

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie an der
Universität Tübingen

**Bedeutung des oxidativen Stresses bei der PEMF-
stimulierten Reifung primärer humaner Osteoblasten**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Birk, Johannes

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nüssler

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. P. Gonser

Tag der Disputation 19.05.2021

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung	1
1.1. Frakturheilung als gesellschaftliche Herausforderung	1
1.1.1. Demografischen Entwicklung	1
1.1.2. Osteoporose	1
1.1.3. Verzögerte Frakturheilung und Pseudarthrosen	1
1.1.4. Folgen: Mortalität und Kosten	2
1.2. Elektromagnetismus in der Medizin	2
1.2.1. Die historische Perspektive	3
1.2.2. Elektromagnetismus als potentiell Karzinogen	4
1.2.3. Therapeutischer Einsatz elektromagnetischer Felder in der Medizin	4
1.3. Überblick der Anwendung am Knochen	5
1.3.1. Unterschiede der technischen Ansätze	5
1.3.2. in vivo Studien – Zusammenfassung der Studienlage	6
1.3.3. In vitro Studien	9
1.4. Wirkmechanismen von PEMF	12
1.4.1. Physikalische Grundlagen	12
1.4.2. Rolle endogener elektrischer und elektromagnetischer Felder	12
1.4.3. Effekte exogener EMF-Stimulation auf Zellen	14
1.5. Oxidativer Stress	16
1.5.1. Klinische Bedeutung	16
1.5.2. Definition	17
1.5.3. “Redox regulation”, “Redox signaling” und “Redox control”	18
1.5.4. Spezifität des Redox Signalings	18

Inhaltsverzeichnis

1.5.5. Antioxidantien und Oxidantien	19
1.6. Übersicht Funktion der Gene des qRT-PCR Array	23
1.7. Überleitung zu Vorarbeiten	29
1.8. Fragestellung und Versuchskonzept der vorliegenden Arbeit	31
2. Material und Methoden	33
2.1. Material	33
2.1.1. Patientenmaterial	33
2.1.2. KITS	34
2.1.3. Primer und qPCR	34
2.1.4. Software	35
2.1.5. weiteres	35
2.2. Methoden	37
2.2.1. Zellkulturen	37
2.2.1.1. Ethikvotum	37
2.2.1.2. Versuchsaufbau	37
2.2.1.3. Zellkulturmedien	38
2.2.1.4. Mechanische Isolation	39
2.2.1.5. Zellkultur	40
2.2.2. Magnetfeldapplikation	41
2.2.3. Messung des Resazurinumsatzes	42
2.2.4. Messung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP)	43
2.2.5. Berechnung des Ansprechens auf PEMF-Stimulation	45
2.2.6. Quantifizierung der Matrixmineralisierung	45
2.2.7. Quantifizierung der gebildeten ROS mittels DCFH-DA Assay	47
2.2.8. qRT-PCR	48
2.2.8.1. Allgemeines	48
2.2.8.2. Probengewinnung und -aufbereitung	49

Inhaltsverzeichnis

2.2.8.3. Poolen der Proben	52
2.2.8.4. Aufreinigung der gepoolten Probe	52
2.2.8.5. cDNA Synthese aus den gepoolten Proben	53
2.2.8.6. Spender und Gene auf den qRT-PCR Array Platten	54
2.2.8.7. qRT-PCR Protokoll	55
2.2.8.8. Auswertung	55
2.2.9. semiquantitative RT-PCR	56
2.2.9.1. cDNA Synthese	56
2.2.9.2. RT-PCR Protokoll	58
2.2.10. Enzymassays	59
2.2.10.1. Proteinisolation für die Enzymassays	59
2.2.10.2. Proteinquantifizierung nach Lowry	60
2.2.10.3. Glutathionperoxidase Enzymaktivitätsmessung nach Wedert und Cullen [180].	61
2.2.10.4. Katalase Enzymaktivitätsmessung [181]	63
2.2.10.5. Superoxiddismutase Enzymaktivitätsmessung [182]	64
2.2.10.6. Weitere Methoden:	64
3. Ergebnisse	66
3.1. Größte Unterschiede und Änderungen in der qRT-PCR	66
3.1.1. Größte Unterschiede zwischen der R- und NR-Gruppe	66
3.1.2. Größte Änderungen während des Reifungsprozesses	71
3.1.3. Änderungen bedingt durch die PEMF-Stimulation während des Reifungsprozesses	72
3.2. qRT-PCR: Gruppen die keine deutliche Änderung oder Unterschiede zeigten	74
3.2.1. Peroxiredoxin-System	74
3.2.2. Weitere Gruppen	75
3.3. Vergleich qRT-PCR und RT-PCR	77
3.3.1. SODs und UCP2	77
3.3.2. Katalase und Glutathion-abhängige Peroxidasen	78
3.3.3. Glutathion System - GSH bildendes und reduzierendes System	81

Inhaltsverzeichnis

3.3.4. CCL5	82
3.3.5. ROS-bildendes System: NADPH-Oxidase-System und Dual-Oxidasen	83
3.4. Enzymmessungen	84
3.4.1. Enzymassays	84
3.4.2. Spezifizierung der Spender (für Enzymassays) nach Ansprechen	85
3.4.3. Quantifizierung der gebildeten ROS mit DCFH-DA Messung	89
4. Diskussion	90
4.1. Einordnung der Arbeit in Vorarbeiten und Limitierung der Methodik	90
4.1.1. Einordnung der Arbeit in Vorarbeiten	90
4.1.2. Limitierungen der genutzten Methodik	90
4.2. Wie verändert sich die Genexpression während der Reifung der Osteoblasten?	93
4.2.1. welche Phase der Differenzierung wird hier mit der Reifung betrachtet?	93
4.2.2. Bedeutung der SOD, CAT, GPX und CCL5 während der osteogenen Differenzierung	94
4.2.3. Wie lassen sich die Änderungen des antioxidativen Systems während der Differenzierung einordnen?	98
4.2.4. Bedeutung der Unterschiede zwischen NR- und R-Gruppe	101
4.3. Wie wirkt sich die PEMF-Stimulation auf die Genexpression während des Reifungsprozesses aus?	103
4.3.1. Einordnung der Ergebnisse	103
4.3.2. Der PEMF-Effekt wird über eine Zunahme der intrazellulären ROS vermittelt	103
4.3.3. Wie wirkt sich das intrazelluläre ROS auf die Zelle aus?	106
4.4. Wie sinnvoll ist die hier genutzte Einteilung nach Zunahme der Reifungsmarker?	108
4.4.1. Einteilung nach Ansprechen in den Zellkulturexperimenten	108
4.4.2. Weiteres: ROS Quantifizierung mittels DCFH-DA Messung	112

Inhaltsverzeichnis

4.5. Ausblick	112
5. Zusammenfassung	114
6. Literaturverzeichnis	116
7. Anhang – Abbildungen und Tabellen	128
7.1. Anhang zu Materialien	128
7.2. Ergebnisse	135
7.2.1. Heatmap: Übersicht	135
8. Erklärung zum Eigenanteil	138
9. Veröffentlichungen	139
10. Danksagung	141

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

95 %-KI	95 %-Konfidenzintervall
bspw.	beispielsweise
CAT	Katalase, engl. Catalase
CC	Kapazitive Kopplung, engl. "capacitive Coupling". Erzeugung eines elektrischen Feldes im Gewebe mittels Elektroden auf der Hautoberfläche
d	Tag/e
DC	(invasive) Gleichspannung, engl. "direct current" oder "invasive direct electrical current". Erzeugung eines elektrischen Feldes im Gewebe mittels invasiver Elektroden
EF	elektrisches Feld
ELF-PEMF	hier genutztes pulsierendes elektromagnetisches Feld des extrem-nieder-frequenten Bereichs, engl. „extremely low-frequency pulsed electromagnetic field“
EMF	elektromagnetisches Feld
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GPX	Glutathion Peroxidase
GSH	reduziertes Glutathion
GSR/GR	Glutathion-S-Reduktase/ Glutathion-Reduktase
GSSG	oxidiertes Glutathion
h	Stunde/n
HKG	Haushaltsgen (engl. Housekeeping Gene)
IC	Induktive Kopplung, engl. "inductive Coupling". Erzeugung des Magnetfeldes bzw. elektrischen Feldes im Gewebe mittels Induktion. Hier genutzter technischer Ansatz zur Magnetfeldstimulation
Lsg	Lösung
MF	magnetisches Feld
min	Minuten
MW	Mittelwert
NR-Gruppe	Non-Responder-Gruppe
o.g.	oben genannt

Abkürzungsverzeichnis

OD	optische Dichte, engl. optical density. Einheit bei Messungen mit dem OmegaPlate Reader
PEMF	pulsierendes elektromagnetisches Feld
PEMF-Stimulation	Behandlung mit dem Somagen- ELF-PEMF 16 Hz einmal täglich
phOB	primäre humane Osteoblasten
R-Gruppe	Responder-Gruppe
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
sec	Sekunden
SOD	Superoxiddismutase
sog.	so genannte
v.a.	vor allem
vs.	versus
Vol.	Volumen
WB	Western-Blot

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: chemische Entstehung der wichtigsten ROS nach Scandalios 2005 [99]	22
Abbildung 2: wichtigste enzymatische Abbauewege der Antioxidantien nach Scandalios 2005 [99]	22
Abbildung 3: intrazelluläre ROS (mit DCFH-DA gemessen) nach PEMF-Stimulation (aus [165]).	30
Abbildung 4: Vorgehen im Versuchskonzept	32
Abbildung 5: Versuchsablauf Zellkulturen: Schematische Darstellung des Versuchskonzepts und zeitlichen Ablaufs der Zellkulturexperimente und Proteinisolation.	37
Abbildung 6: Versuchsaufbau während der PEMF-Stimulation. Versuchsaufbau während der PEMF-Stimulation mit dem 16 Hz PEMF. Grafik aus [51].	42
Abbildung 7: Phasen der Reifung von Osteoblasten in Zellkulturen. Darstellung der 3 Phasen bei Osteoblasten isoliert aus Schädeldecken von Ratten, nach Lian und Stein [49].	44
Abbildung 8: Scatter-Plot: größte Unterschiede zwischen NR- und R-Gruppe am Tag 0 vor Induktion der Reifung.	67
Abbildung 9: Scatter-Plot: größte Unterschiede zwischen NR- und R-Gruppe am Tag 2 nach Reifung.	69
Abbildung 10: Scatter-Plot: größte Unterschiede zwischen NR- und R-Gruppe am Tag 2 nach PEMF-Stimulation während Reifung.	71
Abbildung 11: Darstellung der Zunahme der Expression während des Reifungsprozesses.	72
Abbildung 12: Darstellung der Expressionsänderung bedingt durch die PEMF-Stimulation.	73
Abbildung 13: qRT-PCR Array: Ausschnitt mit dem Peroxiredoxin-System und Expression der Gene in der qPCR.	75
Abbildung 14: qRT-PCR Array: Ausschnitt mit verschiedenen Zusammenhängenden Genen in größeren Gruppen zusammengefasst. Expression der Gene in der qPCR.	76
Abbildung 15: qRT-PCR Array: Ausschnitt mit <i>UCP2</i> , <i>SODs</i> und <i>SOD</i> assoziierten Genen und Expression der Gene in der qPCR.	78
Abbildung 16: qRT-PCR Array: Ausschnitt mit <i>CAT</i> und Glutathion abhängigen Peroxidasen und Expression der Gene in der qPCR.	80
Abbildung 17: semiquantitative RT-PCR: <i>CAT</i> , <i>GPX1</i> , <i>GPX3</i> .	81
Abbildung 18: qRT-PCR Array: Ausschnitt mit GSH bildendem und reduzierendem System und Expression der Gene in der qPCR.	82
Abbildung 19: semiquantitative RT-PCR: <i>GSR</i> .	82
Abbildung 20: qRT-PCR Array: Ausschnitt der Heatmap mit <i>CCL5</i> und semiquantitative RT-PCR mit <i>CCL5</i> .	83
Abbildung 21: qRT-PCR Array: Ausschnitt der Heatmap mit NADPH-Oxidase-System und Dual-Oxidasen und Expression der Gene in der qPCR.	84
Abbildung 22: semiquantitative RT-PCR mit <i>NOX 4</i> .	84
Abbildung 23: Messung Enzymaktivitäten: Non-Responder-Gruppe und Responder-Gruppe. Dargestellt ist die relative Zunahme oder Abnahme der Enzymaktivität relativ zur unbefeldeten Kontrolle.	85

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 24: Darstellung des PEMF-Effekts, relativer Zuwachs oder Abnahme in %. Entsprechend der Einteilung für die qPCR wurde die Grenze für die Trennung nach Responder und Non-Responder bei ca. 64% Gesamtansprechen gesetzt. 86
- Abbildung 25: Quantifizierung des Ansprechens auf PEMF-Stimulation: Resazurin-Konversion, AP-Aktivität und Quantifizierung der Matrixmineralisierung an mittels AlizarinRot-Färbung. 88
- Abbildung 26: DCFH-DA-Messung 89
- Abbildung 27 vollständige Heatmap: Übersicht qRT-PCR Array ohne Trennung nach Gruppen. Auch aufgeführt sind die Gene welche aufgrund geringer Expression von einer Auswertung ausgenommen wurden. 137

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über verschiedene Methoden der elektrischen und elektromagnetischen Stimulation	5
Tabelle 2 EMF-Effekte bei <i>in vivo</i> Studien und klinischen Studien nach pathologischer Situation	6
Tabelle 3: EMF-Effekte auf verschiedene Knochenzellen	10
Tabelle 4: Einflussfaktoren bei <i>in-vitro</i> Studien	11
Tabelle 5: Übersicht über beschriebene Wirkmechanismen von PEMF-Stimulation auf Knochenzellen nach Yuan et al. 2018	15
Tabelle 6: Übersicht der verschiedenen Gruppen reaktiver Spezies nach Sies <i>et al.</i> [93]	20
Tabelle 7: Zusammenfassung der Eigenschaften der wichtigsten ROS nach Schieber und Chandel 2014 [97]	22
Tabelle 8: Übersicht über Funktion der untersuchten oxidativen Stress Gene auf dem qRT-PCR Array „Human Oxidative Stress Plus - Qiagen PAHS-065Y“.	23
Tabelle 9: Übersicht über Spender	33
Tabelle 10: Auflistung der genutzten Kits	34
Tabelle 11: Primer und optimierte Primerbedingungen	34
Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Software	35
Tabelle 13: Lösungen Zellkulturen	38
Tabelle 14: Menge Zellmedium bei unterschiedlichen Gefäßen	38
Tabelle 15: Lösungen mechanische Isolation	39
Tabelle 16: Lösungen Resazurinumatz	42
Tabelle 17: Lösungen AP-Aktivität	43
Tabelle 18: Lösungen Alizarinrot Quantifizierung	45
Tabelle 19: Lösungen DCFH-DA Assay	47
Tabelle 20: Lösungen Isolation mRNA	49
Tabelle 21: Lösungen Gelelektrophorese	50
Tabelle 22: Lösungen Überprüfung der Integrität	51
Tabelle 23: Übersicht über die Verteilung der nRNA Mengen in den gepoolten Gruppen.	53
Tabelle 24: qPCR Array: Gene und Übersicht der Anordnung beim Human Oxidative Stress Plus Array.	54
Tabelle 25: Zeiten der einzelnen RT-PCR Schritte	58
Tabelle 26: Lösungen Proteinisolation	59
Tabelle 27: Lösungen Proteinquantifikation nach Lowry	60
Tabelle 28: Lösungen Aktivitätsbestimmung der GPX	61
Tabelle 29: Pipettierprotokoll SOD-Messung	64
Tabelle 30: Tag 0 – Übersicht über das Verhältnis der Expressionen im Gruppenvergleich	67
Tabelle 31: Tag 2 unbefeldet - Übersicht über das Verhältnis der Expressionen im Gruppenvergleich	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 32: Tag 2 befudet - Übersicht über das Verhältnis der Expressionen im Gruppenvergleich	70
Tabelle 33: Zusammenfassung der Änderungen in Gruppen entsprechend Abbildung 12.	73
Tabelle 34: Tabellarische Aufführung des errechneten Ansprechens für alle 11 Spender der Enzymassays.	86
Tabelle 35: Verwendete Chemikalien und Substanzen	128
Tabelle 36 Auflistung Verbrauchsmaterialien	130
Tabelle 37: qRT-PCR Array Genübersicht (englisches Original) Human Oxidative Stress Plus - Quiagen PAHS-065Y	131
Tabelle 38: Auflistung der verwendeten Geräte	133

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

1.1. Frakturheilung als gesellschaftliche Herausforderung

1.1.1. Demografischen Entwicklung

Aufgrund einer hohen Lebenserwartung und geringer Geburtenrate altert die Bevölkerung in Deutschland zunehmend. Die ungleiche Verteilung der Lebensalter wird noch verstärkt durch geburtenstarke Jahrgänge der 50er und 60er Jahre. Nach Berechnungen des Statistischen Bundesamts werden schon 2040 ca. 29 % der Bevölkerung älter als 65 Jahre und 10 % älter als 80 Jahre alt sein [1]. Im Gegensatz zu einer „einfachen“ Fraktur bei jungen Menschen, bedeuten Frakturen in höherem Lebensalter häufig einen komplikationsreichen und langwierigen Heilungsprozess. Gründe hierfür sind u.a. Multimorbidität, Osteoporose, verzögerte Frakturheilung oder Infektionen.

1.1.2. Osteoporose

Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko für Osteoporose. 2010 litten in Europa geschätzte 22 Millionen Frauen und 5,5 Millionen Männer unter Osteoporose [2]. Ab 50 Jahren nimmt die Inzidenz von, mit Osteoporose assoziierten, Frakturen stark zu. Die Zahl der in 2010 neu aufgetretener, Osteoporose assoziierter, Frakturen wird auf 3,5 Millionen in Europa geschätzt. Davon ca. 620.000 Hüftfrakturen, 520.000 Wirbelkörperfrakturen und 560.000 Unterarmfrakturen. Vertebrale Frakturen entstehen meist ohne Stürze als Instabilitätsfrakturen, nicht-vertebrale Frakturen entstehen mehrheitlich durch Stürze [2]. Ältere Menschen sind hiervon besonders betroffen, da das Sturzrisiko mit zunehmendem Alter ansteigt [3].

1.1.3. Verzögerte Frakturheilung und Pseudarthrosen

Verzögerte Frakturheilung und Pseudarthrosen erfordern eine aufwändige und spezialisierte Therapie mit oftmals mehreren Eingriffen und langwierigen Heilungsverläufen. Schätzungen gehen davon aus, dass 5-10 % aller Frakturen eine verzögerte Knochenheilung zeigen oder in eine Pseudarthrose übergehen [4, 5]. Die Angaben variieren stark, je nach anatomischer Lokalisation und Definition von Pseudarthrose bzw. verzögerter Knochenheilung [6].

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

Bei den Risikofaktoren für verzögerte Frakturheilung unterscheidet man nach Patientenabhängigen und Patientenunabhängigen Risikofaktoren: Patientenabhängige Risikofaktoren sind fortgeschrittenes Alter, Komorbiditäten, Geschlecht, Rauchen, Einnahme von NSAR, verschiedene genetische Störungen, metabolische Erkrankungen und Malnutrition. Patientenunabhängige Risikofaktoren sind z.B. das Frakturmuster, die Lokalisation der Fraktur, der Grad der Dislokation, die Ausprägung der Weichteilschädigung, der Grad des Knochenverlusts, die Qualität der chirurgischen Versorgung und das Vorhandensein einer Infektion [6].

1.1.4. Folgen: Mortalität und Kosten

Frakturen sind mit einer erhöhten Mortalität assoziiert. Selten verursachen Frakturen direkt den Tod, vielmehr erfolgt dies indirekt. Insbesondere bei älteren Patienten mit Komorbiditäten kann, durch die Fraktur und assoziierten Komplikationen, eine Abwärtsspirale getriggert werden. Etwa 20 % der Patienten mit Hüftfraktur sterben innerhalb des 1. Jahres nach dem Frakturereignis [7]. Die Todesfälle verursacht durch Frakturen wurden in Europa für das Jahr 2010 auf 43.000 geschätzt [2].

Frakturen bedeuten auch hohe Kosten. Dabei sind direkte und indirekte Kosten zu unterscheiden. Direkte Kosten sind z.B. Kosten für Operation, Krankenhausaufenthalt, Rehabilitation und Medikation. Die oftmals vorhandenen Komorbiditäten erhöhen die direkten Kosten noch zusätzlich und bedingen häufigere postoperative Komplikationen. Indirekte Kosten sind schwerer abschätzbar, dazu gehören z.B. Kosten durch den Produktivitätsausfall und bleibende Beeinträchtigungen mit entsprechenden Pflegekosten. In Europa werden die indirekten Kosten bei verzögerter Frakturheilung auf ca. 80-90 % der Gesamtkosten geschätzt [6]. Allein die Kosten durch Frakturereignisse und Instabilitätsfrakturen, in der europäischen Union, wurden für das Jahr 2010 auf 37 Milliarden Euro geschätzt [2].

1.2. Elektromagnetismus in der Medizin

Angesichts einer alternden Gesellschaft, mit den Herausforderungen der Frakturbehandlung in dieser Altersgruppe, entsteht ein großes Anwendungspotential

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

für nicht-invasive Stimulatoren des Knochenwachstums. Bei verzögerter Frakturheilung und Pseudarthrosen ist die Stimulation mit elektromagnetischen Feldern (EMF-Stimulation) in den USA schon seit etwa 40 Jahren von der FDA (U.S. Food and Drug Administration) als Therapieoption zugelassen [8] und seit den 50er Jahren wird das Thema weltweit erforscht [8]. Jedoch ist die EMF-Stimulation bis heute nicht im klinischen Alltag angekommen. Woran liegt das? Gründe hierfür finden sich in einer historisch bedingten Assoziation zur Alternativmedizin und Esoterik, einem möglichen karzinogenen Potenzial das diskutiert wird und einer nicht eindeutigen und teils widersprüchlichen Studienlage.

1.2.1. Die historische Perspektive

Die Anwendung von Magnetismus oder elektrischem Strom in der Medizin ist beinahe so alt wie deren jeweilige Entdeckung. Schon in der Antike wurden von griechischen Heilern Magnete zur Behandlung von Arthritis genutzt [9]. Auch Ende des Mittelalters, zu Beginn der Renaissance, wurden Magneten wunderbare Kräfte zugeschrieben, z.B. als Aphrodisiakum, zur Behandlung von Kahlheit, zur Wundreinigung, in der Behandlung von Arthritis und Gicht. Dies scheint in der damaligen Gesellschaft weitgehend akzeptiert gewesen zu sein [9]. Mit dem Aufschwung der Wissenschaft begann dann ein zunehmend kritisches Hinterfragen und Überprüfen der zugeschriebenen Effekte. Forscher, wie der Arzt Thomas Browne, untersuchten die Wirkung des Magnetismus in der Medizin und setzten es mit Wunschdenken gleich [9]. Diese Spannung aus Faszination und kritischer Haltung zieht sich durch die weitere Geschichte. In den USA des 19. Jahrhunderts wurden z.B. magnetische Haarbürsten gegen Kahlheit und Kopfschmerzen, oder Korsetts gegen Schwäche und Nervosität verkauft. Zeitgleich wurden erste ausführliche wissenschaftlich Untersuchung an Menschen und Tieren durchgeführt, hier konnte keine Wirkung auf den Organismus nachgewiesen werden [9, 10]. Aus dieser Zeit stammt jedoch auch die Entwicklung heute gebräuchlicher medizinischer Methoden wie z.B. die elektrische Kardioversion, die elektrokonvulsive Krampftherapie, die transkranielle Magnetstimulation und die transkutane Muskelstimulation. Erste erfolgreiche Fallberichte der Stimulation von Knochenheilung mittels elektrischem Strom reichen bis in das Jahr 1841 zurück [11]. Heute findet sich magnetische Stimulation v.a. bei alter-

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

nativen Heilmethoden wieder, z.B. beim Tragen von magnetischen Amuletten und Schmuck [9].

1.2.2. Elektromagnetismus als potentielles Karzinogen

In den 70er und 80er Jahren rückten zunehmend Bedenken bezüglich Folgen von EMF für Gesundheit und Umwelt in den Fokus der Forschung [9]. ELF-EMF= extremely low frequency electromagnetic fields sind EMF in dem Frequenzbereich 0-300 Hz [12]. Diese gehen in unserer Umwelt u.a. von elektronischen Geräten wie Haushaltsgeräten, Bildschirmgeräten und Stromleitungen aus. Ausgelöst wurden diese Bedenken durch mehrere epidemiologische Studien die u.a. einen Zusammenhang zwischen der Exposition von ELF-EMF und Leukämien im Kindesalter zeigten [9]. In einer Stellungnahme von 2016 bestätigt die WHO eine „mögliche Karzinogenität“. Dies gelte insbesondere für Leukämie bei Kindern. Für die Bewertung der Kausalität fehlten 2016 ausreichend Studien: Der Zusammenhang sei auf eine hohe Exposition begrenzt und würde im Falle einer Kausalität nur einen kleinen Teil der jährlichen Neuerkrankungen ausmachen [13].

Eine grundsätzliche Problematik bei epidemiologischen Studien hierzu ist die Schwierigkeit des Studiendesigns. So wurden in den ersten Studien Störfaktoren und Cofounder ignoriert, die Exposition falsch abgeschätzt und statistisch unsauber gearbeitet [9, 13, 14]. In Laborexperimenten konnte für die potentielle Karzinogenität bislang kein Mechanismus identifiziert werden [13].

1.2.3. Therapeutischer Einsatz elektromagnetischer Felder in der Medizin

Das therapeutische Potential von Elektromagnetismus wird in vielen sehr unterschiedlichen medizinischen Bereichen erforscht, u.a. in der Schmerztherapie (bei postoperativer Schmerztherapie [15], beim chronischen Rückenschmerz trotz Operation sog. „failed back surgery“ [16]), in der Modulation der Differenzierung von Stammzellen [17], bei neurologischen Erkrankungen (Morbus Parkinson [18], Rückenmarksverletzungen [19]), in der Onkologie (z.B. als Zusatz zur konventionellen Therapie bei Glioblastomen [20] oder therapeutisch bei dermatologischen Tumoren [21]), zur Modulation autoimmuner Prozesse [22],

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

zur Verbesserung der Wundheilung [23], zur Behandlung chronischer Entzündungen, zur Durchblutungsförderung und zur Behandlung der Osteoarthritis [24, 25]. Eine Übersicht über die Anwendungen am Knochen bietet Tabelle 2.

1.3. Überblick der Anwendung am Knochen

1.3.1. Unterschiede der technischen Ansätze

Tabelle 1: Übersicht über verschiedene Methoden der elektrischen und elektromagnetischen Stimulation

Technische Ansätze der elektrischen und elektromagnetischen Stimulation am Knochen	
Invasive elektrische Gleichspannung (DC = "direct current" oder "invasive direct electrical current")	
<p>Eine oder mehrere Kathoden werden auf beiden Seiten des Frakturspalts in den Knochen implantiert während die Anode in Weichteilgewebe in der Nähe oder auf der Haut über der Fraktur platziert wird. Die Stimulation erfolgt hier mit einer Gleichspannung über einen längeren Zeitraum z.B. 12 Wochen. Dieses Verfahren wurde in klinischen Studien bei verzögerter Frakturheilung, Pseudarthrosen und auch bei Wirbelsäulenversteifungen, Gelenkversteifungen und Charcot-Fuß Rekonstruktionen angewandt.</p> <p>Heutzutage wird dies Verfahren selten angewendet. Die Batterie wird implantiert und nach 6-8 Monaten explantiert. Vorteil ist hierbei die Compliance da Probanden das Gerät nicht aktiv nutzen müssen. Nachteil sind die lange Behandlungszeit, das Infektionsrisiko, mögliche Kurzschlüsse und der erneute OP-Eingriff zur Explantation.</p>	[26-28]
Elektrisches Wechselfeld durch kapazitive Kopplung (CC = „capacitive coupling“)	
<p>Auf der Hautoberfläche werden auf Höhe des Frakturspalts Elektroden angebracht, sodass der Frakturspalt zwischen den Elektroden liegt. Durch Anlegen einer Wechselspannung wird ein elektrisches Feld im Frakturspalt erzeugt. Der Effekt ist von der jeweiligen Dosis (Feldstärke und Dauer der Exposition in Kombination) und auch von der spezifischen Feldstärke abhängig.</p>	[26]
Induktion (IC = "inductive coupling")	
<p>Eine Spule wird auf Hautniveau über der Fraktur aufgelegt. Hiermit wird mittels Wechselspannung ein magnetisches Feld innerhalb des Frakturspalts erzeugt. Dieses wiederum erzeugt im Frakturspalt ein elektrisches Feld. Dabei ist die Feldstärke entsprechend abhängig von der Stärke des erzeugten magnetischen Feldes und von den physikalischen Eigenschaften des Gewebes um die Fraktur. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die Abhängigkeit von der Compliance. Je nach Dauer der Stimulationszeiten, muss der Patient das Gerät teilweise 8 h /Tag tragen. Der größte Vorteil dieses Verfahrens ist die fehlende Invasivität.</p>	[27].

