

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie der Medizinischen
Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
AG Experimentelle Zelltherapie Leiterin: Prof. Dr. rer. nat. Karen Bieback

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Sehnen- und Knochenregeneration der
Paracelsus Medizinischen Privatuniversität Salzburg, Österreich
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Traweger

Transkriptomweite Auswirkungen der pulsierenden Magnetfeldtherapie auf proinflammatorisch stimulierte 3D-Sehnenzellkonstrukte

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Malik Jessen

aus
Flensburg
2021

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Doktormutter: Frau Prof. Dr. rer. nat. Karen Bieback
Referent: Herr Prof. Dr. rer. nat. Andreas Traweger

Meiner Familie gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 VORWORT	1
2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	2
3 EINLEITUNG	5
3.1 Beschreibung und Aufbau der Sehne	5
3.2 Tendinopathien	7
3.3 Pulsierende Magnetfeldtherapie	8
3.4 3D <i>in vitro</i> Zellkulturmodelle	11
3.5 Rationale der Studie.....	13
4 MATERIAL UND METHODEN	14
4.1 Material	14
4.2 Zellkultur.....	21
4.2.1 Kulturbedingungen.....	21
4.2.2 Mediumwechsel	22
4.2.3 Passagieren von Zellen	22
4.2.4 TDSPC-Isolation	23
4.2.5 Kryokonservierte TDSPCs	24
4.2.6 Bestimmung der Zellzahl, -konzentration und -viabilität	24
4.3 <i>In vitro</i> 3D Sehnenkonstrukte.....	25
4.3.1 Vorbereitung der Zellkulturbehälter.....	25
4.3.2 Herstellung der Sehnenkonstrukte.....	26
4.3.3 Proinflammatorische Stimulation mit IL-1 β	28
4.4 PEMF-Behandlung.....	28
4.4.1 Omnitron Pro.....	28
4.4.2 Optimierung der Behandlungsparameter für die Gesamt-Transkriptom- Shotgun-Sequenzierung („RNAseq“)	30
4.4.3 PEMF-Behandlungsablauf für RNAseq	37
4.5 Molekurlabiologische Methoden.....	38
4.5.1 Bestimmung der Zellviabilität.....	38
4.5.2 RNA-Extraktion	40

4.5.3	Bestimmung von Menge und Reinheit der RNA	41
4.5.4	Bestimmung der RNA-Integrität	42
4.5.5	Synthese von komplementärer DNA (cDNA).....	42
4.5.6	Quantitative Echtzeit-PCR – RT-qPCR.....	43
4.5.7	RNA-Seq und Datenanalyse.....	49
4.6	Fixieren, Einbetten und Schneiden von Gewebeproben.....	50
4.7	TUNEL-Färbung und Caspase3/7 Apoptose-Assay	50
4.8	Quantifizierung der Kern-Ausrichtung, Zellorientierung, Kollagendichte.....	51
4.9	Statistische Analyse	51
5	ERGEBNISSE	52
5.1	Bestimmung der Zellviabilität	52
5.2	Optimierung der Behandlungsparameter für die RNAseq.....	54
5.3	Bestimmung der RNA-Integrität	62
5.4	RNAseq	63
5.5	RNAseq-Verifizierung.....	71
5.6	Organisation der extrazellulären Matrix	71
5.7	Untersuchungen zur Apoptose.....	73
6	DISKUSSION	75
6.1	Setup der PEMF-Behandlung	75
6.2	Transkriptomweiter Response von IL1- β -behandelten TDSPCs nach PEMF-Behandlung.....	77
6.2.1	Anti-inflammatorischer Effekt.....	77
6.2.2	Regenerationsfördernder Effekt.....	78
6.2.3	Anti-apoptotischer Effekt.....	80
6.3	Schlussfolgerung & Ausblick.....	82
7	ZUSAMMENFASSUNG	84
8	LITERATURVERZEICHNIS	86
9	EIGENANTEIL AN DER STUDIE UND EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN ...	97
10	LEBENS LAUF	100
11	DANKSAGUNG	102

1 VORWORT

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden vorab publiziert:

Gehwolf, R., Schwemberger, B.* , Jessen, M.* , Korntner, S., Wagner, A., Lehner, C., Weissenbacher, N., Tempfer, H., Traweger, A. (2019). Global Responses of Il-1beta-Primed 3D Tendon Constructs to Treatment with Pulsed Electromagnetic Fields. *Cells*, 8(5). doi:10.3390/cells8050399

*Autoren waren gleichermaßen beteiligt.

Der Eigenanteil der Vorabpublikation war zum einen die notwendigen, experimentellen Vorarbeiten zur Erstellung des PEMF-Behandlungssetups sowie zum anderen die Mitarbeit bis zur Gewinnung des biologischen Materials zur RNAseq-Analyse.

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCP	1-Bromo-3-chloropropan
BM-MNCs	bone marrow-derived mononuclear cells
bp	Basenpaare
ca.	circa
Calcein-AM	Acetoxymethylester von Calcein
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGFP	enhanced green fluorescent protein, Variante des Grün Fluoreszierenden Proteins
engl.	Englisch
ESCs	equine embryo-derived stem cells
Ex/Em	Exzitation/Emission
EZM	Extrazelluläre Matrix
F344	Ratte des Types „Fischer F344“
FBS	Fetal Bovine Serum, fetales Kälberserum
g	Gramm
GO	Gene Ontology
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMSCs	human mesenchymal stem cells
IL-1 β	Interleukin-1 β , IL-1B
IPA	Insect Pin Assays
MEM	Minimum Essential Medium
Mg ²⁺	Magnesium-Ion

min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
Mo.	Monat, Monate
mRNA	messenger-RNA, Boten-RNA
mT	Millitesla
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
p	Passage
P/S	Penicillin/ Streptomycin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEMF	Pulsed Electromagnetic Field Therapy, pulsed electromagnetic fields, Pulsierende Elektromagnetfelder
PP _i	Pyrophosphat, Diphosphat
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RLU	Relative Light Units oder Relative Luminescence Unit
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Ruhepause
rPMS	repetitive peripheral magnet stimulation, repetitive periphere Magnetfeldstimulation
RQI	RNA Quality Indicator
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TDSPC	Tendon-Derived Stem/Progenitor Cell
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
vgl.	vergleiche
WTSS	Whole Transcriptome Shotgun Sequencing

x g	mittlere Erdbeschleunigung
μl	Mikroliter

3 EINLEITUNG

3.1 Beschreibung und Aufbau der Sehne

Die Funktion der Sehne liegt in der Verbindung eines Muskels mit einem Knochen und der damit einhergehenden muskuloskeletalen Kraftübertragung begründet. Da eine Muskelkontraktionskraft über die Sehne auf den Knochen und damit auf das Gelenk wirkt, verfügen Sehnen über eine bemerkenswerte Zugfestigkeit, Steifigkeit und Viskoelastizität.

Dies erlaubt den Sehnen nicht nur große Spannungskräfte zu übertragen, sondern ermöglicht auch eine partielle Speicherung der Bewegungsenergie, welcher bei entgegen gerichteter Bewegung wieder abgegeben werden kann. Dies kann sowohl den Energieverbrauch als auch die Verletzungsgefahr verringern (Thorpe et al., 2012).

Wie auch andere Bindegewebsarten bestehen Sehnen zu einem Großteil aus Wasser (55 – 70 %), gebunden durch die zahlreichen Proteoglykane (Kannus, 2000). In dieser Proteoglykan-Wasser-Matrix liegen verschiedene Bestandteile (bspw. Elastin) eingebettet. Diese werden im Gesamten auch als extrazelluläre Matrix (EZM) bezeichnet. Betrachtet man die Trockenmasse einer Sehne, so machen Proteoglykane und Elastin lediglich je 2 % (Kannus, 2000) aus; 65 – 80 % sind Kollagene, wovon wiederum 95 % auf das Kollagen Typ I entfallen (Sharma and Maffulli, 2006; Wang, 2006).

Alle Sehnenbestandteile sind in einem komplexen hierarchischen System organisiert (siehe Abb. 1). Aus löslichen Tropokollagenen (1,5 nm Durchmesser) entstehen durch Quervernetzungen unlösliche Kollagenfibrillen (10 – 500 nm), welche in Bündeln angeordnet die Grundeinheit einer Sehne, die Kollagenfaser, ergeben. Gebündelte Kollagenfasern bilden die größte Einheit, das Sehnenfaserbündel oder auch den Faszikel (150 – 500 µm), welche von einer lockeren Bindegewebschicht, dem Endotenon, umgeben werden. Darauf anliegend, befindet sich das Epitenon (Peritendineum), welches als dickere Bindegewebschicht Nerven und Gefäße eingebettet in Septen beinhaltet. Mehrere, zusammen vorliegende Faserbündel bilden eine Sehne. Die Sehne wird von einer weiteren Bindegewebschicht, dem Paratenon (Epitendineum) umfasst. Dem Paratenon wird als Sehnengleitgewebe eine Verminderung der Reibung an den Gelenken zwischen Sehne und Knochen zugesprochen (Canty and Kadler, 2005).

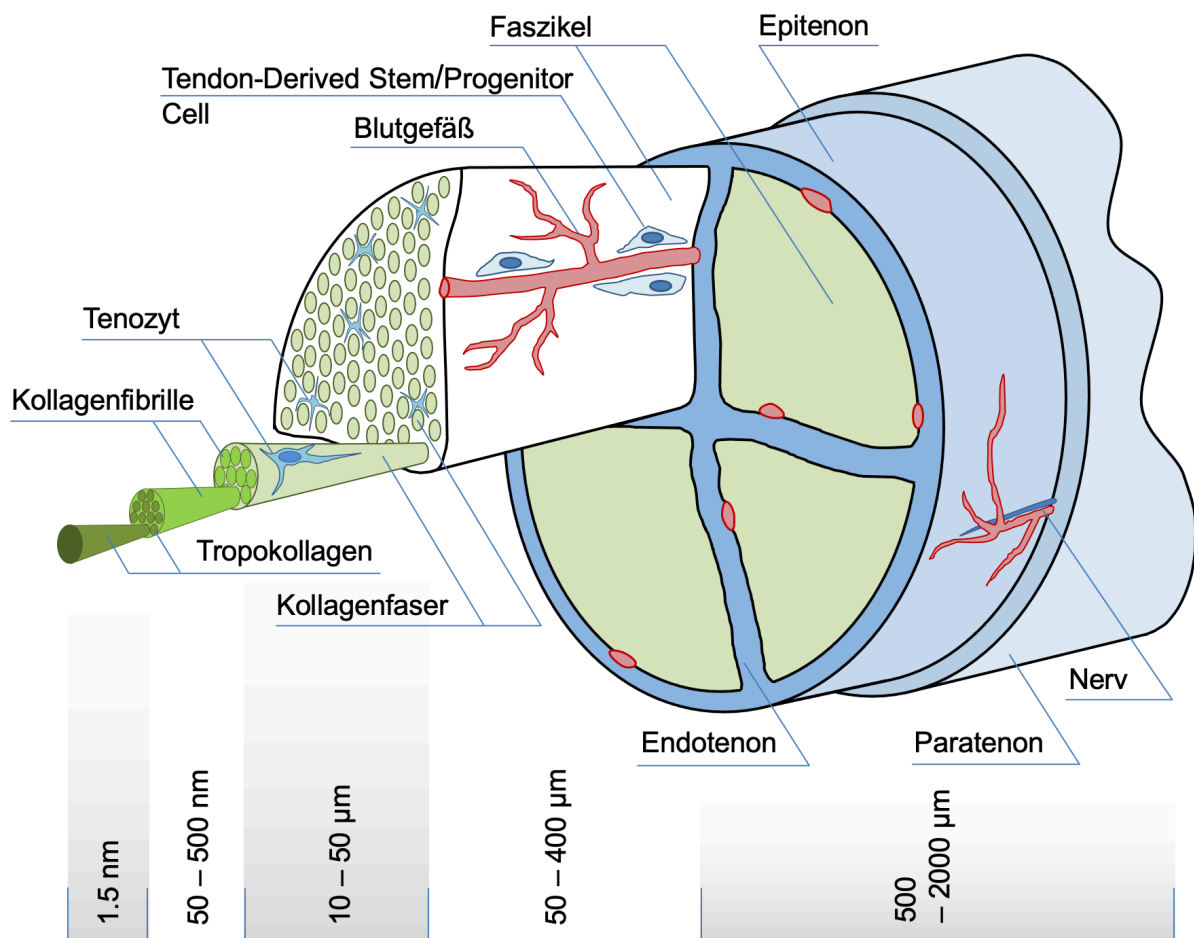


Abb. 1: Schematischer, hierarchischer Aufbau einer Sehne (modifiziert nach Tempfer et al., 2017)

Sowohl Proteoglykane als auch Elastin und das zugfestigkeitsgebende Kollagen Typ I werden von Sehnenzellen produziert (McNeilly et al., 1996). Tenozyten und Tenoblasten liegen als elongierte Fibrozyten und Fibroblasten zwischen den Kollagenfibrillen und machen 90 % der Zellen innerhalb einer Sehne aus (Bi et al., 2007; Kannus, 2000). Die restlichen 10 % entfallen auf Synovialzellen des Endo-/Epitenons, Chondrozyten der Enthese und Gefäßendothelzellen (Gehwolf et al., 2019c). Der zelluläre Anteil am Gesamtvolumen einer Sehne ist mit 5 % dennoch sehr gering.

Neben den Tenozyten und Tenoblasten, welche auch als aktivierte Form der Tenozyten bei einer intrinsischen Heilung von Sehnenverletzungen angesehen werden (Davidson et al., 1997), wurde auch die Existenz einer weiteren sehnen-spezifischen Zelllinie der „Tendon-Derived Stem/ Progenitor Cells“ (TDSPCs) beschrieben (Bi et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass humane und murine Sehnen eine kleine Zellpopulation mit Klonogenität, Selbsterneuerung und multidifferenziellen Eigenschaften

– selbst nach mehreren Expansionen *in vitro* und *in vivo* – beinhalten und daher klassische Kriterien für adulte mesenchymale Stromalzellen (MSC) aufweisen (Bi et al., 2007; Salingcarnboriboon et al., 2003; Tempfer et al., 2009). Ähnlich wie bei anderen Stammzellen sind TDSPCs auf das Zusammenspiel mit ihrer lokalen Mikroumgebung (der sogenannten Nische) angewiesen, um an der Geweberegeneration, -aufrechterhaltung und -heilung mitzuwirken. In Kultur zeigen die Zellen adhärentes Wachstum, wobei sie zunächst in den ersten Tagen wenig proliferieren, ehe sie schnell wachsen und Kolonien in Form eines Monolayers bilden (Yin et al., 2010). Insgesamt ist diese Zellpopulation samt ihrer Nische noch unzureichend charakterisiert und *in vitro* stellen sie eine heterogene Zellkultur dar. Dieser Umstand spiegelt sich in der Literatur mit einem uneinheitlichen Terminus (Tendon-Derived Stem/ Progenitor/ Stromal Cells) wider.

3.2 Tendinopathien

Tendinopathien sind Erkrankungen der Sehne, die sowohl durch Über- oder Fehlbelastung als auch durch degenerative Prozesse entstehen können. Es ist hierbei umstritten, ob Tendinopathien von Entstehung an eine entzündliche Komponente aufweisen oder ob diese sekundär entsteht (Dakin et al., 2015; Dakin et al., 2018; Lehner et al., 2019; Millar et al., 2016). Bei chronischen Tendinopathien geht man von einem chronischen, lokalen Entzündungszustand aus (Dakin et al., 2018). Diese können sich zu akut entzündlichen, schmerzhaften Tendinitiden entwickeln („acute-on-chronic“), ohne dass dabei zwingend ein adäquates Trauma vorangehen muss. Sie stellen einer der häufigsten Erkrankungen des Bewegungsapparates dar, für die Patienten einen ärztlichen Rat einholen (Pennisi, 2002). Häufig präsentieren sich Patienten mit einer Symptomkonstellation aus Schmerz, Schwellung und eingeschränkter Funktion. Typische Lokalisationen von Sehnenentzündungen sind an der Schulter (Rotatorenmanschettenläsion, Tendinose/-itis der langen Bizepssehne), am Ellenbogen (Tennis- oder Golferellenbogen), am Handgelenk (Sehnenscheidenentzündungen), an der Hüfte (Trochantertendinose), am Knie (Patellaspitzensyndrom) oder am Sprunggelenk (Achillessehnenentzündung). Therapeutisch wird mit konservativen Maßnahmen begonnen und bei ungenügender Verbesserung auf operative Verfahren zurückgegriffen (Garving et al., 2017; Rhim et al., 2020).

Die Inzidenz von Sehnenbeschwerden wird einhergehend mit einer steigenden Lebenserwartung zunehmen und trotz vieler medizinischer Fortschritte bleiben akute Sehnenverletzungen und chronische Tendinopathien in der Therapie eine Herausforderung (Riley, 2008). Der hypozelluläre und hypovaskuläre Aufbau von Sehnen einschließlich des komplexen Aufbaus der extrazellulären Matrix behindert eine Heilung erheblich. Häufig führt eine Sehnenheilung zu biomechanisch minderwertigem Narbengewebe, welches anfällig für eine wiederkehrende Symptomatik ist und oft eine Progredienz degenerativer Prozesse an der Sehne unterhält (Tempfer et al., 2017). Im Allgemeinen sind die Ergebnisse der derzeitigen Behandlungen, einschließlich Physiotherapie, Ultraschall- und extrakorporaler Stoßwellentherapie, medikamentöser Schmerztherapie sowie operativer Verfahren einhergehend mit langen Rehabilitationszeiten oft unbefriedigend (Andres and Murrell, 2008).

3.3 Pulsierende Magnetfeldtherapie

Die erste dokumentierte Behandlung, bei der mittels elektrischen Signalen versucht wurde, die Heilung zu beeinflussen, wird auf das Jahr 1743 datiert (Volker, 1993). Seither hat die Vielfalt der verschiedenen Therapien, mit denen versucht wird, die intra- und interzellulären elektrischen Mechanismen zu beeinflussen, enorm zugenommen. Heutzutage werden daher verschiedene elektrotherapeutische Verfahren eingesetzt, um Schmerz und Funktionseinschränkung aufgrund von Sehnenpathologien zu therapieren. Eine Methode zur Behandlung von akuten und chronischen Entzündungen ist die Anwendung von nieder- und hochenergetisch gepulsten, elektromagnetischen Feldern (engl.: *Pulsed Electromagnetic Fields*; PEMF) (Paolucci et al., 2020; Rosso et al., 2015), welche auch als repetitive, periphere Magnetstimulation (engl.: *repetitive peripheral magnetic stimulation*; rPMS) bezeichnet wird. Hierbei handelt es sich um eine nicht-invasive, nicht-thermische Behandlung, die von Patienten hervorragend toleriert wird (Bhavsar et al., 2020).

Die ersten Verwendungen gingen auf die Bemühungen des New Yorkers Andrew Bassett zurück, welcher in den 1960er begann, eine Reihe an Publikationen zur klinischen Wirksamkeit der PEMF-Therapie zu veröffentlichen (Bassett and Becker, 1962; Bassett et al., 1964). Spätestens seit Zulassung der PEMF-Therapie in den USA durch die FDA (engl.: *U.S. Food and Drug Administration*), welche die Behandlung von Frakturen und deren Spätfolgen wie Pseudarthrosen genehmigte (Bassett, 1989), rückten pulsierende Elektromagnetfelder in den Interessenfokus der klinischen Anwendungen

und der Wissenschaft. Es wurden verschiedene Anwendungsbereiche erprobt, beispielsweise in der Tumortherapie (Vadala et al., 2016), bei chronischen Wunden (Canedo-Dorantes et al., 2002) oder neurodegenerativen Erkrankungen (Guerrero and Ricevuti, 2016).

Für muskuloskeletale Gewebe- bzw. Zelltypen hat sich PEMF *in vitro* als effektiv erwiesen, um z.B. die katabolen Auswirkungen von proinflammatorischen Zytokinen auf den hyalinen Knorpel zu begrenzen (De Mattei et al., 2001; Pezzetti et al., 1999). Dies könnte darauf hindeuten, dass eine PEMF-Therapie in der Lage ist, Entzündungen zu begrenzen und die Weichgewebeheilung zu fördern. Ferner wurde bei Synovialzellen eine Verringerung der pro-inflammatorischen Mediatoren PGE₂, IL-6 und IL-8 bei gleichzeitigem Anstieg des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 beobachtet (Ongaro et al., 2012). Ebenfalls wurde die Wirkung von PEMF an Tenozyten in 2D-Zellkulturen untersucht (de Girolamo et al., 2013; de Girolamo et al., 2015). Es konnte gezeigt werden, dass eine 1,5 mT-PEMF-Behandlung zu einem veränderten Freisetzungprofil von IL-6, IL-10 und TGF- β führt und SCX, VEGF-A sowie COL1A1 vermehrt exprimiert werden. Diese für den Sehnenstoffwechsel förderlichen Prozesse bewirken unter anderem eine erhöhte Produktion von EZM-Bestandteilen, eine erhöhte Zellproliferation und Angiogenese.

Präklinisch konnten *in vivo* Studien eine verbesserte Sehnenbelastung und -zugfestigkeit und somit eine verbesserte Achillessehnenheilung zeigen (Huegel et al., 2018; Strauch et al., 2006). In einem Rotatorenmanschettenruptur-Modell und anschließendem Rotatorenmanschetten-Repair an 210 Ratten wurde nach 4, 8 und 16 Wochen nach postoperativem Repair eine frühere Sehnenheilung (u.a. immunhistochemisch vermehrte Kollagen-Typ-I-Bildung) und damit eine bessere Sehnenbelastung und -elastizität bei der PEMF-Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet (Huegel et al., 2018). Ebenso wurde nach einer Achillessehnen-Tenotomie bei Ratten (n = 40) nach 3 Wochen eine bis zu 69 % bessere Zugfestigkeit in der PEMF, verglichen mit der Kontrollgruppe, gemessen (Strauch et al., 2006).

Einige klinische Studien konnten über eine Verringerung des Schmerzes und einer Funktionsverbesserung bei Sehnenpathologien berichten (Galace de Freitas et al., 2014; Osti et al., 2015; Uzunca et al., 2007).

In einer randomisierten, kontrollierten klinischen Studie konnte die Applikation von PEMF im Anschluss eines arthroskopischen Rotatorenmanschetteneingriffes postope-

rative Schmerzen, Analgetika-Einsatz und das Risiko einer postoperativen Schultersteife mindern (Osti et al., 2015). Allerdings konnte kein verbessertes, funktionelles Outcome im Vergleich zur Placebo-Gruppe nach zwei Jahren beobachtet werden.

Die PEMF-Behandlung zeigte somit bisher positive Einflüsse auf das Sehngewebe, sowohl in präklinischen als auch klinischen Studien. Die molekularen und zellulären Mechanismen, welche durch PEMF induziert werden, bleiben dennoch wenig verstanden und der genaue „Mode-of-Action“ ist noch ungeklärt (Gehwolf et al., 2019a).

Die große Vielfalt der kommerziell erhältlichen PEMF-Geräte erschwert den Vergleich ihrer physikalischen und technischen Eigenschaften. Zudem handelt es sich bei PEMF in der Regel um niederfrequent gepulste Magnetfelder, welche unterschiedliche spezifische Formen und Amplituden aufweisen. Allgemein lässt sich jedoch sagen, dass ein zeitvariables oder gepulstes Elektromagnetfeld entsteht, indem das PEMF-erzeugende Gerät so aktiviert wird, dass die Einschaltzeit deutlich kürzer ist als die Ausschaltzeit, so dass die mittlere Leistung relativ gering ist, jedoch die Spitzenleistung um ein Vielfaches höher sein kann (siehe Abb. 2). Dadurch können Ströme im Gewebe induziert (Juutilainen and Lang, 1997) und die Spannung an Zellmembranen beeinflusst werden, die eine Aktivierung intrazellulärer Prozesse zur Folge hat (Funk, 2018; Rosso et al., 2015).

Die PEMF wurde von Andrew Bassett mit einer Frequenz zwischen 6 und 500 Hz definiert (Bassett, 1989). Physiologische Effekte seien jedoch nur im Bereich von 8 bis 60 Hz zu erwarten (Gartzke and Lange, 2002) und heutige, handelsübliche PEMF-Geräte erzeugen Impulse im Bereich zwischen 1 bis 100 Hz (Funk et al., 2009).

Von einer Gewebeschädigung durch PEMF ist nicht auszugehen, da niederfrequente Felder nichtionisierend und athermisch sind (Rubik, 1997).

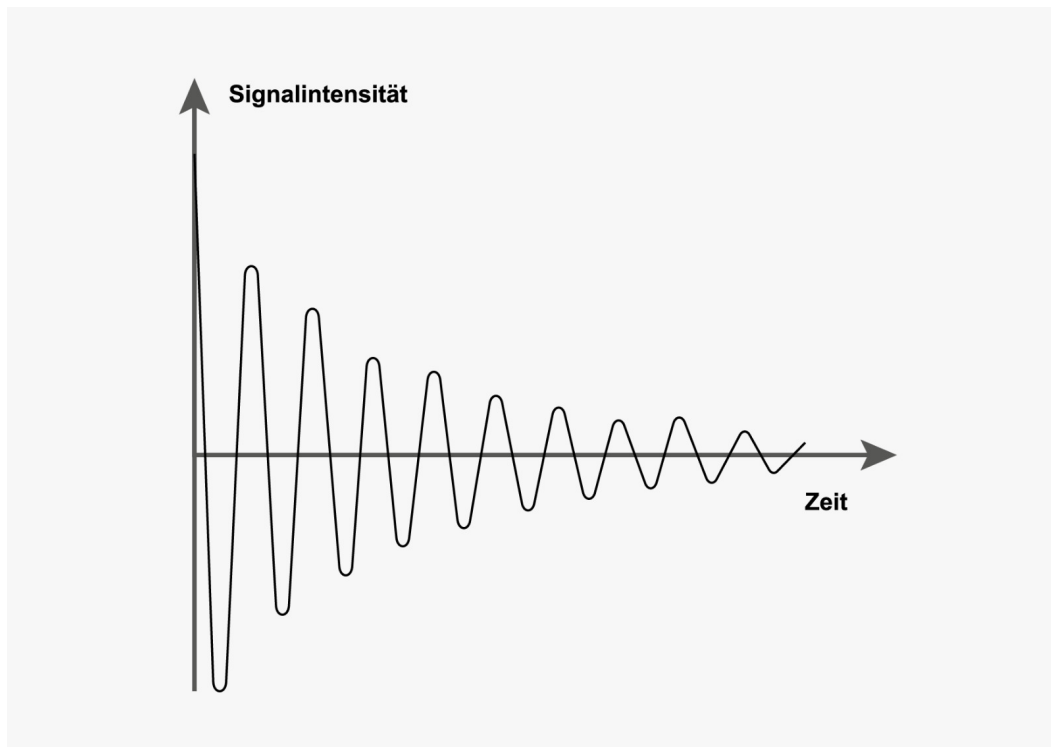


Abb. 2: Schematisches Signal eines PEMF-Geräts. Die Signalamplitude nimmt im Bereich von Millisekunden bis zum Einsetzen des nächsten, gepulsten Signals ab (eigene Abbildung; vergleiche Robertson et al., 2010).

Das in dieser Studie verwendete PEMF-Gerät wird von der Firma *healthfactories GmbH* (Surheim, Deutschland) hergestellt und unter dem Namen *Omnitron Pro* vertrieben (siehe Tab. 7, Tab. 8). Laut Unternehmen wird das *Omnitron Pro* vor allem in Arzt- und Physiotherapiepraxen zur Behandlung von Kopfschmerzen, nach Zahnbehandlungen und bei Funktionseinschränkungen oder Schmerzen am Bewegungsapparat eingesetzt. Unter dem Namen *Equitron Pro* findet das PEMF-Gerät besonders bei Pferden bzw. im Pferderennsport eine breite Anwendung bei jeglichen muskuloskeletalen Pathologien.

3.4 3D *in vitro* Zellkulturmodelle

Standardmäßige 2D-Zellkulturen erlauben oft keine Analyse morphologischer Aspekte und schränken dadurch die Beurteilung funktioneller zellulärer Eigenschaften ein. In konstruierten, dreidimensionalen Zellkulturen sind Zellen in einer extrazellulären Matrix eingebettet. Dadurch entsprechen die morphologischen Aspekte eher dem physiologischen Zustand als bei Monolayer-Zellkulturen, wodurch sich 3D-Kulturen zur Untersuchung von Gewebeentwicklung und -pathologien eignen (Matsusaki et al., 2014).

Erste Beispiele für solche Modelle sind Matrigel™-basierte 3D-Organoiden für Brustdrüsen- (Barcellos-Hoff et al., 1989) oder Lungengewebe (Schuger et al., 1990). In den letzten Jahren gab es auch Arbeitsgruppen, die erfolgreich sehnenartige Konstrukte beschrieben haben (Barsby et al., 2014; Kapacee et al., 2010). Um ein Sehnenzellkonstrukt zu erhalten, müssen sich die Tenozyten, zumeist eingebettet in einer Kollagenmasse, unter Spannung befinden bzw. eine mechanische Last anliegen. Hierbei werden verschiedene Formen unterschieden. Die Konstrukte können hierbei „uniaxiale“ (Yang et al., 2013), „zyklische“ (Altman et al., 2002; Kuo and Tuan, 2008) oder „statische“ (Chen et al., 2009; Chen et al., 2012; Kapacee et al., 2010; Kuo and Tuan, 2008), mechanische Lasten erfahren. Zudem existiert auch eine Variante, bei der die Konstrukte durch elektrochemische Beeinflussung des Kollagens ausgerichtet werden (Cheng et al., 2008; Kishore et al., 2012). Bei einer zyklischen, uniaxialen Last wirkt eine definierte Kraft von außen auf das Konstrukt, welche nur in einer Ausrichtung aufgebracht wird, meist in Richtung der Hauptachse des Konstruktes. Eine statische Last hingegen kommt durch die Fixierung und einer Kontraktion des Kollagengels zustande und wird als „intrinsisch“ bezeichnet (Barsby et al., 2014). Dies bedeutet, dass die Kraft durch die Reorganisation der Matrix durch die Zellen selbst aufgebracht wird. Es werden keine zusätzlichen Kräfte von außen auf das Konstrukt aufgebracht. Bei den in dieser Studie verwendeten Sehnenkonstrukten handelt es sich um ein laborintern entwickeltes Sehnenkonstrukt (Gehwolf et al., 2019c), welches eine Modifizierung der Konstrukte von Barsby et al. darstellt (Barsby et al., 2014). Anstatt zwei einzelner „Insect Pins“ wurden jeweils zwei Pins mit einem konnektierenden Faden verbunden und der Abstand zwischen den inneren Pins von 15 mm auf 10 mm verringert (siehe Abb. 3). Zwischen den inneren Pins werden die Zellen in einer Gel-Matrix aufgetragen. Der verringerte Abstand zwischen den Pins sowie der Einsatz eines konnektierenden Fadens verleiht den Konstrukten mehr mechanische Stabilität, wodurch der laborinterne Umgang mit den Wellplatten einfacher ist. Durch die höhere mechanische Stabilität lässt sich zudem eine größere, intrinsische Kraft vermuten, welche schlussendlich auf die Zellen wirkt.

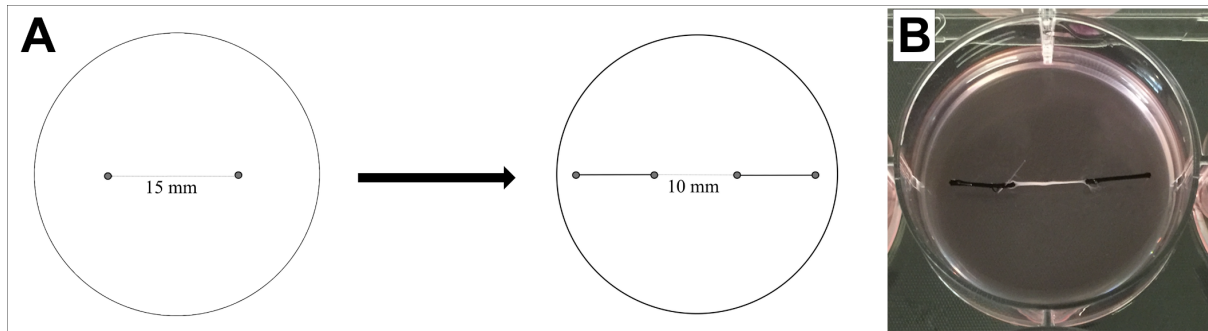


Abb. 3: A) Schematische Darstellung der Konstrukte von Barsby et al. (2014; links) und unsere Modifikation (Gehwolf et al., 2019; rechts). Graue Punkte: Insect Pins, Schwarze Verbindungslinien: konnectierender Faden.

B) Exemplar eines Insect Pin Assays.

