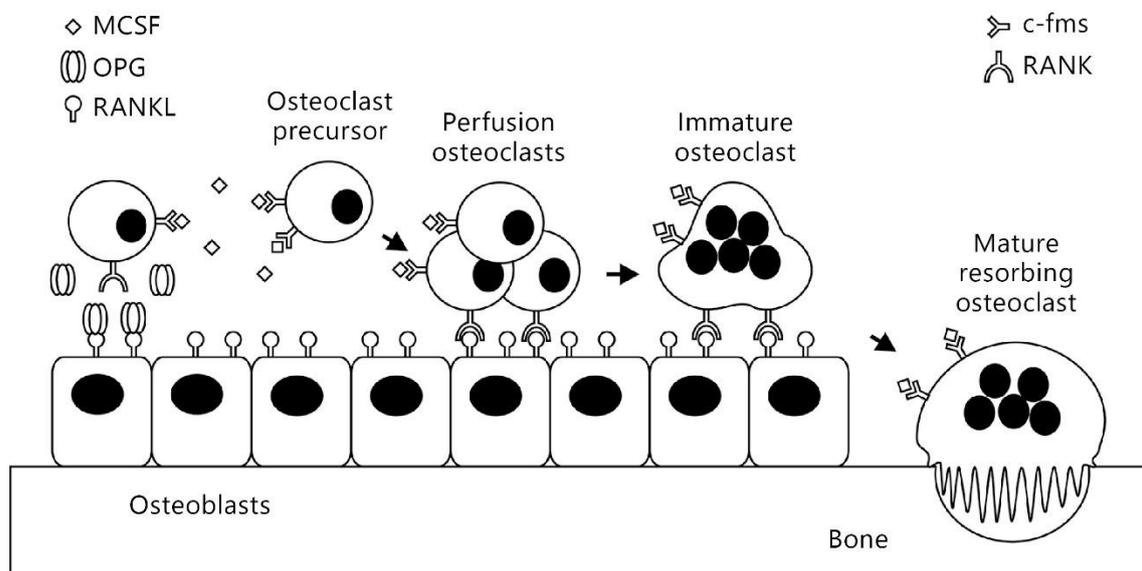


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Osteoklastogenese

Diese Darstellung zeigt schematisch die Differenzierung von Osteoklasten. Ausgangspunkt der Osteoklastogenese ist eine hämatopoetische Stammzelle (Osteoclast precursor), welche sich insbesondere durch den Einfluss von MCSF, OPG und RANKL über verschiedene Zwischenstufen (Perfusion osteoclasts) zunächst zu einem unreifen (Immature osteoclast) und schließlich zu einem reifen Osteoklasten (Mature resorbing osteoclast) entwickelt. An diesem Prozess sind insbesondere auch Osteoblasten (Osteoblasts) regulatorisch beteiligt. Diese Abbildung wird mit freundlicher Genehmigung von Grabowski (2015) verwendet.

Besser verstanden ist die Funktion des Osteoklasten. Er resorbiert die Knochensubstanz und bildet damit den Gegenspieler zum Osteoblasten im Knochen. Als große, mehrkernige Zellen bedecken sie großflächig die Knochenoberfläche. Die Resorption selbst findet in der Kontaktzone zwischen der Zelle und dem Knochen in einer vom Osteoklasten gebildeten Grube, dem sog. „pit“ statt. Durch die Faltung ihrer Zellmembran in diesem Bereich können Osteoklasten die Knochenresorption steigern. Durch die Sekretion von H^+ , Cl^- und katalytischen Enzymen baut der Osteoklast den Knochen im „pit“ ab. Die organischen

Komponenten wie Kollagen Typ I und Glykoproteine werden dabei enzymatisch durch beispielsweise CtsK (Inaoka et al., 1995; Tezuka et al., 1994) und Matrix-Metalloproteasen (bspw. MMP-9 (Vu et al., 1998)) gespalten. Die anorganischen Komponenten, hauptsächlich Hydroxyapatit, werden in dem durch HCl bedingten sauren Milieu resorbiert (Ono & Nakashima, 2018).

Wie im oberen Abschnitt dargelegt, spielen Osteoklasten und Osteoblasten, aber auch Osteozyten und BLCs eine Rolle beim Knochenauf- und -umbau. Durch beide Prozesse wird im Laufe des Lebens das Wachstum und die Form des Knochens verändert. Je nach Lebensphase dient das Zusammenspiel der einzelnen Zellen dabei unterschiedlichen Zielen. In der Kindheit überwiegt das Bone modeling, also die Bildung und Formgebung des Knochens, wohingegen im Erwachsenenalter das Bone remodeling, also der Knochenumbau im Vordergrund steht und Bone modeling vorwiegend nach Frakturen zu beobachten ist. Beide Prozesse sind fein abgestimmte Systeme von Knochenresorption und -bildung und unterliegen vielen Einflüssen. Die Notwendigkeit einer ausgewogenen Balance für ein gesundes Skelettsystem zeigt sich in den aus einer Dysbalance resultierenden Pathologien.

2.1.3 Bone remodeling

2.1.3.1 *Die Basic metabolic unit*

In kortikalem Knochen, wie in jedem anderen Material auch, kommt es durch die wiederholte Belastung zur Materialermüdung (Seeman, 2008). Um die Festigkeit des Knochens zu erhalten, wird der schadhafte Knochen ab-, neuer Knochen auf- und die Mikrostruktur des Knochens laufend entsprechend der aktuellen mechanischen Beanspruchung oder physiologischen Einflüssen umgebaut. Gleichzeitig dient der Knochen als maßgeblicher Mineralspeicher und kann durch Freisetzung oder Bindung von Mineralien den Mineralienhaushalt regulieren. Beide Funktionen sind Ergebnis des stetigen Knochenumbaus, der als Bone remodeling bezeichnet wird und in separaten, vorübergehend gebildeten anatomischen Strukturen, den Basic metabolic units (BMUs) (Frost, 1986), stattfindet. BMUs, und damit das Bone remodeling, finden sich in den endokortikalen, trabekulären und intrakortikalen Anteilen der endokortikalen Hülle des Knochens (Seeman, 2008). Zu einem geringeren Teil finden Knochenauf- und -abbau auch in der periostalen Hülle statt (Bliziotes et al., 2006; Frost, 1986; Orwoll, 2003).

Abbildung 3 zeigt schematisch die Struktur und zelluläre Organisation einer kortikalen BMU. Eine voll entwickelte BMU ist eine dreidimensionale, längliche, zylinderartige Struktur mit einer Länge von 2mm und einer Breite von 200µm (Parfitt, 1994). Sie ist entlang der

Längsachse des Knochens ausgerichtet und arbeitet mit einer Geschwindigkeit von 20-40µm/Tag (Parfitt, 1983). An der Spitze befindet sich die Resorptionszone, in der etwa neun Osteoklasten (Jaworski et al., 1981) kegelförmig angeordnet den vor ihnen liegenden Knochen abbauen (Parfitt, 1994). Dahinter folgt eine circa 200µm, mit spindelförmigen Zellen ausgekleidete Übergangszone, in welcher Knochengrundsubstanz deponiert ist (Parfitt, 1994). Den hinteren Teil der BMU bilden wiederum kegelförmig angeordnete Osteoblasten, die neuen Knochen produzieren (Parfitt, 1994). Im Zentrum der BMU liegt eine Kapillare und Bindegewebe (Parfitt, 1994). In kortikalem Knochen gräbt und modelliert die BMU in einem Tunnel, in spongiösem Knochen dagegen in einem Graben (Parfitt, 2002). Während ihres Wegs durch den Knochen behält die BMU ihre Größe, Form und interne Organisation für 6-9 Monate aufrecht (Jilka, 2003) und folgt dabei einer vorgegebenen Richtung (Parfitt, 1994). Die einzelnen zellulären Bestandteile der BMU entwickeln sich aus Vorläuferzellen, die, je nach Lokalisation, aus dem Knochenmark oder über das Gefäßsystem einwandern (Fujikawa et al., 1996) (Eghbali-Fatourehchi et al., 2005), sich differenzieren und dann zu ihrem Bestimmungsort in der BMU gelangen. Da die Zellen, verglichen mit der Gesamtbestandszeit der BMU, eine relativ kurze Lebensspanne haben, müssen sie für eine einwandfreie Funktion der BMU kontinuierlich ersetzt werden (Parfitt, 1994).

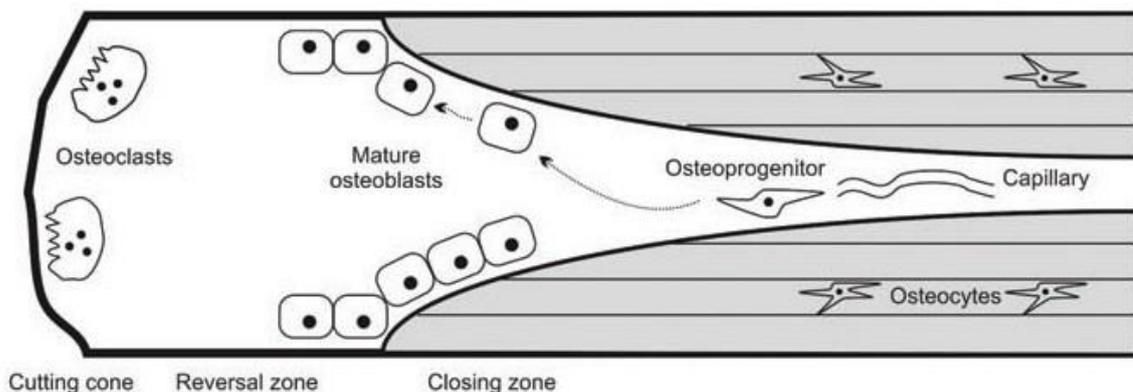


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer BMU

Diese Abbildung zeigt ein Modell der Struktur und zellulären Organisation der kortikalen BMU. Sie zeigt das Zusammenspiel der verschiedenen Zelltypen mit Osteoklasten (Osteoclasts), reifen Osteoblasten (Mature Osteoblasts), Osteozyten (Osteocytes) und der aus einspritzenden Kapillaren (Capillary) stammenden Osteoprogenitoren (Osteoprogenitor). Zudem wird die räumlich-zeitliche Abfolge mit der Resorptionszone/-phase (cutting cone) in der Front, der Übergangszone/-phase (reversal cone) in der Mitte und der nachfolgenden Aufbauzone/-phase (closing cone) dargestellt. Neu gebildeter Knochen ist in hellgrau dargestellt. Die gestrichelten Pfeile zeigen potentielle Migrationswege der Osteoblasten an. Diese Abbildung wird mit freundlicher Genehmigung von Thiel et al. (2018) verwendet.

2.1.3.2 Phasen des Bone remodeling

Der Umbauzyklus durch eine BMU besteht aus sieben aufeinander folgenden Phasen: Ruhephase, Aktivierung, Resorption, Übergangsphase, Aufbau, Mineralisierung und Beendigung (Siddiqui & Partridge, 2016). Der Großteil der Knochenoberfläche befindet sich im Ruhezustand und wird erst durch verschiedene Signale aktiviert. Die Entstehung einer BMU wird durch hormonelle (z.B. Parathormon) oder mechanische Einflüsse induziert (Katsimbri, 2017). Die Forschung der letzten Jahre legt nahe, dass Osteozyten als Mechanosensoren oder über direkte Schädigung an dem Prozess beteiligt sind (Bonewald & Johnson, 2008; Verborgt et al., 2000). Osteozyten sind die häufigsten Zellen im Knochen, stehen über ihre multiplen Zellfortsätze mit BLCs und anderen Osteozyten in Verbindung und bilden ein engmaschiges Netzwerk (Seeman, 2008). Die Apoptose von Osteozyten ist wahrscheinlich eines der ersten Signale für einen notwendigen Knochenumbau (Seeman, 2008) und die Zahl der apoptotischen Osteozyten liefert die topografische Information zur Lokalisierung und Größe des Schadens (Taylor, 1997; Verborgt et al., 2000). Dieses Signal, dessen Natur noch unbekannt ist, wird vermutlich über das Netzwerk an Zellfortsätzen an die BLCs auf der inneren oder endostealen Knochenoberfläche weitergegeben, wo der Umbau stattfindet (Seeman, 2008), und führt zur Osteoklastogenese (Clark et al., 2005) aus Vorläuferzellen.

Die reifen Osteoklasten beginnen an der Spitze der BMU Knochen abzubauen, womit die Resorptionsphase beginnt (Abbildung 3). Es ist noch unklar, welche Faktoren das Ausmaß der Resorption bestimmen oder deren Ende signalisieren, sobald der beschädigte Knochen resorbiert ist (Seeman, 2008). Die Phagozytose der Osteozyten durch die Osteoklasten könnte ein Weg sein, das Signal zu entfernen (Seeman, 2008). Zu welchem Zeitpunkt genau osteoblastäre Vorläuferzellen rekrutiert werden, ist ebenso unklar. Fakt ist, dass die Bildung von Knochen durch Osteoblasten erst nach der Resorption stattfindet (Hattner et al., 1965). In der Übergangsphase wird die Verbindung zwischen dem Ende der Resorption und dem Anfang des Knochenaufbaus hergestellt. Sie benötigt einige Tage und in dieser Zeit liegt ein zylinderförmiger Raum zwischen der resorptiven und der aufbauenden Region (R. B. Martin & Burr, 1989) (Abbildung 3). An diesem Kopplungsvorgang sind verschiedene lokale Faktoren (Howard et al., 1981), unter anderem der aus der Matrix freigesetzte TGF- β , beteiligt (Bonewald & Mundy, 1990; J. Martin & Sims, 2005) (Locklin et al., 1999). Am Ende der Übergangsphase werden Osteoklasten durch Osteoblasten ersetzt und die Phase des Knochenaufbaus für etwa 4-6 Monate beginnt (Katsimbri, 2017). Hierbei füllen Osteoblasten den entstandenen Grabenquerschnitt entweder teilweise oder vollständig mit Osteoid auf (Abbildung 3). Ist der Aufbau abgeschlossen, geht der Großteil der Osteoblasten in Apoptose, nur ein kleinerer Teil differenziert sich zu Osteozyten oder BLCs

(Jilka et al., 2008; Parfitt, 1994). Die letzte Phase umfasst die primäre und sekundäre Mineralisation des deponierten Osteoids (Seeman, 2008), wodurch als Endergebnis einer jeden BMU ein neues Haversches System oder Osteon entsteht (Parfitt, 1994).

2.1.3.3 Regulationsmechanismen

Wie bereits erwähnt, ist die Lebensspanne der Osteoklasten und Osteoblasten kürzer als die Gesamtbestandszeit der BMU. Der Zellverlust muss, um eine reibungslose Funktion zu gewährleisten, durch eine korrekte Anzahl neuer Zellen an einer genau definierten und laufend wechselnden Position kompensiert werden (Parfitt, 1994). Gleichzeitig werden neue Blutgefäße, Nerven und Bindegewebe entsprechend der Progression der ganzen Struktur gebildet (Parfitt, 1994). Die BMU ist demnach eine funktionell komplexe, hochorganisierte anatomische Struktur im Knochen und es stellt sich die Frage nach ihrer internen und externen Regulierung. Das zentrale Nervensystem als Regulator des Knochenstoffwechsels hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass der Hypothalamus über das Hormon Leptin unter anderem auf das sympathische Nervensystem und auf die Knochenhämostasie Einfluss nimmt (Corr et al., 2017; Takeda & Ducy, 2008). Ebenso scheint das Immunsystem an der Balance zwischen Knochenauf- und -abbau beteiligt zu sein (Bozec & Zaiss, 2017). Die Forschung der letzten Jahre *in vivo* und *in vitro* hat gezeigt, dass verschiedene lokale und systemische Faktoren ebenfalls regulierend eingreifen. Zu den systemischen Faktoren gehören insbesondere Hormone wie Calcitonin, PTH, Vitamin D₃ (1,25-(OH)₂ Vitamin D₃) und Östrogen als Regulatoren der Osteoklastenaktivität (Siddiqui & Partridge, 2016). Calcitonin, Parathormon und Vitamin D₃ kontrollieren darüber den Serum Calciumspiegel (Siddiqui & Partridge, 2016). Daneben spielen Wachstumsfaktoren wie BMPs, WNTs, TGF- β , Epidermal Growth Factor (EGF), Fibroblast Growth Factors (FGFs) und Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) eine bedeutende Rolle (Siddiqui & Partridge, 2016).

Die Regulation der einzelnen Phasen der Entstehung der BMU, der BMU selber und des Bone remodeling als körperweiter Vorgang ist ein komplexer, noch nicht im Detail verstandener Vorgang, an dem verschiedene zelluläre und molekulare Signale und Signalgeber beteiligt sind (Sims & Martin, 2014), insbesondere zwischen Osteoklasten und Osteoblasten (Matsuo & Irie, 2008). Neueste Studien haben gezeigt, dass auch der direkte Zellkontakt zwischen Osteoklasten und Osteoblasten deren Funktion *in vivo* kontrolliert (Furuya et al., 2018). Furuya *et al.* (2018) konnten in einer *in vivo* Studie an Mäusen zeigen, dass reife Osteoblasten die Resorptionsaktivität von reifen Osteoklasten durch Zell-Zell-Kontakt inhibieren. Dieser Vorgang scheint besonders in der Kopplungsphase eine Rolle zu spielen (Furuya et al., 2018). Es wird damit deutlich, dass auch die Bewegung der Zellen

aufeinander zu oder voneinander weg, kurz deren Migration, von Bedeutung ist und das nicht nur für die Kommunikation oder Regulation, sondern überhaupt für die Funktionsfähigkeit einer BMU. Dieser Umstand zeigt sich auch an der Tatsache, dass einige der oben genannten Regulationsfaktoren für das Bone remodeling gleichzeitig Einflussfaktoren für die Migration von Osteoblasten sind, wie beispielweise BMPs, IGF-1 oder TGF- β (Thiel et al., 2018).

Dass die Wanderbewegung der Zellen ein entscheidender Schritt sein muss, zeigen auch Überlegungen zur Entstehung einer BMU. Nachdem Vorläuferzellen aus dem Knochenmark oder über das Gefäßsystem einwandern und differenzieren, müssen sie eine genau definierte Position in einer dreidimensionalen, sich laufend verändernden Struktur einnehmen, die mehrere hundert Mikrometer lang ist (Parfitt, 1994). Da die BMU an sich eine hochstrukturierte, anatomische Einheit darstellt, ist anzunehmen, dass die exakte Positionierung der Zellen durch Migration vom Start- zum Zielpunkt auch für eine reibungslose Funktion entscheidend ist. Um die Vorgänge in der BMU genauer verstehen zu können, ist ein Verständnis für das Migrationsverhalten von Osteoblasten im Knochen entscheidend.

2.1.4 Migration

Die Fähigkeit von Zellen der osteoblastären Linie zur Migration wurde schon 1977 von Jones & Boyde dargelegt. In ihrer elektronenmikroskopischen Untersuchung an Rattenknochen kamen sie unter anderem zu folgenden Schlüssen: Osteoblasten bewegen sich auf Knochen; Osteoblasten migrieren als einzelne Zellen oder in näherer Umgebung zueinander; in höherer Dichte und unter hormoneller Stimulation bewegen sie sich präferiert entlang von Kollagenfibrillen; Osteoblasten wandern auch auf exogenen Oberflächen wie Glas, wenn auch mit veränderter Morphologie und Migrationsverhalten (Jones & Boyde, 1977). Diese und spätere Beobachtungen festigten das Bild von Osteoblasten als Zellen mit Migrationspotenzial *in vitro* und *in vivo* (Dirckx et al., 2013; Geurtzen et al., 2014; Maes et al., 2010). Maes *et al.* (2010) konnten zeigen, dass undifferenzierte, unreife Osteoblasten effizienter migrieren als reife und dass *Osx*-exprimierende Zellpopulationen vorzugsweise in der Nähe einwachsender Gefäße zu finden waren. Letzteres macht noch einmal die große Bedeutung der Vaskularisation im Knochenstoffwechsel deutlich (Seeman, 2008). Histologische Untersuchungen zeigten zudem eine kollektive Orientierung (Schenk & Willenegger, 1964) und Migration (Jones & Boyde, 1977) der Osteoblasten passend zu der Vorstellung, dass die Migration von Zellen im Kollektiv zur Bildung von hochkomplexen Geweben wie Knochen beiträgt (Rorth, 2009). Für die Bewegung der Einzelzelle laufen eine Reihe von intrazellulären, molekularen Vorgängen ab (Petrie et al., 2009; Ridley et al.,

2003), an denen auch Integrine während der Vorwärtsbewegung maßgeblich beteiligt sind (Ulrich & Heisenberg, 2009) und die im Folgenden kurz zusammengefasst werden. Zunächst kommt es zur Polarisierung der Zelle und damit zur Ausbildung einer Front- und Rückseite. An der Frontseite bildet die Zelle Ausläufer des Zytoskeletts wie Filopoden und neue Adhäsionskontaktpunkte. Über diese bewegt sie sich vorwärts und baut nebenbei ein Aktingerüst auf, welches der nachziehenden Rückseite der Zelle als Orientierung dient und von ihr zusammen mit den Adhäsionspunkten abgebaut wird.

2.1.4.1 Chemotaxis

Die Polarisierung der Zelle – und damit der Anfang der Zellbewegung – wird durch die asymmetrische Verteilung von Oberflächenrezeptoren reguliert, die Signale zur Migration durch Ligandenbindung vermitteln (Sullivan et al., 1984). Hierbei werden grundsätzlich zwei Arten von induzierter Zellbewegung unterschieden, die Chemokinese und die Chemotaxis. Bei der Chemokinese kommt es durch eine gleichförmige Verteilung der Liganden zu einer ungerichteten Bewegung, wohingegen die Chemotaxis eine gerichtete Bewegung entlang eines Ligandengradienten darstellt (Thiel et al., 2018). Als Chemokine werden solche Liganden bezeichnet, die Zellen entlang eines Gradienten anlocken. Indem sie den Liganden-Rezeptor-Komplex endozytieren, den Liganden abbauen und den leeren Rezeptor wieder in die Zellmembran einbauen, können sich Zellen an diesen Gradienten ausrichten und ihnen folgen (Ulrich & Heisenberg, 2009). In verschiedenen *in vitro* Experimenten zur Migration von Osteoblasten, zum Beispiel in Boyden Kammern, wurden insgesamt 27 Chemokine beschrieben (Thiel et al., 2018), unter anderem BMP-4 (Fiedler et al., 2002), IGF-1 (Lind et al., 1995; Nakasaki et al., 2008; Panagakos, 1993) und TGF- β (1 und 2) (Hughes et al., 1992; Lind et al., 1995; Pfeilschifter et al., 1990).

Daneben gibt es drei Faktoren, vor allem Zytokine wie beispielsweise Interleukin-1 β (Hengartner et al., 2013), welche die induzierte Migration inhibieren können (Thiel et al., 2018) und als Repellents bezeichnet werden. Alle osteoblastenwirksamen Chemokine und Repellents können aus Zellen freigesetzt werden (Thiel et al., 2018). Welche Zellen an der Interaktion beteiligt sind, hängt dabei stark vom Ort des Geschehens im Knochen ab. Osteozyten sind auch hier wieder wichtige Einflussnehmer, da sie verschiedene Chemokine produzieren können (Bonewald, 2017; Goldring, 2015), unter anderem RANKL und PTH, und sich in der BMU in unmittelbarer Nähe von Osteoblasten und ihren Vorläuferzellen befinden.

Chemokine können aber nicht nur zellulär, sondern auch aus der Matrix freigesetzt werden, in welche sie von Osteoblasten oder auch Chondroblasten eingebaut werden (Thiel et al.,

2018). Tang *et al.* (2009) konnten *in vivo* und *in vitro* zeigen, dass durch Osteoklastenresorption freigesetztes TGF- β 1 sowohl als Migrationssignal als auch als Kopplungssignal zwischen Resorption und Formation dient (Tang *et al.*, 2009). Osteoblasten sind also Chemokinen aus verschiedenen Quellen gleichzeitig ausgesetzt und es stellt sich die Frage, wie genau sie auf unterschiedliche Signale reagieren. Studien zum Verhalten von Zellen auf multiple chemotaktische Signale *in vitro* (Foxman *et al.*, 1997; Foxman *et al.*, 1999) zeigten vier wichtige Ergebnisse: Es gibt eine Hierarchie im chemotaktischen Potenzial der einzelnen Chemokine; die Migration erfolgt entlang der Vektorsumme der einzelnen Gradienten; Desensibilisierung oder Sättigung an einem Rezeptor hebt das Migrationssignal auf; dominante Chemokine können in entsprechender Konzentration einen Bewegungsstopp initiieren. Es wird deutlich, dass Chemokine, wie Wachstumsfaktoren oder Zytokine, wichtige Signalgeber für die Migration von Osteoblasten sind.

Allerdings ist keiner der Faktoren dabei migrationspezifisch, sondern sie alle dienen als Signalgeber für multiple physiologische Prozesse im menschlichen Körper. Damit lässt sich vermuten, dass es noch andere Einflussfaktoren auf das Bewegungsverhalten von osteoblastären Zellen geben muss. Es hat sich gezeigt, dass Zellen der osteoblastären Linie nicht nur auf molekulare Signale, sondern auch auf mechanische Signale wie Druck oder Schwerkraft ansprechen (Thompson *et al.*, 2012). Thompson, Rubin & Rubin (2012) stellen in ihrem Review vier Systeme der Mechanotransduktion dar: die Integrin-Actin-Achse; Zell-Zell-Kontakte einschließlich Connexin 43; Kalzium-Kanäle und purinerge Rezeptoren; primäre Zilien. Dabei fällt auf, dass mindestens zwei der vier Systeme auch bei der Migration eine Rolle spielen. Passend zu dieser Beobachtung wurde gezeigt, dass mechanische Signale die gleichen Signalwege in der Zelle induzieren wie migrationsbezogene (Liedert *et al.*, 2006). Zusammengefasst legen die Ergebnisse nahe, dass auch mechanische Einflüsse das Bewegungsverhalten und -muster von Osteoblasten beeinflussen.

2.1.4.2 Oberflächen als Landmarken

Als dritter Einflussfaktor auf die Migration dient die Oberfläche des Knochens selbst. Osteoblasten bewegen sich auf Oberflächen mit Hilfe fokaler Adhäsionen vorwärts, gebildet durch die extrazellulären Domänen der membranständigen Integrinrezeptoren, über welche sie Oberflächen erkennen und binden können (Thiel *et al.*, 2018). Integrinrezeptoren binden dabei an die Hauptkomponenten der Knochenmatrix wie Kollagen Typ 1 oder andere nicht-kollagene Matrixbestandteile wie Osteopontin oder Fibronectin (Helfrich *et al.*, 2008). Die Vermittlung von Signalen an die Zelle über deren Interaktion mit der Oberfläche liegt daher

nahe. Tatsächlich führt die Bindung eines Liganden zur Aktivierung eines oder mehrerer intrazellulärer Signaltransduktionswege, die beispielsweise zur Regulation der Differenzierung von Osteoblasten beitragen (Helfrich et al., 2008). Der Gedanke wird weiter unterstützt durch Ergebnisse von *in vivo* Studien an Mäusen, in welchen eine Veränderung der Integrinfunktion zu veränderter Knochenbildung führte (Bouvard et al., 2007). In ihren Studien über das Migrationsverhalten von Osteoblasten konnten Jones und Boyde schon 1977 zeigen, dass sich Osteoblasten unter gewissen Bedingungen präferiert entlang von Kollagenfibrillen bewegen (Jones & Boyde, 1977). Dazu passen neuere Studienergebnisse, die zeigen, dass auch eigentlich immobilisierte Matrixproteine wie Kollagen 1 oder BMP-2 die Migration induzieren bzw. verstärken können (Sotobori et al., 2006). Immobilisierte Matrixproteine können also ebenso als haptotaktische Migrationsgradienten dienen.

Darüber hinaus könnte in diesem Prozess auch der Mineralanteil der extrazellulären Matrix eine Rolle spielen. Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang neueste Ergebnisse aus der eigenen Forschungsgruppe für experimentelle Orthopädie der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie am Klinikum rechts der Isar in München. In einem neuen Oberflächenmodell wurden MG-63 Osteosarkomzellen für 72 Stunden auf mineralisierten oder demineralisierten Knochenoberflächen kultiviert, anschließend wurde eine Microarray-Analyse zur Detektion von Gen-Expressionsunterschieden durchgeführt und einzelne, ausgesuchte Gene in einer QRT-PCR validiert. Insgesamt waren die mit Zellmigration und -adhäsion assoziierten Gene wie ADAMTS4, MMP-1 und VCAN im demineralisierten Phänotyp signifikant hochreguliert (Wischmann et al., 2018), was einen Zusammenhang zwischen der Mineralisierung des Knochens und der Migration osteoblastärer Zellen nahelegt.

Es wird deutlich, dass die Knochenoberfläche über ihre verschiedenen Anteile als wichtiger Einflussfaktor und Signalgeber für osteoblastäres Bewegungsverhalten dient und es zum genaueren Verständnis der Migration von Osteoblasten als Teil und im Rahmen des physiologischen oder pathologischen Knochenumbaus weiterer Untersuchungen bedarf. Es stellt sich die Frage nach der geeigneten Untersuchungsmethode.

2.1.5 Untersuchungsmethoden osteoblastärer Migration

Das Migrationsverhalten von osteoblastären Zellen kann generell *in vivo* oder *in vitro* untersucht werden. In beiden Fällen werden häufig mikroskopische Zeitrafferaufnahmen zur Detektion der Bewegung verwendet. Sowohl für *in vivo* als auch *in vitro* Untersuchungen stehen verschiedene Modelle mit unterschiedlichen Vor- und Nachteilen zur Verfügung.

Bei *in vivo* Modellen hat man, mehr noch als bei den etablierten *in vitro* Modellen, das Problem, Zellen in einem dreidimensionalen Raum mit dunklem Hintergrund sichtbar machen zu müssen. Um dieses Problem zu lösen, bedient man sich verschiedener Proteine wie Green fluorescent protein (GFP). Diese Proteine besitzen fluoreszierende Eigenschaften und können gen-spezifisch mit Proteinen fusioniert werden, so dass einzelne Proteine oder ganze Zellen mit Fluoreszenzmikroskopie detektierbar gemacht werden können. Als Versuchstiere werden meist transgene Mäuse oder auch Zebrafische (*Danio rerio*) verwendet, in welchen die Zielzellen das fluoreszierende Protein exprimieren. Die Migration kann dann beispielsweise in einem Frakturmodell mit Zeitrafferaufnahmen untersucht und analysiert werden (Geurtzen et al., 2014). Mit neuesten Zwei-Photonen Mikroskopen ist auch eine intravitale Darstellung von Knochenzellen möglich. Furuya *et al.* (2018) konnten mit dieser Methode nachweisen, dass Zell-Zell-Kontakte zwischen reifen Osteoblasten und Osteoklasten deren Funktion *in vivo* beeinflussen. Größter Vorteil dieser *in vivo* Methoden ist sicherlich, dass sie die physiologischen Gegebenheiten im Knochen abbilden, welche sich in einem *in vitro* Modell nicht gänzlich nachbilden lassen. Von Nachteil ist dagegen, dass sich *in vivo* Oberflächen schlecht bis gar nicht charakterisieren lassen. Zudem ist es schwierig, sie auf kontrollierte Art und Weise zu verändern und so an die gewünschten Untersuchungsbedingungen anzupassen. Beide Aspekte sind für ein oberflächenspezifisches Migrationsmodell aber notwendig.

In vivo Modelle sind, durch die Anästhesie der Versuchstiere bedingt, auf kürzere Zeiträume der Zeitrafferaufnahmen limitiert. Furuya *et al.* (2018) konnten in ihrer *in vivo* Studie Zeitrafferaufnahmen über einen Zeitraum von 6 Stunden durchführen, wohingegen *in vitro* Modelle Zeitrafferaufnahmen zwischen 22-48 Stunden erlauben (Dallas et al., 2009; Pepperell & Watt, 2013). Da die Bewegung der Zellen als Ortsänderung über die Zeit detektiert wird, ist letztere ein entscheidender Faktor und sollte bei Studien zum Migrationsverhalten so lang wie möglich gewählt werden. Auffällig ist außerdem, dass, zumindest beim live imaging von Knochenzellen, die dargestellten *in vivo* Aufnahmen häufig eine geringe Zellzahl zeigen (Furuya et al., 2018; Mizuno et al., 2018). Eine gute Detektion, Analyse und Darstellung der Zellen scheint demnach auf eine geringe Zellzahl beschränkt zu sein. Bei *in vitro* Modellen dagegen ist eine Visualisierung einer höheren Zellzahl, beispielsweise 45-50 (Pepperell & Watt, 2013), möglich.

Für die *in vivo* Darstellung von Zellen oder Proteinen wird häufig GFP als günstige und einfache Methode gewählt. Dass *et al.* (2007) konnten zeigen, dass die Expression von Knochenmarkern in osteoblastischen Zellen wie Saos-2 durch die Transfektion mit GFP verändert wird (Dass & Choong, 2007). In wieweit Reportergene auch in anderen Zellen zu Veränderungen auf molekularer Ebene führen, wird häufig nicht untersucht. Die Ergebnisse

von Dass *et al.* (2007) legen nahe, dass es durch die Transfektion der Zellen auf molekularer Ebene zu Veränderungen bei transgenen Mäusen oder Fischen kommen kann. Die Ergebnisse der Studien könnten dadurch beeinflusst und verändert werden und es stellt sich die Frage, in wieweit sie dann die echten physiologischen Vorgänge abbilden.

Ein weiterer Nachteil liegt in der Tatsache, dass die physiologischen Gegebenheiten in der Maus sich doch von denen im menschlichen Knochen unterscheiden und diese *in vivo* Modelle bis auf Weiteres nicht auf den menschlichen Knochen und damit die entscheidende Physiologie anwendbar sind. Zudem ist die Herstellung der Untersuchungstiere sehr kostenintensiv und zeitaufwendig. Die aufgezeigten Limitationen der *in vivo* Methoden machen sie für die Untersuchung der Migration auf planaren, ossären Oberflächen eher ungeeignet.

Gängige *in vitro* Methoden zur Analyse von Chemotaxis sind Zwei-Kammer-Systeme wie die Boyden-Kammer oder die Dunn-Kammer. In beiden Modellen wird die Anzahl der migrierenden Zellen aus Kammer 1 hin zu einem möglichen Chemokine in Kammer 2 gezählt und ausgewertet, wobei die zwei Kammern bei der Boyden-Kammer durch einen Filter und bei der Dunn-Kammer durch eine Brücke voneinander getrennt sind (Boyden, 1962). Die meisten Chemokine, die verantwortlich für die Osteoblastenmigration sind, wurden mit einer der beiden Methoden ermittelt (Thiel *et al.*, 2018). Alternativ dazu gibt es sogenannte Gap Closure Migrations Assays, bei denen ein Defekt in den Zellrasen gesetzt wird, welcher anschließend durch die Migration der Zellen in den Defekt geschlossen wird. Dieser Vorgang wird mikroskopisch mit Zeitrafferaufnahmen aufgenommen und die Bewegung der Zellen analysiert. Als dritte, relativ neue Methode gibt es neuartige Kammersysteme, mit denen man ebenfalls das Migrationspotential von Chemokinen mittels mikroskopischer Zeitrafferaufnahmen untersuchen kann. Mit den meisten dieser Kammersysteme sind allerdings nur lichtmikroskopische Aufnahmen möglich und damit die direkte Mikroskopie von Zellen auf dem Knochen ausgeschlossen.

Zusammengefasst gibt es aktuell keine ausreichend geeignete *in vivo* oder *in vitro* Methode, mit der die Migration fluoreszenzmarkierter, primärer humaner Osteoblasten auf verschiedenen planaren Knochenoberflächen mittels mikroskopischer Zeitrafferaufnahmen untersucht werden kann. Die Entwicklung eines solchen Modells ist für ein besseres Verständnis der Migration und des physiologischen sowie pathologischen Knochenumbaus notwendig. Ein mögliches Modell wird im Folgenden vorgestellt.

2.1.6 Neues *in vitro* Migrationsmodell

Zunächst müssen die Anforderungen an ein solches Modell festgelegt werden. Zum einen bedarf es einer geeigneten, planaren ossären Oberfläche, die in Kombination mit Zellen aus der Zellkultur verwendet und nach Wunsch des Untersuchers verändert werden kann. Zur Herstellung, Sterilisierung und Demineralisation einer solchen Oberfläche müssen geeignete Verfahren gefunden werden. Zum anderen muss in dem Modell die Verwendung und Visualisierung verschiedener Zellen möglich sein. Auch hierfür müssen geeignete Zellmarkierungsmethoden zur Darstellung der Zellen gegen den Knochen gefunden werden. Zuletzt muss es möglich sein, Zeitrafferaufnahmen der Zellen auf der Oberfläche anzufertigen. Dafür müssen geeignete Parameter evaluiert werden. Insgesamt muss der Versuchsaufbau am Ende so gestaltet sein, dass der Versuch unter sterilen Bedingungen in einer Inkubationskammer unter dem Mikroskop bei geeigneten Bedingungen durchgeführt werden kann. Im Folgenden wird ein Modell dargestellt, welches die gestellten Anforderungen erfüllt.

Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung des *in vitro* Untersuchungsmodells. Zur Mikroskopie von Osteoblasten auf Knochen bedarf es zunächst zweier Dinge: die Markierung der Zellen mit einem geeigneten Farbstoff und die Herstellung geeigneter Knochenoberflächen. Um die zu untersuchenden Zellen (1) gegen die intransparente Knochenoberfläche darstellen zu können, werden sie mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt (2), der eine optimale Detektion und Mikroskopie der Zellen erlaubt und gleichzeitig keine toxische Wirkung auf sie hat. Aus Knochen (porcine, human) (3) werden Stücke geeigneter Größe und Dicke ausgesägt, mit Peressigsäure sterilisiert und ggf. mit EDTA demineralisiert (4). Die gefärbten Zellen werden unter der Sterilbank auf den sterilen Knochen ausgebracht und über Nacht inkubiert (5). Anschließend können die Zellen auf dem Knochen in einer Inkubationskammer unter dem Mikroskop bei 37°C und 5% CO₂ über die entsprechende Dauer mit geeigneten Parametern lebend mikroskopiert und die Migration mittels Zeitrafferaufnahmen analysiert werden (6).