Neben diesen Ansätzen gibt es auch Abwandlungen dieser Techniken wie z.B. die Implantation eines EMF-Generators in einem osteosynthetischen Schraubensystem [29]. Interessanterweise zeigen alle drei Ansätze verschiedene Wirkmechanismen wie Knochenwachstum stimuliert wird. Z.B. wird sowohl beim IC als auch beim CC der Effekt über eine Änderung der Wachstumsfaktoren und des transmembranären Signalings vermittelt [28]. In der vorliegenden

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

Arbeit wendeten wir das Prinzip der IC-Stimulation an. Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Wirkmechanismen beziehen sich entsprechend auf den Mechanismus des „inductive coupling“. Auch hier gibt es Unterschiede in der Form des elektromagnetischen Wechselfeldes (siehe Tabelle 4). Die in der vorliegenden Arbeit genutzte Technik des PEMF (pulsierendes elektromagnetisches Feld) besteht in der Applikation von kurzen Pulsen die sich in Anzahl, Pausenintervallen und zeitlicher Abfolge unterscheiden können. Somit fallen unter den Begriff PEMF verschiedene Signalmorphologien [30].

1.3.2. *in vivo* Studien – Zusammenfassung der Studienlage

Ein großer Teil der Studien zur EMF-Stimulation besteht aus klinischen Studien. Die *in vivo* Studien der EMF-Stimulation am Knochen zeigen eine große Heterogenität in den Studiendesigns. Es werden verschiedene pathophysiologische Situationen, anatomische Lokalisationen und auch unterschiedliche technische Parametern (z.B. Frequenz und Applikationszeit) verwendet. Im Folgenden sind die Ergebnisse zu IC-Stimulation, getrennt nach pathophysiologischer Situation und Tiermodellen bzw. klinischen Studien, zusammengefasst.

Tabelle 2 EMF-Effekte bei *in vivo* Studien und klinischen Studien nach pathologischer Situation

Übersicht der EMF-Effekte nach verschiedenen pathophysiologischen Situationen	
Postmenopausale Osteoporose	
Tiermodelle	
In Tiermodellen wurde mittels Ovariectomie eine Osteoporose induziert. Genutzt wurden Frequenzen von 7,5-50 Hz mit Feldstärken von 0,1-3,8 mT, bei Expositionszeiten zwischen 40 min-8 h/d über bis zu 12 Wochen. In verschiedenen Studien ließ sich der Knochenverlust und Verlust der internen Knochenstruktur durch PEMF verhindern. Jedoch ließen sich diese Ergebnisse teilweise nicht reproduzieren. Mögliche Erklärungen hierfür sind Unterschiede des Studiendesigns und applizierter Signale. Z.B. zeigte eine Befeldung tagsüber einen deutlichen stärkeren Effekt als eine Befeldung nachts.	[31-34]
Klinische Studien	
Verschiedene Studien zeigten eine Zunahme der BMD („bone mineral density“ = Knochendichte) unter PEMF Behandlung. Hier gibt es jedoch große Unterschiede der EMF-Parameter in den verschiedenen klinischen Studien. So wurden Frequenzen von 8-100 Hz, Feldstärken von 0-3,8 mT und Expositionszeiten von 10 min-h/d bis zu 3 Monaten untersucht. Die Ergebnisse sind nicht einheitlich. Das Outcome ist in vielen Studien unterschiedlich definiert und meist sind die Patientenzahlen klein. Zhu et. al. kommt 2017 zu dem Schluss, dass es aktuell keine hochqualitative klinische Studie gebe. 1998 konnte eine Zunahme der BMD unter PEMF Behandlung nach 6 Wochen bei 12 Wochen Stimulationszeit gezeigt werden. Jedoch nach 36 Wochen eine Abnahme.	[30, 31, 35, 36]

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

<p>Auch konnte kein Langzeiteffekt auf die BMD nach 8 Jahren follow up-Untersuchung gezeigt werden. Eine neuere Studie aus dem Jahr 2013 zeigte für EMF-Stimulation den gleichen Effekt wie eine medikamentöse Therapie mit Alendronat über 24 Wochen (8 Hz, 3,82 mT, 40 min/d für 6 Tage/ Woche).</p>	
<p>Aseptische Knochennekrose</p>	
<p>Klinische Studien</p>	
<p>In verschiedenen Studien zeigte sich eine PEMF Behandlung als förderlich, insbesondere in frühen Stadien. Hier konnte in 80-89 % die Progression aufgehalten und der Femurkopf erhalten werden. Auch Gelenkschmerzen und das subchondrale Knochenmarksödem konnten verbessert werden. In späteren Stadien konnten diese positiven Ergebnisse nicht bestätigt werden. Hier konnte nur bei jungen Patienten ein Effekt gezeigt werden. Insbesondere bei kollabiertem Femurkopf konnten keine positiven Effekte gezeigt werden. In Kombination von PEMF mit Dekompression und Implantation von autologem Knochen konnten die Ergebnisse in mittleren Stadien zusätzlich verbessert werden.</p>	<p>[37, 38]</p>
<p>Knochenfrakturen</p>	
<p>Tiermodelle</p>	
<p>Grundsätzlich zeigt sich in Tiermodellen eine signifikante Beschleunigung des Reparaturprozesses. Jedoch zeigt sich bei längerer Stimulation (über die Reparaturphase hinaus) ein Ausbleiben der Verbesserung bis hin zu einer Hemmung. So kann PEMF zu verschiedenen Zeitpunkten während des Reparaturprozesses die Zellproliferation und -differenzierung entweder stimulieren oder hemmen. Dies ist auch von dem Zelltyp abhängig. Die Stimulationsparameter variieren sehr deutlich zwischen den verschiedenen Studien. In den meisten Fällen wird die Proliferation während der aktiven Proliferationsphase stimuliert. Während der Differenzierungsphase wird meist die Differenzierung und Gewebsbildung stimuliert. Während in der Mineralisierungsphase die Knochengewebsbildung und Proliferation abnimmt.</p>	<p>[39]</p>
<p>Klinische Studien</p>	
<p>Aleem <i>et al.</i> bewerteten 2016 in einem systematischen Review verschiedene Studien zu dem Thema Knochenheilung und elektrische Stimulation. Eingeschlossen wurden klinische Studien zu verschiedenen pathophysiologischen Situationen wie akuten Frakturen, verzögerter Frakturheilung und chirurgischen Osteotomien. Hier zeigte sich, dass Patienten welche mit elektrischer Stimulation behandelt wurden, signifikant weniger Schmerzen hatten und weniger verzögerte Frakturheilung oder Pseudarthrosen zeigten.</p>	<p>[40]</p>
<p>Verzögerte Frakturheilung und Pseudarthrosen</p>	
<p><u>Klinische Ergebnisse:</u> Bei dem Endpunkt Heilung einer Pseudarthrose zeigten sich durch elektrische Stimulation im Schnitt Erfolgsraten von 81 %, bei chirurgischer Graft-Implantation mit oder ohne interne Fixierung im Schnitt 82 %. Hier bestehen auch zwischen den verschiedenen Methoden (IC/CC/DC) der elektrischen Stimulation leichte Unterschiede. In 10-15 % der Fälle konnte weder durch eine chirurgische noch durch eine elektrische Stimulationstherapie eine Heilung erzielt werden. Insbesondere in diesen Fällen zeigte eine Kombinationstherapie aus elektrischer Stimulation und Graft-Implantation doch noch Erfolge (87 bzw. 93 %). Auch in kontrollierten Studien zeigte sich eine Überlegenheit der PEMF-Therapie gegenüber einer Placebothherapie (45 % Heilung vs. 12 % Heilung).</p> <p><u>Bewertung der Studienlage:</u> Trotz FDA Zulassung vor etwa 40 Jahren und positiven Effekten in vielen Studien ist die Evidenz für EMF-Stimulation aktuell als gering einzustufen. In einem Cochrane Review 2011 zu Pseudarthrosen langer Röhrenknochen, von Griffin <i>et al.</i> wird die Studienlage als nicht ausreichend angesehen, um Handlungsempfehlungen abzuleiten. Die Studienlage sei dafür nicht ausreichend schlüssig und</p>	<p>[28, 30, 37, 39-42]</p>

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

<p>unzureichend. Hierfür werden mehr hochwertige randomisierte kontrollierte Studien benötigt. Diese Aussage wird auch 2016 bestätigt [40]. Chalidis <i>et al.</i> kommen 2011 zu dem Schluss, PEMF könne zur Unterstützung der Knochenheilung eingesetzt werden da es eine sichere nicht-invasive Methode ist und keine negativen Effekte beschrieben sind, auch wenn die Studienlage nicht einheitlich sei.</p> <p><u>Heterogenität und Qualität der Studien:</u></p> <p>Es besteht eine große Heterogenität bei klinischen Studien, z.B. in der technischen Form der Stimulation, Stimulationsparametern, Probandengruppen, Studiendesigns, Nachsorgezeiträumen und auch den beurteilten Endpunkten. Viele Studien sind nur Beobachtungsstudien und damit unkontrollierte longitudinale Kohortenstudien, da sie auf der Grundannahme aufbauen, dass Pseudarthrosen äußerst selten eine spontane Heilung zeigen. Hinzu kommt die oftmals geringe Anzahl an Probanden in den Studien. Insbesondere die geringe Vergleichbarkeit bedingt in der Summe eine geringe Evidenz. Die Effizienz der Stimulation variiert deutlich zwischen den Studien, diese Unterschiede können jedoch Patienten oder Frakturvariablen nicht klar zugeordnet werden.</p>	
Akute Frakturen	
Für akute Frakturen die konservativ behandelt werden zeigt sich ein positiver Effekt durch die PEMF Stimulation. Hierdurch wird die Zeit bis zur radiologisch sichtbaren Heilung verkürzt. Jedoch zeigt sich kein ausreichender Vorteil, der für eine Routine-Behandlung mit PEMF sprechen würde.	[43]
Arthrodesen	
Untersucht wurden Arthrodesen des Sprunggelenks, hier zeigte sich eine schnellere Verbindung der Knochen durch die PEMF-Behandlung.	[44]
Osteotomien	
Unterstützung der Knochenheilung bei chirurgisch bedingtem großem Frakturspalt. Hier zeigte sich PEMF-Behandlung als vorteilhaft.	[28]
Osseointegration von Prothesen	
Durch PEMF konnte die Osseointegration von Titanprothesen verbessert werden.	[45]
Spondylodesen	
Einige Studien zeigen unterstützende Effekte, durch PEMF-Behandlung. Ein systematisches Review aus dem Jahr 2014 bewertete das Evidenzlevel für diesen Zusammenhang als gering. Dies liege vermutlich an der Heterogenität der Patientengruppen, Studiendesigns und Qualität der Studien.	[28, 46, 47]

1.3.2.1. Probleme und Herausforderungen bei *in vivo* Studien

1.3.2.1.1. Tiermodelle

Tiermodelle bieten Vorteile für bestimmte Fragestellungen, z.B. um den Prozess der Frakturheilung besser zu verstehen. In Tiermodellen können Erkenntnisse aus Zellkulturen im komplexeren Gewebekontext untersucht werden und so der Einfluss von Zelleffekten im Zusammenspiel verschiedener Zelltypen im Organismus beobachtet werden. Der große Nachteil ist die Herausforderung der Übertragbarkeit von Erkenntnissen aus Tiermodellen. Z.B. sind viele Erkrankungen spezifisch für die Spezies und es bestehen Unterschiede in Anatomie sowie Unterschiede auf biochemischer und Genexpressionsebene. Von

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

einer Übereinstimmung kann nur ausgegangen werden, wenn sich die Ergebnisse auch beim Menschen bestätigen lassen [39].

1.3.2.1.2. Klinische Studien

Die größte Herausforderung bei der Vergleichbarkeit klinischer Studien ergibt sich durch die große Heterogenität. Dies betrifft technische Parameter wie Applikationsmethode (IC/CC/DC), Signalmorphologie, Feldstärke und Frequenz. Z.B. reichen bei dem Mechanismus des IC die Frequenzen von 15-75 kHz bei unterschiedlichen Amplituden, Feldintensitäten, Signalmorphologien und Gesamtdosen [28].

Auch das Studiendesign zeigt eine große Heterogenität. Die Auswahl der Patienten variiert in den Einschlussfaktoren (verzögerte Frakturheilung wird teilweise unterschiedlich definiert), Nebenerkrankungen und Cofoundern (z.B. Risikofaktoren für verzögerte Frakturheilung: Rauchen, Diabetes, Adipositas). Die pathophysiologische Situation unterscheidet sich ebenfalls häufig, wie z.B. die Art der Fraktur (akute Fraktur, verzögerte Frakturheilung bzw. Pseudarthrose, Osteotomie), Größe des Frakturspalts, Vorliegen einer Infektion und unterschiedliche anatomische Lokalisation der Fraktur. Hinzu kommt auch eine Variabilität in den gemessenen Endpunkten (z.B. radiologische Heilung, klinische Heilung) und Beurteilung des klinischen Ergebnisses (z.B. Schmerzen, Funktionalität, Aktivitäten des alltäglichen Lebens, Notwendigkeit einer Revisions-OP) auch sind bspw. die Nachsorgezeiträume nicht einheitlich (siehe Übersichtsarbeiten [28, 39]).

1.3.3. *In vitro* Studien

1.3.3.1. Verschiedene *in vitro* Modelle

In der vorliegenden Arbeit wurden primäre humane Osteoblasten (phOB) in Zellkulturen untersucht. Die Isolation erfolgte aus Knochenmaterial, welches im Rahmen eines chirurgischen Eingriffs als Abfall anfiel. Bei der Knochenhomöostase sind noch weitere Zelltypen aktiv, u.a. mesenchymale Stammzellen (MSC) und Osteoklasten (siehe Tabelle 3). Kurz zusammengefasst zeigt EMF-Stimulation signifikant positive Effekte auf die Osteogenese über eine Änderung

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

der Genexpression, einer Zunahme der Proliferation, verbesserter Differenzierung und verbesserter Bildung von Knochenmatrix [31, 39].

Tabelle 3: EMF-Effekte auf verschiedene Knochenzellen

Zelltyp und EMF-Effekte	Quellen
Osteoblasten	
Osteoblasten sind die einzigen Zellen die Knochen aufbauen können. Die Vorläuferzellen sind die mesenchymalen Stromazellen oder Stammzellen (MSC). Die primäre Festlegung auf die Differenzierung zu Osteoblasten wird durch „master transcriptional regulators“ reguliert. Für die osteoblastäre Linie ist dies das Runx2 (Cbfa1). Danach werden die Zellen als Präosteoblasten bezeichnet. Es erfolgt eine dreiphasige Reifung bestehend aus einer Proliferationsphase, Matrixreifungsphase und Mineralisierungsphase.	[48, 49]
Unter EMF Stimulation zeigt sich eine Verbesserung, sowohl der osteoblastären Proliferation als auch Differenzierung und Mineralisierung. In Zellkulturstudien konnte sowohl in Osteoblasten als auch bei Vorläuferzellen, eine Zunahme von Knochenbildung beobachtet werden.	[31, 39, 50, 51]
MSC (Mesenchymale Stammzellen)	
MSC sind Stammzellen des Bindegewebes. Sie können zu Adipozyten, Myozyten, Chondroblasten und Osteoblasten differenzieren [52]. Sie kommen v.a. im Knochenmark vor, aber auch im Blut, Fettgewebe, in der Skelettmuskulatur, den Bandscheiben und der Plazenta.	[53]
Die osteogene Differenzierung von MSC kann durch PEMF stimuliert werden (auch bei kurzer Stimulationszeit), sowohl in der Phase exponentieller Proliferation, als auch in der Phase der frühen Osteogenese. So zeigte z.B. ein 15 Hz, 7 mT Sinus-EMF eine Stimulation der osteogenen Differenzierung bei gleichzeitiger Hemmung der adipogenen Differenzierung.	[50, 52, 54, 55]
Osteoklasten	
Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die durch die Fusion von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark entstehen. Diese wiederum leiten sich von derselben hämatopoetischen Stammzelle ab wie die Monozyten. Ihre Hauptaufgabe ist die Resorption der Knochensubstanz.	[56]
Osteoklasten können durch PEMF-Stimulation gehemmt werden: u.a. kann die Proliferation und Differenzierung gehemmt werden, aber auch die Apoptose induziert werden. So zeigte das in der vorliegenden Arbeit genutzte PEMF keine Änderung der Funktion oder Viabilität der Osteoklasten. Aber auch in vielen anderen Studien konnte dies bei ähnlichen und anderen Frequenzen gezeigt werden: z.B. durch ein 7,5 Hz PEMF konnte die Osteoklastogenese gehemmt werden, die Knochenresorption und OPG/RANKL-Verhältnis beeinflusst werden sowie die Apoptoserate verstärkt werden .	[50, 51, 57-60]

1.3.3.2. Probleme und Herausforderungen bei *in vitro* Studien

Auch beim Vergleich von *in vitro* Studien zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei *in vivo* Studien. So gibt es hier verschiedene technische Applikationsmethoden und jeweils Unterschiede in den technischen Parametern der EMF (Frequenz, Amplitude, Stärke des EF, Form des Wechselfeldes). Hinzu kommen jeweils Unterschiede in Kultivierung, Medien und Zelllinien. Manche der beobachteten Stimulationswege und Mechanismen sind von diesen technischen Spezifikatio-

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

nen abhängig [28, 42] (siehe Tabelle 4). Trotz der Verwendung verschiedener technischer Parameter in Klinik und Forschung ist oft nicht ersichtlich warum diese ausgewählt wurden. Hinzu kommt erschwerend die eingeschränkte Übertragbarkeit der Parameter von *in vitro* auf *in vivo* Ebenen. Insbesondere bei dem Prinzip der IC kann nicht davon ausgegangen werden, dass die applizierten Dosen und Parameter so am gewünschten Wirkungsort ankommen wie dies in Kulturstudien simuliert wurde. Mehrfach zeigten Parameter, die in Zellkulturstudien und *in vivo* Modellen optimiert wurden, nicht den gleichen Effekt in klinischen Studien [39].

Tabelle 4: Einflussfaktoren bei *in-vitro* Studien

Einflussfaktor	Quelle
Applikationsform (z.B. IC / CC / DC) Die verschiedenen Applikationsformen gehen jeweils mit einem andern Wirkmechanismus einher	[26, 27, 30, 61]
Wellenform (z.B. rechteckig, dreieckig, sinusförmig, sägezahnförmig, PEMF) Versuche an Knochenzellen von Ratten: z.B. PEMF zeigte hier eine Stimulation der Proliferation mit Hemmung der Differenzierung, sinus-EMF stimulierte nur die Proliferation	[62]
Physikalische Parameter (u.a. Frequenz, Wellenform, Amplitude, Signalmorphologie) Mit einem 15 Hz Signal gleicher Signalmorphologie aber unterschiedlicher Feldstärke konnte die Differenzierung von hBMSCs zur Osteogenese aber auch zur Chondrogenese stimuliert werden [63]	[31, 51, 64, 65]
applizierte Dosis z.B. Langzeitstimulation über mehrere Stunden und Kurzzeitstimulation	[66-68]
Zelllinie und Zelltyp z.B. wurden Osteoblasten von dem hier genutzten Signal stimuliert, während Osteoklasten gehemmt wurden. Der Effekt zeigt sich auch bei anderen Zelltypen und bei unterschiedlichen Zelllinien	[31, 51, 54, 66, 69, 70]
Mögliche Abhängigkeit vom Differenzierungsstadium der Zelle z.B. MC3T3-E1 Zellen, hier zeigt sich ein unterschiedlicher Effekt je nach Differenzierungsstadium: in der Proliferationsphase wurde die Proliferation, Differenzierung und Knochenbildung stimuliert, in der Differenzierungsphase wurde die Differenzierung und Knochengewebsbildung stimuliert, in der Mineralisierungsphase wurde die Knochengewebsbildung gehemmt [71]	[31, 71]
unterschiedliche Versuchsbedingungen (z.B. unterschiedliche Zelldichte oder Unterschiede in der Kultivierungszeit)	[31]
Mediumzusätze (z.B. FCS Konzentration) Für die MG-63 Osteosarkom Zelllinie konnte eine Abhängigkeit des PEMF-Effekts von der FCS-Konzentration beobachtet werden, bei einer höheren Konzentration fiel auch der Effekt stärker aus.	[69]

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

1.4. Wirkmechanismen von PEMF

1.4.1. Physikalische Grundlagen

Entsprechend dem Faraday'schen Induktionsgesetz erzeugt ein sich zeitlich änderndes Magnetfeld ein elektrisches Wirbelfeld. Dementsprechend geht ein magnetisches Wechselfeld immer mit einem elektrischen Feld einher. Elektrische Felder werden, durch die hohe dielektrische Eigenschaft der Zellmembran, stark abgeschwächt. Für magnetische Felder gilt dies nicht, diese können tief ins Gewebe eindringen. Dadurch können MF selbst bis in die Zelle vordringen und hier biochemische und chemische Reaktionen beeinflussen. Bei dem Verfahren des IC, wird in dem Gewebe ein magnetisches Wechselfeld induziert, welches wiederum das, die Wirkung übertragende, elektrische Feld lokal erzeugt [72]. Die therapeutisch extern applizierten EMF versuchen natürlich vorkommende endogene EMF zu imitieren und dadurch auch den physiologischen Wirkmechanismus zu imitieren oder zu modulieren [73]. Diese endogenen EMF kommen ubiquitär im Körper vor und lassen sich bestimmten Funktionen und Aufgaben zuordnen [12].

1.4.2. Rolle endogener elektrischer und elektromagnetischer Felder

1.4.2.1. statische endogene elektrische Felder

Statische elektrische Felder werden durch eine Gleichspannung erzeugt. Das Potential wird hauptsächlich durch Ionen-Transporter generiert. Statische elektrische Felder sind im Körper ubiquitär. Sie spielen u.a. eine Rolle als spezifische aktiv erzeugte EF mit denen Zellverhalten gesteuert wird. V.a. während des embryologischen Entwicklungsprozesses, des normalem Gewebsumsatzes und der Gewebsregeneration [12]. Diese statischen EF haben eine Leitfunktion für die Migration und Zellteilung während der Embryogenese. Eine Unterbrechung dieser EF bedeutet ein Unterbrechen der natürlichen Entwicklung [12]. Auch während der Wundheilung lassen sich endogene EF beobachten. Dabei bildet sich ein elektrisches Feld über der Wunde, die Kathode befindet sich in der Mitte des Wundzentrums. Nach kompletter Reepithelialisierung verschwin-

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

det dieses Feld wieder [12, 74]. Ein statisches EF lässt sich auch z.B. während der Regeneration des amputierten Schwanzes bei Amphibien beobachten [12].

Extern applizierte statische EF bewirken *in vitro*, dass sich Zellen entsprechend dem Verlauf des EF ausrichten und auch die äußere Zellform entsprechend dem Feldverlauf verändern. Dies wird als Elektrotaxis oder Galvanotaxis bezeichnet [12].

1.4.2.2. Pulsierende endogene EMF

Pulsierende magnetische Felder (PEMF) sind in dem Körper viel häufiger als statische. PEMF sind in einem sehr niedrigen Frequenzbereich und entstammen z.B. Aktionspotentialen der Nerven, des Herzens, den Bewegungen der Muskulatur und den rhythmischen Bewegungen des Bindegewebes bei körperlicher Aktivität. Beim ruhigen Stehen entstehen durch Muskelaktivität Frequenzen von 5-30 Hz. Während des Gehens werden Frequenzen < 10 Hz erzeugt. Diese Felder sind oftmals durch Spitzen charakterisiert und werden deshalb als pulsierende EMF bezeichnet (PEMF) [12, 75].

Bei der Entstehung endogener EMF im Knochen kommen verschiedene Effekte zum tragen:

-Piezoelektrischer Effekt: die Verformung von Knochen erzeugt eine elektrische Spannung [76]. Die Spannung entsteht dabei in der organischen Komponente (v.a. Kollagen) und nicht in der anorganischen [77, 78]. Kompression erzeugt dabei ein elektropositives Potential und Zug ein elektronegatives Potential. Es konnte gezeigt werden, dass unter elektronegativem Potential Knochen aufgebaut wird, während unter elektropositivem Potential Knochen abgebaut wird [79]. Sehnen, Bändern und Faszien bestehen zu einem großen Teil aus Kollagen. Sie bilden 30-40 % des piezoelektrisch aktiven Gewebes. Auch die extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpels besitzt piezoelektrische Eigenschaften [12].

-Strömungspotentiale: dabei entstehen Ladungsverschiebungen durch Scherbewegungen von Flüssigkeiten im Rahmen von körperlicher Bewegung [80].

-andere elektrokinetische Prozesse, z.B. Flusseffekte in den Kanalikuli der Osteone [12].

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

Der Zusammenhang zwischen mechanischer Belastung und Knochendichte wird, durch das Wolff'sche Gesetz beschrieben. 1892 beschrieb Julius Wolff in dem „Gesetz der Transformation der Knochen“, dass bei höherer mechanischer Belastung des Knochens, ein Umbau hin zu größerer Steifigkeit erfolgt, indem die Trabekelstruktur und die Kortikalis umgebaut werden. Hingegen bei geringerer oder fehlender Belastung eine Abnahme der Knochendichte erfolgt [81]. Die Bedeutung davon zeigt sich z.B. im Weltall. Bei verminderter Gravität zeigt sich ein Rückgang der Knochendichte aufgrund einer verminderten Knochenbildung [82]. Diese Vermittlung mechanischer Signale in biochemische Signale (Vermittlung von Knochenumbau), wird als „Mechanotransduktion“ bezeichnet. Wie genau diese auf zellulärer Ebene vermittelt wird, ist bislang nicht abschließend geklärt. Jedoch spielen die oben beschriebenen elektrischen Effekte hierbei eine wichtige Rolle. Z.B. zeigen die Knochenzellen, welche durch PEMFs stimuliert werden, eine Frequenzselektivität von 15-30 Hz [12, 75] entsprechend den endogen erzeugten Frequenzen.

1.4.3. Effekte exogener EMF-Stimulation auf Zellen

Grenzwerte für Disposition von elektromagnetischer Strahlung richteten sich lange Zeit nach der theoretischen Berechnung der übertragenen Energie [83]. Diese lässt sich aus Frequenz und Amplitude berechnen und wird bei zunehmender Frequenz größer. Durch die so übertragene Energie kann z.B. die Geninformation mechanisch geändert werden indem DNA-Strangbrüche und Mutationen oder auch Schäden an Makromolekülen und Proteinen erzeugt werden. Dieser Mechanismus erklärt z.B. die Schädigung durch Röntgenstrahlung oder Strahlung im Radiofrequenzbereich.

ELF-EMF fällt jedoch in einen deutlich niedrigeren Frequenzbereich (0-300 Hz [12]), die hiervon übertragene Energie reicht rechnerisch nicht aus um molekulare Brüche zu induzieren. Jedoch ließ sich auch hier eine Beeinflussung der Genexpression beobachten [83-85]. So konnte in Zellkulturen eine Beeinflussung verschiedener Zellfunktionen gezeigt werden, u. a. der Proliferation, Differenzierung, Apoptose, DNA-Synthese, RNA-Transkription, Proteinsynthese, Phosphorylierung von Proteinen, Redox-vermittelter Anstieg von NF-kappaB,

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

Induktion von Zellschäden, Motilität von Mikrovesikeln, ATP-Synthese, Hormonproduktion, antioxidative Enzymaktivitäten, metabolische Aktivität und Inhibition der Adhärenz [86].

Generell besteht die Idee der exogenen EMF-Stimulation darin, natürlich vorkommende EMF, zu imitieren. Klinisch könnte dadurch z.B. Belastung des Knochens bei postoperativer Immobilisation imitiert werden. Dementsprechend muss das applizierte Signal kohärent sein und eine bestimmte Zeit appliziert werden. Man spricht dabei von einem „Fenster-Effekt“. Außerhalb dieses Fensters fällt die Reaktion sehr viel geringer aus. Wie sich EMF auf eine Zelle auswirken ist bislang nicht schlüssig geklärt. Dabei gibt es mehrere beschriebene Mechanismen. Beispiele sind membranständige Antennen die bei einem spezifischen EMF-Signal Bewegung in ein intrazelluläres Signal transduzieren, die Ausrichtung spannungsabhängiger Protonenkanäle in EF-Richtung, Induktion von Änderungen des Membranpotentials der Zelle welches zu einer Signalübermittlung führt, Beeinflussung über magnetische Eigenschaften einzelner Moleküle (z.B. ROS) oder eine direkte Wirkung auf spannungsabhängige Ca^{2+} Kanäle mit Signalüberleitung nach intrazellulär [75].