3.5 Rationale der Studie

Auf zellulärer Ebene ist das Verständnis der biologischen Reaktionen der Tenozyten auf einen externen, physikalischen Reiz durch ein Elektromagnetfeld sehr begrenzt. Um einen besseren Einblick in die Wirkungsweise von PEMF auf Sehngewebe zu gewinnen, war das Ziel dieser Arbeit, ein für dreidimensionale, sehnenähnliche Konstrukte geeignetes Behandlungsregime der PEMF-Therapie zu entwerfen, um im Anschluss sowohl die vitale Funktion als auch die globalen, transkriptomweiten Auswirkungen auf die TDSPCs durch eine hochenergetische PEMF-Behandlung unter proinflammatorischen Bedingungen zu untersuchen. Durch die proinflammatorische Stimulation der Zellen wurde hierbei ein Entzündungsprozess erzeugt, um einen sehnenpathologischen Zustand auf In-vitro-Ebene zu simulieren. Es wurde ein transkriptomweiter Ansatz zur Analyse nach PEMF-Therapie gewählt, um die Gesamtheit der Genveränderungen sowie mögliche Gen-Cluster darzulegen, welche einer Regulation durch eine PEMF-Therapie unterliegen.

Spezifische Ziele der vorliegenden Studie:

- Herstellung der 3D-Sehnenkonstrukte
- Optimierung der PEMF-Behandlung, der -Häufigkeit inklusive Ruhephase
- Analyse des Einflusses von PEMF auf Vitalität und metabolische Aktivität
- Analyse des Genexpressionsprofils von PEMF-behandelten 3D-Sehnenkonstrukten
- Analyse der EZM-Zusammensetzung unter proinflammatorischen Bedingungen vor und nach der PEMF-Behandlung

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

Tab. 1: Auflistung der Verbrauchsmaterialien unter Angabe der Bezeichnung und des Herstellers

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
10 ml Spritze	10 ml syringe	Luer-Lok tip
24-Well-PCR-Platte	Gewebekulturplatte 24 Well	Greiner Bio-One
6-Wellplatte	Zellkultur Multiwellplatte 6 Well	Greiner Bio-One
96 Well-PCR-Platte	Hard-Shell® PCR Plates, 96 Well, thin-wall	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Abdeckfolie für 96-Well-PCR-Platte	Microseal B Adhesive Sealer	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Experion Elektronenreinigungsflüssigkeit	Experion™ Electrode Cleaner	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Experion RNase-freies Wasser	Experion™ DEPC-treated water	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Seidenfäden für die Insect-Pin-Assays	Silk braided black, EP3,5 USP 0 100m, 8035V	SMI AG Steinerberg
Filterpipettenspitzen, diverse Größen	Filterspitzen, Graduiert, Vorgesteckt, PP, natur, steril	Greiner Bio-One
„Insect Pins“	Insect Pins, stainless steel, 0,1 mm, Fine Science Tools	Austerlitz
Parafilm	Parafilm M	Bemis Company, Inc.
Petrischale	petri dish, 94 x 16 mm, with vents, heavy design	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen, mit und ohne Filter, versch. Größen	Pipettenspitzen	Greiner Bio-One

RNA Analyse Chips	Experion™ StdSens Chips	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Spritzenfilter 0,45 µm	Rotilabo®-Spritzenfilter, CME, steril	Carl Roth
T150-Zellkulturflasche	CELLSTAR® Zellkulturflasche, 550 ml, 150 cm ²	Greiner Bio-One
T25-Zellkulturflasche	CELLSTAR® Zellkulturflasche, 50 ml, 25 cm ²	Greiner Bio-One
T75-Zellkulturflasche	CELLSTAR® Zellkulturflasche, 250 ml, 75 cm ²	Greiner Bio-One
Zählkammer bzw. LUNA™-Objektträger	LUNA™ Cell Counting Slide	Logos Biosystems, Inc.
Zellschaber	Cell Scraper SPL	Life Sciences
Zentrifugenröhrchen, versch. Größen	CELLSTAR® Röhrchen	Greiner Bio-One

Tab. 2: Auflistung der Reagenzien unter Angabe des Herstellers und der Identifikationsnummer

Reagenzien	Hersteller	Identifikationsnummer
1-Bromo-3-Chloropropan (BCP)	Sigma-Aldrich GmbH	B9673
2-Propanol	Sigma-Aldrich GmbH	59304-1L-F
Aprotinin	Sigma-Aldrich GmbH	A6106
Ascorbinsäure (L-Ascorbinsäure 2-Phosphat-Sesquimagnesium-Salzhydrat)	Sigma-Aldrich GmbH	A8960
Chloroform	MERCK	102.445
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich GmbH	M81802
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich GmbH	D8537
Ethanol	MERCK	111.727
Ethanol	LiChrosolv®	1.117.272.500
FBS (fetal bovine serum/ Fetales Kälberserum)	Sigma-Aldrich GmbH	T7524
Fibrinogen	Sigma-Aldrich GmbH	F3879

GlutaMAX™	Gibco™ by Life Technologies	35050-038
GlycoBlue™	Thermo Fisher Scientific	AM925
GlycoBlue™ Coprecipitant	Invitrogen™	AM9515
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich GmbH	H3375
Interleukin-1B	PeptoTech	400-01B
Isofluran (1-Chlor-2,2,2-trifluorethyl-difluoromethylether)	Baxter AG	Zulassungsnummer: 53250 (Swiss-medica)
Isopropanol (2-Propanol)	Sigma-Aldrich GmbH	59304
Kollagenase Typ II	Gibco™ by Life Technologies	17101015
L-Prolin	Sigma-Aldrich GmbH	P0380
Luna® Universal Probe qPCR MasterMix	New England BioLabs® Inc.	M3004E
Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification	Sigma-Aldrich GmbH	M4526
Natriumcitrat	Thermo Fisher Scientific	04390432SB
Nuklease-freies Wasser	Jena Bioscience	PCR-258
Penicillin Streptomycin	Sigma-Aldrich GmbH	P4333
Pentobarbital-Natrium	Richter Pharma AG	
PureCol® EZ Gel Collagen Solution, 0.5% PureCol® in DMEM/F-12 Medium	Sigma-Aldrich GmbH	5074
RNase Inhibitor 40 U/µl	Promega Corporation	N251A
RNaseZap	Thermo Fisher Scientific	AM9780
SUPERase-In Rnase Inhibitor	Invitrogen™	AM2696
Surgipath® FSC 22® Einbettmittel	Leica Biosystems	3801480
Sylgard® 184	DOWSIL™	101697
Thrombin	Sigma-Aldrich GmbH	T6884
TRIzol® Reagenz	Sigma-Aldrich GmbH	12044977
Trypsin-EDTA solution	Sigma-Aldrich GmbH	T4049

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Gene

Verwendete Assays für RT-qPCR: PrimTime Std und PrimTime Mini qPCR Assay, IDT, Applied Biosystems				
Gen	Assay ID	Primer1 (5' - 3')	Primer2 (5' - 3')	Probe (5' - 3')
ALDH1 A3	Rn.PT.58.8127033	TTG TAG CAG TTG ACC CAG AC	AGC GAA CAG CAC TGA CTA TG	/56-FAM/AAA CCT CGA/ZEN/CAA AGC CCT GAA GCT /3IABkFQ/
B2M	Rn.PT.39a.2221483 4	TAG CAG TTG AGG AAG TTG GG	TGA TCT TTC TGG TGC TTG TCT C	/56-FAM/CGG TGG ATG/ZEN/GCG AGA GTA CAC TTG/3I- ABkFQ/
CD109	Rn.PT.58.44980245	GAG GAC TCA GAT GTC GAT GAC	CTT GTA ACC TAT GCC CTG TCT G	/56-FAM/TGT GTC TCC/ZEN/TTC CTT TTC TGC TTG CT/3IABkFQ/
COL1A1	Rn.PT.58.8986002	GAGAACCAGCAGAGCCA	GAACAAGGTGACAGAGGCATA	/56-FAM/TGGAGACCA/ZEN/GAGAAGCCACGATGA/3IAB- kFQ/
COL1A2	Rn.PT.58.36132987	G TTCACCCTTCACACCCT	GAGTCGTTGGGCCACAA	/56-FAM/ACCGTTGTG/ZEN/TCCTCGAATGCCTTT/3IAB- kFQ/
COL3A1	Rn.PT.58.35133758	CCTGGATTACCATTGTTGCC	CCCTGGTGGTTCTGGAC	/56-FAM/ACTGCCCCG/ZEN/TTCACCCTTTACA/3IABkFQ/
CTGF	Rn.PT.58.14104520 .gs	AGTTGGCTCGCATCATAGTTG	TGAGGAGTGGGTGTGTGAT	/56-FAM/TCTTCCAGT/ZEN/CGGTAGGCAGCTAGG/3IAB- kFQ/
EIF2B1	Rn.PT.58.13475352	TCT CCA TGA TAT AGC CAA CAG C	GGA GTC ACA GCC TGA TTT ATC TG	/56-FAM/CCT CTG CCA/ZEN/CCT CAA TGT CCC T/3IAB- kFQ/
HPRT1	Rn.PT.58.37395539	AACAAAGTCTGGCCTGTATCC	TTCCTTGGTCAAGCAGTACAG	/56-FAM/CTTCGAGAG/ZEN/GTCCTTTTCACCAGCA/3IAB- kFQ/
IL10	Rn.PT.58.9773600	TGGCCTGTAGACACCTTTG	CGACGCTGTCATCGATTCTC	/56-FAM/TCTTACCT/ZEN/GCTCCACTGCCTTG/3IABkFQ/
IL1B	Rn.PT.58.38028824	TTGTCGTTGCTTGTCTCTCC	GTGCTGTCTGACCCATGT	/56-FAM/TGGCTTATG/ZEN/TTCTGTCCATTGAGGTGG/3I- ABkFQ/
IL1R2	Rn00588589_m1	Applied Biosystems		

MATERIAL UND METHODEN

IL6	Rn.PT.58.13840513	CCTTCTGTGACTCTAACTTCTCC	CAGAGCAATACTGAAAC-CCTAGT	/56-FAM/TCCTTCCTA/ZEN/CCCCAACTTCCAATGC/3IABkFQ/
LEP-REL1	Rn.PT.58.5588277	GGA GTT GTA GAC GAA GGT GAT G	GCA GAA GTT CAC GGA TTG TC	/56-FAM/TCG AGA TCT/ZEN/TAG AGA AGG TGG CCC TC/3IABkFQ/
MKX	Rn.PT.58.13871338	CGTCTAGCATTAGCGAACCAA	CTTTACAAGCACCGTGACAAC	/56-FAM/ACACCTGCA/ZEN/CTAGCGTCATCTGC/3IABkFQ/
MMP11	Rn.PT.58.10854331	ACT TTC CAG GAC TTT CAC CTT C	CCT TCT GAG ATT GAT GCT GCT	/56-FAM/TGC TGA GGG/ZEN/CTA TGC CTA CTT CC/3IABkFQ/
POLR2A	Rn.PT.58.35295130	GGC AGA TAC ACC AGC ATA GTG	TCC AAG TTC AAC CAA GCC AT	/56-FAM/TCC AAG AGA/ZEN/CTG AGC AGC CAA AGC /3IABkFQ/
PUM1	Rn.PT.58.5112866	TATCTTCCACTGCCGTTCCG	CCTTAGCTTTTCCTCCTCTCC	/56-FAM/ACCACCTCC/ZEN/TTCCCTCTCTCACA/3IABkFQ/
RPLP0	Rn.PT.56a.4497907 5	CGCAAATGCAGATGGATCG	GTTGCCTCAGTGCCTCA	/56-FAM/CCACAGACA/ZEN/AAGCCAGGACCCT/3IABkFQ/
SCX	Rn.PT.58.31750069	CTCCTCCTTCTAACTT- CGAATCG	CACCCAGCCCAAACAGAT	/56-FAM/ACCAGAGAA/ZEN/AGTTGAGCAAAGACCCT/3IABkFQ/
TBP	Rn.PT.39a.2221483 7	GGAGAACAATTCTGGGTTT- GATC	TGTGAAGTTCCCCATAAGGC	/56-FAM/TGTTGACCC/ZEN/ACCAGCAGTTCAGT/3IABkFQ/
TGFB1	Rn.PT.58.6690138	CCG AAT GTC TGA CGT ATT GAA GA	ACT ACG CCA AAG AAG TCA CC	/56-FAM/TGG ACC GCA/ZEN/ACA ACG CAA TCT ATG A/3IABkFQ/
TNMD	Rn.PT.58.35753845	CACCTGTCACCAAGCCATT	GCAGAGTTCCATCTTTAGCCT	/56-FAM/CCATCGACC/ZEN/GCTACATCGCCATC/3IABkFQ/
YWHAZ	Rn.PT.58.12339560	CAG CAA CCT CAG CCA AGT AG	GAC ATC TGC AAC GAC GTA CT	/56-FAM/TTC GCA GCC/ZEN/AGA AAG CAA AGT CTT C/3IABkFQ/

FAM, 6-carboxyfluorescein; ZEN, 5' quencher; ABkFQ, Iowa Black® Dark Quencher

Tab. 4: Auflistung der verwendeten Geräte unter Angabe der Bezeichnung und des Herstellers

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Axioplan-Mikroskop	Axioplan Universal Mikroskop	Carl Zeiss AG
CO ₂ -Inkubator	BBD 6220 CO2 Incubator	Thermo Scientific
CO ₂ -Inkubator	Modell CB 160	BINDER GmbH
Einkanal-Pipetten, diverse Größen	Reference®	Eppendorf
Einkanal-Pipetten, diverse Größen	PIPETMAN® Classic	Gilson
Experion Elektrophorese Station	Experion™ Automated Electrophoresis Station	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Hybridisierungssofen	Hybrid 2000	H. Saur Laborbedarf
Inkubator ohne CO ₂	KS 4000 ic control	IKA®
Kryostat	CM 1950	Leica
Laborzentrifuge	Model 1-14	Sigma-Aldrich GmbH
Laser-Scanning-Mikroskop	LSM 700	Carl Zeiss AG
Mikroskop	Axiovert 135 Microscope	Carl Zeiss AG
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5430 R	Eppendorf
Mini-Zentrifuge	Micro Centrifuge I R 220VAC	Carl Roth
PCR Gerät	T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc.
PEMF Gerät	Omnitron Pro	Healthfactories GmbH
pH-Meter	FiveEasy™ pH/mV-Messgerät	Mettler Toledo
Pipettierhilfe	pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte
Mikroplatten-Reader	Tristar LB 941	Berthold Technologies

Plattformschüttler	Polymax 1040	Heidolph
qPCR Maschine	CFX96™ Real-Time System C1000 Touch™ Thermal Cycler	Bio-Rad Labora- ties, Inc.
RNA Analyse Chip Pri- mer	Experion™ Priming Station	Bio-Rad Labora- ties, Inc.
RNA Analyse Chip Vortexer	Experion™ Vortex Station II	Bio-Rad Labora- ties, Inc.
Photometer	NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer	Thermo Scienti- fic
Sterilbank	Heraeus Herasafe™ KS	Thermo Scienti- fic
Vortexmischer	Vortex-Genie 2	Scientific Indust- ries
Zellzähler	LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter	Logos Biosys- tems, Inc.
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 1L-R Centrifuge	Thermo Scienti- fic
Zentrifuge	Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Scienti- fic

Tab. 5: Auflistung der verwendeten Kits unter Angabe des Herstellers und der Identifikationsnummer

Kit	Hersteller	Identifika- tionsnum- mer
Acridine Orange (AO) & Propidium Iodide (PI) Cell Viability	Logos Biosystems, Inc.	LB F23001
Caspase-Glo® 3/7 Assay System	Promega Corpora- tion	G8090
CellTiter 96® AQ _{ueous} One Solution Cell Prolifera- tion Assay	Promega Corpora- tion	G3582
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega Corpora- tion	G7570

Experion™ RNA StdSens Analysis Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc.	7007103
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche	11684795910
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc.	1708890
LIVE/DEAD™ Cell Imaging Kit	Invitrogen™	R37601
SYLGARD® 184 Elastomer Kit	DOWSIL™	634165S

Tab. 6: Auflistung der verwendeten Lösungen

Lösungen

RNA-Storage-Lösung, pH = 6,4

Natriumcitrat	258,07 g/mol	1 mM
steriles DEPC-Wasser		

HEPES-Pufferlösung, 2 M, pH = 7,2

HEPES	238,3 g/mol	2 M
steriles DEPC-Wasser		
pH-Adjustierung mit Natriumhydroxid		

4.2 Zellkultur

4.2.1 Kulturbedingungen

Bei Kultivierung der Zellen *in vitro* muss sowohl die Zufuhr lebensnotwendiger Substanzen als auch die Neutralisierung schädlicher Stoffwechselprodukte über das Zellkulturmedium geschehen. Die TDSPCs wurden im Alpha MEM Medium complete (Alpha MEM Medium versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS, hitzeinaktiviert bei 56 °C für 30 min) und 1% GlutaMAX™) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Begasung im Brutschrank kultiviert. Die Begasung mit 5 % CO₂ erfolgte zur Konstant-

haltung des pH-Wertes der mit Hydrogencarbonat gepufferten Kulturmedien. Das sterile Arbeiten mit den Zellen erfolgte unter Sterilwerkbänken mit vertikalem Luftstrom. Alle Zellkulturmedien wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert und zur Anwendung entweder im Wasserbad oder unter der Sterilbank auf Zimmertemperatur erwärmt. Die Zellen wurden in T25-, T75-, T125-Zellkulturflaschen, sowie in 6-Wellplatten und Konstrukt-6-Wellplatten in Kultur gehalten.

4.2.2 Mediumwechsel

Durch den Stoffwechsel der Zellen werden dem Kulturmedium einerseits ständig Nährstoffe entzogen, andererseits reichern sich die Ausscheidungsprodukte der Zellen im Medium an. Das damit verbundene Absinken des pH-Wertes führt zu einer Farbveränderung des enthaltenen pH-Indikators Phenolrot von rot zu orange. Um gleichmäßiges Wachstum der Zellen zu gewährleisten, ist es notwendig, regelmäßig das Kulturmedium zu ersetzen. Abhängig von der Zelldichte war dies alle 2 bis 4 Tage nötig. Dazu wurde das verbrauchte Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und die benötigte Menge an frischem Medium zugegeben.

4.2.3 Passagieren von Zellen

Bei > 80 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Zunächst wurde das Medium im Kulturbehälter mit einer sterilen Glaspipette abgenommen. Um Mediumreste, die das Trypsin inaktivieren würden, auszuwaschen, wurde für 5 min D-PBS (RT) hinzugefügt. Hierbei wurden 5 ml D-PBS in die T25-, 10 ml in die T75- und 20 ml in die T175-Zellkulturflasche gefüllt. Anschließend wurde für die Zellen im T25 2 ml/ T75 5 ml/ T175 8 ml Trypsin hinzugegeben, die Flasche geschwenkt bis der Boden vollständig bedeckt war und für 2 min bei 37 °C inkubiert. Das Trypsin ist notwendig zur Lösung der Zellverbindungen. Die Ablösung der Zellen wurde anschließend mikroskopisch kontrolliert und in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit vorgelegten 5 ml Alpha MEM Medium complete (für T25; 10 ml für T75 und T175) überführt, wodurch das Trypsin inaktiviert wurde. Diese Suspension wurde 5 min bei 200 x g zentrifugiert, der Überstand abgehoben und das Zellpellet in 5 ml Alpha MEM Medium complete resuspendiert. Nun konnten die Zellen in eine größere Zellkulturflasche oder nach Zellzählung mit LUNA™ gepoolt und a) in T25-Flaschen zur Bestrahlung, b) in eine größere Zellkulturflasche, c) in 6 Wells, d) in Konstrukt-6-Wells oder e) in Petrischalen als Konstrukte angesetzt werden.

4.2.4 TDSPC-Isolation

Die Entnahme von Geweben zur Analyse stellt nach dem österreichischen Tierversuchsgesetz (TVG 2012) keinen Tierversuch dar, und somit musste keine Tierversuchsgenehmigung eingeholt werden. Die Tiere wurde von Janvier Labs (Frankreich) bestellt und sofort nach der Lieferung euthanasiert, weshalb keine Genehmigung für die Zucht der Ratten erforderlich war.

Für die Versuche beginnend ab PEMF 1.2 (siehe 4.4) wurden primäre TDSPCs aus F344-Ratten isoliert und kultiviert (männlich und weiblich, Alter zwischen 3-6 Monaten). Hierfür wurden die Ratten mit Isofluran betäubt und anschließend mit einer intrakardialen Pentobarbital-Injektion euthanisiert.

Die Achillessehnen wurden beidseits mit einer anatomischen Pinzette und einem Skalpell, welche zuvor mit 70-prozentigem Ethanol hinreichend sterilisiert wurden, präpariert. Die Haut wurde hierbei über die Achillessehne in Richtung des Fersenbeines retrograd abgezogen. Nun konnte mit dem Skalpell die Sehne proximal am muskulo-tendinösen Übergang zum Musculus triceps surae und distal vor der Entthese am Calcaneus abgetrennt werden. Die Sehnen wurden in einer Petrischale mit sterilem DPBS gewaschen. Zeitgleich wurden Muskel-, Fett- und Bindegewebsreste (insbesondere das Epitenon) mit dem Skalpell möglichst vollständig entfernt. Im Anschluss wurden die Sehnen zunächst in eine Petrischale mit Alpha MEM Medium complete transferiert und mit dem Skalpell in kleine Gewebestücke zerkleinert. Die zerkleinerten Sehnenstücke wurden dann in einer 6-Wellplatte mit 3 ml Alpha Medium complete und 3 mg/ml Kollagenase-II pro Well über Nacht im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Die zuvor angesetzte Kollagenase-II-Lösung wurde, nach dem Einwiegen der Kollagenase II und dem Lösen im Alpha MEM Medium complete, mittels 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert. Am darauffolgenden Tag wurde der Kollagenverdau makroskopisch beurteilt. Bei ausreichendem Kollagenabbau wurde die Zellsuspension zusammen mit 10 ml Alpha MEM Medium complete in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 120 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgehoben, die Zellen in 5 ml Alpha MEM Medium complete + 1 % P/S resuspendiert und direkt in eine T25-Zellkulturflasche (Passage 0) überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit 5 ml Alpha MEM Medium complete + 1 % P/S. Es erfolgte eine regelmäßige, mikroskopische Kontrolle der Zellkulturflaschen auf Kontamination und Zellwachstum. Bei einer Konfluenz von > 80 % wurden die Zellen nach dem obigen Schema passagiert.

4.2.5 Kryokonservierte TDSPCs

Für die ersten Experimente wurden primäre, kryokonservierte TDSPCs verwendet. Hierbei handelt es sich um TDSPC-Zelllinien aus Achilles- und Flexor-Digitorum-Lon-gus-Sehnen von sowohl männlichen als auch weiblichen F344-EGFP-Ratten im Alter von ca. drei Monaten. Die TDSPCs wurden wie beschrieben isoliert, dem Kollagena-severdau ausgesetzt und bis zur dritten Passage passagiert, damit genügend Zellen zum Aliquotieren herangewachsen waren. Dann wurden die Zellen zunächst wie beim Passagieren trypsiniert, im Zentrifugenröhrchen mit vorgelegtem Alpha MEM Medium complete bei 120 x g 5 min zentrifugiert, mit Medium aufgefüllt und resuspendiert. Da-nach erfolgte eine Zellzahlbestimmung mittels LUNA™ wie unten beschrieben. An-schließend wurde erneut bei 120 x g 5 min zentrifugiert. Die erneute Resuspension des Zellpellets erfolgte nun mit dem erforderlichen Volumen an Einfriermedium (1*10⁶ Zellen/ml), welches sich aus Alpha MEM Medium mit 10% DMSO und 10% FBS zu-sammensetzte. Das lipophile DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen, welche die Zellmembran zerstören würden. Anschließend wurden die Zellen in Kryokonser-vierungsröhrchen (je 1 ml) aliquotiert und zunächst für ein bis zwei Tage bei -80 °C in einem isopropanolbasierten Einfriercontainer gelagert. Nach Ablauf der ein bis zwei Tage erfolgte die Lagerung im flüssigen Stickstoff bei -196 °C.

Zum Auftauen der TDSPCs wurden die Kryokonservierungsröhrchen aus dem Stick-stoff entnommen, zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und sofort im 15-ml-Zent-rifugenröhrchen zusammen mit 5 ml Alpha MEM Medium complete bei 200 x g, 24 °C, 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden mit 5 ml Alpha MEM Medium complete + 1 % P/S im Zentrifugenröhrchen resuspen-diert und direkt in eine T25-Kulturflasche (Passage 4) überführt.

4.2.6 Bestimmung der Zellzahl, -konzentration und -viabilität

Um alle Versuche unter gleichen Bedingungen durchzuführen, ist es notwendig, stets mit der gleichen Zellzahl zu arbeiten. Die Zellzahl in einer Suspension wurde mit Hilfe des Zellzählergerätes „LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter“ von Logos Bio-systems durchgeführt.

Hierfür wurde aus der Zellsuspension, die z.B. nach dem Zentrifugieren im Zentri-fugenröhrchen beim Passagieren oder bei der Herstellung der Sehnenzellkonstrukte vorhanden ist, 18 µl mit 2 µl Acridinorange / Propidiumiodid-Farbstoff in einem 1,5-ml-

Röhrchen vermischt. Anschließend wurden hieraus 10 µl auf einen LUNA™-Objektträger gegeben. Nach einer Wartezeit von einer Minute wurde nun die Zellzahl (alle/lebende/ tote Zellen), Zellkonzentration (lebende/ tote/ alle Zellen in Zellen/ml) und die durchschnittliche Größe samt einer AO/PI-Zellviabilität in Prozent gemessen.

4.3 *In vitro* 3D Sehnenkonstrukte

4.3.1 Vorbereitung der Zellkulturbehälter

Zur Herstellung der Konstrukte mussten zunächst 6-Wellplatten bzw. Petrischalen vorbereitet werden. Der erste Schritt hierbei war das Ausgießen des jeweiligen Zellkulturbehälters mit Silikon um eine hydrophobe Oberfläche zu erzeugen und eine Fixierung der Pins zu ermöglichen. Als Silikonelastomer wurde das Sylgard® 184 (DOWSIL™) verwendet. 45 ml Sylgard® 184 Silicone Elastomer Base wurde mit 5 ml Sylgard® 184 Silicone Elastomer Curing Agent in einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen vermischt. Durch langsames Umkippen des Zentrifugenröhrchens durchmischten sich die Stoffe, sodass eine homogene Flüssigkeit entstand. Dieser Vorgang dauerte bis zu 10 Minuten.

Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen für 3 min bei 350 g zentrifugiert. Nun wurden die Böden der Zellkulturbehälter auf eine Höhe von ca. 5 mm mit Silikongel ausgegossen. Größere Luftblasen wurden mit einer Pipettenspitze entfernt. Nach fertigem Ausgießen wurden die Zellkulturbehälter über Nacht bei 48 °C in einen Brutschrank zur Aushärtung gestellt. Kleinere Luftbläschen im Silikongel verschwanden während der Inkubation, sodass nach erfolgter Aushärtung stets ein luftblasenfreies Gel vorlag. Am darauffolgenden Tag konnten die 0,1 mm dicken und ungefähr 6 mm langen „Insect Pins“ mit dem 1 mm dicken und 8 mm langen zugeschnittenen Faden (Silk braided black) auf den Silikonboden mit Hilfe einer anatomischen Pinzette festgesteckt werden (Abb. 3). Hierbei war zu beachten, dass zwischen den inneren beiden „Insect Pins“ stets ein Abstand von 10 mm eingehalten wurde. Bei Petrischalen war ferner zu beachten, dass der Abstand zwischen den Reihen mindestens 10 mm betragen sollte, um zu verhindern, dass die Konstrukte fusionieren können.

Die Zellkulturbehälter wurden in 70-prozentigem Ethanol für eine Stunde eingelegt. Die anschließende Trocknung fand über Nacht in der Sterilbank statt. Am nächsten

Tag wurden die Zellkulturbehälter 30 min unter UV-Lichtbestrahlung behandelt und in sterilen Plastiktüten zur weiteren Verwendung gelagert.

4.3.2 Herstellung der Sehnenkonstrukte

Für die Herstellung der Sehnenkonstrukte wurden alle Arbeitsschritte unter einer Sterilbank durchgeführt. Die folgenden Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt, um einer vorzeitigen Gelbildung entgegenzuwirken. Zunächst wurde eine Kollagen-Medium-Lösung angefertigt. Pro aufzutragendes Gel in einem Well wurde mit 130 μ l gerechnet und 50 % als Reserve zusätzlich angesetzt, um Verluste auszugleichen. Die Konzentration des Typ-I-Kälber-Kollagens (PureCol®) sollte 2 mg/ml betragen. Konzentrationen unter oder über diesem Wert haben sich in eigenen Vorversuchen als unvorteilhaft herausgestellt. Das entsprechende Volumen des benötigten Kollagens wurde in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und das entsprechend benötigte Volumen an vorgekühltem Alpha-MEM-Medium hinzugefügt. Ferner wurde 1 % P/S (100 Einheiten/ ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin) und 1 % Aprotinin hinzugefügt. Aprotinin ist ein Proteaseinhibitor, welcher vor allem Matrix-Metalloproteasen inhibiert. Ein Verzicht auf Aprotinin an dieser Stelle würde einen schnellen Abbau des Kollagen-Gels zur Folge haben.

Der pH-Wert der farblosen Lösung wurde mit einer einmolaren NaOH-Lösung bis zum Umschlag in eine rosafarbene, mediumstypische Farbe der Kollagen-Medium-Lösung adjustiert. Das Zentrifugenröhrchen wurde geschwenkt, bis sich eine homogene Farbe der Lösung einstellte. Anschließend sollte sich der pH-Wert im Bereich von 7,2 bis 7,6 befinden.

Für den nächsten Schritt wurden die Zellen dem Kollagen-Medium-Lösung hinzugefügt. Die TDSPCs wurden wie beschrieben isoliert (siehe 4.2.4) und als Primärkultur in den Passagen 0 bis 2 in die Konstrukte eingebettet. Die präparierten Zellen wurden sowohl von einer einzigen Ratte als auch als Pool von mehreren Ratten verwendet. Die Zellkonzentration in der fertigen Gellösung wurde auf $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml festgelegt. Eine T75-Zellkulturflasche mit konfluentem Zellwachstum beinhaltet ca. 1×10^6 Zellen. Die Zellen in den Zellkulturflaschen wurden wie beschrieben (siehe 4.2.3) aufbereitet. Die benötigte Anzahl an Zellen wurden nach der Zellzahlbestimmung mit Luna™ und nach einem eventuellem Pool-Vorgang in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Dieses wurde 5 min bei 200 x g zentrifugiert und der Überstand abgehoben. Nun wurde die gekühlte Kollagen-Medium-Lösung verwendet um das Zellpellet auf Eis

zu resuspendieren. Nun konnte die Kollagen-Medium-Zelllösung aufgetragen werden. Hierzu wurden 130 µl zwischen und um die inneren beiden Insect Pins aufgetragen (Abb. 4, Tag 1). Anschließend wurden die 6-Wellplatten bzw. Petrischalen für 60 bis 90 min in den Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) gestellt, damit sich die Gele verfestigen konnten. Wenn sich das Gel noch nicht ausreichend verfestigt hat, konnte es für weitere 30 min in den Inkubator gestellt werden. Nach der Verfestigung der Gele wurden vorsichtig 3 ml Alpha MEM complete + 1 % P/S pro Well gegeben. Hierbei war darauf zu achten, dass die Gele vollständig mit Medium bedeckt waren. Das Medium wurde alle 3 bis 4 Tage gewechselt. Durch intrinsische Spannung der Gele an den Pins zogen sich die Gele in einem Zeitraum von zwei Wochen zu einem sehnenartigen Konstrukt zusammen (Abb. 4). Teile des Kollagengels konnten an der Silikonoberfläche haften bleiben und somit die korrekte Bildung eines Sehnenkonstruktes behindern. In solch einem Fall wurde das Konstrukt vorsichtig mit einer Pipettenspitze vom Silikonboden gelöst, um eine weitere Kontraktion zu ermöglichen.