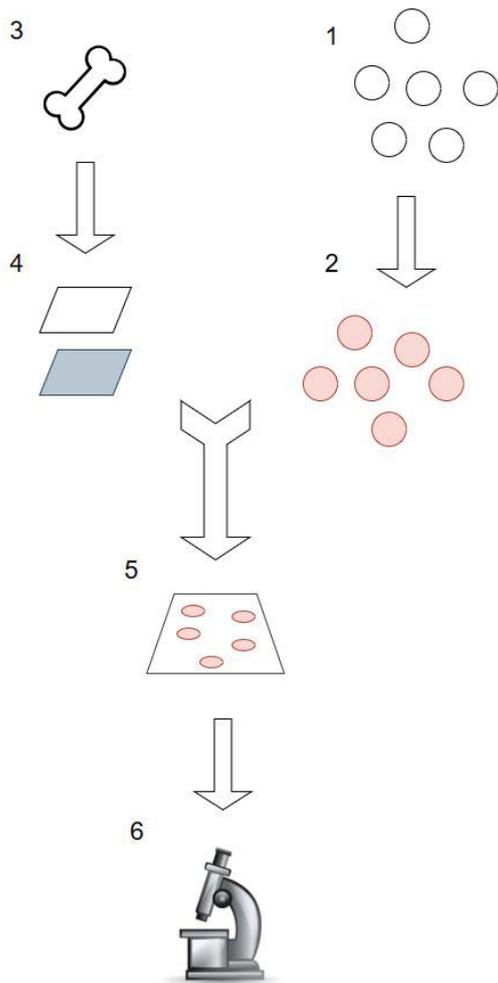


Abbildung 4: Schematische Darstellung des neuen in vitro Untersuchungsmodells, I.

Diese Abbildung zeigt die schematische Darstellung des neuen in vitro Untersuchungsmodells zur Migration von Osteoblasten. Detaillierte Erklärungen zu den einzelnen Schritten finden sich im nebenstehenden Text. Diese Grafik wurde erstellt durch die Autorin mit draw.io (<http://www.draw.io/>).

Eindeutiger Vorteil dieses Modells ist, dass sowohl die verwendeten Zellen als auch die Knochenoberfläche modifiziert werden können, um verschiedenen Stufen der ossären Entwicklung und des Knochenmilieus zu simulieren. Zusätzlich ist in diesem Modell die Verwendung von humanem Knochen und primärer humaner Knochenzellen möglich. Durch eine Mehrfachfärbung verschiedener humaner Knochenzellen kann das Zusammenspiel einzelner oder mehrerer Zelltypen analysiert und damit die physiologischen Gegebenheiten noch exakter nachgebildet werden. Und zuletzt müssen die Zellen für die Detektion mittels Fluoreszenz nicht genetisch verändert und damit eventuelle Abweichungen von nativen Phänotypen in Kauf genommen werden.

Diese Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, geeignete Fluoreszenzfärbungen zur Visualisierung von primären humanen Osteoblasten im oben skizzierten Modell zu evaluieren.

2.2 Hypothese

Die organischen sowie anorganischen Bestandteile der Knochenoberfläche sind Einflussfaktoren für das Migrationsverhalten von Osteoblasten, welches wiederum für den physiologischen Knochenumbau essentiell ist. Ein neues *in vitro* Modell mit fluoreszenzbasierter Zellmarkierung zur Visualisierung von primären humanen Osteoblasten auf planaren, ossären Oberflächen könnte geeignet sein, die Knochenoberfläche als Einflussfaktor in diesem Zusammenhang noch besser untersuchen zu können. Zur Etablierung eines solchen Modells bedarf es zunächst der Evaluation geeigneter Fluoreszenzmarkierungsmethoden. Daraus ergeben sich folgende, dieser Arbeit zu Grunde liegende Hypothesen:

1. Fluoreszenzfarbstoffe verhalten sich in Bezug auf ihre Klasse, zelluläre Toxizität, Farbkraft, Proliferationsbeständigkeit und ihres Anregungsspektrums sowie in Kombination mit verschiedenen Zelllinien unterschiedlich und sind daher nicht alle im gleichen Maß geeignet.
2. Eine systematische Analyse kann am besten geeigneten Label identifizieren.
3. Neben klassischer zellulärer Toxizität besteht die Möglichkeit der molekularen Toxizität.
4. Fluoreszenzfarbstoffe können als geeignete Alternative zu Reportergenen für die fluoreszenzbasierte Zellmarkierung von primären humanen Osteoblasten auf planaren ossären Oberflächen dienen.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Evaluation eines geeigneten Fluoreszenzfarbstoffes in Bezug auf die Toxizität, Farbkraft und dem Einfluss auf die Expression osteoblastärer Proteine in Osteosarkomzellen und primären humanen Osteoblasten. Hierzu wurden schwerpunktmäßig zwei für das Tracking von Zellen etablierte Fluoreszenzfarbstoffklassen verglichen. Als Kontrolle im Vergleich von unterschiedlich gefärbten Zellen dienten ungefärbte Zellen der jeweiligen Zelllinie.

2.3 Aufgabenstellung

2.3.1 Evaluation der Fluoreszenzfarbstoffklassen

Auf Grundlage der aufgestellten Hypothesen wurden zwei etablierte Fluoreszenzfarbstoffklassen in Kombination mit den verwendeten Zelllinien auf folgende Gesichtspunkte hin untersucht:

- 1) Quantifizierung der zellulären Toxizität der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe in Abhängigkeit ihrer Konzentration.
- 2) Visuelle und quantitative Analyse der gefärbten Zelllinien bei verschiedenen Arbeitskonzentrationen in Bezug auf folgende Fragestellungen:

Ist eine fluoreszenzbasierte Zellmarkierung von osteoblastären Zellen und primären humanen Osteoblasten mit Farbstoffen beider Farbstoffklassen möglich?

Welche Konzentration eines Farbstoffs einer Farbstoffklasse erlaubt die optimale, das heißt 100%ige Färbung der Zellen und unterscheiden sich diese innerhalb einer Farbstoffklasse in Bezug auf verschiedene Zelllinien?

Gibt es Unterschiede im Färbeverhalten der Zelllinien bei gleicher Konzentration von Farbstoffen einer Farbstoffklasse?

- 3) Identifikation von geeigneten Labels für die beiden verwendeten Zelllinien.
- 4) Visuelle und quantitative Analyse der Proliferationsbeständigkeit von Zellen mit geeigneten Labels in Bezug auf folgende Fragestellung:

Wie lange ist der Farbstoff in Zellen nachweisbar, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden und wie viele Zellen jeder Zelllinie können demnach mit einer Färbung markiert werden?

2.3.2 Evaluation des Einflusses der Label auf die Genexpression

Für die ermittelten, für beide Zelllinien verwendbaren Label sollte anschließend deren Einfluss auf die Stoffwechsel- und Zellzyklusaktivität gefärbter Zellen beider Zelllinien mit einer geeigneten Methode untersucht werden.

2.3.3 Validierung fluoreszenzbasierter Zellmarkierung auf ossären Oberflächen

Die Anwendbarkeit der evaluierten Label im Rahmen des neuen Untersuchungsmodells zur fluoreszenzbasierten Zellmarkierung von osteoblastischen Zellen und primären humanen Osteoblasten auf verschiedenen ossären Oberflächen sollte validiert werden, um die Hypothese dieser Arbeit zu prüfen.

3. Material

3.1 Zellkultur

Tabelle 1: In der Zellkultur verwendete Materialien

<i>Produktname</i>	<i>Katalognummer/Produktnummer</i>	<i>Firma</i>
Concentrate PAA	0001278723	Schülke
Destilliertes Wasser	171858002	Braun
Dexamethasone	D4902	Sigma
Dimethylsulphoxide (DMSO)	D2438	Sigma
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	P04-01501	Pan™ Biotech
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)-low glucose	D5546	Sigma
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline	D8537	Sigma
EASYstrainer™ Zellfilter, 40µm	542040	Greiner Bio-One
Fetal Bovin Serum	S 0115	Biochrome
Filter Tips 10µl - 1000µl	Variiert je nach Volumen	Greiner Bio-One
HEPES-Puffer Lösung	83264	Sigma
Kammerobjektträger, 4-Well	08 774 209	Falcon
L-Ascorbinsäure	A4544	Sigma
L-Glutamin Solution 200nM	59202C	Sigma
MEM Vitamin Solution (100x)	M6895	Sigma
Penicillin-Streptomycin	P4333	Sigma
Polystyrol Pinzetten	02171/0	J. Söllner AG
Trypanblau Lösung	T8154	Sigma
Trypsin EDTA Solution	T3924	Sigma
Zellkulturflaschen 75cm ²	658175	Greiner Bio-One
Zellkulturflaschen 175cm ²	660175	Greiner Bio-One
Zellkulturpipetten 2ml – 50ml	Variiert je nach Volumen	Greiner Bio-One
Zellkulturschalen 60x15mm	628160	Greiner Bio-One
15ml Cellstar®Tubes	188271	Greiner Bio-One
50ml Cellstar®Tubes	227261	Greiner Bio-One

3.2 Zellreihen

Tabelle 2: Verwendete Zellreihen

Zellreihe	Zelltyp	Spender
MG-63 Zellen	Human, Osteosarkom	14 Jahre Männlich
HOB (Pat.5)	Human, Osteoblasten, primär	34 Jahre Weiblich

3.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 3: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Produktname	Katalognummer	Ex (nm)	Em (nm)	Firma
CellTracker™ Blue CMAC	C2110	353	466	Thermo Fisher Scientific
CellTracker™ Green CMFDA	C2925	492	517	Thermo Fisher Scientific
CellTracker™ Red CMTPIX	C34552	577	602	Thermo Fisher Scientific
DAPI	D1306	358	461	ThermoFisher Scientific
Qtracker®525	Q25041MP	405-485	525	Thermo Fisher Scientific
Qtracker®605	Q25001MP	405-565	605	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 4: Bezeichnung der verwendeten Farbstoffe im Text

Farbstoff	Bezeichnung im Text
CellTracker™ Blue CMAC	CT blau
CellTracker™ Green CMFDA	CT grün
CellTracker™ Red CMTPIX	CT rot
Qtracker®525	QT grün
Qtracker®605	QT rot

3.4 Toxizitätsanalyse

Tabelle 5: Für die Toxizitätsanalyse verwendete Materialien

Produktname	Katalognummer	Firma
Cell Proliferation Reagent WST-1	11644807001	Roche
96-Well Cell Culture Plate, F-bottom, with Lid	655 180	Greiner Bio-One

3.5 RNA Extraktion

Table 6: Für die RNA-Extraktion verwendete Materialien

<i>Produktname</i>	<i>Katalognummer</i>	<i>Firma</i>
Chloroform	C2432-15ML	Sigma
Ethanol	64-17-5	Merck
Trizol	T9424	Sigma
RNeasy® Plus Mini Kit	74124	Qiagen
RNase-Free DNase Set	79254	Qiagen

3.6 PCR und RT-Reaktion

Table 7: Für die PCR und RT-Reaktion verwendete Materialien

<i>Produktname</i>	<i>Katalognummer</i>	<i>Firma</i>
MicroAMP® Fast 96-Well Reaction Plate (0,1mL)	4346907	Life technologies®
MicroAMP™ Optical Adhesive Film	4311971	Life technologies®
QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit	204143	Qiagen
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	205313	Qiagen
QuantiTect® Primer Assay	Variiert je nach Primer	Qiagen
Reaktionsgefäße 0,6ml	710210	Biozym
Reaktionsgefäße 1,6ml	710168	Biozym
Water, DEPC-Treated	693520	Calbiochem

3.7 Primer

Tabelle 8: Verwendete Primer

<i>Gen</i>	<i>Gen-Symbol</i>	<i>Produktname</i>	<i>Katalognummer</i>	<i>Firma</i>
Actinbeta 1	ACTB1	Hs_ACTB_1_SG QuantiTect® Primer Assay	QT00095431	Qiagen
Bone sialoprotein	IBSP	Hs_IBSP_1_SG QuantiTect® Primer Assay	QT00093709	Qiagen
Collagen Typ1 A1	COL1A1	Hs_COL1A1_1_SG QuantiTect® Primer Assay	QT00037793	Qiagen
Cyclin D1	CCND1	Hs_CCND1_1_SG QuantiTect® Primer Assay	QT00495285	Qiagen
GAPDH	GAPDH	Hs_GAPDH_1_SG QuantiTect® Primer Assay	QT00079247	Qiagen
Osteocalzin	BGLAP	Hs_BGLAP_1_SG QuantiTect® Primer Assay	QT00232771	Qiagen

3.8 Knochenmaterial

Das verwendete Knochenmaterial wurde in Form von frisch ausgelösten Tibiaknochen vom Schwein von der Firma Wilhelm März Fleischgroßhandel, München, bezogen und anschließend entweder direkt präpariert oder bei -80°C gelagert.

Tabelle 9: Zur Demineralisation verwendete Materialien

<i>Produktname</i>	<i>Katalognummer</i>	<i>Firma</i>
Ethylendiamintetraessigsäure	8040.3	Roth
Natronlauge (5N)	KK71.1	Roth

3.9 Laborgeräte, Software und Werkzeuge

Tabella 10: Verwendete Laborgeräte und Werkzeuge

<i>Name</i>	<i>Firma</i>
Analytische Waage ABC32	Scaltec
Ascent Software Version 2.4.2	ThermoFischer Scientific
Axio Cam MRc	Zeiss
Axio Cam MRm	Zeiss
Axiovert25 Zellkultur-Mikroskop	Zeiss
AxioVision SE64 Rel. 4.9	Zeiss
Captair Biocap RNA/DNA	erlab
Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Centrifuge 5424 R	Eppendorf
Centrifuge 5810 R	Eppendorf
CO ₂ - und Inkubations-Modul	Zeiss
Eismaschine	Ziegra
EXAKT 300 CL Bandsäge	EXAKT, Deutschland
Feather Disposable Scalpel	Feather
Graphpad Prism 7	Graphpad Software, Inc.
Heracell 150 Inkubator	Heraeus
Laminar Flow Sterilbank	Heraeus
Mikroskop Observer.Z1	Zeiss
Mini Spin plus	Eppendorf
MS2 Minishaker	IKA®
Multiscan Ascent Plate Reader	ThermoFisher Scientific
Nanodrop 2000 Spectrophotometer	ThermoFischer Scientific
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
PCR Thermo cycler	Hybaid
PerfectSpinP	peqlab
pH-Meter inoLab®	WTW
Polymax 1040 Schüttler	Heidolph
StepOnePlus Real-Time PCR System (PCR Cyclers)	ThermoFisher Scientific
StepOnePlus Software	ThermoFisher Scientific
Wasserbad	Grant

4. Methoden

4.1 Zellreihen

Die verwendeten Zellreihen wurden in Petrischalen oder Zellkulturflaschen mit Proliferationsmedium bei 37°C und 5% CO₂ in einem Inkubator kultiviert. Bei 80-90%iger Konfluenz oder nach 5-7 Tagen erfolgte die Subkultivierung unter sterilen Bedingungen in einer Laminar Flow Sterilbank. Für die Kultivierung der zwei Zellreihen wurden Medien mit unterschiedlicher Zusammensetzung hergestellt und verwendet (Tabelle 11).

Tabelle 11: Verwendete Zellreihen und ihre Medien

Zellreihe	Art	Medium	Zusätze
MG-63	Proliferationsmedium	DMEM-low glucose	10% FBS 1% L-Glutamin 1% Penecillin/Streptomycin
MG-63	Färbemedium	DMEM-low glucose	1% L-Glutamin 1% Penecillin-Streptomycin
HOB	Grundmedium	DMEM-calciumfrei	16% FBS 1,6% HEPES-Puffer 0,8% L-Glutamin 0,8% Penecillin/Streptomycin 0,8% MEM Vitamin
HOB	Proliferationsmedium	50ml Grundmedium + osteogene Zusätze	0,02% Dexamethason 0,5% L-Ascorbinsäure
HOB	Färbemedium	DMEM-calciumfrei	2% HEPES-Puffer 1% L-Glutamin 1% Penecillin/Streptomycin 1% MEM Vitamin

4.2 Subkultivierung

Die für die Subkultivierung benötigten flüssigen Substanzen wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert und vor der Benutzung bei 37°C im Wasserbad erwärmt.

Die Subkultivierung der MG-63 Zellreihe erfolgte bei 80-90%iger Konfluenz der Zellen und sterilen Bedingungen unter der Laminar Flow Sterilbank. Zunächst wurde das Medium aus dem Zellkulturgefäß abpipettiert und verworfen. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit Phosphate Buffered Saline (PBS), um die restlichen Mediumrückstände zu beseitigen. PBS wurde ebenfalls abpipettiert und verworfen. Für die Ablösung der adhärennten Zellen vor der

Oberfläche der Kulturgefäße wurde Trypsin hinzugegeben, durch Kippen des Kulturgefäßes gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt und die Zellen für etwa 7-9 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Trypsin wurde mit der 4-fachen Menge Kulturmedium inaktiviert und die Zellen in neue Kulturgefäße mit frischem Kulturmedium umgesetzt. Die Subkultivierung erfolgte in der Regel im Verhältnis 5:1.

Die Kultivierung der primären humanen Osteoblasten (HOB) erfolgte ausschließlich in T175 Zellkulturflaschen und ihre Subkultivierung alle 5 bis maximal 7 Tage. Auch hier wurde zunächst das Medium abpipettiert, verworfen und die Rückstände des Mediums anschließend mit PBS abgewaschen. Zur Ablösung der adhärenen Zellen wurde 5ml Trypsin verwendet und die Zellen für 5 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inaktivierung mit 5ml Grundmedium wurde die Gesamtzellzahl nach Protokoll mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde anschließend in einer Zentrifuge 5810 R (Eppendorf) für 10 Minuten mit 250rpm bei 20°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 1ml Grundmedium resuspendiert. Für die Subkultivierung der primären humanen Osteoblasten wurden maximal 800.000 Zellen in eine T175 Zellkulturflasche mit 35ml Proliferationsmedium überführt. Zu Herstellung des Proliferationsmediums wurde kurz vor dem Ausbringen der Zellen die osteogenen Zusätze Dexamethason und Ascorbinsäure zugegeben.

4.3 Zellzählung

Die Zellzählung wurde in einer Neubauer Zählkammer mit einer Tiefe von 0,100mm durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden die Zellen unter der Laminar Flow Sterilbank nach Protokoll subkultiviert, 10 Minuten bei 250rpm in der Zentrifuge 5810 R (Eppendorf) zentrifugiert und das Zellpellet resuspendiert. Anschließend wurden 2x50µl Zellsuspension entnommen und in je ein steriles Eppendorf Gefäß überführt. Zu beiden Proben wurde außerhalb der Sterilbank 50µl Trypanblau Lösung hinzu pipettiert und gemischt. Die Neubauer Zählkammer wurde vorbereitet und unter das Axiovert25 Zellkultur-Mikroskop gelegt. Im Anschluss wurden bei einer 10-fachen Vergrößerung alle 4 Eckfelder der beiden Kammern ausgezählt und die Zellzahl pro Milliliter wie Folgt berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Summe der Zellen aller Eckfeldern}}{\text{Anzahl der Eckfelder (= 8)}} \times \text{Verdünnungsfaktor (= 2)} \times 10^4$$

4.4 Fluoreszenzfärbung

Für die fluoreszenzbasierte Zellmarkierung wurden zwei Fluoreszenzfarbstoffklassen ausgesucht. CellTracker™ sind Fluoreszenzfarbstoffe, die über die Zellmembran ins Zytosol der Zellen aufgenommen werden. Intrazellulär werden sie enzymatisch durch die Glutathion-S-Transferase hydrophil und können die Zelle nicht mehr verlassen (Gonzalez et al., 2013). Im Zytosol der Zelle werden sie ebenfalls durch enzymatische Aktivität fluoreszent. Qtracker® dagegen gehören zur Farbstoffklasse der Quantum Dots (QDot). QDots sind halbleitende Nanokristalle mit sehr nützlichen photophysikalischen Eigenschaften. Qtracker® bestehen aus QDots mit einer speziellen Beschichtung, welche die Lokalisation im Zytoplasma der Zellen ermöglicht (Lin et al., 2007; Nicholls et al., 2017).

Die Färbung aller Zellen erfolgte bei sterilen Bedingungen unter der Lamina Flow Sterilbank. Nach der Färbung wurden die Zellen entweder direkt mikroskopiert, über Nacht inkubiert oder in anderen Versuchen weiterverwendet. Tabelle 13 zeigt die verwendeten Mengen Färbelösung nach Fluoreszenzfarbstoff und Kulturgefäß.

4.4.1 Färbung mit CellTracker™

Zunächst wurde für jeden CellTracker™ (CT) eine 10mM Stammlösung gemäß der dem Produkt beiliegenden Arbeitsanweisung hergestellt und bei -20°C gelagert. Für die Versuche wurde die Stammlösung aufgetaut, anschließend mit serumfreien Färbemedium bis zu den Arbeitskonzentrationen 0,01µM, 0,1µM, 1µM und 10µM (Tabelle 12) verdünnt und im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt.

4.4.1.1 *Färbung adhärenter Zellen*

Die zu färbenden Zellen wurden vor der Färbung in gewünschter Zellzahl in das entsprechende Kulturgefäß ausgebracht und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde im ersten Schritt das Proliferationsmedium abgenommen. Die vorgewärmte Farbstofflösung in Arbeitskonzentration wurde zugegeben und die Zellen für 15-45 Minuten (i.d.R. 25 Minuten) bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Im letzten Schritt wurde die Farbstofflösung abpipettiert, die Rückstände durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und frisches Proliferationsmedium hinzugegeben.

4.4.1.2 *Färbung von Zellen in Suspension*

Die in Suspension gefärbten Zellen wurden wie beschrieben subkultiviert, gezählt und die gewünschte Zellzahl in ein 15ml Falcon überführt, welches in der Zentrifuge 5810 R (Eppendorf) für 10 Minuten mit 250rpm bei 4°C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde

abgenommen, die Zellen in der vorgewärmten Farbstofflösung in Arbeitskonzentration vorsichtig resuspendiert und für 15-45 Minuten (i.d.R 25 Minuten) bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zentrifugiert, der Überstand abgenommen, die Zellen in Proliferationsmedium resuspendiert und in gewünschter Zellzahl in das entsprechende Kulturgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen über Nacht inkubiert.

4.4.2 Färbung mit Qtracker®

Für beide Qtracker® (QT) wurden Färbelösungen mit den Arbeitskonzentrationen 0,01nM, 0,1nM, 1nM und 10nM (Tabelle 12) gemäß der dem Kit beiliegenden Arbeitsanweisung hergestellt und im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt.

4.4.2.1 *Färbung adhärenter Zellen*

Die zu färbenden Zellen wurden vor der Färbung nach Herstellerangaben mit einer Zelldichte von 25x10² Zellen/cm² in das entsprechende Kulturgefäß ausgebracht und über Nacht bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Die in Arbeitskonzentration vorgewärmte Farbstofflösung wurde zugegeben und die Zellen für 45-60 Minuten bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Die Farbstofflösung wurde abgenommen, die Rückstände durch zweimaliges Waschen mit Proliferationsmedium entfernt und frisches Proliferationsmedium zugegeben.

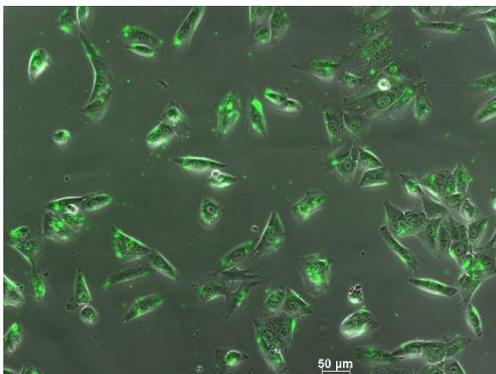


Abbildung 5: MG-63 QT grün 10nM, kombiniert

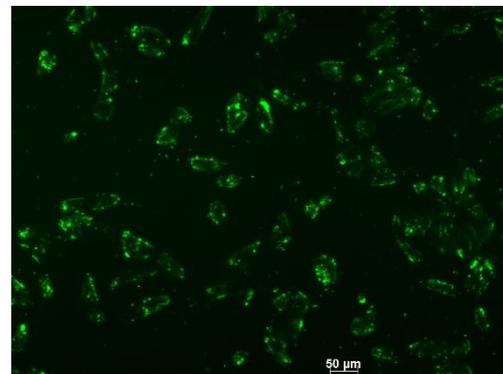


Abbildung 6: MG-63 QT grün 10nM, GFP

MG-63 Zellen wurden nach Protokoll mit QT grün 10nM gefärbt und mikroskopiert. Die Zellen wurden bei 10x Vergrößerung in Brightfield und mit dem GFP-Fluoreszenzfilter (Abbildung 6) aufgenommen und die Aufnahme kombiniert (Abbildung 5). Quelle: privat

4.4.2.2 *Färbung von Zellen in Suspension*

Die in Suspension gefärbten Zellen wurden wie beschrieben subkultiviert, gezählt und eine Zellsuspension mit 1x10⁷ Zellen/ml Kulturmedium hergestellt. Fall notwendig, wurde zur Herstellung der Zellsuspension ein Zwischenschritt mit Zentrifugation und Resuspension

gemäß der Subkultivierung durchgeführt. Im nächsten Schritt wurden 1×10^6 Zellen der Zellsuspension zur vorgewärmten Färbelösung in Arbeitskonzentration zugegeben und für 45-50 Minuten bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Zellen in der Zentrifuge 5810 R (Eppendorf) für 10 Minuten mit 250 rpm bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Rückstände durch zweimaliges Waschen mit Proliferationsmedium entfernt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in frischem Proliferationsmedium resuspendiert, in gewünschter Zellzahl in das entsprechende Zellkulturgefäß überführt und über Nacht inkubiert.

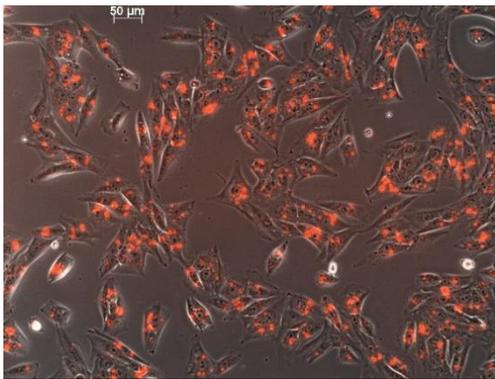


Abbildung 7: MG-63 QT rot 10nM, kombiniert

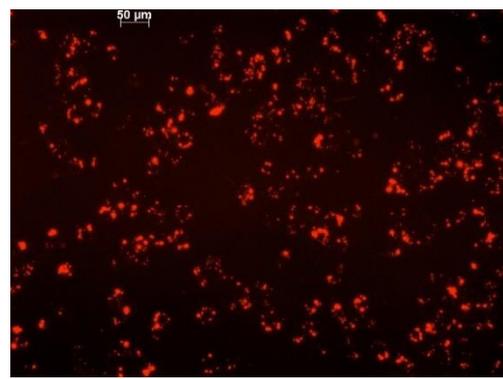


Abbildung 8: MG-63 QT rot 10nM, Texas Red

MG-63 Zellen wurden nach Protokoll mit QT rot 10nM in Suspension gefärbt und anschließend mikroskopiert. Die Zellen wurden bei 10x Vergrößerung in Brightfield und mit dem Texas Red-Fluoreszenzfilter (Abbildung 8) aufgenommen und die Aufnahme kombiniert (Abbildung 7). Quelle: privat.

Tabelle 12: Verwendete Arbeitskonzentrationen nach Fluoreszenzfarbstoffen

Fluoreszenzfarbstoff	Konzentration			
CT blau, grün und rot	0,01µM	0,1µM	1µM	10µM
QT grün und rot	0,01nM	0,1nM	1nM	10nM

Tabelle 13: Verwendete Mengen Färbemedium in µl nach Kulturgefäß

Kulturgefäß	CT blau	CT grün	CT rot	QT grün	QT rot
96-well Platte	100µl	100µl	100µl	80µl	80µl
8-well Chamber slide	200µl	200µl	200µl	200µl	200µl
4-well Chamber slide	400µl	400µl	400µl	400µl	400µl
6mm Petrischale	2000µl	2000µl	2000µl	-	-

4.5 Fluoreszenzmikroskopie

Um die Färbefizienz der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe in ihren Arbeitskonzentrationen zu analysieren, wurden MG-63 und primäre humane Osteoblasten mit allen Fluoreszenzfarbstoffen in den jeweiligen Konzentrationen gefärbt und mikroskopiert. Es wurden pro Farbe, Zellreihe und Konzentration Bilder von zufällig ausgewählten Punkten in Brightfield und in Fluoreszenz aufgenommen und die Zellzahl manuell bestimmt. Für die Auswertung wurde der Quotient aus der Zellzahl in der Brightfield- und der Fluoreszenzaufnahme gebildet und in Prozent angegeben.

4.5.1 Native Zellen

Für die CT blau, grün und rot wurden für die Mikroskopie jeweils 800.000 Zellen in eine 60mm Petrischale ausgebracht, über Nacht inkubiert und nach Protokoll für 25 Minuten gefärbt. Für die QT grün und rot wurden jeweils 40.000 Zellen/Kammer auf einen 4-Kammerobjektträger ausgebracht, über Nacht inkubiert und ebenfalls nach Protokoll für 60 Minuten gefärbt. Die Zellen wurden nach der Färbung direkt mit einem Observer.Z1 Mikroskop (Zeiss) mikroskopiert und die Bilder mit der AxioCamMR3 aufgenommen. In Kombination wurden die in Tabelle 14 angegebenen Filter entsprechend der Extinktions- und Emissionswellenlängen der Fluoreszenzfarbstoff und die in Tabelle 15 angegebenen Objektive mit Phasenkontrast verwendet. Zur digitalen Aufnahme der Bilder wurde das AxioVision SE64 Rel. 4.9 (Zeiss) Programm verwendet und die Belichtungszeit für jedes Bild automatisch für die entsprechenden Verhältnisse neu berechnet. Die Bilder wurden abschließend nachbearbeitet und der Kontrast oder die Helligkeit optimiert sowie eine Gammakorrektur vorgenommen. Häufig verwendete Darstellungsmodi mit voreingestellten Parametern waren „Best Fit“ oder „Min/Max“.

Tabelle 14: Verwendete Filtersätze

<i>Filter Sets</i>	<i>Exzitation</i>	<i>Beam Splitter</i>	<i>Emission</i>	<i>Item Nummer</i>	<i>Firma</i>
49 DAPI	G 365	FT 395	BP 445/50	488049-9901-000	Zeiss
21 HE Brightfield	BP 340/30 (HE) BP 387/15 (HE)	FT 409 (HE)	BP 510/90 (HE)	489021-0000-000	Zeiss
38 GFP	BP 470/40	FT 495	BP 525/50	000000-1031-346	Zeiss
45 Texas Red	560/40	585	630/75	000000-1114-462	Zeiss

Tabelle 15: Verwendete Objektive mit Vergrößerung und Phasenkontrast

<i>Objektiv</i>	<i>Vergrößerung</i>	<i>Phasenkontrast</i>
EC Plan-Neofluar	10x/0,30	Ph 1
LD A-Plan	20x/0.30	Ph1
LD A-Plan	32x/0,40	Ph2
LD Plan-Neofluar	40x/0.6 Korr	Ph2 M27

4.5.2 Fixierte Zellen

Teilweise war es von Interesse, ob und wie sich die Darstellung nativer Zellen von fixierten Zellen im Mikroskop unterscheiden würde. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach den Aufnahmen in nativem Zustand mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 20-25 Minuten fixiert und anschließend erneut mikroskopiert. Für die Fixierung wurde zunächst eine 8%ige PFA-Lösung durch Zugabe von PBS auf 4% verdünnt. Das Kulturmedium wurde abgenommen und die Rückstände durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die 4%ige PFA-Lösung wurde hinzugegeben und das Kulturgefäß für 20-25 Minuten auf einen Polymax 1040 Schüttler (Heidolph) mit dreidimensionaler Taumelbewegung gestellt. Nach Ablauf der Zeit wurde die PFA-Lösung abpipettiert und die Rückstände durch zweimaliges Waschen mit PBS und einen letzten Waschgang mit destilliertem Wasser entfernt. Nach dem Trocknen wurden erneut Bilder aufgenommen und mit den nativen Aufnahmen verglichen.

4.5.3 Analyse der Färbung mittels Mikroskopie

Um die Färbungen der Zelllinien mit den einzelnen Farbstoffklassen und Arbeitskonzentrationen zu analysieren, wurden die Zellen dem Protokoll entsprechend gefärbt und mikroskopiert. Dabei wurden pro Zelllinie, Farbstoff und Konzentration je 4 Aufnahmen bei einer Vergrößerung von 10x aufgenommen und ausgewertet. Für die Auswertung wurde die Gesamtzellzahl in der Brightfield- und in der Fluoreszenzaufnahme manuell bestimmt und damit der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl berechnet. Gezählt wurden dabei nur Zellen, deren Zellkern sich vollständig innerhalb des Sichtfensters befanden.

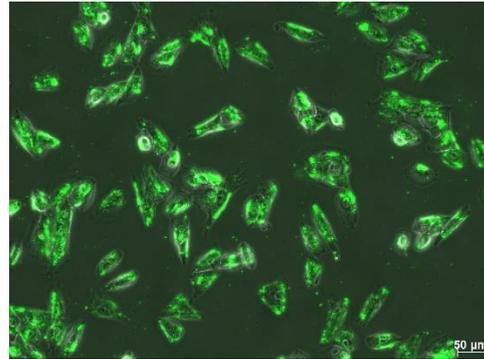
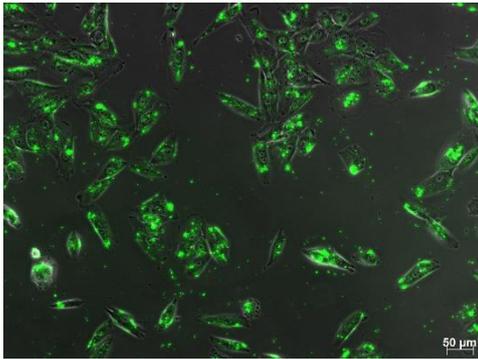
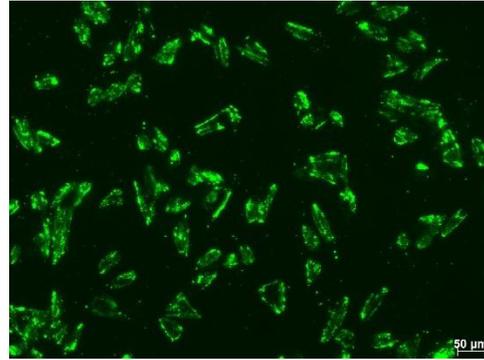
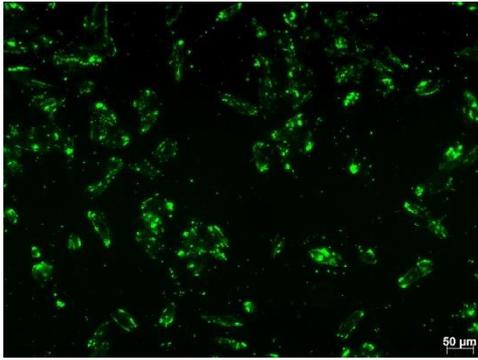


Abbildung 9: MG-63 QT grün 10nM nativ; oben GFP, unten kombiniert.

Abbildung 10: MG-63 QT grün 10nM fixiert; oben GFP, unten kombiniert.

MG-63 Zellen wurden nach Protokoll mit QT grün gefärbt, nativ mikroskopiert (Abbildung 9) und anschließend fixiert (Abbildung 10). Die Zellen wurden bei 10x Vergrößerung in Brightfield und mit dem GFP-Fluoreszenzfilter (oben) aufgenommen und die Aufnahme kombiniert (unten). Quelle: privat.

4.6 Toxizitätsnachweis

Die Toxizität der CT und QT in ihren jeweils vier Arbeitskonzentrationen wurde für die MG-63 Zellen und die primären humanen Osteoblasten getrennt voneinander mit einem WST-1 Test untersucht. Hierfür wurden pro Farbstoff und Arbeitskonzentration Proben vorbereitet und analysiert. Als Kontrolle dienen jeweils ungefärbte Zellen.

4.6.1 WST-1 Test

WST-1 gehört in die Gruppe der Mono-Tetrazoliums Salze, ist als solches wasserlöslich und dient als Indikator für eine Redox-Reaktion: In oxidiertem Zustand (WST-1) ist der Indikator farblos bis leicht rötlich, in reduziertem Zustand (Formazan) ist er tief rot und seine Extinktion kann gemessen werden. Diese Eigenschaft macht sich der Test zunutze, indem WST-1 durch Zellenzyme wie mitochondriale Dehydrogenasen oder Reduktasen zur Formazan gespalten wird, wodurch ein Farbumschlag im Medium zu beobachten ist. Durch Zunahme funktionsfähiger Zellen bei Zellwachstum wird die enzymatische Aktivität erhöht und die Menge an Formazan nimmt zu. Diese Zunahme korreliert direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen in der Kultur. Die Quantifizierung von Formazan erfolgt mittels Spektrometer, wobei die Absorption der Farblösung im Medium bei geeigneten

Wellenlängen gemessen wird. Die Absorptionswerte behandelter und unbehandelter Zellen können nun verglichen und so Rückschlüsse auf Unterschiede in der metabolischen Funktionsfähigkeit der Zellen gezogen werden.

Der WST-1 Test wurde unter einer Laminar Flow Bank durchgeführt. MG-63 Zellen und primäre humane Osteoblasten wurden nach Protokoll subkultiviert und gezählt. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 250rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die Zellen wurden in Proliferationsmedium resuspendiert und auf eine Zellzahl von 50.000 Zellen/ml gebracht. Von der Zellsuspension wurden je 100µl gemäß dem Schema in eine 96-well Mikrotiterplatte mit flachem Boden pipettiert und über Nacht bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen gemäß Protokoll mit den Färbelösungen in entsprechender Konzentration gefärbt (Tabelle 12). Bei der ungefärbten Kontrollgruppe wurde das Proliferationsmedium gewechselt und reines Proliferationsmedium als Hintergrundkontrolle hinzugefügt. Die Platten wurden im Anschluss für 48 Stunden inkubiert. Nach 48 Stunden wurden je 10µl WST-1 Reagenz pro Well zugegeben und die Platten für weitere 4 Stunden inkubiert. In diesem Zeitfenster zeigte sich der Farbumschlag (Abbildung 11). Zum Abschluss wurden die Mikrotiterplatten für 1 Minute auf einen Polymax 1050 Schüttler (Heidolph) gestellt.