Auf Knochenzellen wurden ebenfalls verschiedene Wirkmechanismen von PEMF beschrieben. Die Unterschiede lassen sich teilweise, aber nicht vollständig, durch die unterschiedlichen Stimulationsparameter erklären [28, 42]. Eine Übersicht über die wichtigsten Wege während der Osteogenese und Angiogenese, zwei essentiellen Aspekten der Knochenheilung, stellte Yuan *et al.* 2018 [37] zusammen (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Übersicht über beschriebene Wirkmechanismen von PEMF-Stimulation auf Knochenzellen nach Yuan et al. 2018

Signalweg	Beschreibung
Ca^{2+} - Signaling	Das von PEMF erzeugte elektrische Wechselfeld erzeugt im Zytosol eine Freisetzung von intrazellulärem Calcium. Es erfolgt ein Anstieg des zytosolischen Calciums, eine Aktivierung des Calmodulin und eine Verbesserung der Viabilität der Knochenzellen. Stimulationsweg auf Osteoblasten: erhöhte Kalziumspiegel → Level von Stickstoffmonoxid wird erhöht → Anstieg der cGMP Synthese → Aktivierung der Protein G Kinase → Stimulierung der Differenzierung und Reifung von Osteoblasten Durch den Kalziumanstieg wird z.B. die osteogene Differenzierung der MSCs beschleunigt.

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

Wnt/beta-Catenin Signaling	<p>Das Wnt/beta-Catenin spielt eine essentielle Rolle in der Zellproliferation, Differenzierung, Entwicklung, Selbsterneuerung und Festlegung des Zellschicksals in der Differenzierung. Wnt-Liganden binden extrazellulär an den Wnt-Rezeptor und einen Korezeptor. Dies stabilisiert beta-Catenin im Zytoplasma und bewirkt dadurch eine Initiierung des Wnt/beta-Catenin Signalweges.</p> <p>Eine gesteigerte Expression des Wnt/beta-Catenin Signalings durch PEMF, bewirkt eine Aktivierung der Expression von Genen die mit der Proliferation und Differenzierung in osteoblastären Zellen assoziiert sind.</p> <p>Der Wnt/beta-Catenin Pfad spielt z.B. eine Schlüsselrolle bei der PEMF-induzierten osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen, sowie der Knochenbildung und bei knöchernen Reparaturprozessen.</p>
MAP-Kinasen	<p>Der MAPK Pfad spielt eine Rolle in der Transduktion von extrazellulären Signalen zu verschiedenen zellulären Kompartimenten und ist essenziell für die Zellproliferation, Differenzierung, Migration und Zelltod. Bspw. auch in der PEMF-stimulierten osteogenen Differenzierung und osteoblastären Viabilität und Funktion. Die klassischen MAPK sind Erk1/2, JNK und p38.</p>
FGF und VEGF	<p>PEMF beeinflussen auch die Angiogenese, hier zeigt sich ein stimulierender Effekt auf die Angiogenese. Dabei spielt das FGF und VEGF Signaling eine Rolle. Der FGF Signalweg beeinflusst die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten, sowie die Angiogenese. Der VEGF Signalweg spielt eine regulierende Rolle in der Beziehung von Osteoblasten und Endothelzellen während der Osteogenese.</p>
TGF-beta/BMP	<p>Der TGF-beta/BMP-Signalweg spielt eine wichtige regulatorische Rolle in der Knochenheilung. Durch PEMF konnte sowohl ein TGF-beta als auch ein BMP-Anstieg, in differenzierten Osteoblasten, erzeugt werden</p>

1.5. Oxidativer Stress

1.5.1. Klinische Bedeutung

Oxidativer Stress wird mit der Pathogenese sehr vieler Erkrankungen in Verbindung gebracht z.B. neurodegenerativer Erkrankungen (Alzheimer Erkrankung, Parkinson Erkrankung, Amyotrophe Lateralsklerose, Huntington Erkrankung), Lungenerkrankungen (Asthma, COPD, akutes Lungenversagen und idiopathische Lungenfibrose) sowie Volkskrankheiten wie Atherosklerose, Bluthochdruck, Diabetes und Ischämien. Nicht zuletzt wird oxidativem Stress eine regulatorische Rolle bei der Karzinogenese, bei Autoimmunerkrankungen und beim Alterungsprozess zugeschrieben [87].

Oxidativer Stress spielt ebenfalls in der Pathogenese von Knochenerkrankungen eine Rolle. Bei einem Frakturereignis entstehen große Mengen an aktiven Radikalen [88, 89]. Z.B. konnte Prasad *et al.* erhöhte Lipidperoxidation mit einem Maximum in der 2-3 Woche nach Frakturereignis beobachten [90]. ROS spielen außerdem eine Rolle in der Pathogenese der Osteoporose, sowohl bei

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

der postmenopausalen Osteoporose als auch der sekundären Osteoporose. Der Verlust von Östrogenen und Androgenen schwächt hierbei die antioxidative Aktivität [91]. Oxidativer Stress beeinflusst zudem das Bone-Remodeling indem das Gleichgewicht der osteoblastären und osteoklastären Aktivität zerstört wird [92].

1.5.2. Definition

Der Begriff „oxidativer Stress“ wurde von H. Siess im Jahr 1985 definiert, als „eine Verschiebung des Gleichgewichts aus Prooxidantien und Antioxidantien, zugunsten der Prooxidantien“ [93]. Dies beruht auf den Phänomenen der Homöostase, wonach ein System einen Gleichgewichtszustand aktiv durch interne Regulationsmechanismen aufrechterhält. Stress bedeutet dabei die Reaktion eines Systems auf eine Anforderung (durch einen Stressor) und geht mit einer temporären Abweichung von dem Gleichgewicht einher [93].

Nicht jede Abweichung vom Gleichgewicht bedeutet eine Schädigung. Es wurde zunehmend die essentielle Rolle von Redox-Reaktionen in der physiologischen Regulation wichtiger Lebensprozesse der Zelle gezeigt. In Abhängigkeit der Intensität des oxidativen Stresses unterscheidet man demnach physiologischen oxidativen Stress (Eustress) von übermäßigem toxischem oxidativen Stress (Distress). Distress führt zu Veränderung oder Schädigung von nahezu allen Biomolekülen (insbesondere Lipide, Proteine und DNA [94]) und kann auch zur Modulation bis hin zur Unterbrechung des Redox-Signalings führen [93].

Redox-Prozesse durchdringen alle fundamentalen Zellprozesse von Energiegewinnung über Metabolismus bis Proliferation, Differenzierung und Regeneration [93]. Redox-Signaling Pfade sind ebenso wichtig wie Phosphorylierungs-Dephosphorylierungs-Reaktionen. Die beiden Systeme interagieren auch durch Verbindungen untereinander. Ebenso bestehen Verbindungen zu Acetylierungs-/Deacetylierungsprozessen und auch Methylierungs-/Demethylierungsprozessen und somit zur Kontrolle der Genexpression [93].

Eine aktuelle allgemein akzeptierte Definition von oxidativem Stress berücksichtigt diese Redox-gesteuerten Regulationsprozesse:

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

Oxidativer Stress sei, "ein Ungleichgewicht von Oxidantien und Antioxidantien hin zu den Oxidantien, welche zu einer Unterbrechung des Redox-Signalings und der Redox-Kontrolle und/oder molekularen Schäden führt" [93].

Oxidativer Stress entsteht, wenn die Produktion oder der Abbau von reaktiven Spezies überfordert ist, bzw. wenn Reparatur- oder Degradierungssysteme für zerstörte Produkte beeinträchtigt sind [95].

1.5.3. "Redox regulation", "Redox signaling" und "Redox control"

Die Redox-Prozesse sind eng reguliert („redox regulation“) und lassen sich in zwei fundamentale Prozesse trennen: dem „redox signaling“ und dem „redox control“ [96]. „Redox signaling“ ist als die „Vermittlung eines Redox-Signals über ein essentielles Redox-Element von einer Quelle zu einem Ziel“ definiert [93]. Dabei werden Abweichungen, von dem Sollwert des metabolischen Fließgleichgewichts, für das Redox-Signaling verwendet. „Redox control“ bezeichnet die Kontrolle der Abweichungen in engen Grenzen und damit ein Verhindern von „Distress“ [93].

1.5.4. Spezifität des Redox Signalings

Die Spezifität des Redox-Signalings wird vor allem durch zwei Faktoren beeinflusst, einerseits durch die Spezifität und Selektivität der ROS, andererseits durch die Kompartimentierung in der Zelle.

Die jeweiligen ROS unterscheiden sich in ihren biologischen Eigenschaften (u.a. chemische Reaktivität, Stabilität und Lipid-Diffusions-Kapazität) und dadurch auch in Spezifität und Selektivität (siehe Tabelle 7 nach [97]). Jede physiologische Situation ist durch ein Muster aus Antioxidantien und Oxidantien bestimmt, ähnlich des optimalen pHs in verschiedenen Kompartimenten. Dadurch können z.B. im Phagosom Fremdkörper abgebaut werden ohne dass dies die Zelle schädigt [93]. Auch sind in den jeweiligen Kompartimenten andere Oxidantien präsent und unterschiedliche Enzyme aktiv. Dies ist z.B. von der Sauerstoffkonzentration in der nahen Umgebung und exogenen Bedingungen abhängig, sowie von dem Gewebetyp, Organ oder dem Zelltyp.

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

Entsprechend bedingen sowohl die Art des ROS als auch die lokale Konzentration, ob der Anstieg einer physiologischen Situation (Redox Signaling) oder einer toxischen Situation entspricht (Distress). Für ein effektives Signaling, muss sich die H_2O_2 Produktion in der Nähe zu der H_2O_2 abhängigen Oxidation des Zielproteins befinden. Bspw. befindet sich die NADPH-Oxidase in der Nähe plasmamembranständiger Zielproteine oder Mitochondrien bewegen sich in der Zelle zu den Zielproteinen hin welche über einen H_2O_2 -Anstieg aktiviert werden. Die Bedeutung des H_2O_2 Anstiegs abhängig vom jeweiligen Kompartimenten zeigt sich beim Knockout abbauender Enzyme. So zeigen SOD2 knockout Mäuse (Isoenzym im Mitochondrium) einen dramatisch stärker geschädigten Phänotyp als SOD1 Knockout Mäuse (Isoenzym im Zytoplasma) [97].

1.5.5. Antioxidantien und Oxidantien

1.5.5.1. Oxidantien - Übersicht

Oxidantien können sowohl exogen als auch endogen entstehen. Exogene Quellen für Oxidantien sind z.B. Tabak, Strahlung, Schadstoffe, Medikamente und Xenobiotika [87]. Endogen entstehen Oxidantien als Teil des physiologischen Stoffwechsels und im Rahmen des Redox-Signalings sowie zur Pathogenabwehr in phagozytierenden Zellen. Der Hauptteil der endogenen reaktiven Spezies in der Zelle entsteht jedoch als Teil des physiologischen Stoffwechsels der Zelle. Dadurch ist die Bildung für die Zelle unvermeidlich und der Abbau entsprechend wichtig. Reaktive Spezies, Redox Spezies oder reaktive Redox Spezies können Radikale mit freiem Elektron, stabile Verbindungen und stabile Verbindungen in elektronisch angeregtem Zustand sein. Dementsprechend besteht eine große Spannbreite in der chemischen Reaktivität der Verbindungen [93] (Übersicht siehe Tabelle 6).

Die Gruppe der ROS ist die wichtigste Gruppe der Oxidantien in aeroben Lebewesen. Sauerstoff wird für die Zellatmung, die mitochondriale Energiegewinnung benötigt und dabei entstehen als unvermeidliche Nebenprodukte des Metabolismus die reaktiven und zerstörerischen ROS die kontrolliert werden müssen. Davies bezeichnete das ambivalente Verhältnis von aeroben Lebewesen

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

und Sauerstoff als das „Sauerstoff-Paradox“: Sauerstoff ist sowohl essentiell für aerobe Lebewesen, gleichzeitig aber auch potentiell schädigend [95].

Tabelle 6: Übersicht der verschiedenen Gruppen reaktiver Spezies nach Sies *et al.* [93]

Übersicht über Oxidantien nach Sies <i>et al.</i> [93]		
Gruppe	Radikale	Nicht-Radikale
ROS (reaktive Sauerstoff Spezies)	Hyperoxid-Anion ($\cdot\text{O}_2^-$) Hydroperoxylradikal ($\text{HOO}\cdot$) Peroxylradikal ($\text{ROO}\cdot$) Hydroxylradikal ($\text{HO}\cdot$) Alkoxyradikal ($\text{RO}\cdot$)	Singulett Sauerstoff ($\text{O}_2^1\Delta_g$) (angeregtes Sauerstoffmolekül) Wasserstoffperoxid (H_2O_2) Hydroperoxide (ROOH) Elektronisch angeregte Carbonyle (RCO) ³ Ozon (O_3)
Reaktive Chlor/Brom Spezies	Chlor ($\text{Cl}\cdot$), Brom ($\text{Br}\cdot$)	Hypochlorit (OCl^-), etc.
RNS (reaktive Stickstoffspezies)	Stickstoffmonoxid ($\text{NO}\cdot$), Stickstoffdioxid ($\text{NO}_2\cdot$), etc.	Nitrite (NO_2^-), Stickstoffmonoxid Anion (NO^-), Peroxynitrit (ONOO^-), Peroxynitrate (O_2NOO^-), etc.
RSS (reaktive Schwefel Spezies)	Thiyl-Radikale ($\text{RS}\cdot$)	Thiolgruppe (RSH) und entsprechende Thiolate (RS^-) z.B. in Glutathion (GSH), Thioredoxin Disulfide (RSSR) z.B. GSSG weitere: Schwefelhaltigen Aminosäuren (Cystein, Methionin)
RCS (reaktive Carbonyl Spezies)		Acetaldehyd, etc.
Reaktive Selen Spezies		Selenocystein, Selenomethioninreste in Proteinen, etc.

1.5.5.2. ROS – endogene Entstehung und Eigenschaften

Der Hauptteil der endogenen reaktiven Spezies in der Zelle entsteht im Rahmen des aeroben Stoffwechsels im Mitochondrium [98]. Die ROS leiten sich vom Sauerstoff ab. Sauerstoff ist im natürlichen Zustand des molekularen Sauerstoffs (O_2) chemisch stabil und relativ unreaktiv. Erst durch die energetische Anregung oder Aufnahme eines Elektrons entsteht eine reaktive Verbindung [99]:

-Singulett-Sauerstoff ($^1\Delta_g\text{O}_2$): entsteht durch Energieaufnahme von Photosensibilisatoren (können die durch Licht übertragene Energie sammeln und Sauerstoff anregen) (siehe Abbildung 1). Singulett-Sauerstoff schädigt Biomoleküle (DNA, Proteine, Lipide), kann aber auch als Signalmolekül in niedrigen Konzentrationen

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

nen wirken [100]. Der Abbau erfolgt durch niedermolekulare Antioxidantien wie z.B. Karotinoide, ein Abbau durch Enzyme ist nicht möglich [93].

-Superoxid-Radikal (O_2^-): entsteht aus O_2 durch Aufnahme eines Elektrons v.a. im Mitochondrium, im Rahmen der mitochondrialen Atmungskette und durch membranständige Dehydrogenasen [99]. Die Superoxid-Bildung bewegt sich in engen Grenzen und wird streng kontrolliert (siehe Abbildung 1, Abbildung 2 und Übersicht

Tabelle 7).

-Wasserstoffperoxid (H_2O_2): ist ein stabiles Molekül und entsprechend weniger reaktiv als das Superoxid-Radikal, es wirkt als 2nd messenger in der Signalübertragung [101] (siehe Abbildung 1, Abbildung 2 und

Tabelle 7).

-Hydroxyl-Radikal (OH^\cdot): Eine Ein-Elektron Reduktion von H_2O_2 führt zu dem sehr reaktiven Hydroxyl-Radikal. Das OH^\cdot ist sehr instabil mit sehr kurzer Halbwertszeit und reagiert schnell und unselektiv mit Biomolekülen [101] (siehe Übersicht Tabelle 7). Die Bildung erfolgt bei unkontrolliert hohen H_2O_2/O_2^- -Spiegeln (siehe Abbildung 1).

ROS-Bildung beim oxidativen Burst [102, 103]:

Als oxidativer Burst oder respiratorischer Burst, wird die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) während der Phagozytose bezeichnet. Dies erfolgt v.a. im Phagosom in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Der Prozess der ROS-Bildung wird durch das membranständige Enzym NADPH-Oxidase (an der Phagosomenmembran nach luminal gerichtet und an der Zellmembran nach extrazellulär gerichtet) katalysiert. Dabei vermittelt die NADPH-Oxidase die Bildung des Superoxid-Anions ($NOX4$ bildet direkt H_2O_2), welches durch weitere Enzyme zu anderen ROS abgebaut werden kann. Außerhalb des oxidativen Burst können, in geringerer Ausprägung, auf diesem Weg auch in allen anderen Zellen ROS gebildet werden.

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

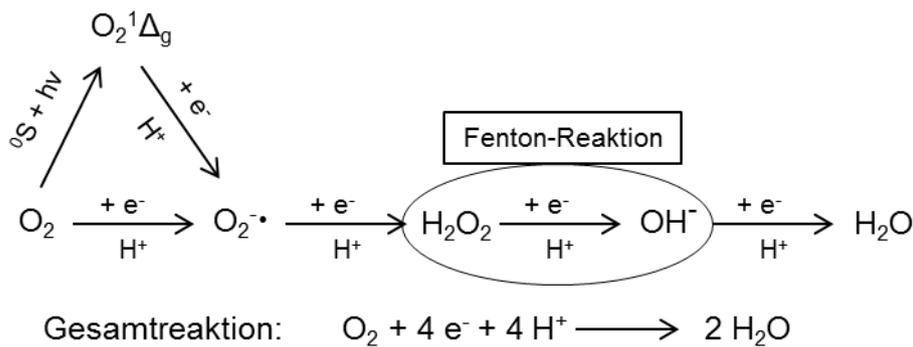


Abbildung 1: chemische Entstehung der wichtigsten ROS nach Scandalios 2005 [99]

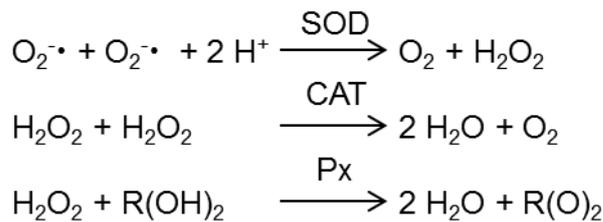


Abbildung 2: wichtigste enzymatische Abbauege der Antioxidantien nach Scandalios 2005 [99]

Tabelle 7: Zusammenfassung der Eigenschaften der wichtigsten ROS nach Schieber und Chandel 2014 [97]

ROS	Funktion und Eigenschaften	Quellen
Superoxid ($O_2^{\cdot-}$)	<p>Entstehung: endogen v.a. im Rahmen der mitochondrialen Atmungskette in der Matrix (Komplex I, II und III) und durch membranständige Dehydrogenasen. Weitere Quellen sind z.B. die zytosolische membranständige NADPH-Oxidase (v.a. beim oxidativen Burst) und das Peroxisom. Aber auch nicht-enzymatische Reaktionen von O_2 mit Ubichinonen, Katecholen, Thiolen und Flavinen spielen bei der Generierung von Superoxid eine Rolle. Kann auch durch exogene Stimuli wie z.B. ionisierende Strahlung entstehen. Unter sauren Bedingungen geht es in seine protonierte Form HOO^{\cdot} (Hydroperoxyl-Radikal).</p> <p>Funktion: reaktiv, schädigt jedoch nicht unselektiv. Akkumulation bewirkt oxidativen Stress. Weniger wichtig für das Redox-Signaling, kann aber auch als 2nd messenger wirken. Bestimmte Proteine sind sensibel auf Hyperoxid-bedingte Inaktivierung. Dies sind Proteine welche Signalfade aktivieren, entweder um die Adaptation an ein erhöhtes Hyperoxid-Level zu unterstützen oder um den Zelltod einzuleiten.</p> <p>Abbau: erfolgt durch die Superoxid-Dismutasen (SOD)</p>	[99, 102]
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	<p>Entstehung: als Signalmolekül, als Nebenprodukt bei Proteinoxidationen im ER, als Endprodukt verschiedener peroxisomaler Oxidationswege (z.B. beta-Oxidation sehr langkettiger Fettsäuren) und verschiedene weitere Enzyme wie Oxidasen (z.B. Zytochrom P450, Monoaminoxidase, Xanthinoxidase, Aldehydoxidase usw.).</p> <p>Funktion: stabiles Molekül, es kann durch die Lipidmembran diffundieren. Es wirkt v.a. als 2nd messenger im Rahmen des Redox-Signalings.</p>	[101]

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

	Abbau: u.a. durch Catalase und verschiedene Peroxidasen wie PRDX und GPX in nahezu allen Zellkompartimenten.	
Hydroxyl-Radikal (OH [•])	Entstehung: durch eine unkontrolliert Ein-Elektron Reduktion von H ₂ O ₂ im Rahmen der Haber-Weiss-Reaktion und Fenton-Reaktion in Anwesenheit von Metallkationen (hauptsächlich Fe ²⁺ oder Cu ⁺). Dies erfolgt v.a. bei unkontrolliert hohen H ₂ O ₂ -Spiegeln. Da dies typischerweise im Rahmen der Fenton-Reaktion, in Anwesenheit von Eisen-Kationen, gebildet wird, ist die Kontrolle des H ₂ O ₂ -Spiegels und Eisenhaushalts essentiell. Funktion: extrem reaktiv. Sehr kurze Halbwertszeit, starkes oxidierendes Potenzial und Lipidunlöslichkeit. Unselektive Schädigung von Biomolekülen (Lipiden, Proteinen und DNA) was zu einer genomischen Instabilität führt („Distress“).	[101]

1.5.5.3. Antioxidantien – enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien

Nicht enzymatische Antioxidantien sind niedermolekulare Verbindungen. Dazu gehören Verbindungen mit Thiol-Gruppen wie Glutathion (GSH), Thioredoxin, Glutaredoxin, Cystein (Cys) oder reduzierte Fettsäuren. Aber auch nicht Thiolhaltige Verbindungen wie Polyphenole in Pflanzen und Vitamine wie das α -Tocopherol, Ascorbat und Vitamin A [92].

Der größte Teil des Abbaus von Oxidantien erfolgt nicht durch die direkte Reaktion mit niedermolekularen Antioxidantien (dies erfolgt z.B. beim Abbau von Singulett-Sauerstoff) im Sinne eines Gleichgewichts aus beiden. Vielmehr wird die Hauptlast des oxidativen Stresses durch Enzyme abgebaut [103]. Niedermolekulare Antioxidantien wie z.B. GSH oder Thioredoxin wirken dabei als Scavenger-Moleküle.

Eine ausführliche Auflistung und Erklärung der verschiedenen Enzyme welche sich auf dem qPCR-Array befanden, findet sich in Tabelle 8.

1.6. Übersicht Funktion der Gene des qRT-PCR Array

Tabelle 8: Übersicht über Funktion der untersuchten oxidativen Stress Gene auf dem qRT-PCR Array „Human Oxidative Stress Plus - Qiagen PAHS-065Y“.

Gen	Funktion	Quelle
ROS Metabolismus Gene		
Superoxid assoziierte Gene		
<i>UCP2</i>	Mitochondrial uncoupling protein 2 gehört zur Familie der mitochondrialen Anionen Transporter (Mitochondrial Anion carrier proteins). UCP2 kann die oxidativen Phosphorylierung von der ATP-Synthese entkoppeln. Überschüssige Energie wird als Wärme	[104, 105]

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

	abgegeben. Dadurch sinkt die Produktion von ROS durch die Atmungskette. UCP2 kann akut durch ROS aktiviert werden und senkt dadurch den ROS Spiegel.	
Superoxiddismutasen (SOD) Bauen Superoxid zu H ₂ O ₂ ab (siehe Abbildung 2).		
<i>SOD1</i>	Lokalisation: v.a. im Zytoplasma (aber auch Nukleus, Mikrosomen, mitochondrialer Intermembranraum). Katalytisches Zentrum: Kupfer, Zink, wobei Kupfer das katalytisch aktive Zentrum ist. CCS und GSH wirken als Chaperon.	[106]
<i>CCS</i>	Cu Chaperone für SOD1 CCS und GSH (als sekundäres Chaperon) wirken als spezifische Chaperone für SOD1	
<i>SOD2</i>	Lokalisation: mitochondriale Matrix. Aktives katalytisches Zentrum ist Mn ²⁺ . Assoziierte Proteine sind: Smf2p (Mn trafficking factor for mitochondrial SOD2) und MTM1 (Mn trafficking factor for mitoch. SOD2). Das einzige SOD-Enzym welches essentiell für das Überleben aerober Organismen ist (MnSOD Knockout Mäuse sterben kurz nach der Geburt).	
<i>SOD3</i>	Lokalisation: v.a. in der Plasmamembran und extrazellulären Flüssigkeiten. Katalytisches Zentrum: Cu ²⁺ und Zn ²⁺ , wobei Kupfer das katalytisch aktive Zentrum ist. Atox 1 (antioxidant-1 Cu Chaperone) und MNK (Menkes ATPase = Transmembran Protein für Kupfertransport) wirken als Chaperone.	
<i>ATOX1</i>	Antioxidant-1 Cu Chaperone Chaperon welches direkt mit der SOD3 interagiert. Zusammen mit ATOX1 und MNK (Menkes ATPase = Transmembranprotein für Kupfertransport) erhalten sie die SOD3 Aktivität. ATOX1 wirkt auch als Transkriptionsfaktor.	
Glutathionperoxidasen		
Glutathionperoxidasen (GPX) Katalysieren die Reduktion von organischen Peroxiden und Wasserstoffperoxid zu Wasser und entsprechenden Alkoholen. Dabei wird Glutathion oxidiert. Funktionen: Schutz vor Schädigung durch Redoxreaktionen (oxidativer Stress). Regulation der H ₂ O ₂ -Ansammlung und dadurch Modulation des H ₂ O ₂ Signalings (Wachstumsfaktorvermittelte Signale, mitochondriale Funktionen, Erhaltung der Thiol Redox Balance).		[107, 108]
<i>GPX1</i>	häufigstes Isoenzym, in allen Zellen exprimiert. Lokalisation v.a. im Zytosol (aber auch Nukleus und Mitochondrien). Initial in Erythrozyten entdeckt, v.a. in roten Blutkörperchen, Leber-, Lungen- und Nierenzellen hoch exprimiert.	[107, 109]
<i>GPX2</i>	Lokalisation: v.a. Zytoplasma (auch im Nukleus). Initial Gastrointestinal entdeckt und hier am höchsten exprimiert.	
<i>GPX3</i>	Lokalisation: v.a. Extrazellulär und im Plasma. Wurde initial im humanen Plasma beschrieben, deshalb auch als Plasma-GPX bezeichnet. V.a. in der Niere hoch exprimiert, aber auch in vielen weiteren Zellen und Organen (z.B. Muskelzellen).	
<i>GPX4</i>	Lokalisation: membranassoziierte GPX, lokalisiert in Zytosol, Mitochondrium und Nukleus. Wird auch Phospholipid Hydroperoxid GPX (PHGPX) genannt. Kann auch Lipid-Peroxide reduzieren. V.a. in Hoden-, Hirn- und Herzzellen hoch exprimiert.	
Mitglieder der Glutathion-S-Transferase Superfamilie		
<i>GSTP1</i>	Mitglied der Glutathion-S-Transferase Superfamilie; Detoxifizierung mittels Konjugation mit GSH: giftige Substrate werden mit reduziertem GSH konjugiert und so detoxifiziert. Werden bei oxidativem Stress hochreguliert.	[110]
<i>GSTZ1</i>		
GSH-bildendes und reduzierendes System		