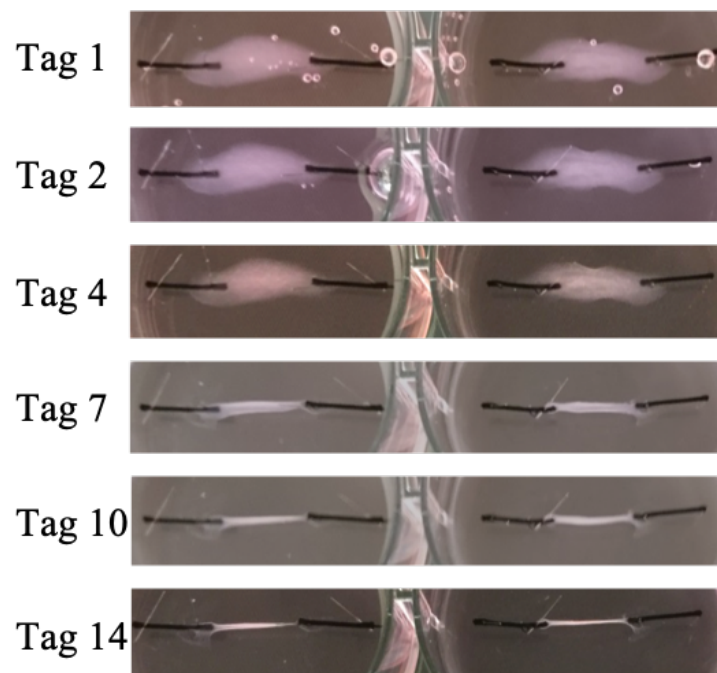


Abb. 4: Zeitlicher Verlauf von zwei beispielhaften Sehnenkonstrukten in einer 6-Wellplatte über 14 Tage. Es wurden primäre Ratten-Achillessehnen-TDSPCs (p2, ♂, 3 Monate, n=1) verwendet.

4.3.3 Proinflammatorische Stimulation mit IL-1 β

Entzündungen können zu Schäden an der extrazellulären Matrix führen und damit Sehnenverletzungen begünstigen. Unter den verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen spielt Interleukin-1 β eine zentrale Rolle bei der Steuerung kataboler Prozesse in Sehngewebe, was letztlich zur Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen und einer verminderten Kollagensynthese führt, die beide den Abbau der extrazellulären Matrix der Sehnen fördern. Um eine Entzündung zu simulieren, wurden die Zellen mit Interleukin-1 β behandelt. Hierfür wurden die Zellen 25 Stunden vor der PEMF-Behandlung (siehe weiter unten) mit 10 ng/ml IL-1 β induziert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gegen ein frisches ohne IL-1 β ausgewechselt. Eine Stunde nach dem Mediumwechsel konnte eine PEMF-Behandlung stattfinden.

4.4 PEMF-Behandlung

4.4.1 Omnitron Pro

Das Omnitron Pro (Abb. 5) wurde während der Studie mit verschiedenen Intensitätseinstellungen betrieben, wodurch sich die unten angegebenen Spezifikationsparameter veränderten (Tab. 7, Tab. 8). Die Benutzeroberfläche des Omnitron Pros erlaubte dem Verwender zwei Einstellungen für eine Behandlung vorzunehmen; (a) Einstellung der Intensität in 10er Prozentschritten und (b) Einstellung der Behandlungsdauer in 10er Sekundenschritten bis max. 20 min. Da bei einigen Experimenten eine längere Behandlungszeit als 20 min gewählt wurde, musste nach Ablauf der 20 min manuell eine neue Behandlung am Omnitron Pro gestartet werden. Der Start der neuen Behandlung hat im Optimalfall unter eine Sekunde gedauert.



Abb. 5: Produktbild (Copyright healthfactories GmbH) des Omnitron Pros (links) und der Spule (rechts)

Tab. 7: Spezifikationen des verwendeten PEMF-Gerätes Omnitron Pro.

Intensität (%)	Pulsfrequenz (Hz)	Magnetische Flussdichte oder Induktion (mT)
100	2	82
90	2,3	72
80	2,5	64
70	2,9	56
60	3,2	48
50	3,9	40
40	4,8	32
30	6,5	24
20	8	16

Tab. 8: Spannung, Resonanzfrequenz und Pulsdauer eines Pulses des verwendeten PEMF-Gerätes Omnitron Pro

Spannung	3 – 15 kV
Resonanzfrequenz	110 – 130 kHz
Pulsdauer	50 – 110 μ s

4.4.2 Optimierung der Behandlungsparameter für die Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung („RNAseq“)

In der Literatur sind verschiedene PEMF-Behandlungsregime für unterschiedliche PEMF-Geräte auf *in vitro* Ebene beschrieben. Diese Studie stellt jedoch die erste PEMF-Behandlung *in vitro* mit dem Omnitron Pro dar. Daher war es notwendig, einen geeigneten Versuchsaufbau und ein geeignetes Behandlungsregime zu etablieren.

Vor Studienbeginn wurde das Setup in „PEMF 1 – 6“ untergliedert.

„PEMF 1 – 4“ fassen hierbei alle Vor-Experimente zusammen, für die jeweils die Optimierung einzelner Einstellungen der PEMF-Behandlung als übergeordnetes Ziel festgelegt wurde. Die Vorversuche „PEMF 1 – 3“ wurden mit 2D-Zellkulturen durchgeführt, da diese schneller durchführbar sind und weniger Ressourcen binden als selbige Versuche mit 3D-Konstrukten. Wir konnten in Vorversuchen bereits zeigen, dass auf 2D-Ebene keine massiven Unterschiede in den Ergebnissen innerhalb der Vorversuche und im Vergleich zur 3D-Zellkultur zu erwarten sind. Die PEMF-Behandlung auf 2D-Ebene hat sowohl in der Behandlungsdauer als auch bei maximaler Intensitätseinstellung des Omnitron Pros keinen negativen Effekt auf die Zellviabilität und auf die metabolische Zellaktivität gezeigt.

Ab „PEMF 4“ wurden für die Experimente 3D-Zellkulturen verwendet. „PEMF 4“ galt als einziger Vorversuch auf 3D-Ebene. „PEMF 5“ stellt das finale Behandlungssetup dar, welches für die RNAseq-Analyse verwendet wurde. Ferner folgt darauf „PEMF 6“, welches eine Verifizierung der RNAseq Daten mittels PCR vorsah.

Die Bestrahlungseinstellungen, die definierten Ziele jedes Zwischenrittes, das verwendete Medium sowie Zellkulturgefäß während der Bestrahlung und die anschließenden Analysen sind in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9: Behandlungseinstellungen der PEMF-Setups

PEMF Setup	Definierte Ziele	Intensität	RP	Bestrahlungszeit	Häufigkeit der Behandlung	TDSPC-Zelltyp	Proinflammatorische Stimulation	Medium	Kulturbedeälter	Analysen
1.1	• Optimale Ruhepause („RP“) ermitteln	100 %	a) 30 min b) 3 h c) 8 h	60 min	1x	• Achillessehne, kryokonserviert, ♂, p6, 3 Mon., n=3	nein	• Kultivierung: Alpha-MEM complete • Bestrahlung: Alpha MEM complete + 1 % P/S + 10 mM HEPES	• 6 Well • 10.000 Zellen/Well	• qPCR • MTS-Test • ATP-Test
1.2	• Optimale Zellquelle ermitteln • Optimale RP ermitteln • Optimale HEPES-Pufferlösung-Konzentration ermitteln	100 %	a) 30 min b) 90 min	60 min	1x	• Achillessehne, kryokonserviert, ♂, p6, 3 Mon., n=3 • Flexorsehne, kryokonserviert, ♀, p6, 3 Mon., n=3 • Achillessehne, primäre Zellen, p2-3, ♂, 6 Mon., n=2 • Flexorsehne, primäre Zellen, p2-3, ♀, 3 Mo., n=1	nein	• Kultivierung: Alpha-MEM complete • Bestrahlung: Alpha MEM complete + 1 % P/S + 20 mM HEPES	• 6 Well • 10.000 Zellen/Well	• qPCR

MATERIAL UND METHODEN

1.3	• Optimale RP ermitteln	100 %	a) 30 min b) 90 min c) 3 h	60 min	1x	• Achillessehne, primäre Zellen, p1 oder p3, ♂, 5 Mon., n=2 oder n=3	nein	• Kultivierung/Bestrahlung: Alpha-MEM complete	• T25-Gewebe- kulturflasche • 3.000.000 Zellen/T25	• qPCR
2	• Optimale Bestrahlungszeit ermitteln	100 %	90 min	a) 15 min b) 30 min c) 45 min d) 60 min	1x	• Achillessehne, primäre Zellen, p2-3, ♂, 3-5 Mon., n=3	nein	• Kultivierung/Bestrahlung: Alpha-MEM complete	• T25-Gewebe- kulturflasche • 3.000.000 Zellen/T25	• qPCR
3	• Optimale Bestrahlungsintensität ermitteln	a) 40 % b) 60 % c) 80 % d) 100 %	90 min	60 min	1x	• Achillessehne, primäre Zellen, p1-3, ♂, 3-5 Mon., n=3	nein	• Kultivierung/Bestrahlung: Alpha-MEM complete	• T25-Gewebe- kulturflasche • 3.000.000 Zellen/T25	• qPCR
4	• Bisherige Ergebnisse mit den Sehnenkonstrukten verifizieren • Optimale Bestrahlungshäufigkeit ermitteln • Proinflammatorische Stimulation	100 %	90 min	60 min	a) 1x b) 2x c) 3x	• Achillessehne, primäre Zellen, p1-3, ♂, 3-5 Mon., n=3 oder n=4	ja	• Kultivierung/Bestrahlung: Alpha-MEM complete	• Sehnenkonstrukte in 6-Wellplatte • 250.000 Zellen/ml und 2 mg/ml PureCol	• qPCR
5	• Finale PEMF-Behandlung für RNA-seq	100 %	90 min	60 min	2x	• Achillessehne, primäre Zellen, p2, ♂, 3 Mon., n=1, 7 Individuen	ja	• Kultivierung/Bestrahlung: Alpha-MEM complete	• Sehnenkonstrukte in Petrischale • 250.000 Zellen/ml und 2 mg/ml PureCol	• Live/Dead Assay • RNAseq • EZM Analysen • Apoptose Assays
RNAseq-Verifizierung mit gleichen Einstellungen wie PEMF 5 mit 9 Individuen										• qPCR

Die Methodik und der Versuchsaufbau der Bestrahlung wurden fortlaufend während der Vorversuche optimiert. Nachfolgend ist der stetig veränderte Behandlungsablauf für die 2D-Zellkultur und der endgültige Ablauf für die 3D-Zellkultur getrennt dargestellt.

Vorversuche mit 2D-Zellkulturen:

Der Zwischenritt PEMF 1 wurde in PEMF 1.1 – 1.3 unterteilt, da der Versuchsablauf währenddessen einige Male verändert wurde und alle Untergliederungen die Ermittlung der optimalen Ruhepause „RP“ (Ruhepause) gemein hatten. Die Ruhepause wurde als Zeit nach der Bestrahlung definiert, bevor die Zellen erneut bestrahlt oder für die Analyse aufgearbeitet wurden.

Ablauf für PEMF 1.1:

Zunächst wurden TDSPCs in definierter Menge (10.000 Zellen/Well, vgl. Tab. 9) in 6-Wellplatten passagiert und 3 ml Alpha MEM complete + 1 % P/S als Medium hinzugefügt. Zwei Tage später war die Konfluenz der Zellen bei ca. 80 % und eine PEMF-Behandlung konnte somit stattfinden. Eine Stunde vor dem geplanten Behandlungsstart der jeweiligen Versuchsgruppe wurde das Medium gegen 2 ml Alpha MEM complete + 1 % P/S + 20 mM HEPES ausgewechselt. Da die Bestrahlung in einem Inkubator ohne CO₂-Begasung stattfand, war eine HEPES-Pufferlösung für die nötige pH-Wert-Konstanthaltung notwendig. Anschließend wurden die zu bestrahlenden und die Kontroll-6-Wellplatten zurück in den mit 5 % CO₂-begastem Inkubator für eine Stunde gestellt, damit sich der gleiche pH-Wert wie vor dem Mediumwechsel einstellen konnte. Anschließend wurde eine 6-Wellplatte zur Bestrahlung (Abb. 6) in einen Inkubator bei 37 °C gestellt. Es wurde darauf geachtet, dass sich die 6-Wellplatte im Zentrum der Induktionspule befand. Die jeweilige Kontrolle wurde in einen separaten Inkubator bei 37 °C platziert.

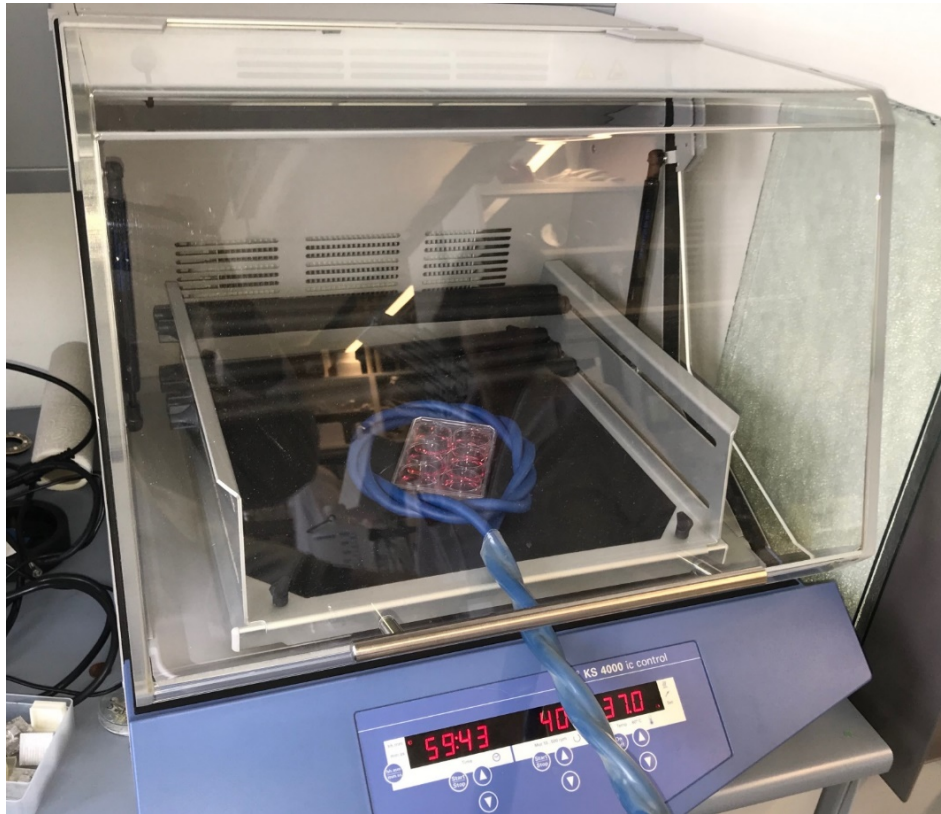


Abb. 6: PEMF-Behandlung einer 2D-Zellkultur in einem nicht-CO₂-begastem Inkubator bei 37 °C. Die 6-Wellplatte passte genau in die Spule des Omnitron Pros hinein und wurde samt dieser mittig auf die Inkubatorfläche platziert.

Nach erfolgtem Bestrahlungsregime (60 min Bestrahlung bei 100 % Intensität, verschiedene Ruhepausen) wurde das Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und der Kulturbehälter mit D-PBS bodenvoll aufgefüllt. Nach Absaugung des D-PBS wurde 1 ml TRIzol® Reagenz der 6-Wellplatte oder der T25-Zellkulturflasche hinzugefügt. Durch stetiges Auf- und Abpipettieren des Milliliters wurden die Zellen vom Plastikboden gelöst, lysiert und als Suspension in ein steriles 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nun konnte die RNA-Extraktion (siehe 4.5.2), cDNA-Synthese (siehe 4.5.5) und anschließende qPCR Analyse (siehe 4.5.6) erfolgen.

Anpassung für PEMF 1.2:

Aufgrund der augenscheinlich starken pH-Indikatorfarbänderung nach der einstündigen Bestrahlung in einem nicht-CO₂-begastem Inkubator im Vergleich von zuvor, wurden die pH-Werte des Mediums in Abhängigkeit vom Inkubator (mit und ohne CO₂-Begasung), der HEPES-Pufferkonzentration (10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM) und vom Parafilm (6-Wellplatten mit und ohne Parafilm luftdicht verschlossen) gemessen. Aufgrund der Ergebnisse wurde daraufhin die HEPES-Pufferkonzentration von 10 auf 20

mM erhöht und zusätzlich wurden nun die Kulturbedälter luftdicht mit Parafilm verschlossen.

Anpassung für PEMF 1.3 – 3:

Da die qPCR-Ergebnisse weiterhin inhomogen waren, wurde nun der Einfluss von HEPES auf die Genexpression der TDSPCs untersucht. Aufgrund schlechter Datenqualität wurde von fortan kein HEPES mehr verwendet. Es wurde jedoch stets mit einem nicht-CO₂-begastem Inkubator die PEMF-Behandlungen durchgeführt.

Der Mediumwechsel eine Stunde vor der PEMF-Behandlung war demnach hinfällig. Zudem wurden die Kulturbedälter von 6-Wellplatten auf T25-Zellkulturflaschen umgestellt. Die T25-Zellkulturflaschen wurden mit 3×10^6 Zellen / T25 angesetzt (vgl. Tab. 9). Die Umstellung hatte den Vorteil, dass die Wechselzeit zwischen dem CO₂-begastem und dem nicht-CO₂-begastem Inkubator, welcher zur Bestrahlung verwendet wurde, verkürzt werden konnte, indem man anstatt Parafilm zur luftdichten Verschlussung nun nur noch einen luftdichten Deckel auf die T25-Zellkulturflasche drehen musste. Darüber hinaus war eine zuverlässigere luftdichte Verschlussung gewährleistet.

Anpassungen ab PEMF 4, 3D-Zellkultur:

Ab PEMF 4 wurden die Experimente mit einem CO₂-begastem Inkubator durchgeführt. Der Wechsel von einem CO₂-begastem zu einem nicht-CO₂-begastem Inkubator übt möglicherweise Stress auf die Zellen aus und stellt damit eine schwer einzuschätzende Variable im Versuchsaufbau dar. Es wurde daher eine Konstruktion entworfen, die es ermöglichte, die PEMF-Behandlung der Zellen in einem Inkubator mit 5 % CO₂-Begasung bei 37 °C durchzuführen (siehe Abb. 7). Somit wurden der Inkubatorwechsel und die luftdichte Verschlussung obsolet. Um eine gleichmäßige Strahlungsintensität zwischen den Sehnenkonstrukten sicherzustellen, wurden die inneren beiden Wells ausgespart. Somit hatten die übrigen, äußeren 4 Wells bzw. Sehnenkonstrukte den gleichen Abstand zur Omnitron-Spule.

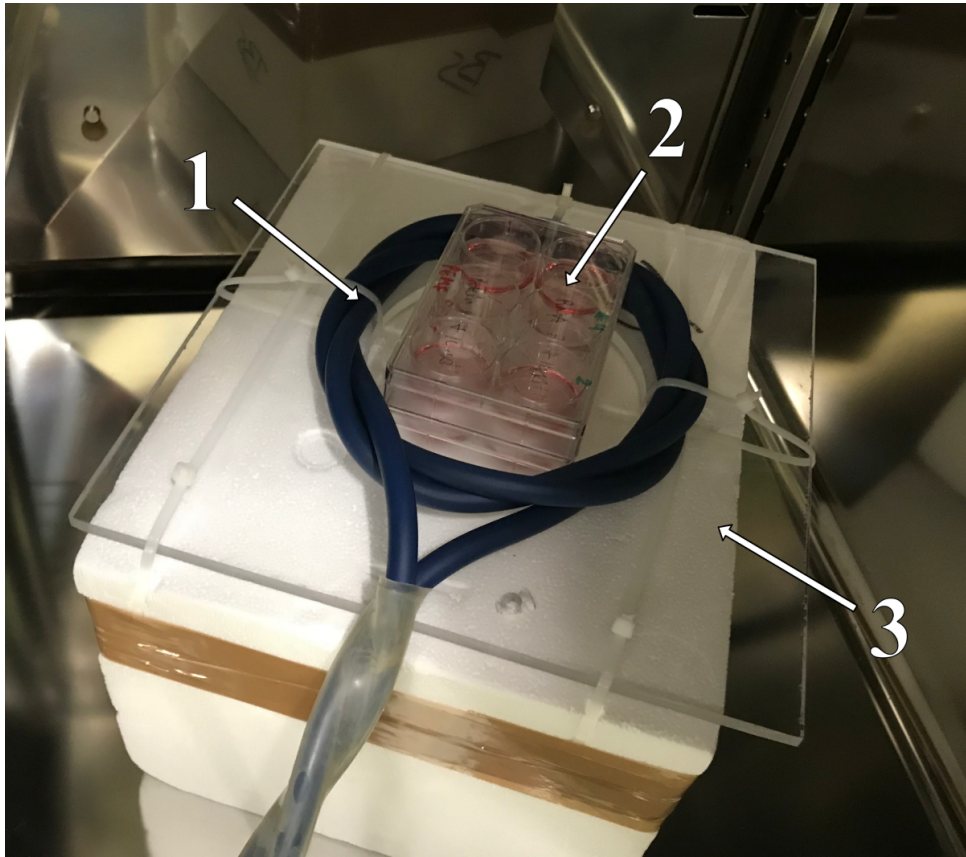


Abb. 7: Versuchsaufbau für die PEMF-Bestrahlung ab PEMF 3, Ansicht innerhalb des CO₂-Inkubators. 1: Spule des Omnitrons, 2: Zu bestrahlende Zellkulturbehälter (hier: zwei aufeinandergestellte 6-Wellplatten), 3: Styroporbox mit Plexiglasscheibe, welche mit Hilfe von Kabelbindern sowohl die Position der Spule im Inkubator als auch die Position der Zellkulturbehälter in der Spule konstant hält.

Anpassung für PEMF 5 und 6:

Um mehr RNA für den RNAseq Analysen zu gewinnen und gleichzeitig weniger Zellkulturmedium (mit rekombinantem Il-1 β versetzt) zu benötigen, wurden 8 Sehnenkonstrukte in einer Petrischale angesetzt und für die PEMF-Bestrahlung verwendet (siehe Abb. 8). Ein gleichmäßiger Abstand der Konstrukte zur Induktionsspule konnte so ebenfalls gewährleistet werden.



Abb. 8: Darstellung einer zellosten Petrischale in der Omnitron-Spule. In der Petrischale können 8 Sehnenkonstrukte gleichzeitig bestrahlt werden.

4.4.3 PEMF-Behandlungsablauf für RNAseq

Die Sehnenzellkonstrukte wurden wie beschrieben in Petrischalen generiert. Für die RNA-Analyse wurden insgesamt 5 ungepoolte und für Zellviabilitätsmessungen 2 ungepoolte Individuen (Ratten-Achillessehne, primäre Zellen, p2, ♂, 3 Monate) verwendet. Pro Individuum wurden 4 Petrischalen (1 x Behandlung ohne IL-1 β , 1 x Kontrolle ohne IL-1 β , 1 x Behandlung mit IL-1 β , 1 x Kontrolle mit IL-1 β) mit je 8 Sehnenkonstrukten (vgl. Abb. 8) hergestellt. Für die IL-1 β -Induktion wurde das Medium 25 Stunden vor PEMF-Behandlung von allen vier Petrischalen eines Individuums gewechselt. Die Überstände wurden einzeln in 25-ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt und bei -80 °C gelagert. Die proinflammatorischen Versuchsgruppen erhielten ein mit 10 ng/ml IL-1 β versetztes Medium (siehe 4.3.3). Nach 24 Stunden wurde ein erneuter Mediumwechsel von allen Petrischalen vollzogen. Der Überstand wurde wieder bei -80 °C gelagert.

Eine Stunde nach dem Mediumwechsel erfolgte die zweifach repetitive PEMF-Behandlung (für Behandlungsregime siehe Tab. 9). Im Anschluss an die letzte Ruhepause wurden die dritten Überstände aus allen Petrischalen gesammelt und bei -80 °C für spätere Analysen eingelagert. Für die Sehnenkonstrukte wurde bereits 1 ml TRIzol® in einem 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Alle 8 Sehnenkonstrukte einer Petrischale wurden mit einer sterilen Pinzette in die mit TRIzol gefüllten Zentrifugenröhrchen transferiert. Die befüllten Zentrifugenröhrchen wurden bei -80 °C gelagert, damit nach abgeschlossener PEMF-Behandlung aller Versuchsgruppen ein gleichzeitiges Aufarbeiten möglich war. Die RNA wurde wie beschrieben isoliert (siehe 4.5.2). Nach der RNA-Extraktion wurde je Versuchsgruppe und je Individuum 1 µg RNA zur externen RNAseq-Durchführung versandt. Ein Teil der restlichen RNA wurde für eine RNA-Integritätsprüfung mittels Experion (Lab-On-A-Chip System; BioRad) und für Kontroll-qPCR-Analysen verwendet.

4.5 Molekurlabiologische Methoden

4.5.1 Bestimmung der Zellviabilität

Die Bestimmung der Zellviabilität, bzw. metabolischen Aktivität wurde mittels MTS-, ATP-Test und anhand eines Live/Dead Assays durchgeführt.

MTS-Test:

Um die Beeinflussung der metabolischen Zellaktivität durch eine PEMF-Behandlung zu untersuchen, wurde ein MTS-Test (CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) angewandt und nach Gebrauchsanweisung des Herstellers vorgegangen. Bei dieser Testung wurden die Zellen mit dem gelben Tetrazoliumsalz MTS (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) behandelt. Dieses wird sowohl durch NADH und NADPH (abhängig von Enzymen des endoplasmatischen Retikulums) (Berridge and Tan, 1993) als auch durch Succinat (abhängig von der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase) reduziert. Hierdurch entsteht der violette Farbstoff Formazan. Die Menge des Formazanprodukts ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden, metabolisch aktiven Zellen und wird durch einen Mikroplattenreader (Tristar LB941, Berthold Technologies) bei einer Absorption von 492 nm gemessen. Für die Testung wurden primäre Ratten

TDSPCs (Passage 2) verwendet. Die PEMF-Behandlungsgruppe wurde 1 h mit einer Intensität von 100 % in einem Inkubator (ohne CO₂-Begasung, 37 °C) bestrahlt, während die Kontrollgruppe in einen separaten Inkubator (ohne CO₂-Begasung, 37 °C) für ebenfalls 1 h gestellt wurden.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit der Software Prism (GraphPad, CA, U.S.).

ATP-Test:

Bei einem ATP-Test wird Adenosintri-phosphat (ATP) quantitativ *in vitro* ermittelt. Die Quantifizierung des vorhandenen ATPs zeigt die direkt proportionale Anzahl von metabolisch aktiven und damit lebenden Zellen an (Crouch et al., 1993). Für den Test wurde der CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) verwendet und nach Gebrauchsanweisung des Herstellers vorgegangen. Das Prinzip dieses Assays ist es, dass Luciferin + ATP + O₂ in einer Oxidationsreaktion durch Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase in Anwesenheit von Mg²⁺ zu Oxyluciferin + AMP + PP_i + CO₂ + Licht umgesetzt wird, wobei die Lichtintensität linear abhängig zur ATP-Konzentration ist. Die Menge an durch ATP hervorgerufene Biolumineszenz wurde durch den Mikroplattenreader Tristar LB941 (Berthold Technologies) bestimmt. Es wurden die gleichen Zellen, das gleiche PEMF-Setup wie bei der MTS-Testung verwendet.

Live/Dead Assay:

Das LIVE/DEAD™ Cell Imaging Kit von Invitrogen™ diente zur weiteren Überprüfung der Zellviabilität. Hierbei wurde nach Gebrauchsanweisung des Herstellers vorgegangen. Der Assay basiert auf einem zellpermeablen Farbstoff (Komponente A, Calcein-AM) zur Färbung lebender Zellen und einem zellundurchlässigen Farbstoff (Komponente B, Propidiumiodid) zur Färbung von toten und sich in Apoptose befindenden Zellen, die durch geschädigte Zellmembranen charakterisiert sind. Lebende Zellen zeichnen sich durch das Vorhandensein einer intrazellulären Esterase-Aktivität aus, welche durch die enzymatische Umwandlung von Calcein-AM in Calcein bestimmt wird. Das Calcein erzeugt im Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 700, Carl Zeiss AG) eine intensive, gleichmäßige grüne Fluoreszenz (Ex/Em 488 nm/515 nm). Tote und sich in Apoptose befindenden Zellen erzeugen eine überwiegend rote Kernfluoreszenz (Ex/Em 570 nm/602 nm), welche durch die Bindung von Propidiumiodid an die DNA zustande kommt.

Der Live/Dead Assay wurde nach der PEMF-Behandlung im Setup PEMF 5 (siehe 4.4.3) durchgeführt. Zur Überprüfung der Funktionalität des Live/Dead Assays wurden als Positivkontrolle die Zellen kurz mit 70% Ethanol behandelt. Die Positivkontrolle wurde nach der Waschung mit D-PBS in 4 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur für 30 min fixiert.

4.5.2 RNA-Extraktion

Während der gesamten Extraktion wurde unter dem Laborabzug gearbeitet, da einige verwendete Substanzen flüchtig und gesundheitsschädlich sind.

Zunächst wurde das Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und der Kulturbehälter mit D-PBS bodenvoll aufgefüllt. Nach Absaugung des D-PBS wurde 1 ml gekühltes TRIzol® Reagenz der 6-Wellplatte oder der T25-Zellkulturflasche hinzugefügt. Durch stetiges Auf- und Abpipettieren des Milliliters wurden die Zellen vom Plastikboden gelöst, lysiert und als Suspension in ein steriles 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Sollte die RNA-Isolation zu einem späteren Zeitpunkt fortgesetzt werden, so konnten die Proben nun bei -80 °C gelagert werden. Für die Sehnenkonstrukte wurde 1 ml gekühltes TRIzol® in einem 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Nach dem Waschen mittels D-PBS wurden die Sehnenzellkonstrukte mit einer Pinzette in das Zentrifugenröhrchen überführt. Es konnten hierbei mehrere Konstrukte gleicher Versuchsgruppe zusammen in ein Zentrifugenröhrchen transferiert werden, um die RNA-Ausbeute zu erhöhen. Nun konnten die Proben bei -80 °C für mindestens einen Monat gelagert werden oder weiter aufarbeitet werden, indem der Milliliter stetig auf- und abpipettiert. Nach einigen Minuten brachte dieser Vorgang die Sehnenkonstrukte nahezu zur vollständigen Lyse. Die Behandlung mit TRIzol®, eine Phenol-Chloroform-Lösung, dient sowohl zur Lyse der Zellen als auch zur anschließenden Reinigung der Nukleinsäuren und Beseitigung von organischen Verunreinigungen (Proteine und Lipide). Anschließend wurde die Zelllösung für 5 min bei Raumtemperatur auf einen kreisförmig vibrierenden Plattformschüttler (Vortex) inkubiert. Es wurde pro ml verwendetem TRIzol® 100 µl 1-Brom-3-chlorpropan (BCP) dem 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen hinzugefügt, für 5 min bei Raumtemperatur erneut auf den Plattformschüttler gelegt und gelegentlich kräftig geschüttelt. Darauf folgte die erste Zentrifugation bei 12.000 x g und 4 °C für 15 min. Das Zentrifugieren trennte die Lösung in drei Phasen; eine trizol-farbene Phenol-, eine dünne, undurchsichtig weiße Protein- und in eine klare, wässrige

Phase. Die RNA lag in der wässrigen Phase gelöst vor. Anschließend wurde die klar-wässrige Phase abgehoben, in ein neues 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und das gleiche Volumen an Chloroform hinzugegeben. Nun wurde wie bei der zuvor beschriebenen BCP-Zugabe verfahren. Somit wurde auch nun wieder die wässrige Phase (s. Abb. 123) nach der zweiten Zentrifugation in ein neues 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen überführt.

Die nun folgenden Alkoholfällungen dienen zur Entfernung verbleibender Phenolreste aus der Lösung und einer Präzipitation der RNA. Es wurde das gleiche Volumen an 2-Propanol sowie 0,5 µl GlycoBlue™ zugegeben. Das im GlycoBlue™ vorhandene Glykogen erhöht die Ausbeute an RNA durch Co-Präzipitation und die beigegebene blaue Färbung dient der besseren Identifizierung von kleinen RNA Pellets.

Zunächst wurde das Gemisch durch Inversion gemischt, bevor es dann für 30 min bei -25 °C inkubiert wurde. Dieser Vorgang diente der RNA-Fällung. Der nächste Schritt war eine erneute Zentrifugation (14.000 x g, 4 °C, 30 min). Anschließend war die ausgefällte RNA als bläuliches Pellet im unteren Bereich des 1,5-ml-Zentrifugenröhrchens zu erkennen. Sobald die RNA ausgefällt war, war eine Lagerung bei -25 °C möglich. Für die folgenden Schritte wurden Filterspitzen verwendet, um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden. Nun wurde der Überstand weitestgehend abgehoben. Die Probe wurde kurz erneut zentrifugiert, damit der restliche Überstand entfernt und mit gekühltem 1 ml eines 75-prozentigem Ethanol zum Waschen aufgefüllt werden konnte. Das 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen wurde gevortext, bei 7.500 x g, 4 °C, 10 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Selbiges wurde mit 100-prozentigem Ethanol wiederholt. Der Überstand wurde erneut vorsichtig abgehoben, die Probe zentrifugiert und der restliche Überstand erneut abgehoben. Das RNA-Pellet wurde luftgetrocknet bis es begann, transparent zu werden.