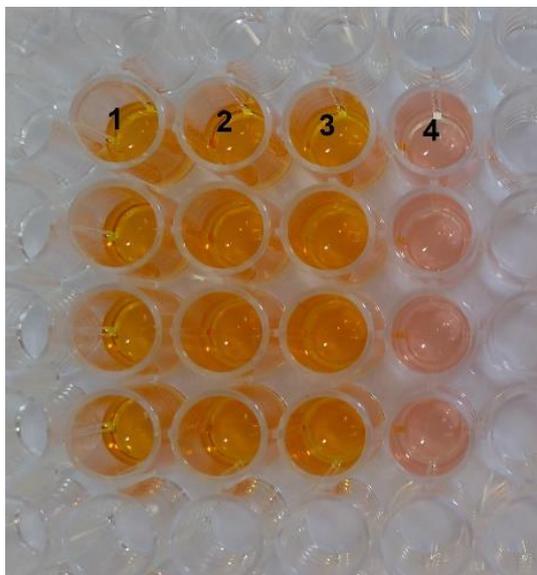


Abbildung 11: WST-1 Test nach 4 Stunden Inkubation

Abbildung 11 zeigt den Farbumschlag im Medium nach 4 Stunden Inkubation mit WST-1 Reagenz. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Proben mit Zellen (1-3) und dem Medium als Hintergrundkontrolle (4) zu sehen. Quelle: privat

Die Mikrotiterplatten wurden mit einem Multiscan Ascent Plate Reader und der Ascent Software Version 2.4.2 (ThermoFisher Scientific) ausgelesen. Gemessen wurde die Absorption bei 450nm, als Referenzwellenlänge wurde 620nm eingestellt. Von allen Werten wurde zunächst die Referenzwellenlänge, für die Kontrolle und die Proben anschließend noch der Mittelwert der Hintergrundabsorption subtrahiert. Aus den erhaltenen Werten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und die Werte nach Farbstoff und Konzentration aufgetragen.

4.7 RNA-Extraktion

Die Extraktion der RNA wurde mit einem RNeasy® Mini Kit (Qiagen) und einem RNase-Free DNase-Set (Qiagen) nach dem beiliegenden Protokoll durchgeführt und die komplette RNA extrahiert. Da RNA an sich sehr instabil ist und bei unsauberem Arbeiten leicht mit RNase kontaminiert werden kann, wurde die RNA-Extraktion unter sterilen Bedingungen in der Laminar Flow Sterilbank durchgeführt und die Arbeitsflächen sowie Handschuhe regelmäßig mit RNase-Away-Spray (Carl Roth) gesäubert.

4.7.1 Vorbereitung

Zur Versuchsvorbereitung wurden 250.000 Zellen in eine 60mm Kulturplatte ausgebracht, über Nacht inkubiert und anschließend entweder nach Protokoll gefärbt oder mit DMSO behandelt. Da die verwendeten CT und QT in lyophilisiertem Zustand in DMSO gelöst werden, wurden als Kontrolle DMSO behandelte Zellen verwendet, um den reinen Einfluss der Farbstoffe beurteilen zu können. Zu diesem Zweck wurde reines DMSO entsprechend der Farbstoffkonzentration mit Färbemedium verdünnt und die Zellen analog zur Färbedauer inkubiert. Anschließend wurde sie zweimalig mit PBS gewaschen und frisches Proliferationsmedium zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde die RNA extrahiert, wobei wegen der niedrigeren Teilungsrate bei den primären humanen Osteoblasten jeweils zwei Platten mit initial 250.000 Zellen pro Phänotyp verwendet wurden.

4.7.2 Durchführung

Im ersten Schritt wurden die Zellen nach Protokoll trypsiniert, das Trypsin neutralisiert und die Zellen für 10 Minuten bei 250rpm und 20°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und die Zellen in 1ml Trizol resuspendiert. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen lysiert und in ein 1,5ml Eppendorf Gefäß überführt. Zu jeder Probe wurde 200µl Chloroform hinzugefügt, kurz gevortext und anschließend für 15 Minuten bei 12000rpm und 4°C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation bildete sich in den Eppendorf Gefäßen ein wässriger Überstand, der vorsichtig abgenommen und in ein

steriles 1,5ml Eppendorf Gefäß mit jeweils 600µl 70%igem Ethanol gegeben wurde. Im nächsten Schritt erfolgte die Isolation der RNA. Hierzu wurde zunächst die Silika-Membran-RNA-Bindungssäule, welche dem Kit beilag, mit dem Inhalt der Eppendorf Gefäße beladen. Zur Reinigung der RNA auf den Säulen wurden diese danach mehrmals mit den dem Kit beiliegenden Puffern (RW1 Puffer und RPE Puffer) gewaschen und durch Zugabe von 80µl DNase aus dem RNase-Free DNase-Set (Qiagen) auch von verunreinigter DNA befreit. Im letzten Schritt wurde 40µl RNase-freies destilliertes Wasser hinzugefügt und die Eppendorf Gefäße nochmals für 60 Sekunden bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurde die Gesamt-RNA aus der RNA-Bindungssäule ausgelöst und in neue 1,5ml Reaktionsgefäße transferiert.

Um die RNA-Konzentration zu messen und Verunreinigungen durch Trizol zu detektieren, wurden aus jeder Probe 1,8µl in einem NanoDrop 2000 Spektralphotometer (ThermoFischer) analysiert. Die Kalibrierung erfolgte mit RNase-freiem Wasser. Im Anschluss wurden die Proben auf das Messfeld des Spektralphotometers pipettiert und die RNA-Konzentration aus der Absorption des Lichts berechnet.

4.8 RNA-Transkription

Die extrahierte RNA der Phänotypen wurde direkt nach der Extraktion mit einem QuantiTec® Reverse Transcription Kit (Qiagen) und einem Thermocycler in cDNA umgeschrieben. Es wurde dabei nach den beiliegenden Arbeitsanweisungen vorgegangen.

Ziel der reversen Transkription ist es, die mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben (Mülhardt, 2006b), um im letzten Schritt die Menge der cDNA in der PCR zu quantifizieren und damit eine Aussage über die vorhandene Menge des entsprechenden Gens treffen zu können (Schalasta, 2009). Wichtigstes Enzym bei diesem Vorgang ist die reverse Transkriptase und im Besonderen ihre Aktivität als RNA-abhängige-DNA-Polymerase und RNase (Mülhardt, 2006b). Im ersten Schritt wurde die RNA von Verunreinigungen durch DNA gesäubert. Hierfür wurde der RNA eine Puffer-Lösung (cDNA Wipeout Buffer) und Wasser zugegeben und bei 42°C für 2 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die reverse Transkriptase (RT), eine Pufferlösung und der Primer-Mix dazu pipettiert und bei 42°C für 15 Minuten im Thermocycler inkubiert. Ausgangspunkt für die reverse Transkription ist die Anlagerung des Primers an den Poly-A⁺-Schwanz der mRNA (Mülhardt, 2006b). Von diesem Startpunkt aus kann die reverse Transkriptase als RNA-abhängige-DNA-Polymerase die Synthese einer komplementären Polynukleotid-Sequenz in 5'→3' Richtung beginnen und es entstehen RNA-cDNA-Hybridstränge. In ihrer zweiten Funktion als RNase H zersetzt die reverse Transkriptase die mRNA Stränge des RNA-DNA-

Hybridstranges, so dass zuletzt die synthetisierte cDNA vorliegt. Diese wurde entweder direkt für die QRT-PCR verwendet oder zwischenzeitlich bei -20 °C gelagert.

4.9 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (QRT-PCR)

4.9.1 Grundlagen

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von DNA *in vitro*. Dabei können je nach verwendetem Primer ganze Gene, Teile von Genen oder auch nicht-kodierende DNA-Sequenzen mit bis zu dreitausend Basenpaaren in einer Standard-PCR vervielfältigt werden. Wichtigstes Enzym bei dieser Reaktion ist DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase), ein hitzestabiles Enzym, welches die durch die Primer determinierten DNA-Sequenzen repliziert. Ein PCR-Prozess beinhaltet, je nach Protokoll, bis zu 50 Zyklen, wobei ein Zyklus aus je drei Reaktionsschritten besteht. Jeder Schritt benötigt dabei eine optimale Umgebungstemperatur, so dass die PCR in einem Thermocycler durchgeführt wird, der über seinen Heizblock die optimalen Bedingungen herstellt. Die drei Reaktionsschritte sind im Einzelnen (Mülhardt, 2006a):

1. Denaturierung: Im ersten Schritt wird die Probe auf 94°C erhitzt, wodurch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen aufbrechen und diese dann als Einzelstrang-DNA vorliegen. Zu Beginn des PCR-Prozesses wird dieser Schritt häufig verlängert durchgeführt als sog. initiale Aktivierung, um sicher zu stellen, dass sich sowohl Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander gelöst haben und Einzelstränge vorliegen. Das anschließende schnelle Abkühlen dient dazu, die erneute Bildung von DNA-Doppelhelices zu verhindern.
2. Hybridisierung: Die Temperatur wird etwa 30 Sekunden auf einem geeigneten Niveau gehalten, damit sich die Primer an die entsprechenden DNA-Sequenzen anlagern können. Primer selbst sind Oligonukleotiden, die sich an das 3' Ende der DNA anlagern und so mit ihrem 3'-OH-Ende den Startpunkt der Replikation für die DNA-Polymerase markieren.
3. Elongation: Die DNA-Polymerase verlängert vom Primer ausgehend den Gegenstrang entlang des DNA-Stranges mit freien Nukleotiden und es entsteht eine Doppelstrang-DNA.

Seit der Erstbeschreibung dieser Methode Mitte der 80er Jahre (Mullis et al., 1992) wurde die klassische PCR erweitert und verbessert, beispielsweise in Form der in dieser Arbeit angewandten quantitativen Real Time-PCR (QRT-PCR). Bei dieser Methode kann die DNA

über einen mit der DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, in dieser Arbeit QuantiTec® SYBR® Green (Qiagen), markiert und so die Menge an amplifizierter DNA über die Zunahme der im Spektrometer gemessenen Fluoreszenzintensität nach jedem Zyklus in Echtzeit quantifiziert werden (Mülhardt, 2006a).

4.9.2 Durchführung

Die QRT-PCR wurde mit der synthetisierten cDNA und einem QuantiTec® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen) kombiniert mit dem QuantiTec® Primer Assay (Qiagen) durchgeführt. Es wurde dabei nach den beiliegenden Arbeitsanweisungen vorgegangen. Für die Amplifikation jedes Primers wurden in einem Reaktionsgefäß je 10µl QuantiTec® SYBR® Green PCR Master Mix, 2µl QuantiTec® Primer Assay, 2µl cDNA und 6µl RNase-freies Wasser gemischt. Für die QRT-PCR wurde ein StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems), StepOnePlus Software und die sechs in der folgenden Tabelle (Tabelle 16) gelisteten Primer des QuantiTec® Primer Assays (Qiagen) benutzt.

Tabelle 16: In der QRT-PCR amplifizierte Gene mit Gensymbolen

<i>Gen</i>	<i>Gen-Symbol</i>
Actinbeta 1	ACTB
Bone sialoprotein	IBSP
Collagen Typ1 A1	COL1A1
Cyclin D1	CCND1
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	GAPDH
Osteokalzin	BGLAP

In dieser Arbeit wurden die QRT-PCR Analysen wie folgt durchgeführt (Tabelle 17).

Tabelle 17: Verwendeter Temperatur-Zyklus der QRT-PCR

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
Initialer Aktivierungsschritt	95°C	15 Minuten
1. Denaturierung	94°C	15 Sekunden
2. Primerhybridisierung	55°C	30 Sekunden
3. Extension	72°C	30 Sekunden
Anzahl der Zyklen (Schritt 1.-3.)	40	

4.9.3 Datenanalyse

Für die Analyse der QRT-PCR Daten wurde für jede Probe die gemessenen Intensitäten gegen die Zyklusanzahl aufgetragen, wobei sich ein sigmoider Verlauf zeigte. In Abbildung 12 ist eine Analyse schematisch dargestellt. Um zu detektieren, in welchem Zyklus der Fluoreszenzwert einer Probe zum ersten Mal exponentiell über den Hintergrundwert steigt, wird der Threshold-cycle-Wert (Ct) bestimmt (Schalasta, 2009). Im Vergleich der Ct-Werte zweier Proben zeigt sich demnach, welche Probe vor Beginn der Amplifikation mehr Template-DNA enthielt. Es wurde dabei vorausgesetzt, dass beide Amplifikationen mit der gleichen Effizienz erfolgten.

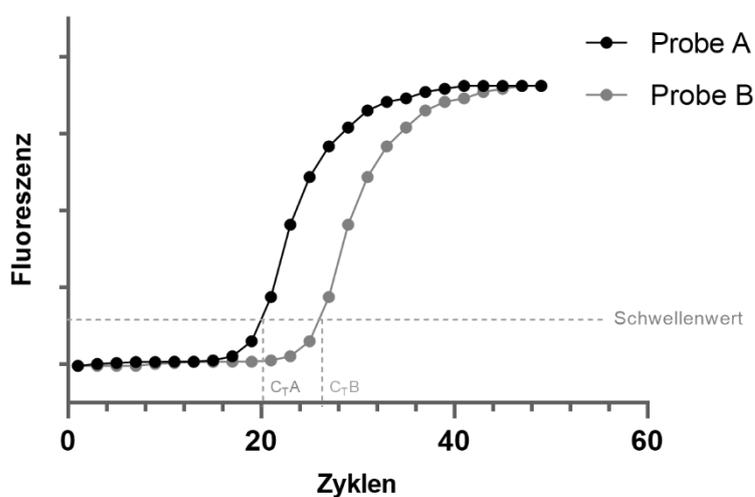


Abbildung 12: Ergebnis einer QRT-PCR in schematischer Darstellung

Die Kurven zeigen den Verlauf der gemessenen Fluoreszenzintensität (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Zyklusnummer (X-Achse) für Probe A und Probe B. Quelle: Graphik erstellt durch die Autorin mit GraphPad Prism 7

Es gibt verschiedene Rechenmodelle, die für die Quantifizierung benutzt werden können. In dieser Arbeit wurde die QRT-PCR mittels relativer Quantifizierung basierend auf der von Livak und Schmittgen (Livak & Schmittgen, 2001) beschriebenen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet. Die mit DMSO behandelten Zellen dienten dabei als Kontrolle und die Genexpression der gefärbten Proben wurde relativ zu dieser berechnet (Schmittgen & Livak, 2008). Die Normalisierung der Ergebnisse einer QRT-PCR kann auf verschiedene Weisen durchgeführt werden (Bollmann et al., 2012). In dieser Arbeit wurden die für die relative Quantifizierung notwendigen internen Referenz-Kontrollen, sogenannte house-keeping-genes (HKG), in Form von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Actinbeta 1 (ACTB) verwendet und in der QRT-PCR für alle Phänotypen ermittelt. Für die relative Quantifizierung wurden die ΔCt -Werte, $\Delta\Delta Ct$ -Werte und die relative Gen-Expression (RQ) bzw. der Foldchange (FC) der untersuchten Gene (X) wie folgt errechnet:

$$\Delta Ct_{\text{Färbung/Kontrolle}} = \text{Mittelwert}_{Ct_{Tx}} - \text{Mittelwert}_{Ct_{HKG}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Färbung}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}}$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

4.10 Time-Label-Loss

Um zu detektieren, wie lange verschiedene Farbstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen in einer gefärbten Zellkultur nachweisbar sind, wurden MG-63 Zellen und primäre humane Osteoblasten entsprechend gefärbt und anschließend solange in Subkultur zwischen 30-80% und damit in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten, bis in der Fluoreszenzmikroskopie kein Label mehr detektierbar war.

Zur Vorbereitung wurden MG-63 Zellen und primäre humane Osteoblasten nach Protokoll subkultiviert, gezählt und jeweils 272.500 Zellen in eine 6cm Kulturschale mit frischem Proliferationsmedium ausgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden wurden die Zellen nach Protokoll gefärbt und anschließend mikroskopiert. Hierbei wurden Brightfield- und Fluoreszenzaufnahmen an unterschiedlichen Orten der Platte in 5- und 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen wieder in den Inkubator gestellt, jeden Tag mikroskopiert und auf Konfluenz kontrolliert. Bei einer Konfluenz von maximal 80% wurden die Zellen wie oben beschrieben mikroskopiert, subkultiviert und anteilig in eine neue 60mm Kulturplatte überführt.

4.11 Knochenmodell

Als Knochenmaterial wurde unbehandelte Tibia vom Schwein verwendet, die nach Bezug entweder direkt präpariert oder bei -80°C gelagert und nach dem Auftauen bei 4°C präpariert wurde.

4.11.1 Präparation

Im ersten Schritt wurde das restliche, den Knochen umgebende, Gewebe mit einem Skalpell und einer Pinzette entfernt und der Knochen mit einer handelsüblichen Handsäge in kleinere Teilstücke zerlegt (Abbildung 14).

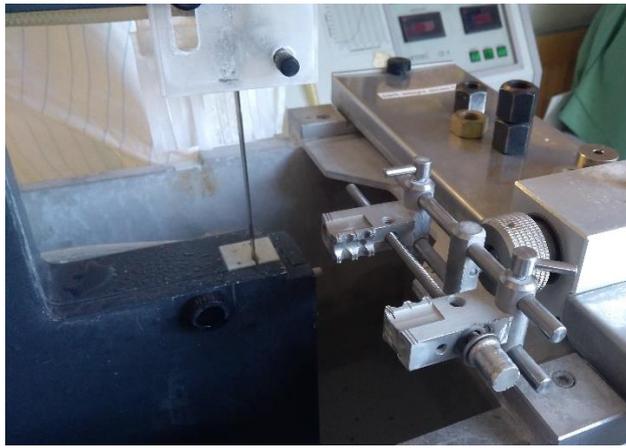


Abbildung 13: EXACT 300 Bandsäge ohne Knochen.

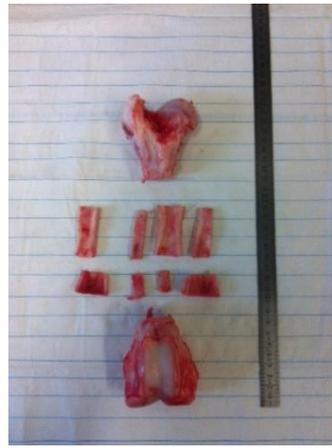


Abbildung 14: Präparierte Schweinetibia



Abbildung 15: EXACT 300 Bandsäge mit Knochen

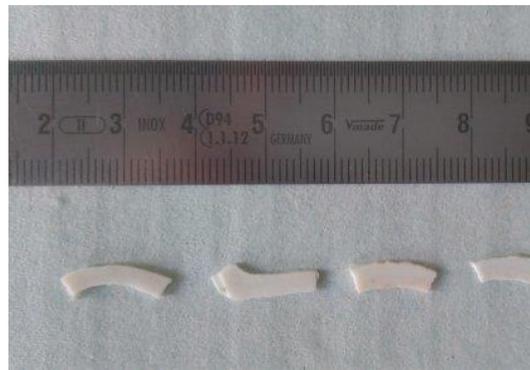


Abbildung 16: Fertige Knochenscheiben, 1mm Dicke

Quelle Abbildung 13-16: privat

Anschließend wurden aus den Knochenstücken etwa 0,5 x 1cm große und 1mm dicke Scheiben gesägt (Abbildung 16). Hierfür wurde eine EXAKT 300 CL Bandsäge verwendet (Abbildung 13), der Knochen in die verstellbare Halterung eingespannt und fixiert (Abbildung 15). Das Sägeblatt bestand aus einem Diamantschleifblatt und lief mit einer Geschwindigkeit von 560m/min. Über Gegengewichte konnte die Geschwindigkeit, mit welcher der Knochen durch das fixierte Sägeblatt gezogen wurde, reguliert werden.

4.11.2 Demineralisation

Die Demineralisation von Knochen mittels EDTA ist ein standartmäßiges Verfahren zur Aufbereitung von Knochengewebe und findet heutzutage in vielen Bereichen der Histologie und Histopathologie routinemäßig Anwendung. Von einer signifikanten Beeinflussung der Gewebeintegrität mit Ausnahme des Minerals ist dabei nicht auszugehen (Abrantes et al., 2017; Wischmann et al., 2018). Als Chelatbildner formt EDTA Komplexe mit Kalzium, welches im Knochen verbaut ist, und löst diese heraus. Die einzelnen Knochenscheiben wurden mit 0,5M EDTA über 16 Stunden bei Raumtemperatur demineralisiert. Hierfür

wurden die Scheiben in einem 1,5 ml Eppendorf Gefäß platziert und anschließend mit 0,5M EDTA bedeckt. Nach der Demineralisation wurde EDTA abpipettiert und der Knochen sterilisiert.

4.11.3 Sterilisation

Das mineralisierte oder zuvor demineralisierte Knochenmaterial wurde mit Peressigsäure (PAA) sterilisiert. Dieses Verfahren ist getestet und zuverlässig (Pruss et al., 2001). Mineralisierte und demineralisierte Knochenscheiben wurde in 1,5 ml Eppendorf Gefäßen platziert und diese mit 2%iger PAA aufgefüllt. Anschließend wurden die Gefäße für einen Zeitraum von 16 Stunden bei Raumtemperatur auf einem rotierenden Plattformschüttler positioniert und der Knochen sterilisiert. Der folgende Waschschrift mit PBS dauerte ebenfalls 16 Stunden. Der sterilisierte Knochen wurde nach dem Waschen direkt zur Mikroskopie verwendet.

4.12 Mikroskopie auf dem Knochen

4.12.1 Vorbereitung

Zur Vorbereitung der Mikroskopie wurde der Knochen nach Protokoll zunächst demineralisiert, falls notwendig, und dann mit 2%iger PAA sterilisiert. Der sterile Knochen wurde unter der Laminar Flow Sterilbank in einer Kammer eines 4-Kammerobjektträger platziert. Die MG-63 Zellen und primäre humane Osteoblasten wurden zur Vorbereitung in 60mm Kulturschalen ausgebracht und in diesen nach einer 12 stündigen Inkubationszeit protokollkonform gefärbt, bevor sie in entsprechender Zellzahl zu dem sterilisierten Knochen in eine der Kammern pipettiert wurden. Hierbei wurde für jede Zellreihe und jede Knochenoberfläche (mineralisiert/demineralisiert) jeweils ein Knochen mit einer hohen und einer niedrigen Zelldichte präpariert. Zur Simulation einer hohen Zelldichte wurden 180.000 Zellen/Kammer, zur Simulation einer niedrigen Zelldichte 90.000 Zellen/Kammer auf den Knochen gegeben. Zur Kontrolle wurden ungefärbte Zellen verwendet und entsprechend den gefärbten Zellen auf den verschiedenen Knochenoberflächen ausgebracht.

4.12.2 Mikroskopie

Nach einer Ruhezeit von 12 Stunden wurden die Zellen zunächst nativ auf dem Knochen mikroskopiert. Dafür wurde der Knochen in dem Kulturgefäß gewendet, so dass die mit Zellen besiedelte Oberseite nun unten lag. Anschließend wurden nach Protokoll Fluoreszenzaufnahmen in drei verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen (10-fach, 20-fach und 32-fach). Nach den Nativaufnahmen wurde der Knochen und die darauf siedelnden Zellen mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung (PFA-Lösung) fixiert, indem das Medium abpipettiert, 500µl PFA-Lösung je Kammer hinzugefügt und das Kulturgefäß für 30

Minuten auf einen Plattenschüttler gestellt wurde. Im nächsten Schritt wurde die PFA-Lösung abpipettiert und der Knochen zweimal mit PBS gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Zellen zur Kontrolle noch mit DAPI gefärbt. Hierfür wurde eine 300µM Färbelösung hergestellt und je 750µl/Kammer hinzugegeben. Der Farbstoff wurde für 5 Minuten im Dunkeln auf einem Plattenschüttler inkubiert und dann wieder abpipettiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die fixierten Zellen auf dem Knochen erneut nach Protokoll mikroskopiert.

4.13 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden mit dem Programm GraphPad Prism 7 und 8 statistisch ausgewertet und die dazugehörigen Graphen erstellt. Es sind, wenn nicht anders angegeben, die Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ($N \geq 3$) dargestellt. Bei Vergleichen zweier Gruppen wurde, wenn nicht anders angegeben, zur Untersuchung von Signifikanzen ein t-Test für unverbundene Stichproben angewendet. Zur Prüfung von signifikanten Unterschieden zwischen multiplen Mittelwerten bei mehr als zwei Gruppen $N \geq 3$ bedurfte es eines zweiteiligen Vorgehens. Im ersten Schritt der statistischen Analyse wurden mit einer einfaktoriellen ANOVA für multiple Mittelwertvergleiche die Ergebnisse auf signifikante Unterschiede der Mittelwerte der Proben und der Kontrolle verglichen. Dieser Test zeigt an, ob und nicht wo ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten besteht. Im zweiten Schritt wurden dann die Mittelwerte mit einem post-hoc Turkey-Test oder Dunnett-Test auf Signifikanz im Vergleich untereinander bzw. zur Kontrolle getestet.

Um zu überprüfen, ob die gemessene Absorption im WST-1 Test mit der verwendeten Arbeitskonzentration der Fluoreszenzfarbstoffe in Beziehung stehen und als Gerade abgebildet werden können, wurde zusätzlich zu der ANOVA eine Regressionsanalyse durchgeführt. Sie untersucht die Beziehung zwischen einer abhängigen Variable, in diesem Fall die gemessene Absorption, und einer unabhängigen Variable, hier die verwendete Arbeitskonzentration der Farbstoffe (Backhaus et al., 2008). In dieser Arbeit sollte damit geprüft werden, ob eine Kausalbeziehung zwischen der Farbstoffkonzentration und der Absorption besteht. Der Regressionskoeffizienten R^2 gibt dabei den Effekt einer Änderung der unabhängigen Variablen auf die abhängige Variable an. Er wird mit Hilfe eines t-Test auf Signifikanz im Vergleich zum Wert 0 getestet (Backhaus et al., 2008). In allen statistischen Auswertungen wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen. Für alle Abbildungen gilt, wenn nicht anders angegeben, folgende statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, n.s. = nicht signifikant.

5. Ergebnisse

5.1 Evaluation der Fluoreszenzfarbstoffklassen

Als Alternativen zu fluoreszierenden Reportergenen wurden zwei Fluoreszenzfarbstoffklassen, CellTracker™ und Qtracker®, auf ihre Anwendbarkeit im beschriebenen Modell hin evaluiert. Da ein Vorteil des Modells die Verwendungsmöglichkeit von primären humanen Osteoblasten ist, wurden diese zuerst untersucht.

5.1.1 Primäre humane Osteoblasten

Zunächst wurde die Farbstoffklasse der CellTracker™ auf ihre Verwendbarkeit mit primären humanen Osteoblasten hin geprüft.

5.1.1.1 CellTracker™

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich primäre humane Osteoblasten mit allen drei Fluoreszenzfarbstoffen der CT anfärben lassen und als Alternative zu fluoreszierenden Reportergenen in Betracht kommen. Alle CT färbten das Zytosol der Zellen bis in ihre Fortsätze vollständig an, CT blau und grün auch den Zellkern. Zur exakteren Evaluation wurden Toxizitäts- und Färbeanalysen in je vier Arbeitskonzentrationen pro Farbstoff durchgeführt.

Toxizitätsanalyse

Zur Analyse der Toxizität der CT wurde ein WST-1 Test in Abhängigkeit der Arbeitskonzentration, wie in 4.6 beschrieben, durchgeführt. Mit einem ANOVA-Test für multiple Mittelwertvergleiche wurden die Werte auf signifikante Unterschiede der Mittelwerte verglichen. Für die Kontrolle, im Weiteren als *Zellen w/o* bezeichnet, wurden die Absorptionswerte aller Kontrollen addiert und der Mittelwert mit Standardabweichung gebildet. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der WST-1 Tests für die primären humanen Osteoblasten in Abhängigkeit der verwendeten Arbeitskonzentrationen der CT. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden in der Graphik entsprechend ihrer sichtbaren Fluoreszenzfarbe beschriftet, ungefärbte Kontrollen als *Zellen w/o*. Auf der Y-Achse ist dabei die Absorption und auf der X-Achse die analysierten Proben aufgetragen.

Im WST-1 Test zeigte sich für die Färbung von primären humanen Osteoblasten mit CT (Abbildung 17) für CT blau bei der Arbeitskonzentration 0,01 μ M (1) keine signifikante Reduktion ($p>0,05$) der Absorption im Vergleich zur Kontrolle, für die Färbung mit CT grün und CT rot dagegen eine signifikante Erhöhung um 17,1% ($p<0,05$) bzw. 17,0% ($p<0,05$) (1). Bei der Arbeitskonzentration von 0,1 μ M waren die Absorptionswerte für alle drei Farbstoffe nicht signifikant reduziert ($p>0,05$) (2), ebenso für die Färbung mit CT blau 1 μ M ($p>0,05$) (3). Für CT grün und CT rot war die Absorption bei der Färbung mit 1 μ M um 19,8% ($p<0,01$) bzw. 22,4% ($p<0,01$) (3) und bei 10 μ M um 20,8% ($p<0,01$) bzw. 26,20% ($p<0,001$) signifikant reduziert (4). CT blau zeigte keine signifikante Abnahme der Absorptionswerte bei 10 μ M (4).

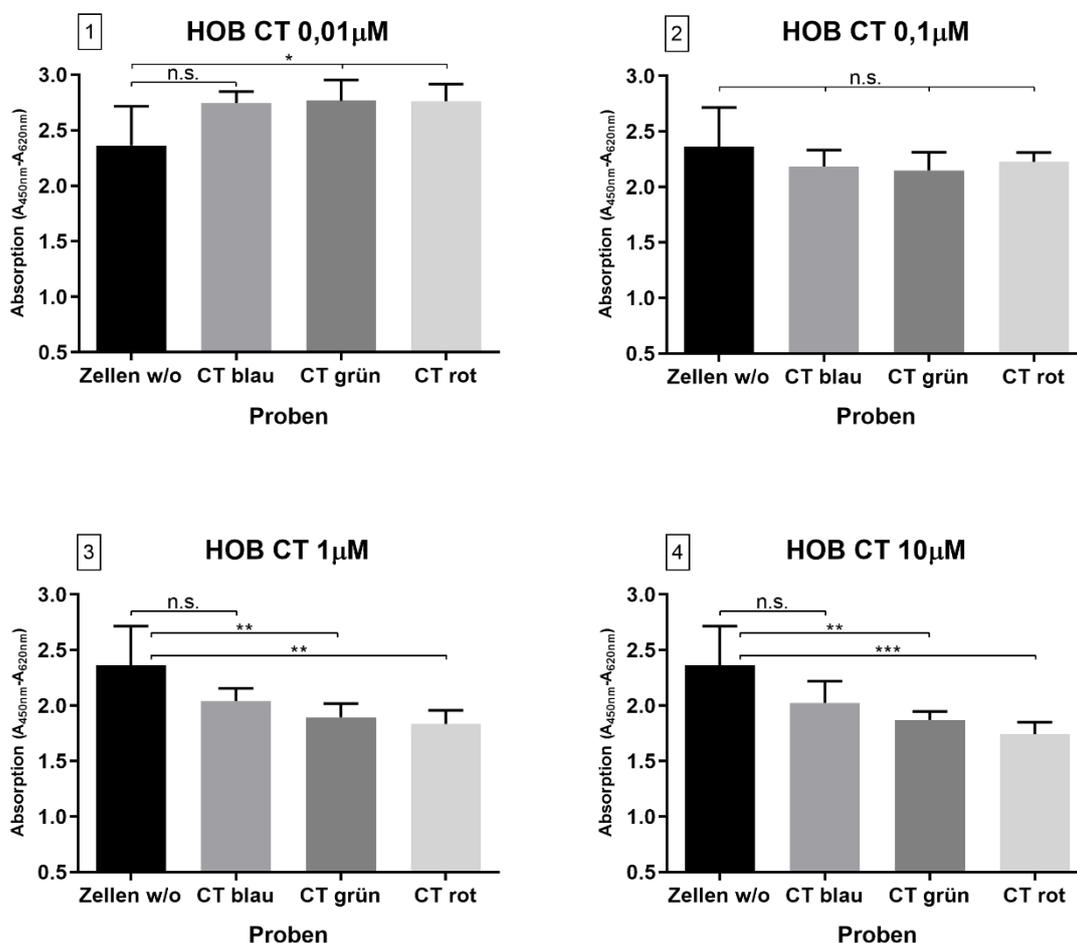


Abbildung 17: Ergebnisse des WST-1 Test für CT und HOB

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse des WST-1 Test der primären humanen Osteoblasten mit der Farbstoffklasse der CT in Abhängigkeit ihrer Arbeitskonzentration (1-4) und im Vergleich mit ungefärbten primären humanen Osteoblasten als Kontrolle (Zellen w/o). Alle Werte stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens vier unabhängigen Versuchen ($N\geq 4$) dar. Statistische Signifikanz: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$, n.s. = nicht signifikant.

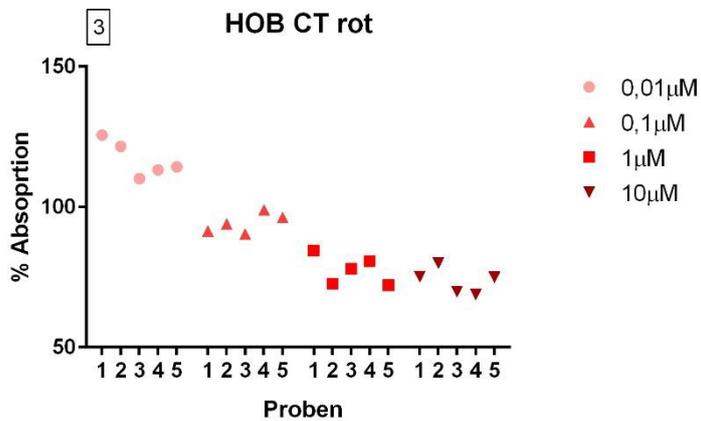
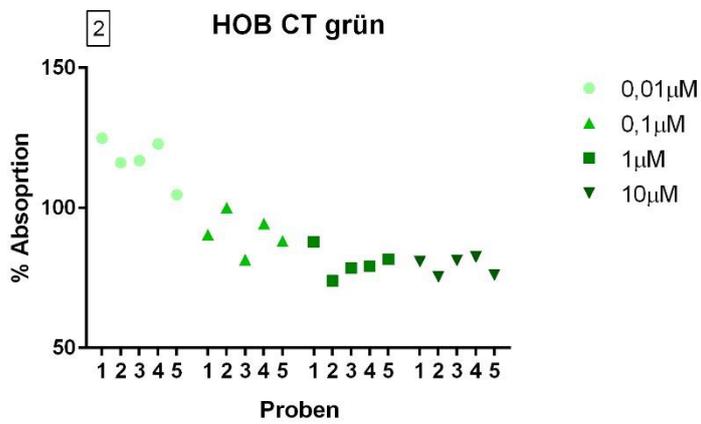
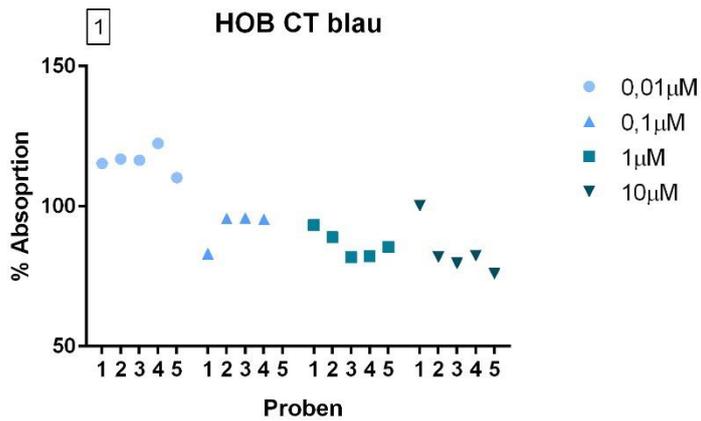


Abbildung 18: Ergebnisse der WST-1 Tests mit HOB nach CT

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse der WST-1 Tests mit primären humanen Osteoblasten für CT blau (1), CT grün (2) und CT rot (3). Die Absorptionwerte der einzelnen Proben wurden dabei als prozentualer Anteil am Mittelwert der Absorptionwerte aller Kontrollen aufgetragen.

In der Analyse der linearen Regression waren die R^2 -Werte für alle drei CT signifikant unterschiedlich zu null, dabei galt CT blau $R^2=0,257$ ($p<0,05$), CT grün $R^2=0,259$ ($p<0,05$) und CT rot $R^2=0,376$ ($p<0,01$).

Analyse der Färbung

Um einen geeigneten Farbstoff zu identifizieren, spielt neben der Toxizität auch die Qualität der Färbung eine entscheidende Rolle. Um Letztere zu prüfen, wurde die Analyse der Färbung von primären humanen Osteoblasten mit den CT in den entsprechenden Arbeitskonzentrationen wie beschrieben durchgeführt. Es wurde der Mittelwert mit Standardabweichung gebildet und statistisch ausgewertet (siehe 4.13). Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Färbeanalyse der CT mit primären humanen Osteoblasten entweder in Abhängigkeit ihrer Arbeitskonzentrationen oder ihrer Farbstoffe. In den Diagrammen sind auf der Y-Achse der Anteil gefärbter Zellen an der Gesamtzellzahl in Prozent und auf der X-Achse entweder die Farbstoffe oder die Konzentrationen aufgetragen.

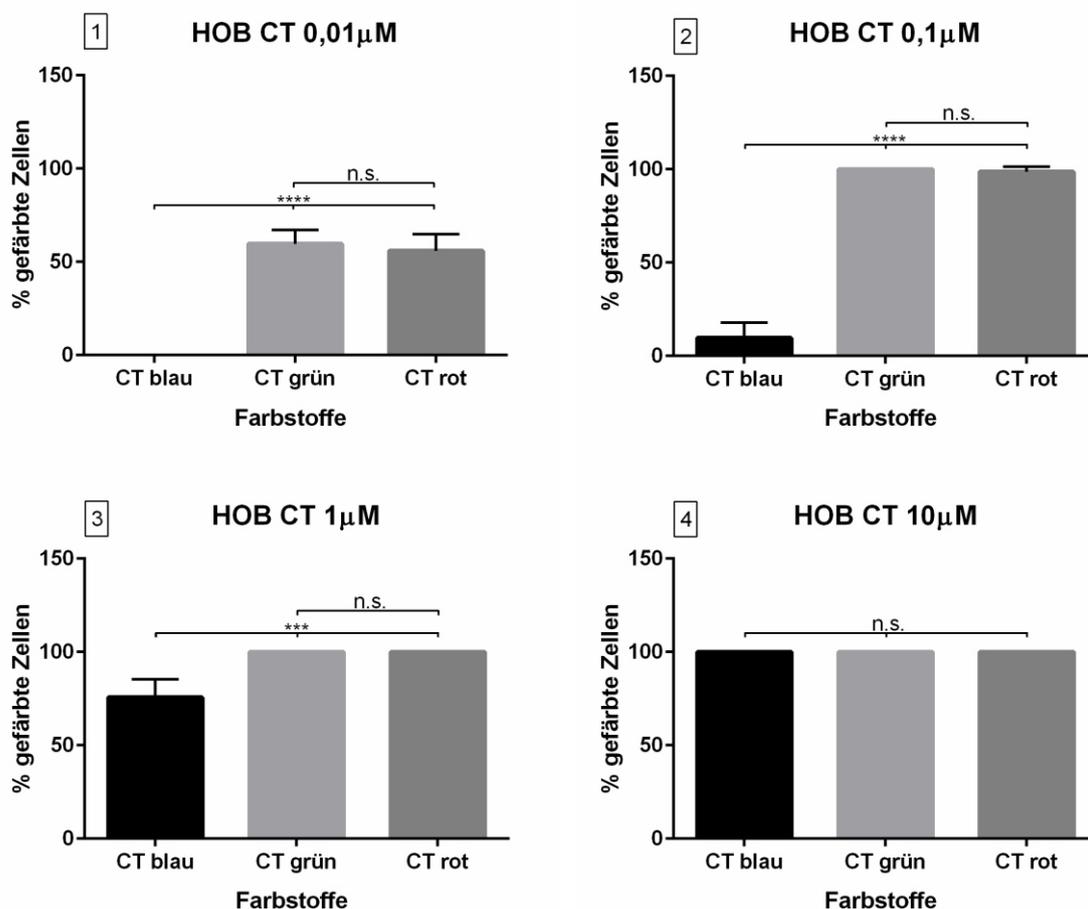


Abbildung 19: Ergebnisse der Färbeanalyse mit HOB nach CT-Arbeitskonzentrationen

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse der Färbeanalyse der primären humanen Osteoblasten in Bezug auf die verschiedenen Arbeitskonzentrationen und Farbstoffe der CT (1-4). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl. Alle Werte stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus vier unabhängigen Versuchen (N=4) dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, n.s. = nicht signifikant.