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

<i>GCLM, GCLC, GSS</i>	Glutamatcysteinyligase (GCLM, GCLC), Glutathionsynthase (GSS). Glutathion wird in zwei Schritten synthetisiert: 1. Schritt: Glutamatcysteinyligase: GCLC: schwere UE, katalytische Funktion, GCLM: leichtere regulatorische UE/modifier subunit. Die GCL ist der Geschwindigkeitsbegrenzende Schritt der GSH Synthese. 2. Schritt: Glutathionsynthase (GSS)	[111, 112]
<i>GSR</i>	Glutathion-S-Reduktase. Katalytische Rückreduktion des oxidierten Glutathion unter NADPH/H ⁺ -Verbrauch	[113]
Peroxiredoxin System		
<i>PRDX1-6</i>	Peroxiredoxine (PRDX) reduzieren Peroxide (Wasserstoffperoxid, organische Hydroperoxide und Peroxynitrit). Dabei wird eine Sulfhydrylgruppe eines Zysteins am Peroxiredoxin oxidiert. Dieses Zystein wird durch Oxidation eines Thiols (meist Thioredoxin) zurückreduziert. Funktion: Abbau von oxidativem Stress und auch Redox-Signaling. z.B. als H ₂ O ₂ -Sensor, Vermittler des H ₂ O ₂ -Signalings (dabei auch Modulation von MAPK)	[114]
<i>TXN</i>	Thioredoxin. Wird bei der Rückreduktion von PRDX oxidiert. TXN kann von TXNRD rückreduziert werden.	
<i>SRXN1</i>	Sulfiredoxin. Oxidation von Peroxiredoxin kann bei zweifacher Oxidation zu einer Hyperoxidation der Schwefelgruppe des Zysteins führen. Dies führt zu einer Inaktivierung der Peroxidase Aktivität. Sulfiredoxin (SRXN1) kann die Inaktivierung durch eine ATP-abhängige Reaktion aufheben.	
<i>TXNRD</i>	Thioredoxin Reduktase. Einzig bekanntes Enzym welches die Reduktion von Thioredoxin katalysieren kann (dabei Verbrauch von NADPH/H ⁺). TXNRD1 ist im Zytoplasma lokalisiert, das TXNRD2 ist im Mitochondrium.	
Weitere Peroxidasen Peroxidasen katalysieren die Reduktion von Peroxiden (z.B. Wasserstoffperoxid). Die Reaktion dient hauptsächlich der Entfernung der giftigen Peroxide.		
<i>CAT</i>	Katalase. Schlüsselenzym der Antioxidativen Abwehr. CAT kann Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff degradieren ohne dabei zelluläre reduzierende Äquivalente (z.B. GSH) zu verbrauchen. Lokalisiert vorwiegend im Peroxisom. Sehr hohe katalytische Effizienz, sodass das Enzym kaum übersättigt werden kann.	[99]
<i>CYBB</i>	Zytochrom B-245 Beta Kette. Teil des Zytochrom B Komplexes. Spielt insbesondere eine Rolle in der Pathogenabwehr durch Superoxidbildung. Teil der membranständigen Oxidase die Superoxid in Phagozyten synthetisiert.	[115]
<i>CYGB</i>	Zytoglobin Hämoglobinprotein unklarer Funktion. Spielt eine Rolle beim Schutz vor oxidativem Stress, Sauerstofftransport und Sauerstoffspeicher.	[116]
<i>PTGS1</i>	<i>PTGS1/PTGS2</i> bzw. <i>COX1/COX2</i> . Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 1 und 2, Cyclooxygenase 1 und 2.	[117, 118]
<i>PTGS2</i>	Produktion von Prostaglandin H ₂ . Dieses kommt in allen Geweben im Körper vor. Beide Enzyme besitzen sowohl eine Cyclooxygenase-Funktion als auch eine Peroxidase-Funktion.	
Weitere ROS Metabolismus Gene		
<i>AOX1</i>	Aldehydoxidase 1. Ist im Zytosol lokalisiert. Oxidase mit großer Substratspezifität. Baut Aldehyde ab, dabei wird H ₂ O ₂ produziert. Spielt eine Schlüsselrolle im Metabolismus von Xenobiotika. Vermutlich an der Regulation der ROS-Homöostase beteiligt. Mögliche Quelle von Superoxid durch eine ein-Elektron Reduktion von molekularem Sauerstoff und mögliche Quelle von Stickstoffmonoxid (NO).	[119]
<i>BNIP3</i>	BCL2 interagierendes Protein 3. Mitglied der apoptotischen bcl-2 Protein Familie. Interaktion mit anti-apoptotischen Proteinen. Pro-apoptotische Funktion und an der Regulierung eines atypischen programmierten Zellto-	[120]

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

	des beteiligt. Spielt eine Rolle bei der Autophagie. Beteiligt an dem Abbau von geschädigten Proteinen innerhalb des Mitochondriums.	
<i>EPHX2</i>	Epoxid Hydrolase 2. Ist ein Mitglied der Epoxid-Hydrolase Familie. Baut Epoxide zu den entsprechenden Dihydrolenen ab. Ist im Zytosol und Peroxisomen lokalisiert.	[121]
<i>MPV17</i>	Mitochondrial Inner Membrane Protein MPV17. Am ROS-Metabolismus beteiligt. Spielt eine Rolle beim Erhalt der mtDNA. Die genaue Funktion ist bislang nicht bekannt. Lokalisation an der mitochondrialen inneren Membran.	[122]
<i>SFTPD</i>	Surfactant protein D. Teil der unspezifischen angeborenen Immunantwort in der Lunge, die inhalierte Mikroorganismen und Chemikalien abwehrt.	[123]
ROS bildende Funktion		
<i>NOX2, NOX 1/3/4/5, DUOX 1/2 und NCF1/2</i>	NADPH Oxidase 1-5 (NOX 1-5); weitere mit NADPH-Oxidase Funktion: duale Oxidase ½ (DUOX 1/2), neutrophiler zytosolischer Faktor 1/2 (NCF1/2). Funktion: NADPH Oxidasen bilden Superoxid, typischerweise in den Extrazellulärraum oder intraorganellären Raum (z.B. Peroxisom). Außerhalb des oxidativen Bursts und dem Phagosom ist dieser Weg eine Quelle für Superoxid und H ₂ O ₂ (nur NOX4) im Rahmen des Redox-Signalings. Bei Superoxid erfolgt der enzymatische oder spontane Abbau zu Wasserstoffperoxid, welches durch Membranen diffundieren kann, und die weitere Wirkung z.B. als second messenger vermittelt. Superoxid kann teilweise auch direkt durch spezifische Anionenkanäle nach intrazellulär transportiert werden. NOX sind dadurch an verschiedenen zellulären Funktionen beteiligt, u.a. an der Abwehr, an der posttranslationalen Modifizierung von Proteinen, am zellulären Signaling, der Regulation der Genexpression und der Zelldifferenzierung. Zu NOX4: sowohl im Zytoplasma als auch im Mitochondrium lokalisiert. NOX4 bildet H ₂ O ₂ während NOX1/2 Superoxid (O ₂ ⁻) bilden. NOX4 hat eine konstitutive Aktivität, wird v.a. über das Transkriptionslevel des Enzyms reguliert.	[124, 125]
Zellzyklusregulation, Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktion		
<i>MSRA</i>	Methionine Sulfoxide Reductase A. Methionin gehört so wie Cystein zu den Schwefelhaltigen Aminosäuren. Oxidation von Methioninresten in Proteinen führt zu Fehlfaltung und damit Dysfunktion. MSR führt die Reduktion von der oxidierten Form (methionine sulfoxide - MetO) zu Methionin aus. Dabei wird Thioredoxin verbraucht. Isoenzyme: MSRA, MSRB und die freie Met-R-SO Reduktase (fRMSr). MSRA kann sowohl freies MetO als auch die proteingebundene Form reduzieren. Funktion: protektive Rolle vor oxidativem Stress durch Reparatur von geschädigten inaktiven Biomolekülen (v.a. Proteinen nach Oxidation durch oxidativen Stress) und auch regulatorische Rolle im Rahmen des Redox-Signalings (Oxidierung der Methioninreste als An-Aus-Schalter).	[126, 127]
<i>RNF7 bzw. SAG, RBX2 oder ROC2</i>	RNF7 (RING Finger Protein 7) oder SAG (Sensitive to Apoptosis Gene)/RBX2 (RING box protein 2)/ROC2 (Regulator of Cullins 2). Lokalisation: Zytoplasma und Nukleus. Funktion: nicht-enzymatische antioxidative Aktivität. Dabei wird ROS entfernt über Oxidation der Cysteingruppen und folgender Selbst-Oligomerisierung (dabei werden intra- und intermolekulär Disulfidbrücken gebildet). Außerdem Komplexbildung mit anderen SCF Proteinen (Skp1-Cullin1-F-box proteins) zur E3 Ubiquitin Ligase. Hierdurch Unterstützung der Ubiquitinierung und Abbau verschiedener Proteine (u. A. c-JUN, DEPTOR, HIF-1α, IκBα, NF1, NOXA, p27 und Procaspase-3).	[128]
<i>DUSP1</i>	Dual Specificity Phosphatase 1. Phosphatase mit dualer Spezifität für Tyrosin und Threonin. Kann dadurch	[129, 130]

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

	MAP-Kinasen (MAPK1/ERK2) dephosphorylieren. Verschiedene extrazelluläre Signale können über den gleichen MAPK-Weg unterschiedliche Antworten intrazellulär erzeugen. Durch Dephosphorylierung und damit Unterbrechung der Aktivität der aktivierten MAP-Kinase ist die DUSP1 an der Regulation der Spezifität der Signale beteiligt.	
<i>PDLIM1</i>	PDZ And LIM Domain 1. Gen des Zytoskeletts mit zwei Protein-interagierenden Bereichen (PDZ und LIM Ende). Vermittelt wahrscheinlich die Verbindung zwischen Proteinen und Zytoskelett. Ist z.B. für Zellmigration von Fibroblasten und dem Erhalt der Polarität nötig. Zeigt auch eine negative Regulation des NF-kB Signalings.	[131, 132]
<i>FHL2</i>	Four And A Half LIM Domains 2. Moduliert Übertragungspfade des intrazellulären Signalings die an einer Vielzahl von Aufgaben beteiligt sind: Dabei werden wahrscheinlich Proteininteraktionen vermittelt, z.B. mit beta-Catenin, FOXO1, p53, RUNX1/2, Smad2/3/4 und Wnt1.	[133]
<i>SQSTM1</i>	Sequestosome 1. Multifunktionales Protein. Bindet an Ubiquitin und reguliert die Aktivierung des NF-kB Pfades. Wirkt als Autophagie-Rezeptor bei der selektiven Autophagie. Reguliert möglicherweise Signalkaskaden durch Ubiquitinierung. Ist möglicherweise an der Differenzierung, Apoptose, Immunantwort und Regulation von K ⁺ -Kanälen beteiligt.	[134]
<i>FOXM1</i>	Forkhead box protein M1. Transkriptionsfaktor welcher eine Rolle in der Progression des Zellzyklus (Regulation verschiedener Zellzyklus-Gene) und in der Reparatur von DNA-Strangbrüchen spielt.	[135]
<i>SIRT2</i>	Sirtuin 2. NAD-abhängige Histon-Deacetylase, lokalisiert im Zytoplasma. Kann Histone und andere Proteine deacetylieren und spielt dadurch eine modulatorische Rolle bei verschiedenen Zellprozessen wie z.B. Zellzyklus, Zellbewegung, Autophagie, Metabolismus, Apoptose und antioxidativem Schutz. SIRT2 moduliert auch oxidative Stress Mechanismen und Schlüsselgene.	[136, 137]
<i>NCOA7</i>	nuclear receptor coactivator 7. Stimuliert die transkriptionale Aktivität verschiedener nukleärer Rezeptoren (v.a. des Ah-Rezeptors). Hierüber wird z.B. Cytochrom P450 aktiviert.	[138]
Metabolismus, Katabolismus und Biotransformation		
<i>SEPP1</i>	Selenoprotein P. Selenoprotein welches multiple Selenocystein-Gruppen (10 Gruppen pro Protein) enthält. Häufigstes Selenoprotein im Plasma, transportiert Selen im Körper. Kann auch extrazellulär als Antioxidant wirken.	[139]
<i>VIMP</i> oder <i>SELENOS</i>	VCP-Interacting Membrane Protein (VIMP) oder SELENOS, Selenoprotein S. Spielt eine wichtige Rolle in der Neutralisierung von oxidativem Stress und fürs Zellüberleben. Im ER finden Prozesse wie die Proteinfaltung und die post-translationale Modifizierung statt. Selenoprotein S ist Teil der ER-assoziierten Proteindegradation (ERAD) und auch am Transport fehlgefalteter Proteine, für den Abbau, ins Zytosol beteiligt. Die Stimulation erfolgt unter Bedingungen welche das Fehlfalten von Proteinen bedingen (z.B. bei oxidativem Stress).	[140, 141]
<i>TRAPP C6A</i>	Trafficking Protein Particle Complex 6A. Untereinheit des TRAPP Komplexes (Transport von ER zum Golgi-Apparat). Indikator für den Proteinmetabolismus der synthetisierten und gefalteten Proteine.	[142]
<i>AKR1C2</i>	Aldo-Keto Reductase Family 1 Member C2. Mitglied der Aldo/Keto-Reduktase-Familie. Katalysiert den Abbau von Aldehyden und Ketonen zum entsprechenden Alkohol. Als Kofaktoren	[143]

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

	werden NADH oder NADPH verbraucht.	
<i>GLA</i>	Galaktosidase alpha. V.a. in den Lysosomen lokalisiert. Abbau von Glykolipiden und Glykoproteinen	[144]
<i>LHPP</i>	Phospholysine Phosphohistidine Inorganic Pyrophosphate Phosphatase. Teil des Metabolismus, v.a. Purinmetabolismus.	[145]
<i>DHCR24</i>	24-Dehydrocholesterol Reductase. Spielt eine Rolle in der Antwort auf oxidativen Stress (sowohl in der akuten als auch chronischen Antwort), wirkt dabei antiapoptotisch (u.a. durch Reduzierung der Caspase 3 Aktivität) und spielt auch eine Rolle in der Cholesterinbiosynthese.	[146, 147]
<i>NQO1</i>	NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1. Funktion: Reduktion von Quinonen zu Hydroquinonen mittels einer zwei-Elektronen-Reduktion. Dadurch wird die ein-Elektronen-Reduktion von Quinonen verhindert, welche eine Bildung von Radikalen bedingt.	[148]
<i>APOE</i>	Apolipoprotein E. Es spielt eine wesentliche Rolle im Alterungsprozess und der Pathogenese des Morbus Alzheimer. ApoE ist Bestandteil von Lipoproteinen. Als Bindestelle an Rezeptoren ist es essentiell für den Abbau und Transport von Lipoproteinen. Oxidativer Stress stimuliert die Expression von apoE in Adipozyten. Eine hohe apoE Expression schützt Zellen vor Wasserstoffperoxid-induzierten Schäden.	[149-151]
<i>PRNP</i>	Major prion protein. Ein Protein mit bislang unklarer physiologischer Funktion. Spielt eine Rolle in der oxidativen Homöostase und könnte eine Rolle im Eisen- und Kupferhaushalt spielen (Eisenaufnahme und Homöostase).	[152, 153]
FE Haushalt		
<i>HMOX1</i>	Hämoxygenase 1. Essentielles Enzym des Häm-Abbaus, spaltet Häm zu Biliverdin. Hierbei wird Eisen (II) und Kohlenstoffmonoxid frei. Hohe Spiegel an freiem Häm sensibilisieren die Zelle für Apoptose. Der weitere Abbau zu Bilirubin erfolgt durch die Biliverdin-Reduktase.	
<i>FTH1</i>	schwere UE des Ferritins 1. Eisen ist für das Zellwachstum essentiell und ist Bestandteil verschiedener lebensnotwendiger Enzyme und Proteine. Über die Fentonreaktion können Hydroxyl-Radikal gebildet werden. Dafür werden Metallionen benötigt (u.a. Fe ²⁺ und Cu ⁺). Entsprechend gehören Eisenspeicher und Detoxifizierung von Eisen zu den lebensnotwendigen Funktionen der Zelle. Ferritin besteht aus einer schweren und leichten Untereinheit. Dabei besitzt die hier codierte schwere (H) Untereinheit eine hohe Ferroxidase-Aktivität welche das Eisen schnell in die gebundene nicht-toxische Fe (III)-Form oxidiert. Die leichte (L) Untereinheit erleichtert die Eisen Langzeitspeicher.	[154]
HSP und Reparaturgene		
<i>BAG2</i>	BCL2 Associated Athanogene 2. Spezifische Interaktion mit der Hsc70 ATPase Domain. Vermittelt die Freisetzung des Substrats und inhibiert dadurch die Chaperon-Aktivität.	[155]
<i>HSP90AA1</i>	Heat shock protein HSP 90-alpha. Chaperon welches die Reifung und Strukturerehalt und Regulation spezifischer Zielproteine aufrechterhält. Die Zielproteine des Chaperons sind an der Zellzykluskontrolle und Signaltransduktion beteiligt. Spielt eine Rolle in der Regulation der Transkription über 3 verschiedene Mechanismen: Änderung der Spiegel verschiedener Transkriptionsfaktoren; Modulation der Aktivität von epigenetischen Modifikatoren (z.B. Histone-Deacetylasen, DNA Methyltransferasen); spielen eine Rolle an dem	[156]

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

	Freilegen (Lösen der Histonbindung) von Promoterregionen bestimmter Gene.	
<i>HSPA1A</i>	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 1A. Teil der Heat shock Protein 70 Familie. Stabilisiert in Verbindung mit anderen HS-Proteinen Enzyme gegen Proteinabbau. Vermittelt das Falten neu synthetisierter Proteine im Zytosol und den Organellen.	[157]
<i>NUDT1</i>	Nudix Hydrolase 1. Oxidierte Nucleosid Triphosphate werden falsch eingebaut und verursachen Mutationen die zu Karzinogenese und Neurodegeneration führen können. NUDT1 kodiert ein Protein welches diese oxidierten NTPs hydrolysiert und dadurch den Fehleinbau verhindert. Damit wirkt es Zelldysfunktion und oxidativem Stress bedingtem Zelltod entgegen.	[158]
Weitere		
<i>CCL5</i>	C-C Motif Chemokine Ligand 5. Chemokin bzw. chemotaktisches Zytokin für Blutmonozyten, Gedächtnis-T-Helfer-Zellen und eosinophile Granulozyten. Bewirkt das Histaminrelease von Basophilen und aktiviert eosinophile Granulozyten. Die CCL5 Expression wird unter anderem durch das Redox-Signaling reguliert.	[159, 160]
<i>PTGR1</i>	Prostaglandin Reduktase 1. Ist eine alkenal/one oxidoreductase die an dem Katabolismus von Eikosanoiden und Lipidperoxidation, sowie an der Inaktivierung des chemotaktischen Faktors Leukotrien B4 beteiligt ist. Über Induktion der Bildung von ROS wird auch ein Abwehrmechanismus induziert.	[161]
<i>SLC7A11</i>	Solute Carrier Family 7 Member 11. Anionisches Aminosäure Transport System, hochspezifisch für Zystein und Glutamat. Rolle in der Signalübertragung, v.a. neuronal.	[162]
<i>SPINK1</i>	Serine peptidase inhibitor, Kazal type 1. Wird von Azinuszellen des Pankreas sezerniert. Damit wird eine vorzeitige Aktivierung von Zymogenen verhindert.	[163]

1.7. Überleitung zu Vorarbeiten

Die vorliegende Arbeit baut auf verschiedenen Vorarbeiten auf.

Die Isolation und Kultivierung von Osteoblasten erfolgte nach einem von Ehnert *et al.* modifizierten Verfahren. Das Stimulationsverfahren wurde ebenfalls von Ehnert *et al.* etabliert, indem 10 verschiedene Felder nach Literaturrecherche ausgewählt (Unterschiede in Frequenz, Wellenform, Intensität und Signal-Pausen-Intervallen) und über 21 d an primären humanen Osteoblasten, während der Reifung, untersucht wurden. Die Befeldung entsprach einer kurzzeitigen Befeldung für jeweils 7 min an drei Tagen pro Woche (Mo/Mi/Fr). Um die Verbesserung der Funktion zu quantifizieren wurden folgende Marker für die Bewertung der Osteoblastenfunktion und -reifung gewählt: Zunahme der AP-Aktivität, Resazurinkonversion und Mineralisierung. Diese zeigten in der Summe die größte Zunahme bei dem, hier genutzten, Feld #16. Auch zeigte sich

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

eine Abhängigkeit des Effekts von der initialen AP-Aktivität zu Beginn des Reifungsprozesses. Eine hohe initiale AP-Aktivität ging mit einer geringen Zunahme der Reifungsmarker durch die EMF-Stimulation einher. Eine initial niedrige AP-Aktivität bedeutete hingegen eine schlechte Mineralisierung und Differenzierung ohne EMF-Stimulation bei deutlicher Zunahme nach PEMF-Stimulation. In diesen Zellen mit initial niedriger AP-Aktivität zeigte sich im Western-Blot eine Aktivierung des ERK1/2 mit einem Maximum 30 min nach PEMF-Stimulation. In einem entsprechenden Inhibitionsexperiment konnte durch chemische Inhibition von ERK1/2 eine Inhibition des EMF-Effektes gezeigt werden.

Das Feld #16 wurde auch an Osteoklasten untersucht und zeigte hier keine signifikanten funktionsverbessernden oder hemmenden Effekte.

In einigen anderen Arbeiten in denen Knochenzellen mit EMF stimuliert wurden, konnte eine Rolle des Redox-Signalings in diesem Prozess gezeigt werden. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte ein Effekt der PEMF-Stimulation auf den intrazellulären ROS-Gehalt in primären humanen Osteoblasten gezeigt werden. In den ersten zwei Tagen zeigte sich eine signifikante Zunahme des intrazellulären ROS (gemessen mit DCFH-DA Färbung) in PEMF-stimulierten Zellen mit signifikanter Abnahme am 6. Tag der Stimulation ([164], siehe Abbildung 3).

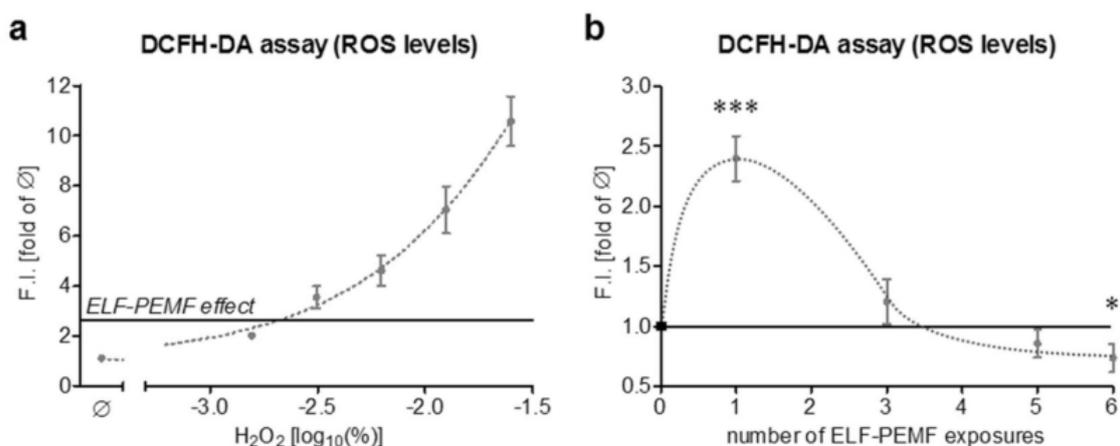


Abbildung 3: intrazelluläre ROS (mit DCFH-DA gemessen) nach PEMF-Stimulation (aus [164]).

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

1.8. Fragestellung und Versuchskonzept der vorliegenden Arbeit

Entsprechend den Erkenntnissen aus den Vorarbeiten sollte der Einfluss der PEMF-Stimulation (Feld #16) auf die Genexpression verschiedener oxidativer Stress assoziierter Gene untersucht werden.

Die Hypothesen und Fragen die dabei beantwortet werden sollten:

-ROS spielen eine wesentliche Rolle bei der Übertragung des PEMF-induzierten Effektes während Reifung in primären humanen Osteoblasten.

Gibt es einen Mechanismus der durch einen ROS-Anstieg gesteuert wird?

-Zwischen den Spendern gibt es Unterschiede in der Differenzierung und im Ansprechen auf die PEMF-Stimulation.

Lässt sich dies auf vorbestehende Unterschiede in der Genexpression zurückführen? Reagieren die Spender grundsätzlich unterschiedlich auf die PEMF-Stimulation?

Einen Überblick über das experimentelle Vorgehen bietet Abbildung 4.

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

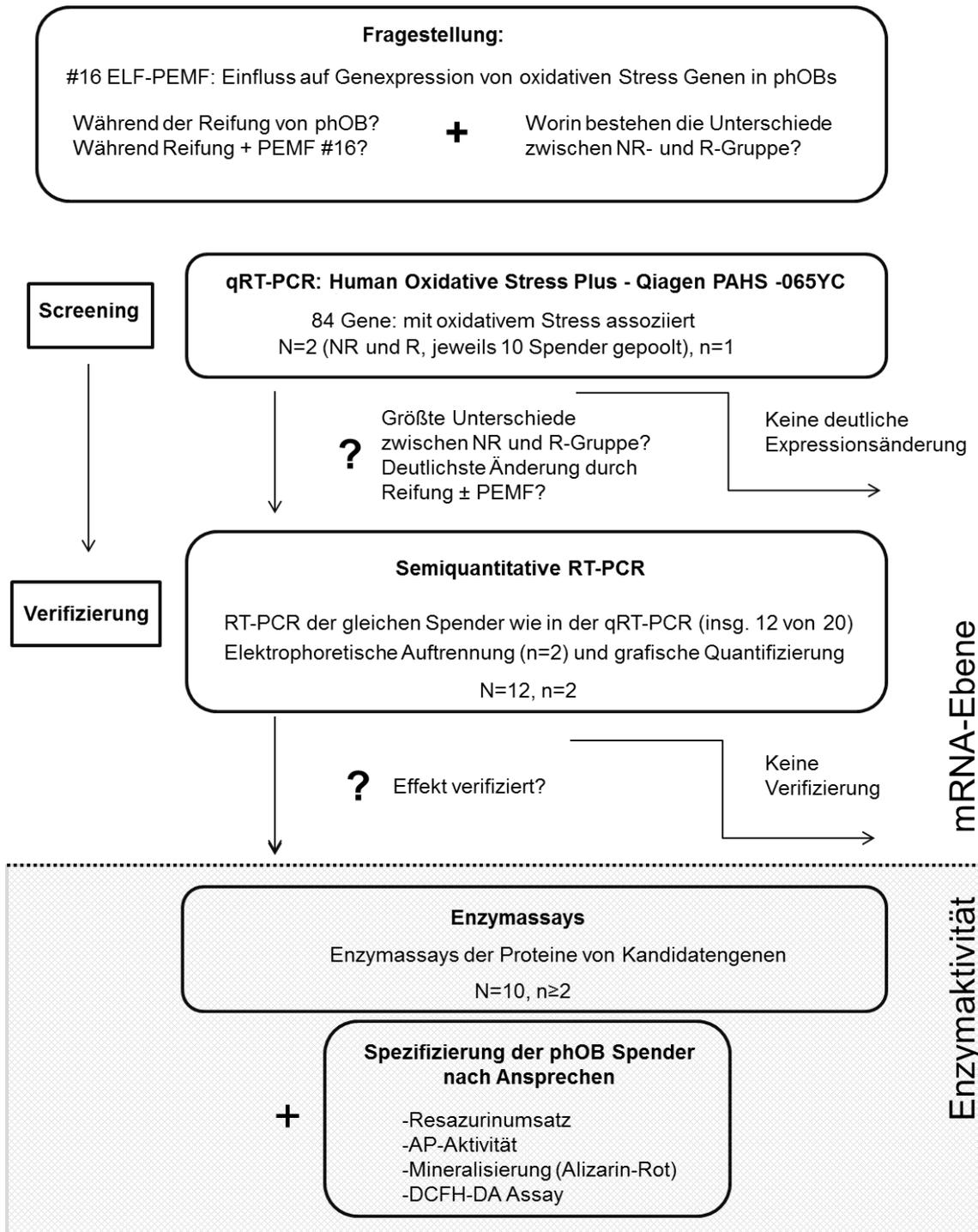


Abbildung 4: Vorgehen im Versuchskonzept

2. Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Patientenmaterial

Tabelle 9: Übersicht über Spender

Spender Nummer	Alter*	Geschlecht	rechnerisches An- sprechen
qPCR und PCR Spender			
Non-Responder Gruppe			
119	60	W	-6 %
172	78	M	19 %
176	59	W	40 %
186	74	M	47 %
188	78	W	64 %
128	68	W	12 %
166	83	W	60 %
174	68	W	25 %
212	81	W	43 %
127	68	M	39 %
	MW: 71,7; Median: 71; SD 8,0	M:W 3:7	MW: 34 %
Responder Gruppe			
132	63	M	77 %
139	78	W	134 %
151	70	M	159 %
171	81	M	61 %
126	52	W	71 %
142	60	W	82 %
148	43	M	65 %
149	82	W	64 %
167	60	W	234 %
140	64	W	106 %
	MW: 65,3; Median: 63,5; SD 12,0	M:W 4:6	MW: 105 %
Spender Messungen Enzymaktivitäten			
261	79	M	-122 %
316	74	W	296 %
339	58	M	122 %
341	78	W	-80 %

2. Material und Methoden

343	58	W	-13 %
356	69	W	-42 %
380	67	W	148 %
383	78	M	308 %
389	61	W	33 %
396	73	W	201 %
397	37	W	14 %
	MW: 66,6; Median 69; SD 11,9	M:W 3:8	
* Alter der Spender zum Stichtag 15.10.2015			

2.1.2. KITS

Tabelle 10: Auflistung der genutzten Kits

Kit	Hersteller	Bestellnr.
OxiSelect™ Catalase Activity Assay Kit, Fluorometric	Cell Biolabs, INC.	STA-339
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific	K1612
KAPA2G Fast ReadyMix with Dye	Peqlab	KAPBKK5101
peqGOLD TriFast	Peqlab	30-2010
RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit	Qiagen	74804
RT ² First Strand Kit	Qiagen	330404
RT ² SYBR Green qPCR Mastermix	Qiagen	330501
SOD determination kit	Sigma-Aldrich	19160

2.1.3. Primer und qPCR

Für die qRT-PCR wurde der 96 Well RT² Profiler™ PCR Array PAHS-065YC (Human Oxidative Stress Plus) von Qiagen verwendet. Für eine ausführliche Liste der Belegung siehe Tabelle 37 im Anhang.

Die Primer für die RT-PCR wurden von MWG Operon (Eurofins Genomics Deutschland, Ebersberg) bezogen.