Das Pellet wurde dann in 15 µl RNA-Storage-Lösung (1 mM Natriumcitrat pH 6,4, Ambion) oder RNase-freiem Wasser vollständig resuspendiert. Abschließend wurde 0,5 µl 40 U/µl RNase-Inhibitor hinzugefügt.

Nun konnte die Bestimmung der Menge sowie Reinheit der RNA, eine RNA-Integritätsprüfung oder die Lagerung der RNA-Lösung bei -80 °C bis zu einem Jahr erfolgen.

4.5.3 Bestimmung von Menge und Reinheit der RNA

Mengen- und Reinheitsbestimmung der RNA wurden mittels dem NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer durchgeführt.

Ein μl RNA-Storage-Lösung diene hierbei als Blindwert um das Gerät zu kalibrieren. Ein μl der RNA-Probe wurde anschließend durch die Software über eine modifizierte Beer-Lambert-Gleichung unter der Angabe in $\text{ng}/\mu\text{l}$ quantifiziert. Des Weiteren wurden durch Messung der optischen Dichte bei 230, 260 und 280 nm folgende Quotienten vom Computerprogramm berechnet:

- 260/280: Der Richtwert für reine RNA beim primären Reinheitsparameter liegt bei $\sim 1,8$ (reine DNA: $\sim 2,0$). Bei niedrigeren Werten kann auf eine Verunreinigung durch beispielsweise Phenol aus dem TRIzol® oder Proteine, beispielsweise durch versehentliches Pipettieren der Inter- oder organischen Phase nach der TRIzol®-Zugabe und Zentrifugation, geschlossen werden.
- 260/230: Der Sollwert für reine RNA beim sekundären Reinheitsparameter liegt idealerweise im Bereich 1,8 – 2,2. Alle niedrigeren Werte könnten wiederum auf eine Verunreinigung hindeuten.

4.5.4 Bestimmung der RNA-Integrität

Mittels dem Experion™ RNA StdSens Analysis Kit (Bio-Rad) wird die Intaktheit der mRNA überprüft. Es wurde wie in der Gebrauchsanweisung beschrieben vorgegangen. Die RNA-Integrität wurde mittels RNA-Analyse-Chip (Experion™ StdSens Chip) ermittelt und nur Proben mit einem RQI (RNA Quality Indicator) von über 7,5 wurden für weitere Analysen herangezogen.

4.5.5 Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

Um sich der Methode der qPCR zu bedienen, muss zunächst die einzelsträngige, instabile mRNA in eine wesentlich stabilere, doppelsträngige cDNA umgeschrieben werden.

Die Synthese der cDNA erfolgt nach dem Prinzip der PCR und wird auch Reverse Transkription PCR, kurz RT-PCR, genannt. Die RNA beziehungsweise in der Regel mRNA wird hierbei als Template eingesetzt. Die RNA wird mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert. Die Qualität und Reinheit des RNA-Templates ist entscheidend für den Erfolg der RT-PCR. Die cDNA ist zunächst mit der mRNA hybridisiert. Der RNA-Anteil wird durch den RNase-H-Anteil der Reversen Transkriptase abgebaut. Nun wird die einzelsträngige Form der cDNA

durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität der Reversen Transkriptase zu einer zweisträngigen vervollständigt.

Für die cDNA-Synthese wurde das iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) verwendet. Hierbei ist zu beachten, dass immer gleiche Mengen an RNA eingesetzt werden, um eine Vergleichbarkeit der darauffolgenden einzelnen Expressionsmuster zu gewährleisten. Wie zuvor beschrieben (siehe 4.5.3), wurden die RNA-Konzentrationen zuvor mit Hilfe des NanoDrop™ 2000c Spectrophotometers ermittelt. Von der ermittelten RNA-Konzentration ausgehend, wurde jenes Volumen berechnet, welches 1 µg RNA enthielt. Somit wurde das entsprechende Volumen der resuspendierten RNA in ein kleines PCR-Zentrifugenröhrchen überführt und 4 µl 5x iScript™ Reverse Transcription Supermix hinzugefügt. Mit nukleasefreiem Wasser wurde auf 20 µl aufgefüllt. Darauffolgend wurden die PCR-Zentrifugenröhrchen gevortext und abzentrifugiert ehe sie nun in den T100™ Thermal Cycler überführt wurden, in welchem drei Temperaturstufen durchlaufen wurden (25 °C für 5 min, 42 °C für 45 min und 85 °C für 5 min).

1 µg RNA wird mittels des Kits in einem Arbeitsschritt zu cDNA umgeschrieben, welche abschließend mit nukleasefreiem Wasser auf eine Konzentration von 5 ng/µl verdünnt wurde. Die cDNA wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.5.6 Quantitative Echtzeit-PCR – RT-qPCR

Die quantitative Echtzeit-PCR, auch kurz qPCR genannt, dient der Genexpressionsanalyse von Zellen. Aufgrund des Enzymes DNA-Polymerase können DNA-Gensequenzen selektiv amplifiziert werden. Die Amplifikate können anschließend quantitativ bestimmt werden.

Um eine Normierung der zu untersuchenden DNA-Gensequenzen zu erhalten, werden Referenzgene, sogenannte „Endogenous Controls“, benötigt. Die Referenzgene sind häufig für die Aufrechterhaltung grundlegender Zellfunktionen notwendig und werden sowohl unter normalen als auch pathophysiologischen Bedingungen in gleicher Menge in allen Zellen eines Organismus exprimiert.

Für die qPCR wurde zunächst die Konzentration der benötigten Menge an cDNA von 5 ng/µl auf 2,5 ng/µl mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Nun wurden die 2 µl cDNA-Probe (entspricht 5 ng cDNA) in eine 96-Wellplatte gegeben. Für jedes Gen, welches es zu untersuchen galt, wurde ein Mastermix hergestellt. Dieser bestand aus 7,5 µl Luna® Universal Probe qPCR Master Mix, 0,75 µl des jeweiligen PrimeTime qPCR

Assays und 4,75 µl RNase freies Wasser. Nach dem Vortexen des hergestellten Mastermixes wurden 13 µl zu je 2 µl der bereits pipettierten cDNA in die 96-Wellplatte gegeben. Nach erfolgtem Pipettieren wurde die 96-Wellplatte mit einer luftdichten Folie verschlossen und abzentrifugiert. Anschließend wurde die 96-Wellplatte in den C1000 Touch™ Thermal Cycler gestellt. Die Amplifikationsbedingungen waren wie folgt: 50 °C für 2 min, 95 °C für 10 min, 40 Zyklen 95 °C für 15 sec und abschließend 60 °C für 1 min. Die Einstellungen des Thermal Cyclers, der Verlauf der Amplifikationen sowie die Erstellung der anschließenden Export-Dateien wurden mit der Software CFX Manager™ Software 3.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) am PC vollzogen. Die exportierten Dateien mit den Ergebnissen wurden mit dem Programm qbasePLUS (Biogazelle) ausgewertet. Die abschließende graphische Darstellung erfolgte mit Prism (Graph-Pad).

Tab. 10: Beschreibung der verwendeten Genexpressionsmarker (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/) unter Angabe der zugehörigen Accession Number.

Gen	Accession Nr.	Beschreibung
<i>Endogenous Controls</i>		
B2M	NM_012512(1)	Das β2 Microglobulin (B2M) ist eine Komponente der MHC-Klasse-I-Moleküle.
EIF2B1	NM_172029(1)	Das EIF2B1-Gen kodiert die Alpha-Untereinheit des Initiationsfaktors eIF-2B. Initiationsfaktoren leiten die Translation der mRNA ein.
HPRT1	NM_012583(1)	Mithilfe der Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) und der APRT können Purinbasen durch einen Phosphoribosylrest wieder zum Nucleotid aufgebaut werden. Mutationen führen zur Hyperurikämie und können ein Lesch-Nyhan-Syndrom ausbilden.
POLR2A	XM_001079162 (4)	Das POLR2A-Gen kodiert das Protein DNA-directed polymerase II subunit RPB1 (RPB1), welches die größte Untergruppe der RNA Polymerase II darstellt.

PUM1	NM_001108684(1)	Das PUM1-Gen kodiert das Protein Pumilio homolog 1 (PUM1). Das Protein könnte an der translationalen Regulation der Embryogenese, Zellentwicklung und -differenzierung beteiligt sein.
RPLP0	NM_022402(1)	RPLP0 kodiert das Protein 60S acidic ribosomal protein P0, welches ein Teil der 60S-Untereinheit in Ribosomen darstellt.
TBP	NM_001004198(1)	Das Protein TATA-binding protein (TBP) ist eine Untereinheit des allgemeinen Transkriptionsfaktors Transcription Factor II D (TFIID), der spezifisch an die TATA-Box-Sequenz der DNA bindet. TFIID ist das erste Protein, welches an die DNA während der Bildung des präinitialen Komplexes der RNA Polymerase II bindet.
YWHAZ	NM_013011(1)	Das YWHAZ-Gen kodiert das Protein 14-3-3 protein zeta/delta (14-3-3ζ), welches ein zentrales Protein für viele Signaltransduktion-Pathways darstellt. 14-3-3ζ spielt eine wichtige Rolle in der Apoptose und in einer Reihe von Tumoren und neurodegenerativen Erkrankungen.

Sehnenassoziierte Gene

COL1A1	NM_053304(1)	COL1A1 kodiert das Protein Alpha-1-Typ-I-Kollagen, welches die wichtigste Komponente des fibrillären Kollagens Typ I darstellt. Das fibrilläre Kollagen Typ I ist ein wichtiger Bestandteil der Extrazellulärmatrix. Es wird von verschiedenen Zelltypen im Bindegewebe und in Haut, Sehnen, Faszien, Knochen, Knorpel, Gefäßen, inneren Organen, Sclera und Dentin expremiert. Eine Mutation im COL1A1 kann zu den Krankheitsbild Osteogenesis imperfecta oder dem Ehlers-Danlos-Syndrom führen.
COL3A1	NM_032085(1)	COL3A1 kodiert das Strukturprotein Alpha-1-Typ-III-Kollagen. Das fibrilläre Kollagen Typ III ist ebenfalls wie Typ I eine Hauptkomponente der extrazellulären Matrix in der

		Haut, Lunge, Darm und des Gefäßsystems. Eine Mutation des COL3A1-Gens kann zu einem Ehlers-Danlos-Syndrom vom vaskulären Typ führen.
CTGF	NM_022266(1)	Das CTGF-Gen kodiert den Connective tissue growth factor (CTGF oder CCN2). Das extrazelluläre Matrixprotein CTGF spielt eine wichtige Rolle bei vielen biologischen Prozessen, einschließlich Zelladhäsion, Migration, Proliferation, Angiogenese, Skelettentwicklung und Gewebewundheilung. Zudem ist es maßgeblich an fibrotischen Erkrankungen und verschiedenen Krebsarten beteiligt.
MKX	XM_001063892(2)	Das MKX-Gen kodiert das Protein Homeobox protein Mohawk (MKX) bzw. iroquois homeobox protein-like 1. MKX spielt womöglich eine Rolle in der Zelladhäsion. Ebenso zeigten Studien an Mäusen, dass MKX eine wesentliche Funktion in der Sehnenentwicklung einnimmt.
SCX	NM_001130508(1)	Das SCX-Gen (Scleraxis) kodiert einen Transkriptionsfaktor, welcher in der Bildung des Mesoderms und der Herzklappen beteiligt ist. Das kodierte Protein wird während der embryologischen Entwicklung von Sehnen und Bändern exprimiert. Ebenso reguliert es die Kollagen Typ I Expression in Herz- und Myofibroblasten. Nach einem Herzinfarkt wird es vermehrt im Narbengebiet exprimiert und könnte eine Rolle im myokardialen Remodeling spielen.
TNMD	NM_022290(1)	Das TNMD-Gen kodiert für das Protein Tenomodulin, welches für die Sehnenreifung von Bedeutung ist. Es wird in Sehnen stark exprimiert und gilt als Markergen für Zelllinien der Sehnen und Ligamente.

Entzündungsassoziierte Gene

TGFB1	NM_021578(1)	TGFB1 kodiert das Protein Transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1). Zahlreiche Zellen synthetisieren TGF- β 1 und besitzen spezifische TGF- β -Rezeptoren. Das sekretierte TGF- β 1 ist ein Zytokin, welches beim Zellwachstum, -proliferation, -differenzierung beteiligt ist. Dysregulation in der TGF- β 1-Aktivierung kann zur Apoptose führen.
IL1 β	NM_031512(1)	IL1 β kodiert das Zytokin Interleukin-1 β , welches zu den Entzündungsmediatoren gezählt wird. Es wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und Blut-Monozyten produziert und ist neben der Antwort auf Fremdeinflüssen wie Lipopolysaccharide auch bei Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose beteiligt. Im ZNS kann Interleukin-1 β das Enzym Cyclooxygenase-2 (PTGS2/COX2) induzieren und trägt damit zur entzündlichen Schmerzüberempfindlichkeit bei.
IL6	NM_012589(1)	Das IL6-Gen kodiert das Protein Interleukin 6 (IL-6), welches sowohl als Zytokin als auch als Myokin agieren kann. Als proinflammatorisches Zytokin ist es ein wichtiger Mediator für Fieber und der Akute-Phase-Reaktion. Makrophagen sezernieren IL-6 als Antwort auf PAMPs (Pathogen-assoziierte molekulare Muster). Als antiinflammatorisches Myokin wird IL-6 von Muskeln im Rahmen einer körperlichen Betätigung produziert. Hierbei werden die proinflammatorischen Effekte von TNF-Alpha und IL-1 inhibiert und die antiinflammatorischen Effekte von IL-1ra sowie IL-10 aktiviert.

Verifizierte Gene nach der RNAseq-Auswertung

ALDH1A3	NM_153300(1)	ALDH1A3 kodiert das Enzym Aldehyddehydrogenase 1A3, welches Retinal als Substrat verwendet. Informationen in Bezug auf Sehnen oder Entzündungen sind bis-
---------	--------------	---

		her nicht beschrieben. Mutationen in diesem Gen wurden mit Mikrophthalmie in Verbindung gebracht und Expressionsänderungen wurden auch in Tumorzellen nachgewiesen.
CD109	XM_003750546 (6)	CD109 kodiert für ein Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-gebundenes Glykoprotein, das auf der Oberfläche von Thrombozyten, aktivierten T-Zellen und Endothelzellen lokalisiert ist. Das Protein bindet an die Signaltransduktion und reguliert sie negativ, indem es TGF- β transformiert.
COL1A2	NM_053356(1)	COL1A2 kodiert das Protein Alpha-2-Typ-I-Kollagen, eine Komponente des Kollagens vom Typ I. Kollagen Typ I besitzt eine Tripelhelix, welche aus zwei Pro- α 1(I)-Polypeptidketten (kodiert durch COL1A1) und einer Pro- α 2(I)-Kette (kodiert durch COL1A2) gebildet wird. Eine Mutation des COL1A2 führt daher zu ähnlichen Krankheitsbildern wie bei COL1A2; Osteogenesis imperfecta, Ehlers-Danlos-Syndrom, Idiopathische juvenile Osteoporose, Marfan-Syndrom.
IL10	NM_012854(1)	Das von diesem Gen kodierte Protein ist ein Zytokin, das hauptsächlich von Monozyten und in geringerem Maße von Th2-Lymphozyten sezerniert wird. IL10 hat pleiotropische Wirkungen bei der Immunregulation und Entzündung. Es stellt gemeinsam mit TGF- β die wichtigsten antiinflammatorischen Zytokine dar. Es reguliert die Expression von Th1-Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen auf Makrophagen. Es verbessert auch das Überleben, die Proliferation und die Antikörperproduktion der B-Zellen. IL10 kann ferner die NF- κ B-Aktivität blockieren und ist in der Regulation des JAK-STAT-Signalweges einbezogen. Gen-Mutationen sind mit einer erhöhten Anfälligkeit für HIV-1-Infektionen und rheumatoider Arthritis verbunden.

IL1R2	XM_006712736 (3)	Das von diesem Gen kodierte Protein ist ein Interleukin-1-Rezeptor, welcher die Interleukine 1 α und 1 β , sowie den Interleukin-1-Rezeptor vom Typ I (IL1R1/IL1RA), und fungiert als "Lockrezeptor" (engl. "Decoy Receptor"), der die Aktivität seiner Liganden hemmt. Interleukin 4 induziert die Expression und Freisetzung dieses Zytokins um Interleukin 1 zu antagonisieren.
LEP-REL1	NM_153300(1)	LEPREL1 oder auch P3H3 kodiert das Enzym Prolyl-3-Hydroxylase Leprecan Like 1, ein Mitglied der Unterfamilie der Prolyl-3-Hydroxylase von 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen. Dieses Enzym spielt eine entscheidende Rolle beim Aufbau, der Stabilität und der Vernetzung der Kollagenketten durch die Hydroxylierung von Prolin zu 3-Hydroxyprolin. Ein Knockout des Genes führt zu strukturellen Kollagen-Anomalien, welche in verschiedenen Gewebetypen des Auges beobachtet wurden. Bisher gibt es keine sehensspezifischen Untersuchungen.
MMP11	NM_012980(1)	Matrix-Metalloproteinasen (MMP) sind am Abbau der extrazellulären Matrix bei normalen physiologischen Prozessen wie Embryonalentwicklung, Fortpflanzung und Gewebeumbau sowie bei Krankheitsprozessen wie Arthritis und Metastasierung beteiligt. In Tendinopathien sind viele MMPs hochreguliert. Im Gegensatz zu anderen MMPs spaltet MMP11 das Enzym α 1-Antitrypsin, baut aber Strukturproteine der extrazellulären Matrix schwach ab.

4.5.7 RNA-Seq und Datenanalyse

Die RNA-Seq (auch WTSS, „Whole Transcriptome Shotgun Sequencing“) basiert auf der Next-Generation-Sequencing-Methode und dient zur Bestimmung der Anwesenheit, Quantität und Nukleotidabfolge der RNA (Wang et al., 2009). Durch die RNA-Seq kann das globale, zelluläre Transkriptom analysiert und quantifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die RNA-Seq-Methode zur Genexpressionsanalyse nach

Erstellung eines PEMF-Behandlungsregimes für Sehnenkonstrukte einmalig durchgeführt.

Das Setup und die PEMF-Behandlungseinstellungen entsprachen dem Schema der finalen „PEMF 5“. Nach der PEMF-Behandlung und der RNA-Isolation wurde im Anschluss für jede der vier Versuchsgruppen 1 µg RNA zur externen Durchführung (Exiqon (Qiagen), Hilden, Deutschland) der RNA-Sequenzierung (mRNA-Sequenzierung, 50bp, 30M Single-End-Reads pro Probe) verschickt. Die Analyse wurde auf Basis von 3 Individuen durchgeführt. Eine differentielle Expression der Gene sowie die Ermittlung von Gene Ontology (GO) Terms wurden mit FunRich (Pathan et al., 2015) durchgeführt (<http://www.funrich.org/>; v 3.1.3; GO-Datenbank Norway Rat, ID:10116). Genexpressionsveränderungen mit einem korrigierten p-Wert von weniger als 0,05 wurden für die weitere Analyse verwendet. Die p-Werte wurden mithilfe der False Discovery Rate (FDR) nach der Benjamini-Hochberg-Methode korrigiert. Die FDR wurde auf < 0,5 gesetzt. Anschließend wurden die Kandidatengene durch quantitative RT-PCR verifiziert. Hierfür wurde in der Regel die Mittelwerte von drei als stabil-exprimiert identifizierten Referenzgenen für die Normalisierung verwendet.

4.6 Fixieren, Einbetten und Schneiden von Gewebeproben

Die Sehnenkonstrukte wurden in D-PBS gewaschen und in 4 % Paraformaldehyd für 60 min bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wurden die Konstrukte zweimal für 15 min in D-PBS erneut gewaschen und anschließend in Sucrose abgesenkt. Es folgte eine Inkubation für 12 Stunden in 15 % und anschließend weitere 12 Stunden in 30% Sucrose bei 4°C. Anschliessend erfolgte über Nacht eine Inkubation in 30% Sucrose / Surgipath® FSC22® Einbettmittel (Mischungsverhältnis 1:1) und schließlich wurden die Konstrukte in Surgipath® FSC22® Einbettmittel auf Trockeneis eingebettet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Das Schneiden der Sehnenkonstruktproben (10- und 20-µm-Schnitte) wurden mit einem Kryostatmikrotom CM1950 durchgeführt.

4.7 TUNEL-Färbung und Caspase3/7 Apoptose-Assay

Zur Bestimmung der Apoptoserate nach der PEMF-Behandlung mit/ohne IL-1β wurden die Sehnenkonstrukte mit dem *In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein gefärbt. Hierbei wurde nach Gebrauchsanweisung des Herstellers vorgegangen. Bei der sogenannten TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) werden

freiliegende Zellkerne bzw. fragmentierte DNA von apoptotischen und sich in Apoptose befindlichen Zellen gefärbt und detektiert. Die Quantifizierung der TUNEL-Färbung wurde mit der Software ImageJ (Version 150a) durchgeführt (Tempfer et al., 2018).

Um darüber hinaus die Apoptose-Rate zu bestimmen, wurde die Caspase3/7-Aktivität aus den Proteinlysaten der Sehnenkonstrukte mittels einem Caspase-Glo® 3/7 Assay gemessen.

4.8 Quantifizierung der Kern-Ausrichtung, Zellorientierung, Kollagen-dichte

Die Polarisationsmikroskopie wurde zur Bestimmung der Orientierung und Dichte der Typ-I-Kollagenfasern verwendet. Zur Anfertigung der polarisationsmikroskopischen Aufnahmen wurde ein Axioplan-Mikroskop verwendet, welches mit einem 10x- oder 16x-Objektiv und aufliegendem Polarisationsfilter ausgestattet gewesen ist. Die Aufnahmen wurden an ungefärbten Sehnenkonstrukt-Schnitten durchgeführt. Die Doppelbrechungsintensität wurde durch Quantifizierung der durchschnittlichen Pixelintensität mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (Version 150a) bestimmt (Tempfer et al., 2018).

Die Zellorientierung wurde durch Berechnung der Kern-Ausrichtung (Werte um 1 entsprechen einem runden Kern, Werte gegen 0.1 entsprechen einem ovalen, flachem Kern) (Hsieh et al., 2016) und der Winkelabweichung der Spannungsfaserorientierung bestimmt. Hierfür wurden die Präparate mit Rhodamin-Phalloidin angefärbt.

4.9 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurde GraphPad Prism (Version 5.04) verwendet. Die Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) unter Anwendung des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests wurde verwendet, um Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen zu testen. Die Pairwise Comparison der RNAseq-Verifizierung mittels qPCR wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

5 ERGEBNISSE

5.1 Bestimmung der Zellviabilität

Zunächst bestimmten wir die Zellviabilität, um in einen ersten Schritt Erkenntnis darüber zu erlangen, ob die Zellen die Behandlung mittels PEMF in vitro vertragen.

Die Testung der metabolischen Aktivität, welche im Rahmen der Vorversuche durchgeführt wurde, ergab sowohl in Bezug auf den zellulären ATP-Gehalt (Abb. 9) als auch in der MTS-Testung (Abb. 10) ein ähnliches Resultat. Die PEMF-Exposition hatte keinen negativen Einfluss auf die metabolische Aktivität oder ATP-Produktion der eingebetteten TDSPCs in 2D-Zellkulturebene. Die einstündige Behandlung mit PEMF bei voller Intensität zeigte keine signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität.

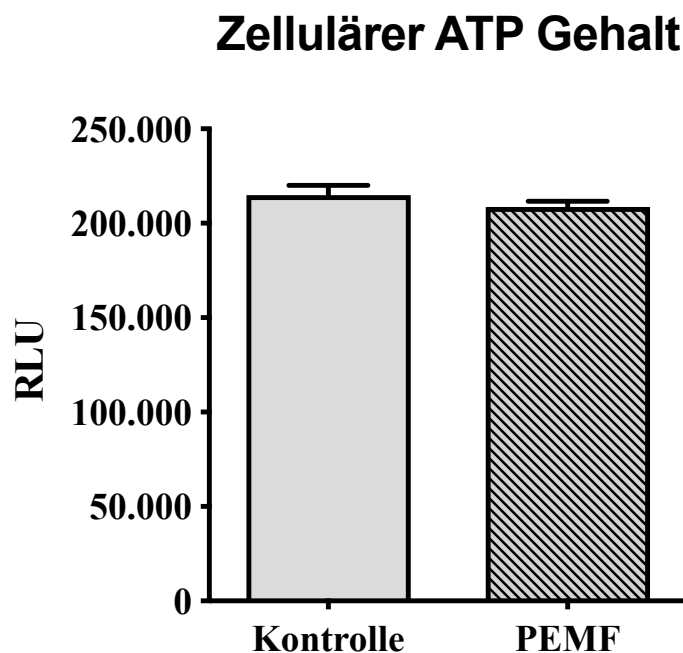


Abb. 9: Zellulärer ATP Gehalt von nativen (Kontrolle) und PEMF-behandelten (1 h, Intensität 100 %) Ratten TDSPCs (Passage 2). Die ATP Biolumineszenz wurde in RLU (Relative Light Units) gemessen.

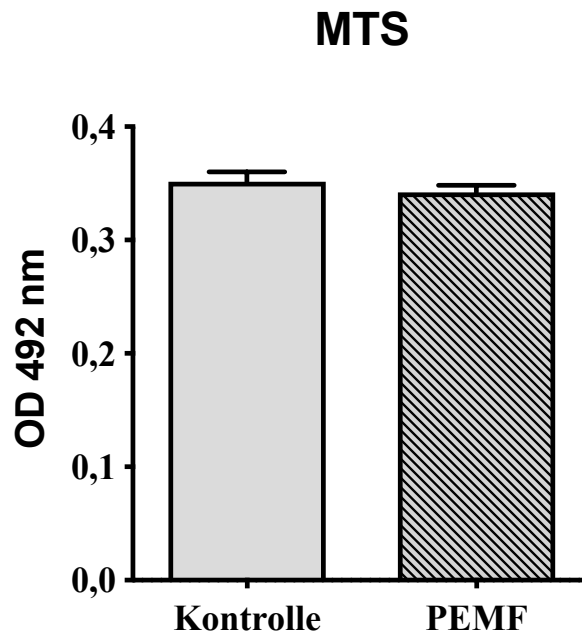


Abb. 10: MTS-Test von nativen (Kontrolle, n=6) und PEMF-behandelten (1 h, Intensität 100 %, n=6) Ratten TDSPCs (Passage 2). Die Extinktion wurde bei 492 nm gemessen.

Die Ergebnisse auf 2D-Zellkulturebene konnten in einem durchgeführten Live/Dead Assay auf 3D-Zellkulturebene bestätigt werden. Hier zeigte sich eine hohe Vitalität der Zellen in allen Versuchsgruppen. Es war kein Unterschied zwischen den PEMF- und IL1 β -behandelten Zellen im Vergleich zu den nativen Zellen (Versuchsgruppe -PEMF -IL1 β) zu erkennen (siehe Abb. 11). Weder die Stimulation mit IL-1 β noch die Exposition gegenüber PEMF haben die Viabilität der Sehnenkonstrukte signifikant vermindert. Zusammengefasst haben PEMF und IL-1 β die Behandlung der 3D-Konstrukte keinen signifikanten zytotoxischen Effekt hervorgerufen.

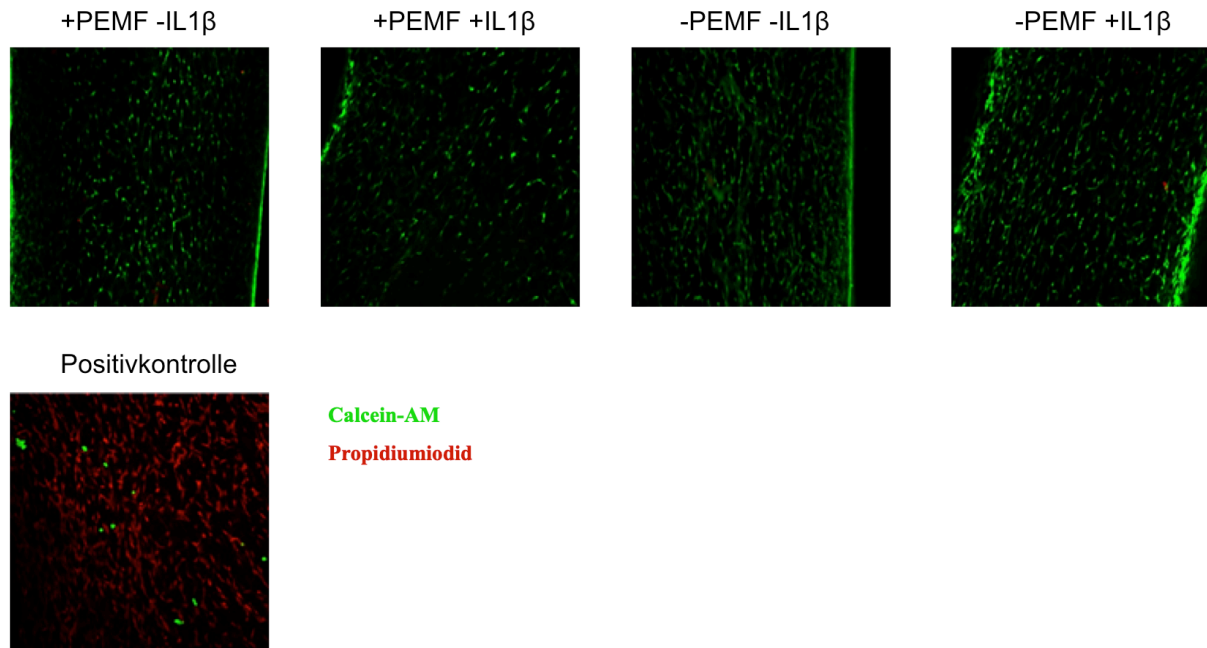


Abb. 11: Repräsentative Live/Dead-Assays von allen vier Versuchsgruppen sowie einer Positivkontrolle im Anschluss von PEMF 5.

5.2 Optimierung der Behandlungsparameter für die RNAseq

Um sowohl einen geeigneten Versuchsaufbau als auch ein optimales PEMF-Behandlungsregime für einen finalen RNAseq-Durchgang zu erstellen, wurde über diverse Zwischenschritte gearbeitet. Jeder nachfolgende Schritt inkludierte die Optimierung des vorherigen Schrittes. Somit hatten die Zwischenritte PEMF 1 bis 5 inklusive 1.1 bis 1.3 unterschiedliche Behandlungseinstellungen (siehe Tab. 9). Pro Zwischenschritt wurden gezielt ein bis zwei Behandlungseinstellungen ermittelt. Die optimierten Behandlungseinstellungen wurden im Anschluss für die nachfolgenden PEMF-Behandlungen beibehalten. Die optimierten Behandlungsparametern wurden mittels qPCR von ausgewählten Zielgenen ermittelt.

Die nachfolgend gezeigten Genexpressionsanalysen veranschaulichen die Entscheidungsfindung für das jeweils nächste PEMF-Setup.

PEMF 1.1:

PEMF 1.1 – 1.3 hatten die Ermittlung einer optimalen Ruhepause „RP“ gemein (Tab. 9). Nachfolgend sind die Ergebnisse als relative Genexpression dargestellt. Hierzu wurden die Referenzgene eines jeden Experimentes durch einen Mittelwert normalisiert. Die Genexpression der zu untersuchenden Gene sind in Relation zum jeweiligen Mittelwert der Referenzgene dargestellt.

Die relative Genexpression in der Abb. 12 zeigte eine erhöhte Expression der Gene COL1A1, COL3A1, CTGF, MKX, TGFB1, TNMD bei einer RP von 30 min, bei einer RP von 3 h eine Repression jener Gene. Im Gegensatz dazu stand die Genexpression B, bei der trotz gleichen Versuchablaufs alle genannten Genregulierungen aus A entgegengesetzt waren bzw. keinen Effekt aufwiesen. Zudem zeigte sich bei der Genexpression B bei einer RP von 8 h keine einzige Hochregulierung der Gene und auch keinen messbaren Effekt auf die Entzündungsmarker IL6 und TGFB1.