Abbildung 19 stellt die Ergebnisse der Färbearalyse von primären humanen Osteoblasten mit der Farbstoffklasse der CT in Abhängigkeit ihrer Arbeitskonzentration dar. Es zeigte sich für CT blau bei den Arbeitskonzentrationen 0,01 μ M (1), 0,1 μ M (2) und 1 μ M (3) die Anzahl gefärbter Zellen im Vergleich zu den beiden anderen Farbstoffen um je 100% ($p < 0,0001$) (1), 90,3 ($p < 0,0001$) bzw. 90,2 ($p < 0,0001$) (2) und 19,3 ($p < 0,05$) (3) signifikant reduziert. Für die CT grün und rot zeigte sich bei keiner Arbeitskonzentration ein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) (1-3). Bei einer Arbeitskonzentration von 10 μ M ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) zwischen den drei Farbstoffen.

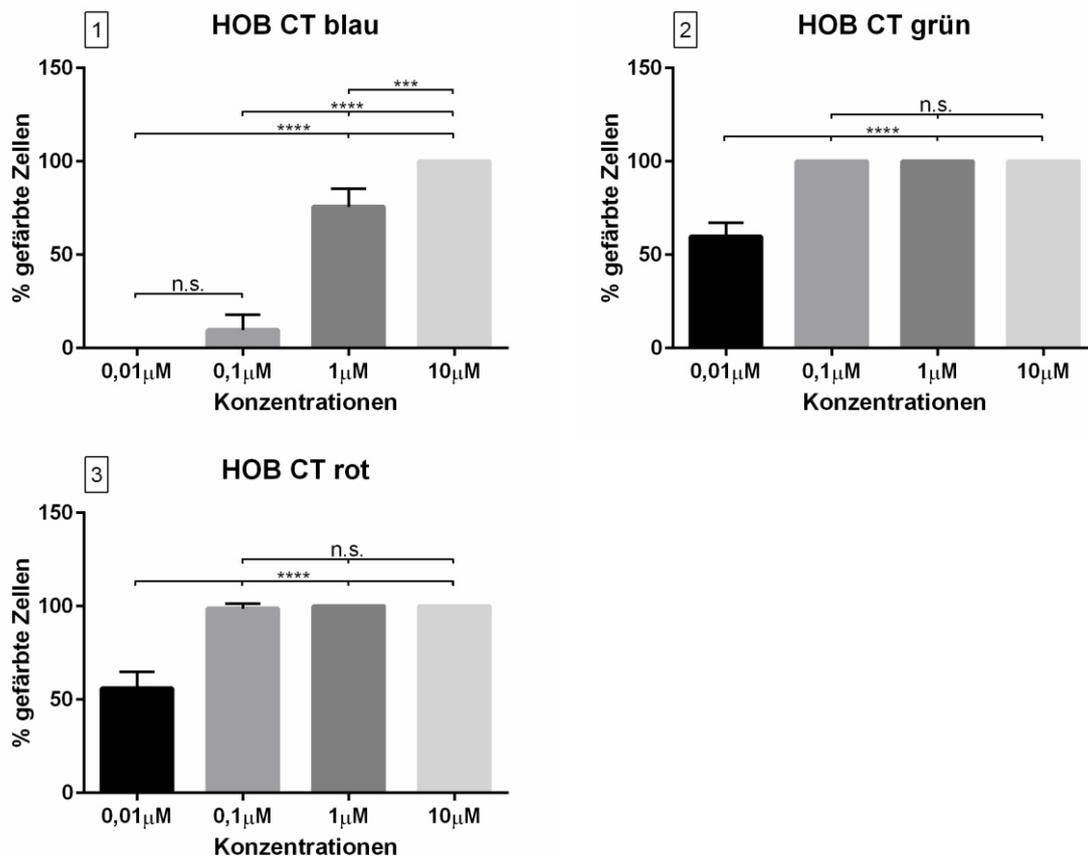


Abbildung 20: Ergebnisse der Färbearalyse mit HOB nach CT

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse der Färbearalyse von primären humanen Osteoblasten für CT blau (1), CT grün (2) und CT rot (3). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl. Alle Werte stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus vier unabhängigen Versuchen (N=4) dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, n.s. = nicht signifikant.

Bei der Analyse der Färbung von primären humanen Osteoblasten mit CT (Abbildung 20) zeigte sich für CT blau kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) in der Anzahl gefärbter Zellen zwischen den Konzentrationen 0,01 μ M und 0,1 μ M (1). Im Vergleich zu den Ergebnissen bei einer Arbeitskonzentration von 1 μ M waren die Werte bei 0,01 μ M um 100% ($p < 0,0001$) und bei 0,1 μ M um 88,0% ($p < 0,0001$) signifikant reduziert (1). Gleiches galt für den Vergleich mit einer Konzentration von 10 μ M, in welchem eine signifikante Reduktion um 100% ($p < 0,0001$) bei 0,01 μ M und um 90,3% ($p < 0,0001$) bei 0,1 μ M zu beobachten war (1).

Die Anzahl gefärbter Zellen bei Verwendung des CT blau in einer Konzentration von 1µM war verglichen mit 10µM ebenfalls um 19,3% (p<0,05) signifikant niedriger (1). Für die CT grün und CT rot ergaben sich außer bei einer Konzentration von 0,01µM mit 40,4 % (p<0,0001) (2) bzw. 43,4 % (p<0,0001) (3) keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl gefärbter Zellen zwischen den Arbeitskonzentrationen.

Tabelle 18 zeigt die Ergebnisse der Toxizitäts- und Färbearalyse von primären humanen Osteoblasten mit der Farbstoffklasse der CT im Überblick.

Tabelle 18: Ergebnisse der Evaluation für CT und HOB im Überblick

	0,01µM	0,1µM	1µM	10µM
Blau				
Grün				
Rot				

	= signifikante Toxizität im WST-1 Test
	= keine signifikante Toxizität
	= signifikante Färbekraft
	= keine signifikante Färbekraft

In der Zusammenschau der Ergebnisse (siehe Tabelle 18) zeigten sich drei Kombinationen aus Farbstoff und Konzentration als geeignet für die Färbung von primären humanen Osteoblasten. Insbesondere der CT blau schien geeignet zu sein, da er auch bei hohen Konzentrationen im Vergleich zu den beiden anderen Farbstoffen keine Toxizität aufwies. Im Vergleich der drei Färbungen untereinander (Abbildung 21-23) fiel allerdings auf, dass die Qualität der Färbung trotz hoher Färbefizienz unterschiedlich war.

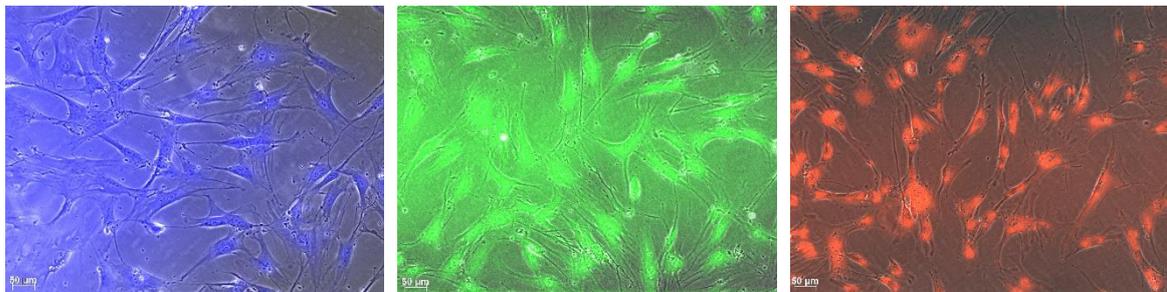
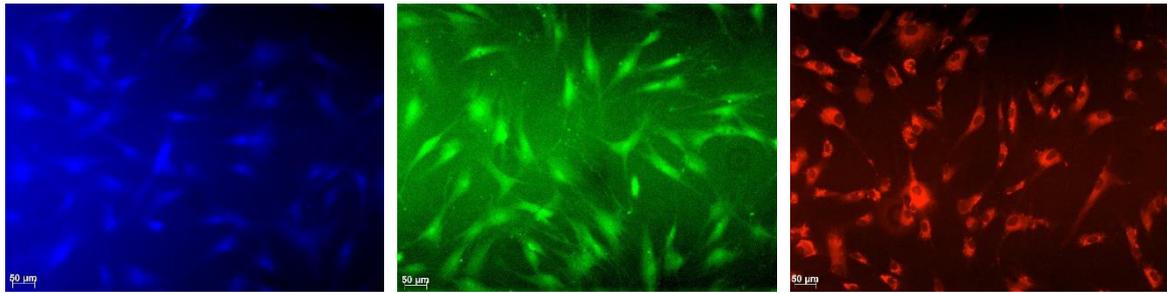


Abbildung 21: HOB mit CT blau
10 μ M

Abbildung 22: HOB mit CT grün
0,1 μ M

Abbildung 23: HOB mit CT rot
0,1 μ M

Die Abbildung 21-23 zeigen Aufnahmen der primären humanen Osteoblasten mit CT blau 10 μ M (Abbildung 21), CT grün 0,1 μ M (Abbildung 22) und CT rot 0,1 μ M (Abbildung 23). Es werden reine Fluoreszenzaufnahmen der Zellen (oben) und Kombinationsaufnahmen (Brightfield+Fluoreszenz, unten) gegenüber gestellt. Quelle: privat

Verglich man die Fluoreszenzaufnahmen (Abbildung 21-23, obere Reihe) der primären humanen Osteoblasten mit den drei Farbstoffen, so fiel auf, dass zwar jeweils alle Zellen gefärbt waren, die Qualität der Färbung aber nicht gleich war. Für CT blau schien die Fluoreszenzintensität schwächer zu sein als für die anderen CT. Bei CT grün zeigte sich im Vergleich zu blau und rot mehr Hintergrundfluoreszenz. Nur für CT rot zeigte sich eine intensive, homogene Färbung der Zellkörper, exklusive Zellkern, ohne wesentliche Hintergrundfluoreszenz. Die prominente Darstellung des Zellkerns war vor allem für die Auswertung von Zeitrafferaufnahmen wünschenswert, da er als Referenzpunkt in der Zelle die Detektion von tatsächlicher Bewegung im Vergleich zu Zellformänderung erlaubte (Fotos et al., 2006). Allerdings waren CT grün und rot durch ihre toxischen Einflüsse in höheren Konzentrationen zur Anwendung bei primären humanen Osteoblasten nur eingeschränkt zu empfehlen.

Zusammenfassend ergab die Evaluation der CT kein uneingeschränkt geeignetes Label für die Fluoreszenzfärbung von primären humanen Osteoblasten im Modell, weshalb eine weitere, allgemein verbreitete Fluoreszenzfarbstoffklasse, die QT auf ihre Anwendbarkeit hin evaluiert wurde.

5.1.1.2 Qtracker®

Die verwendeten QT waren ebenso wie die CT in der Lage, primäre humane Osteoblasten anzufärben und mit Fluoreszenz zu markieren, weshalb sie als Alternative zu fluoreszierenden Reportergenen angesehen wurden. Zur genaueren Evaluation ihrer Verwendbarkeit wurden sie entsprechend der CT untersucht.

Toxizitätsanalyse

Zur Analyse der Toxizität der QT wurde ein WST-1 Test in Abhängigkeit der Arbeitskonzentration, wie in 4.6 beschrieben, durchgeführt. Mit einem ANOVA-Test für multiple Mittelwertvergleiche wurden die Werte auf signifikante Unterschiede der Mittelwerte verglichen. Für die Kontrolle Zellen w/o wurden die Absorptionswerte aller Kontrollen addiert und der Mittelwert mit Standardabweichung gebildet. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der WST-1 Tests für die primären humanen Osteoblasten in Abhängigkeit der verwendeten Arbeitskonzentrationen der QT. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden in der Graphik entsprechend ihrer sichtbaren Fluoreszenzfarbe beschriftet, ungefärbte Kontrollen als Zellen w/o. Auf der Y-Achse ist dabei die Absorption und auf der X-Achse die analysierten Proben aufgetragen.

Im WST-1 Test für die Färbung von primären humanen Osteoblasten mit QT (Abbildung 24) war lediglich für QT grün die Absorption bei einer Färbung mit 10nM um 24,4% ($p < 0,001$) signifikant reduziert (2).

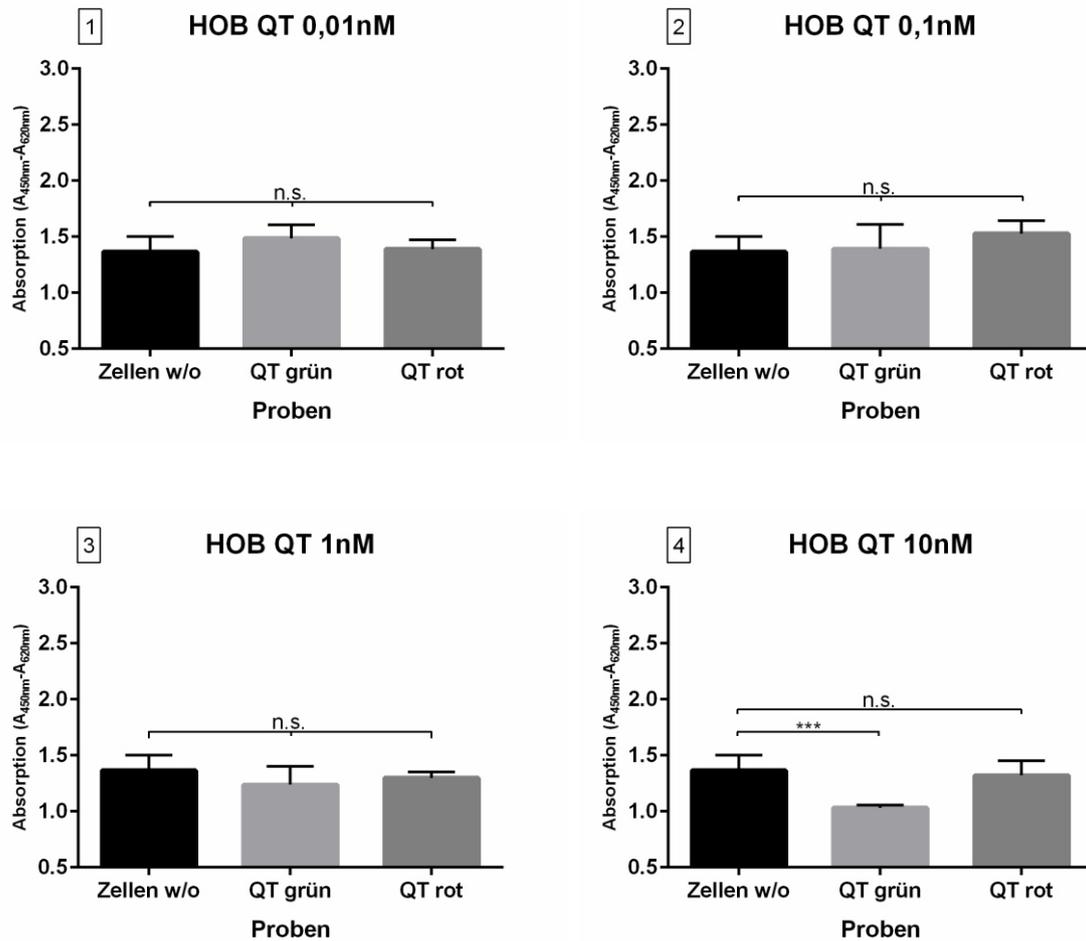


Abbildung 24: Ergebnisse des WST-1 Test für QT und HOB

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse des WST-1 Test der primären humanen Osteoblasten mit der Farbstoffklasse der QT in Abhängigkeit ihrer Arbeitskonzentration (1-4) und im Vergleich mit ungefärbten primären humanen Osteoblasten als Kontrolle (Zellen w/o). Alle Werte stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus vier unabhängigen Versuchen ($N=4$) dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, n.s. = nicht signifikant.

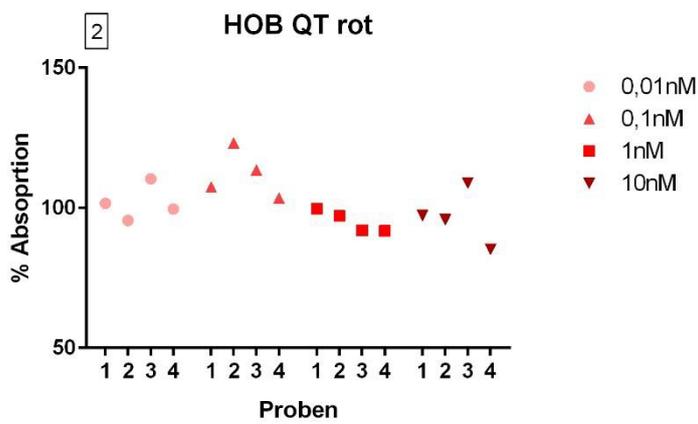
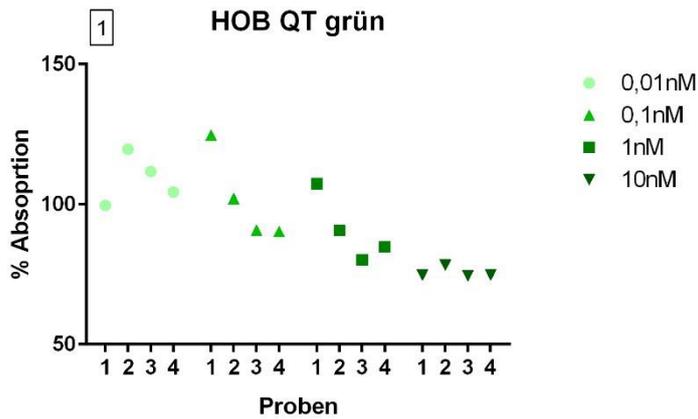


Abbildung 25: Ergebnisse der WST-1 Tests mit HOB nach QT

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse der WST-1 Tests mit primären humanen Osteoblasten für QT grün (1) und QT rot (2). Die Absorptionswerte der einzelnen Proben wurden dabei als prozentualer Anteil am Mittelwert der Absorptionswerte aller Kontrollen aufgetragen.

In der Analyse der linearen Regression waren für beide QT, wie auch für alle drei CT (Abbildung 18), die R^2 -Werte signifikant unterschiedlich zu 0, dabei galt für QT grün $R^2=0,72$ ($p<0,0001$) und QT rot $R^2=0,52$ ($p<0,01$).

Analyse der Färbung

Für die Farbstoffklasse der QT wurde, wie in 5.1.1.1 beschrieben, ebenfalls eine Analyse der Färbung in den Arbeitskonzentrationen durchgeführt und ausgewertet. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Färbeanalyse der QT mit primären humanen Osteoblasten entweder in Abhängigkeit ihrer Arbeitskonzentrationen oder ihrer Farbstoffe. In den Diagrammen sind auf der Y-Achse der Anteil gefärbter Zellen an der Gesamtzellzahl in Prozent und auf der X-Achse entweder die Farbstoffe oder die Konzentrationen aufgetragen.

In der Analyse der Färbung von primären humanen Osteoblasten mit QT (Abbildung 26) war die Anzahl der gefärbten Zellen für QT grün im Vergleich zu QT rot bei einer Konzentration von 0,01nM um 64,0% ($p < 0,05$) signifikant niedriger (1), bei einer Konzentration von 1nM und 10nM dagegen um 39,7% ($p < 0,01$) (3) und 36,3% ($p < 0,01$) (4) signifikant höher.

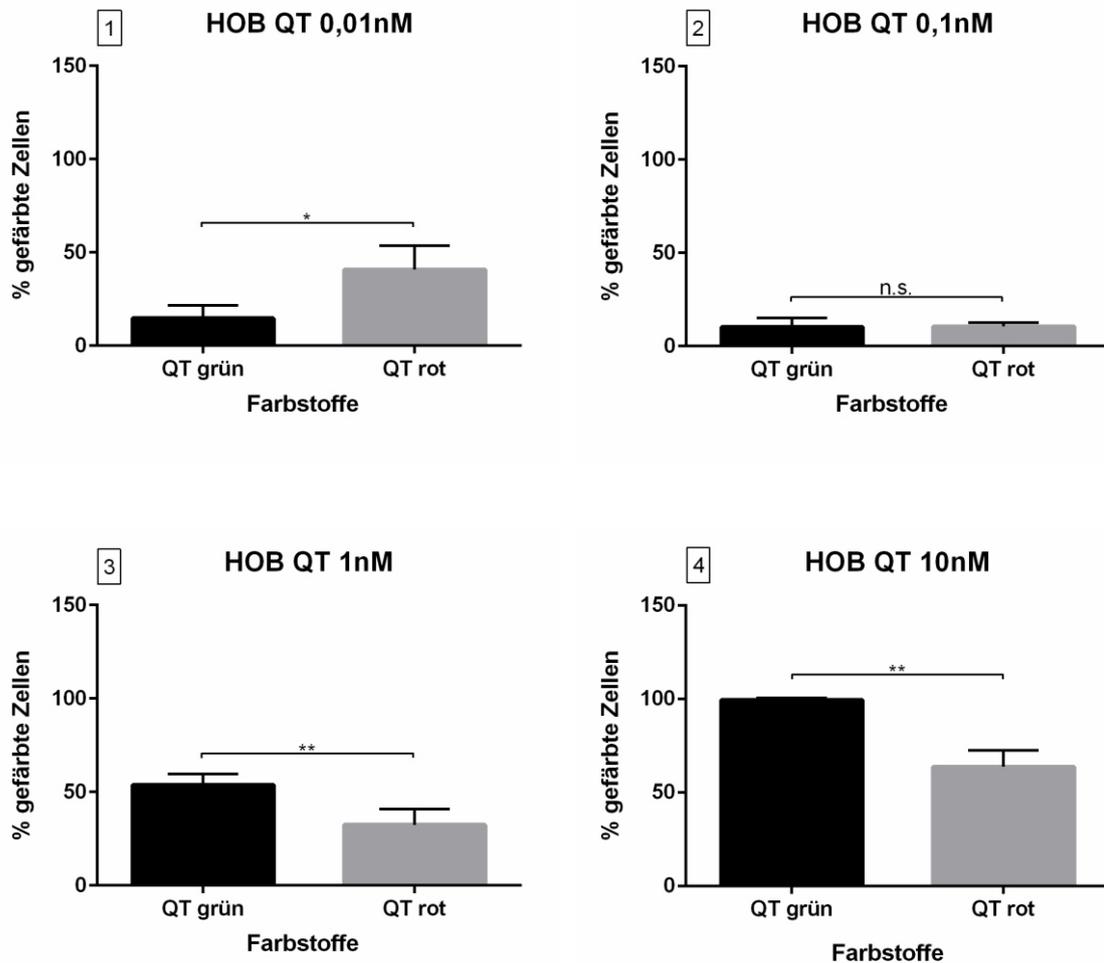


Abbildung 26: Ergebnisse der Färbearalyse mit HOB nach QT-Arbeitskonzentrationen

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse der Färbearalyse mit primären humanen Osteoblasten in Bezug auf die verschiedenen Arbeitskonzentrationen und Farbstoffe der QT (1-4). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl. Alle Werte stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus vier unabhängigen Versuchen ($N=4$) dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, n.s. = nicht signifikant.

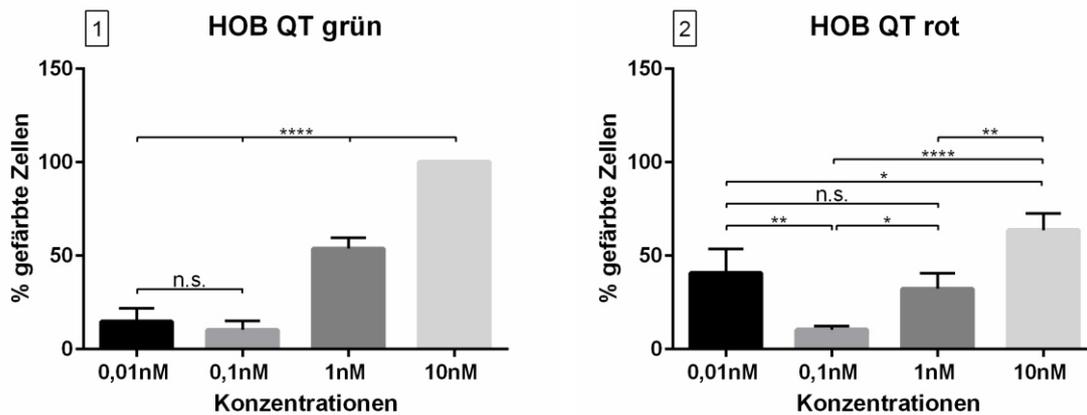


Abbildung 27: Ergebnisse der Färbeanalyse mit HOB nach QT

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse der Färbeanalyse mit primären humanen Osteoblasten für QT grün (1) und QT rot (2). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl. Alle Werte stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus vier unabhängigen Versuchen (N=4) dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, n.s. = nicht signifikant.

In der Analyse der Färbung von primären humanen Osteoblasten mit QT (Abbildung 27) zeigte sich für QT grün (1) kein signifikanter Unterschied in der Anzahl gefärbter Zellen zwischen den Konzentrationen 0,01nM und 0,1nM (1). Im Vergleich zu den Ergebnissen bei einer Arbeitskonzentration von 1nM waren die Werte bei 0,01nM um 72,6% ($p < 0,0001$) und bei 0,1nM um 81,0% ($p < 0,0001$) signifikant reduziert (1). Gleiches galt für den Vergleich mit einer Konzentration von 10nM, in welchem eine signifikante Reduktion um 85,3% ($p < 0,0001$) bei 0,01nM, um 89,8% ($p < 0,0001$) bei 0,1nM und um 46,3% ($p < 0,0001$) bei 1nM zu beobachten war (1). In der Analyse der Färbung von primären humanen Osteoblasten mit QT rot (2) zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl gefärbter Zellen zwischen den Konzentrationen 0,01nM und 1nM (2). Im Vergleich zu den Ergebnissen bei einer Arbeitskonzentration von 0,01nM und 1nM waren die Werte bei 0,1nM um 74,3% ($p < 0,01$) bzw. 67,6% ($p < 0,05$) signifikant erniedrigt (2). Verglichen mit der Arbeitskonzentration 10nM war eine signifikante Reduktion der Werte um 35,9% ($p < 0,5$) bei 0,01nM, um 83,5% ($p < 0,0001$) bei 0,1nM und um 49,2% ($p < 0,01$) bei 1nM zu beobachten (2).

Um im nächsten Schritt die beiden Fluoreszenzfarbstoffklassen hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit im Modell mit primären humanen Osteoblasten, vergleichen zu können, stellt Tabelle 19 die Ergebnisse der Evaluation von CT und QT im Überblick dar.

Tabelle 19: Ergebnisse der Evaluation für HOB im Überblick

Farben	Blau	CT	0,01µM	
			0,1µM	
			1µM	
			10µM	
	Grün	CT	0,01µM	
			0,1µM	
			1µM	
			10µM	
		QT	0,01nM	
			0,1nM	
			1nM	
			10nM	
	Rot	CT	0,01µM	
			0,1µM	
			1µM	
			10µM	
		QT	0,01nM	
			0,1nM	
			1nM	
			10nM	

	= keine Toxizität im WST-1 Test
	= signifikante Toxizität
	= keine signifikante Färbeefferizienz
	= signifikante Färbeefferizienz

Die Farbstoffklasse der Quantum Dots wird allgemein zur Detektion von Zellen in Fluoreszenzaufnahmen, auch im Zeitraffermodus, verwendet (Voura et al., 2004). Ihr negatives Abschneiden in der Färbeanalyse mag etwas verwundern, kann aber anhand der folgenden Abbildungen (Abbildung 28-31) verdeutlicht werden.

Für beide QT zeigte sich im Vergleich zum CT der entsprechenden Fluoreszenzfarbe eine weniger homogene Färbung der Zellkörper und des Zellkerns, was im Gegenzug die Markierung und Abgrenzung der Zellen erschwerte. Vergleich man die Fluoreszenzaufnahme von HOB mit QT grün 10nM (Abbildung 28, oben) mit der Fluoreszenzaufnahme von HOB mit CT grün 10µM (Abbildung 29, oben) und ihre jeweils mit Brightfield kombinierten Aufnahmen (Abbildung 28 und 29, unten), so wurde dieser Unterschied deutlich. Gleiches galt für QT rot im Vergleich der Aufnahmen in Abbildung 30 und 31.

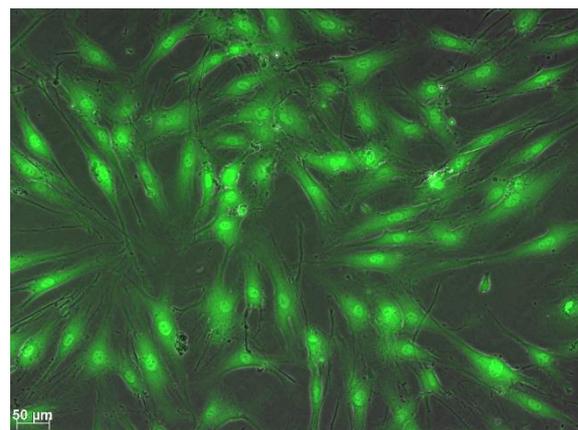
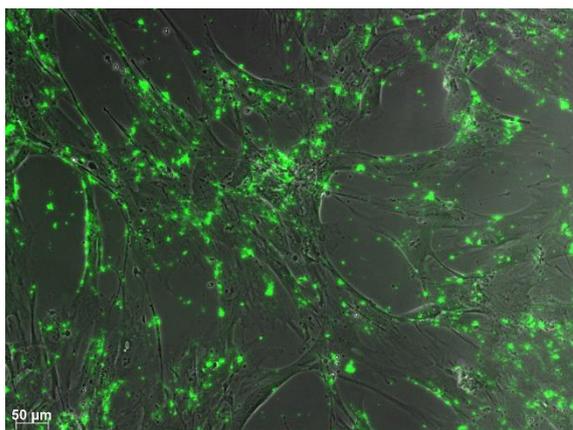
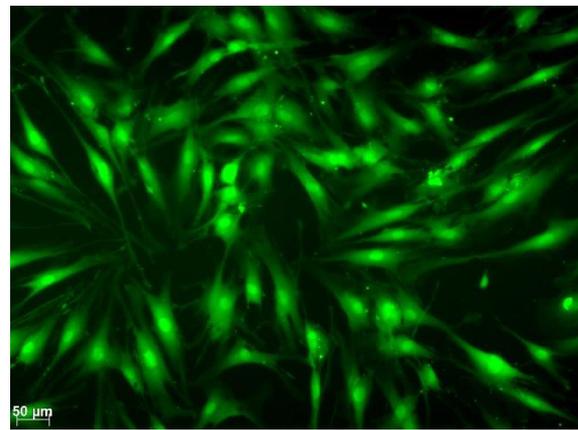
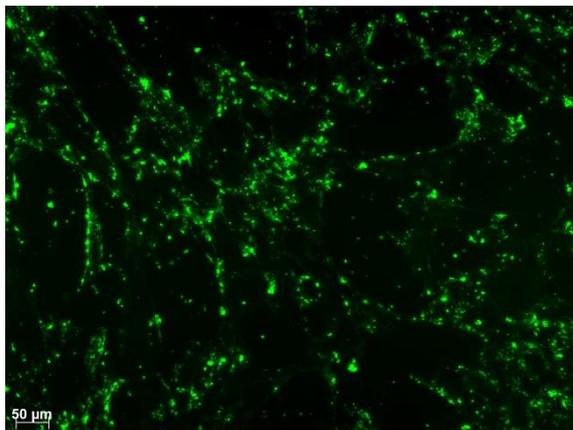


Abbildung 28: HOB mit QT grün 10nM

Abbildung 29: HOB mit CT grün 10µM

Die Abbildung 28 und 29 zeigen Aufnahmen von primären humanen Osteoblasten mit QT grün 10nM (Abbildung 28) und CT grün 10µM (Abbildung 29). Die Zellen wurden bei 10x Vergrößerung in Brightfield und mit dem GFP-Fluoreszenzfilter (oben) aufgenommen und die Aufnahme kombiniert (unten). Quelle: privat.

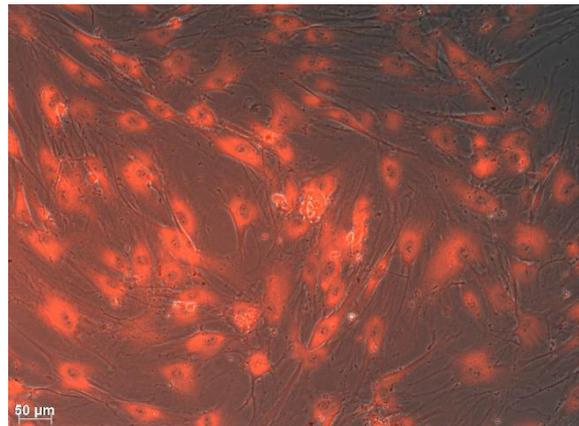
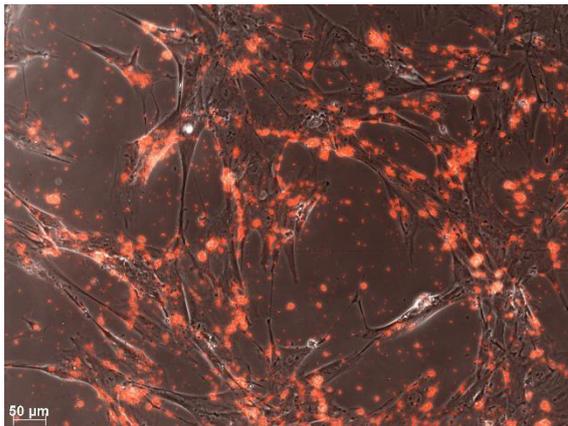
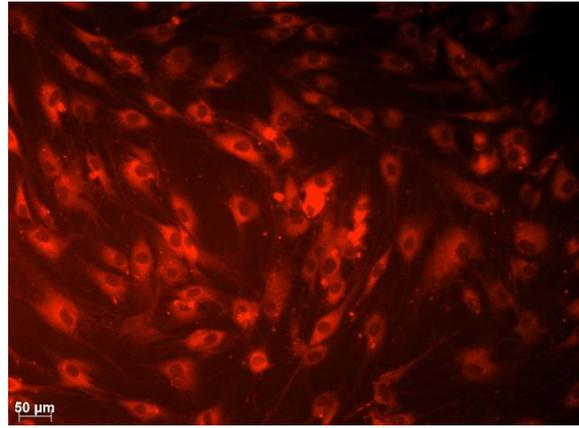
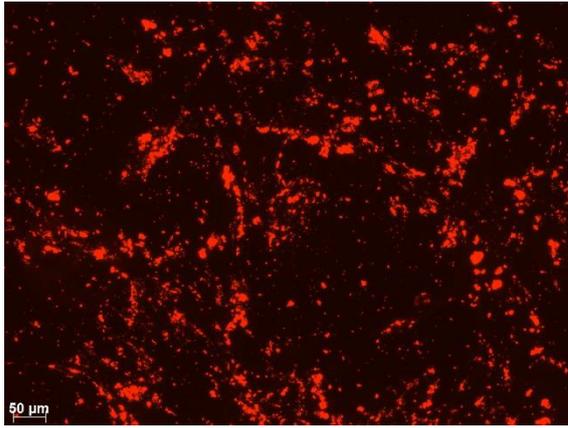


Abbildung 30: HOB mit QT rot 10nM

Abbildung 31: HOB mit CT rot 10 µM

Die Abbildung 30 und 31 zeigen Aufnahmen von HOB mit QT rot 10nM (Abbildung 30) und CT rot 10µM (Abbildung 31). Die Zellen wurden bei 10x Vergrößerung in Brightfield und mit dem Texas Red-Fluoreszenzfilter (oben) aufgenommen und die Aufnahme kombiniert (unten). Quelle: privat.

Die Abgrenzung einzelner Zellen voneinander war für Fluoreszenzaufnahmen mit dem Ziel, die Bewegung einzelner Zellen zu detektieren und zu analysieren, von grundlegender Bedeutung. Da die verwendeten CT im Vergleich zu den QT diese Voraussetzung erfüllten, waren sie eher als QT geeignet, als fluoreszenzbasierte Zellmarkierungsmethode im beschriebenen Modell zu dienen. Die Kultur und Verwendung von primären humanen Osteoblasten war aufwendig, kostenintensiv und zeitlich limitiert. Um eine stabile, kostengünstige Alternative im Modell verwenden zu können, wurde die Evaluation der Farbstoffe auch mit transformierten Zellen, in diesem Fall der Osteosarkomzelllinie MG-63, durchgeführt, die als osteoblastische Zellen etabliert sind (Bilbe et al., 1996).

5.1.2 MG-63 Zellen

Die MG-63 Zellen wurden analog zu primären humanen Osteoblasten mit den Farbstoffen untersucht (siehe 5.1.1).

5.1.2.1 CellTracker™

Toxizitätsanalyse

Die Analyse der Toxizität wurde wie bereits in 5.1.1.1 beschrieben für die MG-63 Zellen in Kombination mit den CT durchgeführt. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der WST-1 Tests für die MG-63 Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Arbeitskonzentrationen der CT. Auf der Y-Achse ist dabei die Absorption und auf der X-Achse die analysierten Proben aufgetragen. Im WST-1 Test zeigte sich für die Färbung von MG-63 Zellen mit CT (Abbildung 32), im Unterschied zu den primären humanen Osteoblasten (vgl. Abbildung 17), lediglich für CT blau und CT grün die Absorption bei der Färbung mit 0,1µM um 29,2% ($p < 0,0001$) bzw. 27,4% ($p < 0,0001$) signifikant reduziert (2). Ansonsten ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse ($p > 0,05$) (1-4).