Tabelle 11: Primer und optimierte Primerbedingungen

Gen	Primer	Sequenz der Primer	Länge des Amplifikats in bp	eingesetzte Menge cDNA in [ng]	Annealing Temperatur in [°C]	Anzahl der Zyklen
CAT	f(5'→3')	ACCCTCGTGGGTTTGCAGTGA	763	50	58	35
	r(3'→5')	CGAGCACGGTAGGGACAGTTCA				

2. Material und Methoden

CCL5	f(5'→3')	ATCCTCATTGCTACTGCCCTC	135	80	62	35
	r(3'→5')	GCCACTGGTGTAGAAATACTCC				
GAPDH	f(5'→3')	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	420	20	56	35
	r(3'→5')	AGGGGTCTACATGGCAACTG				
GPX1	f(5'→3')	TGGGCATCAGGAGAACGCCA	199	20	60	30
	r(3'→5')	GGGGTCGGTCATAAGCGCGG				
GPX3	f(5'→3')	CTGACGGGCCAGTACATTGA	156	30	58	35
	r(3'→5')	TCCACCTGGTCGGACATACT				
GSR	f(5'→3')	AGGAGCTGGAGAACGCTGGC	162	30	60	30
	r(3'→5')	CAATGGCCCAGAGCAGGCA				
NOX4	f(5'→3')	CGGGCTTCCACTCAGTCTTT	297	40	62	35
	r(3'→5')	TCCTAGCCCCAACATCTGGT				
SOD2	f(5'→3')	GCAGCTGCACCACAGCAAGC	422	30	62	30
	r(3'→5')	CGTGCTCCCACACATCAATCCCC				
UCP2	f(5'→3')	CCCCTGTAGACGTGGTCAAG	131	30	60	35
	r(3'→5')	GGAGGGCATGAACCCTTTGT				

2.1.4. Software

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Software

Programm	Hersteller
EndNote X7	Japone/Team LnDL, Thomas Reuters, San Francisco, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
GeneGlobe Data Analysis Center: https://www.qiagen.com/de/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/	Qiagen, Hilden, Deutschland
Image J: Image Processing and Analysis in Java	National Institute of Health, USA
Intas Image Software	Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
NCBI Primer-BLAST	National Center for Biotechnology Information, USA
OMEGA 1.3 Software FLUOstar	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Microsoft Office 2010 Excel, Word, Powerpoint	Microsoft Corporation, Redmond USA

2.1.5. weiteres

Eine Auflistung weiterer genutzter Materialien findet sich im Anhang:

Für eine Auflistung der verwendeten Chemikalien und Substanzen siehe Tabelle 35 im Anhang.

2. Material und Methoden

Für eine Auflistung der Verbrauchsmaterialien siehe Tabelle 36 im Anhang.

Für eine Auflistung der verwendeten Geräte siehe Tabelle 38 im Anhang.

2. Material und Methoden

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkulturen

2.2.1.1. Ethikvotum

Die Zellkulturen wurden aus humanem Knochengewebe isoliert, welches durch die Operationsmethode bedingt als Abfall anfiel. Hauptsächlich waren das elektive Hüft- und Knieprothesenimplantationen. Die Spender gaben dafür im Voraus ihr schriftliches Einverständnis. Potentielle Tumorpatienten oder Patienten mit potentieller viraler oder bakterieller Infektion wurden von der Studie ausgeschlossen. Votum der Ethikkommission: 387/2012BO2.

2.2.1.2. Versuchsaufbau

Die Zellen wurden nach Isolation in Wachstumsmedium kultiviert und in P2/3 entnommen und die Reifung durch Zugabe von Differenzierungsmedium induziert. Die Befeldung erfolgte an den Wochentagen, wobei Tag 0 an einem Montag war. AP-Aktivität und Resazurin-Konversion, sowie DCFH-DA Färbung wurden an den Tagen 0, 4 und 7 gemessen. Die Mineralisierung wurde mittels Alizarinrot-Färbung, an den Tagen 14 und 21, quantifiziert. Proteinlysate wurden an Tag 2 der Reifung entnommen (siehe Abbildung 5).

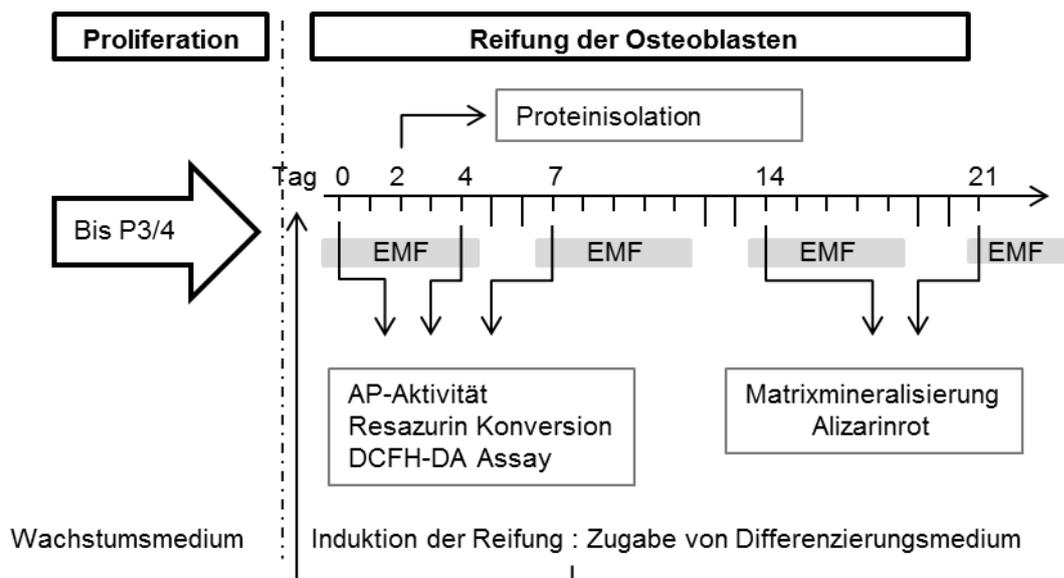


Abbildung 5 Versuchsablauf Zellkulturen: Schematische Darstellung des Versuchskonzepts und zeitlichen Ablaufs der Zellkulturexperimente und Proteinisolation.

2. Material und Methoden

2.2.1.3. Zellkulturmedien

Zellmedien und Zusätze wurden unter sterilen Bedingungen angesetzt. Dabei wurden unsterile Zusätze durch einen Sterilfilter filtriert. In einer 48-Well Platte wurden Triplikaten mit jeweils etwa 1 ml Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h und 48 h wurden die Proben unter dem Mikroskop nach sichtbaren Bakterien untersucht um Kontaminationen auszuschließen.

Tabelle 13: Lösungen Zellkulturen

Lösung	Zusätze	Endkonzentration
L-Ascorbat-2-Phosphat Stammlösung	144,8 mg L-Ascorbat-2-Phosphat	50 mM
	10ml PBS	
Lagerung bei -20 °C		
beta-Glycerol-Phosphate Stammlösung	108 mg beta-Glycerol-Phosphate	50 mM
	10 ml PBS	
Lagerung bei -20 °C		
Dexamethason Stammlösung	2 mg Dexamethason	5 mM
	1 ml DMSO	
Lagerung bei -20 °C		
Wachstumsmedium	500 ml MEM Earle's	1:1 Mischung
	500 ml HAM's F12	
	50 ml FCS	10 % (v/v)
	5 ml Penicillin/Streptomycin	1 %
	0,5 ml L-Ascorbate-2-Phosphat Stammlsg.	50 µM
	0,5 ml beta-Glycerol-Phosphat Stammlösung	50 µM
Lagerung bei +4 °C für bis zu 3 Wochen		
Differenzierungsmedium	500 ml MEM Earle's	1:1 Mischung
	500 ml HAM's F12	
	5 ml FCS	1 % (v/v)
	5 ml Penicillin/Streptomycin	1 %
	29 mg L-Ascorbic acid 2-Phosphat	200 µM
	1,08 g beta-Glycerolphosphat	10 mM
	2,98 g Hepes	25 mM
	83 mg Calciumchlorid	1,5 mM
10 µl Dexamethason Stammlösung	100 nM	
Lagerung bei +4 °C für bis zu 3 Wochen		

Tabelle 14: Menge Zellmedium bei unterschiedlichen Gefäßen

Gefäß	Volumen Medium pro Gefäß
T 75 Flasche	15 ml
T 175 Flasche	25 ml
6-Well Mikrotiterplatte	2 ml/Well
48-Well Mikrotiterplatte	250 µl/Well

2. Material und Methoden

96-Well Mikrotiterplatte	100 µl/Well
9 cm Petrischale	10 ml

2.2.1.4. Mechanische Isolation

Tabelle 15: Lösungen mechanische Isolation

Lösung	Zusätze	Endkonzentration
Kollagenase-II-Lösung 0,07 %	0,7 mg Kollagenase II	0,07 %
	1 ml DPBS	
Färbelösung	0,75 ml Trypanblau 0,5 % (Stammlösung)	0,125 %
	2,25 ml DPBS	

Das hier beschriebene Verfahren zur Isolation von humanen Osteoblasten baut auf dem von Gallagher und Beresford *et al.* erstbeschriebenen Prinzip auf [165, 166] und wurde von Ehnert, Baur *et al.* Modifiziert [167]. In den für die Versuche benutzten Passagen P3 und P4 exprimierten die Zellen osteoblastentypische Oberflächenmarker in der Durchflußzytometrie: negativ für CD14 und CD45 aber positiv für CD90 und CD105 [167].

Unter sterilen Bedingungen wurde die Spongiosa mit einer Luer Hohlmeißelzange von den Knochenresten entfernt. Das Material wurde in einem sterilen Falcon mit DPBS mehrfach gewaschen um Blut und Fettreste zu entfernen. Anschließend wurde Kollagenase II-Lösung (1 ml Lösung pro 1 ml Knochenfragmente) zum Lösen der Knochenzellen hinzugegeben und die Suspension bei 37 °C im Wasserbad für eine Stunde inkubiert. Der Überstand wurde in ein neues Falcon überführt. Die Knochenreste wurden noch zweimal mit DPBS gewaschen um weitere Knochenzellen zu lösen. Die Spüllösung wurde ebenfalls in das frische Falcon überführt. Durch Zugabe von Wachstumsmedium wurde die Kollagenasereaktion gestoppt und das Gesamtvolumen mit DPBS im Falcon auf 45 ml aufgefüllt. Anschließend wurde das Falcon zentrifugiert (600 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT)). Das dabei gebildete Pellet wurde nach Entfernen des Überstandes in 15 ml Wachstumsmedium gelöst. Diese Zellsuspension wurde in eine T75 Kulturflasche gefüllt und 62,5 µl A/A-Lösung (Antibiotika-/Antimykotikalösung) hinzugegeben. Die Flasche wurde im Inkubator (37 °C und 5 % CO₂) gelagert. Am ersten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit erneu-

2. Material und Methoden

ter Zugabe von A/A-Lösung. Ab hier erfolgte der Mediumwechsel je nach Verfärbung des Mediums etwa alle 3-4 Tage.

2.2.1.5. Zellkultur

Passagieren und Splitten der Zellen

Nach der Isolation wurden die Zellen in einer T75-Flasche kultiviert (P0) und anschließend in eine größere T175-Flasche „passagiert“ (P1). Beim Übergang von P1 zu P2 wurden die Zellen auf zwei T175-Flaschen „gesplittet“. Meist wurden P2 Zellen, selten auch P3 Zellen für die Experimente ausplattiert.

Die Zellkultur wurde nach Entfernen des Mediums zweimal mit DPBS (10 ml DPBS bei T75-Flasche und 13 ml bei T175-Flasche) gewaschen. Anschließend wurde die entsprechende Menge einer bei 37 °C vorgewärmten Trypsin/EDTA-Lösung hinzugegeben (für T75-Flasche 1 ml, für T175-Flasche 2 ml) und die Flasche für 5-10 min inkubiert (bei 37 °C und 5 % CO₂). Die Zellen wurden durch Beklopfen des Flaschenrandes gelöst und dies unter dem Mikroskop kontrolliert. Das Trypsin wurde anschließend durch Zugabe der entsprechenden Menge Wachstumsmedium inaktiviert (für T75-Flasche 8 ml, für T175-Flasche 10 ml). Der Flascheninhalt wurde in ein Falcon überführt und zentrifugiert (600 g für 10 Minuten bei RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Wachstumsmedium gelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend zusammen mit weiteren 15 ml Wachstumsmedium in eine T175 Flasche überführt.

Das Ausplattieren für die Zellkulturexperimente erfolgte mit Zellen der P2 oder P3 Generation. Die Zellen wurden wie oben beschrieben gelöst. Nach Zentrifugation der Zellen wurde das Pellet in 10 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Durch Schütteln wurde eine homogenere Verteilung der Zellen in der Lösung erreicht, sodass 25 µl repräsentativ entnommen werden konnten und in 25 µl Trypanblau-Lösung in einem Eppendorfgefäß gelöst wurden. Diese Lösung wurde in der Zählkammer ausgezählt und somit auf die Zellzahl in der 10 ml Lösung zurückgeschlossen. Bei einer 96-Well Platte wurden jeweils 3.000-5.000 Zellen pro Well pipettiert und zusätzlich Petrischalen oder 6-Well Platten mit den weiteren Zellen für Proteinlysate oder RNA-Isolation ausplattiert. Zellen in den 96 Well-Platten wurden direkt in Differenzierungsmedium ausplattiert.

2. Material und Methoden

Zellen in 6 Well-Platten und Petrischalen wurden mit Wachstumsmedium behandelt bis die Zellen eine Konfluenz von etwa 90-100 % erreicht hatten. Erst anschließend wurde die Reifungsphase induziert, durch Zugabe des Differenzierungsmediums und CIT-Behandlung.

2.2.2. Magnetfeldapplikation

Die Stimulation erfolgte mit dem Somagen[®] Master der Sachtleben GmbH. Genutzt wurde das Programm #16. Die Zellkulturen wurden auf den Applikator aufgesetzt (siehe Abbildung 6).

Spezifikationen des elektromagnetischen Feldes (EMF):

Das Feld ist ein pulsierendes EMF. Dabei wird eine Gruppe von Pulsen der Frequenz 16 Hz emittiert und dazwischen in den Pausenintervallen kein Signal gesendet. Die Feldstärke reicht von 6-280 μT , gemessen 6 mm oberhalb der Applikatorfläche. Die Stimulationsparameter wurden in Vorexperimenten, entsprechend der Zellreaktion, ausgewählt [51]. Hier wurde auch die Stimulationsdauer optimiert. Bei einer Stimulationsdauer von 7 min zeigte sich ein optimaler Effekt, dieser ließ sich durch eine Verlängerung auf 30 min nicht verbessern (laborinterne Versuche, nicht veröffentlicht). Eine häufigere Applikation zeigte hingegen einen verbessernden Effekt, sodass in der vorliegenden Arbeit jeden Wochentag stimuliert wurde (laborinterne Versuche, nicht veröffentlicht). Die Applikation erfolgte vormittags zu ähnlicher Uhrzeit am gleichen Ort. Die Kontrolle wurde während der Stimulationsdauer, außerhalb der Reichweite des EMF, bei gleichen Umgebungsbedingungen gelagert.

2. Material und Methoden

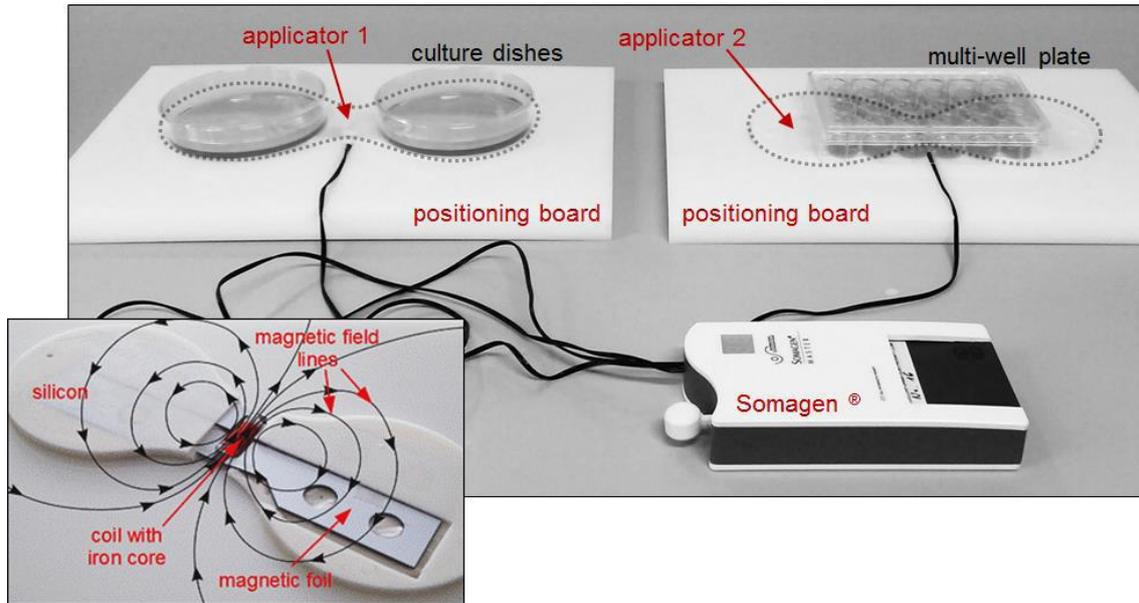


Abbildung 6: Versuchsaufbau während der PEMF-Stimulation. Versuchsaufbau während der PEMF-Stimulation mit dem 16 Hz PEMF. Grafik aus [51].

2.2.3. Messung des Resazurinumsatzes

Tabelle 16: Lösungen Resazurinumsatz

Lösung	Zusätze	Endkonzentration
0,025 % Stammlösung	0,125 g Resazurin Natriumsalz	0,025 %
	500 ml DPBS	
Lagerung für 6 Monate bei -20 °C		
Resazurin-arbeitslösung	100 µl Stammlösung	0,0025 %
	1 ml DPBS	

Bei der Messung des Resazurinumsatzes wird die Reduktion des Resazurin zu dem fluoreszierenden Resorufin quantifiziert. Dabei verändert sich sowohl Absorption als auch Fluoreszenz, wobei die Fluoreszenzänderung sensitiver ist [168]. Die Fluoreszenz des Produkts Resorufin wird bei einer Wellenlänge von 590 – 610 nm gemessen (Anregungswellenlänge 544 nm). Während des Zelltods geht die Fähigkeit zu dieser Resorufinreduktion verloren, sodass die Resazurin-Konversion meist zur Beurteilung der Zellviabilität, Toxizität und Proliferation genutzt wird [168].

Protokoll: Pro Well, in denen die Zellen von 100 µl Medium (96 Well-Platte) bedeckt waren, wurde 10 µl/Well einer 0,0025 %igen Resazurinlösung hinzugefügt. Nach 30 min inkubieren (37 °C und 5 % CO₂) wurde die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen. Es wurden jeweils Quadruplikate

2. Material und Methoden

gemessen. Es wurde jeweils ein Well mit Medium, ohne Zellen, und mit o.g. Zusätzen als Hintergrund gemessen [51].

Berechnung des Ansprechens auf CIT für Resazurin: Aus den zellfreien Wells wurde ein Hintergrundwert mittels Medianfunktion errechnet. Nach Subtraktion des Hintergrundwertes wurde aus den Quadrupeln ein Medianwert für den Spender errechnet und dieser mittels der Steigung aus der Standardkurve auf die Zellzahl umgerechnet. Die Standardkurve wurde in Vorexperimenten mittels definierten Zellzahlen als Ausgleichsgerade nach $y = x * m + b$ (y = Fluoreszenz-Signal; x = Resazurinumsatz bei definierter Zellzahl; b = Fluoreszenz bei 0 Zellen) ermittelt.

Tabelle 17: Lösungen AP-Aktivität

Lösung	Zusätze	Endkonzentration
AP Puffer	3,75 g Glycin	50 mM
	12,11 g Tris Base	100 mM
	203 mg MgCl ₂	1 mM
	NaOH	pH=10,5
	mit ddH ₂ O auffüllen	Gesamtvolumen: 1 l
Lagerung bei RT		
AP Substratlösung	1,3 mg pNPP (4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat)	3,5 mM
	1 ml AP Puffer	0,1 M
Lagerung bei -20 °C		
Standardkurve		
Standardlösung 1	50 µl 10 mM pNP Lösung	500 µM pNP Lösung
	950 µl AP Puffer Lösung	
Weitere Standardlösungen als 1:1 Verdünnungsreihe	500 µl Standardlösung X	verschiedene Konzentrationen in µl: 250 / 125 / 62,5 / 31,25 / 115 , 625 / 7,8125 / 0
	500 µl AP Puffer Lösung	
Die Menge gelösten pNP's ist in einem linearen Verhältnis zur gemessenen Absorption (optical density / OD bei 405 nm). Entsprechend wurde eine Standardgerade ermittelt nach der Formel $y = m * x + b$ (y = OD, x = Konzentration pNP, b = Achsenabstand. Nach Abzug des Hintergrundwertes für Zellfreie Wells wurde auf die pNP Konzentration nach $x = y / m$ zurückgeschlossen.		

2.2.4. Messung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP)

2. Material und Methoden

Die Alkalische Phosphatase ist ein Enzym welches v.a. in der Leber, Galle, Plazenta und Knochen in hohen Konzentrationen vorkommt. Erhöhte Spiegel an Alkalischer Phosphatase im Serum deuten u.a. auf Erkrankungen des hepatobiliären Systems oder vermehrten Knochenumsatz hin. Während der Reifung von Osteoblasten in Zellkulturen zeigt sich ein charakteristischer Verlauf der AP-Bildung, sodass AP häufig als Marker der Differenzierung genutzt wird.

Bei Osteoblasten, lassen sich drei Stadien des Wachstums und der Differenzierung unterscheiden: Proliferation, Matrixreifung und Mineralisierung. Im ersten Stadium der Proliferation steht ein hohes Zellwachstum im Vordergrund, zusammen mit Bildung einer extrazellulären Kollagenmatrix. Im zweiten Stadium steht die Matrixreifung im Vordergrund. Die gebildeten Kollagenfasern werden in Anordnung und Organisation verändert sodass sie im folgenden Stadium mineralisiert werden können. Von Wachstum bis zur Matrixreifung nimmt die AP-Aktivität kontinuierlich zu, danach nimmt sie wieder ab. Über die Messung der AP-Aktivität kann man Rückschlüsse auf den Fortschritt der Differenzierung der Osteoblasten ziehen.

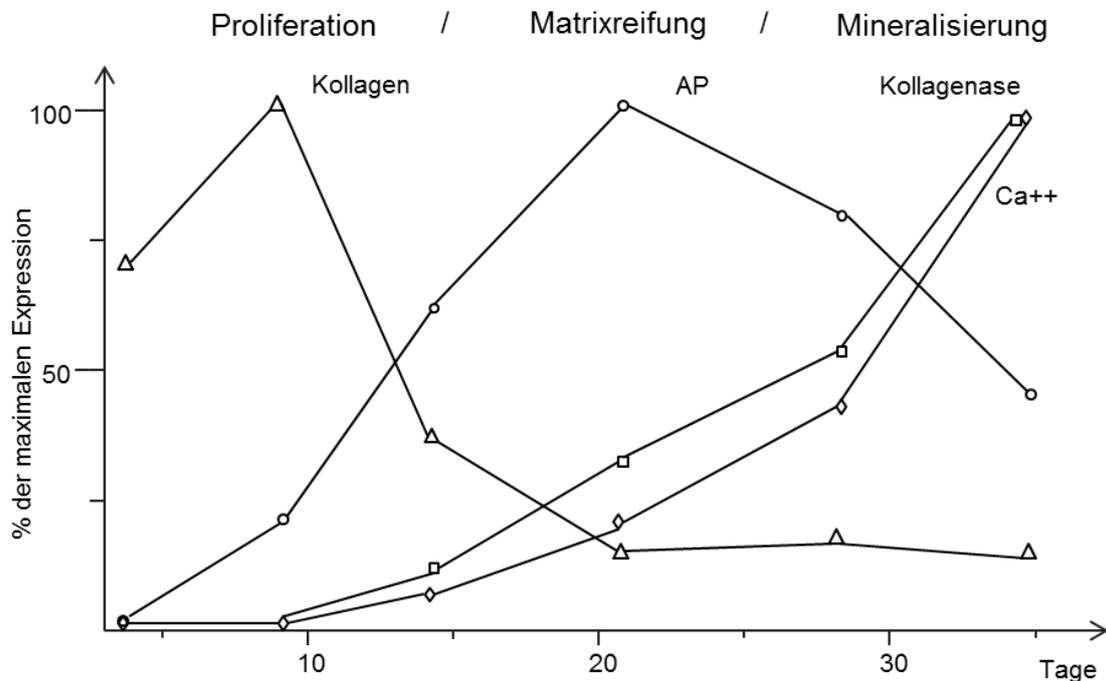


Abbildung 7: Phasen der Reifung von Osteoblasten in Zellkulturen. Darstellung der 3 Phasen bei Osteoblasten isoliert aus Schädeldecken von Ratten, nach Lian und Stein [49]. Änderung verschiedener Reifungsmarker, insbesondere der alkalischen Phosphatase im Zeitverlauf. Während der Mineralisierungsphase lässt sich Apoptose beobachten.

2. Material und Methoden

Das hier genutzte Verfahren beruht auf dem schon 1946 beschriebenen Verfahren zur Quantifizierung der Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum [169]. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse von Phosphates-tern. Bei der Messmethode wird das Substrat pNPP (p-Nitrophenylphosphat) zu pNP (p-Nitrophenol) hydrolysiert. pNPP ist dabei farblos, während pNP eine intensive gelbe Farbe hat. Durch die veränderte Absorption kann auf die Menge an gebildetem pNP zurückgeschlossen werden. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen [170].

Protokoll: Die Messung der AP Aktivität erfolgte nach der Messung des Resazurinumsatzes. Die Zellen wurden nach Entfernen der Resazurininlösung und Medium mit DPBS gewaschen und anschließend mit 100 µl AP-Substratlösung pro Well (96 Well-Platte) stimuliert. Nach Inkubation (37 °C und 5 % CO₂) wurde nach 10 min die Absorption gemessen (Wellenlänge 405 nm) [167, 171]. Mit Hilfe einer Standardkurve aus pNP-Konzentrationen wurde die Menge an von Zellen gebildetem pNP quantifiziert und der Umsatz auf eine Stunde hochgerechnet.

2.2.5. Berechnung des Ansprechens auf PEMF-Stimulation

Die Berechnung des Ansprechens erfolgte wie von Ehnert et al. [51] in Vorarbeiten beschrieben. Für die einzelnen Zeitpunkte (Tag 4, 7) wurde für jeden Spender der Median von Resazurinumsatz und AP-Aktivität errechnet. Die befeldete Probe wurde relativ auf die unbefeldete Probe bezogen, der prozentuelle Zuwachs oder Abnahme zur unbefeldeten Probe wurde als Prozentwert ausgedrückt. Die Summe der Prozentwerte von Tag 4 und Tag 7 für Resazurinkonversion und AP-Aktivität bildet das rechnerische Ansprechen.

2.2.6. Quantifizierung der Matrixmineralisierung

Tabelle 18: Lösungen Alizarinrot Quantifizierung

Lösung	Zusätze	Endkonzentration
0,5 % Alizarinrot Färbelösung	200 mg Alizarinrot S	0,5 %
	40 ml ddH ₂ O	
	NaOH/HCl Ziel-pH 4,0	pH 4,0

2. Material und Methoden

Lagerung lichtgeschützt bei RT		
10 % Cetylpyridiumchlorid-Lösung	10 g Cetylpyridiumchlorid Monohydrat	10 %
	100 ml Leitungswasser	
Aufheizen im Wasserbad im den Feststoff zu lösen. Lagerung bei RT		
Standardkurve		
Standard 1	900 µl Cetylpyridiumchlorid-Lösung	0,05 %
	100 µl 0,5 % Alizarinrot Färbelösung	
Weitere Standardlösungen als 1:1 Verdünnungsreihe	500 µl Standardlösung X	verschiedene Konzentrationen in µl: 0,025 / 0,0125 / 0,00625 / 0,003125 / 0,0015625 / 0,00078125 / 0
	500 µl Cetylpyridiumchlorid Lösung	
Die Menge gelösten Alizarinrot ist in einem linearen Verhältnis zur gemessenen Absorption (optical density / OD bei 560 nm). Entsprechend wurde eine Standardgerade ermittelt nach der Formel $y = m * x + b$ ($y = OD$, $x = \text{Konzentration Alizarinrot}$, $b = \text{Achsenabstand}$). Nach Abzug des Hintergrundwertes für Zellfreie Wells wurde auf die Alizarinrot Konzentration nach $x = y / m$ zurückgeschlossen.		

Alizarinrot färbt freie Calciumablagerungen rot ein. Im der Stadium der Mineralisierung lagern Osteoblasten *in vitro* große Mengen an extrazellulärem Calcium ab. Durch Lösen des Alizarinrot und spektrophotometrischer Quantifizierung kann indirekt auf die Calciumablagerungen zurückgeschlossen werden.