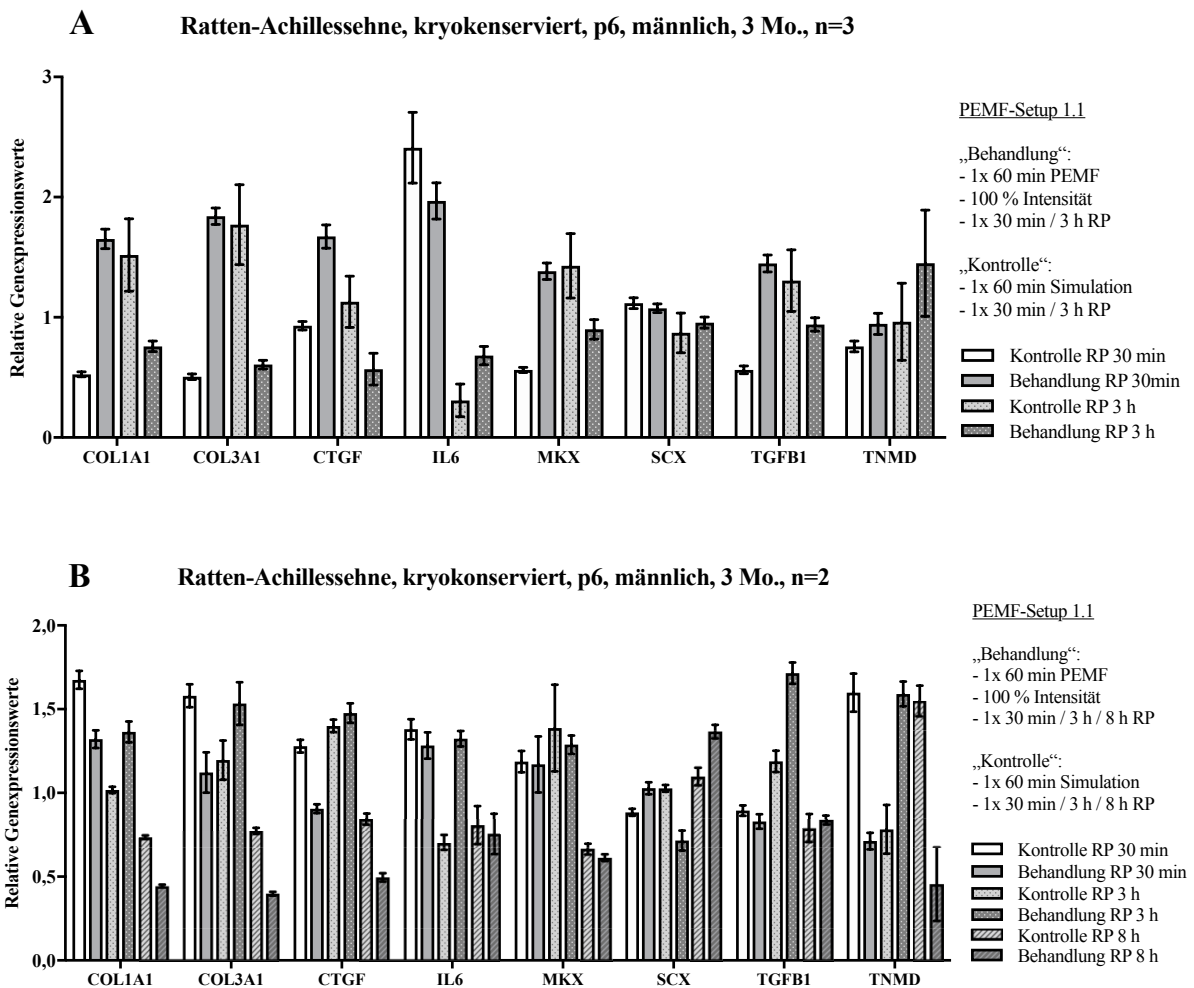


Abb. 12: PEMF 1.1: Genexpression von kryokonservierten TDSPCs aus der Achillessehne von Ratten. Die Zellen wurden 1 h bei 100 % Intensität mit unterschiedlichen Ruhepausen „RP“ einmalig mit dem Omnitron Pro behandelt. Es wurden sowohl sehnenpezifische Gene (COL1A1, COL3A1, CTGF, MKX, Scx, TNMD) als auch Entzündungsmarker (IL6, TGFB1) untersucht. Als Referenzgene wurden RPLP0, TBP und HPRT1 verwendet.

PEMF 1.2:

Basierend auf den Daten aus PEMF 1.1, reduzierten wir die Ruhepause auf 90 min, zudem verglichen wir Zellen isoliert aus der Flexor- und Achillessehne. Das Genexpressionsprofil (Abb. 13A) der Zellen der Flexorsehne zeigte eine PEMF-induzierte

Hochregulierung aller Gene bei einer RP von 30 min, bei einer RP von 3 h jedoch eine deutliche Herunterregulierung. Im Vergleich dazu zeigen Zellen der Achillessehne ein anderes Genexpressionsprofil: PEMF hat keinen Effekt auf die Expression von COL1A1 und COL3A1 bei einer RP von 30 min, bewirkt jedoch eine Herunterregulierung von CTGF und TGFB1. Nach einer RP von 90 min resultierte die PEMF-Behandlung in einem Anstieg der Expression aller Gene, indikativ für eine Stimulation der Kollagenproduktion.

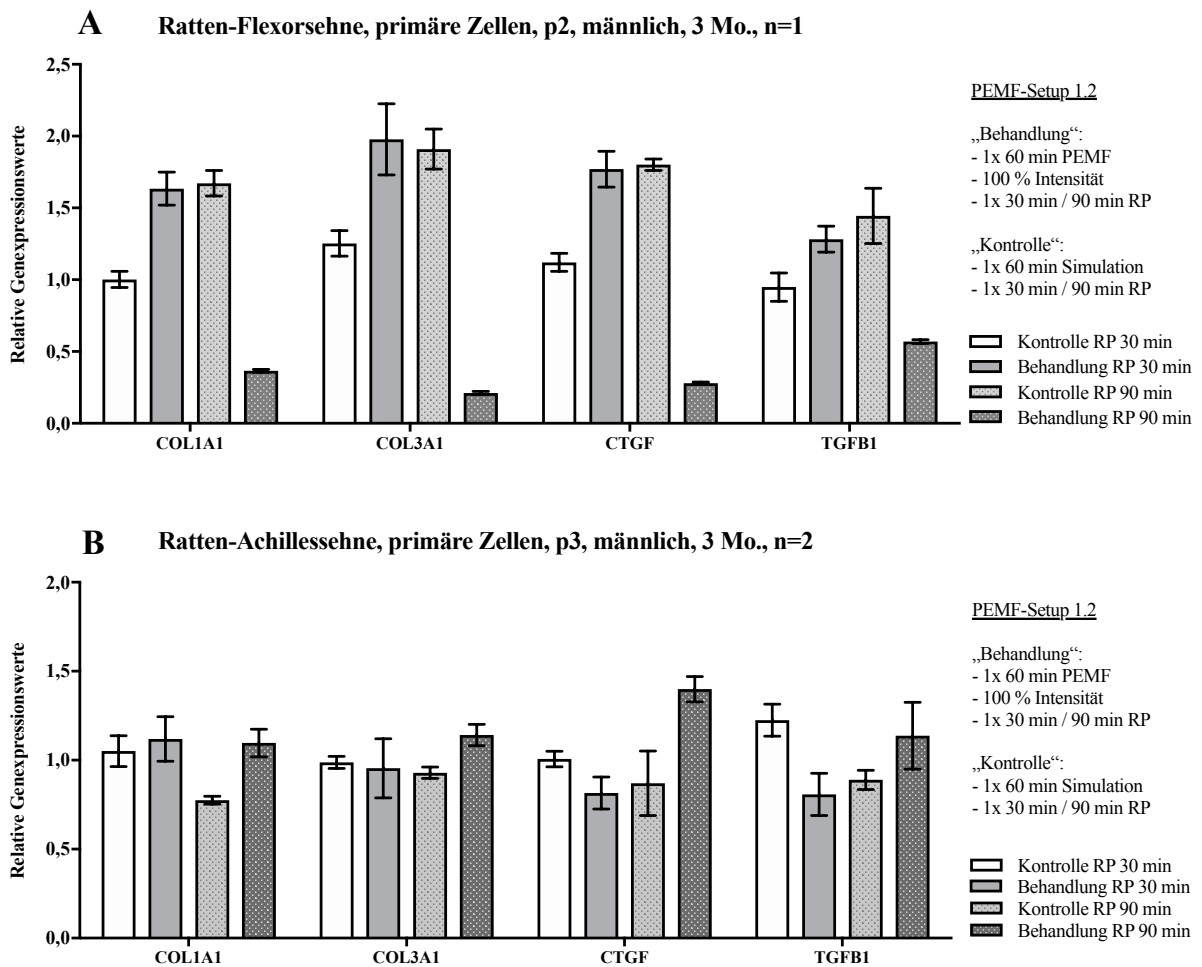


Abb. 13: PEMF 1.2: Genexpression von primären TDSPCs aus der Flexor- und Achillessehne. Die Zellen wurden 1 h bei 100 % Intensität mit unterschiedlichen Ruhepausen „RP“ einmalig mit dem PEMF-Gerät bestrahlt. Es wurden die sehnen-spezifischen Gene COL1A1, COL3A1, CTGF und der Entzündungsmarker TGFB1 untersucht. Als Referenzgene dienten RPLP0, TBP und HPRT1.

PEMF 1.3:

Nachdem wir aus den Daten aus der Serie PEMF 1.2 geschlossen hatten, primäre TDSPCs aus der Achillessehne zu verwenden, untersuchten wir, ob die Anzahl der Zellkulturpassagen einen Einfluss hat und verglichen Zellen der Passage 2 (Abb. 14A)

mit denen aus Passage 3. PEMF bewirkte eine Hochregulierung aller Gene bei allen Behandlungsgruppen im Verhältnis zur jeweiligen Kontrollgruppe, ausgenommen TGFB1 bei einer RP von 3 h (Abb. 14A). Besonders bei einer RP von 90 min fällt eine verstärkte Hochregulierung auf (COL1A1: 4,99-fach, COL3A1: 5,86-fach, CTGF: 6,89-fach, TGFB1: 3,92-fach). Auffällig ist die Veränderung der Genexpression in der Kontrolle nach 3 h. TDSPCs in Passage 3 zeigen nach PEMF-Behandlung eine Hochregulierung aller Gene bei allen Behandlungsgruppen verglichen zu den jeweiligen Kontrollgruppen bereits nach 30 min, deutlich ausgeprägt nach 90 min und abgeschwächt nach 3 h.

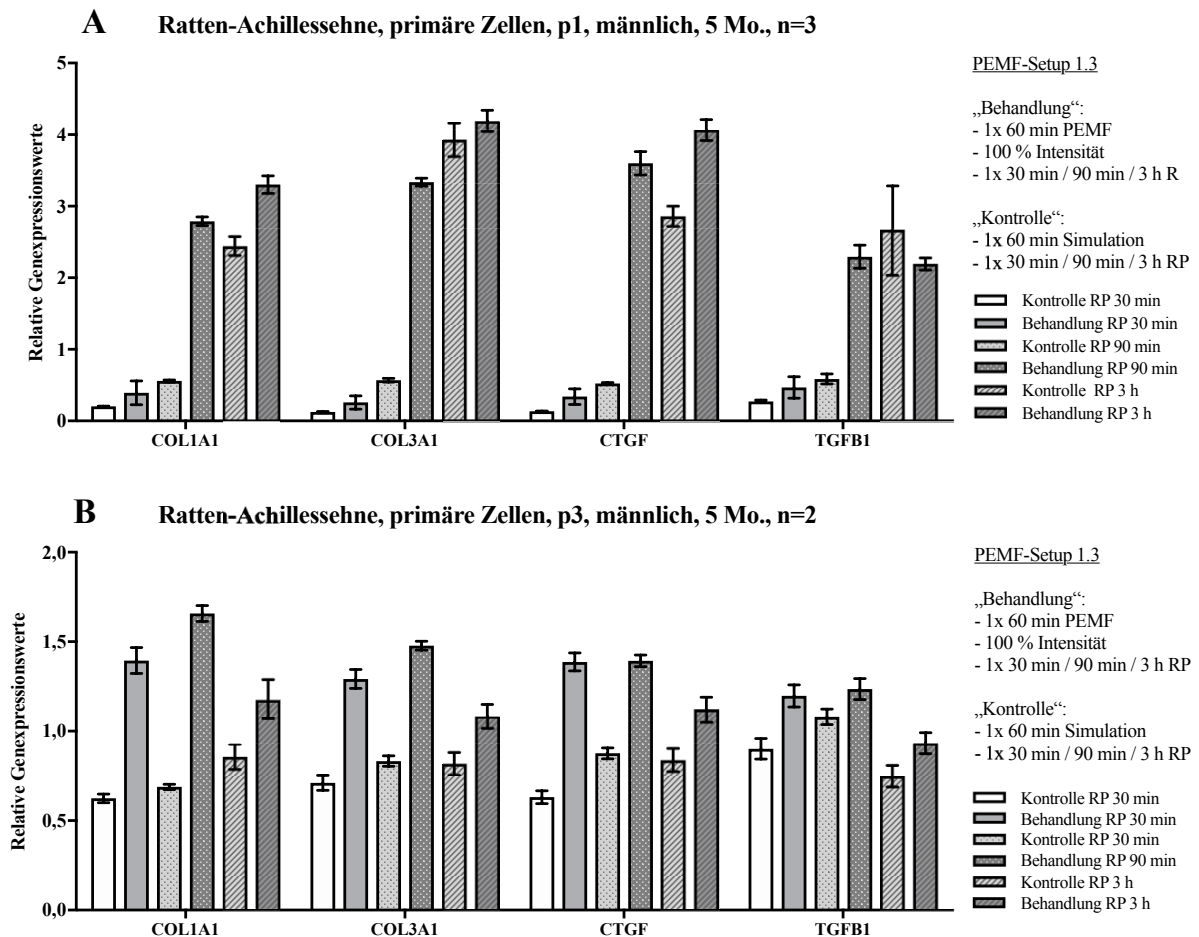


Abb. 14: PEMF 1.3: Genexpression von primären TDSPCs aus der Achillessehne. Die Zellen wurden 1 h bei 100 % Intensität mit unterschiedlichen Ruhepausen „RT“ einmalig mit dem PEMF-Gerät bestrahlt. Es wurden die sehenspezifischen Gene COL1A1, COL3A1, CTGF und der Entzündungsmarker TGFB1 untersucht. Als Referenzgene dienten RPLP0, TBP und HPRT1.

PEMF 2:

Die Vorversuche PEMF 1 halfen uns, die Bedingungen für das Behandlungssetup des RNAseq-Durchlaufes festzulegen. Somit arbeiteten wir von nun an mit einer 90-minütigen Ruhepause nach Behandlung sowie mit primären Achillessehnenzellen, welche die Passage 3 nicht überschritten. Im nächsten Schritt evaluierten wir den Einfluss der PEMF-Behandlungsdauer. Während 20 min / 40 min Behandlung zu einer Herunterregulation von COL1A1 und COL3A1 beitrugen, führte die 60-minütige Behandlung zu einer Induktion der Expression dieser Gene (Abb. 15).

Die anderen Gene CTGF und TGFB1 zeigten nur geringfügige Schwankungen in der Expression. Unsere Schlussfolgerung war demzufolge, dass eine Behandlungsdauer von 60min notwendig ist, um die gewünschte Veränderung zu bewirken.

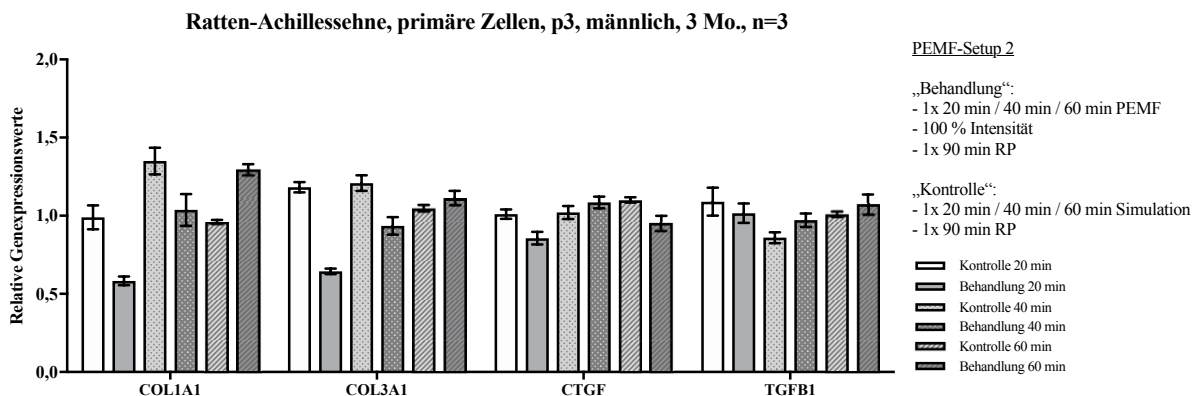


Abb. 15: PEMF 2: Genexpression von primären TDSPCs aus der Achillessehne. Die Zellen wurden 20 min / 40 min / 60 min bei 100 % Intensität mit 90 min Ruhepause „RP“ einmalig mit dem PEMF-Gerät bestrahlt. Es wurden die sehnen-spezifischen Gene COL1A1, COL3A1, CTGF und der Entzündungsmarker TGFB1 untersucht. Als Referenzgene dienten RPLP0, TBP und YWHAZ.

PEMF 3:

Im nächsten Schritt variierten wir die Behandlungsintensität zwischen 40 und 100 %. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten sich bei der Behandlung mit 100 % Intensität die stärkste Hochregulierung der Gene (Abb. 16; COL1A1: 2,03-fach, COL3A1: 1,89-fach, CTGF: 1,87-fach, TGFB1: 1,84-fach). Die Behandlung mit 40 % Intensität zeigt einen ähnlichen Anstieg für COL3A1 (1,69-fach), CTGF (1,79-fach) und TGFB1 (1,69-fach), jedoch blieb COL1A1 unverändert (1,18-fach). Interessanterweise ergab sich jedoch nur bei COL1A1 ein intensitätsabhängiger Anstieg der Genexpression, während bei den anderen drei Genen der Anstieg jeweils bei 40 und 100% deutlich ausgeprägter

gewesen ist, jedoch von 40 zu 60 und zu 80% abfiel. Auf Basis dieser Daten legten wir eine Intensität von 100% fest.

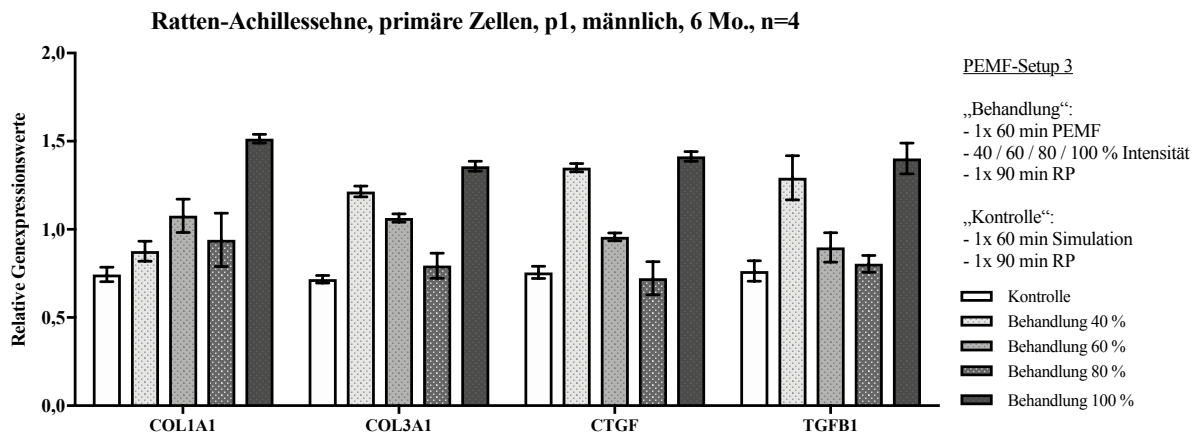


Abb. 16: PEMF 3: Genexpression von primären TDSPCs aus der Achillessehne. Die Zellen wurden 20 min / 40 min / 60 min bei 100 % Intensität mit 90 min Ruhepause „RT“ einmalig mit dem PEMF-Gerät bestrahlt. Es wurden die sehnen-spezifischen Gene COL1A1, COL3A1, CTGF und der Entzündungsmarker TGFB1 untersucht. Als Referenzgene dienten RPLP0, TBP, EIF2B1, POLR2A und YWHAZ.

PEMF 4:

In diesen Versuchen untersuchten wir den Einfluss des proinflammatorischen Milieus auf die 3D-Sehnenkonstrukte. Während die proinflammatorische Stimulation zu einer Herunterregulation der sehnen-spezifischen Gene und einer Aufregulation der inflammatorischen Zytokine führte, reduzierte die PEMF-Behandlung diesen Trend. Wie erhofft, ist dieser Effekt am ausgeprägtesten nach 3x Behandlung. Bei COL3A1 wird nach 3x PEMF Behandlung sogar der gleiche Genexpressionswert erreicht, wie in der Kontrolle. Dagegen scheint jedoch eine dreimalige Behandlung wiederum einen entzündlichen Prozess zu unterhalten. Zwar ist das IL1 β -Niveau nach dreimaliger Behandlung geringer als in der Kontrollgruppe, jedoch auf einem wesentlich höheren Niveau im Vergleich zur einmaligen und zweimaligen Behandlung.

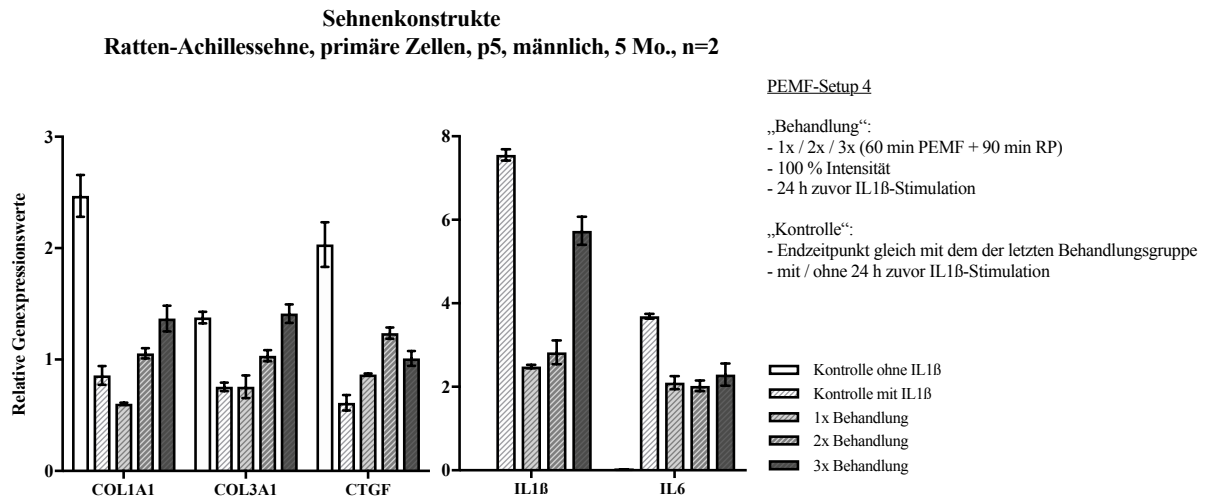


Abb. 17: PEMF 4: Genexpression von Sehnenkonstrukten mit primären TDSPCs aus der Achillessehne. Die Zellen wurden ein-, zwei- und dreimal mit je 60 min bei 100 % Intensität mit dem PEMF-Gerät bestrahlt und anschließend folgte je 90 min Ruhepause „RP“. Die Zellen wurden 24 h zuvor mit IL1 β (Verdünnung: 1:10.000) vorbehandelt. Es wurden die sehnen-spezifischen Gene COL1A1, COL3A1, CTGF und die Entzündungsmarker IL1 β und IL6 untersucht. Als Referenzgene dienten RPLP0, EIF2B1 und YWHAZ.

Somit entschieden wir uns anhand der Ergebnisse aus PEMF 4 für eine zweimalige PEMF-Behandlung der 3D-Sehnenkonstrukte.

Zusammenfassend lässt sich aus den Versuchsreihen PEMF 1 – 4 folgende Ergebnisse festhalten: es konnte ein Behandlungssetup für den PEMF 5 bzw. RNAseq-Durchlauf mit zweimaliger Behandlung à 60 min bei 100 % Intensität sowie 90-minütiger Ruhepause nach jedem der zwei Behandlungen (siehe Abb. 18) erstellt werden. Die Ergebnisse zeigten sich zum Teil nicht zuletzt durch einen stetig veränderten Versuchsaufbau bis einschließlich PEMF 4 heterogen. Während der Versuchsreihen wurden für die qPCR verschiedene endogene Kontrollen verwendet. Dies lag darin begründet, dass sich die Gene im Zuge der Änderungen im Versuchsaufbau unterschiedlich stabil erwiesen. In Zusammenschau aller endogener Kontrollen über alle Versuchsreihen hinweg, stellten sich RPLP0, EIF2B1 sowie YWHAZ als stabilste, endogene Kontrollen heraus. Folglich wurden diese zur qPCR-Verifizierung nach erfolgter RNAseq verwendet.

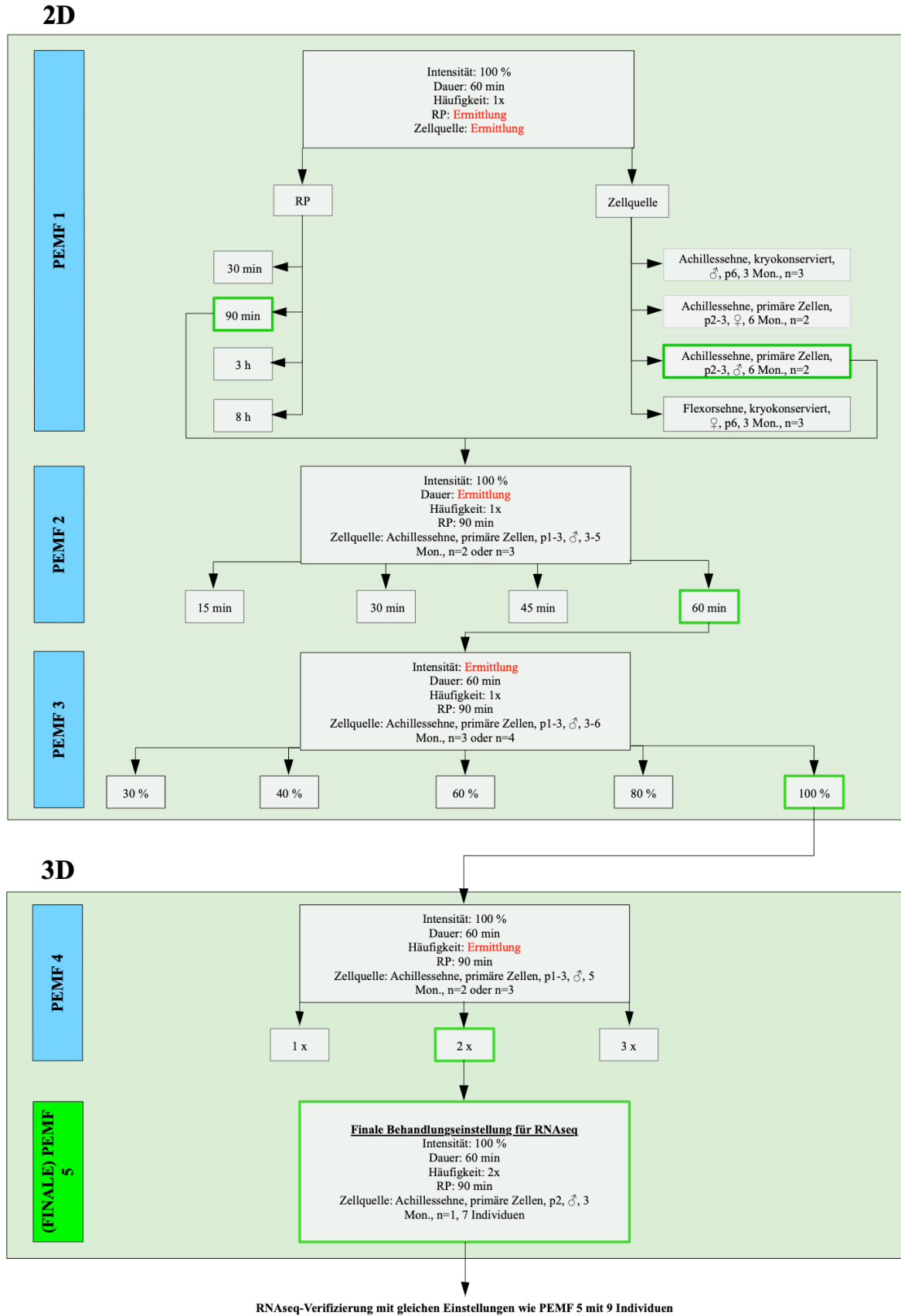


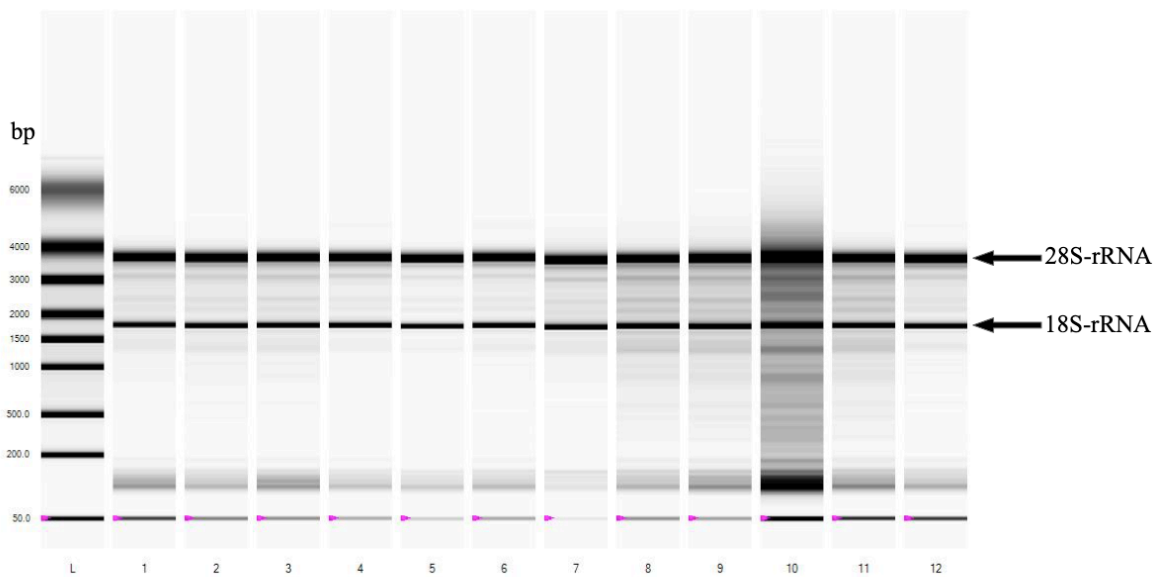
Abb. 18: Flussdiagramm zur schematischen Darstellung der Entscheidungsauswahl eines jeden PEMF-Behandlungsparameters. Die grünen, umschließenden Kästchen stellen die Versuche mit 2D- bzw. 3D-Zellkultur dar. Die

grün umrahmten Felder einer jeden Versuchsreihe stellten die ermittelten (optimierten) Parameter für die anschließenden Versuchsreihen dar.

5.3 Bestimmung der RNA-Integrität

Nach Bestimmung der Zellviabilität und der Optimierung der PEMF-Behandlungsparameter, konnte mit dem finalen PEMF-Durchgang zur RNAseq-Analyse gestartet werden. Die Gesamt-RNA-Proben für die RNAseq-Analyse wurden aus kultivierten, 3D-eingebetteten Tenozyten-Kulturen entnommen, welche aus Ratten-Achillessehnen isoliert wurden. Zunächst wurde hier eine RNA-Integritätsprüfung aller Proben, welche für die RNAseq-Analyse verwendet wurden, durchgeführt. Diese ergab sehr gute RQI-Werte zwischen 9,1 und 9,8 (Abb. 19, B) mit Ausnahme von Well 10 (#6_2). Die RNA in Lane 10 schien mit einem RQI von 7,1 zum Teil degradiert zu sein. In der virtuellen Gelelektrophorese war in allen Proben eine eindeutige Auftrennung der 28S-rRNA (ca. 3.700 bp) und der 18S-rRNA (ca. 1.700 bp) zu erkennen (Abb. 19, A). Die Probe in Lane 10 stellte sich mit dunklerem Hintergrund sowie unklarerer RNA-Bandengrenzen und einer im Vergleich zu den anderen Proben ausgeprägtere RNA-Bande bei ca. 100 bp dar.