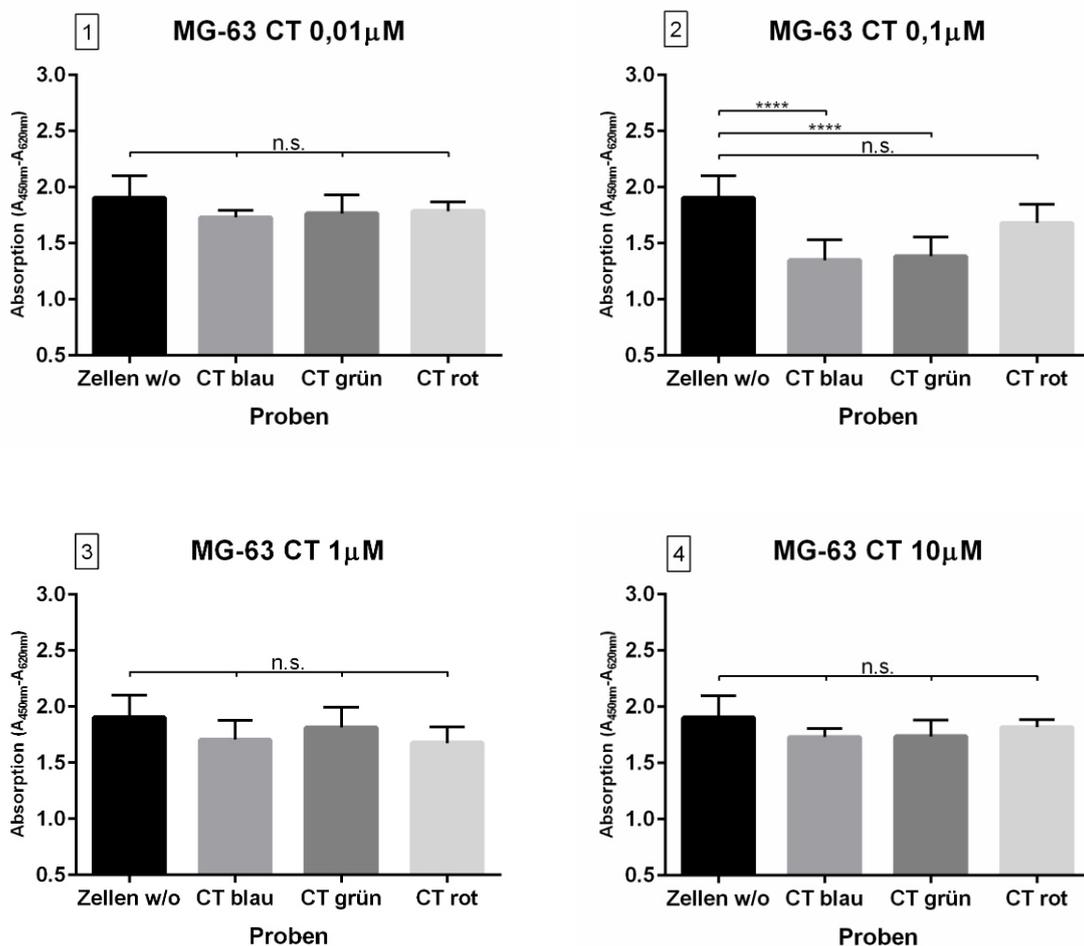


Abbildung 32: Ergebnisse des WST-1 Test für CT und MG-63 Zellen

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse des WST-1 Test der MG-63 Zellen mit der Farbstoffklasse der CT in Abhängigkeit ihrer Arbeitskonzentration (1-4) und im Vergleich mit ungefärbten MG-63 Zellen als Kontrolle (Zellen w/o). Alle Werte stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchen (N=5) dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, n.s.= nicht signifikant.

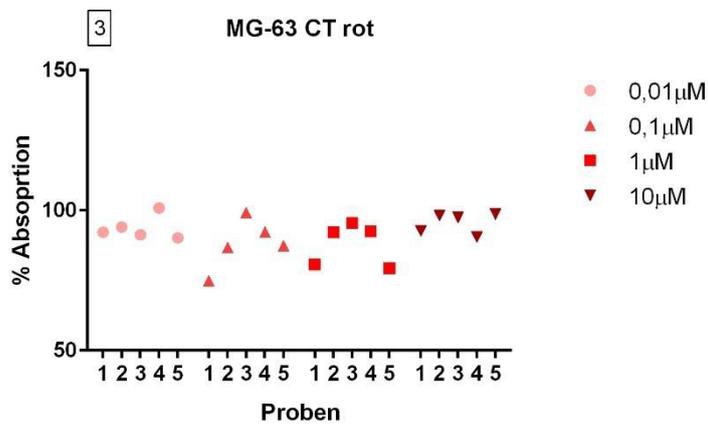
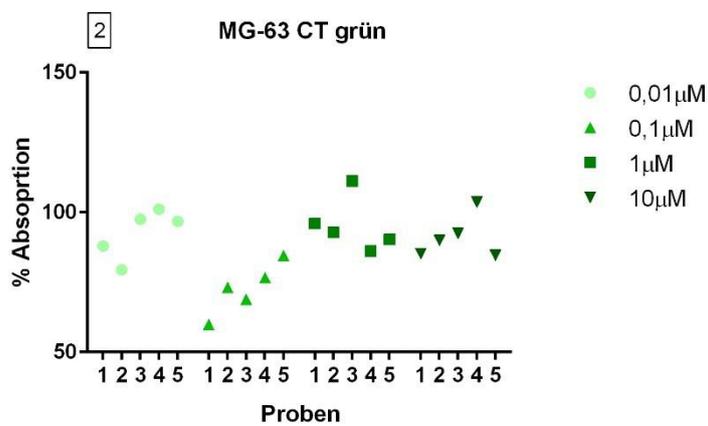
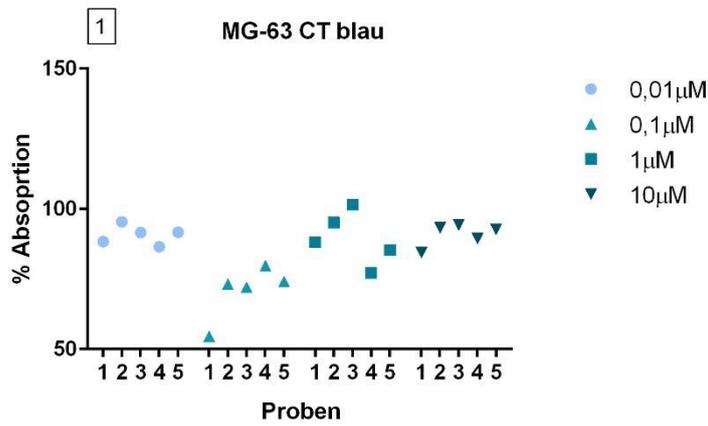


Abbildung 33: Ergebnisse der WST-1 Tests mit MG-63 Zellen nach CT

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse der WST-1 Tests mit MG-63 Zellen für CT blau (1), CT grün (2) und CT rot (3). Die Absorptionen der einzelnen Proben wurden dabei als prozentualer Anteil am Mittelwert der Absorptionen aller Kontrollen aufgetragen.

Bei Verwendung der CT war, im Gegensatz zu den primären humanen Osteoblasten (Abbildung 18), für die MG-63 Zellen in der Analyse der linearen Regression kein R^2 signifikant unterschiedlich zu Null (1-3).

Analyse der Färbung

Für die Farbstoffklasse der CT wurde in Kombination mit MG-63 Zellen, wie in 5.1.1.1 beschrieben, eine Analyse der Färbung in den Arbeitskonzentrationen durchgeführt und ausgewertet. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Färbeanalyse der CT mit MG-63 Zellen entweder in Abhängigkeit ihrer Arbeitskonzentrationen oder ihrer Farbstoffe. In den Diagrammen sind auf der Y-Achse der Anteil gefärbter Zellen an der Gesamtzellzahl in Prozent und auf der X-Achse entweder die Farbstoffe oder die Konzentrationen aufgetragen. In der Analyse der Färbung von MG-63 Zellen mit der Farbstoffklasse der CT (Abbildung 34) zeigte sich nur für CT blau bei den Arbeitskonzentrationen $0,01\mu\text{M}$ (1) und $0,1\mu\text{M}$ (2) die Anzahl gefärbter Zellen im Vergleich zum Durchschnitt der beiden anderen Farbstoffe um 99,1% ($p < 0,0001$) (1) bzw. 94,5% ($p < 0,0001$) (2) signifikant reduziert. Insgesamt verhielten sich die MG-63 Zellen damit entsprechend der HOB (vgl. Abbildung 19).

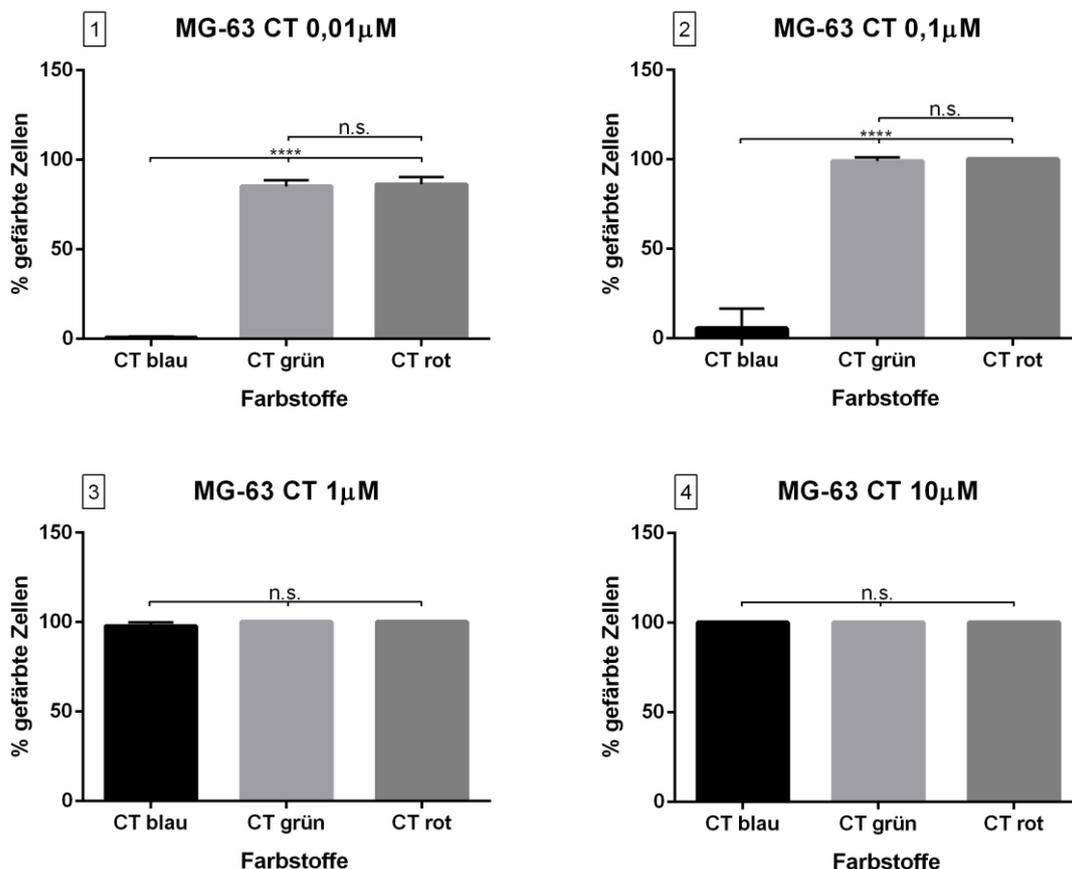


Abbildung 34: Ergebnisse Färbeanalyse mit MG-63 nach CT-Arbeitskonzentrationen

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse der Färbeanalyse der MG-63 Zellen in Bezug auf die verschiedenen Arbeitskonzentrationen und Farbstoffe der CT (1-4). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl. Für die Analyse bei $1\mu\text{M}$ (3) wurden der Brown-Forsythe ANOVA Test angewandt. Bei $10\mu\text{M}$ (4) erübrigte sich die Analyse, da sich für alle drei CT der Wert 100% ergab. Alle Werte

stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus vier unabhängigen Versuchen (N=4) dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, n.s. = nicht signifikant.

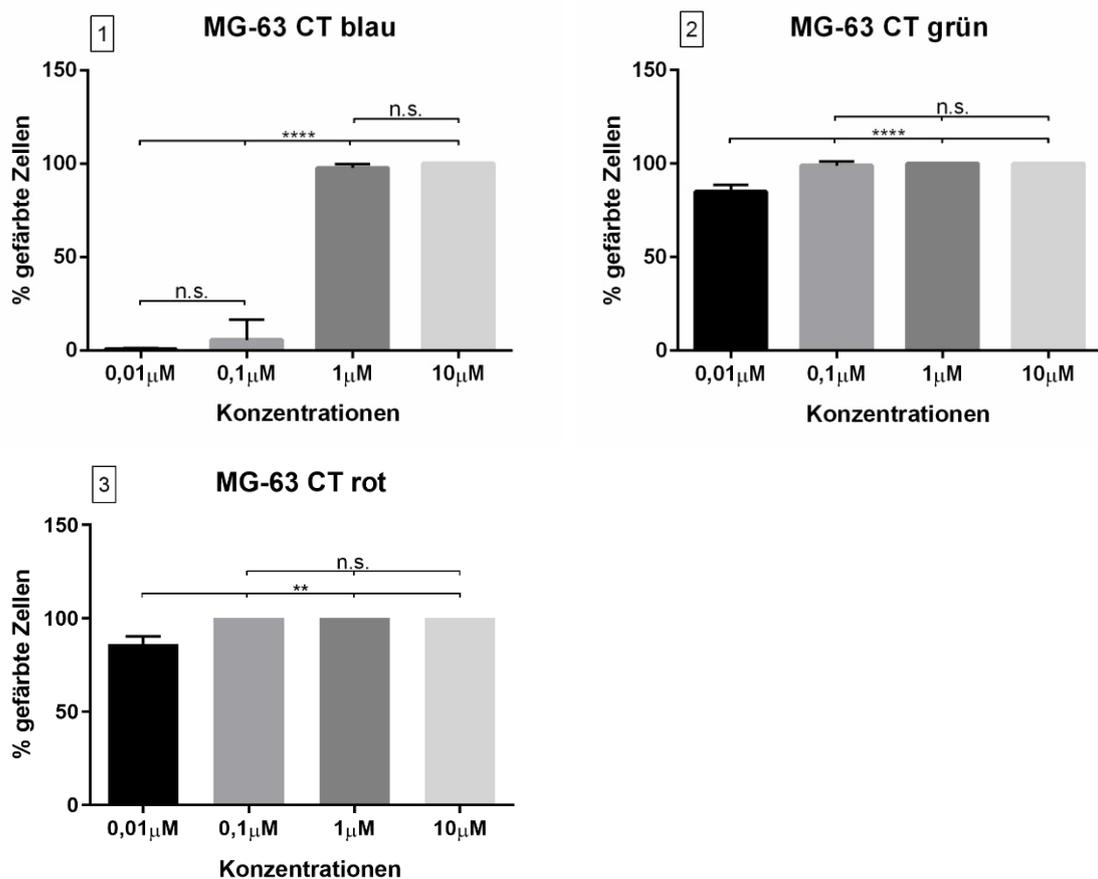


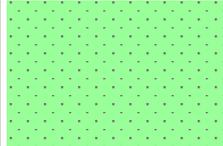
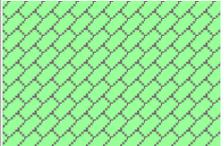
Abbildung 35: Ergebnisse der Färbearalyse mit MG-63 Zellen nach CT

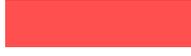
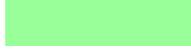
Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse der Färbearalyse der MG-63 Zellen in Bezug auf die verschiedenen Arbeitskonzentrationen und Farbstoffe der CT (1-4). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl. Für CT rot wurde in dieser Analyse der Brown-Forsythe ANOVA Test für ungleiche Varianzen angewandt (3). Alle Werte stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus vier unabhängigen Versuchen (N=4) dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, n.s. = nicht signifikant.

In der Analyse der Färbung von MG-63 Zellen mit CT (Abbildung 35) zeigte sich für CT blau kein signifikanter Unterschied in der Anzahl gefärbter Zellen zwischen den Konzentrationen 0,01 μM und 0,1 μM bzw. 1 μM und 10 μM (1). Im Vergleich mit den Arbeitskonzentrationen 1 μM und 10 μM waren die Werte bei 0,01 μM und 0,1 μM um 99,3% ($p < 0,0001$) bzw. 94,4% ($p < 0,0001$) signifikant niedriger (1). Für die CT grün und rot ergaben sich außer bei einer Konzentration von 0,01 μM mit 14,1% ($p < 0,0001$) (2) bzw. 13,8% ($p < 0,01$) (3) keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl gefärbter Zellen zwischen den Arbeitskonzentrationen.

Tabelle 20 zeigt die Ergebnisse der Toxizitäts- und Färbearalyse von MG-63 Zellen mit der Farbstoffklasse der CT im Überblick.

Tabelle 20: Ergebnisse der Evaluation für CT und MG-63 Zellen im Überblick

	0,01µM	0,1µM	1µM	10µM
Blau				
Grün				
Rot				

	= signifikante Toxizität im WST-1 Test
	= keine signifikante Toxizität
	= signifikante Färbekraft
	= keine signifikante Färbekraft

Für die MG-63 Zellen ergab sich, im Gegensatz zu den primären humanen Osteoblasten, keine vermehrte Toxizität der CT bei höheren Konzentrationen im WST-1 Test sowie in der Analyse der linearen Regression. Demnach konnten alle drei CT bei einer Konzentration von 10µM prinzipiell verwendet werden. Für eine Verwendung der Farbstoffe zur Mikroskopie auf dem Knochen mussten aber noch weitere Überlegungen angestellt werden. Wie bereits bei den primären humanen Osteoblasten gezeigt (vgl. Abbildung 21), fiel der CT blau auch bei den MG-63 Zellen mit einer im Vergleich zu den anderen beiden CT schwächeren Fluoreszenzintensität auf. Er war damit nur bedingt geeignet, Zellen gegen einen Hintergrund wie Knochen zu markieren. Für CT grün zeigte sich bereits bei den Aufnahmen in der Kulturschale mehr Hintergrundfluoreszenz als bei den beiden anderen CT. Da bei Knochen, insbesondere durch das enthaltene Kollagen, generell eine Autofluoreszenz in mikroskopischen Aufnahmen zu beobachten ist (Prentice, 1967), erschien ein Fluoreszenzfarbstoff mit einer hohen Hintergrundfluoreszenz nicht geeignet, die Zellen ausreichend zu markieren. Der CT rot zeigte in Bezug auf Fluoreszenzintensität, Hintergrundfluoreszenz und Zellmarkierung die überzeugendsten Ergebnisse und schien

daher am besten geeignet zu sein, die MG-63 Zellen auf dem Knochen detektierbar zu machen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden gemäß Protokoll (siehe 4.12) MG-63 Zellen mit CT rot 10µM gefärbt, auf mineralisiertem und demineralisiertem Knochen ausgebracht und mikroskopiert. Beurteilt wurde die Qualität des Fluoreszenzsignals, die Darstellbarkeit der Zellen auf dem Knochen und die bestehende Hintergrundfluoreszenz in nativen und fixierten Zustand. Durch die Färbung der fixierten Zellen mit DAPI wurde verglichen, wie gut die Zellen über das Fluoreszenzsignal detektiert werden konnten. Die Zellen auf beiden Knochenoberflächen wurden außerdem auf Unterschiede ihrer Morphologie, Vitalität und Adhäsion hin überprüft. Zusätzlich wurden erste Beobachtungen über geeignete Aufnahmeparameter der Zeitrafferaufnahmen bezüglich Vergrößerung und Zellzahl gemacht. Abbildung 36 und Abbildung 37 zeigen die Ergebnisse der Mikroskopie auf dem Knochen.

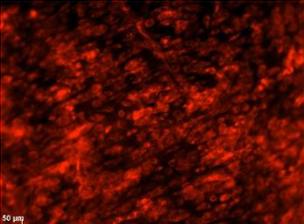
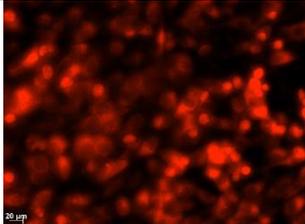
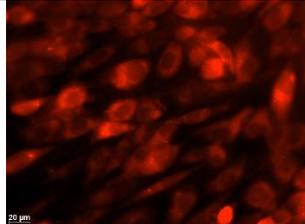
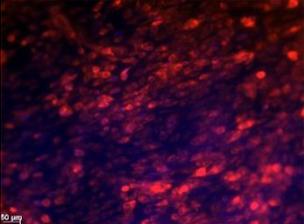
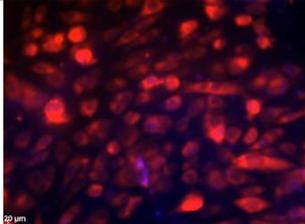
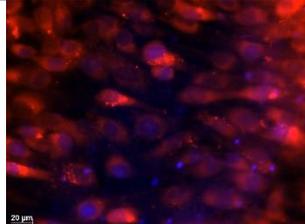
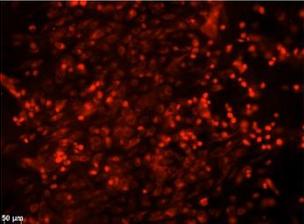
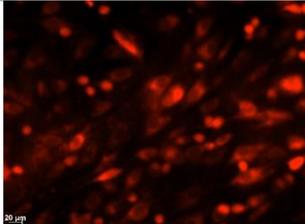
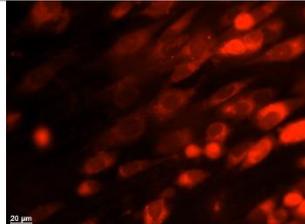
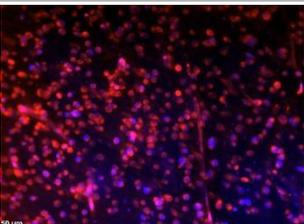
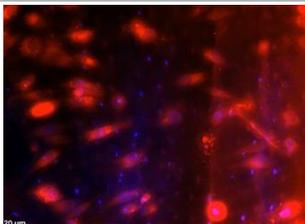
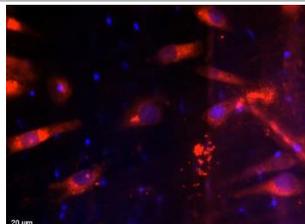
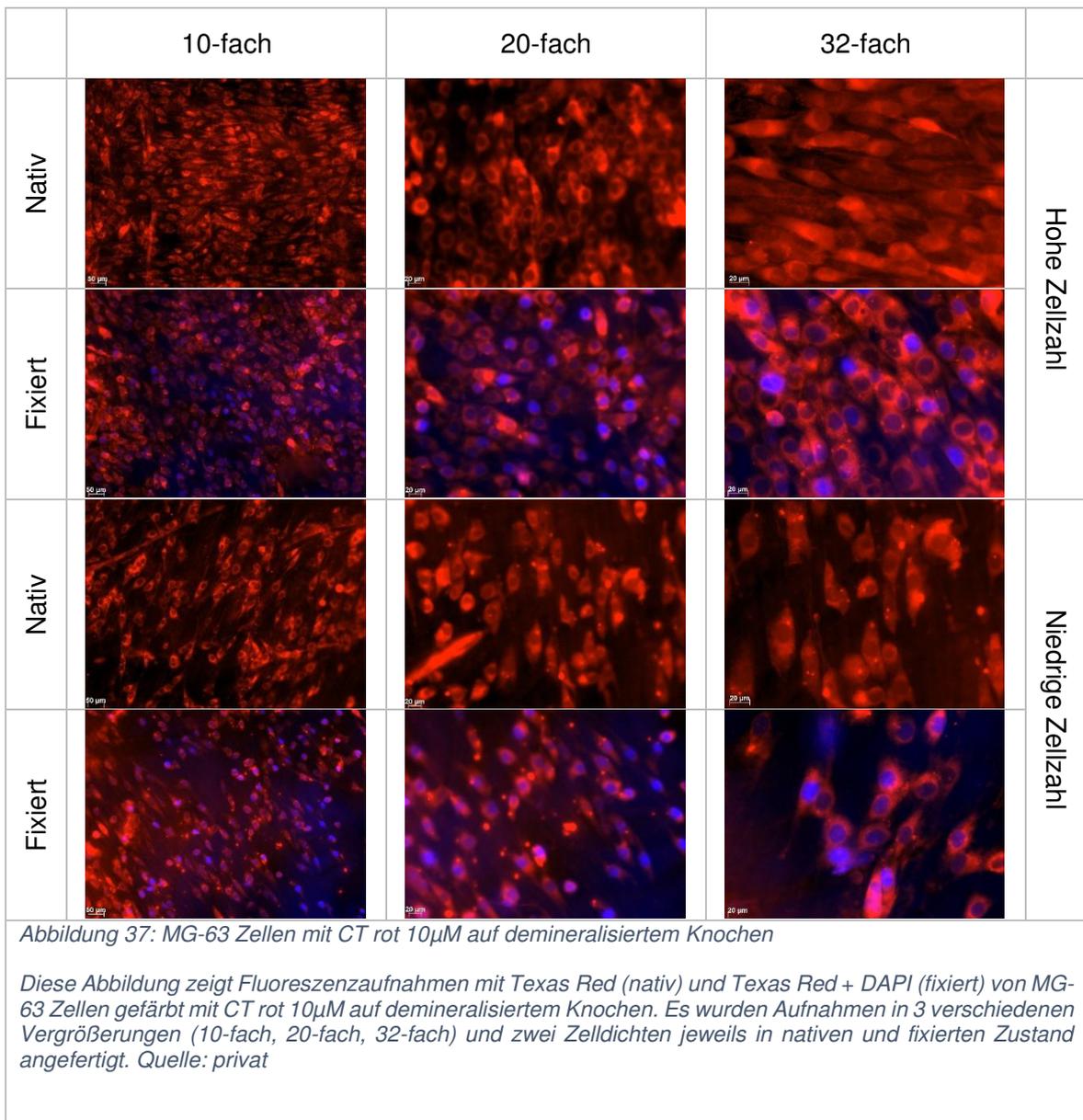
	10-fach	20-fach	32-fach	
Nativ				Hohe Zellzahl
Fixiert				
Nativ				Niedrige Zellzahl
Fixiert				

Abbildung 36: MG-63 Zellen mit CT rot 10µM auf mineralisiertem Knochen

Diese Abbildung zeigt Fluoreszenzaufnahmen mit Texas Red (nativ) und Texas Red + DAPI (fixiert) von MG-63 Zellen gefärbt mit CT rot 10µM auf mineralisiertem Knochen. Es wurden Aufnahmen in 3 verschiedenen Vergrößerungen und zwei Zelldichten jeweils in nativen und fixierten Zustand angefertigt. Quelle: privat



Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass MG-63 Zellen mit allen drei CT gefärbt werden konnten und CT daher als Alternative zu fluoreszierenden Reportergenen zur fluoreszenzbasierten Zellmarkierung dienen können. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Färbung mit CT rot 10µM die Mikroskopie von MG-63 Zellen auf verschiedenen Knochenoberflächen erlaubte.

Die MG-63 Zellen wurden im nächsten Schritt, analog zu den primären humanen Osteoblasten, in Kombination mit der Farbstoffklasse der QT evaluiert.

5.1.2.2 Qtracker®

Toxizitätsanalyse

Die Analyse der Toxizität wurde wie bereits in 5.1.1.2 beschrieben für die MG-63 Zellen in Kombination mit den QT durchgeführt.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der WST-1 Tests für die MG-63 Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Arbeitskonzentrationen der QT. Auf der Y-Achse ist dabei die Absorption und auf der X-Achse die analysierten Proben aufgetragen.

Im WST-1 Test zeigte sich für die Färbung von MG-63 Zellen mit QT (Abbildung 38) nur für QT rot bei der Färbung mit 0,1nM eine signifikante Erhöhung der Absorption um 13,1% ($p < 0,01$), darüber hinaus ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) der Absorptionswerte.

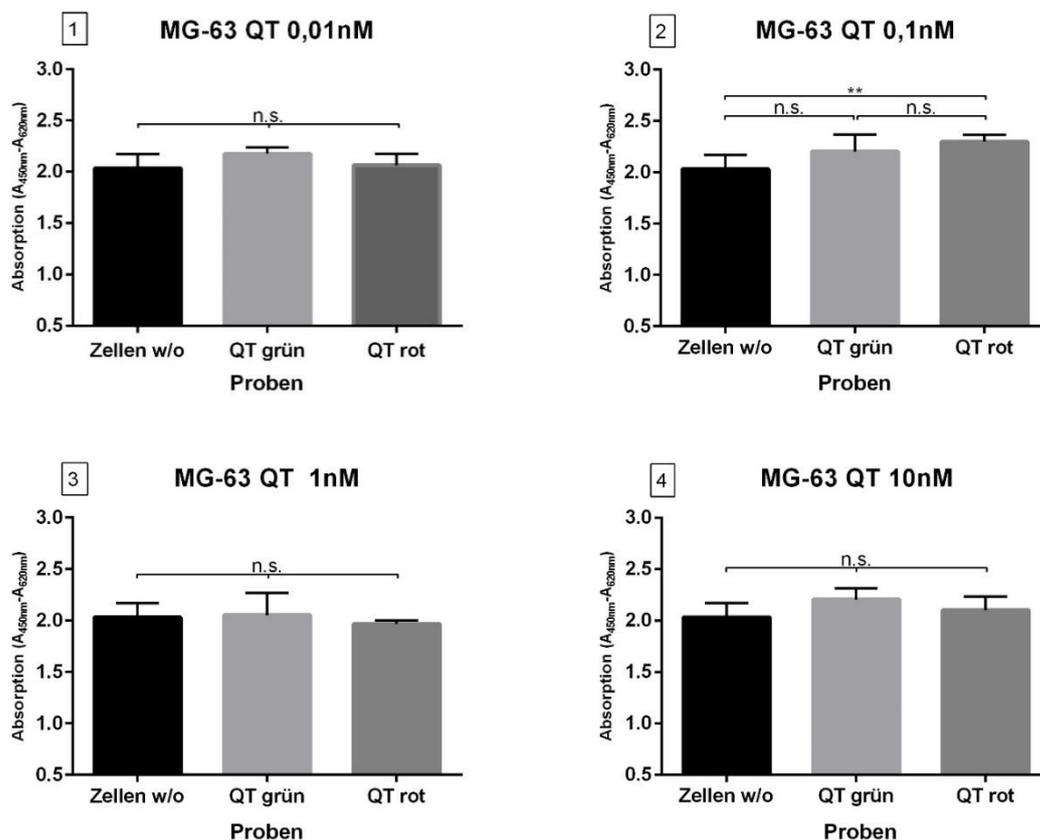


Abbildung 38: Ergebnisse des WST-1 Test für QT und MG-63 Zellen

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse des WST-1 Test der MG-63 Zellen mit der Farbstoffklasse der QT in Abhängigkeit ihrer Arbeitskonzentration (1-4) und im Vergleich mit ungefärbten MG-63 Zellen als Kontrolle (Zellen w/o). Alle Werte stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus vier unabhängigen Versuchen (N=4) dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, n.s. = nicht signifikant.

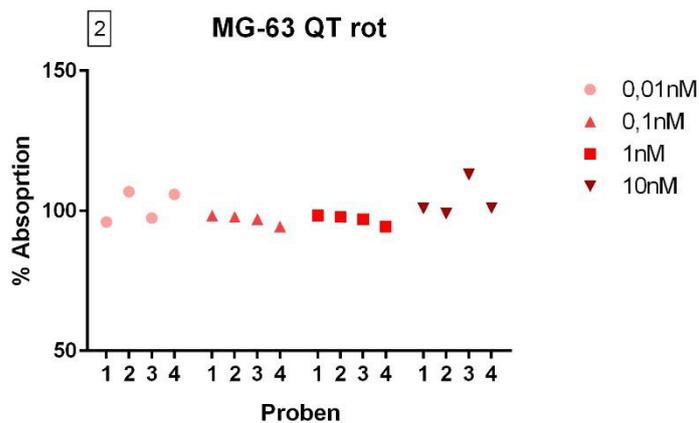
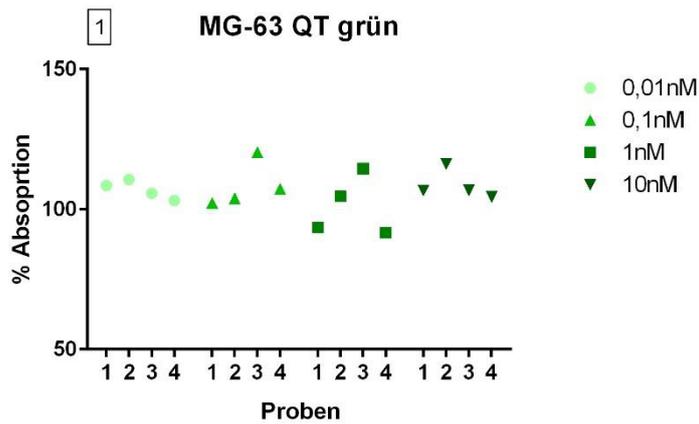


Abbildung 39: Ergebnisse der WST-1 Tests mit MG-63 Zellen nach QT

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse der WST-1 Tests mit MG-63 Zellen für QT grün (1) und QT rot (2). Die Absorptionen der einzelnen Proben wurden dabei als prozentualer Anteil am Mittelwert der Absorptionen aller Kontrollen aufgetragen.

Bei Verwendung der QT war, im Gegensatz zu den HOB (vgl. Abbildung 25), für die MG-63 Zellen in der Analyse der linearen Regression kein R^2 signifikant unterschiedlich zu 0 (1-3).

Analyse der Färbung

Für die Farbstoffklasse der QT in Verwendung mit MG-63 Zellen wurde, wie in 5.1.1.2 beschrieben, eine Analyse der Färbung in den Arbeitskonzentrationen durchgeführt und ausgewertet. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Färbeanalyse der QT mit MG-63 Zellen entweder in Abhängigkeit ihrer Arbeitskonzentrationen oder ihrer Farbstoffe. In den Diagrammen sind auf der Y-Achse der Anteil gefärbter Zellen an der Gesamtzellzahl in Prozent und auf der X-Achse entweder die Farbstoffe oder die Konzentrationen aufgetragen.

Für die Analyse der Färbung von MG-63 Zellen mit den QT (Abbildung 40) zeigte sich, anders als für die primären humanen Osteoblasten (vgl. Abbildung 26), im t-Test für unverbundene Stichproben für keine der verwendeten Arbeitskonzentrationen ein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) hinsichtlich der Anzahl gefärbter Zellen zwischen den beiden Farbstoffen.

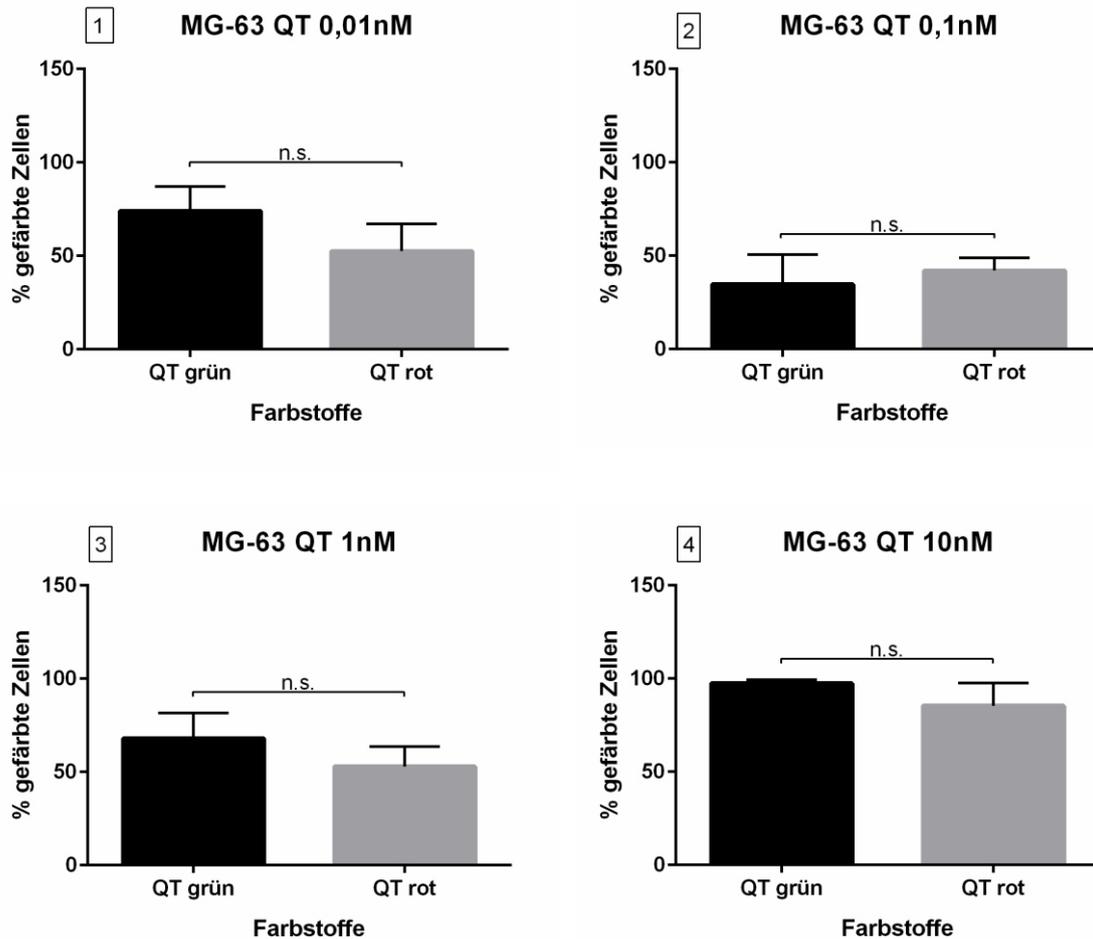


Abbildung 40: Ergebnisse Färbeanalyse mit MG-63 nach QT-Arbeitskonzentrationen

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse der Färbeanalyse mit MG-63 Zellen in Bezug auf die verschiedenen Arbeitskonzentrationen und Farbstoffe der QT (1-4). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl. Alle Werte stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus vier unabhängigen Versuchen ($N=4$) dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, n.s. = nicht signifikant.