Protokoll: Das Medium wurde von den Zellen abpipettiert und die Zellen mit 99%igem Ethanol fixiert. Die Wellplatten wurden für mindestens 60 min bei -20 °C fixiert. Anschließend wurden die Zellen 3-4 mal mit Leitungswasser gewaschen und 100 µl pro Well (96 Well-Platte) Alizarinrot Lösung zu den Zellen hinzugegeben. Nach etwa 30 min wurden die Zellen erneut 3-4 mal mit Leitungswasser gewaschen um ungebundenes Alizarinrot zu entfernen. Mit dem Mikroskop wurden Bilder zur Dokumentation aufgenommen.

Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurden die Zellen luftgetrocknet und danach mit jeweils 100 µl Cetylpyridiumchlorid Lösung pro Well behandelt. Hierfür wurden die Zellen 15-60 min bei RT schwenkinkubiert. Nach Lösen der Färbung wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen.

Mittels den Standardkonzentrationen wurde auf die gebundene Menge Alizarinrot zurückgeschlossen [172].

2. Material und Methoden

2.2.7. Quantifizierung der gebildeten ROS mittels DCFH-DA Assay

Tabelle 19: Lösungen DCFH-DA Assay

Lösung	Zusatz	Endkonzentration
DCFH-DA Lösung	10 mM DCFH-DA Stammlösung	10 µM
	1,5 ml DPBS	
Wasserstoffperoxid-Lösung	8 ml DPBS	0,045 %
	12 µl 30 % H ₂ O ₂	

Die DCFH-DA Messung wurde 1965 erstmals beschrieben [173] und ist die meist verbreitete Methode um intrazelluläre H₂O₂ und oxidativen Stress zu messen [174]. Die Messung beruht auf dem Prinzip, dass das lipophile und nicht fluoreszierende DCFH-DA (Dichlorodihydrofluorescein Diacetat) in die Zelle aufgenommen und intrazellulär zu DCFH (DCFH Carboxylat-Anion) hydroxyliert wird. DCFH ist hydrophil, kann dadurch die Zellmembran nicht passieren und reichert sich intrazellulär an. Durch eine zwei Elektronen Oxidierung entsteht intrazellulär das fluoreszierende Produkt 2,7-Dichlorofluorescein (DCF) [174]. Dazu ist anzumerken, dass der Mechanismus wie das fluoreszierende Produkt DCF gebildet wird komplex ist und nicht durch eine direkte Reaktion mit H₂O₂ erfolgt. So unterstützen verschiedene Mechanismen die Bildung von DCF. Auch Redox-aktive Metalle (wie z.B. Fe²⁺) und Cytochrom C, welches bei der Apoptose aus dem Mitochondrium ins Zytosol wandert, können DCF bilden. Eine spezifische Messmethode für intrazelluläres H₂O₂ ist die Methode nicht. Auch andere ROS können zur Bildung von DCF beitragen, insbesondere •O₂⁻, HO•, ONOO⁻ [174].

Die Messung wurde in PBS und ohne Serumzusätze oder Eisenzusätze und mit einer homogenen Kultur von Osteoblasten durchgeführt. Die Kontrollen wurden gleich behandelt wie die stimulierten Proben, sodass bei diesem Versuchsaufbau zwar nicht direkt auf H₂O₂ zurückgeschlossen werden kann aber auf die Menge an ROS [174].

Protokoll: Pro Well einer 96 Well-Platte (pro Well ca. 5.000 Zellen) wurden 10 µl der DCFH-DA-Lösung hinzugegeben und für 20 Minuten inkubiert (37 °C und 5 % CO₂). Anschließend wurde die Kultur für ca. 7 Minuten mit dem EMF befe-

2. Material und Methoden

det. Die Kontrollplatte blieb unbefeldet. Kontrollplatte als auch behandelte Platte wurden gleich lang bei 37°C als auch während der Stimulation, bei Raumtemperatur, inkubiert. Direkt nach Beenden der Stimulation wurden die Zellen zügig dreifach mit DPBS gewaschen. In vier Wells je Spender wurden 100 µl DPBS jeweils zu den unbefeldeten und befeldeten Zellen pipettiert. Für die Positivkontrolle wurden in den übrigen vier Wells des Spenders 100 µl/Well einer 0,045%igen Wasserstoffperoxid-Lösung zu den unbefeldeten und befeldeten Zellen pipettiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz des DCF bei einer Ex-tinktion von 485 nm (Anregungswellenlänge bei 535 nm) nach 5, 10, 15 und 20 min quantifiziert (modifiziert nach [175]).

Die Zunahme wurde jeweils zum Zeitpunkt 0 relativ gesetzt und die einzelnen Zeitpunkte zum jeweiligen Mittelwert der Kontrolle (unbefeldet + H₂O₂) zu diesem Zeitpunkt relativ gesetzt. Die Werte wurden auf die Positivkontrolle (unbefeldete mit H₂O₂ stimulierte Zellen) normalisiert. Zwei Spender (343 und 356) wurden aus der Berechnung entfernt, aufgrund fehlerhafter Erfassung.

2.2.8. qRT-PCR

2.2.8.1. Allgemeines

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, kurz PCR) können kurze, genau definierte Genabschnitte, vervielfältigt werden. Dies erfolgt durch eine thermostabile Polymerase (hier eine modifizierte Taq-Polymerase) und für den Genabschnitt spezifische Primer (jeweils Primer für die 5'→3' und 3'→5' Richtung). Bei der qRT-PCR (quantitative Echtzeit PCR, engl. real-time quantitative PCR) wird nach jedem Amplifikationsschritt die Menge an doppelsträngiger DNA gemessen. Hierfür wurde SYBR Green genutzt, ein Farbstoff der durch Binden an doppelsträngige DNA einen Komplex bildet, welcher zur Fluoreszenz angeregt werden kann.

In der exponentiellen Phase liegen optimale Reaktionsbedingungen vor, die Effizienz der Reaktion liegt idealerweise bei 100 %. Das Fluoreszenzsignal korreliert in dieser Phase direkt mit der Menge des gebildeten Produktes, sodass die Expression der verschiedenen Gene miteinander verglichen werden kann. Dies erfolgt über die C_T Werte. Der C_T Wert (Threshold Cycle) ist der Zyklus an

2. Material und Methoden

dem die Fluoreszenz zum ersten Mal messbar wird. Je niedriger dieser ist, desto früher ist die Produktmenge sichtbar geworden und desto mehr cDNA befand sich in der Probe, bzw. entsprechend höher ist die Expression, dadurch ist eine relative Aussage über die Stärke der Expression möglich.

2.2.8.2. Probengewinnung und -aufbereitung

2.2.8.2.1. Isolation der mRNA mit TriFast

Tabelle 20: Lösungen Isolation mRNA

Lösung	Zusätze	Endkonzentration
DEPC H ₂ O (0,1 %)	1 ml DEPC	0,1 %
	1 l ddH ₂ O	
Für 1 h bei 37 °C inkubieren. Anschließend autoklavieren und abkühlen lassen auf RT		
70 % Ethanol	70 ml 99 % Ethanol	70 %
	30 ml DEPC H ₂ O	

Die Isolation der mRNA erfolgt mittels peqGOLD TriFast von peqlab entsprechend dem Herstellerprotokoll. Dabei wird RNA von DNA und Protein, durch eine Phasentrennung, getrennt. Die obere wässrige Phase enthält die RNA, während die mittlere Interphase v.a. DNA enthält und die untere organische Phase v.a. Proteine enthält. Nach der Phasentrennung erfolgte noch ein mehrmaliges Waschen des RNA Pellets.

Protokoll:

Phasentrennung: Das Medium wurde abgesaugt und 500 µl TriFast Lösung pro Kulturschale hinzugegeben. Mittels eines Zellschabers wurden die Zellen von der Oberfläche gelöst und die Lösung in ein Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß übertragen und bei RT kurz (ca. 30 sek) inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Chloroform der Zellsuspension zugefügt und die Probe für etwa 15 sec gevortext. Darauf folgte eine erneute Inkubation bei RT für 10 Minuten, gefolgt von 10 min Zentrifugation bei 4 °C mit 14.000 g. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß übertragen welches 250 µl Isopropanol enthielt. Als Zwischenschritt wurde die Probe hier bei -20 °C für 1-24 h gelagert. Dadurch wurde die Ausbeute an RNA erhöht.

Waschschritte: Die Probe wurde nach dem Auftauen auf Eis 10 min bei 14.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt ohne das

2. Material und Methoden

Pellet zu verlieren. Nun wurde das Pellet zweimal hintereinander gewaschen: es wurden 1 ml 70 %ige Ethanollösung hinzugefügt und erneut zentrifugiert (14.000 g bei 4 °C für 10 min) und anschließend der Überstand abgekippt. Dieser Waschschrift wurde wiederholt.

Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß für etwa 5 min offen stehen gelassen um verbliebenen Alkohol verdampfen zu lassen. Das Pellet wurde anschließend in 30 µl DEPC H₂O gelöst und erneut für etwa 15 min offen stehen gelassen um etwaigen restlichen Ethanol entweichen zu lassen.

2.2.8.2.2. RNA Quantifizierung

Isolierte RNA kann Kontamination von Salz, Proteinen, Lösungsmitteln und genomischer DNA enthalten. Nukleinsäuren können bei einer Wellenlänge von 260 nm detektiert werden, Proteine, Salze und Lösungsmittel bei einer Wellenlänge von 230 und 280 nm. Bei einer Relation dieser Absorptionen 260 nm/280 nm von 1,8-2,0 bzw. 260 nm/230 nm von mindestens 1,8 kann man von einer ausreichenden RNA Qualität für die PCR/qPCR ausgehen.

Das Verhältnis wurde mit der LVis Plate von BMG im FluoStar Omega Plate Reader entsprechend den Herstellerangaben gemessen. Als Hintergrundmessung wurde in die Messkammer der LVis Platte 2 µl DEPC H₂O pipettiert und hier die Absorption mittels des Programms „LVIS DUST CHECK“ gemessen. War die OD >0,05 wurde die Platte vorsichtig mit DEPC H₂O geputzt und die Messung wiederholt, bis die OD entsprechend <0,05 war. Danach wurde die Messung mit 2 µl der Probe durchgeführt.

2.2.8.2.3. Gelelektrophorese

Tabelle 21: Lösungen Gelelektrophorese

Lösung	Zusätze	Endkonzentration
10x TBE (TRIS-Borat-EDTA-Puffer)	108 g TRIS	0,89 M
	55 g Borsäure 99,8 % p.a.	0,89 M
	40 ml EDTA (0,5 M) pH 8 (EDTA Dinatriumsalz / Dihydrat)	20 mM
	ddH ₂ O	Volumen auf 1 l auffüllen
Agarose Gel	1,5-2 g Agarose	1,5-2 % Mischung aufkochen
	100 ml 1x TBE (1:10 Verdünnung mit ddH ₂ O)	

2. Material und Methoden

	7 µl Ethidiumbromid	In die kochende Lösung zugeben
--	---------------------	--------------------------------

Agarose bildet in der getrockneten Form ein Netzwerk. Je höher die Agarosekonzentration im TBE Puffer ist, desto kleiner ist die Porengröße. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen wandern Nukleinsäuren bei Anlegen einer Spannung zur Anode. Dabei bewegen sich kleinere Moleküle schneller zur Anode und legen dadurch eine größere Strecke zurück. Dadurch können die einzelnen Komponenten des Gemisches räumlich aufgetrennt werden.

Protokoll: 100 ml der 1:10 Verdünnung des 10x TBE-Puffer wurden mit 1,5-2 g Agarose zum Kochen gebracht und 7 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Durch vorsichtiges Schwenken wurde das Ethidiumbromid verteilt und anschließend in die vorbereitete Form gegossen. Luftblasen wurden mittels einer Pipettenspitze entfernt.

2.2.8.2.4. Überprüfung der Integrität der RNA mittels Elektrophorese

Tabelle 22: Lösungen Überprüfung der Integrität

Lösung	Zusätze	Endkonzentration
PCR Ladepuffer (5x)	25 mg Bromphenol Blau	
	5 ml 10 x TBE	5x
	5 ml Glycerol (10 %)	5 %
Lagerung bei +4 °C oder -20 °C		

Bevor die mRNA-Lösung mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben wurde, erfolgte eine Prüfung auf unerwünschte RNA und Proteinverunreinigungen. Die mRNA besteht aus 18S und 28S ribosomaler RNA. Mittels Gelelektrophorese wurde die Lösung nach Molekülgröße aufgelöst. Dabei ließen sich zwei deutliche Banden für die 18S und 28S ribosomale RNA erkennen. Zeigt sich dabei ein Schleier über verschiedene Molekülgrößen hinweg und ohne klare Banden, spricht dies für eine Verunreinigung [176].

Protokoll: Pro Lösungsansatz wurden 1000 ng RNA vorbereitet. Zu der RNA-Lösung wurde das Volumen mit DEPC H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Weiter wurden 2,5 µl 5x Ladepuffer (bzw. 1/5 des Endvolumens) hinzugefügt. Es wurden jeweils 3 µl dieser Lösung pro Gelkammer pipettiert. Die Probe werde bei 90 V für 40-45 min aufgetrennt.

2. Material und Methoden

2.2.8.3. Poolen der Proben

Die Proben wurden in zwei Gruppen entsprechend ihrem Ansprechen auf die Behandlung mit dem EMF unterteilt. Dabei wurde der Grenzwert bei 64 % rechnerischem Ansprechen angesetzt. Neben dem Ansprechen richtete sich dieser Grenzwert nach der Menge verfügbarer cDNA. Da von den einzelnen Spendern RNA in verschiedenen Mengen bestand, ist die Verteilung einzelner Spender in den Gruppen nicht gleichmäßig (siehe Tabelle 23).

2.2.8.4. Aufreinigung der gepoolten Probe

Die Aufreinigung der gepoolten Proben erfolgte mit dem RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit von Qiagen entsprechend dem Herstellerprotokoll.

Dabei wurde zu der RNA-Lösung 1 ml QIAzol Lysis Reagent hinzugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und vortexen erfolgte erneut eine Inkubation über 3 min bei RT. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 12.000 g und 4 °C für 15 min. Die obere Phase wurde vorsichtig in ein RNeasy Mini Spin Gefäß übertragen und anschließend für 15 s bei RT und >8.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Es wurden jeweils maximal 700 µl der Probe in zwei Durchgängen gefiltert.

In das RNeasy Mini Spin Gefäß wurden 700 µl des Puffers RW1 hinzugefügt und anschließend erneut für 15 sec bei >8.000 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Zentrifugationsschritt wurde nach Zugabe von 500 µl RPE Puffer wiederholt. Danach wurde nochmals 500 µl RPE Puffer hinzugegeben und für 2 min bei >8.000 g und RT zentrifugiert. Anschließend wurde das RNeasy Mini Spin Gefäß in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß als Auffanggefäß überführt. Nach Zugabe von 30-50 µl RNase-freiem Wasser erfolgte eine erneute Zentrifugation für 1 min bei >8.000 g bei RT. Anschließend wurde die RNA nochmals quantifiziert und die Integrität kontrolliert. Durch Zugabe von RNase freiem Wasser wurde die Gesamtkonzentration auf 1946,8 ng / 20 µl bzw. 97,34 ng/µl verdünnt.

2. Material und Methoden

Tabelle 23: Übersicht über die Verteilung der nRNA Mengen in den gepoolten Gruppen.

Spender Nummer	Menge RNA in ng pro 10 µl Probe	Anteil an der RNA Menge der Gruppe in %
Non-Responder Gruppe		
119	1318,64	8,6 %
172	1678,64	11,0 %
176	1016,72	6,6 %
186	1281,56	8,4 %
188	637,56	4,2 %
128	1705,08	11,1 %
166	1181,64	7,7 %
174	3290,64	21,5 %
212	1959,16	12,8 %
127	1252,08	8,2 %
		Median: 8,5 %
Responder Gruppe		
132	1156,64	7,8 %
139	1300,28	8,7 %
151	1164,32	7,8 %
171	935,32	6,3 %
126	1836,24	12,3 %
142	1689,8	11,4 %
148	1829,84	12,3 %
149	1457,24	9,8 %
167	2395,24	16,1 %
140	1118,92	7,5 %
		Median: 9,3 %

2.2.8.5. cDNA Synthese aus den gepoolten Proben

Die cDNA Synthese erfolgte mit dem RT² First Strand Kit von Qiagen entsprechend dem Hersteller-Protokoll. Hier erfolgt vor der eigentlichen cDNA Synthese eine Behandlung mit DNase um DNA-Verunreinigungen zu entfernen.

Die Mengen der Lösungen sind jeweils für einen Reaktionsansatz angegeben.

Mix zum Entfernen genomischer DNA:

20 µl	RNA-Lösung (mRNA: ca. 97,34 ng/µl, 1946,8 ng in 20 µl)
5 µl	GE Puffer

25 µl Gesamtvolumen

2. Material und Methoden

Reverse Transkriptase Mix:

10 µl	5x Buffer BC3
2,5 µl	Control P2
5 µl	RE3 Reverse Transcriptase Mix
7,5 µl	Nuklease freies Wasser (kein DEPC)

25 µl Gesamtvolumen

Protokoll: Als erstes wurde der Mix zum Entfernen genomischer DNA angesetzt und anschließend für 5 min bei 42 °C inkubiert und dann für mindestens 1 min auf Eis gelagert. Zu den 25 µl des Mix zum Entfernen genomischer DNA wurde nach der Inkubation 25 µl des reverse Transkriptase Mix hinzugefügt und durch vorsichtiges Pipettieren vermischt. Die cDNA-Synthese wurde durch Inkubieren für 15 min bei 42 °C aktiviert und danach die Reaktion durch ein Aufheizen auf 95 °C für 5 min beendet. Zu dem Gemisch wurden 227,5 µl Nuklease freies Wasser hinzugefügt und durch pipettieren vorsichtig vermischt. Dadurch wurde die Konzentration auf 7 ng/µl verdünnt. Anschließend wurde die cDNA bis zur Nutzung bei -20 °C eingefroren. Die erfolgreiche Synthese wurde durch eine PCR des GAPDH-Gens bestätigt.

2.2.8.6. Spender und Gene auf den qRT-PCR Array Platten

Die qRT-PCR wurde mit den 96 Well RT² ProfilerTM PCR Array PAHS-065YC (Human Oxidative Stress Plus) der Firma Qiagen durchgeführt. Für eine detaillierte Auflistung mit vollständigen Namen und Datenbank-Codes siehe Tabelle 37 im Anhang.

Tabelle 24: qPCR Array: Gene und Übersicht der Anordnung beim Human Oxidative Stress Plus Array (Zeile H: H1-H5: Housekeeping Gene, H6-H12: verschiedene Kontrollen).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ALB	ALOX12	AOX1	APOE	ATOX1	BNIP3	CAT	CCL5	CCS	CYBB	CYGB	DHCR24
B	DUOX1	DUOX2	DUSP1	EPHX2	EPX	FOXM1	FTH1	GCLC	GPX1	GPX2	GPX3	GPX4
C	GPX5	GSR	GSS	GSTP1	GSTZ1	HSPA1A	KRT1	LPO	MB	MBL2	MPO	MPV17
D	MSRA	MT3	NCF1	NCF2	NOS2	NOX4	NOX5	NUDT1	PDLIM1	PRDX1	PRDX2	PRDX3
E	PRDX4	PRDX5	PRDX6	PRNP	PTGS1	PTGS2	RNF7	VIMP	SEPP1	SFTPD	SIRT2	SOD1
F	SOD2	SOD3	SQSTM1	SRXN1	TPO	TTN	TXNRD2	UCP2	AKR1C2	BAG2	FHL2	GCLM
G	GLA	HMOX1	HSP90A A1	LHPP	NCOA7	NQO1	PTGR1	SLC7A11	SPINK1	TRAPP C6A	TXN	TXNRD1
H	<i>ACTB</i>	<i>B2M</i>	<i>GAPDH</i>	<i>HPRT1</i>	<i>RPLP0</i>	<i>HGDC</i>	<i>RTC</i>	<i>RTC</i>	<i>RTC</i>	<i>PPC</i>	<i>PPC</i>	<i>PPC</i>

2. Material und Methoden

2.2.8.7. qRT-PCR Protokoll

Pro 96-Well wurde eine Mischung nach folgenden Komponenten vorbereitet:

1350 µl	SYBR Green Mastermix	(12,5 µl pro Well)
1248 µl	RNase-freies Wasser	(11,5 µl pro Well)
102 µl	cDNA (7 ng/µl; ca. 700 ng /96 Well)	(1 µl pro Well)
<hr/>		
2700 µl	Gesamtvolumen/Array	(25 µl pro Well)

Für das Vorbereiten der qPCR Zusätze wurde auf einer RNase freien Arbeitsfläche sowie mit RNase freien Gefäßen und Pipettenspitzen gearbeitet. So wurden für jede einzelne gepoolte Probe gesonderte Einweg-Wannen und für jedes Well der qPCR eine Einweg-Pipettenspitze mit Filter genutzt.

Der qPCR Array wurde vor dem Pipettieren zentrifugiert um die Primer am Boden der Platte zu konzentrieren. Nach Pipettieren des Arrays wurde eine Klebefolie auf die offene Oberfläche angebracht. Anschließend wurde die Arrayplatte kurz zentrifugiert um alle Lösungsanteile auf den Boden der Reaktionsgefäße zu konzentrieren. Luftblasen welche die Fluoreszenz-Messung verfälscht hätten wurden so ebenfalls aufgelöst, ggf. auch erst durch vorsichtiges Klopfen.

2.2.8.8. Auswertung

Vortestung

Auf den Arrays befinden sich verschiedene interne Kontrollen um die Qualität des qPCR-Laufs zu testen. Dabei wird die Kontamination mit genomischer DNA, die erfolgreiche Transkription und die Reproduzierbarkeit überprüft. Weiter erfolgte nach jedem Lauf eine Schmelzkurvenanalyse. Proben bei denen sich eine auffällige Schmelzkurve zeigte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, um so mögliche Nebenprodukte sichtbar zu machen.

Aufgrund fehlender Produktbildung wurden folgende Gene aus der Auswertung ausgeschlossen. Kriterium dabei war eine Zyklenzahl von $C_T > 34,8$. Dies sind insgesamt 16 Gene: *ALB*, *ALOX12*, *DUOX2*, *EPX*, *GPX5*, *KRT1*, *LPO*, *MB*, *MBL2*, *MPO*, *MT3*, *NOS2*, *TPO*, *TTN*, *SPINK1*, *NCF1*.

2. Material und Methoden

statistische Auswertung

Die Rohdaten wurden mittels des von Qiagen bereitgestellten Onlinetools (GeneGlobe Data Analysis Center: <https://www.qiagen.com/de/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>) und mit Microsoft Excel 2010 entsprechend der $\Delta\Delta C_T$ Methode nach dem RT² Profiler PCR Array Handbook 06/2013 ausgewertet.

Relative Quantifizierung mit der $\Delta\Delta C_T$ Methode

Bei dieser Methode werden ΔC_T -Werte errechnet und miteinander verglichen. Um verschiedene Arrays miteinander vergleichen zu können, sind Housekeeping-Gene (HKG) auf den Arrays vorhanden. Diese sollten über alle Arrays nicht mehr als 1 Zyklus voneinander abweichen. Aus den HKG welche diese Bedingungen erfüllten wurde das geometrische Mittel gebildet. Für den Human Oxidative Stress Plus Array waren dies B2M, HPRT1, RPLP0.

2.2.9. semiquantitative RT-PCR

RT-PCR oder reverse Transkriptase PCR beschreibt die reversen Transkriptase Reaktion kombiniert mit einer konventionellen PCR. Zur Quantifizierung werden gleiche Mengen der verschiedenen Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Fluoreszenz des DNA bindenden Farbstoffs Ethidiumbromid photometrisch Quantifiziert. Da die Proben die gleichen Primer, Zyklenzahlen und Reaktionsbedingungen hatten, kann mittels des relativen Vergleichs eine Aussage zur Expression getroffen werden.

2.2.9.1. cDNA Synthese

Die mRNA Isolation erfolgte ebenfalls mit dem peqGOLD TriFast von peqlab. Die cDNA-Synthese der gepoolten Proben erfolgte mit dem THERMO SCIENTIFIC First Strand cDNA Synthesis Kit #K1612 entsprechend der Anleitung des Herstellers.

2. Material und Methoden

Aufreinigung mRNA (in RNase freiem Eppendorff Gefäß):

- 1 µg RNA
 - 1 µl 10X Reaction Buffer with MgCl₂
 - 1 µl DNase I, RNase-free
 - 7 µl Nukleasefreies Wasser
-

10 µl Gesamtvolumen

Die Lösung wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl 50 mM EDTA wurde die Lösung bei 65 °C für 10 min inkubiert.

cDNA-Synthese:

MIX 1:

- 9 µl RNA-Probe
 - 1 µl oligo (dT)₁₈ Primer
 - 1 µl random hexamer Primer
-

11 µl Gesamtvolumen

Für den Reaktionsansatz wurden zu 9 µl der RNA-Probe die Primer hinzugegeben. Das Gemisch wurde vorsichtig gevortext und kurz zentrifugiert, sodass sich das Material vollständig am Gefäßboden befand. Anschließend wurde die Probe für 5 min bei 65 °C inkubiert. Danach wurde der Reaktionsansatz auf Eis abgekühlt und 9 µl des Mix 2 hinzugegeben.

MIX 2:

- 4 µl 5x Reaction Buffer
 - 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)
 - 2 µl 10 mM dNTP MIX
 - 2 µl M-MuLV Reverse Transcriptase (20 U/µl)
-

9 µl Gesamtvolumen

(Alle Kitkomponenten wurden während des Ansetzens auf Eis gelagert.)

Die Lösung wurde kurz zentrifugiert und für 5 min bei 25 °C gefolgt von 60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Transkriptionsreak-

2. Material und Methoden

tion, durch Aufheizen auf 70 °C für 5 min, beendet. Die aufgereinigte cDNA Probe wurde mit DEPC H₂O auf die Konzentration von 10 ng/μl verdünnt.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Transkription wurde eine konventionelle PCR des GAPDH-Gens durchgeführt und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.9.2. RT-PCR Protokoll

Der Reaktionsansatz für einen PCR-Lauf wurde folgendermaßen in PCR-Mikroreaktionsgefäßen pipettiert:

10 μl	KAPA2G Fast Ready Mix + dye
1 μl	forward Primer
1 μl	reversed Primer
8 μl	cDNA und DEPC H ₂ O (je nach gewünschter Menge cDNA)
<hr/>	
20 μl	Gesamtvolumen

Für eine Übersicht über genutzte Zeiten und Temperaturen siehe Tabelle 25.

Tabelle 25: Zeiten der einzelnen RT-PCR Schritte

Phase	Temperatur in °C	Zeit
1. erste Denaturierung	95	3 min
2. Denaturierung	95	15 sec
3. Primerhybridisierung	Abhängig vom Primer	15 sec
4. Elongation	72	10 sec
5. Beenden der Reaktion	72 4 °C	10 min ∞

Zyklenzahl

Primerdesign und Optimierung der Bedingungen

Die Primer wurden mit Hilfe des Primerblast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) für die Sequenz des menschlichen Genoms entworfen. Dabei wurde darauf geachtet, dass mindestens eine Exon-Exon-Grenze des Zielgens Teil des Amplifikats ist.

2. Material und Methoden

Für einen Teil der ausgewählten Gene befanden sich Primer für das menschliche Genom im Bestand des Labors, sodass hier auf ein Design verzichtet wurde. Für folgende Gene wurden Primer neu designt: *UCP2*, *GPX3*, *NOX4*.

Die Primer wurden nach Temperatur, Konzentration der cDNA und Zykluszahl optimiert. Eine Auflistung der genutzten Bedingungen findet sich in Tabelle 11.

Quantifizierung: Elektrophoretische Auftrennung, Fotodokumentation und Densitometrische Auswertung [177]

Die PCR-Proben wurden bei 90 V für 35 min gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend die Fluoreszenz bei verschiedenen Belichtungszeiten fotodokumentiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mittels ImageJ. Zur Kontrolle wurde das Signal der Positivkontrolle, nach Subtraktion des Hintergrundsignals, relativ zur Expositionszeit gesetzt. Dieser Quotient sollte über die verschiedenen Belichtungszeiten konstant sein. Eine Abweichung weist auf eine verminderte Trennschärfe des Signals bei Werten im Sättigungsbereich hin. Entsprechend wurden die Bilder mit konstant gleichem Quotient für die Auswertung ausgewählt. Nach Bereinigung um das Hintergrundsignal wurden die einzelnen Proben auf GAPDH normalisiert. Da nicht alle Spender auf dem gleichen Gel aufgetrennt wurden, wurden die einzelnen Proben auf eine konstante Probe relativ bezogen, z.B. die Positivprobe.

2.2.10. Enzymassays

2.2.10.1. Proteinisolation für die Enzymassays

Tabelle 26: Lösungen Proteinisolation

Lösung	Zusatz	Endkonzentration
Lysepuffer	3,03 g Tris (Trizma Base)	50 mM
	0,186 g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	1 mM
	Mit dd H ₂ O auf Gesamtvolumen 500 ml auffüllen	90 % (v/v)
	50 ml Glycin	10 % (v/v)
	5,59 g KCl	0,154 M
	1 µl Pepstatin A pro 500 µl Gesamtlösung	1 µg/ml
	0,5 µl PMSF pro 500 µl Gesamtlösung	1 mM
	Mit 4 N HCl pH auf 7,2 titrieren (bei Lagerung auf Eis)	pH 7,2

Inhibitoren (PMSF und Pepstatin A) wurden jeweils frisch vor der Isolation hinzugefügt

2. Material und Methoden

Die Proteinisolation zur Messung der Enzymaktivitäten von SOD, GPX, CAT und GR wurde nach einem modifizierten Protokoll nach Lake durchgeführt [178].