A



B

Well ID	Sample Name	RNA Area	RNA Concentration (ng/ μ l)	Ratio [28S:18S]	RQI	RQI Classification	RQI Alert
L	Ladder	622.31	160.00				
1	#1_1	381.72	98.14	1.58	9.7	■	
2	#1_2	559.30	143.80	1.20	9.4	■	
3	#1_3	659.73	169.62	1.32	9.5	■	
4	#1_4	721.66	185.54	1.14	9.5	■	
5	#2_1	1,049.75	269.90	1.48	9.8	■	
6	#2_2	717.72	184.53	1.14	9.5	■	
7	#2_3	2,698.38	693.77	1.18	9.5	■	
8	#2_4	751.30	193.16	1.10	9.1	■	
9	#6_1	791.53	203.51	1.25	9.1	■	
10	#6_2	343.84	88.40	0.97	7.1	■	
11	#6_3	365.69	94.02	1.33	9.1	■	
12	#6_4	280.95	72.23	1.36	9.7	■	

#1-6: Tiernummer
 #x_1: +PEMF -IL1 β
 #x_2: +PEMF +IL1 β
 #x_3: -PEMF -IL1 β
 #x_4: -PEMF +IL1 β

Abb. 19: Virtuelle Gelelektrophorese (A) und die dazugehörige Wertetabelle (B) nach RNA-Integritätsprüfung mittels Experion nach PEMF 5. Die RNA-Banden der Referenzleiter sind in bp (Basenpaaren) angegeben.

5.4 RNAseq

Nachdem wir im Rahmen der Vorversuche belegen konnten, dass eine optimale Adjustierung der PEMF Behandlung zu einer Induktion sehnenpezifischer Gene führt und sogar die inflammationsbedingte Veränderung der Sehnenkonstrukte reduzieren konnten, wurden nun Versuche für die Analyse der Gesamt-Genexpression durchgeführt.

Für die nachfolgenden Analysen wurden vier unterschiedliche Behandlungsgruppen gebildet (Abb. 20); eine unbehandelte Kontrollgruppe, eine +IL-1 β Behandlungsgruppe, eine +PEMF Behandlungsgruppe und eine +PEMF+IL-1 β Behandlungsgruppe. Die Konstrukte wurden entweder 12 Stunden lang mit IL-1 β stimuliert oder unbehandelt gelassen und anschließend der PEMF-Behandlung ausgesetzt. Es wurden drei biologische Replikate (TDSPCs aus drei Tieren) gewonnen und 8 Sehnenkonstrukte pro Tier und Behandlung zusammengeführt. Insgesamt wurden 12 RNA-Seq-Bibliotheken vorbereitet und in Tiefen von 24,23 bis 31,96 Millionen Reads pro Probe sequenziert (Exiqon mRNA Sequencing).

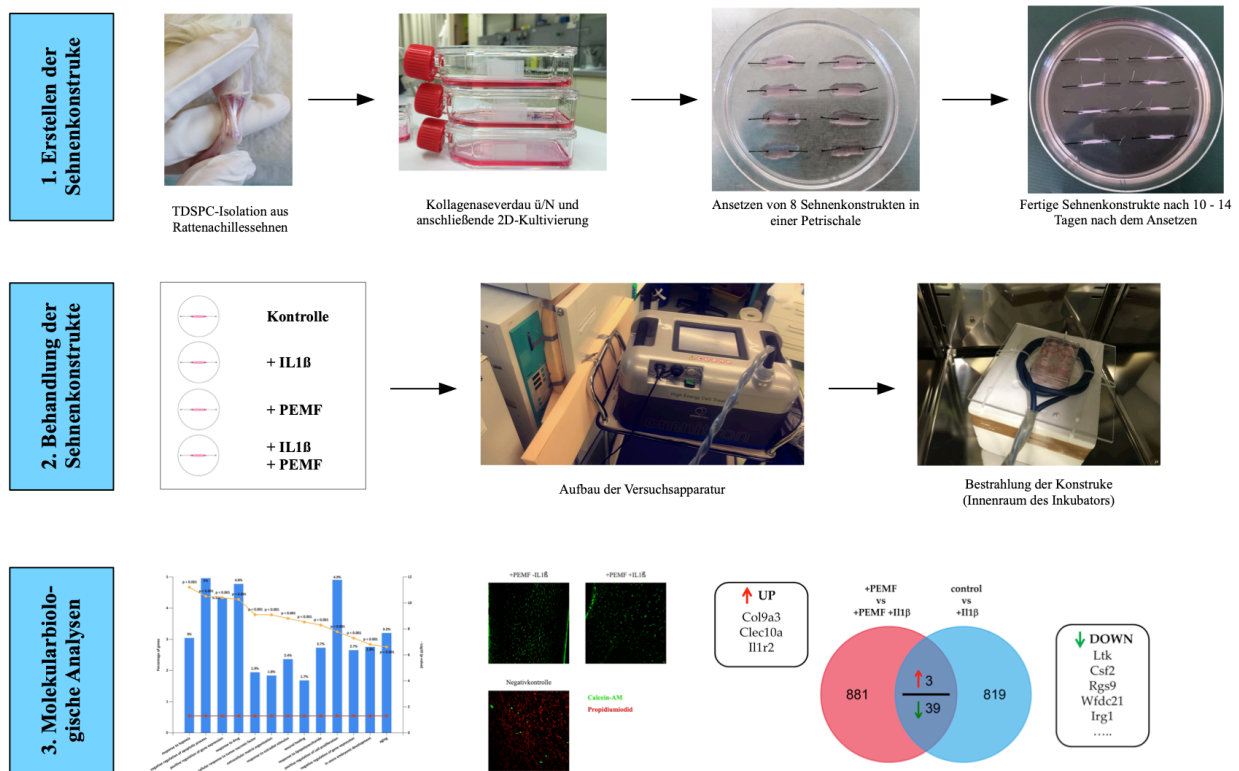


Abb. 20: Workflow der Sehnenkonstrukt-Herstellung, des experimentellen Versuchsaufbau zur PEMF-Behandlung der Sehnenkonstrukte und anschließender molekularbiologischer Analysen.

Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen, ergab das RNA-Sequencing bei IL1 β -behandelten TDSPCs nach PEMF-Exposition eine Genexpressionsveränderung von ca. 5.400 signifikant veränderten ($p < 0,05$) Genen. Um die als Reaktion auf die PEMF-Behandlung regulierten Gene funktionellen Gruppen zuordnen zu können, wurde eine Gene Ontology (GO) Analyse auf der Grundlage von Genen durchgeführt, die als unterschiedlich reguliert zwischen (1) „unbehandelte Kontrolle vs. IL-1 β Stimu-

lation“ und (2) „PEMF-Behandlung vs. IL-1 β Stimulation und PEMF-Behandlung“ identifiziert wurden (Fold Change/Änderungsfaktor der Genexpressionswerte [+PEMF +/- IL-1 β] vs.[+/- IL-1 β]). Dies umfasst nahezu 4.600 Gene (Gehwolf et al., 2019b).

Im nachfolgenden sind die Top 20 der GO Terms dargestellt, geordnet nach dem korrigierten p-Wert (Tab. 11) und eine graphische Darstellung von 13 GO Terms (Abb. 21).

Tab. 11: Top 20 der GO Terms von unterschiedlich exprimierten Genen in IL-1 β -stimulierten Sehnenkonstrukten nach PEMF-Exposition

Biological process	% genes	Fold enrichment	Corrected p value
response to hypoxia	3.044	2.032	6.18E-12
negative regulation of apoptotic process	4.959	1.698	3.06E-11
positive regulation of gene expression	4.330	1.765	3.93E-11
response to drug	4.776	1.708	5.34E-11
cellular response to tumor necrosis factor	1.942	2.293	7.95E-10
extracellular matrix organization	1.837	2.350	8.19E-10
response to estradiol stimulus	2.362	2.092	1.55E-09
wound healing	1.679	2.398	2.92E-09
response to lipopolysaccharide	2.729	1.949	5.02E-09
positive regulation of cell proliferation	4.907	1.606	1.64E-08
negative regulation of gene expression	2.650	1.907	5.10E-08
in utero embryonic development	2.755	1.853	1.57E-07
aging	3.201	1.755	2.45E-07
cytoplasmic translation	0.787	3.223	4.20E-07
positive regulation of cell migration	2.467	1.893	4.53E-07
protein transport	2.309	1.925	6.84E-07
regulation of cell proliferation	2.020	2.012	8.89E-07
apoptotic process	3.385	1.690	1.25E-06
collagen fibril organization	0.813	3.059	1.48E-06
negative regulation of cell proliferation	3.437	1.667	2.58E-06

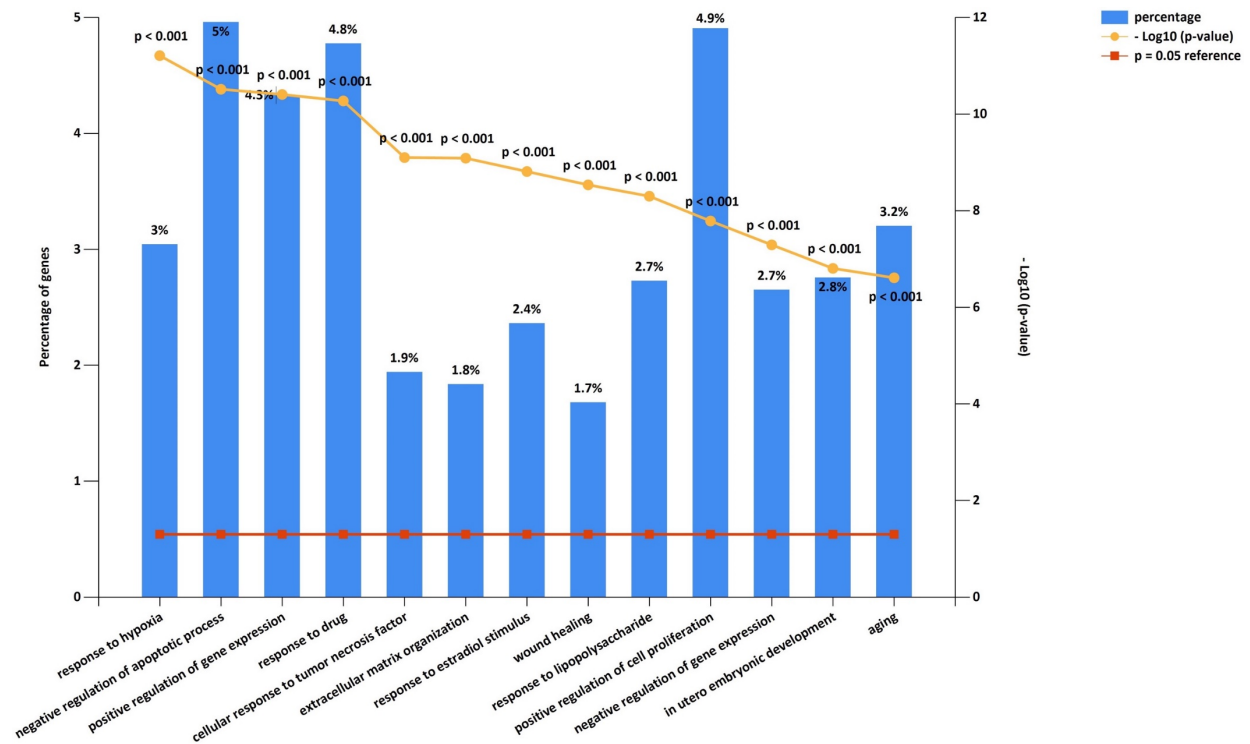


Abb. 21: Balkendiagramm zur Darstellung der GO Terms von unterschiedlich exprimierten Genen in IL-1 β -stimulierten Sehnenkonstrukten nach PEMF-Exposition.

GO Terms wie beispielsweise die zelluläre Antwort auf TNF („cellular response to tumor necrosis factor“, 1,942 % der Gene) unterstreichen eine mögliche, anti-inflammatorische PEMF-Wirkung. Ebenfalls deuten einige Terms wie EZM-Organisation („extracellular matrix organisation“, 1,837 % der Gene) und Kollagenfibrillenorganisation („collagen fibril organization“, 0,813 % der Gene) auf eine regenerationsfördernde Wirkung der PEMF-Behandlung hin.

Basierend auf der Zuordnung zu den GO Terms EZM-Organisation und Kollagenfibrillenorganisation wurde eine ungeclusterte Heatmap für alle Gene erstellt, die einen mindestens zweifachen Unterschied in der Expression aufwiesen (Abb. 22). Gegenübergestellt wurden hier zwei Cluster. Zum einen das Cluster ohne PEMF-Behandlung, also die unterschiedlich exprimierten Gene zwischen den Kontrollgruppen mit und ohne IL-1 β (+/- IL-1 β) und zum anderen das Cluster mit PEMF-Behandlung, entsprechend auch hier mit und ohne IL-1 β (+PEMF +/-IL-1 β).

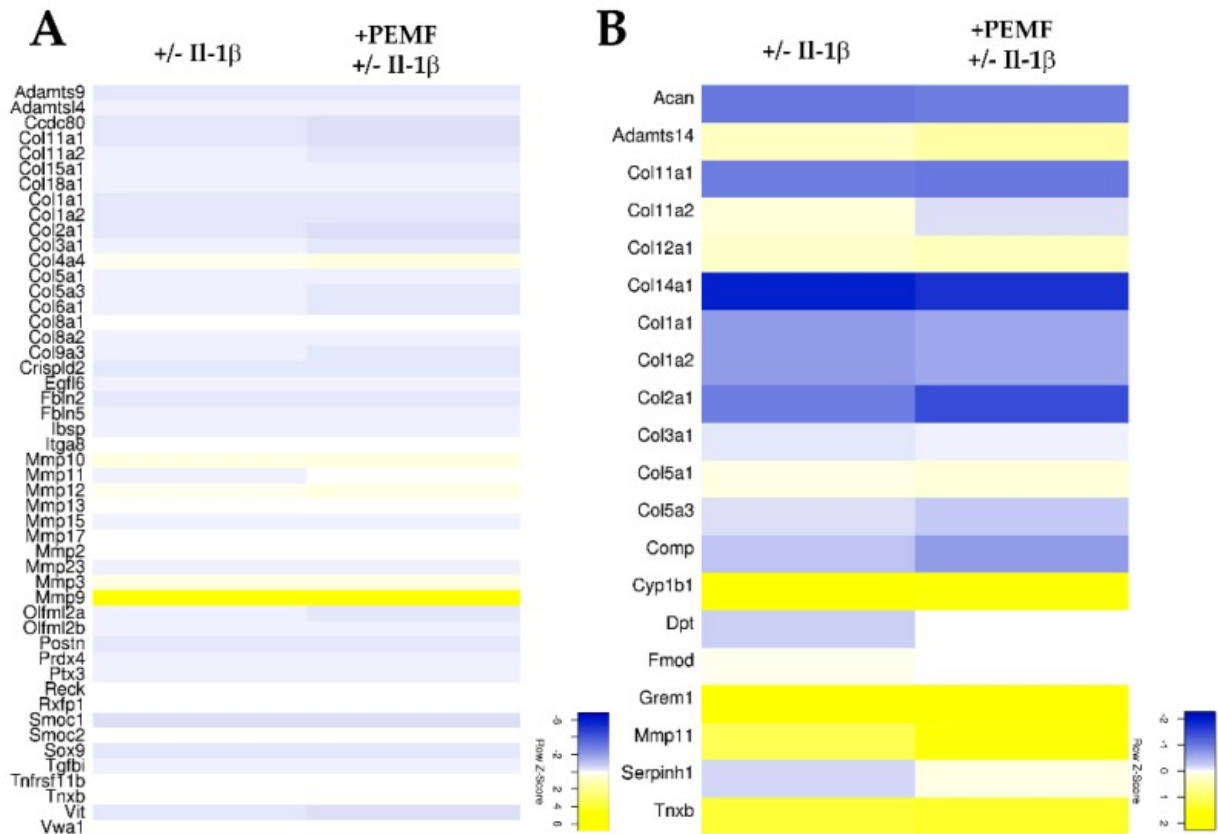


Abb. 22: Heatmaps, die die differentielle Expression von Genen zusammenfassen, die (A) mit dem GO-Term "extrazelluläre Matrixorganisation" und (B) mit dem GO-Begriff "Kollagenfibrillenorganisation" assoziiert sind (≥ 2.0 -fache Veränderung; p-Wert $< 0,05$).

Jene Gene, die mit EZM-Organisation und der Kollagenfibrillenorganisation assoziiert sind (Abb. 22), zeigten nur mäßige Unterschiede. Im Vergleich dazu zeigten 77 Gene, die mit einer negativen Regulation der Apoptose assoziiert sind, eine robustere Reaktion nach PEMF-Exposition (Abb. 23). Die negative Regulation von apoptotischen Prozessen („negative regulation of apoptotic process“; Tab. 11, Abb. 21) gehörte ebenfalls zu den GO Terms mit den meist involvierten Genen (4,959 %).



Abb. 23: Heatmap der differentiell exprimierten Gene, die für die zwei gepaarten Gruppen ([+/- IL-1β] vs. [+PEMF +/- IL-1β]) identifiziert wurden, die dem GO-Term "negative regulation of apoptotic process" zugeordnet sind (≥2.0-fache Veränderung; p-Wert < 0,05).

Nachdem die häufigsten Gen-Gruppen untersucht wurden (Tab. 11, Abb. 21), wurden im Anschluss die häufigsten differentiell exprimierten, einzelnen Gene als Reaktion auf die PEMF-Behandlung nach der IL-1 β -Stimulation bestimmt. Für eine Differentialanalyse wurden zwei Paarvergleiche mit (1) [+/- IL-1 β] und (2) [+PEMF +/- IL-1 β] mittels Cuffdiff2 durchgeführt. Es wurden alle Genänderungen berücksichtigt, die mindestens einen zweifachen Unterschied in der Expression zeigten. Bei (1) wurden im Vergleich beider Gruppen insgesamt 819 Gene unterschiedlich reguliert, bei (2) 881 (siehe Abb. 24). Eine Schnittmenge der Paarvergleiche (1) und (2) ergab eine signifikant erhöhte Expression von 3 und eine Repression von 39 Genen (Abb. 24, Tab. 12).

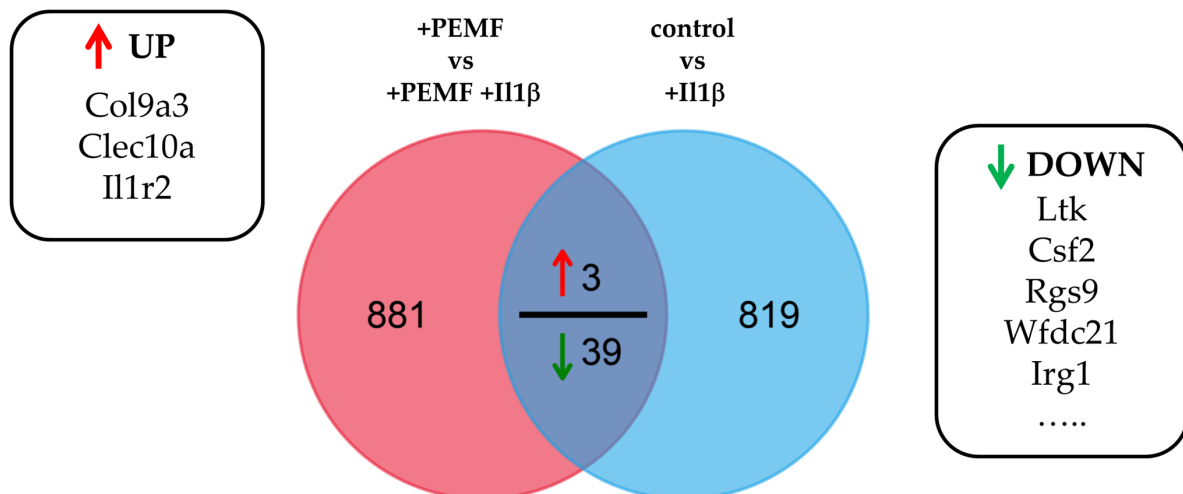


Abb. 24: Das quantitative Venn-Diagramm stellt unterschiedlich regulierte Gene mit ≥ 2.0 Fold Change aus der differentiellen Expressionsanalyse dar.

Mehrere der identifizierten Gene (Tab. 12) können den extrazellulären Matrixproteinen (z.B. Col9a3), Entzündungssurrogaten, der Zytoprotektion (z.B. Il1r2, Csf3) oder der Regulation der Apoptose (Ltk) zugeordnet werden und untermauern die Ergebnisse der GO-Analyse, welche eine anti-inflammatorische sowie regenerationsfördernde Wirkung der PEMF aufzeigen.

Tab. 12: Zusammenfassung der am stärksten regulierten Gene beim Vergleich von 3D-Sehnenkonstrukten, die mit Il-1 β allein (+/- Il-1 β) behandelt oder PEMF unter Il-1 β (+PEMF +/- Il-1 β) ausgesetzt wurden.

Gene Symbol	Gene name	Fold change
Ltk	Tyrosine-protein kinase receptor	-10.36
Csf2	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	-10.16
Rgs9	Regulator of G-protein signaling 9	-4.61
Wfdc21	WAP four-disulfide core domain 21	-4.41
Itga7	Integrin alpha-7	-3.86
Scgb1c1	Secretoglobin family 1C member 1	-3.80
Fam71e2	Family with sequence similarity 71, member E2	-3.60
Adgb	Androglobin	-3.59
Cd40	CD40 molecule	-3.56
Car12	Carbonic anhydrase 12	-3.51
Cxcl2	C-X-C motif chemokine 2	-3.40
Ip6k3	Kinase	-3.21
Rdh5	Retinol dehydrogenase 5	-3.05
Nsg2	Neuronal vesicle trafficking-associated protein 2	-2.84
Fam64a	Family with sequence similarity 64, member A	-2.84
Ass1	Argininosuccinate synthase	-2.78
Prom1	Prominin 1	-2.61
RGD1561143	Similar to cell surface receptor FDFACT	-2.54
Ces1a	Carboxylic ester hydrolase	-2.49
Fbn2	Fibrillin 2	-2.47
Irg1 (Acod1)	Immune-Responsive Gene 1 Protein; aconitate decarboxylase 1	-2.45
Ereg	Proepiregulin	-2.44
Egr3	Early growth response protein 3	-2.43
Fam84a	Family with sequence similarity 84, member A	-2.41
Cited1	Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 1	-2.29
Csf3	Colony-stimulating factor 3	-2.28
Cnn1	Calponin-1	-2.27
Gdf15	Growth/differentiation factor 15	-2.16
Ptgs2	Prostaglandin G/H synthase 2	-2.15
Actg2	Actin, gamma-enteric smooth muscle	-2.14
Scube1	Signal peptide, CUB domain and EGF-like domain-containing 1	-2.14
Pvalb	Parvalbumin alpha	-2.14
Ggt1	Glutathione hydrolase 1 proenzyme	-2.13
Igsf9b	Protein turtle homolog B	-2.09
Myb	MYB proto-oncogene, transcription factor	-2.07
Dlgap2	Disks large-associated protein 2	-2.04
Neurl3	E3 ubiquitin-protein ligase NEURL3	-2.03
Col9a3	Collagen type IX alpha 3 chain	2.05
Clec10a	C-type lectin domain family 10 member A	2.05
Il1r2	Interleukin-1 receptor type 2	2.78

5.5 RNAseq-Verifizierung

Um die Ergebnisse aus der differentiellen Expressionsanalyse zu verifizieren, wurden verschiedene matrix-assoziierte Gene (COL1A1, COL1A2, COL3A1, LEPREL1, MMP11) sowie IL1-R2, welches den höchsten Fold Change (2,78-fach) in der RNA-seq-Analyse erreichte (siehe Tab. 12), mittels qPCR untersucht.

Im Paarvergleich der Sehnenkonstrukte (PEMF unter IL-1 β [+PEMF +/- IL-1 β] vs. IL-1 β allein [+/- IL-1 β]) stellte sich ein Fold Change $\geq 2,0$ und eine signifikante, differentielle Genexpressionsveränderung bei COL1A1, COL1A2 und COL3A1 dar (siehe Abb. 25), auch, wenn die Genexpressionswerte der einzelnen biologischen Replikate sehr heterogen waren. Insgesamt war die Regulation der Genexpression jedoch eher gering.

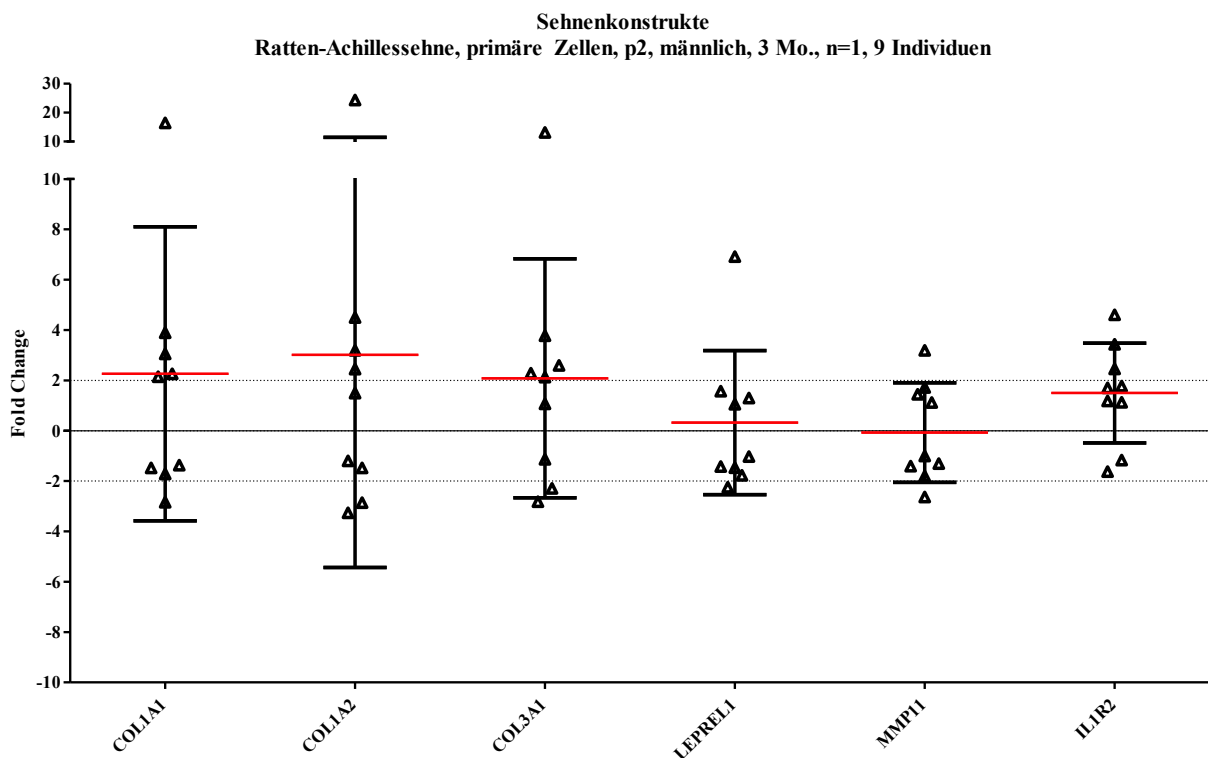


Abb. 25: Paarvergleich von 3D-Sehnenkonstrukten, die mit IL-1 β allein (+/- IL-1 β) behandelt oder PEMF unter IL-1 β (+PEMF +/- IL-1 β) ausgesetzt wurden. Die rote Markierung gibt den Mittelwert an, die Standardabweichung ist durch die schwarzen Markierungen dargestellt. Differentielle Genexpressionen mit einem Fold-Change-Wert von $\geq 2,0$ oder $\leq -2,0$ wurden als signifikant definiert. Als Referenzgene dienten RPLP0, EIF2B1 und YWHAZ.

5.6 Organisation der extrazellulären Matrix

Zusätzlich zur RNA-Sequenzierung wurde der Effekt einer PEMF-Behandlung mit/ohne IL-1 β -Induktion auf die EZM-Organisation innerhalb der Sehnenkonstrukte untersucht. Hierbei zeigte sich in den Aufnahmen der Polarisationsmikroskopie sowohl

mit ungefärbten als auch mit Phalloidin- und DAPI-gefärbten Schnitten von Sehnenkonstrukten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 26).

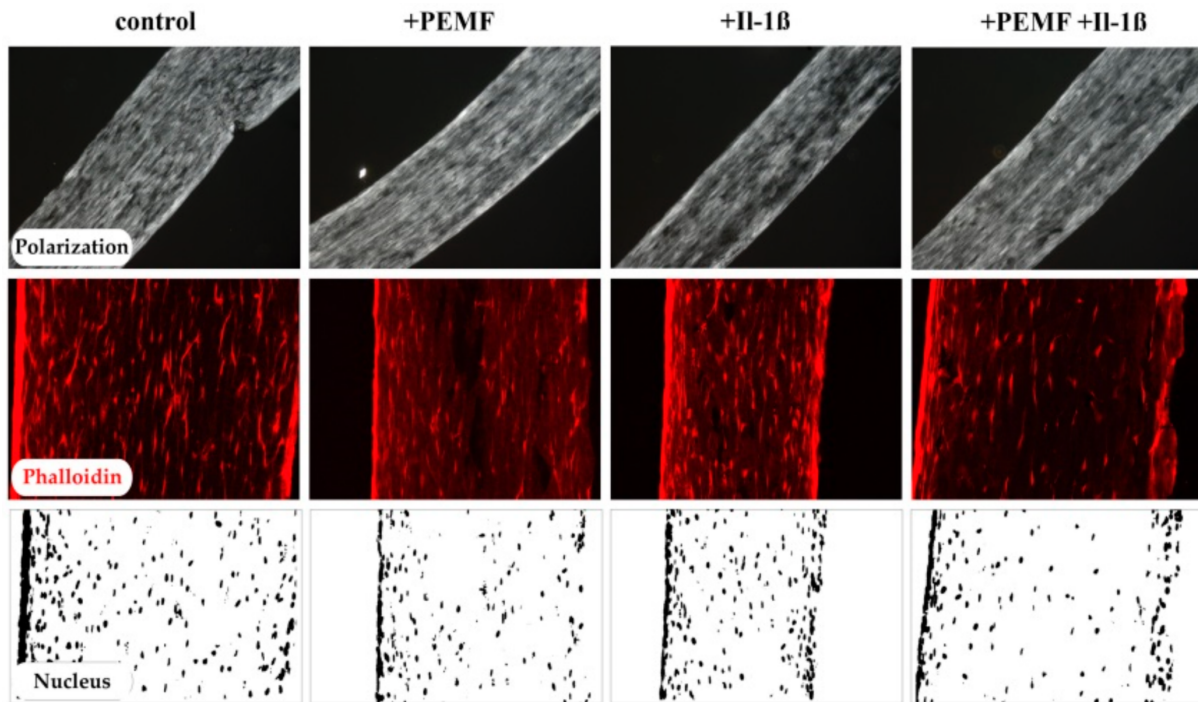


Abb. 26: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen, Phalloidin-Färbung und Kernfärbung (DAPI) von 3D-Sehnenkonstrukten.

Um darüber hinaus den strukturellen Aufbau der EZM zu untersuchen, wurde ferner die Doppelbrechungsintensität und die Dispersion des Aktin Cytoskeletts, sowie die Ausrichtung der Zellkerne bestimmt (Abb. 27). Wie in der Polarisationsmikroskopie konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden.

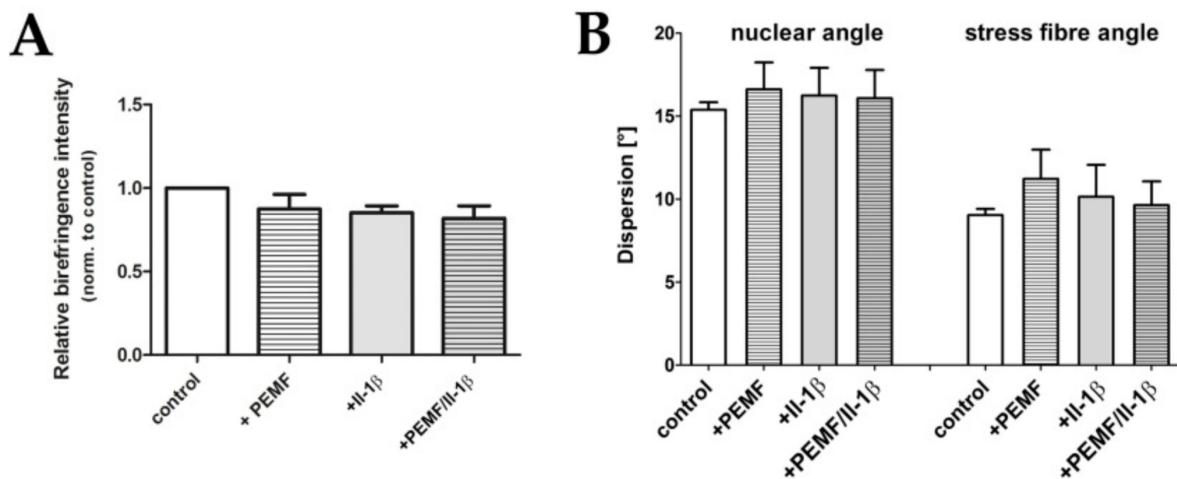


Abb. 27: (A) Relative Doppelbrechungsintensitäten (Relative birefringence intensity; normalisiert auf die Kontrollgruppe) als Surrogat für die Organisation der Kollagenfasern (n = 4, n.s.). (B) Bestimmung der Ausrichtung des Aktin Zytoskeletts (stress fibre angle) und Zellkerne (nuclear angle) innerhalb der 4 Behandlungsgruppen (n = 4, n.s.). Die densitometrischen Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben. Die Signifikanzprüfung zwischen den Gruppen erfolgte durch eine einfaktorielles ANOVA unter Anwendung des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests.