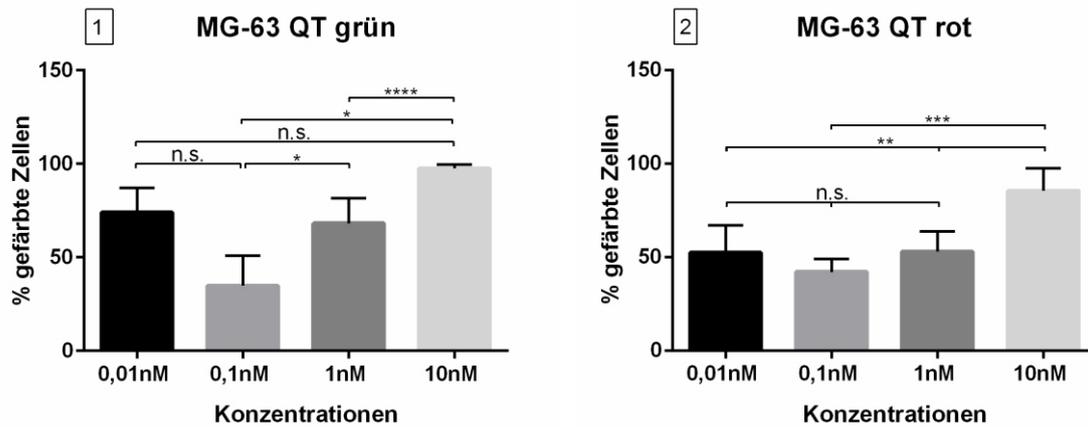


Abbildung 41: Ergebnisse der Färbeanalyse mit MG-63 Zellen nach QT

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse der Färbeanalyse mit MG-63 Zellen für QT grün (1) und QT rot (2). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl. Alle Werte stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus vier unabhängigen Versuchen (N=4) dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, n.s. = nicht signifikant.

In der Analyse der Färbung von MG-63 Zellen mit QT (Abbildung 41) zeigte sich für QT grün (1) kein signifikanter Unterschied in der Anzahl gefärbter Zellen zwischen den Konzentrationen 0,01nM und 0,1nM sowie 0,01nM und 10nM (1). Verglichen mit den Ergebnissen für die Arbeitskonzentrationen 1nM und 10nM waren diejenigen für 0,1nM um 49,0% ($p < 0,05$) bzw. um 64,3% ($p < 0,05$) signifikant erniedrigt (1). Im Vergleich zwischen 1nM und 10nM war ebenfalls eine signifikante Reduktion der Anzahl gefärbter Zellen um 30,1% ($p < 0,0001$) zu beobachten (1). In der Analyse der Färbung von MG-63 Zellen mit QT rot (2) zeigten sich im Vergleich mit den Ergebnissen für die Arbeitskonzentration 10nM die Werte bei 0,01nM um 38,7% ($p < 0,01$), bei 0,1nM um 50,7% ($p < 0,001$) und bei 1nM um 38,2% ($p < 0,001$) signifikant niedriger (2). Insgesamt verhielten sich die MG-63 Zellen bei Färbung mit den QT ähnlich wie primäre humane Osteoblasten (vgl. Abbildung 27)

Um die beiden Fluoreszenzfarbstoffklassen hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit im Modell mit MG-63 Zellen vergleichen zu können, stellt Tabelle 21 die Ergebnisse der Evaluation von CT und QT im Überblick dar.

Tabelle 21: Ergebnisse der Evaluation für MG-63 Zellen im Überblick

Farben	Blau	CT	0,01µM	
			0,1µM	
			1µM	
			10µM	
	Grün	CT	0,01µM	
			0,1µM	
			1µM	
			10µM	
		QT	0,01nM	
			0,1nM	
			1nM	
			10nM	
	Rot	CT	0,01µM	
			0,1µM	
			1µM	
			10µM	
QT		0,01nM		
		0,1nM		
		1nM		
		10nM		

	= signifikante Toxizität im WST-1 Test
	= keine signifikante Toxizität
	= signifikante Färbekraft
	= keine signifikante Färbekraft

5.1.3 Identifikation geeigneter Label

Als „Label“ (L_x) wird im Folgenden die Kombination aus einem Farbstoff einer Fluoreszenzfarbstoffklasse mit einer Arbeitskonzentration bezeichnet. Um geeignete Label zur Färbung von MG-63 Zellen und HOB zu identifizieren, wurden die Ergebnisse der WST-1 Tests und der Färbeanalysen für die Farbstoffe der zwei Fluoreszenzfarbstoffklassen in ihren jeweiligen Arbeitskonzentrationen in der folgenden Tabelle (Tabelle 22) dargestellt. Unter dem Begriff „osteoblastische Zellen“ werden im Folgenden MG-63 Zellen und HOB zusammengefasst. Die Analyse ergab nur zwei für osteoblastische Zellen geeignete Kombinationen L₁ und L₂, die in Tabelle 23 aufgeführt sind.

Tabelle 22: Matrix zur Identifikation geeigneter Label für osteoblastische Zellen

				Zellen		
				MG-63 Zellen	HOB	Osteoblastische Zellen (MG-63 + HOB)
Farben	Blau	CT	0,01µM			
			0,1µM			
			1µM			
			10µM			
	Grün	CT	0,01µM			
			0,1µM			
			1µM			
			10µM			
		QT	0,01nM			
			0,1nM			
			1nM			
			10nM			
	Rot	CT	0,01µM			
			0,1µM			
			1µM			
			10µM			
		QT	0,01nM			
			0,1nM			
			1nM			
			10nM			

	= keine Signifikanz im WST-1 Test
	= Signifikanz im WST-1 Test
	= signifikante Färbeanalyse
	= keine Signifikanz in der Färbeanalyse

Tabelle 23: Geeignete Label für osteoblastische Zellen

<i>Label</i>	<i>Farbstoff mit Konzentration</i>
L_1	CellTracker™ blau 10 μ M
L_2	CellTracker™ rot 0,1 μ M

Die der Arbeit zugrunde liegende Hypothese, dass Fluoreszenzfarbstoffe sich in Bezug auf ihre Toxizität und Farbkraft in Abhängigkeit ihrer Konzentration und des Anregungsspektrums, sowie in Kombination mit verschiedenen Zelllinien unterschiedlich verhalten und daher nicht alle im gleichen Maße geeignet sind, konnte in der Evaluation der Farbstoffe bewiesen werden.

5.2 Untersuchung des Einflusses der Label auf die Genexpression

Nach der Identifikation geeigneter Label für die Färbung von osteoblastischen Zellen wurde deren Einfluss auf die Genexpression der Zellen und ihre molekulare Toxizität untersucht. Hierzu wurden mehrere Gene von Proteinen ausgewählt, die für reife Osteoblasten charakteristisch sind und Aufschluss über die Zellaktivität und -zyklus geben. Die Zellen wurden in einer QRT-PCR amplifiziert. Insbesondere Kollagen Typ1 A1 (COL1A1) und Osteokalzin (BGLAP) stellen biochemische Marker der Knochenbildung und damit der Osteoblastenaktivität dar (Cremers et al., 2008). Die untersuchten Gene und ihre Bedeutung im Zellstoffwechsel und -zyklus sind im Folgenden nochmals dargestellt (Tabelle 24).

Tabelle 24: Amplifizierte Gene und ihre Funktion

Gen	Proteinklasse	Funktion im Knochenstoffwechsel
CCND1	Zellzyklusprotein	Regulation des Zellzyklus während des G1/S-Übergangs (Baldin et al., 1993) Regulation von Gentranskription (Qie & Diehl, 2016) Förderung zellulärer Beweglichkeit (LiWangJiao et al., 2006; LiWangPrendergast et al., 2006)
COL1A1	Extrazelluläres Strukturprotein	Hauptkomponente der Knochenmatrix (Bou-Gharios & De Crombrughe, 2008) Bindungsstellen für Integrinrezeptoren von Osteoblasten (Helfrich et al., 2008) Leitstruktur für migrierende Osteoblasten (Jones & Boyde, 1977) Haptotaktische Migrationssignale (Sotobori et al., 2006)
BGLAP	Extrazelluläres Matrix Protein	Sensitiver und spezifischer Marker der Osteoblastenaktivität im Serum (Cremers et al., 2008) Interaktion mit Hydroxyapatit im Knochen (Hauschka et al., 1989) Multiple endokrinologische Funktionen (Lee et al., 2007; Mizokami et al., 2017; Tangseefa et al., 2018) Regulation der Hirnentwicklung und -funktion (Obri et al., 2018)
IBSP	Extrazelluläres Matrix Protein	Stimulation von Hydroxyapatitbildung <i>in vitro</i> , Mineralisation der Matrix (Gehron Robey, 2008) Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten (Cremers et al., 2008; Malaval et al., 2008) Angiogenese (Bellahcene et al., 2000; Boulefour et al., 2017)

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der QRT-PCR der mit CT blau 10µM, CT rot 10µM oder CT rot 0,1µM gefärbten osteoblastischen Zellen im Vergleich zu nur mit DMSO behandelten Zellen als Kontrolle. In den Diagrammen ist die Genexpression der

gefärbten Phänotypen als Vielfaches der Genexpression des mit DMSO behandelten Phänotyps aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung.

5.2.1 Änderung der Genexpression in MG-63 Zellen

In der QRT-PCR der MG-63 Zellen (Abbildung 42) zeigten sich für die Färbung mit CT blau 10 μ M (1) die Gene COL1A1 0,57-fach ($p < 0,001$), CCND1 0,38-fach ($p < 0,0001$) und BGLAP 0,54-fach ($p < 0,001$) signifikant erniedrigt. Bei der Färbung mit CT rot 10 μ M (2) war dagegen BGLAP 1,75-fach ($p < 0,001$) signifikant erhöht. Für CT rot 0,1 μ M (3) ergab sich bei CCND1 eine 1,7-fache ($p < 0,05$) und bei IBSP eine 2,01-fache ($p < 0,0001$) signifikante Erhöhung der relativen Genexpression.

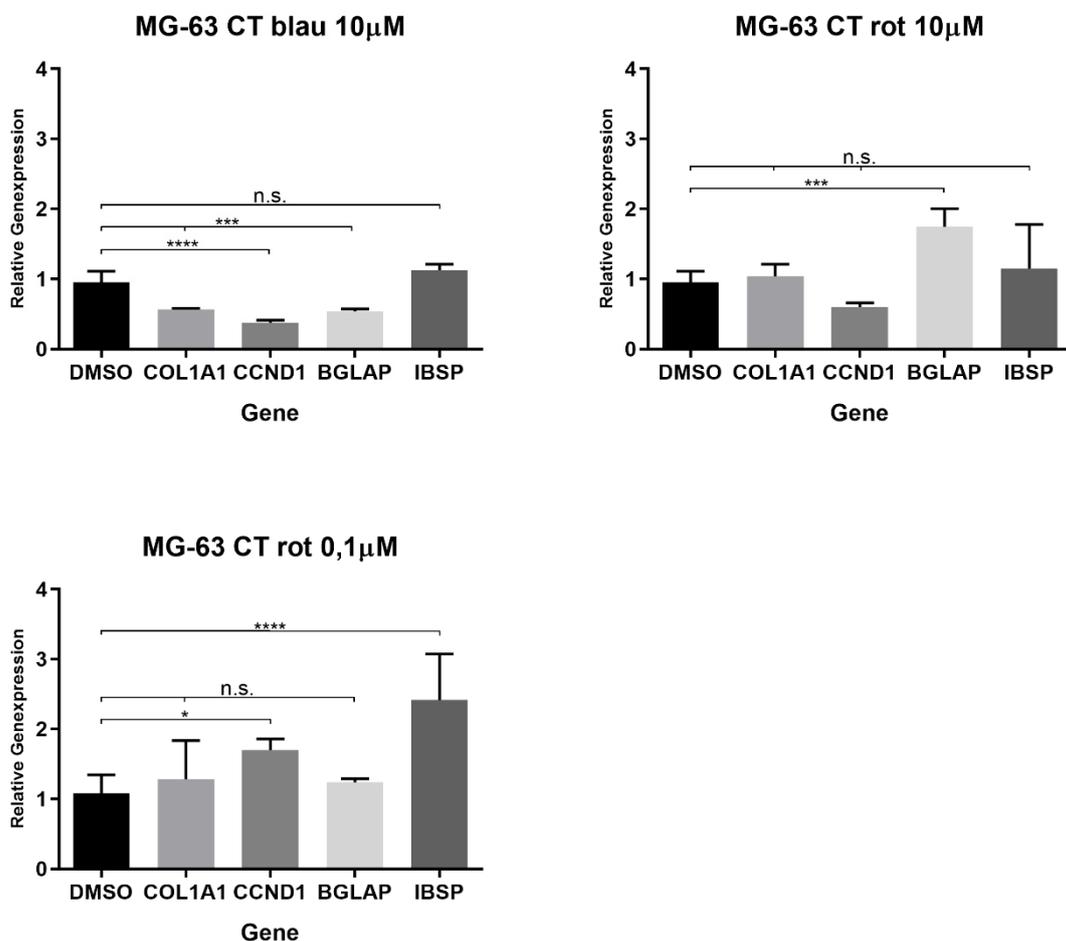


Abbildung 42: Ergebnisse der QRT-PCR mit MG-63 Zellen

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse der QRT-PCR der MG-63 Zellen für die Färbung CT blau 10 μ M (1), CT rot 10 μ M (2) und CT rot 0,1 μ M (3) mit DMSO behandelten Zellen als Kontrolle. Alle Werte stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (N=3) dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, n.s. = nicht signifikant.

5.2.2 Änderung der Genexpression in primären humanen Osteoblasten

In der QRT-PCR der HOB (Abbildung 43) zeigten sich für die Färbung mit CT blau 10 μ M (1) die Gene COL1A1 0,76-fach ($p < 0,05$) und CCND1 0,69-fach ($p < 0,01$) signifikant erniedrigt, IBSP dagegen 1,18-fach ($p < 0,001$) signifikant erhöht. Bei der Färbung mit CT rot 10 μ M (2) war COL1A1 ebenfalls 0,65-fach ($p < 0,01$) signifikant erniedrigt, wohingegen CCND1 1,32-fach ($p < 0,0001$), BGLAP 1,31-fach ($p < 0,0001$) und IBSP 1,36-fach ($p < 0,0001$) signifikant erhöht waren. Für CT rot 0,1 μ M (3) ergab sich bei COL1A1 eine 1,19-fache ($p < 0,001$), bei CCND1 eine 1,09-fache ($p < 0,05$) und bei BGLAP eine 1,21-fache ($p < 0,001$) signifikante Erhöhung der relativen Genexpression.

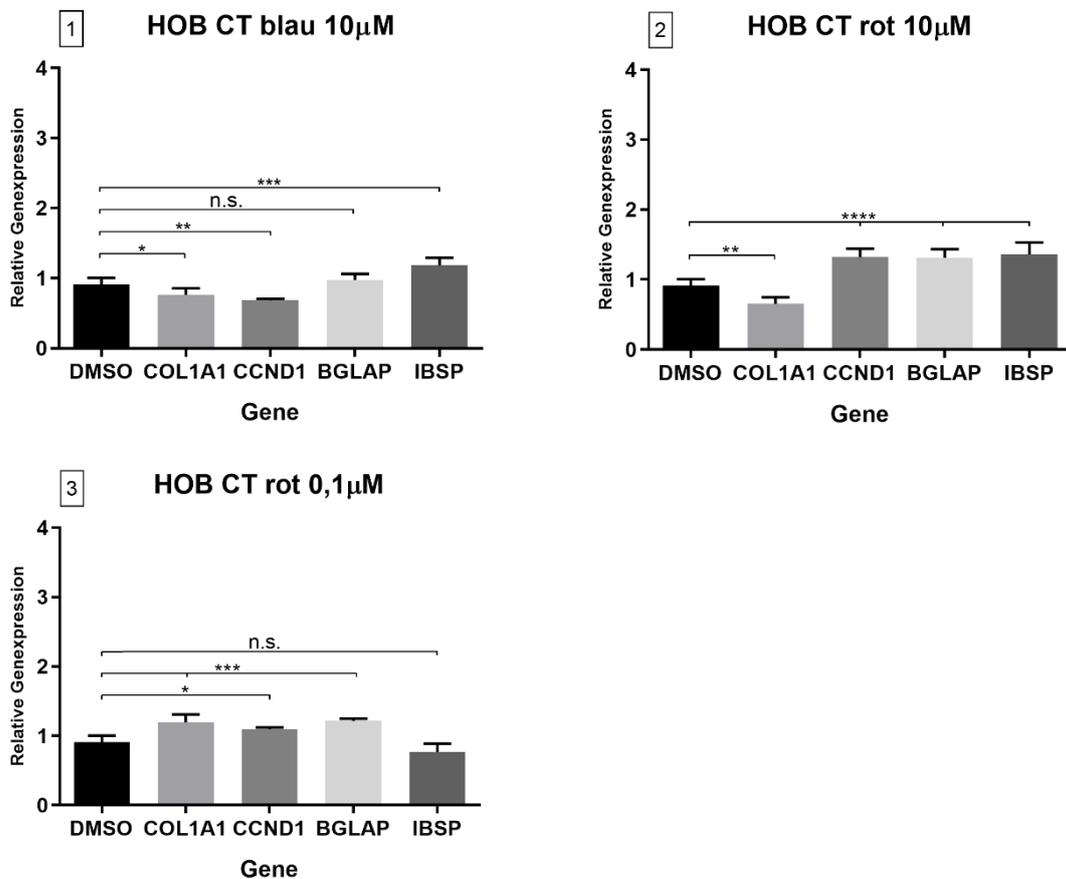


Abbildung 43: Ergebnisse der QRT-PCR mit HOB

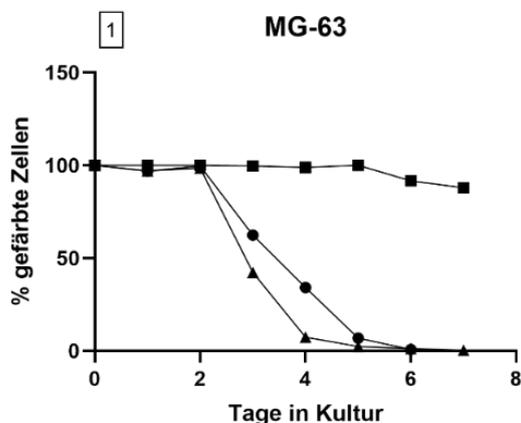
Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse der QRT-PCR mit primären humanen Osteoblasten für die Färbung mit CT blau 10 μ M (1), CT rot 10 μ M (2) und CT rot 0,1 μ M (3), sowie mit DMSO behandelten Zellen als Kontrolle. Alle Werte stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (N=3) dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, n.s. = nicht signifikant.

Die Färbung mit CT blau 10µM führte bei mindestens 50% der amplifizierten Gene zu einer signifikant erniedrigten relativen Genexpression osteoblastischer Zellen (Abbildung 42 (1) und 43 (1)). Für CT rot 10µM dagegen waren maximal 25% der Marker signifikant reduziert (Abbildung 42 (2) und 43 (2)) und für CT rot 0,1µM zeigte sich für keines der Gene eine signifikante Reduktion der relativen Genexpression osteoblastischer Zellen (Abbildung 42 (3) und 43 (3)).

5.3 Proliferationsbeständigkeit über die Zeit

Zur Quantifizierung des Farbverlustes gelabelter Zellen über die Zeit, wurde der Versuch nach Protokoll durchgeführt (4.10). Ermittelt wurden dabei der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen über die Zeit. Zudem wurde die Anzahl von Zellen bezogen auf die Tage in Kultur ermittelt. Die Zellzahlen wurden dabei über die zellspezifische Verdopplungszeit berechnet, wobei letztere für primäre humane Osteoblasten bei 44,5h und für MG-63 Zellen bei 26,2h lag (Daten nicht dargestellt). Im Folgenden sind die Ergebnisse dargestellt. Auf der X-Achse ist die Anzahl der Tage in Kultur, auf der Y-Achse entweder der prozentuale Anteil gefärbter Zellen oder die Zellzahl aufgetragen.

Mit CT blau 10µM und CT rot 0,1µM konnten die MG-63 Zellen im Durchschnitt 5,5±0,5 Tage visualisiert werden und eine Darstellung von ≥50% der Zellen war für 2,5±0,5 Tage möglich (Abbildung 44 (1)). Mit CT rot 10µM dagegen konnten die MG-63 Zellen bis zu 14 Tage signifikant länger ($p < 0,05$) visualisiert werden und eine Färbung von mehr als 50% der Zellen war 9 Tage zu beobachten (Daten nicht dargestellt). Für die MG-63 Zellen lag die Anzahl gefärbter Zellen für einen Zeitraum von 8 Tagen bei durchschnittlich $4,82 \pm 0,27 \times 10^6$ Zellen (Abbildung 44 (2)).



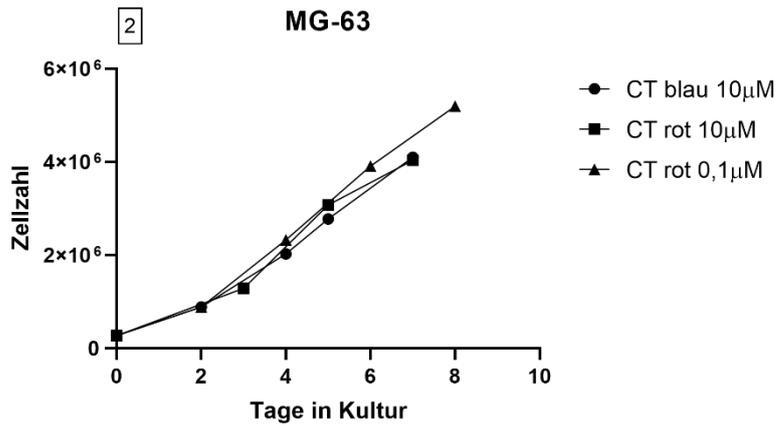


Abbildung 44:
Proliferationsbeständigkeit
der MG-63 Zellen

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse der Proliferationsbeständigkeit von MG-63 Zellen. Diagramm (1) zeigt den Verlust der Label über die Zeit als prozentualen Anteil gefärbter Zellen an der Gesamtzellzahl bezogen auf die Anzahl der Tage in Kultur. Alle Werte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (N=3) dar. Diagramm (2) zeigt die für je einen Versuch bestimmte Anzahl der Zellen bezogen auf die Tage in Kultur (N=1).

Für die HOB war eine Visualisierung der Zellen für einen Zeitraum von $6,5 \pm 0,5$ Tagen möglich (Abbildung 45 (1)). Eine Färbung von $\geq 50\%$ der Zellen war, identisch zu den MG-63 Zellen (Abbildung 44 (1)), für $2,5 \pm 0,5$ Tage zu beobachten. Über den Zeitraum von 7 Tagen war die Anzahl der Zellen in Kultur im Durchschnitt $2,18 \pm 1,25 \times 10^6$ Zellen (Abbildung 45 (2)).

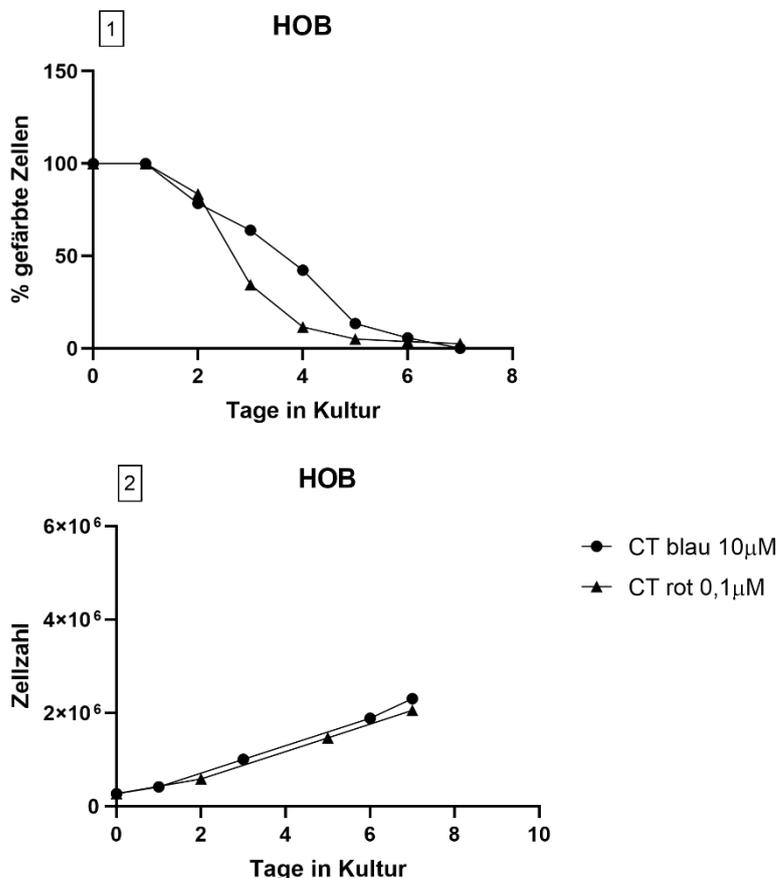


Abbildung 45:
Proliferationsbeständigkeit
der primären humanen
Osteoblasten

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse der Proliferationsbeständigkeit von primären humanen Osteoblasten. Diagramm (1) zeigt den Verlust der Label über die Zeit als prozentualen Anteil gefärbter Zellen an der Gesamtzellzahl bezogen auf die Anzahl der Tage in Kultur. Alle Werte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (N=3) dar. Diagramm (2) zeigt die für je einen Versuch bestimmte Anzahl der Zellen bezogen auf die Tage in Kultur (N=1).

MG-63 Zellen und primäre humane Osteoblasten als osteoblastischen Zellen zusammengefasst, konnten für einen Zeitraum von $6,5 \pm 0,5$ Tagen mit CT rot $0,1 \mu\text{M}$ und $5,5 \pm 0,5$ Tagen mit CT blau $10 \mu\text{M}$ mikroskopisch visualisiert werden (Abbildung 46). Ein signifikanter Unterschied zwischen primären humanen Osteoblasten und MG-63 Zellen ergab sich dabei im t-Test nicht ($p > 0,05$).

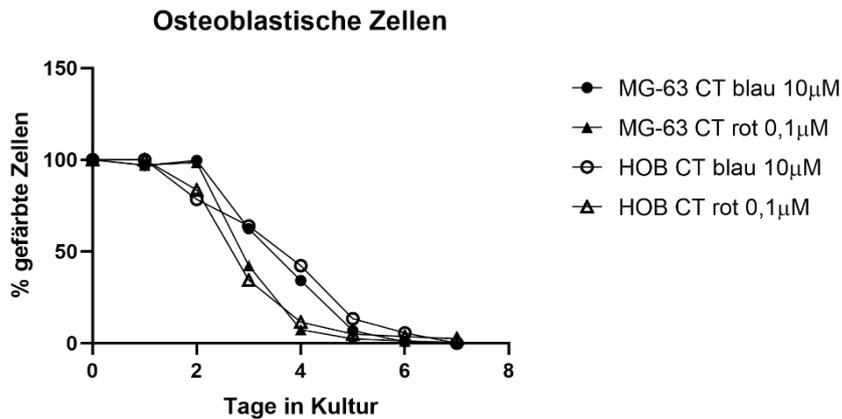


Abbildung 46:
Proliferationsbeständigkeit
osteoblastischer Zellen

Diese Abbildung zeigt den Verlust der Label in osteoblastischen Zellen über die Zeit als prozentualen Anteil gefärbter Zellen an der Gesamtzellzahl bezogen auf die Anzahl der Tage in Kultur. Alle Werte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ($N=3$) dar.

6. Diskussion

6.1 Zusammenfassung

Die durchgeführte Evaluation von Fluoreszenzmarkierungsmethoden ermöglicht die Auswahl geeigneter Label für primäre humane Osteoblasten und MG-63 Zellen für deren Anwendung in einem neuen *in vitro* Modell. In diesem neuen und innovativen *in vitro* Modell kann die Migration von primären humanen Osteoblasten visualisiert und in Abhängigkeit der Oberfläche analysiert werden. Insbesondere können hierbei Einflüsse der ossären Mineralisierung auf die Knochenphysiologie untersucht werden. In der Evaluation der Farbstoffe zweier etablierter Fluoreszenzfarbstoffklassen, CellTracker™ und Qtracker®, wurde ihre Eignung als alternative Zellmarkierungsmethode zu Reportergenen gezeigt. Zudem konnten Toxizitäts- und Färbanalysen die Hypothese stützen, dass nicht alle Fluoreszenzfarbstoffe in gleichem Maße zur Anwendung geeignet sind. In der durchgeführten Studie empfahlen sich vor allem die CellTracker™ zur fluoreszenzbasierten Zellmarkierung und es ergaben sich für primäre humane Osteoblasten, MG-63 Zellen und osteoblastische Zellen insgesamt unterschiedliche geeignete Label. Mit Hilfe der QRT-PCR wurde zudem der Einfluss der Farbstoffe auf die Genexpression dargestellt und die Möglichkeit einer molekularen Toxizität untersucht. In der Mikroskopie von gefärbten Zellen auf mineralisierten und demineralisierten Knochenoberflächen konnte die Anwendbarkeit der Label im Modell gezeigt werden.

6.2 Diskussion der verwendeten Methoden

Als Alternative zu Reportergenen wurden Farbstoffe zweier etablierter Fluoreszenzfarbstoffklassen, CT und QT, verwendet. Für CT und QT wurden jeweils vier Arbeitskonzentrationen festgelegt, welche auch die vom Hersteller empfohlenen Konzentrationsbereiche beinhalteten. So konnten die Farbstoffe in einem breiten Anwendungsbereich analysiert werden, eine Feinabstufung zwischen einzelnen Konzentrationen wurde allerdings nicht vorgenommen. Durch diese Auswahl wurden insgesamt fünf Farbstoffe und drei Fluoreszenzfarben untersucht, woraus sich in der Kombination mit den Arbeitskonzentrationen ein breites Spektrum ergab. Trotzdem blieb die Studie auf die verwendeten Farbstoffklassen und Farbstoffe beschränkt. Die Anwendungsbereiche der CT und QT unterschieden sich in dieser Arbeit nicht wesentlich von denen in anderen Studien. In unterschiedlichen medizinischen Forschungsbereichen werden CT zur Fluoreszenzmarkierung von Zellen (D'Anto et al., 2010; Qin et al., 2017) und zum Zelltracking (Iyer et al., 2009; Makinen et al., 2013) verwendet. Auch QT werden seit ihrer Entdeckung in den 1990er Jahren zur Fluoreszenzmarkierung *in vitro* (Bruchez et al., 1998; Chan & Nie, 1998) und *in vivo* (Larson et al., 2003), sowie zum Zelltracking (Voura et al., 2004) eingesetzt. Im Gegensatz zu anderen Studien wurden in der vorliegenden

Arbeit vor allem niedrige Konzentrationen verwendet und methodisch auf ihre Anwendung mit primären humanen Osteoblasten und MG-63 Zellen hin analysiert. Zusammengefasst sind die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe für die Verwendung im skizzierten *in vitro* Modell geeignet. Ob darüber hinaus noch weitere Farbstoffe in Betracht gezogen werden können, müsste in erweiterten Studien untersucht werden.

Für alle Fluoreszenzaufnahmen wurde ein inverses Mikroskop, Oberserver Z1 (Zeiss), und die den Fluoreszenzfarbstoffen entsprechenden Filtersätze (siehe Tabelle 14) verwendet. Zur Analyse der Färbung von primären humanen Osteoblasten und MG-63 Zellen mit verschiedenen Farbstoffen und Arbeitskonzentrationen wurden die Zellen nach Protokoll gefärbt und mikroskopiert. Die anschließende manuelle Zellzahlbestimmung erfasste nur solche Zellen in der Fluoreszenzaufnahme, die durch den Farbstoff einwandfrei von anderen Zellen und dem Hintergrund abzugrenzen waren. Die Abgrenzung der Zellen voneinander und vom Hintergrund sind entscheidende Parameter in der Auswertung von Zeitrafferaufnahmen und müssen daher in der Analyse der Färbung besonders berücksichtigt werden. Im Hinblick auf die Anwendbarkeit im Modell war daher die Qualität der Färbung im Sinne einer problemlosen Detektion der Zellen wichtig. Es war hierbei davon auszugehen, dass gefärbte Zellen, die sich bereits im Kulturgefäß schwer identifizieren ließen, in einem Modell auf Knochen nicht als solche darstellbar waren. Nachteil der manuellen Zellzahlbestimmung war, dass gegebenenfalls nicht alle gefärbten Zellen visuell-mikroskopisch als solche detektiert wurden. Insbesondere bei geringen Farbstoffkonzentrationen gestaltete sich die klare Zuordnung/Abgrenzung als schwierig.

Andere Methoden zur Analyse von Färbungen wie die Flow Zytometrie scheinen genauer. Letztere wird in ähnlichen Studien verwendet, um die Effizienz einer Zellfärbung zu untersuchen (Shah et al., 2006; Tao et al., 2014). Teilweise werden beide Verfahren auch kombiniert eingesetzt (Shah et al., 2006). Vor dem Hintergrund der Anwendbarkeit im Modell lag in dieser Studie der Fokus eher auf einer qualitativen Beurteilung der Färbung. Eine gegebenenfalls reduzierte Aussagekraft der Färbeefferizienz im Vergleich zu Methoden wie der Flow Zytometrie wurde dabei in Kauf genommen. Insgesamt war die angewandte Methode geeignet, um unter Berücksichtigung von qualitativen und quantitativen Gesichtspunkten die Färbung der Zellen zu untersuchen. In wieweit sich die Analyse auf die Mikroskopie auf ossären Oberflächen übertragen lässt, wird sich zukünftig zeigen.

Neben der Analyse der Färbung gehörte zur Evaluation der Fluoreszenzfarbstoffe auch die Untersuchung auf klassische zelluläre Toxizität. Zu diesem Zweck wurde ein WST-1 Test, wie beschrieben, durchgeführt (siehe 4.6). Der WST-1 Test ist eine standardmäßig verwendete Methode zum Nachweis von Toxizität und gibt vor allem Aufschluss über die

metabolische Funktionsfähigkeit der Zelle. Im Unterschied dazu messen Tests wie der LDH-Test die Nekrose oder Apoptoserate. Daher ließ sich im WST-1 Test hauptsächlich eine Aussage über die Stoffwechselaktivität der Probe im Vergleich zur Kontrolle treffen und nur indirekt über die Zellteilungs- oder Apoptoserate. Vor dem Hintergrund des skizzierten *in vitro* Modells und der Analyse von Zellmigration war die zelluläre Toxizität im Sinne einer eingeschränkten Stoffwechselaktivität als interessanter zu bewerten. Andere Untersuchungsmethoden zur Zellfunktion, wie der MTT-Test oder CCK-8 Test, die in ähnlichen Studien Anwendung finden (Ding et al., 2014; Gao et al., 2016), sind im Vergleich zum WST-1 Test als gleichwertig zu betrachten. Da die WST-1 Tests für primäre humane Osteoblasten und MG-63 Zellen in Kombination mit den Farbstoffen und Arbeitskonzentrationen einheitlich durchgeführt wurden, konnten die Bedingungen als gleich angesehen und die Ergebnisse zwischen den Farbstoffen und Zellreihen verglichen werden. Dieses Vorgehen findet sich auch in andere Untersuchungen zur Eignung von CT (Makinen et al., 2013).

Darüber hinaus erlaubten die Ergebnisse in der Analyse der linearen Regression Rückschlüsse auf einen korrelativen Zusammenhang zwischen der Farbstoffkonzentration und der gemessenen Absorption. Nachteil war, dass in den WST-1 Tests der Einfluss des DMSO allein nicht berücksichtigt wurde. In Anbetracht der Ergebnisse konnte dieser allerdings vernachlässigt werden, da die Menge des DMSO keinen systematischen Einfluss auf die Zellen zu haben schien. Der Einfluss des DMSO wurde erst in der QRT-PCR bedacht und mit DMSO behandelte Zellen als Kontrolle verwendet. In ähnlichen Studien zur Untersuchung von CT als geeigneten Zellmarkierungsmethoden wurde der Einfluss von DMSO überhaupt nicht berücksichtigt (Makinen et al., 2013).

Andere Untersucher führten zusätzlich noch eigenständige Tests zur Proliferation der Zellen und der zellulären Akut- oder Langzeittoxizität der Farbstoffe durch (Chong et al., 2014; Lin et al., 2007; Nicholls et al., 2017). Dies stellt sicherlich eine wertvolle Ergänzung der Daten dar. In der vorliegenden Studie wurde darauf auf Grund der fehlenden Relevanz und der Schwierigkeiten inkongruenter Ergebnisse verzichtet. Stattdessen wurden die Zellen vor allem mikroskopisch auf ihre Vitalität hin überprüft. Die visuell-mikroskopische Beurteilung der Zellen findet über die vorliegende Studie hinaus Anwendung (Gao et al., 2016; Nicholls et al., 2017). Der WST-1 Test erwies sich für die Untersuchung des zellulären toxischen Einflusses der Farbstoffe in ihren Arbeitskonzentrationen auf primäre humane Osteoblasten und MG-63 Zellen als geeignet. In zukünftigen Studien könnten noch mit DMSO behandelte Zellen als Kontrolle ergänzt werden.

Der Einfluss geeigneter Färbungen auf die Genexpression wurde in einer Real Time Quantitativen Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (QRT-PCR) auf Transkriptionseben untersucht. Um die Ergebnisse mit denen der zellulären Toxizitätsanalyse vergleichen zu können, wurde die QRT-PCR ebenfalls 48 Stunden nach Färbung der Zellen durchgeführt. Im Unterschied zu anderen Studien (Gao et al., 2016; Lin et al., 2007) gab es keine Wiederholungen zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt. Eine Aussage über die Akut- oder Langzeitenwicklung auf molekularer Ebene lässt sich daher in dieser Studie nicht treffen. Bei Studien mit wiederholten Messungen lag der Fokus der PCR darauf, herauszufinden, ob die Differenzierung der verwendeten Zellen durch die Färbung beeinflusst wird (Gao et al., 2016; Lin et al., 2007). Für diese Fragestellung erscheint eine wiederholte Messung sinnvoll.