Protokoll: Die Zellen wurden in 6 Well-Platten kultiviert. Pro Well wurden die Zellen 2-3 mal mit 2 ml PBS pro Well gewaschen und dann in jeweils 80 µl Lysepuffer gelöst und mit einem Zellschaber gekratzt. Anschließend wurde die Zellsuspension sofort in vorgekühlte Eppendorff Reaktionsgefäße auf Eis überführt. Zur vollständigen Lyse wurden die Proben bei -80 °C eingefroren. Um die weitere Isolation und Enzymmessungen parallel und zeitgleich bei den verschiedenen Proben durchzuführen, wurden alle Proben zeitgleich für die Weiterverarbeitung aufgetaut. Nach dem Auftauen auf Eis wurden die Proben zur weiteren Lyse im Ultraschallbad behandelt. Dabei erfolgte die Ultraschallbehandlung in eiskaltem Wasser für insgesamt 180 sek pro Probe. Alle 30 sek wurden die Proben kurz gevortext und auf Eis gelagert um ein übermäßiges Erwärmen zu verhindern. Die Suspension mit den lysierten Zellen wurde anschließend bei 800 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthält die Fraktionen des Zytosols und des Mitochondriums. Dieser wurde in vorgekühlte Eppendorff-Reaktionsgefäße überführt und auf Eis zwischengelagert. Anschließend wurde die Messung der Enzymaktivität von SOD, CAT, GPX und GR durchgeführt.

2.2.10.2. Proteinquantifizierung nach Lowry

Tabelle 27: Lösungen Proteinquantifikation nach Lowry

Lösung	Zusatz	Endkonzentration
BSA Standardlösung	50 mg BSA	10 µg/µl
	5 ml ddH ₂ O	
Lagerung bei -20 °C möglich		
Na-K- Tartrate Lösung	2 g Na-K-Tartrate	2 %
	100 ml ddH ₂ O	
CuSO ₄ Vorratslösung	1 g CuSO ₄ *5H ₂ O	1 %
	100 ml ddH ₂ O	
Na ₂ CO ₃ Vorratslösung	20 g Na ₂ CO ₃	2 %
	950 ml ddH ₂ O	
	50 ml 2 M NaOH	100 mM
Messlösungen		
Lösung A	20 µl Na-K-Tartrate Vorratslösung	0,02 %
	20 µl CuSO ₄ Vorratslösung	0,01 %
	mit Na ₂ CO ₃ Vorratslösung auf 2 ml Gesamtvolumen auffüllen	

2. Material und Methoden

Frisch ansetzen. Keine Lagerung		
Lösung B	500 µl Folin Reagenz	33 %
	1000 µl ddH ₂ O	
Frisch ansetzen. Keine Lagerung		

Mit dem Lowry Assay ist es möglich das Gesamtprotein in einer Lösung zu messen. Dabei verändert sich die Farbe mit zunehmender Proteinkonzentration. Durch Messung der Absorption kann so auf die Menge des Gesamtproteins in Lösung zurückgeschlossen werden [179].

Protokoll: Die Messung erfolgte in einer 96 Well-Platte. Pro Probe wurden mindestens Duplikate angefertigt. Jeweils 2 µl Standard und Probe wurden pro Well pipettiert. Dazu wurden 150 µl der Lösung A pro Well hinzugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 30 µl Lösung B pro Well hinzugegeben. Die Platte wurde für 1-6 h bei RT schwenkinkubiert. Die Absorption wurde bei 750 nm gemessen. Ausgehend von der BSA Standardlösung wurden 7 verschiedene Standardlösungen mit den Konzentrationen 10 / 8 / 6 / 4 / 2 / 1 / 0 µg/µl gemessen. Die Standardkurve ergibt eine Gerade nach der Formel $x=(y-b)/m$. Dadurch kann auf die Menge an Protein zurückgerechnet werden.

2.2.10.3. Glutathionperoxidase Enzymaktivitätsmessung nach Wedert und Cullen [180].

Tabelle 28: Lösungen Aktivitätsbestimmung der GPX

Lösung	Zusätze	Endkonzentration
Pufferlösungen		
alle Lösungen in dieser Tabelle bei +4 °C lagern		
1 M KH ₂ PO ₄ -Lösung	13,609 g KH ₂ PO ₄	1 M
	Mit ddH ₂ O auf Gesamtvolumen von 100 ml auffüllen	
1 M K ₂ HPO ₄ -Lösung	17,418 g K ₂ HPO ₄	1 M
	Mit ddH ₂ O auf Gesamtvolumen von 100 ml auffüllen	
1 M Kaliumphosphat Puffer, pH 7,0	1 M K ₂ HPO ₄ -Lösung	Mischen, sodass Ziel-pH = 7,0
	1 M KH ₂ PO ₄ -Lösung	
0,05 M Kaliumphosphat Puffer, pH 7,0	5 ml 1 M Kaliumphosphat Puffer, pH 7,0	0,05 M
	95 ml ddH ₂ O	
0,05 M KH ₂ PO ₄ 1,1 mM EDTA 1,1 mM NaN ₃ Lösung	0,756 g KH ₂ PO ₄	0,05 M
	41,4 mg Na ₂ EDTA	1,1 mM
	7,3 mg NaN ₃	1,1 mM
	Mit ddH ₂ O auf Gesamtvolumen 100 ml auffüllen	

2. Material und Methoden

0,05 M K_2HPO_4 1,1 mM EDTA, 1,1 mM NaN_3 Lösung	1,452 g K_2HPO_4	0,05 M
	62,0 mg Na_2EDTA	1,1 mM
	10,8 mg NaN_3	1,1 mM
	Mit ddH ₂ O auf Gesamtvolumen 150 ml auffüllen	
0,05 M Kaliumphosphat Puffer 1,1 mM EDTA, 1,1 mM NaN_3 , pH 7,0	0,05 M K_2HPO_4 Lösung 1,1 mM EDTA 1,1 mM NaN_3	Beide Lösungen mischen, sodass Ziel-pH = 7,0
	0,05 M KH_2PO_4 Lösung 1,1 mM EDTA 1,1 mM NaN_3	
Reaktionslösungen (alle Lösungen für 200 Reaktionen)		
Alle Lösungen in dieser Tabelle frisch ansetzen und auf Eis lagern		
GPx Arbeitslösung	44 µl GR	Mit 0,05 M Kaliumphosphat Puffer, 1,1 mM EDTA, 1,1 mM NaN_3 , pH 7,0 auf Gesamtvolumen 15 ml auffüllen
	6,1 mg GSH	
4 mM NADPH-Lösung	9.9 mg NADPH	4 mM
	0.05 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.0 (auf Gesamtvolumen von 3 ml auffüllen)	
15 mM Cumolhydroperoxid-Lösung	11,7 µl Cumenehydroperoxid	15 mM
	5 ml ddH ₂ O	
GPx Standardkurve		
Glutathionperoxidase Stammlösung (20 U/ml)	100 units Glutathionperoxidase 20 U/ml	20 U/ml
	5 ml 0.05 M Kaliumphosphat Puffer, pH 7.0	
Bis zu 200 µl Stammlösung in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäßen lagern. Lagerung mit Parafilm und bei -20 °C für bis zu einem Monat möglich.		
Glutathionperoxidase Stammlösung (1 U/ml)	10 µl Glutathionperoxidase (20U/ml)	1 U/ml
	190 µl 0.05 M Kaliumphosphat Puffer, pH 7.0	
Weitere Standardlösungen	Verdünnung der 1 U/ml GPx Stammlösung mit 0,05 Kaliumphosphat Puffer, pH 7.0	0,8 / 0,6 / 0,4 / 0,2 / 0,1 / 0 U/ml

In Lösung katalysiert die Glutathion Peroxidase (GPx) die Reduktion von H_2O_2 zu H_2O . Dabei werden 2 GSH zu GSSG oxidiert. Statt H_2O_2 kann auch Cumene hydroperoxide -wie in diesem Verfahren- genutzt werden. Dies wird dann zu Dimethylphenylcarbinol reduziert.

Die Rückreduktion des GSSG zu 2 GSH durch die Glutathionreduktase (GR) erfolgt unter Verbrauch des Kosubstrats NADPH zu $NADP^+$. Der Verbrauch des Kosubstrats kann durch Messung der Absorption quantifiziert werden (Wellen-

2. Material und Methoden

länge 340 nm). Über 20 min wurde einmal pro Minute die Absorption gemessen. Die zeitliche Abnahme der Absorption von der 4. zur 9. Minute wurde berechnet. Für die Standardkonzentrationen wurde daraus eine Regressionsgerade ermittelt, sodass auf die Konzentration in den Proben zurückgeschlossen werden konnte.

Protokoll: Pro Well einer 96 Well-Platte wurden 10 µl der Standardlösungen (und 10 µl des Puffers, sodass das Volumen insgesamt 20 µl betrug) oder 20 µl der Probe pipettiert. Von den Standardlösungen wurden jeweils Triplikate pipettiert, von den Proben Duplikate. Dazu wurde 15 µl NADPH Lösung und 75 µl GPx-Arbeitslösung pro Well hinzugefügt und durch auf- und abpipettieren vermischt. Anschließend wurde die Absorption bei 340 nm gemessen und wenn die OD kleiner als 1,0 war zusätzliche 4 mM NADPH-Lösung pro Well hinzugefügt bis die OD mindestens 1,0 betrug. Nach weiteren 5 min inkubieren bei RT, wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 10 µl der Cumolhydroperoxid-Lösung gestartet. Unverzöglich wurde begonnen die Absorption in minütlichem Abstand für insgesamt 20 min zu messen (Wellenlänge 340 nm). Aus der Abnahme der OD pro Minute wurde eine Standardkurve erstellt und mittels Regressionsgerade eine Funktion nach $Y = a * x + b$ bzw. $(Y + b) / a = x$ ermittelt. Mittels dieser konnte auf die in den Proben befindliche Menge an funktionaler GPx zurückgeschlossen werden.

2.2.10.4. Katalase Enzymaktivitätsmessung [181]

Die Aktivität der Catalase wurde mit dem „OxiSelect™ Catalase Activity Assay Kit“ (Cell Biolabs, INC., Katalognummer STA-339) entsprechend dem Herstellerprotokoll bestimmt.

Dabei wurde jeweils 20 µl der Probe oder des Standards in ein Eppendorff Mikroreaktionsgefäß pipettiert und nach Zugabe von 20 µl der 40 µM Wasserstoffarbeitslösung für 30 min bei RT inkubiert. In einem zweiten Schritt wurden 40 µl der ADHP/HRP Arbeitslösung hinzugefügt und für 30 min lichtgeschützt bei RT schwenkinkubiert. In eine 96 Well-Platte wurden jeweils 75 µl/Well dieser Lösung pipettiert und die Fluoreszenz gemessen (Exzitationsmaximum bei 544 nm und Emissionsmaximum bei 590 nm). Aus dem Standard wurde über

2. Material und Methoden

GraphPad Prism eine Funktion extrapoliert. Die Standardlösungen befanden sich im Bereich von 0 bis 1 U CAT/ml (1 / 0,8 / 0,6 / 0,4 / 0,2 / 0,1 / 0 U/ml).

2.2.10.5. Superoxiddismutase Enzymaktivitätsmessung [182]

Die Aktivität der Superoxid Dismutase (SOD) wurde mit dem „SOD determination kit“ (Sigma-Aldrich, Katalognummer 19160) entsprechend des vom Hersteller optimierten Protokolls, als Kinetik über eine Stunde, gemessen.

Dabei wird die Reduktion von WST-1 zu dem violettfarbenen WST-1 Formazan genutzt. Diese Änderung korreliert linear mit der Aktivität der Xanthinoxidase und wird durch die SOD gehemmt.

Tabelle 29: Pipettierprotokoll SOD-Messung

	Probe	Blank 1	Blank 2	Blank 3
Probenlösung	20 µl		20 µl	
ddH₂O		20 µl		20 µl
WST Arbeitslösung	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Enzym Arbeitslösung	20 µl	20 µl		
Lösungspuffer			20 µl	20 µl

Pro Well einer 96 Well-Platte wurden 20 µl der Probe bzw. ddH₂O (Blank 1 und Blank 3) pipettiert. Hierzu wurden 200 µl der WST Arbeitslösung und 20 µl der Enzym Arbeitslösung (Proben und Blank 1) bzw. 20 µl Lösungspuffer (Blank 2 und Blank 3) hinzugegeben (siehe Tabelle 29).

Anschließend wurde eine Kinetik der Absorption (Wellenlänge 450 nm) über 1 h erfasst, mit Messungen alle 5 min. Aus der Kinetik wurde eine Steigung errechnet. Entsprechend dem Herstellerprotokoll wurde die SOD-Aktivität (Inhibitionsrate) nach folgender Formel errechnet:

SOD Aktivität:

$$\text{SOD} = [(\text{Blank 1} - \text{Blank 3}) - (\text{Probe} - \text{Blank 2})] / (\text{Blank 1} - \text{Blank 3}) * 100$$

2.2.10.6. Weitere Methoden:

Die Bestimmung der GR-Aktivität erfolgte nach einer Laborinternen SOP entsprechend dem von Smith *et al.* beschriebenen Protokoll [183].

2. Material und Methoden

Die Die Isolation der Zelllysate und Bestimmung des GSH/GSSG-Gleichgewichts erfolgte nach dem von Rahman *et al.* 2006 veröffentlichten Protokoll [184].

3. Ergebnisse

3. Ergebnisse

3.1. Größte Unterschiede und Änderungen in der qRT-PCR

In einem ersten Schritt wurden die NR- und R-Gruppe jeweils, zu den unterschiedlichen Zeitpunkten verglichen. Hierbei wurde primär auf die größten Unterschiede geachtet. Zusätzlich wurden die Änderungen in den beiden Gruppen während des Reifungsprozesses und durch PEMF-Stimulation getrennt betrachtet. Ziel dieser Auswertung war Gene mit großen Unterschieden in beiden Gruppen oder großen Änderungen bei der Reifung bzw. PEMF-Stimulation zu finden. Ziel war es diese potentiell regulatorisch wichtigen Gene anschließend in der semiquantitativen RT-PCR weiter zu untersuchen.

3.1.1. Größte Unterschiede zwischen der R- und NR-Gruppe

3.1.1.1. Tag 0: vor Induktion der Reifung

Schon vor der Initiierung des Reifungsprozesses unterscheiden sich beide Gruppen in der Transkription. Grundsätzlich werden alle untersuchten Gene in der NR-Gruppe mehr transkribiert als in der R-Gruppe, bzw. wenige gleichstark in beiden Gruppen. Von den 68 Genen im Detektionsbereich sind nur 6 Gene gleich stark exprimiert. Der Großteil, 44 Gene, sind doppelt so stark in der NR-Gruppe exprimiert wie in der R-Gruppe. 16 weitere sind 4-fach und 2 weitere Gene 8-fach stärker exprimiert.

Den größten Unterschied (8-fach stärkere Expression in der NR-Gruppe) zwischen beiden Gruppen zeigen *GSR* und *UCP2*. Beide zeigen jedoch auch einen hohen ΔC_T -Wert am Limit des Detektionsbereichs (insbesondere in der R-Gruppe). Einen ebenfalls starken Unterschied (4-fach stärkere Expression in der NR-Gruppe) zeigen *CCS*, *ATOX1*, *CAT*, *GCLC*, *CYBB*, *GSTZ1*, *PRDX6*, *NCF2*, *FOXM1*, *PDLIM1*, *PRNP*, *RNF7*, *VIMP*, *SEPP1*, *HMOX1*, und *SLC7A11*. Das höchste Expressionslevel, jedoch mit geringem Unterschied, zeigt die *FTH1* (ΔC_T -Wert im negativen Bereich).

3. Ergebnisse

Tabelle 30: Tag 0 – Übersicht über das Verhältnis der Expressionen im Gruppenvergleich

Tag 0	Gene	Anzahl
NR=R	<i>GPX1, GPX3, GPX4, NOX4, CYGB, AKR1C2</i>	6
NR>>>R (8 fach)	<i>GSR, UCP2</i>	2
NR>>R (4 fach)	<i>CCS, ATOX1, CAT, GCLC, CYBB, GSTZ1, PRDX6, NCF2, FOXM1, PDLIM1, PRNP, RNF7, VIMP, SEPP1, HMOX1, SLC7A11</i>	16
NR>R (2 fach)	<i>SOD1, SOD2, SOD3, NOX5, DUOX1, GPX2, GSTP1, GCLM, GSS, PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX4, PRDX5, TXNRD1, TXNRD2, TXN, SRXN1, PTGS1, PTGS2, HSPA1A, HSP90AA1, CCL5, FTH1, AOX1, APOE, BNIP3, DHCR24, DUSP1, EPHX2, MPV17, MSRA, NUDT1, SFTPD, SIRT2, SQSTM1, BAG2, FHL2, GLA, LHPP, NCOA7, NQO1, PTGR1, TRAPPC6A</i>	44

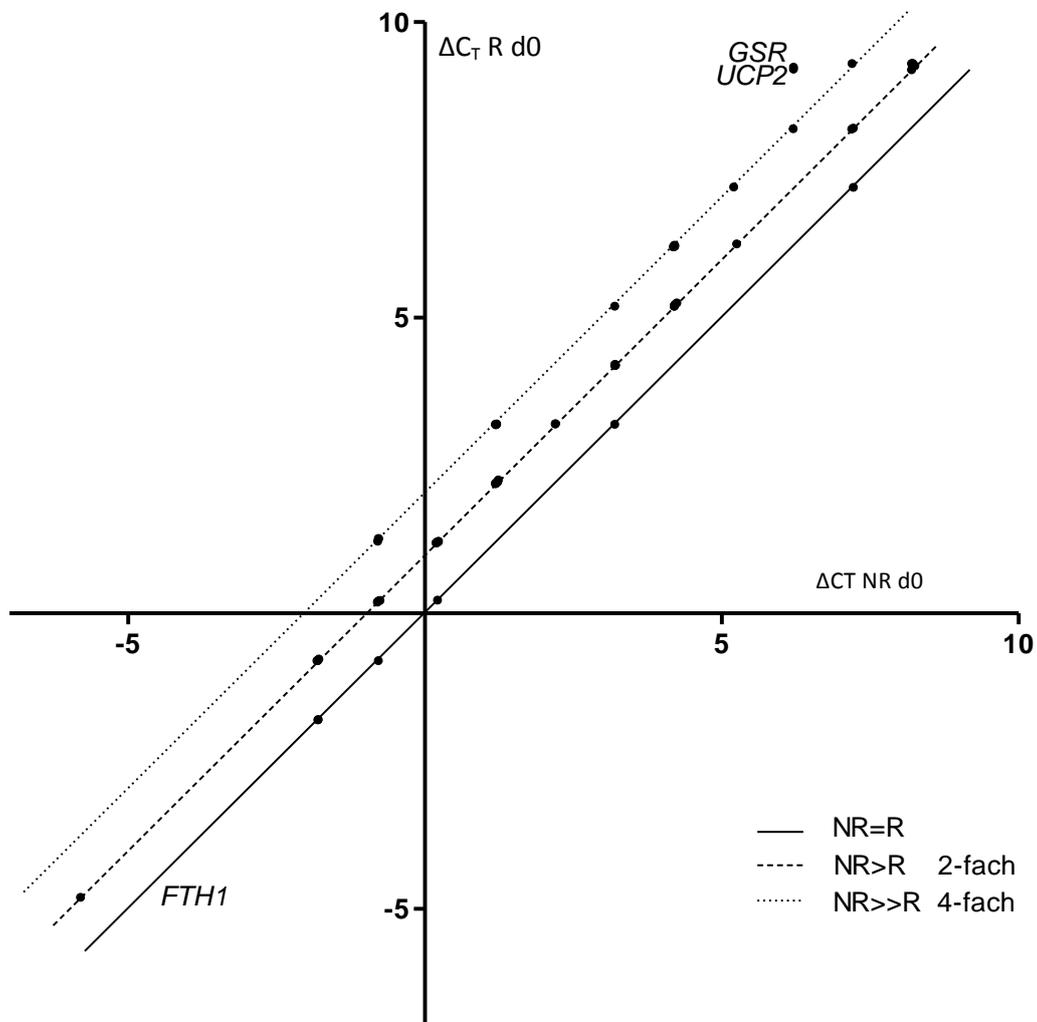


Abbildung 8: Scatter-Plot: größte Unterschiede zwischen NR- und R-Gruppe am Tag 0 vor Induktion der Reifung. Aufgetragen sind die ΔC_T -Werte. X-Achse: ΔC_T -Werte der NR-Gruppe. Y-Achse: ΔC_T -Werte der R-Gruppe. Detektionslimit bei $\Delta C_T=9,299$ (entspricht 35 Zyklen).

3. Ergebnisse

3.1.1.2. Tag 2: nach Induktion der Reifung

Nach der Reifung zeigt sich ein homogeneres Bild. Die NR-Gruppe zeigt nicht ausschließlich eine stärkere Expression als die R-Gruppe. Hier fällt jedoch auf, dass wenige Unterschiede zwischen beiden Gruppen bestehen. Der Großteil der Gene wird in beiden Gruppen in gleichem Ausmaß exprimiert (49 Gene). Sowohl in der NR-Gruppe als auch in der R-Gruppe gibt es Gene welche stärker als in der anderen Gruppe exprimiert werden.

In der NR-Gruppe werden 13 Gene etwas stärker (2-fach) als in der R-Gruppe exprimiert: *SOD1*, *UCP2*, *GSS*, *PRDX4*, *NCF2*, *HSP90AA1*, *HMOX1*, *DHCR24*, *AOX1*, *FHL2*, *SIRT2*, *SFTPD* und *BAG2*.

In der R-Gruppe werden 6 Gene stärker als in der NR-Gruppe exprimiert. Den größten Unterschied (8-fach stärkere Expression in der R-Gruppe) zeigen *SOD2* und *CCL5*. Dabei fällt auf, dass *SOD2* in beiden Gruppen hoch exprimiert ist, während *CCL5* in beiden Gruppen sehr niedrig exprimiert ist (hoher ΔC_T -Wert am Limit des Detektionsbereichs). 4 weitere Gene zeigen eine 2-fach stärkere Expression in der R-Gruppe: *GPX3*, *GCLM*, *DUOX1* und *CYGB*.

Tabelle 31: Tag 2 unbefeldet - Übersicht über das Verhältnis der Expressionen im Gruppenvergleich

Tag 2 - EMF	Gene	Anzahl
NR<<<R (8 fach)	<i>SOD2</i> , <i>CCL5</i>	2
NR<R (2 fach)	<i>GPX3</i> , <i>GCLM</i> , <i>DUOX1</i> , <i>CYGB</i>	4
NR=R	<i>CCS</i> , <i>SOD3</i> , <i>ATOX1</i> , <i>CAT</i> , <i>GPX1</i> , <i>GPX2</i> , <i>GPX4</i> , <i>GSTP1</i> , <i>GSTZ1</i> , <i>GSR</i> , <i>GCLC</i> , <i>NOX4</i> , <i>NOX5</i> , <i>PRDX1</i> , <i>PRDX2</i> , <i>PRDX3</i> , <i>PRDX5</i> , <i>PRDX6</i> , <i>TXN</i> , <i>TXNRD1</i> , <i>TXNRD2</i> , <i>SRXN1</i> , <i>APOE</i> , <i>BNIP3</i> , <i>CYBB</i> , <i>DUSP1</i> , <i>EPHX2</i> , <i>FOXM1</i> , <i>FTH1</i> , <i>PTGS1</i> , <i>PTGS2</i> , <i>HSPA1A</i> , <i>MPV17</i> , <i>MSRA</i> , <i>NUDT1</i> , <i>PDLIM1</i> , <i>PRNP</i> , <i>RNF7</i> , <i>VIMP</i> , <i>SEPP1</i> , <i>SQSTM1</i> , <i>AKR1C2</i> , <i>GLA</i> , <i>LHPP</i> , <i>NCOA7</i> , <i>NQO1</i> , <i>PTGR1</i> , <i>SLC7A11</i> , <i>TRAPPC6A</i>	49
NR>R (2 fach)	<i>SOD1</i> , <i>UCP2</i> , <i>GSS</i> , <i>PRDX4</i> , <i>NCF2</i> , <i>HSP90AA1</i> , <i>HMOX1</i> , <i>DHCR24</i> , <i>AOX1</i> , <i>FHL2</i> , <i>SIRT2</i> , <i>SFTPD</i> , <i>BAG2</i>	13

3. Ergebnisse

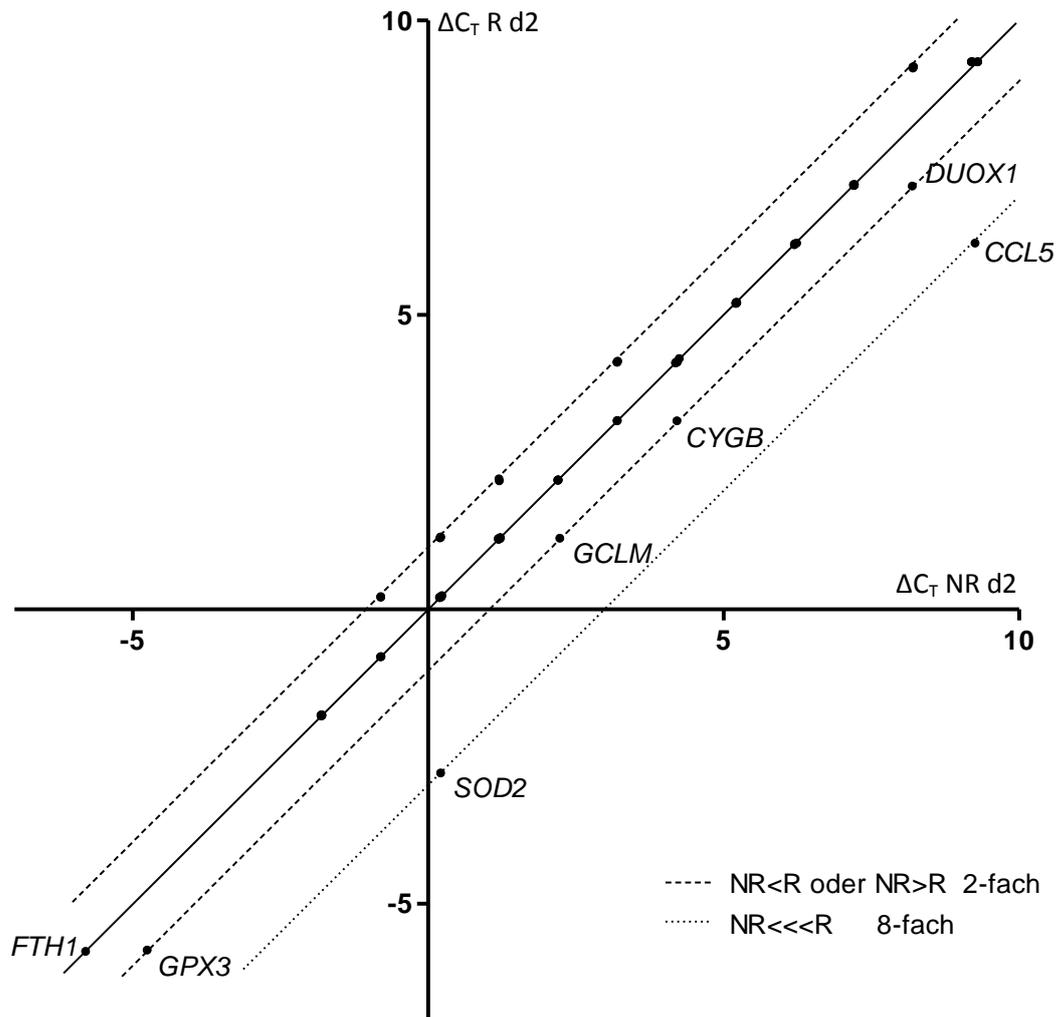


Abbildung 9: Scatter-Plot: größte Unterschiede zwischen NR- und R-Gruppe am Tag 2 nach Reifung. Aufgetragen sind die ΔC_T -Werte. X-Achse: ΔC_T -Werte der NR-Gruppe. Y-Achse: ΔC_T -Werte der R-Gruppe. Detektionslimit bei $\Delta C_T=9,299$ (entspricht 35 Zyklen).

3.1.1.3. Tag 2: Reifung unter EMF-Stimulation

Nach der Reifung unter EMF-Stimulation überwiegt die Expression in der NR-Gruppe, die Gene sind durchgängig in der NR-Gruppe stärker oder in beiden Gruppen gleich stark exprimiert.