5.7 Untersuchungen zur Apoptose

Die Genexpressionsdaten deuteten eine Veränderung der Regulation der Apoptose an. Um eine fundierte Aussage über die Apoptose-Rate der TDSPCs in den vier Behandlungsgruppen in unserem experimentellem Setup (vgl. Abb. 18) treffen zu können, wurden die Sehnenkonstrukte in TUNEL-gefärbten Präparaten sowie deren Proteinlysate nach dem PEMF Durchlauf 5 (vgl. Tab. 9, Abb. 18) untersucht. Im TUNEL Assay zeigte sich hierbei eine signifikant höhere Apoptose-Rate bzw. TUNEL-positiven (apoptotischen) Zellen bei IL-1 β -behandelten TDSPCs (Versuchsgruppe +IL-1 β) verglichen mit den übrigen drei Versuchsgruppen (Abb. 28 A-B). Eine PEMF-Behandlung (+PEMF/IL-1 β , vgl. Abb. 28 B) scheint hierbei den apoptosefördernden Effekt der Vorbehandlung der TDSPCs mit 10 ng/mL IL-1 β (+IL-1 β) auf das Niveau der Kontrollgruppe (control) bzw. einer alleinigen PEMF-Behandlung ohne IL-1 β (+PEMF) zu führen. Das Ergebnis aus dem TUNEL Assay deckt sich mit dem Ergebnis aus der Caspase-3/7-Aktivitätsuntersuchung (Abb. 28 C). Es konnte ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Apoptose-Rate durch Erhöhung der Caspase-Aktivität der +IL-1 β -Versuchsgruppe im Vergleich zu den anderen drei Versuchsgruppen festgestellt werden. Auch hier scheint sich die Caspase-Aktivität durch eine zusätzliche PEMF-Behandlung der IL-1 β -behandelten TDSPCs (+PEMF/IL-1 β , vgl. Abb. 28 C) auf ein vergleichbares

Aktivitätslevel aus der beobachteten Kontroll- bzw. alleinigen PEMF-Behandlungsgruppe (+PEMF) zu reduzieren.

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse aus der Apoptose-Untersuchung die Ergebnisse aus der RNAseq-Analyse, bei welcher bereits der GO Term „negative regulation of apoptotic process“ identifiziert wurde (vgl. Tab. 11, Abb. 21). Eine PEMF-Behandlung nach unserem experimentellen Ansatz (vgl. Abb. 18) scheint daher nicht nur für die eingebetteten TDSPCs hervorragend verträglich zu sein, sondern darüber hinaus einen durch proinflammatorische Stimulation hervorgerufenen, erhöhten Apoptose-Rate auf ein Ausgangsniveau zu dämpfen (Abb. 28).

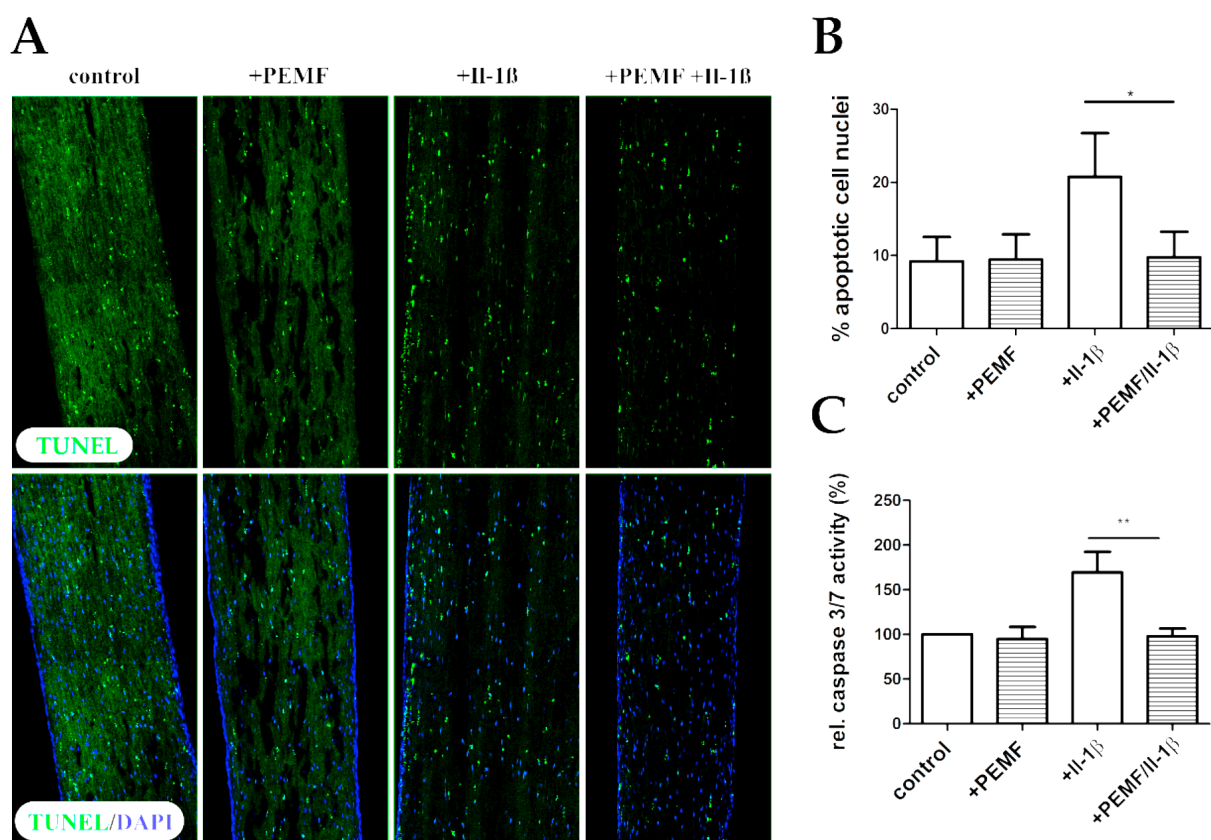


Abb. 28: (A) Nach der TUNEL-Färbung der Sehnenkonstrukte stellten sich die apoptotischen Zellkerne mit fragmentierten Phänotypen grün dar. (B) Bestimmung de apoptotischen Zellkerne (apoptotic cell nuclei) in Prozent und (C) Messung der relativen Caspase-3/7-Aktivität (rel. Caspase 3/7 activity) in Prozent der 4 Versuchsgruppen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Gehwolf et al., 2019a).

6 DISKUSSION

Da die kausalen Zusammenhänge der PEMF-Wirkung auf Sehnenzellen unzureichend verstanden werden, wurde in dieser Arbeit die globale Reaktion auf die PEMF-Exposition in entzündungsstimulierten 3D-Sehnenkonstrukten unter anderem anhand einer RNA-Sequenzierung untersucht.

6.1 Setup der PEMF-Behandlung

Die Pulsfrequenz und die magnetische Flussdichte variieren bei den derzeit handelsüblich erhältlichen PEMF-Geräten stark (Bhavsar et al., 2020). Auch die Behandlungszeiten und -häufigkeiten, mit denen bisherige PEMF-Studien durchgeführt wurden, sind sehr heterogen. So wurde in bisherigen Studien zwischen 30 Minuten und 8 Stunden täglich behandelt, oftmals mehrere Behandlungssitzungen pro Tag in einem Zeitraum von ein bis drei Wochen, mit Induktionen um die 1 bis 3 mT sowie Frequenzen bis 75 Hz (de Girolamo et al., 2013; de Girolamo et al., 2015; Huegel et al., 2018; Strauch et al., 2006). Das in dieser Studie verwendete PEMF-Gerät Omnitron Pro erzeugte im Vergleich dazu Induktionen zwischen 16 und 82 mT mit einer Pulsfrequenz von 2 bis 8 Hz (siehe Tab. 7). Durch die verschiedenen PEMF-Behandlungsschemata in der Literatur und nicht zuletzt durch die stark abweichenden Spezifikationen unseres Gerätes gegenüber den verwendeten Geräten in der Literatur, musste ein geeignetes PEMF-Behandlungsregime für unsere *in vitro* Studie erstellt werden. Zunächst wurde die Vitalität der TDSPCs sowohl in 2D- als auch in 3D-Zellkultur (Sehnenkonstrukte) bei maximaler Intensität, welcher einer magnetischen Flussdichte von 82 mT entspricht, bestimmt (siehe Abb. 9 – Abb. 11). Mittels der Vitalitätsprüfung konnte kein signifikanter Unterschied zu unbehandelten Kontrollen beobachtet werden. Die PEMF-Behandlung stellt sich dadurch selbst bei 82 mT für Tenozyten als nicht zellschädlich dar. Nicht-zytotoxische PEMF-Effekte wurden bereits für Tenozyten für Behandlungsdauern bis 12 Stunden beschrieben (de Girolamo et al., 2013; de Girolamo et al., 2015), jedoch wurden nur Induktionen bis höchstens 3 mT verwendet, ein Wert, der selbst bei niedrigster Intensitätseinstellung des Omnitron Pros (10 % ~ 16 mT; vergl. Tab. 7) bei Weitem übertroffen wurde. Nachdem sich das Omnitron Pro auch bei höchster Intensitätseinstellung (100 % ~ 82 mT; vergl. Tab. 7) als sicher für die in den Sehnenkonstrukten eingebetteten TDSPCs erwies, konnte anschließend die PEMF-

Therapieeinstellungen optimiert werden. Hierfür wurden bestimmte Behandlungsparameter geändert (siehe Tab. 9, Abb. 18) und die jeweiligen beibehalten, welche die vielversprechendsten qPCR-Ergebnisse anhand von entzündungs- und sehnenspezifischen Markern zeigten (Abb. 12 – Abb. 17). Somit konnte ein optimiertes Behandlungsregime für die PEMF-Behandlung proinflammatorisch stimulierter TDSPCs in 3D-Zellkultur mit zweifach repetitiver Behandlungszeit von 60 min bei 100% Intensität (82 mT) bei jeweils anschließenden 90 min Ruhepause ermittelt werden.

Bei den ersten Experimentreihen waren die qPCR-Ergebnisse häufig heterogen. Die Ursache ließ sich nicht immer eindeutig nachvollziehen. Der Versuchsaufbau wurde fortlaufend optimiert (siehe 4.4.2) um für die jeweils anschließenden Experimente eine physiologischere Umgebung der TDSPCs zu schaffen. Eine Veränderung im Versuchsaufbau war beispielsweise der Verzicht auf eine HEPES-Pufferung sowie nachfolgend die Umstellung auf einen CO₂-begasteten Inkubator. Hierdurch konnte nach pH-Schwankungen in den ersten Versuchsreihen ein konstanter pH-Wert während der PEMF-Behandlung gewährleistet werden.

In den meisten Versuchsreihen zur Parameteroptimierung konnten keine massiven Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe festgestellt werden. Dies sei möglicherweise dadurch begründet, dass unsere Auswahl von qPCR-Genmarkern willkürlich geschah und dadurch ein Selektions-Bias darstellte. Wenn man die verwendeten Genmarker der Versuche PEMF 1 bis 4 (Abb. 12 – Abb. 17) mit der RNAseq-Verifizierung (Abb. 25) vergleicht, welche als Auswahl der meistregulierten Genen nach der RNAseq-Analyse galt, überschneidet sich die Genauswahl lediglich mit COL1A1 und COL3A1. Kein Fold Change zeigte sich hingegen für SCX, MKX und ein lediglich sehr geringer für CTGF (0,95) sowie TNMD (1,19). Dies war jedoch weitestgehend zu erwarten, da eine selektierte Auswahl von Genmarkern, welche aus eigener Erfahrung und der Literatur heraus an vielversprechendsten galten, sich nicht zwangsläufig mit einer Genauswahl mit dem höchsten Fold Change aus einer RNAseq-Analyse decken müssen.

Ferner wurden mindestens 8 verschiedene endogene Kontrollen verwendet (siehe Tab. 10) bis die optimale Kombination an Referenzgenen für die sehnenähnlichen Konstrukte identifiziert werden konnte (RPLP0, EIF2B1, YWHAZ; Abb. 17, Abb. 25). Dies hatte zur Folge, dass sich die Referenz der selektierten Gene für die Versuche PEMF 1 bis 4 unterschieden.

6.2 Transkriptomweiter Response von IL1- β -behandelten TDSPCs nach PEMF-Behandlung

Die mRNA Sequenzierung identifizierte ca. 5.400 differentiell exprimierte Gene nach einer Behandlung mit PEMF. Eine RNAseq-Analyse nach PEMF-Behandlung wurde zuvor nur an humanen Osteoblasten ohne inflammatorische Stimulierung in Monolayer-Kultur durchgeführt (He et al., 2018). Unsere Betrachtung der einzelnen, unterschiedlich exprimierten Gene und Zuordnung dieser Gene zu biologischen Prozessen (Gene Ontology Analyse) in IL1 β -behandelten TDSPCs nach PEMF-Exposition sowie ergänzende Untersuchungen zur EZM-Struktur und Apoptose, ergab in der vorliegenden Studie im Wesentlichen einen anti-apoptotischen, anti-inflammatorischen und regenerationsfördernden Effekt, welche im Nachfolgenden diskutiert werden.

6.2.1 Anti-inflammatorischer Effekt

Obwohl die Zytokinprofile bei Sehnenerkrankungen nur unvollständig untersucht sind, ist bekannt, dass die Interleukin-1 β -Spiegel bei Tendinopathie und nach Sehnenverletzungen erhöht sind. Familienmitglieder der Interleukin-1-Familie, insbesondere IL-1 β , können über die Aktivierung von MMPs (D'Addona et al., 2017; Millar et al., 2017; Schulze-Tanzil et al., 2011) einen katabolen Abbau der EZM auslösen und damit zum Fortschreiten einer Tendinopathie beitragen (Archambault et al., 2002; Tsuzaki et al., 2003). IL-1 β führt in Tenozyten zu zytotoxischen Effekten, insbesondere durch Caspase-Aktivierung, sowohl in 2D- als auch in 3D-Zellkultur (Busch et al., 2012; McClellan et al., 2019).

Eine anti-inflammatorische Wirkungsweise der PEMF auf Tenozyten in 2D-Zellkultur wurde bereits beschrieben (de Girolamo et al., 2013). Die Autoren verwendeten, verglichen mit der vorliegenden Studie, ein PEMF-Gerät mit geringer Intensität (1,5 mT), höherer Pulsfrequenz (75 Hz) und einer längeren Behandlungsdauer von bis zu 12 Stunden. Zwei Tage nach der Behandlung konnten keine Unterschiede vom proinflammatorischen IL-1 β zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe beobachtet werden, jedoch eine hochsignifikante Erhöhung von TGF- β auf einen 11-fachen Wert verglichen zur Kontrollgruppe. In den Vorversuchen dieser Studie ohne IL-1 β -Stimulation und in 2D-Kultur konnten wir nur eine moderate Wirkung auf TGF- β beobachten. Teilweise lieferten die qPCR-Ergebnisse vielversprechende Ergebnisse (Abb. 14A, 5-facher Fold Change der Behandlungsgruppe 90 min verglichen mit der Kontrollgruppe

90 min), jedoch zeigte sich häufig auch kein Effekt (Abb. 14B, Abb. 15). Ebenfalls konnte in der RNAseq-Analyse mit IL-1 β -Stimulation und in 3D-Zellkultur keine signifikante Genexpressionsänderung von TGF- β festgestellt werden. Dahingegen zeigte die RNAseq-Analyse einen signifikanten 2,78-fachen Genexpressionsanstieg des IL-1R2 (Tab. 12). Dieser Anstieg ließ sich ebenfalls mit der qPCR verifizieren, auch wenn dies keine signifikanten Werte erbrachte (Abb. 25). Das IL-1R2-Gen transkribiert für den IL-1R2 Decoy Receptor, welcher die entzündungsfördernde Wirkung des IL1 β verringert (Peters et al., 2013). Vor Kurzem wurde gezeigt, dass der IL-1R2 Decoy Receptor eine zentrale Rolle in der Zytoprotektion bei Tenozyten aus embryonalen Stammzellen (embryonic stem cells-derived tenocytes) einnimmt, und zwar in vergleichbaren Bedingungen wie in der vorliegenden Studie: d.h. in 3D-Sehnenkonstrukten unter proinflammatorischer Stimulation (McClellan et al., 2019).

McClellan et al. zeigten, dass IL-1 β die Fähigkeit von fetalen und adulten Tenozyten zur Bildung reifer sehnenähnlicher Konstrukte verminderte, während von embryonalen Stammzellen abgeleitete Tenozyten die 3D-Sehnenkonstrukte strukturell unverändert erscheinen ließen. Da die von embryonalen Stammzellen abgeleiteten Tenozyten hohe Konzentrationen des IL-1R2-Gens exprimierten, war die Translokation von NF- κ B in den Nucleus nach der Stimulation von IL-1 β signifikant reduziert, was möglicherweise eine Zytoprotektion bewirkte.

Somit lässt sich in dieser Studie ein anti-inflammatorischer Effekt der PEMF auf IL-1 β -stimulierte, in 3D-Sehnenkonstrukten eingebetteten TDSCPs durch eine erhöhte Expression des IL-1R2 Decoy Receptors als Gegenspieler des Interleukin-1 β postulieren.

6.2.2 Regenerationsfördernder Effekt

Mehrere Studien haben zeigen können, dass die IL-1 β -Stimulation von Sehnenzellen die Expression von Kollagenen unterdrückt, die Expression von Matrix-Metalloproteasen erhöht (D'Addona et al., 2017; Millar et al., 2017; Schulze-Tanzil et al., 2011; Zhang et al., 2015) und zu zytotoxischen Effekten sowohl in 2D- als auch in 3D-Zellkulturen führt (Zhang et al., 2015). Es konnte auch gezeigt werden, dass IL-1 β die Expression tenogener Marker wie Scleraxis oder Tenomodulin irreversibel reprimiert und den Zellstoffwechsel in Sehnenzellen, die aus verletzten Sehnen isoliert wurden, verändert (McClellan et al., 2019; Zhang et al., 2015). Wie durch die RNAseq-Analyse und durch die qPCR-Verifizierung nachgewiesen wurde, stellte die PEMF-Exposition

in der vorliegenden Studie die Expression von Kollagen-Genen (Tab. 12: COL9A3; Abb. 25: COL1A1, COL1A2, COL3A1) nach proinflammatorischer Stimulation der TDSPCs in 3D-Zellkultur teilweise wieder her. Eine Steigerung der Kollagenproduktion der Tenozyten nach PEMF-Applikation und unter Interleukin-1 β wurde bereits für Kollagen Typ I (Liu et al., 2017) beschrieben. Eine Steigerung der Kollagenproduktion durch PEMF alleine ohne pro-inflammatorischer Stimulation der TDSPCs konnte in dieser Studie in den Vorexperimenten PEMF 1 – 3 (vgl. Abb. 18) nicht gezeigt werden (Abb. 12 – Abb. 16). Somit stellt sich diese Beobachtung kohärent zu den meisten bisher publizierten Ergebnissen (Denaro et al., 2011; Liu et al., 2017) dar, bei welchen ebenfalls keine Kollagen-Expressionsänderung nach PEMF ohne pro-inflammatorischer Stimulation der Zellen beschrieben wurde. Möglicherweise könnte jedoch eine längere Behandlungszeit über mehrere Stunden auch bei nativen Sehnenzellen eine gesteigerte Kollagenexpression bewirken (de Girolamo et al., 2013).

Die Ergebnisse bezüglich der Expressionssteigerung von Kollagen-Genen in proinflammatorisch stimulierten TDSPCs legen einen regenerationsfördernden Effekt der PEMF nahe. Diese Vermutung wird ferner durch die durchgeführte Gene-Ontology-Analyse bestärkt. So konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass sich wichtige biologische Prozesse, die der Regenerationsförderung zugeordnet werden können, sich in den TOP 20 der GO Terms befinden (Tab. 11). Neben dem Term Kollagenfibrillenorganisation (collagen fibril organization, Tab. 11), konnten die funktionellen Gruppen „EZM-Organisation“ (extracellular matrix organization, Tab. 11), „Wundheilung“ (wound healing, Tab. 11) und „positive Regulation der Zellproliferation“ (positive regulation of gene expression, Tab. 11) direkt der Regenerationsförderung zugeordnet werden.

Die vielversprechenden, molekularbiologischen Erkenntnisse konnten jedoch nicht in einer strukturellen Analyse der Sehnenkonstrukte bestätigt werden. Es zeigte sich kein Effekt der PEMF auf proinflammatorisch stimulierte Sehnenkonstrukte in Hinblick auf die Doppelbrechungsintensität (Maß für Organisation der Kollagenfasern), der Dispersion des Aktin Zytoskeletts, sowie des Kernwinkels (Abb. 27 und 28). Vermutlich könnte die kurze Dauer des gesamten Behandlungszyklus (ca. 5 Stunden; vgl. Tab. 9, PEMF Setup 5) ein Grund für nicht messbare Strukturunterschiede auf Proteinebene sein. Bei längeren PEMF-Behandlungsdauern über mehrere Wochen konnten bereits

strukturelle Veränderungen in einer *in vivo* Studie mit einem Supraspinatussehnendefekt-Modell an Ratten histologisch beobachtet werden (Huegel et al., 2018). Selbige Autorengruppe räumte in einer *in vivo* Folgestudie mit einem Achillessehnendefekt-Modell an Ratten ein, dass die Achilles- verglichen zur Supraspinatussehne schlechtere, strukturelle und funktionelle Ergebnisse festzustellen seien (Huegel et al., 2020). In der vorliegenden Studie wurden ebenfalls Ratten-Achillessehnen verwendet (vgl. Tab. 9). Die verwendeten Achillessehnen wurden jedoch im Rahmen eines *in vitro* Modells verwendet, weswegen eine Vergleichbarkeit zu den *in vivo* Studien von Huegel et al. (Huegel et al., 2020; Huegel et al., 2018), abgesehen von stark abweichenden PEMF-Behandlungsschemata, ohnehin nur sehr bedingt möglich wäre. In zukünftigen Studien könnte auf Basis der vorliegenden Genexpressionsdaten die Expression bestimmter Proteine nach gegebenenfalls intensiverer PEMF-Behandlung gezielter untersucht werden.

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass nach einem PEMF-Behandlungszyklus von ca. 5 Stunden (vgl. Tab. 9) eine gesteigerte Expression regenerationsfördernder Gene in IL-1 β stimulierten Sehnenkonstrukten zu beobachten war ohne jedoch strukturelle Veränderungen nachweisen zu können.

6.2.3 Anti-apoptotischer Effekt

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods, welche nicht nur während der Entwicklung und der Homöostase eines Gewebes von entscheidender Bedeutung ist, sondern auch bei der Pathogenese einer Reihe von Krankheiten.

Bei muskuloskeletalen Erkrankungen mit einer entzündlichen oder degenerativen, gewebsverändernden Komponente wie Arthrose und Tendinopathien ist seit Langem bekannt, dass diese mit einer erhöhten Apoptoserate bzw. dysregulierter Apoptose assoziiert sind (Aigner et al., 2001; Andarawis-Puri and Flatow, 2018; Lian et al., 2007; Lotz et al., 1999; Pearce et al., 2009; Yuan et al., 2002).

In vorherigen Studien zu muskuloskeletalen Pathologien konnte bereits ein anti-apoptotischer Effekt der PEMF gezeigt werden (Guo et al., 2011; Li et al., 2011). So wurde in einem Arthrose-Modell an Ratten eine durch PEMF Behandlung erzielte Verringerung der Caspase-3/8-Aktivität in Chondrozyten beschrieben (Guo et al., 2011).

In der vorliegenden Studie wurde daher der Einfluss einer PEMF-Behandlung auf das Apoptoseverhalten der in Sehnenkonstrukten eingebetteten, proinflammatorisch stimulierten TDSPCs untersucht.

Zunächst zeigte eine Zellviabilitätstestung mittels Messung des zellulären ATP-Gehaltes (Abb. 9) und MTS-Testung (Abb. 10) zwischen PEMF-behandelten TDSPCs und der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede. Somit kann auf eine für die TDSPCs sichere Applikation der PEMF geschlossen werden. Dies konnte ebenfalls durch einen Live/Dead Assay für alle vier Behandlungsgruppen im Rahmen von PEMF 5 (vgl. Tab. 9) bestätigt werden (Abb. 11).

Die mittels RNASeq nachgewiesene negative Regulation von apoptotischen Prozessen („negative regulation of apoptotic process“; Tab. 11, Abb. 21) galt als GO Term mit den meist involvierten Genen (4,959 %). Der GO Term mit den zweitmeisten involvierten Genen (4,905 %), war die positive Regulation der Zellproliferation („positive regulation of cell proliferation“; Tab. 11, Abb. 21), welche einen anti-apoptischen Effekt suggerierte. Im Kontrast dazu stand, dass auch die negative Regulation der Zellproliferation („negative regulation of cell proliferation“; Tab. 11, Abb. 21) zu den Terms mit prozentual vielen involvierten Genen gehörte (3,437 %) und einen zellproliferationshemmenden Effekt vermuten lässt.

In der Betrachtung der unterschiedlich exprimierten einzelnen Gene im Paarvergleich von [+/- IL-1 β] und [+PEMF +/- IL-1 β] (Abb. 24) konnte das Gen LTK den höchsten Fold Change unter allen Genen erreichen (Fold Change -10,36; Tab. 12). LTK transkribiert für einen Leukozytenrezeptor mit Tyrosinkinase-Aktivität, welcher das Zellüberleben unterstützt (Farhan et al., 2010).

Um die positiven Einflüsse der PEMF aus der RNAseq-Analyse in Hinblick auf das Apoptoseverhalten der pro-inflammatorisch stimulierten TDSPCs weitergehend zu untersuchen, wurde ein TUNEL Assay durchgeführt (Abb. 28 A). Hierbei zeigte sich eine signifikante Verringerung der TUNEL-positiven bzw. apoptotischen Zellen bei PEMF-behandelten, pro-inflammatorisch stimulierten TDSPCs (Abb. 28 B). Darüber hinaus zeigte die Behandlungsgruppe +PEMF/IL-1 β einen vergleichbaren Wert an apoptotischen Zellen wie die Kontroll- und die +PEMF-Gruppe. Eine PEMF-Behandlung nach

oben genanntem Schema (vgl. PEMF 5, Tab. 9) scheint somit den apoptotischen Effekt des IL-1 β auf die TDSPCs signifikant und nahezu vollständig zu dämpfen.

Dieses Ergebnis wird untermauert durch die Aktivitätsanalyse der Caspase 3/7 aus den Zellüberständen der vier Behandlungsgruppen (Abb. 28 C). Wie bereits in der Abbildung der apoptotischen Zellen (Abb. 28 B) dargestellt, ergibt sich ein vergleichbares Ergebnis der Caspase-Aktivität (Abb. 28 C); die Caspase-Aktivität der Behandlungsgruppe +PEMF/IL-1 β stellt sich im Vergleich zur Behandlungsgruppe +IL-1 β hochsignifikant erniedrigt dar. Dabei scheint der hier beobachtete Caspase-aktivitätsmindernde Effekt der PEMF auf pro-inflammatorisch stimulierte TDSPCs ausgeprägter zu sein als bei Chondrozyten aus einem Arthrose-Modell (Guo et al., 2011). Eine neuere Arbeit konnte den Apoptose-dämpfenden Effekt der PEMF-Behandlung durch eine Caspase-3/7-Aktivitätsmessung auf ein Niveau der nativen Kontrollgruppe ebenfalls an Chondrozyten, welche zuvor mit dem Apoptose-Induktor Staurosporin vorbehandelt wurden, beobachten (Parate et al., 2020).

Zusammenfassend lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen aus den Untersuchungen zur Apoptose sagen, dass für die PEMF-Behandlung nativer TDSPCs im Vergleich zur Kontrollgruppe kein Unterschied festgestellt werden konnte, jedoch eine PEMF-Applikation proinflammatorisch stimulierter TDSPCs die Apoptoserate auf das Niveau nativer TDSPCs reduziert werden konnte.

6.3 Schlussfolgerung & Ausblick

Die positiven Einflüsse einer PEMF-Therapie auf Sehnen(-zellen) wurden vielfach beschrieben. Präklinisch wurden insbesondere ein Anstieg tenogener und anti-inflammatorischer sowie ein Abfall proinflammatorischer Marker beobachtet. Tiermodelle deuteten auf eine schnellere Wundheilung hin, welche bisher, neben Schmerzreduktion, auch in klinischen Studien beobachtet wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden die transkriptomweiten Auswirkungen der PEMF-Therapie auf proinflammatorisch stimulierte TDSPCs in 3D-Zellkultur untersucht, um Zusammenhänge in den bisher unzureichend verstandenen, zugrundeliegenden Mechanismen zur molekularen Wirkungsweise der PEMF-Therapie auf Sehnenzellen zu untersuchen. Da in der bisherigen Literatur stets sehr unterschiedliche PEMF-Geräte verwendet wurden und zudem meist nicht mit mehr als 10 mT Experimente an Sehnenzellen durchgeführt wurden, musste zunächst ein geeignetes Behandlungsschema entworfen werden.

Hierbei zeigte sich, dass die in Sehnenkonstrukten eingebetteten, pro-inflammatorisch stimulierten TDSPCs die höchste Intensitätsstufe des PEMF-Gerätes Omnitron Pro (100 %, entspricht 82 mT) sehr gut tolerieren. Ein optimiertes Behandlungsregime für die PEMF-Behandlung pro-inflammatorisch stimulierter TDSPCs in 3D-Zellkultur ergab sich folglich mit zweifach repetitiver Behandlungszeit von 60 min bei 100% Intensität (82 mT) bei jeweils anschließenden 90 min Ruhepause. Nach anschließender Transkriptom-Analyse konnte dabei ein anti-apoptotischer, ein anti-inflammatorischer und ein regenerationsfördernder Effekt der PEMF-Therapie auf Sehnenzellen festgestellt werden. Unterschiede in der EZM-Struktur waren nur auf Transkriptomebene zu beobachten, haben sich aber nicht strukturell manifestiert. Zusammengenommen deuten die Ergebnisse der vorliegenden Studie darauf hin, dass die hochenergetische PEMF die katabolischen Effekte eines pro-inflammatorischen Stimulus durch $IL-1\beta$ begrenzt, indem sie die Expression von zellschützenden Molekülen induziert und die Apoptose dämpft, wodurch ein degeneratives, entzündliches Milieu in einen eher gewebergenerativen Zustand überführt wird.

Es konnte somit zur präklinischen Evidenzlage zur Wirksamkeit der PEMF beigetragen werden. Die ermittelten *in vitro* Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei der PEMF um ein erfolgversprechendes Therapieverfahren zur perioperativen und konservativen Therapie von sowohl akuten als auch chronischen Sehnenpathologien handeln könnte. Um die Ergebnisse dieser Arbeit zu festigen, müssen *in vivo* Studien mit dem Omnitron Pro folgen, um die *in vitro* Ergebnisse zu bestätigen. Ebenfalls sind klinische Studien von hoher Relevanz, um neben der klinischen Wirksamkeit der Behandlung auch ein geeignetes Patienten Klientel zu ermitteln. Darüber hinaus müssen Vergleichsstudien zwischen verschiedenen PEMF-Geräten durchgeführt werden, da sowohl die Intensität als auch die Pulsfrequenz erheblich variieren können. Dadurch ist eine allgemeine Schlussfolgerung zur Wirkung der PEMF kaum möglich und Studienergebnisse können daher nur auf das jeweils verwendete PEMF-Gerät bezogen werden.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Die pulsierende Elektromagnetfeldtherapie „PEMF“ stellt in der Behandlung muskuloskeletaler Erkrankungen eine Möglichkeit zur konservativen und perioperativen Therapie dar.

In Hinblick auf das Sehngewebe konnten präklinische Studien eine günstige Beeinflussung inflammatorischer und tenogener Marker, sowie eine schnellere Sehnenheilung in Tiermodellen zeigen. Klinische Studien weisen ebenfalls auf einen regenerationsfördernden Effekt auf Sehnen und zudem auf eine Schmerzverringerung hin. Auf zellulärer Ebene ist jedoch das Verständnis der biologischen Reaktionen der Tenozyten auf einen externen, physikalischen Reiz durch ein Elektromagnetfeld sehr begrenzt. Daher war das Ziel dieser Arbeit, einen für dreidimensionale, sehnenähnliche Konstrukte geeignetes Behandlungsregime der PEMF-Therapie zu entwerfen, um sowohl die vitale Funktion als auch die transkriptomweiten Reaktionen von Sehnenstamm/-vorläuferzellen (Tendon-Derived Stem/Progenitor Cells) auf eine hochenergetische PEMF-Behandlung unter proinflammatorischer Stimulation mit Interleukin-1 β zu untersuchen.