Im Sinne der Analyse von Stoffwechsel- und Zellzyklusaktivität, wie sie auch der WST-1 Test vornimmt, wurden bei der Auswahl der zu amplifizierenden Gene nur solche berücksichtigt, die für den Stoffwechsel von reifen Osteoblasten charakteristisch sind (siehe Tabelle 24). Dies ermöglichte es dem Untersucher, die Ergebnisse beider Untersuchungen in Zusammenhang zu setzen. Der Einfluss der Label auf Gene, die mit der Migration von Osteoblasten assoziiert sind, wurde nicht weiter betrachtet. Interessanterweise verwendeten Gao *et al.* (2016) ähnliche genetische Marker, um den Einfluss von Nanopartikeln auf den osteogenen Differenzierungsprozess muriner bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSC) zu untersuchen. Eine Interpretation der Ergebnisse in Bezug auf die Differenzierung der verwendeten primären humanen Osteoblasten und MG-63 Zellen ist demnach ebenfalls möglich. Zusammenfassend ermöglichte es die QRT-PCR, den Einfluss der Label auf die relative Genexpression von Stoffwechselproteinen auf transkriptioneller Ebene und damit die Möglichkeit einer molekularen Toxizität zu überprüfen. Die Frage, in wieweit die Expression von mit Migration assoziierten Genen durch die Label beeinflusst wird, ist für die Weiterentwicklung des skizzierten Modells interessant und könnte Gegenstand weiterführender Forschungen sein.

Um die Proliferationsbeständigkeit der Label zu untersuchen, wurde der prozentuale Anteil gefärbter Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase über die Zeit manuell bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach der Färbung kultiviert und täglich mikroskopiert. Dieses Vorgehen erlaubte nicht nur, die gefärbten Zellen zu zählen, sondern auch die Zellen hinsichtlich ihrer Lebensfähigkeit zu beurteilen und so die Langzeitwirkung der Label auf die Zellen abzuschätzen. Ähnlich gingen auch Soenen *et al.* (2014) und Mäkinen *et al.* (2013) in ihren Studien vor, allerdings wurde in letzterer Studie der prozentuale Anteil gefärbter Zeller einmalig nach 4 Wochen Kultivierung bestimmt. Soenen *et al.* (2014) bezogen den prozentualen Anteil der Zellen auf die Anzahl der Zellteilungen und nicht, wie

in der vorliegenden Studie, auf die Anzahl von Tagen in Kultur. Unterschiedliche Teilungsraten verwendeter Zellen können die Vergleichbarkeit der dargestellten Ergebnisse erschweren. In der vorliegenden Studie wurde die Zeit (Tage in Kultur) als Referenzgröße verwendet. Alternativ zur mikroskopischen Auszählung kann der Verlust von Label über die Zeit auch mit Hilfe der Flow Zytometrie quantifiziert werden (Gao et al., 2016; Lin et al., 2007). Vorteil der Analyse mittels Flow Zytometrie ist die maschinelle Auswertung und eine deutlich größere Anzahl analysierter Zellen, was sie insgesamt als genauer erscheinen lässt. Die Frage, wie lange die Zellen unter dem Mikroskop visualisierbar sind, kann die Flow Zytometrie allerdings nicht beantworten und schien vor dem Hintergrund der Anwendung im skizzierten Modell wichtiger.

Zur Mikroskopie von gefärbten Zellen auf dem Knochen wurden porcine Tibiaknochen präpariert, teilweise demineralisiert und sterilisiert. Ein entscheidender Vorteil des skizzierten Modells ist die Möglichkeit der Verwendung von humanem Knochen und, in Kombination mit primären humanen Osteoblasten, die Anwendung als humanes *in vitro* Modell. Es ist davon auszugehen, dass die angewandten Methoden zur Bearbeitung und Mikroskopie des Knochens auf humanes Knochenmaterial übertragbar sind. Eine Veränderung der Knochenphysiologie durch die Präparation ist anzunehmen und stellt dagegen eine Limitation des Modells dar. Vor allem im Vergleich zu *in vivo* Modellen wird die mikroskopische Knochenstruktur durch die Bearbeitung gestört. Da Osteoblasten über ihre Integrinrezeptoren mit der Knochenoberfläche interagieren, kann die Wahrnehmung der Oberfläche durch die Zellen in Folge der Aufbereitung des Knochens verändert sein. In wieweit sich dieser Umstand auf ihr Migrationsverhalten auswirkt, ist unklar. Ein Einfluss muss an dieser Stelle indes vermutet werden. Da die Oberflächen, auf denen die Zellen migrieren sollen, im Model in gleicher Weise für Kontrolle (mineralisierter Knochen) und Probe (demineralisierter Knochen) verändert werden, kann dieser Effekt vernachlässigt werden. Es ist davon auszugehen, dass für Zellen, die auf in gleichem Maße veränderte Knochenoberflächen treffen, die „Wahrnehmung“ in beiden Fällen identisch ist. Eventuelle Unterschiede im Migrationsverhalten sind daher auf den unterschiedlichen Mineralisierungsgrad der ossären Oberfläche zurück zu führen.

Neben der Präparation könnten auch die Demineralisierung oder Sterilisation die Integrität des Knochens beeinflussen und damit einen Nachteil des Modells darstellen. In verschiedenen Studien konnte indes gezeigt werden, dass die Demineralisation mit EDTA die Integrität der organischen Knochenmatrix nicht verändert (Abrantes et al., 2017; Wischmann et al., 2018). Darüber hinaus konnten Wischmann *et al.* (2018) zeigen, dass die Behandlung von Knochenscheiben mit EDTA zu einer signifikanten Reduktion des relativen Mineralgehaltes führte und diese Methode zur Demineralisation der

Knochenoberfläche im skizzierten Modell geeignet ist. In der vorliegenden Studie wurden nur mineralisierte und vollständig demineralisiert Knochenoberflächen verglichen. Durch die einfache Durchführung der Demineralisation kann in zukünftigen Untersuchungen der Demineralisierungsgrad abgestuft und damit eine Vielzahl von Oberflächen simuliert werden. Zur Sterilisation von Knochen gilt die Verwendung von PAA ebenfalls als zuverlässige Methode (Pruss et al., 2001). Für mineralisierten Knochen zeigten sich außerdem nach der Sterilisation keine wesentlichen, messbaren Veränderungen zu Referenzknochen (Wischmann et al., 2018). Zusammengefasst sind die angewandten Methoden zur Präparation, Demineralisation und Sterilisation geeignet, um Knochenmaterial zur Verwendung im Modell aufzubereiten.

6.3 Diskussion der Ergebnisse

6.3.1 Ergebnisse in Bezug auf Hypothese 1

„Fluoreszenzfarbstoffe verhalten sich in Bezug auf ihre Klasse, zelluläre Toxizität, Farbkraft, Proliferationsbeständigkeit und ihres Anregungsspektrums sowie in Kombination mit verschiedenen Zelllinien unterschiedlich und sind daher nicht alle in gleichem Maße geeignet.“

Mit allen Farbstoffen war eine Färbung und Visualisierung von Zellpopulationen der primären humanen Osteoblasten und MG-63 Zellen zuverlässig möglich. Sie zeigten dabei die für sie typischen biophysikalischen Eigenschaften bezüglich der zellulären Aufnahme und Lokalisation. CT werden ins Zytosol aufgenommen und färben die komplette Zelle, inklusive Zellausläufer, an, wobei der Zellkern teilweise ausgespart bleibt (Abbildung 21-23). Das gleiche Muster konnte bereits für andere primäre Zellen und Zellreihen gezeigt werden (Gonzalez et al., 2013; Makinen et al., 2013; Markiewicz et al., 2011; Roder & Hille, 2018). Die Aussparung des Zellkerns ist insbesondere für die Auswertung hilfreich, da er als Referenzpunkt innerhalb der Zelle dient. QT werden zwar ebenfalls ins Zytosol aufgenommen, zeigen aber verglichen mit den CT eine punktuelle Fluoreszenz im Zellkörper (Abbildung 28-31). Darüber hinaus bestanden auch in anderen Studien Hinweise auf die Färbung der Zellmembran durch QT (Nicholls et al., 2017).

Auffällig war vor allem die qualitativ gute Färbung der Zellen mit CT rot und grün bei sehr kleinen Konzentrationen, wodurch bei $0,1\mu\text{M}$ Farbstoffkonzentration schon $99,4\pm 1,7\%$ der primären humanen Osteoblasten und $99,5\pm 1,4\%$ der MG-63 Zellen gefärbt waren (Abbildung 19 und Abbildung 34). Im Gegensatz dazu erreichte CT blau erst bei einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ eine $97,7\pm 1,8\%$ ige Färbung der MG.63 Zellen und $80,7\pm 12,3\%$ iger Färbung der primären humanen Osteoblasten. Die Qualität der Färbung, insbesondere

bezogen auf die Fluoreszenzintensität, war für CT blau im Vergleich zu den beiden anderen CT auch bei hohen Konzentrationen schwächer (vgl. Abbildung 21-23). Es ist nicht davon auszugehen, dass die zelluläre Aufnahme der einzelnen CT unterschiedlich ist. Daher kann eher angenommen werden, dass die Fluoreszenzintensität von CT blau verglichen zu grün und rot generell geringer ist. Eine längere Inkubationszeit der Zellen mit der Farbstofflösung könnte diesem Effekt entgegenwirken, wurde in dieser Studie aber nicht weiter untersucht. In der Literaturrecherche ergaben sich auch keine vergleichbaren Ergebnisse mit ähnlich niedrigen Konzentrationen.

Im Unterschied zu den CT war eine effiziente Visualisierung der osteoblastischen Zellen mit den QT, ähnlich wie für anderen Zellen (Danner et al., 2013), nur bei vergleichsweise hohen Konzentrationen möglich. Es ergab sich erst bei 10nM eine Färbung der HOB und MG-63 Zellen von $81,9 \pm 19\%$ bzw. $91,4 \pm 9,6\%$ (Abbildung 26 und Abbildung 40), wobei die Anzahl der gefärbten Zellen bei den HOB für QT grün um $36,6\%$ ($p < 0,01$) signifikant erhöht war (Abbildung 26). Bei einer Färbung mit QT rot 10nM waren demnach nur $63,7 \pm 7,7\%$ der Zellen gefärbt. Dagegen waren MG-63 Zellen zu $85,5\%$ mit QT rot 10nM gefärbt und Studien mit anderen Zellen zeigten ebenfalls Färbefeffizienzen von $> 70\%$ nach 24 Stunden (Danner et al., 2013; Lin et al., 2007). In diesem Fall schien tatsächlich eine geringere Aufnahme von QT rot in das Zytosol primärer humaner Osteoblasten vorzuliegen und eine Beschränkung auf die vom Hersteller empfohlenen 10nM stellte eine Limitation der Arbeit dar. Es darf vermutet werden, dass mit höheren Konzentrationen auch eine effektivere Färbung von humanen Osteoblasten mit QT rot, wie für andere Zellen bereits gezeigt (Danner et al., 2013), möglich ist. Diese Vermutung könnte in weiterführenden Studien bestätigt werden. Zusammenfassend präsentierte sich in der Analyse der Farbkraft der QT nur QT grün 10nM als geeignetes Label für osteoblastische Zellen. In der Analyse der Toxizität allerdings waren die Absorptionswerte für dieses Label in Kombination mit primären humanen Osteoblasten um $24,4\%$ ($p < 0,001$) signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 24 (4)). Für QT rot 10nM zeigte sich hingegen keine signifikante Reduktion (Abbildung 24 (4)).

Auf Grundlage der oben aufgestellten Vermutung über die zelluläre Aufnahme von QT rot ist davon auszugehen, dass bei gleicher Aufnahmemenge von QT rot die Absorptionswerte ebenfalls reduziert wären. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass für beide QT signifikante R^2 -Werte (QT grün $R^2=0,72$ ($p < 0,0001$) und QT rot $R^2=0,52$ ($p < 0,01$)) in der Analyse der linearen Regression ermittelt wurden. Folglich bestand eine Korrelation zwischen der Konzentration der Farbstoffe und der Zellfunktion. Interessanterweise fand sich dieser Zusammenhang nicht für die MG-63 Zellen. Diese zeigten weder im Vergleich der Absorptionswerte mittels ANOVA signifikante Reduktionen der Absorption (Abbildung 38),

noch ein R^2 signifikant ungleich Null in der linearen Regressionsanalyse. Um die Ergebnisse einordnen zu können, war ein Vergleich mit anderen Studien hilfreich. Dieser Vergleich war jedoch schwierig, da es eine große Vielfalt von verwendeten Quantum Dots gibt, deren Toxizitätspotential von den individuellen physiochemischen Eigenschaften abhängt (Hardman, 2006; Resch-Genger et al., 2008). Daher war nur ein Vergleich mit Studien sinnvoll, bei denen die gleichen QT eingesetzt wurden. Lin *et al.* (2007) verwendeten in ihrer Studie zur Anwendung von Quantum Dots mit embryonischen Stammzellen ebenfalls QT grün und QT rot in der Konzentration 10nM und konnten in ihren Untersuchungen keinen Einfluss der Färbung auf die Zellfunktion feststellen. Auch eine Verdopplung der Konzentration von QT rot auf 20nM führt bei Danner *et al.* (2013) weder kurz- noch langfristig zu Veränderungen der Proliferation von pankreatischen Stammzellen. In Kombination mit den eigenen Ergebnissen für MG-63 Zellen liegt der Schluss nahe, dass der zelluläre toxische Effekt der QT auf die primären humanen Osteoblasten zelltypabhängig ist.

Diese Überlegung wurde durch die Ergebnisse der zellulären Toxizitätsanalyse von osteoblastischen Zellen mit den CT unterstützt, welche deutliche Parallelen aufwies. Farbstoffkonzentrationen ab $1\mu\text{M}$ führten, zumindest für CT grün und rot, zu einer signifikant eingeschränkten Zellfunktion der HOB (Abbildung 17) im WST-1 Test. In der Regressionsanalyse war R^2 für alle drei Farbstoffe ebenfalls signifikant ungleich Null. MG-63 Zellen zeigten unterdessen bei Konzentrationen ab $1\mu\text{M}$ keine signifikanten Ergebnisse (Abbildung 32) und in der linearen Regressionsanalyse kein R^2 signifikant unterschiedlich zu Null. Im Vergleich mit anderen Studien bestätigte sich der Eindruck. Mäkinen *et al.* (2013) konnten für CT grün $10\mu\text{M}$ weder kurz- noch langfristig signifikante Unterschiede der Zellfunktion oder Proliferation von hESC-stämmigen neuronalen Zellen feststellen. Insgesamt ließen die Ergebnisse die Aussage zu, dass primäre humane Osteoblasten auf die Färbung mit exogenen Farbstoffen höherer Konzentration mit einer Reduktion der Zellfunktion reagierten. Dadurch ergaben sich in der Evaluation deutlich weniger geeignete Label für primäre humane Osteoblasten (Tabelle 19) als für die MG-63 Zellen (Tabelle 21). Für osteoblastische Zellen insgesamt konnten nur zwei Label identifiziert werden (Tabelle 23).

Im Weiteren war von Interesse, die Proliferationsbeständigkeit der Label zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurde der prozentuale Anteil gefärbter Zellen über die Zeit und die Anzahl der Zellen in Kultur bestimmt. Mit CT blau $10\mu\text{M}$ und CT rot $0,1\mu\text{M}$ war die Visualisierung von MG-63 Zellen im Durchschnitt $5,5\pm 0,5$ Tage möglich (Abbildung 44 (1)). CT rot $10\mu\text{M}$ dagegen ermöglichte die Darstellung der Zellen für 14 Tage und damit signifikant länger ($p < 0,05$) als die beiden anderen Label (Daten nicht gezeigt). Für die primären humanen Osteoblasten ergab sich mit durchschnittlich $6,5\pm 0,5$ Tagen für CT blau $10\mu\text{M}$ und CT rot

0,1µM ein ähnlicher Zeitraum (Abbildung 45 (1)). Osteoblastische Zellen insgesamt konnten mit CT blau 10µM und rot 0,1µM für 5,5±0,5 Tage (Abbildung 46) visualisiert werden. Hierbei bestand kein signifikanter Unterschied ($p>0,05$) zwischen primären humanen Osteoblasten und MG-63 Zellen. Der Verlust des Labels schien nach diesen Ergebnissen eher abhängig von Farbstoff und Konzentration als vom Zelltyp. Über den beobachteten Zeitraum hinweg zeigte sich in der visuellen Inspektion kein Einfluss der Label auf das Überleben oder die Funktionsfähigkeit der Zellen.

Neben dem Farbstoff und seiner Konzentration schien auch die Inkubationszeit der Färbung ein entscheidender Parameter zu sein, der die Proliferationsbeständigkeit der Zellen beeinflusst. Mäkinen *et al.* (2013) konnten in ihrer Untersuchung von neuronalen Zellen mit CT grün zeigen, dass eine Färbung mit 10µM für 72 Stunden die Visualisierung der Zellen über 4 Wochen ermöglichte (Mäkinen *et al.*, 2013). Im Gegensatz dazu war der Farbstoff bei Inkubationszeiten von 0,25-4 Stunden nur für einen Zeitraum von 2 Wochen detektierbar (Mäkinen *et al.*, 2013). Eine ähnliche Visualisierungsdauer von unter 14 Tagen zeigte sich auch bei Peterson *et al.* (2010), in deren Studie olfaktorische Gliazellen mit 5µM für 60 Minuten gefärbt wurden. In der vorliegenden Studie wurde nur eine Färbedauer verwendet, die sich an den Empfehlungen des Herstellers orientierte. Inwieweit sich die Proliferationsbeständigkeit bei längerer Inkubationszeit verlängert, wurde hier nicht untersucht und stellt eine Limitation der Arbeit dar. Auf Basis des Literaturvergleiches ist aber anzunehmen, dass sich die Proliferationsbeständigkeit durch längere Inkubationszeiten steigern ließe. Der Einfluss der Färbedauer auf die Toxizität der Farbstoffe sollte hierbei auf jeden Fall berücksichtigt werden. Insgesamt ermöglichte die Färbung mit CT blau 10µM und CT rot 0,1µM die Visualisierung der Zellen bis zu 5,5±0,5 Tagen (Abbildung 46 (1)). Inwiefern sich dieser Zeitraum durch eine längere Inkubationszeit der Farbstoffe steigern lässt, ohne dass toxische Effekte beobachtet werden, ist eine Forschungsfrage für weiterführende Versuche.

Zusammenfassend bestätigten die Ergebnisse der Evaluation der Farbstoffe (Tabelle 22) die Hypothese dieser Arbeit, dass sich Fluoreszenzfarbstoffe in Bezug auf ihre Klasse, zelluläre Toxizität, Farbkraft, Proliferationsbeständigkeit und ihres Anregungsspektrums, sowie in Kombination mit verschiedenen Zelllinien unterschiedlich verhalten und daher nicht alle in gleichem Maße geeignet sind.

6.3.2 Ergebnisse in Bezug auf Hypothese 2

„Eine systematische Analyse kann am besten geeigneten Label identifizieren.“

Die Ergebnisse der systematischen Toxizitäts- und Färbeanalyse wurden in Abhängigkeit der verwendeten Zellen oder Farbstoffklassen tabellarisch dargestellt (Tabelle 18-21). Die Zusammenführung der Einzeltabellen in einer Matrix (Tabelle 22) ermöglichte die Identifikation der am besten geeigneten Label sowohl zellspezifisch als auch für osteoblastische Zellen.

Für die primären humanen Osteoblasten ergaben sich nach der Analyse nur drei geeignete Label: CT blau 10 μ M, CT grün 0,1 μ M und CT rot 0,1 μ M (Tabelle 19). Für die MG-63 Zellen dagegen konnten zehn geeignete Label in der systematischen Analyse identifiziert werden (Tabelle 21), also mehr als 3 Mal so viele. Diese Diskrepanz verdeutlichte die Unterschiede im Toxizitäts- und Färbeverhalten der beiden Zellen, die bereits in den vorangegangenen Analysen aufgefallen war (*siehe* 6.3.1). Bei den primären humanen Osteoblasten mussten fünf Label auf Grund von signifikanter zellulärer Toxizität als ungeeignet eingestuft werden, bei den MG-63 Zellen dagegen nur drei. Insbesondere bei hohen Konzentrationen der CT konnte ein signifikanter Unterschied in der zellulären Toxizität der Label beobachtet werden. Für die Konzentrationen 1 μ M und 10 μ M waren bei den primären humanen Osteoblasten 66,6% der Label auf zellulärer Ebene signifikant toxisch, bei den MG-63 Zellen konnte keine zelluläre Toxizität bei den gleichen Konzentrationen nachgewiesen werden (Tabelle 22).

In Bezug auf die Färbeanalyse erreichten bei den primären humanen Osteoblasten elf Label keine signifikante Färbeeffizienz, wohingegen es bei den MG-63 Zellen nur acht Label waren. Hier zeigten sich für beide Zelltypen allerdings ähnliche Muster. In der Analyse von CT blau und den beiden QT war für die MG-63 Zellen bei mindestens 25% der verwendeten Konzentrationen eine Signifikanz in der Färbeanalyse zu beobachten, bei den primären humanen Osteoblasten war dies bei maximal 25% der Konzentrationen der Fall. Interessanterweise trugen diese Ergebnisse maßgeblich dazu bei, dass keines der Label mit QT für die Verwendung mit primären humanen Osteoblasten geeignet war (Tabelle 22). Bei den MG-63 Zellen dagegen konnten drei von acht möglichen Labeln mit QT nach der Analyse als geeignet identifiziert werden.

Für primäre humane Osteoblasten und MG-63 Zellen, zusammengefasst als osteoblastische Zellen, waren nach der Analyse zwei Label geeignet: CT blau 10 μ M und CT rot 0,1 μ M (Tabelle 22 und Tabelle 23). Studien mit vergleichbaren Ergebnissen zu MG-63 Zellen und primären humanen Osteoblasten fehlen nach aktueller Literaturlauswertung. Für andere Zelltypen konnte in vorhergehenden Studien aber bereits gezeigt werden, dass

eine systematische Analyse von ein oder mehreren Farbstoffen und Konzentrationen die Identifikation geeigneter Label erlaubte. Nicholls *et al.* (2017) legten dar, dass u.a. Qtracker® 656 als geeignetes Label zur Identifikation von transplantierten neuronalen Stammzellen dienen konnte. Auch Qtracker® 605 konnte in Konzentrationen bis zu 20nM in Versuchen mit pankreatischen Stammzellen eingesetzt werden (Danner *et al.*, 2013). Und nicht zuletzt konnten Mäkinen *et al.* (2013) durch ihre detaillierte Untersuchung von CT grün und DID zeigen, dass humane neuronale Zellen mit beiden Farbstoffen ohne signifikanten Effekt auf die Zellcharakteristiken gefärbt werden konnten. Im Unterschied und als Ergänzung zu den genannten Studien wurden in der vorliegenden Studie sowohl primäre Zellen als auch eine etablierte Zellreihe verwendet, analysiert und passende Label identifiziert. Als eine Stärke dieser Studie kann festgehalten werden, dass sich mögliche Label für eine Mehrfachfärbung aus Tabelle 22 eruieren lassen. Die Option einer Mehrfachfärbung wiederum stellt einen deutlichen Vorteil des skizzierten *in vitro* Modells dar und ermöglicht es, die Interaktion zwischen humanen Osteoblasten und anderen Zellen während der Migration zu visualisieren und zu untersuchen.

Zusammengefasst ermöglichte die dargestellte systematische Analyse eine Identifikation geeigneter Label für die Einfach- oder Mehrfachfärbung von primären humanen Osteoblasten und MG-63 Zellen sowie die Kombinationsfärbungen beider und die Verwendung verschiedener Zellen in einem neuen *in vitro* Migrationsmodell.

6.3.3 Ergebnisse in Bezug auf Hypothese 3

„Neben klassischer zellulärer Toxizität besteht die Möglichkeit der molekularen Toxizität.“

Die in Abbildung 42 und Abbildung 43 gezeigten Daten zur möglichen molekularen Toxizität führten zu drei zentralen Beobachtungen. Erstens führten alle Label, unabhängig von Farbstoff und Zelltyp, zu einer Änderung in zumindest einer der vier exprimierten Marker. Zweitens wurden sowohl Erhöhung als auch Erniedrigung der Markerexpression gemessen. Drittens, obwohl signifikant, war die Größenordnung der Expressionsveränderungen weniger als 2-fach und daher moderat.

In der Analyse von CT blau 10µM zeigte sich eine signifikante Reduktion der relativen Genexpression für mindestens 50% der amplifizierten Gene sowohl für primäre humane Osteoblasten (Abbildung 43 (1)) als auch für MG-63 Zellen (Abbildung 42 (1)). Im Gegensatz dazu war bei CT rot 10µM nur Col1A1 0,65-fach ($p < 0,01$) für primäre humane Osteoblasten signifikant reduziert exprimiert (Abbildung 43 (2)). Eine Färbung mit CT rot 0,1µM führte nicht zur signifikanten Reduktion ($p > 0,05$) der relativen Genexpression von osteoblastischen Zellen (Abbildung 42 (3) und Abbildung 43 (3)). Insgesamt konnte durch

die signifikante Reduktion der relativen Genexpression von osteoblastischen Zellen durch die Label die Möglichkeit einer molekularen Toxizität der Farbstoffe bestätigt werden. Letztere schien in der vorliegenden Studie (i) farbstoffabhängig, (ii) nicht konzentrationsabhängig und (iii) nicht zellspezifisch zu sein.

Es fiel auf, dass häufig eine signifikante Steigerung der relativen Genexpression durch die Färbung zu beobachten war (Abbildung 42 und Abbildung 43). Eine Erklärung dafür lieferte die vorliegende Studie nicht. Unklar war zudem, ob sich eine gesteigerte Transkription auch auf posttranskriptioneller Ebene, sprich in der Menge tatsächlich produzierter Proteine, wiederfinden lässt. Der Vergleich mit vorherigen Studien war an dieser Stelle interessant. In der Literaturrecherche fanden sich leider keine vergleichbaren Untersuchungen mit CT.

Frühere *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen konnten allerdings darlegen, dass reife Osteoblasten osteoblastische Marker sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene sehr heterogen exprimieren (Candeliere et al., 2001; Liu et al., 1997). Matrixmoleküle wie BSP oder OC wurden von Untergruppen der Osteoblastenpopulation, abhängig von dem zellulären Reifungsgrad, der Umgebung und des Mikroumfeldes, unterschiedlich stark gebildet (Candeliere et al., 2001). Liu *et al.* (1997) untersuchten die Expression einzelner reifer Osteoblasten untereinander mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen und PCR und fanden ebenfalls signifikante Unterschiede. Bis auf die Färbung oder Behandlung mit DMSO waren die Bedingungen für die primären humanen Osteoblasten in dieser Studie identisch, weshalb etwaige Unterschiede am ehesten auf den Einfluss der Label zurück zu führen waren. Zudem wurde die Genexpression nicht auf Einzelzellniveau quantifiziert, sondern die relative Genexpression einer großen Zellzahl untersucht, wodurch Unterschiede zwischen den einzelnen Zellen weniger bedeutend waren.

In Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich ein deutlicher Einfluss der Label auf die relative Genexpression von osteoblastischen Zellen, wobei sich für die signifikanten Steigerungen in dieser Studie keine Erklärung fand. Die der Arbeit zu Grunde liegende Hypothese wurde dennoch bestätigt. Mit der QRT-PCR wurden jedoch nur Expressionsunterschiede der mRNA und nicht der dazugehörigen Proteine festgestellt. Dies stellte eine Limitation der Arbeit dar. In wieweit der fehlende negative oder positive Einfluss lediglich auf die transkriptionelle Ebene beschränkt ist oder sich auch auf Proteinebene zeigt, sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

Wichtig bei der Interpretation der oben diskutierten Daten sind zwei Aspekte. Zum einen lassen die allermeisten vorausgegangenen Studien mögliche Veränderungen der Genexpression durch Fluoreszenzfarbstoffe außer Acht. Ungeachtet dessen werden diese

Label seit Jahren erfolgreich eingesetzt. Auch die eigene Forschungsgruppe wird auf Grund der Daten in der vorliegenden Studie nicht auf die Verwendung der Label verzichten. Jedoch wird in weiterführenden Studien die mögliche Veränderung der Genexpression sorgfältig beachtet werden. Ein Beispiel wäre eine Migrationsanalyse fluoreszenzmarkierter Zellen zuerst durch Mikroskopie und nachfolgend durch Transkriptomics. In diesem Fall sollten Kontrollen der Transcriptomicsanalyse immer gefärbte und ungefärbte Zellen beinhalten. Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen kann empfohlen werden, neben der zellulären auch immer die molekulare Toxizität zu untersuchen.

6.3.4 Ergebnisse in Bezug auf Hypothese 4

„Fluoreszenzfarbstoffe können als geeignete Alternative zu Reporter genen für die fluoreszenzbasierte Zellmarkierung von primären humanen Osteoblasten auf planaren ossären Oberflächen dienen.“

Die Aufnahmen von gelabelten MG-63 Zellen auf Knochen (Abbildung 36 und Abbildung 37) zeigten deren Anwendbarkeit im Modell. Osteoblastische Zellen konnten durch das Labeling auf mineralisierten und demineralisierten ossären Oberflächen bei unterschiedlich hoher Zellzahl, Vergrößerung sowie nativ und fixiert visualisiert und mikroskopiert werden. Die Gegenfärbung mit DAPI erlaubte dabei die exakte Zuordnung des Fluoreszenzsignals zu einer Zelle, wobei das bei der guten Fluoreszenzdarstellung der Zellen nicht zwingend notwendig war. Auf beiden Oberflächen waren die Zellen deutlich gegen den Hintergrund abgrenzbar und eine Hintergrundfluoreszenz kaum zu detektieren, was CT rot besonders für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen auf biologischen Materialien empfiehlt. In der visuell-mikroskopischen Analyse der Zellmorphologie, -vitalität und -adhäsion ergaben sich keine Hinweise auf Differenzen zwischen den beiden Knochenoberflächen. Die Zellen waren allgemein gut adhärent, vital und in ihrer Morphologie nicht verändert (Abbildung 36 und Abbildung 37). Beide Knochentypen wurden mit Essigsäure sterilisiert. Obwohl die visuelle Beobachtung viele Rückschlüsse auf die zelluläre Funktionalität zulässt, fehlt doch der Vergleich mit Knochenoberflächen, die nicht oder auf eine andere Weise sterilisiert wurden. Nicht-sterilisierte Knochen sind auf Grund der Kontaminationsgefahr nicht einsetzbar. Für andere Sterilisationsverfahren ist anzunehmen, dass eine Beeinträchtigung der Zellen in ähnlichem Maße wie für Essigsäure vorliegt. Die Evaluation einer alternativen Sterilisationsmethode bringt daher keinen Vorteil.

Die Analyse der Fluoreszenzaufnahmen ließ ferner Schlussfolgerungen über die optimalen Aufnahmeparameter zu. Für die im Modell vorgesehenen Zeitrafferaufnahmen empfahl sich der Einsatz der 20- oder 32-fachen Vergrößerung bei einer geringen Zellzahl. Während der

Aufnahmen fiel die Fokussierung mit dem 20er Objektiv zeitweise schwer, was aber eher auf ein technisches Problem des verwendeten Mikroskops zurück zu führen war. Mit dem 32er Objektiv waren die detailliertesten Aufnahmen möglich, bei einer niedrigen Zellzahl auf dem Knochen ist die Anzahl der Zellen im Bildfeld aber möglicherweise zu gering und eine höhere Vergrößerung besser. Die Alternative, einfach eine größere Zelldichte zu verwenden, schien auf den ersten Blick sinnvoll, brachte indes zwei Nachteile mit sich: die Darstellung der Zellen war bei hoher Dichte etwas schwieriger und ihre Bereitschaft zur Migration gegebenenfalls reduziert. In ähnlichen Studien wurden ebenfalls 20er Objektive für die Zeitrafferaufnahmen verwendet (Dallas et al., 2009; Fotos et al., 2006), was die in dieser Arbeit gezogenen Rückschlüsse unterstützte. Im ursprünglichen Modell war die Aufnahme der Zellen im Intervall von 15 Minuten für 24 Stunden geplant. Die Färbung von MG-63 Zellen mit CT rot 1µM war für diesen Zeitraum stabil (Daten nicht gezeigt). Die Modalitäten für Zeitrafferaufnahmen können je nach Studie stark variieren. Es finden sich aber Studien mit dem gleichen Aufnahmeintervall und der gleichen Aufnahmezeit (Dallas et al., 2009; Saller et al., 2012). Zusätzlich werden für eine höhere Fallzahl in Zeitrafferstudien häufig mehrere Orte parallel aufgenommen. Auch dieses Vorgehen ist im skizzierten Modell möglich.

Zusammengefasst konnte die Anwendung der Label zur fluoreszenzbasierten Zellmarkierung und Visualisierung auf ossären Oberflächen unterschiedlicher mineralischer Komposition validiert und geeignete Aufnahmeparameter für die geplanten Zeitrafferaufnahmen bestimmt werden. Trotzdem zeigten sich bei den durchgeführten Untersuchungen auch Limitationen des neuen *in vitro* Modells.

6.4 Limitationen des neuen *in vitro* Modells

Zunächst einmal musste festgestellt werden, dass auch die Färbung mit gängigen Fluoreszenzfarbstoffen wie CT und QT einen Einfluss auf die Expression osteoblastenspezifischer Gene hat. Dieser Effekt wurde bereits von Dass *et al.* (2007) für die Transfektion von osteoblastischen Zellen mit GFP gezeigt und ist ein häufiges Argument gegen die Verwendung von Reportergenen. Auf der Grundlage der vorliegenden Ergebnisse wurde die Möglichkeit einer molekularen Toxizität der verwendeten Farbstoffe diskutiert. Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen wie CT und QT scheint demnach, verglichen mit Reportergenen wie GFP, bezüglich der Möglichkeit färbebedingter molekularer Veränderungen keinen Vorteil zu bieten. In beiden Fällen ist eine Veränderung des physiologischen Zellverhaltens, auch in Bezug auf die Migration, durch die veränderte Genexpression nicht auszuschließen. Wie bereits dargelegt werden CT und QT dennoch weiterhin – auch in der eigenen Forschungsgruppe – Anwendung finden. Bei der Bewertung

von Ergebnissen zur Migration von Osteoblasten in dem neuen *in vitro* Modell sollte die Möglichkeit einer molekularen Toxizität aber speziell berücksichtigt werden.

Eine weitere Limitation des Modells stellte die Verwendung von präpariertem Knochen dar. Durch die unterschiedlichen Präparationsschritte und verwendeten Werkzeuge wurde die Knochenoberfläche im Vergleich zu ihrer physiologischen Struktur mechanisch verändert. Im Rahmen der Sterilisation war zudem eine Beeinflussung der chemischen Zusammensetzung nicht ausgeschlossen. Es musste davon ausgegangen werden, dass eine strukturelle Veränderung der Oberfläche in einem derart komplexen Prozess wie der Zellmigration, in welchem Letztere ein entscheidender Einflussfaktor ist, zur Veränderung des Migrationsverhaltens der Zellen führen kann. Die artifizielle Oberflächenstruktur im Modell und deren Einfluss auf das Migrationsverhalten von osteoblastischen Zellen muss daher bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Darüber hinaus ist die Demineralisation zwar ein Standardverfahren in der Histologie, in wieweit sie allerdings den tatsächlichen Bedingungen in einem osteoporotischen Knochen entspricht, ist noch schwer quantifizieren.

Wie die meisten anderen *in vitro* Modelle unterliegt das neue Modell ebenfalls den Beschränkungen des zweidimensionalen Untersuchungsaufbaus. Mit diesem lässt sich ein so hochkomplexer und vor allem dreidimensionaler Prozess wie die Migration von Zellen im Knochen nur näherungsweise darstellen. Darüber hinaus werden Einflussfaktoren wie Chemokine, Flüssigkeitsströmungen, mechanische Beanspruchung des Knochens und Zell-Zell-Interaktionen zunächst nicht berücksichtigt. Sie sind aber, wie in der Einleitung dargelegt, neben der ossären Oberfläche, ebenfalls wichtige Einflussfaktoren für das Bewegungsverhalten von Zellen. Das neuen *in vitro* Untersuchungsmodell lässt demnach vor allem Aussagen über den Einfluss der Oberfläche auf das Migrationsverhalten von osteoblastischen Zellen auf planaren ossären Oberflächen zu.

Zusammengefasst kann das neue *in vitro* Modell – unter Berücksichtigung der Limitationen – zur Visualisierung von osteoblastischen Zellen auf planaren ossären Oberflächen für zukünftige Migrationsdetektion verwendet werden. Im letzten Schritt erfolgte die Implementierung der Ergebnisse der vorliegenden Studien in das skizzierte *in vitro* Untersuchungsmodell.

6.5 Implementierung der Ergebnisse in das neue *in vitro* Untersuchungsmodell

Die Ergebnisse der Evaluation wurden in das skizzierte *in vitro* Modell (Abbildung 4) implementiert und dieses wird im Folgenden mit den in dieser Arbeit verwendeten Arbeitsschritten vorgestellt (Abbildung 47):

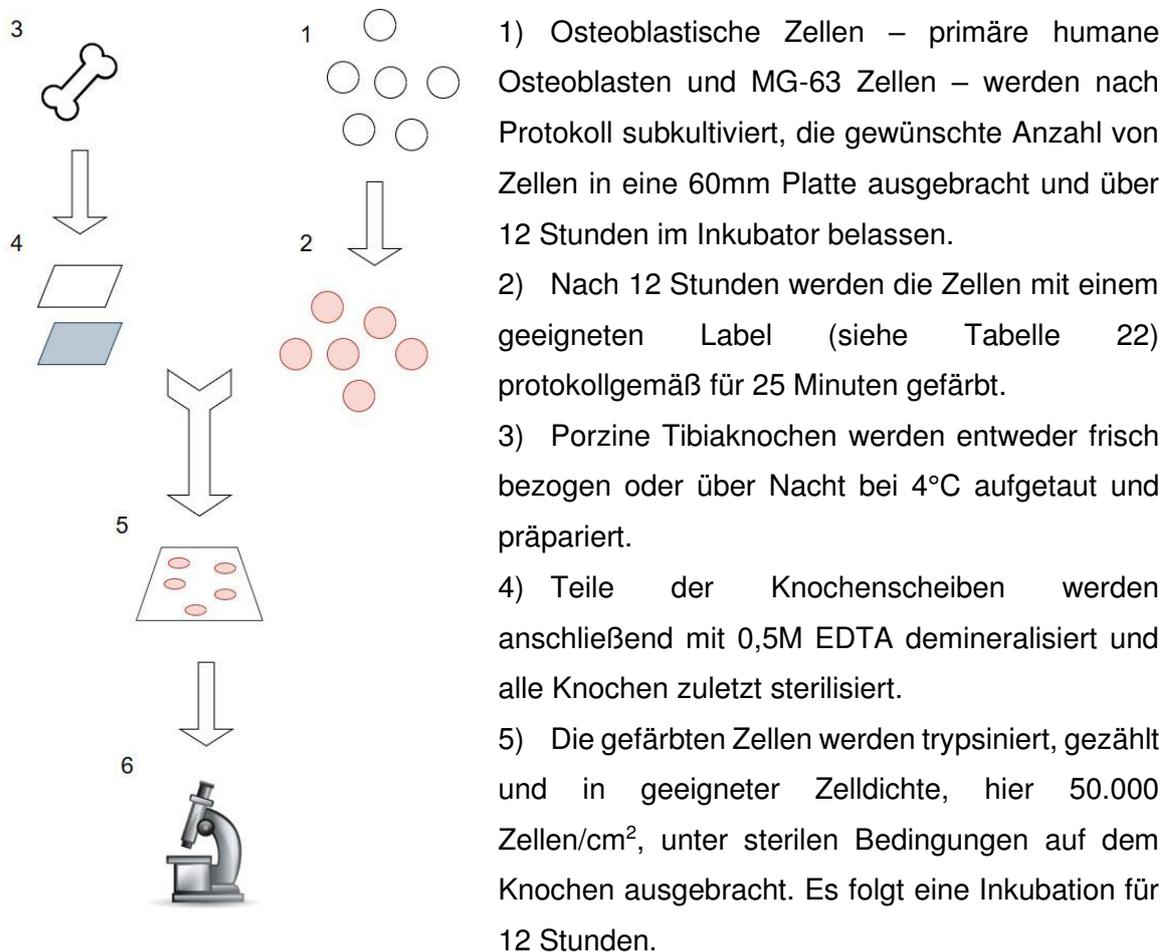


Abbildung 47: Schematische Darstellung des neuen *in vitro* Untersuchungsmodells, II

Diese Abbildung zeigt die schematische Darstellung des neuen *in vitro* Untersuchungsmodells zur Migration von Osteoblasten. Detaillierte Erklärungen zu den einzelnen Schritten finden sich im nebenstehenden Text. Diese Grafik wurde erstellt durch die Autorin mit draw.io (<http://www.draw.io/>).