Die bisherigen in der Literatur verwendeten PEMF-Geräte beschränkten sich meist auf Intensitäten bis 10 Millitesla. Nachdem sich das in dieser Studie verwendete PEMF-Gerät mit einer Intensität von 82 Millitesla als sicher für die in den Sehnenkonstrukten eingebetteten Sehnenstamm/-vorläuferzellen erwies, konnte anschließend die PEMF-Therapieeinstellungen optimiert werden. Somit konnte ein optimiertes Behandlungsregime für die PEMF-Behandlung pro-inflammatorisch stimulierter Sehnenstamm/-vorläuferzellen in dreidimensionaler Zellkultur mit zweifach repetitiver Behandlungszeit von 60 Minuten mit 82 Millitesla bei jeweils anschließenden 90 Minuten Ruhepause ermittelt werden.

Nach anschließender Transkriptom-Analyse konnte dabei ein anti-apoptotischer, anti-inflammatorischer und ein regenerationsfördernder Effekt der PEMF-Therapie auf Interleukin-1 β -behandelte Sehnenstamm/-vorläuferzellen festgestellt werden.

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse der vorliegenden Studie darauf hin, dass die hochenergetische PEMF die katabolischen Effekte eines pro-inflammatori-

schen Stimulus durch Interleukin-1 β begrenzt, indem sie die Expression von zellschützenden Molekülen induziert und die Apoptose dämpft, wodurch ein degeneratives, entzündliches Milieu in einen eher geweberegenerativen Zustand versetzt wird.

Die ermittelten *in vitro* Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei der PEMF um ein erfolgversprechendes Therapieverfahren zur perioperativen und konservativen Therapie von sowohl akuten als auch chronischen Sehnenpathologien handeln könnte. Um die Ergebnisse dieser Arbeit zu festigen, sollten weitere präklinische als auch klinische Studien mit dem in dieser Studie verwendeten PEMF-Gerät folgen, um die *in vitro*-Ergebnisse zu bestätigen.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Aigner, T., Hemmel, M., Neureiter, D., Gebhard, P.M., Zeiler, G., Kirchner, T. und McKenna, L. (2001). Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritis human articular knee cartilage: a study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage. *Arthritis Rheum* 44, 1304-1312. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200106\)44:6<1304::AID-ART222>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200106)44:6<1304::AID-ART222>3.0.CO;2-T)

Altman, G.H., Horan, R.L., Martin, I., Farhadi, J., Stark, P.R., Volloch, V., Richmond, J.C., Vunjak-Novakovic, G. und Kaplan, D.L. (2002). Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J* 16, 270-272. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0656fje>

Andarawis-Puri, N. und Flatow, E.L. (2018). Promoting effective tendon healing and remodeling. *J Orthop Res* 36, 3115-3124. <https://doi.org/10.1002/jor.24133>

Andres, B.M. und Murrell, G.A. (2008). Treatment of tendinopathy: what works, what does not, and what is on the horizon. *Clin Orthop Relat Res* 466, 1539-1554. <https://doi.org/10.1007/s11999-008-0260-1>

Archambault, J., Tsuzaki, M., Herzog, W. und Banes, A.J. (2002). Stretch and interleukin-1beta induce matrix metalloproteinases in rabbit tendon cells in vitro. *J Orthop Res* 20, 36-39. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(01\)00075-4](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(01)00075-4)

Barcellos-Hoff, M.H., Aggeler, J., Ram, T.G. und Bissell, M.J. (1989). Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Development* 105, 223-235.

Barsby, T., Bavin, E.P. und Guest, D.J. (2014). Three-dimensional culture and transforming growth factor beta3 synergistically promote tenogenic differentiation of equine embryo-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* 20, 2604-2613. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0457>

Bassett, C.A. (1989). Fundamental and practical aspects of therapeutic uses of pulsed electromagnetic fields (PEMFs). *Crit Rev Biomed Eng* 17, 451-529.

Bassett, C.A. und Becker, R.O. (1962). Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. *Science* 137, 1063-1064.

Bassett, C.A., Pawluk, R.J. und Becker, R.O. (1964). Effects of Electric Currents on Bone in Vivo. *Nature* 204, 652-654.

Berridge, M.V. und Tan, A.S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303, 474-482.
<https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>

Bhavsar, M.B., Han, Z., DeCoster, T., Leppik, L., Costa Oliveira, K.M. und Barker, J.H. (2020). Electrical stimulation-based bone fracture treatment, if it works so well why do not more surgeons use it? *Eur J Trauma Emerg Surg* 46, 245-264.
<https://doi.org/10.1007/s00068-019-01127-z>

Bi, Y., Ehrchiou, D., Kilts, T.M., Inkson, C.A., Embree, M.C., Sonoyama, W., Li, L., Leet, A.I., Seo, B.M., Zhang, L., *et al.* (2007). Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med* 13, 1219-1227.
<https://doi.org/10.1038/nm1630>

Busch, F., Mobasher, A., Shayan, P., Lueders, C., Stahlmann, R. und Shakibaei, M. (2012). Resveratrol modulates interleukin-1beta-induced phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB signaling pathways in human tenocytes. *J Biol Chem* 287, 38050-38063. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.377028>

Canedo-Dorantes, L., Garcia-Cantu, R., Barrera, R., Mendez-Ramirez, I., Navarro, V.H. und Serrano, G. (2002). Healing of chronic arterial and venous leg ulcers through systemic effects of electromagnetic fields [corrected]. *Arch Med Res* 33, 281-289.

Canty, E.G. und Kadler, K.E. (2005). Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* 118, 1341-1353. <https://doi.org/10.1242/jcs.01731>

Chen, X., Song, X.H., Yin, Z., Zou, X.H., Wang, L.L., Hu, H., Cao, T., Zheng, M. und Ouyang, H.W. (2009). Stepwise differentiation of human embryonic stem cells

promotes tendon regeneration by secreting fetal tendon matrix and differentiation factors. *Stem Cells* 27, 1276-1287. <https://doi.org/10.1002/stem.61>

Chen, X., Yin, Z., Chen, J.L., Shen, W.L., Liu, H.H., Tang, Q.M., Fang, Z., Lu, L.R., Ji, J. und Ouyang, H.W. (2012). Force and scleraxis synergistically promote the commitment of human ES cells derived MSCs to tenocytes. *Sci Rep* 2, 977. <https://doi.org/10.1038/srep00977>

Cheng, X., Gurkan, U.A., Dehen, C.J., Tate, M.P., Hillhouse, H.W., Simpson, G.J. und Akkus, O. (2008). An electrochemical fabrication process for the assembly of anisotropically oriented collagen bundles. *Biomaterials* 29, 3278-3288. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.028>

Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. und Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 160, 81-88.

D'Addona, A., Maffulli, N., Formisano, S. und Rosa, D. (2017). Inflammation in tendinopathy. *Surgeon* 15, 297-302. <https://doi.org/10.1016/j.surge.2017.04.004>

Dakin, S.G., Martinez, F.O., Yapp, C., Wells, G., Oppermann, U., Dean, B.J., Smith, R.D., Whewey, K., Watkins, B., Roche, L., *et al.* (2015). Inflammation activation and resolution in human tendon disease. *Sci Transl Med* 7, 311ra173. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac4269>

Dakin, S.G., Newton, J., Martinez, F.O., Hedley, R., Gwilym, S., Jones, N., Reid, H.A.B., Wood, S., Wells, G., Appleton, L., *et al.* (2018). Chronic inflammation is a feature of Achilles tendinopathy and rupture. *Br J Sports Med* 52, 359-367. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2017-098161>

Davidson, C.J., Ganion, L.R., Gehlsen, G.M., Verhoestra, B., Roepke, J.E. und Sevier, T.L. (1997). Rat tendon morphologic and functional changes resulting from soft tissue mobilization. *Med Sci Sports Exerc* 29, 313-319.

de Girolamo, L., Stanco, D., Galliera, E., Vigano, M., Colombini, A., Setti, S., Vianello, E., Corsi Romanelli, M.M. und Sansone, V. (2013). Low frequency pulsed electromagnetic field affects proliferation, tissue-specific gene expression, and

cytokines release of human tendon cells. *Cell Biochem Biophys* 66, 697-708.
<https://doi.org/10.1007/s12013-013-9514-y>

de Girolamo, L., Vigano, M., Galliera, E., Stanco, D., Setti, S., Marazzi, M.G., Thiebat, G., Corsi Romanelli, M.M. und Sansone, V. (2015). In vitro functional response of human tendon cells to different dosages of low-frequency pulsed electromagnetic field. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 23, 3443-3453. <https://doi.org/10.1007/s00167-014-3143-x>

De Mattei, M., Caruso, A., Pezzetti, F., Pellati, A., Stabellini, G., Sollazzo, V. und Traina, G.C. (2001). Effects of pulsed electromagnetic fields on human articular chondrocyte proliferation. *Connect Tissue Res* 42, 269-279.

Denaro, V., Ruzzini, L., Barnaba, S.A., Longo, U.G., Campi, S., Maffulli, N. und Sgambato, A. (2011). Effect of pulsed electromagnetic fields on human tenocyte cultures from supraspinatus and quadriceps tendons. *Am J Phys Med Rehabil* 90, 119-127. <https://doi.org/10.1097/PHM.0b013e3181fc7bc7>

Farhan, H., Wendeler, M.W., Mitrovic, S., Fava, E., Silberberg, Y., Sharan, R., Zerial, M. und Hauri, H.P. (2010). MAPK signaling to the early secretory pathway revealed by kinase/phosphatase functional screening. *J Cell Biol* 189, 997-1011.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200912082>

Funk, R.H. (2018). Coupling of pulsed electromagnetic fields (PEMF) therapy to molecular grounds of the cell. *Am J Transl Res* 10, 1260-1272.

Funk, R.H., Monsees, T. und Ozkucur, N. (2009). Electromagnetic effects - From cell biology to medicine. *Prog Histochem Cytochem* 43, 177-264.
<https://doi.org/10.1016/j.proghi.2008.07.001>

Galace de Freitas, D., Marcondes, F.B., Monteiro, R.L., Rosa, S.G., Maria de Moraes Barros Fucs, P. und Fukuda, T.Y. (2014). Pulsed electromagnetic field and exercises in patients with shoulder impingement syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Arch Phys Med Rehabil* 95, 345-352.
<https://doi.org/10.1016/j.apmr.2013.09.022>

Gartzke, J. und Lange, K. (2002). Cellular target of weak magnetic fields: ionic conduction along actin filaments of microvilli. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C1333-1346. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00167.2002>

Garving, C., Jakob, S., Bauer, I., Nadjar, R. und Brunner, U.H. (2017). Impingement Syndrome of the Shoulder. *Dtsch Arztebl Int* 114, 765-776. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2017.0765>

Gehwolf, R., Schwemberger, B., Jessen, M., Korntner, S., Wagner, A., Lehner, C., Weissenbacher, N., Tempfer, H. und Traweger, A. (2019a). Global Responses of Il-1beta-Primed 3D Tendon Constructs to Treatment with Pulsed Electromagnetic Fields. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8050399>

Gehwolf, R., Schwemberger, B., Jessen, M., Korntner, S., Wagner, A., Lehner, C., Weissenbacher, N., Tempfer, H. und Traweger, A. (2019b): Supplementary File 1. <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/5/399/s1>. Abgerufen 21.11.2021.

Gehwolf, R., Spitzer, G., Wagner, A., Lehner, C., Weissenbacher, N., Tempfer, H. und Traweger, A. (2019c). 3D-Embedded Cell Cultures to Study Tendon Biology. *Methods Mol Biol*. https://doi.org/10.1007/7651_2019_208

Guerriero, F. und Ricevuti, G. (2016). Extremely low frequency electromagnetic fields stimulation modulates autoimmunity and immune responses: a possible immunomodulatory therapeutic effect in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 11, 1888-1895. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.195277>

Guo, H., Luo, Q., Zhang, J., Lin, H., Xia, L. und He, C. (2011). Comparing different physical factors on serum TNF-alpha levels, chondrocyte apoptosis, caspase-3 and caspase-8 expression in osteoarthritis of the knee in rabbits. *Joint Bone Spine* 78, 604-610. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2011.01.009>

He, Z., Selvamurugan, N., Warshaw, J. und Partridge, N.C. (2018). Pulsed electromagnetic fields inhibit human osteoclast formation and gene expression via osteoblasts. *Bone* 106, 194-203. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.09.020>

Hsieh, C.F., Alberton, P., Loffredo-Verde, E., Volkmer, E., Pietschmann, M., Muller, P., Schieker, M. und Docheva, D. (2016). Scaffold-free Scleraxis-programmed tendon

progenitors aid in significantly enhanced repair of full-size Achilles tendon rupture. *Nanomedicine (Lond)* 11, 1153-1167. <https://doi.org/10.2217/nnm.16.34>

Huegel, J., Boorman-Padgett, J.F., Nuss, C.A., Raja, H.A., Chan, P.Y., Kuntz, A.F., Waldorff, E.I., Zhang, N., Ryaby, J.T. und Soslowsky, L.J. (2020). Effects of Pulsed Electromagnetic Field Therapy on Rat Achilles Tendon Healing. *J Orthop Res* 38, 70-81. <https://doi.org/10.1002/jor.24487>

Huegel, J., Choi, D.S., Nuss, C.A., Minnig, M.C.C., Tucker, J.J., Kuntz, A.F., Waldorff, E.I., Zhang, N., Ryaby, J.T. und Soslowsky, L.J. (2018). Effects of pulsed electromagnetic field therapy at different frequencies and durations on rotator cuff tendon-to-bone healing in a rat model. *J Shoulder Elbow Surg* 27, 553-560. <https://doi.org/10.1016/j.jse.2017.09.024>

Juutilainen, J. und Lang, S. (1997). Genotoxic, carcinogenic and teratogenic effects of electromagnetic fields. Introduction and overview. *Mutat Res* 387, 165-171.

Kannus, P. (2000). Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* 10, 312-320.

Kapacee, Z., Yeung, C.Y., Lu, Y., Crabtree, D., Holmes, D.F. und Kadler, K.E. (2010). Synthesis of embryonic tendon-like tissue by human marrow stromal/mesenchymal stem cells requires a three-dimensional environment and transforming growth factor beta3. *Matrix Biol* 29, 668-677. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2010.08.005>

Kishore, V., Bullock, W., Sun, X., Van Dyke, W.S. und Akkus, O. (2012). Tenogenic differentiation of human MSCs induced by the topography of electrochemically aligned collagen threads. *Biomaterials* 33, 2137-2144. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.066>

Kuo, C.K. und Tuan, R.S. (2008). Mechanoactive tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 14, 1615-1627. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2006.0415>

Lehner, C., Spitzer, G., Gehwolf, R., Wagner, A., Weissenbacher, N., Deininger, C., Emmanuel, K., Wichlas, F., Tempfer, H. und Traweger, A. (2019). Tenophages: a

novel macrophage-like tendon cell population expressing CX3CL1 and CX3CR1. *Dis Model Mech* 12. <https://doi.org/10.1242/dmm.041384>

Li, S., Luo, Q., Huang, L., Hu, Y., Xia, Q. und He, C. (2011). Effects of pulsed electromagnetic fields on cartilage apoptosis signalling pathways in ovariectomised rats. *Int Orthop* 35, 1875-1882. <https://doi.org/10.1007/s00264-011-1245-3>

Lian, O., Scott, A., Engebretsen, L., Bahr, R., Duronio, V. und Khan, K. (2007). Excessive apoptosis in patellar tendinopathy in athletes. *Am J Sports Med* 35, 605-611. <https://doi.org/10.1177/0363546506295702>

Liu, M., Lee, C., Laron, D., Zhang, N., Waldorff, E.I., Ryaby, J.T., Feeley, B. und Liu, X. (2017). Role of pulsed electromagnetic fields (PEMF) on tenocytes and myoblasts-potential application for treating rotator cuff tears. *J Orthop Res* 35, 956-964. <https://doi.org/10.1002/jor.23278>

Lotz, M., Hashimoto, S. und Kuhn, K. (1999). Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 7, 389-391. <https://doi.org/10.1053/joca.1998.0220>

Matsusaki, M., Case, C.P. und Akashi, M. (2014). Three-dimensional cell culture technique and pathophysiology. *Adv Drug Deliv Rev* 74, 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.01.003>

McClellan, A., Evans, R., Sze, C., Kan, S., Paterson, Y. und Guest, D. (2019). A novel mechanism for the protection of embryonic stem cell derived tenocytes from inflammatory cytokine interleukin 1 beta. *Sci Rep* 9, 2755. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39370-4>

McNeilly, C.M., Banes, A.J., Benjamin, M. und Ralphs, J.R. (1996). Tendon cells in vivo form a three dimensional network of cell processes linked by gap junctions. *J Anat* 189 (Pt 3), 593-600.

Millar, N.L., Dean, B.J. und Dakin, S.G. (2016). Inflammation and the continuum model: time to acknowledge the molecular era of tendinopathy. *Br J Sports Med* 50, 1486. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2016-096419>

Millar, N.L., Murrell, G.A. und McInnes, I.B. (2017). Inflammatory mechanisms in tendinopathy - towards translation. *Nat Rev Rheumatol* 13, 110-122. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.213>

Ongaro, A., Varani, K., Masieri, F.F., Pellati, A., Massari, L., Cadossi, R., Vincenzi, F., Borea, P.A., Fini, M., Caruso, A., *et al.* (2012). Electromagnetic fields (EMFs) and adenosine receptors modulate prostaglandin E(2) and cytokine release in human osteoarthritic synovial fibroblasts. *J Cell Physiol* 227, 2461-2469. <https://doi.org/10.1002/jcp.22981>

Osti, L., Buono, A.D. und Maffulli, N. (2015). Pulsed electromagnetic fields after rotator cuff repair: a randomized, controlled study. *Orthopedics* 38, e223-228. <https://doi.org/10.3928/01477447-20150305-61>

Paolucci, T., Pezzi, L., Centra, A.M., Giannandrea, N., Bellomo, R.G. und Saggini, R. (2020). Electromagnetic Field Therapy: A Rehabilitative Perspective in the Management of Musculoskeletal Pain - A Systematic Review. *J Pain Res* 13, 1385-1400. <https://doi.org/10.2147/JPR.S231778>

Parate, D., Kadir, N.D., Celik, C., Lee, E.H., Hui, J.H.P., Franco-Obregon, A. und Yang, Z. (2020). Pulsed electromagnetic fields potentiate the paracrine function of mesenchymal stem cells for cartilage regeneration. *Stem Cell Res Ther* 11, 46. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-1566-5>

Pathan, M., Keerthikumar, S., Ang, C.S., Gangoda, L., Quek, C.Y., Williamson, N.A., Mouradov, D., Sieber, O.M., Simpson, R.J., Salim, A., *et al.* (2015). FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics* 15, 2597-2601. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400515>

Pearce, C.J., Ismail, M. und Calder, J.D. (2009). Is apoptosis the cause of noninsertional achilles tendinopathy? *Am J Sports Med* 37, 2440-2444. <https://doi.org/10.1177/0363546509340264>

Pennisi, E. (2002). Tending tender tendons. *Science* 295, 1011. <https://doi.org/10.1126/science.295.5557.1011>

Peters, V.A., Joesting, J.J. und Freund, G.G. (2013). IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation. *Brain Behav Immun* 32, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.11.006>

Pezzetti, F., De Mattei, M., Caruso, A., Cadossi, R., Zucchini, P., Carinci, F., Traina, G.C. und Sollazzo, V. (1999). Effects of pulsed electromagnetic fields on human chondrocytes: an in vitro study. *Calcif Tissue Int* 65, 396-401.

Rhim, H.C., Kim, M.S., Choi, S. und Tenforde, A.S. (2020). Comparative Efficacy and Tolerability of Nonsurgical Therapies for the Treatment of Midportion Achilles Tendinopathy: A Systematic Review With Network Meta-analysis. *Orthop J Sports Med* 8, 2325967120930567. <https://doi.org/10.1177/2325967120930567>

Riley, G. (2008). Tendinopathy--from basic science to treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4, 82-89. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0700>

Robertson, J.A., Theberge, J., Weller, J., Drost, D.J., Prato, F.S. und Thomas, A.W. (2010). Low-frequency pulsed electromagnetic field exposure can alter neuroprocessing in humans. *J R Soc Interface* 7, 467-473. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0205>

Rosso, F., Bonasia, D.E., Marmotti, A., Cottino, U. und Rossi, R. (2015). Mechanical Stimulation (Pulsed Electromagnetic Fields "PEMF" and Extracorporeal Shock Wave Therapy "ESWT") and Tendon Regeneration: A Possible Alternative. *Front Aging Neurosci* 7, 211. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00211>

Rubik, B. (1997). Bioelectromagnetics & the future of medicine. *Adm Radiol J* 16, 38-46.

Salingcarnboriboon, R., Yoshitake, H., Tsuji, K., Obinata, M., Amagasa, T., Nifuji, A. und Noda, M. (2003). Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res* 287, 289-300.

Schuger, L., O'Shea, K.S., Nelson, B.B. und Varani, J. (1990). Organotypic arrangement of mouse embryonic lung cells on a basement membrane extract: involvement of laminin. *Development* 110, 1091-1099.

Schulze-Tanzil, G., Al-Sadi, O., Wiegand, E., Ertel, W., Busch, C., Kohl, B. und Pufe, T. (2011). The role of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines in tendon healing and rupture: new insights. *Scand J Med Sci Sports* 21, 337-351. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2010.01265.x>

Sharma, P. und Maffulli, N. (2006). Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6, 181-190.

Strauch, B., Patel, M.K., Rosen, D.J., Mahadevia, S., Brindzei, N. und Pilla, A.A. (2006). Pulsed magnetic field therapy increases tensile strength in a rat Achilles' tendon repair model. *J Hand Surg Am* 31, 1131-1135. <https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2006.03.024>

Tempfer, H., Kaser-Eichberger, A., Lehner, C., Gehwolf, R., Korntner, S., Kunkel, N., Wagner, A., Gruetz, M., Heindl, L.M., Schroedl, F., *et al.* (2018). Bevacizumab Improves Achilles Tendon Repair in a Rat Model. *Cell Physiol Biochem* 46, 1148-1158. <https://doi.org/10.1159/000489057>

Tempfer, H., Lehner, C., Grütz, M., Gehwolf, R. und Traweger, A. (2017). Biological Augmentation for Tendon Repair: Lessons to be Learned from Development, Disease, and Tendon Stem Cell Research. In *Cell Engineering and Regeneration*, S. 1-31.

Tempfer, H., Wagner, A., Gehwolf, R., Lehner, C., Tauber, M., Resch, H. und Bauer, H.C. (2009). Perivascular cells of the supraspinatus tendon express both tendon- and stem cell-related markers. *Histochem Cell Biol* 131, 733-741. <https://doi.org/10.1007/s00418-009-0581-5>

Thorpe, C.T., Udeze, C.P., Birch, H.L., Clegg, P.D. und Screen, H.R. (2012). Specialization of tendon mechanical properties results from interfascicular differences. *J R Soc Interface* 9, 3108-3117. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0362>

Tsuzaki, M., Guyton, G., Garrett, W., Archambault, J.M., Herzog, W., Almekinders, L., Bynum, D., Yang, X. und Banes, A.J. (2003). IL-1 beta induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 beta and IL-6 in human tendon cells. *J Orthop Res* 21, 256-264. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(02\)00141-9](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(02)00141-9)

Uzunca, K., Birtane, M. und Tastekin, N. (2007). Effectiveness of pulsed electromagnetic field therapy in lateral epicondylitis. *Clin Rheumatol* 26, 69-74. <https://doi.org/10.1007/s10067-006-0247-9>

Vadala, M., Morales-Medina, J.C., Vallelunga, A., Palmieri, B., Laurino, C. und Iannitti, T. (2016). Mechanisms and therapeutic effectiveness of pulsed electromagnetic field therapy in oncology. *Cancer Med* 5, 3128-3139. <https://doi.org/10.1002/cam4.861>

Volker, A. (1993). [250 years ago: the origin of electrotherapy exemplified by Halle]. *Z Gesamte Inn Med* 48, 251-258.

Wang, J.H. (2006). Mechanobiology of tendon. *J Biomech* 39, 1563-1582. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2005.05.011>

Wang, Z., Gerstein, M. und Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10, 57-63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>

Yang, G., Rothrauff, B.B., Lin, H., Gottardi, R., Alexander, P.G. und Tuan, R.S. (2013). Enhancement of tenogenic differentiation of human adipose stem cells by tendon-derived extracellular matrix. *Biomaterials* 34, 9295-9306. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.08.054>

Yin, Z., Chen, X., Chen, J.L., Shen, W.L., Hieu Nguyen, T.M., Gao, L. und Ouyang, H.W. (2010). The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers. *Biomaterials* 31, 2163-2175. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.083>

Yuan, J., Murrell, G.A., Wei, A.Q. und Wang, M.X. (2002). Apoptosis in rotator cuff tendonopathy. *J Orthop Res* 20, 1372-1379. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(02\)00075-X](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(02)00075-X)

Zhang, K., Asai, S., Yu, B. und Enomoto-Iwamoto, M. (2015). IL-1beta irreversibly inhibits tenogenic differentiation and alters metabolism in injured tendon-derived progenitor cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 463, 667-672. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.05.122>

9 EIGENANTEIL AN DER STUDIE UND EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

Die Dissertationsarbeit ist im Rahmen eines größeren Forschungsprojektes zur Untersuchung der PEMF-Wirkung auf Sehnenkonstrukte entstanden. Die Erstellung des PEMF-Behandlungssetups bis zur Gewinnung des biologischen Materials zur RNA-seq-Analyse, sowie die in dieser Arbeit dargestellte RNAseq-Verifizierung stellte hierbei die persönliche wissenschaftliche Leistung für das gesamte Forschungsprojektes dar.

Abstracts der Studie

1. Jessen M, Schwemberger B, Gehwolf R, Korntner S, Wagner A, Lehner C, Weissenbacher N, Tempfer H, Traweger A: Die Wirkung von repetitiver peripherer Magnetstimulation (rPMS) auf Sehnenzellorganoide in vitro. 34. Jahreskongress der GOTS, Salzburg (Österreich) 06/2019
2. Jessen M, Schwemberger B, Gehwolf R, Korntner S, Wagner A, Lehner C, Weissenbacher N, Tempfer H, Traweger A: Effects of pulsed electromagnetic fields (PEMF) on Il-1b-primed 3d tendon constructs. 19th ESSKA Congress, Milan (Italy) 09/2020

Eigene Publikationen (# aus der Dissertation entstanden)

1. # Gehwolf, R., Schwemberger, B.*, Jessen, M.*, Korntner, S., Wagner, A., Lehner, C., Weissenbacher, N., Tempfer, H., Traweger, A. (2019). Global Responses of Il-1beta-Primed 3D Tendon Constructs to Treatment with Pulsed Electromagnetic Fields. *Cells*, 8(5). doi:10.3390/cells8050399
*Autoren waren gleichermaßen beteiligt.
2. Schmalzl, J., Jessen, M., Sadler, N., Lehmann, L. J., & Gerhardt, C. (2020). High tuberosity healing rate associated with better functional outcome following primary reverse shoulder arthroplasty for proximal humeral fractures with a 135 degrees prosthesis. *BMC Musculoskelet Disord*, 21(1), 35. doi:10.1186/s12891-020-3060-8

3. Schmalzl, J., Jessen, M., Holschen, M., Cohen, B. C., Steinbeck, J., Lehmann, L. J., & Denard, P. J. (2020). Tuberosity healing improves functional outcome following primary reverse shoulder arthroplasty for proximal humeral fractures with a 135 degrees prosthesis. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. doi:10.1007/s00590-020-02649-8
4. Ernstbrunner, L., Jessen, M., and Wieser, K. (2020). Anatomic healing after non-operative treatment of a large, displaced anterior glenoid rim fracture after primary traumatic anterior shoulder dislocation - a case report. *BMC Musculoskelet Disord*, 21, 361. doi:10.1186/s12891-020-03384-1
5. Schmalzl, J., Jessen, M., Gilbert, F., Gerhardt, C., and Lehmann, L.J. (2020c). Proximal humeral fracture morphology in patients with advanced osteoarthritis: An observational study in a surgically treated cohort. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 28, 2309499020944114. doi: 10.1177/2309499020944114
6. Schmalzl, J., Jessen, M., Gilbert, F., Gerhardt, C., and Lehmann, L.-J. (2020d). Proximal humeral fracture morphology in patients with advanced cuff tear arthropathy: an observational study in a surgically treated cohort. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*. doi: 10.1007/s00590-020-02801-4
7. Jessen, M., Gerhardt, C., Lehmann, L.-J., and Schmalzl, J. (2020). Severe Heterotopic Ossification with Proximal Entrapment of the Ulnar Nerve following Primary Anterior Shoulder Dislocation. *Case Reports in Orthopedics* 2020, 1-4. doi: 10.1155/2020/8883758
8. Jessen, M., Lappen, S., Schneider, MM. (2020). Patient-Reported Outcome Measurements (PROMs) in der Schulter- und Ellenbogenchirurgie. *Obere Extremität*. doi: 10.1007/s11678-020-00615-8

9. Ernstbrunner, L., Jessen, M., Rohner, M., Dreu, M., Bouaicha, S., Wieser, K., Borbas, P. (2021). Anatomical study of the teres major muscle: description of an additional distal muscle slip. *BMC Musculoskelet. Disord.* doi: 10.1186/s12891-021-04227-3

Eingeworbene Mittel

1. PROMOS-Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) für den Dissertationsaufenthalt in Salzburg, 2017
2. Promotionsstipendium der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädischer Chirurgie (DGOOC), 2018

10 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Jessen, Malik
Geburtsdatum: 09.07.1992
Geburtsort: Flensburg
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Ledig

SCHULISCHER WERDEGANG

1999 – 2003 Grundschule Sörup
2003 – 2013 Bernstorff-Gymnasium Satrup
28.05.2013 Allgemeine Hochschulreife

UNIVERSITÄRER UND BERUFLICHER WERDEGANG

WS 2013 / 2014 Beginn des Studiums Humanmedizin an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim
16.09.2015 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
02.2017 – 10.2017 Forschungsaufenthalt am Institut für Sehnen- und Knochenregeneration der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität Salzburg, Österreich
02.2018 – 06.2018 Auslandssemester an der Universität Autònoma de Barcelona, Spanien
07.2018 – 10.2018 Forschungsaufenthalt am Institut für Sehnen- und Knochenregeneration der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität Salzburg, Österreich

10.10.2019	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
11.2019 – 11.2020	Praktisches Jahr
11.2019 – 02.2020	Wahlfach Orthopädie am Balgrist Universitätsklinikum Zürich, Schweiz
02.2020 – 04.2020	Innere Medizin am Royal North Shore Hospital, Sydney, Australien
04.2020 – 05.2020	Innere Medizin am Universitätsklinikum Mannheim
05.2020 – 08.2020	Ambulante Orthopädie am Deutschen Gelenkzentrum, ATOS Klinik Heidelberg
08.2020 – 11.2020	Unfallchirurgie am Universitätsklinikum rechts der Isar, München
30.11.2020	Approbation als Arzt
01.01.2021 – aktuell	Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Universitätsklinikum rechts der Isar, München
06.2021 – 11.2021	Rotation in die Abteilung für Handchirurgie der Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie, Universitätsklinikum rechts der Isar, München

11 DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Traweger und bei Frau Prof. Dr. Karen Bieback für die ausgezeichnete Möglichkeit der Kooperation danken. Die sehr gute Kommunikation in Salzburg sowie in Mannheim haben diese Arbeit möglich gemacht. Ich danke Prof. Dr. Andreas Traweger insbesondere für die Überlassung des Themas dieser Arbeit sowie für die sehr tolle, persönliche Unterstützung in den letzten Jahren. Frau Prof. Dr. Karen Bieback danke ich insbesondere für die Möglichkeit nach Salzburg für den wissenschaftlichen Austausch zu gehen und für die Unterstützung der Arbeit aus Mannheim.

Ein ebenfalls großer Dank gilt dem gesamten Team aus dem Labor, besonders an Renate Gehwolf und Stefanie Korntner, für die stets geduldigen Anleitungen und für die exzellente Einführung in die (Grundlagen-)Wissenschaft, wodurch mein Interesse an der Wissenschaft geweckt wurde. Ich habe meine Salzburg-Aufenthalte immer sehr genossen und danke allen für sehr tolle, lebenslange Erinnerungen.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, meiner Partnerin und meinen Freunden, die mich stets motivierten und mir Rückhalt gaben.