37°C und 5%CO₂ inkubiert. Der Knochen wird mikroskopiert und das 20er Objektiv sowie die dem Label entsprechenden Fluoreszenzfilter eingestellt. Ein oder mehrere geeignete Analysepunkte werden gesetzt und die Zeitrafferaufnahme für 24 Stunden mit einem Aufnahmeintervall von 15 Minuten gestartet.

Für die Analyse der Bilder steht eine Vielzahl von Programmen, auch frei zugängliche, zur Verfügung. „Relativ“ verbreitet ist hierbei die Auswertung mit ImageJ und verschiedenen Plugins wie bspw. MTrackJ (Dallas et al., 2009; Saller et al., 2012).

Mit dem neuen *in vitro* Modell wird es möglich sein, die Migration von Osteoblasten auf planaren ossären Oberflächen durch fluoreszenzbasierte Zellmarkierung in Zeitrafferaufnahmen zu erfassen und in Abhängigkeit des Mineralisierungsgrades auszuwerten. Dies ermöglicht neue Erkenntnisse über das Bewegungsverhalten von Osteoblasten im Allgemeinen und speziell in Bezug auf die mineralische Oberflächenkomposition, die für ein besseres Verständnis des Bone remodeling und der damit verbundenen physiologischen und pathologischen Vorgänge essenziell sind. Durch die Verwendung von humanem Knochen besteht zudem die Möglichkeit, Rückschlüsse auf die Vorgänge im menschlichen Körper zu ziehen. Darüber hinaus kann das Modell in vielen Bereichen variiert, erweitert und an die Bedürfnisse des Untersuchers angepasst werden, bspw. durch eine Abstufung des Mineralisationsgrades oder die Verwendung anderer Zelllinien. Durch die Vielzahl an möglichen Labeln unterschiedlicher Fluoreszenzfarben (Tabelle 22) sind auch Zeitrafferaufnahmen mit mehreren verschiedenen Zelllinien möglich. Letzteres ist vor allem für Studien zur Interaktion der diversen Zellen in der BMU interessant.

Zusätzlich zu Veränderungen im Aufbau kann das Modell mit anderen Untersuchungsmethoden wie Genearrays oder QRT-PCR kombiniert werden. Forschungsergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe für experimentelle Orthopädie der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie am Klinikum rechts der Isar zeigten diese Möglichkeit auf. Wischmann *et al.* (2018) entfernten MG-63 mit einer schonenden Methode vom Knochen und führten anschließend einen Genearray und eine QRT-PCR mit den abgelösten Zellen durch. In Verbindung mit den Zeitrafferaufnahmen erlaubt dieses Vorgehen, eventuelle Unterschiede im visuell detektierten Migrationsverhalten mit Veränderungen auf genetischer und transkriptioneller Ebene zu korrelieren. Für die posttranskriptionelle Ebene könnte sogar noch eine Proteinanalyse mittels Western Blot angefügt werden. Hierbei sind nicht nur osteoblastenspezifische Marker, wie sie in der vorliegenden Studie verwendet wurden, sondern insbesondere mit Migration assoziierte Gene von Interesse. Wischmann *et al.* (2018) konnten bereits *in vitro* zeigen, dass die Genexpression von osteoblastischen Zellen durch die Mineralisation der Matrix beeinflusst wird und in diesem Vorgang auch migrationsassoziierte Gene hochreguliert werden. Die Validierung dieser Ergebnisse mit einer Migrationsanalyse von osteoblastischen Zellen im skizzierten *in vitro* Modell ist eine der vielen spannenden Anwendungsmöglichkeiten für zukünftige Forschungsfragen.

7. Literaturverzeichnis

- Abrantes, A. A., Rafacho, A., Rivero, E. R., Mariano, F. V., Siqueira, F. M., & Gondak, R. O. (2017). Tissue integrity, costs and time associated with different agents for histological bone preparation. *Microsc Res Tech*, *80*(4), 344-349. doi:10.1002/jemt.22798
- Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Billingsley, W. L., Dougall, W. C., Tometsko, M. E., Roux, E. R., Teepe, M. C., DuBose, R. F., Cosman, D., & Galibert, L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, *390*(6656), 175-179. doi:10.1038/36593
- Aubin, J. E. (2008). Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & T. J. Martin (Eds.), *Principles of Bone Biology* (3 ed., pp. 85-107). San Diego: American Press.
- Azuma, Y., Kaji, K., Katogi, R., Takeshita, S., & Kudo, A. (2000). Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem*, *275*(7), 4858-4864.
- Backhaus, K., Erichson, B., Plinke, W., & Weiber, R. (2008). *Multivariate Analysemethoden: Eine anwendungsorientierte Einführung* (12 ed.). Berlin (u.a.): Springer.
- Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M. J., Pagano, M., & Draetta, G. (1993). Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev*, *7*(5), 812-821.
- Bellahcene, A., Bonjean, K., Fohr, B., Fedarko, N. S., Robey, F. A., Young, M. F., Fisher, L. W., & Castronovo, V. (2000). Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis. *Circ Res*, *86*(8), 885-891.
- Bennett, C. N., Longo, K. A., Wright, W. S., Suva, L. J., Lane, T. F., Hankenson, K. D., & MacDougald, O. A. (2005). Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(9), 3324-3329. doi:10.1073/pnas.0408742102
- Bilbe, G., Roberts, E., Birch, M., & Evans, D. B. (1996). PCR phenotyping of cytokines, growth factors and their receptors and bone matrix proteins in human osteoblast-like cell lines. *Bone*, *19*(5), 437-445.
- Blizotes, M., Sibonga, J. D., Turner, R. T., & Orwoll, E. (2006). Periosteal remodeling at the femoral neck in nonhuman primates. *J Bone Miner Res*, *21*(7), 1060-1067. doi:10.1359/jbmr.060414
- Bollmann, F., Casper, I., Henke, J., & Pautz, A. (2012). qRT-PCR: a method and its difficulties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, *385*(10), 949-951. doi:10.1007/s00210-012-0786-3
- Bonewald, L. F. (2017). The Role of the Osteocyte in Bone and Nonbone Disease. *Endocrinol Metab Clin North Am*, *46*(1), 1-18. doi:10.1016/j.ecl.2016.09.003
- Bonewald, L. F., & Johnson, M. L. (2008). Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*, *42*(4), 606-615. doi:10.1016/j.bone.2007.12.224
- Bonewald, L. F., & Mundy, G. R. (1990). Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop Relat Res*(250), 261-276.
- Bou-Gharios, G., & De Crombrughe, B. (2008). Type I Collagen Structure, Synthesis, and Regulation. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & T. J. Martin (Eds.), *Principles of Bone Biology* (3rd ed., pp. 285-318). San Diego: Academic Press.
- Boulefour, W., Granito, R. N., Vanden-Bossche, A., Sabido, O., Roche, B., Thomas, M., Linossier, M. T., Aubin, J. E., Lafage-Proust, M. H., Vico, L., & Malaval, L. (2017). Bone Shaft Revascularization After Marrow Ablation Is Dramatically Accelerated in BSP-/- Mice, Along With Faster Hematopoietic Recolonization. *J Cell Physiol*, *232*(9), 2528-2537. doi:10.1002/jcp.25630
- Bouvard, D., Aszodi, A., Kostka, G., Block, M. R., Albiges-Rizo, C., & Fassler, R. (2007). Defective osteoblast function in ICAP-1-deficient mice. *Development*, *134*(14), 2615-2625. doi:10.1242/dev.000877
- Bowman, B. M., & Miller, S. C. (1986). The proliferation and differentiation of the bone-lining cell in estrogen-induced osteogenesis. *Bone*, *7*(5), 351-357.

- Boyden, S. (1962). The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*, *115*, 453-466.
- Bozec, A., & Zaiss, M. M. (2017). T Regulatory Cells in Bone Remodelling. *Curr Osteoporos Rep*, *15*(3), 121-125. doi:10.1007/s11914-017-0356-1
- Bruchez, M., Jr., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., & Alivisatos, A. P. (1998). Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, *281*(5385), 2013-2016.
- Canas, F., Terepka, A. R., & Neuman, W. F. (1969). Potassium and milieu interieur of bone. *Am J Physiol*, *217*(1), 117-120. doi:10.1152/ajplegacy.1969.217.1.117
- Candelieri, G. A., Liu, F., & Aubin, J. E. (2001). Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires. *Bone*, *28*(4), 351-361.
- Capulli, M., Paone, R., & Rucci, N. (2014). Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys*, *561*, 3-12. doi:10.1016/j.abb.2014.05.003
- Ceilil, A. B., & Campbell, P. G. (2005). BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate Osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways. *J Biol Chem*, *280*(36), 31353-31359. doi:10.1074/jbc.M503845200
- Chan, W. C., & Nie, S. (1998). Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, *281*(5385), 2016-2018.
- Chong, Y., Ma, Y., Shen, H., Tu, X., Zhou, X., Xu, J., Dai, J., Fan, S., & Zhang, Z. (2014). The in vitro and in vivo toxicity of graphene quantum dots. *Biomaterials*, *35*(19), 5041-5048. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.03.021
- Clark, W. D., Smith, E. L., Linn, K. A., Paul-Murphy, J. R., Muir, P., & Cook, M. E. (2005). Osteocyte apoptosis and osteoclast presence in chicken radii 0-4 days following osteotomy. *Calcif Tissue Int*, *77*(5), 327-336. doi:10.1007/s00223-005-0074-z
- Corr, A., Smith, J., & Baldock, P. (2017). Neuronal Control of Bone Remodeling. *Toxicol Pathol*, *45*(7), 894-903. doi:10.1177/0192623317738708
- Cox, T. R., Rumney, R. M. H., Schoof, E. M., Perryman, L., Hoye, A. M., Agrawal, A., Bird, D., Latif, N. A., Forrest, H., Evans, H. R., Huggins, I. D., Lang, G., Linding, R., Gartland, A., & Erler, J. T. (2015). The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature*, *522*(7554), 106-110. doi:10.1038/nature14492
- Cremers, S., Garnero, P., & Seibel, M. J. (2008). Biochemical Markers of Bone Metabolism. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & T. J. Martin (Eds.), *Principle of Bone Biology* (3rd ed., pp. 1857-1881). San Diego: American Press.
- D'Anto, V., Di Caprio, M. P., Ametrano, G., Simeone, M., Rengo, S., & Spagnuolo, G. (2010). Effect of mineral trioxide aggregate on mesenchymal stem cells. *J Endod*, *36*(11), 1839-1843. doi:10.1016/j.joen.2010.08.010
- Dallas, S. L., Prideaux, M., & Bonewald, L. F. (2013). The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev*, *34*(5), 658-690. doi:10.1210/er.2012-1026
- Dallas, S. L., Veno, P. A., Rosser, J. L., Barragan-Adjemian, C., Rowe, D. W., Kalajzic, I., & Bonewald, L. F. (2009). Time lapse imaging techniques for comparison of mineralization dynamics in primary murine osteoblasts and the late osteoblast/early osteocyte-like cell line MLO-A5. *Cells Tissues Organs*, *189*(1-4), 6-11. doi:10.1159/000151745
- Danner, S., Benzin, H., Vollbrandt, T., Oder, J., Richter, A., & Kruse, C. (2013). Quantum Dots Do Not Alter the Differentiation Potential of Pancreatic Stem Cells and Are Distributed Randomly among Daughter Cells. *Int J Cell Biol*, *2013*, 918242. doi:10.1155/2013/918242
- Dass, C. R., & Choong, P. F. (2007). GFP expression alters osteosarcoma cell biology. *DNA Cell Biol*, *26*(8), 599-601. doi:10.1089/dna.2006.0531
- Ding, D., Mao, D., Li, K., Wang, X., Qin, W., Liu, R., Chiam, D. S., Tomczak, N., Yang, Z., Tang, B. Z., Kong, D., & Liu, B. (2014). Precise and long-term tracking of adipose-derived stem cells and their regenerative capacity via superb bright and stable organic nanodots. *ACS Nano*, *8*(12), 12620-12631. doi:10.1021/nn505554y

- Dirckx, N., Van Hul, M., & Maes, C. (2013). Osteoblast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis, and regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 99(3), 170-191. doi:10.1002/bdrc.21047
- Dobnig, H., & Turner, R. T. (1995). Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology*, 136(8), 3632-3638. doi:10.1210/endo.136.8.7628403
- Doty, S. B. (1981). Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int*, 33(5), 509-512.
- Edwards, J. R., & Mundy, G. R. (2011). Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models. *Nat Rev Rheumatol*, 7(4), 235-243. doi:10.1038/nrrheum.2011.23
- Eghbali-Fatourehchi, G. Z., Lamsam, J., Fraser, D., Nagel, D., Riggs, B. L., & Khosla, S. (2005). Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med*, 352(19), 1959-1966. doi:10.1056/NEJMoa044264
- Eriksen, E. F., Vesterby, A., Kassem, M., Melsen, F., & Mosekilde, L. (1993). Bone Remodeling and Bone Structure. In G. R. Mundy & T. J. Martin (Eds.), *Physiology and Pharmacology of Bone* (pp. 67-109). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Everts, V., Delaisse, J. M., Korper, W., Jansen, D. C., Tigchelaar-Gutter, W., Saftig, P., & Beertsen, W. (2002). The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res*, 17(1), 77-90. doi:10.1359/jbmr.2002.17.1.77
- Ferron, M., Hinoi, E., Karsenty, G., & Ducy, P. (2008). Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(13), 5266-5270. doi:10.1073/pnas.0711119105
- Fiedler, J., Roderer, G., Gunther, K. P., & Brenner, R. E. (2002). BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem*, 87(3), 305-312. doi:10.1002/jcb.10309
- Fotos, J. S., Patel, V. P., Karin, N. J., Temburni, M. K., Koh, J. T., & Galileo, D. S. (2006). Automated time-lapse microscopy and high-resolution tracking of cell migration. *Cytotechnology*, 51(1), 7-19. doi:10.1007/s10616-006-9006-7
- Foxman, E. F., Campbell, J. J., & Butcher, E. C. (1997). Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol*, 139(5), 1349-1360.
- Foxman, E. F., Kunkel, E. J., & Butcher, E. C. (1999). Integrating conflicting chemotactic signals. The role of memory in leukocyte navigation. *J Cell Biol*, 147(3), 577-588.
- Frost, H. M. (1986). *Intermediary Organization of the Skeleton* (Vol. 1). Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.
- Fujikawa, Y., Quinn, J. M., Sabokbar, A., McGee, J. O., & Athanasou, N. A. (1996). The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction. *Endocrinology*, 137(9), 4058-4060. doi:10.1210/endo.137.9.8756585
- Furuya, M., Kikuta, J., Fujimori, S., Seno, S., Maeda, H., Shirazaki, M., Uenaka, M., Mizuno, H., Iwamoto, Y., Morimoto, A., Hashimoto, K., Ito, T., Isogai, Y., Kashii, M., Kaito, T., Ohba, S., Chung, U. I., Lichtler, A. C., Kikuchi, K., Matsuda, H., Yoshikawa, H., & Ishii, M. (2018). Direct cell-cell contact between mature osteoblasts and osteoclasts dynamically controls their functions in vivo. *Nat Commun*, 9(1), 300. doi:10.1038/s41467-017-02541-w
- Gao, M., Chen, J., Lin, G., Li, S., Wang, L., Qin, A., Zhao, Z., Ren, L., Wang, Y., & Tang, B. Z. (2016). Long-Term Tracking of the Osteogenic Differentiation of Mouse BMSCs by Aggregation-Induced Emission Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*, 8(28), 17878-17884. doi:10.1021/acsami.6b05471
- Gehron Robey, P. (2008). Noncollagenous Bone Matrix Proteins. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & T. J. Martin (Eds.), *Principles of Bone Biology* (3 ed., pp. 335-349). San Diego: Academic Press.
- Geurtzen, K., Knopf, F., Wehner, D., Huitema, L. F., Schulte-Merker, S., & Weidinger, G. (2014). Mature osteoblasts dedifferentiate in response to traumatic bone injury in

- the zebrafish fin and skull. *Development*, 141(11), 2225-2234. doi:10.1242/dev.105817
- Goldring, S. R. (2015). The osteocyte: key player in regulating bone turnover. *RMD Open*, 1(Suppl 1), e000049. doi:10.1136/rmdopen-2015-000049
- Gonzalez, J. M., Jr., Hamm-Alvarez, S., & Tan, J. C. (2013). Analyzing live cellularity in the human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54(2), 1039-1047. doi:10.1167/iovs.12-10479
- Goodenough, D. A., & Paul, D. L. (2003). Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(4), 285-294. doi:10.1038/nrm1072
- Grabowski, P. (2015). Physiology of Bone. *Endocr Dev*, 28, 33-55. doi:10.1159/000380991
- Hardman, R. (2006). A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ Health Perspect*, 114(2), 165-172. doi:10.1289/ehp.8284
- Hattner, R., Epker, B. N., & Frost, H. M. (1965). Suggested sequential mode of control of changes in cell behaviour in adult bone remodelling. *Nature*, 206(983), 489-490.
- Hauschka, P. V., Lian, J. B., Cole, D. E., & Gundberg, C. M. (1989). Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev*, 69(3), 990-1047. doi:10.1152/physrev.1989.69.3.990
- Helfrich, M. H., Stenbeck, G., Nesbitt, S. A., & Horton, M. A. (2008). Integrins and Other Cell Surface Attachment Molecules of Bone Cells. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & T. J. Martin (Eds.), *Principles of Bone Biology* (3rd ed., pp. 385-424). San Diego: Academic Press.
- Hengartner, N. E., Fiedler, J., Ignatius, A., & Brenner, R. E. (2013). IL-1beta inhibits human osteoblast migration. *Mol Med*, 19, 36-42. doi:10.2119/molmed.2012.00058
- Howard, G. A., Bottemiller, B. L., Turner, R. T., Rader, J. I., & Baylink, D. J. (1981). Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(5), 3204-3208.
- Hughes, F. J., Aubin, J. E., & Heersche, J. N. (1992). Differential chemotactic responses of different populations of fetal rat calvaria cells to platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *Bone Miner*, 19(1), 63-74.
- Imai, S., Kaksonen, M., Raulo, E., Kinnunen, T., Fages, C., Meng, X., Lakso, M., & Rauvala, H. (1998). Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J Cell Biol*, 143(4), 1113-1128.
- Inaoka, T., Bilbe, G., Ishibashi, O., Tezuka, K., Kumegawa, M., & Kokubo, T. (1995). Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. *Biochem Biophys Res Commun*, 206(1), 89-96. doi:10.1006/bbrc.1995.1013
- Iyer, R. K., Chui, J., & Radisic, M. (2009). Spatiotemporal tracking of cells in tissue-engineered cardiac organoids. *J Tissue Eng Regen Med*, 3(3), 196-207. doi:10.1002/term.153
- Jaworski, Z. F., Duck, B., & Sekaly, G. (1981). Kinetics of osteoclasts and their nuclei in evolving secondary Haversian systems. *J Anat*, 133(Pt 3), 397-405.
- Jilka, R. L. (2003). Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol*, 41(3), 182-185. doi:10.1002/mpo.10334
- Jilka, R. L., Bellido, T., Almeida, M., Plotkin, L. I., O'Brien, C. A., Weinstein, R. S., & Manolagas, S. C. (2008). Apoptosis of Bone Cells. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & T. J. Martin (Eds.), *Principles of Bone Biology* (3rd ed., pp. 237-261). San Diego: Academic Press.
- Jones, S. J., & Boyde, A. (1977). The migration of osteoblasts. *Cell Tissue Res*, 184(2), 179-193.
- Katsimbri, P. (2017). The biology of normal bone remodelling. *Eur J Cancer Care (Engl)*, 26(6). doi:10.1111/ecc.12740
- Kim, S. W., Pajevic, P. D., Selig, M., Barry, K. J., Yang, J. Y., Shin, C. S., Baek, W. Y., Kim, J. E., & Kronenberg, H. M. (2012). Intermittent parathyroid hormone administration

- converts quiescent lining cells to active osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 27(10), 2075-2084. doi:10.1002/jbmr.1665
- Klein-Nulend, J., & Bonewald, L. F. (2008). The Osteocyte. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & T. J. Martin (Eds.), *Principles of Bone Biology* (3rd ed., pp. 153-174). San Diego: Academic Press.
- Kobayashi, K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, M., Kotake, S., Nakagawa, N., Kinosaki, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Morinaga, T., Higashio, K., Martin, T. J., & Suda, T. (2000). Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med*, 191(2), 275-286.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., & Kishimoto, T. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89(5), 755-764.
- Larson, D. R., Zipfel, W. R., Williams, R. M., Clark, S. W., Bruchez, M. P., Wise, F. W., & Webb, W. W. (2003). Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo. *Science*, 300(5624), 1434-1436. doi:10.1126/science.1083780
- Lee, N. K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J. D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P. J., McKee, M. D., Jung, D. Y., Zhang, Z., Kim, J. K., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P., & Karsenty, G. (2007). Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*, 130(3), 456-469. doi:10.1016/j.cell.2007.05.047
- Li, Z., Wang, C., Jiao, X., Lu, Y., Fu, M., Quong, A. A., Dye, C., Yang, J., Dai, M., Ju, X., Zhang, X., Li, A., Burbelo, P., Stanley, E. R., & Pestell, R. G. (2006). Cyclin D1 regulates cellular migration through the inhibition of thrombospondin 1 and ROCK signaling. *Mol Cell Biol*, 26(11), 4240-4256. doi:10.1128/MCB.02124-05
- Li, Z., Wang, C., Prendergast, G. C., & Pestell, R. G. (2006). Cyclin D1 functions in cell migration. *Cell Cycle*, 5(21), 2440-2442. doi:10.4161/cc.5.21.3428
- Liedert, A., Kaspar, D., Blakytyn, R., Claes, L., & Ignatius, A. (2006). Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 349(1), 1-5. doi:10.1016/j.bbrc.2006.07.214
- Lin, S., Xie, X., Patel, M. R., Yang, Y. H., Li, Z., Cao, F., Gheysens, O., Zhang, Y., Gambhir, S. S., Rao, J. H., & Wu, J. C. (2007). Quantum dot imaging for embryonic stem cells. *BMC Biotechnol*, 7, 67. doi:10.1186/1472-6750-7-67
- Lind, M., Deleuran, B., Thestrup-Pedersen, K., Soballe, K., Eriksen, E. F., & Bunger, C. (1995). Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors. *APMIS*, 103(2), 140-146.
- Liu, F., Malaval, L., & Aubin, J. E. (1997). The mature osteoblast phenotype is characterized by extensive plasticity. *Exp Cell Res*, 232(1), 97-105. doi:10.1006/excr.1997.3501
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Locklin, R. M., Oreffo, R. O., & Triffitt, J. T. (1999). Effects of TGFbeta and bFGF on the differentiation of human bone marrow stromal fibroblasts. *Cell Biol Int*, 23(3), 185-194. doi:10.1006/cbir.1998.0338
- Maes, C., Kobayashi, T., Selig, M. K., Torrekens, S., Roth, S. I., Mackem, S., Carmeliet, G., & Kronenberg, H. M. (2010). Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell*, 19(2), 329-344. doi:10.1016/j.devcel.2010.07.010
- Makinen, M., Joki, T., Yla-Outinen, L., Skottman, H., Narkilahti, S., & Aanismaa, R. (2013). Fluorescent probes as a tool for cell population tracking in spontaneously active neural networks derived from human pluripotent stem cells. *J Neurosci Methods*, 215(1), 88-96. doi:10.1016/j.jneumeth.2013.02.019
- Malaval, L., Wade-Gueye, N. M., Boudiffa, M., Fei, J., Zirngibl, R., Chen, F., Laroche, N., Roux, J. P., Burt-Pichat, B., Duboeuf, F., Boivin, G., Jurdic, P., Lafage-Proust, M. H., Amedee, J., Vico, L., Rossant, J., & Aubin, J. E. (2008). Bone sialoprotein plays

- a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med*, 205(5), 1145-1153. doi:10.1084/jem.20071294
- Markiewicz, I., Sypecka, J., Domanska-Janik, K., Wyszomirski, T., & Lukomska, B. (2011). Cellular environment directs differentiation of human umbilical cord blood-derived neural stem cells in vitro. *J Histochem Cytochem*, 59(3), 289-301. doi:10.1369/0022155410397997
- Martin, J., & Sims, N. A. (2005). Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med*, 11(2), 76-81. doi:10.1016/j.molmed.2004.12.004
- Martin, R. B., & Burr, D. B. (1989). The Formation of Secondary Osteons. *Structure, Function, and Adaption of Compact Bone* (pp. 105-142). New York: Raven Press.
- Matic, I., Matthews, B. G., Wang, X., Dymont, N. A., Worthley, D. L., Rowe, D. W., Grcevic, D., & Kalajzic, I. (2016). Quiescent Bone Lining Cells Are a Major Source of Osteoblasts During Adulthood. *Stem Cells*, 34(12), 2930-2942. doi:10.1002/stem.2474
- Matsuo, K., & Irie, N. (2008). Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys*, 473(2), 201-209. doi:10.1016/j.abb.2008.03.027
- Miller, S. C., & Jee, W. S. (1987). The bone lining cell: a distinct phenotype? *Calcif Tissue Int*, 41(1), 1-5.
- Mizokami, A., Kawakubo-Yasukochi, T., & Hirata, M. (2017). Osteocalcin and its endocrine functions. *Biochem Pharmacol*, 132, 1-8. doi:10.1016/j.bcp.2017.02.001
- Mizuno, H., Kikuta, J., & Ishii, M. (2018). In vivo live imaging of bone cells. *Histochem Cell Biol*, 149(4), 417-422. doi:10.1007/s00418-018-1638-0
- Mülhardt, C. (2006a). Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics* (5 ed., pp. 80-116). München: Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag.
- Mülhardt, C. (2006b). RNA. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics* (5 rd ed., pp. 117-129). München: Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*, 24, 17-27.
- Nakagawa, N., Kinoshita, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., Morinaga, T., & Higashio, K. (1998). RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 253(2), 395-400. doi:10.1006/bbrc.1998.9788
- Nakasaki, M., Yoshioka, K., Miyamoto, Y., Sasaki, T., Yoshikawa, H., & Itoh, K. (2008). IGF-I secreted by osteoblasts acts as a potent chemotactic factor for osteoblasts. *Bone*, 43(5), 869-879. doi:10.1016/j.bone.2008.07.241
- Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-Hora, M., Feng, J. Q., Bonewald, L. F., Kodama, T., Wutz, A., Wagner, E. F., Penninger, J. M., & Takayanagi, H. (2011). Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*, 17(10), 1231-1234. doi:10.1038/nm.2452
- Nicholls, F. J., Liu, J. R., & Modo, M. (2017). A Comparison of Exogenous Labels for the Histological Identification of Transplanted Neural Stem Cells. *Cell Transplant*, 26(4), 625-645. doi:10.3727/096368916X693680
- Obri, A., Khiridian, L., Karsenty, G., & Oury, F. (2018). Osteocalcin in the brain: from embryonic development to age-related decline in cognition. *Nat Rev Endocrinol*, 14(3), 174-182. doi:10.1038/nrendo.2017.181
- Ono, T., & Nakashima, T. (2018). Recent advances in osteoclast biology. *Histochem Cell Biol*, 149(4), 325-341. doi:10.1007/s00418-018-1636-2
- Orwoll, E. S. (2003). Toward an expanded understanding of the role of the periosteum in skeletal health. *J Bone Miner Res*, 18(6), 949-954. doi:10.1359/jbmr.2003.18.6.949
- Oury, F., Sumara, G., Sumara, O., Ferron, M., Chang, H., Smith, C. E., Hermo, L., Suarez, S., Roth, B. L., Ducy, P., & Karsenty, G. (2011). Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell*, 144(5), 796-809. doi:10.1016/j.cell.2011.02.004
- Panagakos, F. S. (1993). Insulin-like growth factors-I and -II stimulate chemotaxis of osteoblasts isolated from fetal rat calvaria. *Biochimie*, 75(11), 991-994.

- Parfitt, A. M. (1983). The physiologic and clinical significance of bone histomorphogenetic data. In R. Recker (Ed.), *Bone Histomorphogenetry. Techniques and Interpretations*. (pp. 143-223). Boca Raton: CRC Press.
- Parfitt, A. M. (1994). Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem*, *55*(3), 273-286. doi:10.1002/jcb.240550303
- Parfitt, A. M. (2002). Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone*, *30*(1), 5-7.
- Pepperell, E. E., & Watt, S. M. (2013). A novel application for a 3-dimensional timelapse assay that distinguishes chemotactic from chemokinetic responses of hematopoietic CD133(+) stem/progenitor cells. *Stem Cell Res*, *11*(2), 707-720. doi:10.1016/j.scr.2013.04.006
- Petrie, R. J., Doyle, A. D., & Yamada, K. M. (2009). Random versus directionally persistent cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*(8), 538-549. doi:10.1038/nrm2729
- Pfeilschifter, J., Wolf, O., Naumann, A., Minne, H. W., Mundy, G. R., & Ziegler, R. (1990). Chemotactic response of osteoblastlike cells to transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res*, *5*(8), 825-830. doi:10.1002/jbmr.5650050805
- Prentice, A. I. (1967). Autofluorescence of bone tissues. *J Clin Pathol*, *20*(5), 717-719.
- Pruss, A., Baumann, B., Seibold, M., Kao, M., Tintelnot, K., von Versen, R., Radtke, H., Dorner, T., Pauli, G., & Gobel, U. B. (2001). Validation of the sterilization procedure of allogeneic avital bone transplants using peracetic acid-ethanol. *Biologicals*, *29*(2), 59-66. doi:10.1006/biol.2001.0286
- Qie, S., & Diehl, J. A. (2016). Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J Mol Med (Berl)*, *94*(12), 1313-1326. doi:10.1007/s00109-016-1475-3
- Qin, Z., Balimunkwe, R. M., & Quan, T. (2017). Age-related reduction of dermal fibroblast size upregulates multiple matrix metalloproteinases as observed in aged human skin in vivo. *Br J Dermatol*, *177*(5), 1337-1348. doi:10.1111/bjd.15379
- Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R., & Nann, T. (2008). Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat Methods*, *5*(9), 763-775. doi:10.1038/nmeth.1248
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., & Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, *302*(5651), 1704-1709. doi:10.1126/science.1092053
- Roder, P., & Hille, C. (2018). Local tissue manipulation via a force- and pressure-controlled AFM micropipette for analysis of cellular processes. *Sci Rep*, *8*(1), 5892. doi:10.1038/s41598-018-24255-9
- Rorth, P. (2009). Collective cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *25*, 407-429. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113231
- Saller, M. M., Prall, W. C., Docheva, D., Schonitzer, V., Popov, T., Anz, D., Clausen-Schaumann, H., Mutschler, W., Volkmer, E., Schieker, M., & Polzer, H. (2012). Increased stemness and migration of human mesenchymal stem cells in hypoxia is associated with altered integrin expression. *Biochem Biophys Res Commun*, *423*(2), 379-385. doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.134
- Schalasta, G. (2009). Molekulare Diagnostik: Identifizierung von Mikroorganismen. In B. Neumeister, H. K. Geiss, R. W. Braun, & P. Kimmig (Eds.), *Mikrobiologische Diagnostik* (2 ed., pp. 224-246). Stuttgart: Thieme Verlag.
- Schenk, R., & Willenegger, H. (1964). [on the Histology of Primary Bone Healing]. *Langenbecks Arch Klin Chir Ver Dtsch Z Chir*, *308*, 440-452.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, *3*(6), 1101-1108.
- Seeman, E. (2008). Modeling and Remodeling. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & T. J. Martin (Eds.), *Principles of Bone Biology* (3rd ed., pp. 3-28). San Diego: Academic Press.
- Shah, B., Clark, P., Stroschio, M., & Mao, J. (2006). Labeling and imaging of human mesenchymal stem cells with quantum dot bioconjugates during proliferation and osteogenic differentiation in long term. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, *1*, 1470-1473. doi:10.1109/IEMBS.2006.260082

- Siddiqui, J. A., & Partridge, N. C. (2016). Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda)*, 31(3), 233-245. doi:10.1152/physiol.00061.2014
- Sims, N. A., & Martin, T. J. (2014). Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep*, 3, 481. doi:10.1038/bonekey.2013.215
- Sotobori, T., Ueda, T., Myoui, A., Yoshioka, K., Nakasaki, M., Yoshikawa, H., & Itoh, K. (2006). Bone morphogenetic protein-2 promotes the haptotactic migration of murine osteoblastic and osteosarcoma cells by enhancing incorporation of integrin beta1 into lipid rafts. *Exp Cell Res*, 312(19), 3927-3938. doi:10.1016/j.yexcr.2006.08.024
- Spaniel-Borowski, K. (2007). Zytologie und Histologie - Grundlagen. In G. Aumüller & u.a. (Eds.), *Anatomie* (2. ed., pp. 20-72). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Sullivan, S. J., Daukas, G., & Zigmond, S. H. (1984). Asymmetric distribution of the chemotactic peptide receptor on polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol*, 99(4 Pt 1), 1461-1467.
- Takayanagi, H. (2007). Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*, 7(4), 292-304. doi:10.1038/nri2062
- Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., Wagner, E. F., Mak, T. W., Kodama, T., & Taniguchi, T. (2002). Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*, 3(6), 889-901.
- Takeda, S., & Ducy, P. (2008). Regulation of Bone Remodeling by Central and Peripheral Nervous Signals. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & T. J. Martin (Eds.), *Principles of Bone Biology* (3 ed., pp. 1059-1068). San Diego: Academic Press.
- Tanaka, S. (2017). RANKL-Independent Osteoclastogenesis: A Long-Standing Controversy. *J Bone Miner Res*, 32(3), 431-433. doi:10.1002/jbmr.3092
- Tang, Y., Wu, X., Lei, W., Pang, L., Wan, C., Shi, Z., Zhao, L., Nagy, T. R., Peng, X., Hu, J., Feng, X., Van Hul, W., Wan, M., & Cao, X. (2009). TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med*, 15(7), 757-765. doi:10.1038/nm.1979
- Tangseefa, P., Martin, S. K., Fitter, S., Baldock, P. A., Proud, C. G., & Zannettino, A. C. W. (2018). Osteocalcin-dependent regulation of glucose metabolism and fertility: Skeletal implications for the development of insulin resistance. *J Cell Physiol*, 233(5), 3769-3783. doi:10.1002/jcp.26163
- Tao, R., Sun, T. J., Han, Y. Q., Xu, G., Liu, J., & Han, Y. F. (2014). Optimization of in vitro cell labeling methods for human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 18(8), 1127-1134.
- Taylor, D. (1997). Bone maintenance and remodeling: a control system based on fatigue damage. *J Orthop Res*, 15(4), 601-606. doi:10.1002/jor.1100150417
- Tezuka, K., Takeshita, S., Hakeda, Y., Kumegawa, M., Kikuno, R., & Hashimoto-Gotoh, T. (1990). Isolation of mouse and human cDNA clones encoding a protein expressed specifically in osteoblasts and brain tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 173(1), 246-251.
- Tezuka, K., Tezuka, Y., Maejima, A., Sato, T., Nemoto, K., Kamioka, H., Hakeda, Y., & Kumegawa, M. (1994). Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts. *J Biol Chem*, 269(2), 1106-1109.
- Thiel, A., Reumann, M. K., Boskey, A., Wischmann, J., von Eisenhart-Rothe, R., & Mayer-Kuckuk, P. (2018). Osteoblast migration in vertebrate bone. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 93(1), 350-363. doi:10.1111/brv.12345
- Thompson, W. R., Rubin, C. T., & Rubin, J. (2012). Mechanical regulation of signaling pathways in bone. *Gene*, 503(2), 179-193. doi:10.1016/j.gene.2012.04.076
- Ulrich, F., & Heisenberg, C. P. (2009). Trafficking and cell migration. *Traffic*, 10(7), 811-818. doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00929.x

- Verborgt, O., Gibson, G. J., & Schaffler, M. B. (2000). Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *J Bone Miner Res*, *15*(1), 60-67. doi:10.1359/jbmr.2000.15.1.60
- Voura, E. B., Jaiswal, J. K., Mattoussi, H., & Simon, S. M. (2004). Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy. *Nat Med*, *10*(9), 993-998. doi:10.1038/nm1096
- Vu, T. H., Shipley, J. M., Bergers, G., Berger, J. E., Helms, J. A., Hanahan, D., Shapiro, S. D., Senior, R. M., & Werb, Z. (1998). MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*, *93*(3), 411-422.
- Wischmann, J., Lenze, F., Thiel, A., Bookbinder, S., Querido, W., Schmidt, O., Burgkart, R., von Eisenhart-Rothe, R., Richter, G. H. S., Pleshko, N., & Mayer-Kuckuk, P. (2018). Matrix mineralization controls gene expression in osteoblastic cells. *Exp Cell Res*, *372*(1), 25-34. doi:10.1016/j.yexcr.2018.09.005

8. Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn Prof. Dr. Rainer Burgkart danke ich für seine ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit.

Auch möchte ich speziell Frau Jutta Tübel und darüber hinaus allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der orthopädischen Forschungsabteilung und Forschungsabteilung Biomechanik der Technischen Universität München für die Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft danken.

Zudem möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Martijn van Griensven für die Betreuung der Arbeit als Mentor herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Dr. Philipp Mayer-Kuckuk.

Meinen Eltern und meinem Lebenspartner möchte ich für ihre Unterstützung, Ermutigung und starke Nerven danken.