Der Großteil, 56 Gene sind in der NR-Gruppe stärker exprimiert. 12 Gene davon sind 4-fach stärker und 44 Gene 2-fach stärker exprimiert. Den größten Unterschied (4-fach) zeigen: *PRDX6*, *PRDX2*, *GCLC*, *GSTZ1*, *MSRA*, *DUSP1*, *BAG2*, *PTGS2*, *AOX1*, *VIMP*, *RNF7* und *NQO1*. Zu den Genen mit 2-fachem Unterschied gehören u.a. *SOD2* und *CCL5* (größter Unterschied nach Reifung). Außerdem *UCP2*, *GPX1* und *GPX3*, *CAT*, das GSH System (*GSR*, *GSS*,

3. Ergebnisse

GCLM), fast das ganze PRDX-System (*PRDX1, PRDX3, PRDX4, PRDX5, TXN*), die Eisenstoffwechselgene (*FTH1 und HMOX1*), die HSP-Familie (*HSPA1A, HSP90AA1*) und auch ein Teil der NADPH-Oxidasen (*NCF2, NOX4*).

Tabelle 32: Tag 2 befaltet - Übersicht über das Verhältnis der Expressionen im Gruppenvergleich

Tag 2 + EMF	Gene	Anzahl
NR=R	<i>SOD3, GPX2, GPX4, NOX5, DUOX1, SRXN1, TXNRD2, CYBB, CYGB, APOE, FOXM1, AKR1C2</i>	12
NR>R (2 fach)	<i>SOD1, SOD2, CCS, ATOX1, UCP2, GPX1, GPX3, GSTP1, GSS, GCLM, GSR, CAT, PRDX1, PRDX3, PRDX4, PRDX5, TXN, XNRD1, NCF2, NOX4, FTH1, HMOX1, HSPA1A, HSP90AA1, CCL5, SIRT2, SQSTM1, NCOA7, TRAPPC6A, DHCR24, EPHX2, PRNP, SEPP1, FHL2, NUDT1, PTGS1, SFTPD, GLA, LHPP, PTGR1, BNIP3, MPV17, PDLIM1, SLC7A11</i>	44
NR>>R (4 fach)	<i>PRDX6, PRDX2, GCLC, GSTZ1, MSRA, DUSP1, BAG2, PTGS2, AOX1, VIMP, RNF7, NQO1</i>	12

3. Ergebnisse

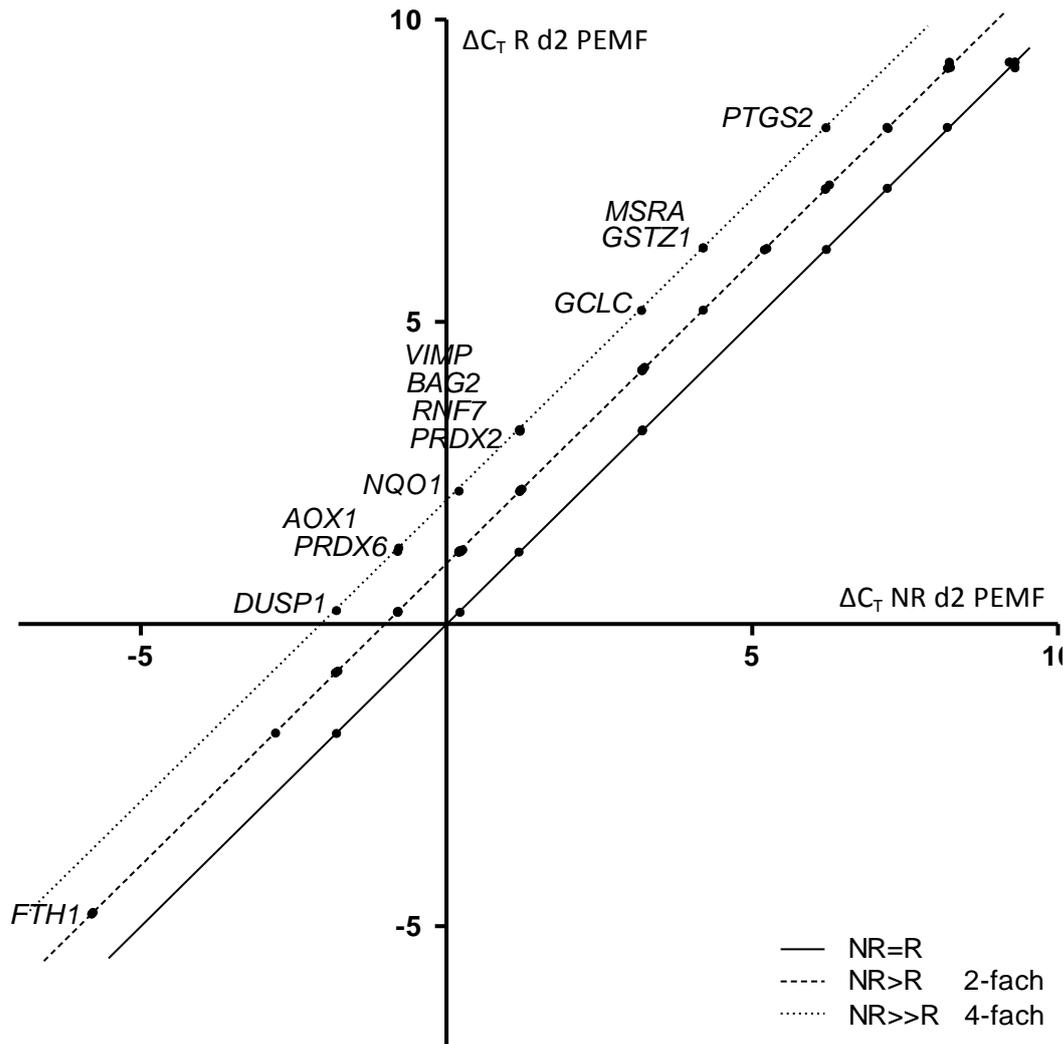


Abbildung 10: Scatter-Plot: größte Unterschiede zwischen NR- und R-Gruppe am Tag 2 nach PEMF-Stimulation während Reifung. Aufgetragen sind die ΔC_T -Werte. X-Achse: ΔC_T -Werte der NR-Gruppe. Y-Achse: ΔC_T -Werte der R-Gruppe. Detektionslimit bei $\Delta C_T=9,299$ (entspricht 35 Zyklen).

3.1.2. Größte Änderungen während des Reifungsprozesses

Während des Reifungsprozesses ändern sich beide Gruppen deutlich. In der NR-Gruppe findet hauptsächlich eine Abnahme der Expression statt, während in der R-Gruppe hauptsächlich eine Zunahme stattfindet.

In der NR-Gruppe werden 6 Gene stärker exprimiert (1 mal 32-fach, 2 mal 4-fach und 3 mal 2-fach), während 41 Gene schwächer exprimiert werden (3 mal 8-fach, 7 mal 4-fach, 31 mal 2-fach), nur 21 Gene bleiben unverändert. Die größte Zunahme in der NR-Gruppe zeigen *GPX3* (32-fach), *AOX1* mit *DHCR24* (4-fach) sowie *CAT*, *DUSP1* und *TXNRD1* (2-fach). Die stärkste Abnahme in

3. Ergebnisse

der NR-Gruppe zeigen *PTGS1*, *PTGS2* und *SLC7A11* (8-fach). Weitere deutliche Abnahmen zeigen *CYBB*, *FOXM1*, *NCF2*, *PRNP*, *SEPP1*, *UCP2* und *HMOX1* (4-fach) (siehe Abbildung 11).

In der R-Gruppe werden 31 Gene stärker exprimiert (1 mal 64-fach, 3 mal 8-fach, 7 mal 4-fach, 20 mal 2-fach), 10 Gene werden schwächer exprimiert (2 mal 4-fach, 8 mal 2-fach), während 26 Gene gleichbleibend exprimiert werden. In der R-Gruppe zeigt die *GPX3* die stärkste Zunahme (64-fach). Weitere deutliche Zunahmen zeigen *CCL5*, *CAT*, *SOD2* (8-fach) und *AOX1*, *DHCR24*, *DUSP1*, *GCLC*, *GSR*, *PDLIM1*, *TXNRD1* (4-fach). Die deutlichste Abnahme in der R-Gruppe zeigen *PTGS1* und *PTGS2* (4-fach) (siehe Abbildung 11).

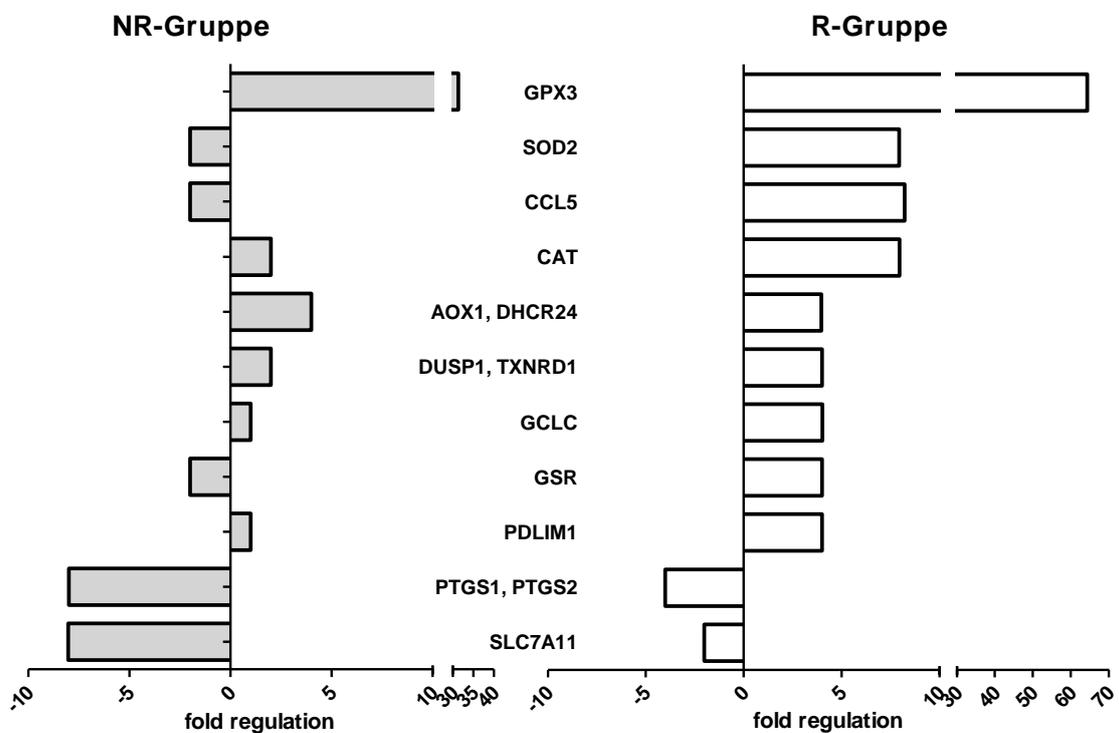


Abbildung 11: Darstellung der Zunahme der Expression während des Reifungsprozesses. Fold Regulation = 1 bedeutet keine Änderung. Links in der Gruppe der NR, rechts in der Gruppe der R. Dargestellt sind nur die größten Änderungen.

3.1.3. Änderungen bedingt durch die PEMF-Stimulation während des Reifungsprozesses

Durch die PEMF-Stimulation wird der Reifungsprozess in beiden Gruppen unterschiedlich beeinflusst. In der NR-Gruppe nimmt dabei die Expression entwe-

3. Ergebnisse

der leicht zu oder bleibt unverändert. Bei 30 Genen nimmt die Expression um den 2-fach zu, während 38 Gene unverändert bleiben. In der R-Gruppe nimmt bei 31 Genen die Expression ab, während 37 Gene unverändert bleiben. Die stärkste Abnahme zeigen SOD2 und CCL5 (8-fach), alle anderen Gene zeigen nur eine schwache Abnahme (2-fach).

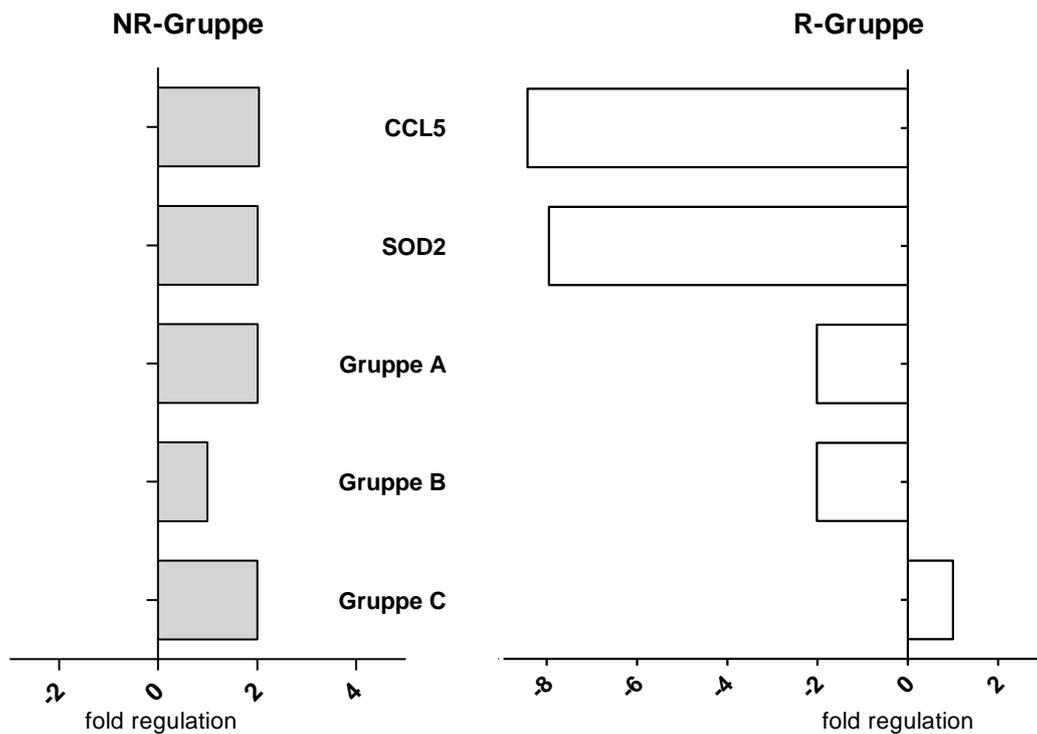


Abbildung 12: Darstellung der Expressionsänderung bedingt durch die PEMF-Stimulation. Fold Regulation = 1 bedeutet keine Änderung. Links: NR-Gruppe, rechts: R-Gruppe. Dargestellt sind die stärksten Änderungen, alle anderen sind in Gruppen zusammengefasst (für eine genaue Übersicht siehe Tabelle 33).

Tabelle 33: Zusammenfassung der Änderungen in Gruppen entsprechend Abbildung 12.

Zusammenfassung der Expressionsänderungen in Gruppen		Anzahl
Gruppe A	<i>DUSP1, MSRA, RNF7, VIMP, NQO1, PTGS2, GPX3, GCLC, GCLM, GSTZ1, PRDX2, PRDX6</i>	12
Gruppe B	<i>ATOX1, CCS, CAT, GSR, GSTP1, PRDX3, PRDX5, TXN, TXNRD1, BAG2, DUOX1, EPHX2, FTH1, MPV17, SEPP1, SQSTM1, NCOA7</i>	17
Gruppe C	<i>NOX4, GPX1, PRDX1, HSPA1A, AOX1, BNIP3, CYGB, PRNP, PTGS1, GLA, LHPP, PTGR1, SLC7A11, TRAPPC6A, NUDT1, PDLIM1</i>	16
NR und R unverändert	<i>UCP2, SOD1, SOD3, GPX2, GPX4, GSS, NCF2, NOX5, PRDX4, TXNRD2, SRXN1, APOE, CYBB, DHCR24, FOXM1, SFTPD, SIRT2, AKR1C2, FHL2, HMOX1, HSP90AA1</i>	21

3. Ergebnisse

3.2. qRT-PCR: Gruppen die keine deutliche Änderung oder Unterschiede zeigten

Von den insgesamt 84 Genen auf dem Array wurden 16 von der Auswertung ausgeschlossen da sie sich außerhalb des Detektionsbereichs befanden (>34,8 Zyklen). Im Folgenden sind die Gene in funktionell zusammenhängenden Gruppen zusammengefasst die nur kleinen Änderungen und Unterschiede in der qRT-PCR zeigen. Dementsprechend wurden sie nicht in der RT-PCR untersucht.

3.2.1. Peroxiredoxin-System

Alle Gene dieser Gruppe werden auf einem starken bis sehr starken Level exprimiert. Ausnahme hiervon ist das mitochondriale *TXNRD2*. Die stärkste Expression von allen zeigt das Thioredoxin.

Änderungen und Unterschiede in der qPCR: die Änderungen sind eher moderat ausgeprägt. Eine deutliche Expressionsänderung um den Faktor 4 zeigt sich für *TXNRD1*, ansonsten zeigen sich nur Änderungen um den Faktor 2. Die Unterschiede im Vergleich der beiden Gruppen sind auch eher klein ausgeprägt. Die größten Unterschiede zeigen sich bei *PRDX6* und *TXNRD1* um den Faktor 4. Meist ist die Expression in der NR-Gruppe stärker ausgeprägt als in der R-Gruppe. Grundsätzlich zeigt sich eine durchgehend höhere Expression in der NR-Gruppe am Tag 0. Während in der NR-Gruppe die Expression für die meisten Gene abnimmt oder gleichbleibt, steigt die Expression für die meisten Gene in der R-Gruppe. In der R-Gruppe nimmt die Expression für die meisten Gene im PRDX-System für die meisten Gene unter PEMF-Stimulation wieder ab.

Ausnahmen sind die *PRDX4*, welches in der R-Gruppe durch die Reifung weniger exprimiert wird und die *PRDX2*, welche unter PEMF-Stimulation in der R-Gruppe etwas abnimmt. Weiter fällt die *PRDX6* auf welche in der NR-Gruppe eine deutlich stärkere Expression zeigt und vor Reifung und unter PEMF-Stimulation in der NR-Gruppe stark exprimiert ist. Außerdem zeigt die *TXNRD1* eine starke Expression nach Reifung in beiden Gruppen mit einem leichten Abfall unter PEMF-Stimulation in der R-Gruppe.

3. Ergebnisse

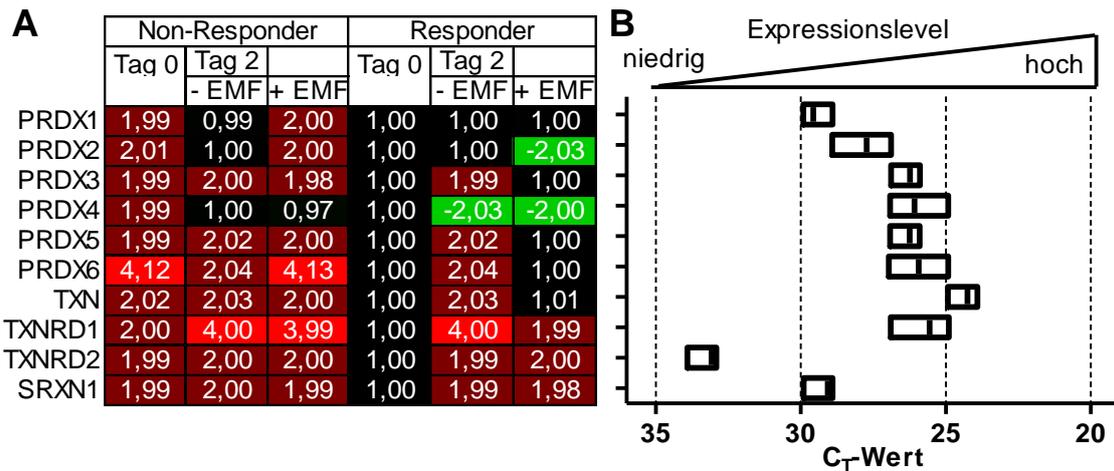


Abbildung 13: **qRT-PCR Array**: **A**: Ausschnitt der Heatmap: Expression relativ zu der R-Gruppe Tag 0. Ausschnitt mit dem Peroxiredoxin-System. Dargestellt ist die fold regulation ($2^{-\Delta\Delta CT}$, wenn $2^{-\Delta\Delta CT} < 0,9$: $(-1)/(2^{-\Delta\Delta CT})$). **B**: Expression der Gene in der qPCR. Dargestellt ist die Zyklenzahl invers. Entsprechend nimmt die Expression nach rechts zu (bei abnehmender Zyklenzahl). Detektionslimit: 35 Zyklen. Dargestellt ist der Bereich der gemessenen Zyklenzahlen aller gemessenen Zustände, mit Markierung in Höhe des MW.

3.2.2. Weitere Gruppen

Grundsätzlich fällt eine durchgehend höhere Expression zum Tag 0 in der NR-Gruppe auf. Während der Reifung zeigen einige Gene eine deutliche Zunahme (Faktor 4) in der R-Gruppe, insbesondere *AOX1*, *DUSP1*, *PDLIM1* und *DHCR24*. Nach PEMF-Stimulation zeigt sich in der R-Gruppe eher eine Abnahme der Expression (*PTGS2*, *EPHX2*, *MPV17*, *MSRA*, *RNF7*, *DUSP1*, *SQSTM1*, *NCOA7*, *SEPP1*, *VIMP*, *NQO1*, *FTH1*, *BAG2*), eine Zunahme zeigt nicht. In der NR-Gruppe zeigt sich bei der Reifung für einige Gene eine deutliche Zunahme (Faktor 4: *AOX1*, *DHCR24*) bzw. schwache Zunahme (Faktor 2: *DUSP1*), eine starke Abnahme zeigen die *PTGS1/2* und *SLC7A11* (Abnahme um Faktor 8). Unter PEMF-Stimulation zeigt sich in der NR-Gruppe für viele Gene eine schwache Zunahme der Expression (Faktor 2).

Mit hohen Expressionsänderungen bei hohem Expressionsniveau fällt die *AOX1*, *RNF7*, *DUSP1*, *PDLIM1* und *DHCR24* auf. Alle diese Gene wurden nicht weiter in der RT-PCR untersucht, weil andere Gene deutlichere Unterschiede zeigten.

3. Ergebnisse

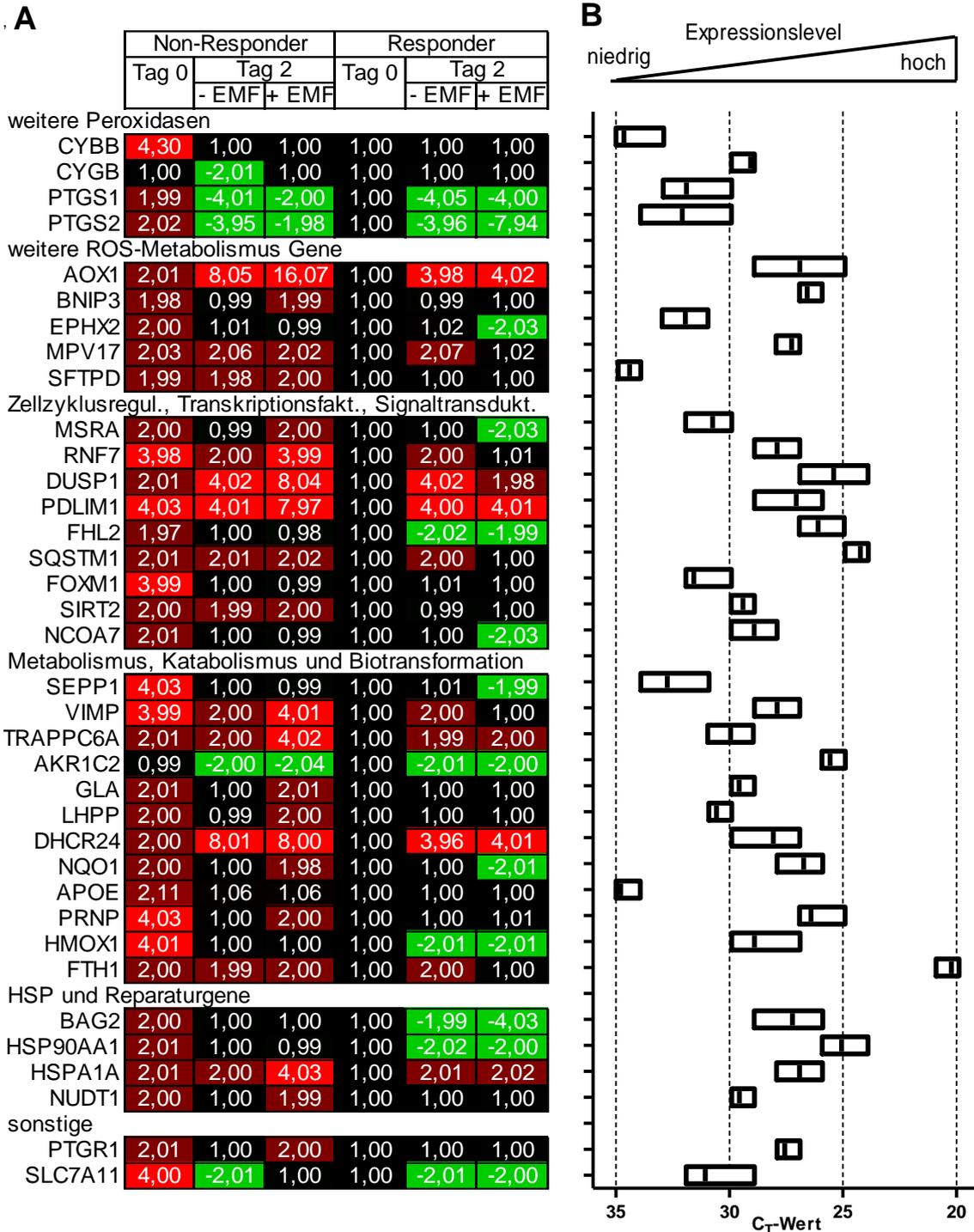


Abbildung 14: **qRT-PCR Array**: **A**: Ausschnitt der Heatmap: Expression relativ zu der R-Gruppe Tag 0. Ausschnitt mit verschiedenen Zusammenhängenden Genen in größeren Gruppen zusammengefasst. Dargestellt ist die fold regulation ($2^{\Delta\Delta CT}$, wenn $2^{\Delta\Delta CT} < 0,9$: $(-1)/(2^{\Delta\Delta CT})$). **B**: Expression der Gene in der qPCR. Dargestellt ist die Zyklenzahl invers. Entsprechend nimmt die Expression nach rechts zu (bei abnehmender Zyklenzahl). Detektionslimit: 35 Zyklen. Dargestellt ist der Bereich der gemessenen Zyklenzahlen aller gemessenen Zustände, mit Markierung in Höhe des MW.

3. Ergebnisse

3.3. Vergleich qRT-PCR und RT-PCR

Die Gene, welche die größten Unterschiede und Änderungen zeigten wurden anschließend in einer semiquantitativen RT-PCR untersucht. Hierfür wurde mRNA von jeweils 6-10 Spender beider Gruppen der qRT-PCR Spender genutzt. Der RT-PCR ging die Gestaltung der Primer und eine Optimierung der PCR-Bedingungen (Zyklenzahlen und mRNA Menge) voraus. Im Folgenden sind die auffallenden Gene im Zusammenhang mit Isoenzymen und funktional zusammenhängenden Enzymen aufgeführt. Vergleichend dazu sind die RT-PCR-Ergebnisse dargestellt.

3.3.1. *SODs* und *UCP2*

Änderungen und Unterschiede in der qRT-PCR:

Die Gruppe der Superoxiddismutasen zeigt sich ein hohes Expressionslevel der *SODs*. Das Chaperon CCS zeigt eine schwache Expression, während ATOX1 eine starke Expression zeigt (siehe Abbildung 15 A). Die größten Änderungen zeigt die *SOD2*. In der NR-Gruppe besteht an Tag 0 eine starke Expression der Chaperone, während die *SODs* keine großen Änderungen durch Reifung und PEMF-Stimulation zeigen. In der R-Gruppe ist die Expression durchgehend schwächer ausgeprägt, jedoch zeigt sich hier auch ein Anstieg durch die Reifung, am stärksten bei *SOD2*. Unter PEMF-Stimulation fehlt dieser Zuwachs bei der Reifung (siehe Abbildung 15 B).

Das *UCP2* verhält sich sehr ähnlich wie die Gruppe der *SODs*. Es besteht eine durchgehend stärkere Expression in der NR-Gruppe mit einer großen initialen Expression am Tag 0. In der R-Gruppe zeigt sich keine Änderung. Jedoch ist das Expressionslevel sehr gering (siehe Abbildung 15 A+B).

Bestätigung der qRT-PCR mittels RT-PCR:

In die RT-PCR der *SOD2* wurden alle 10 Spender der NR- und der R-Gruppe einbezogen. Jeweils 6 Spendern wurden zweifach quantifiziert, weitere 4 Spender einfach. In der RT-PCR lassen sich dem Trend nach die gleichen Änderungen wie in der qRT-PCR beobachten. Die Expressionsunterschiede sind jedoch nicht statistisch signifikant. Insbesondere der große Unterschied nach 2 Tagen

3. Ergebnisse

Reifung zeigt sich nur in der Tendenz und mit einer besonders großen Streuung der Spenderwerte (Abbildung 15 C).

Für die *UCP2* lässt sich die starke initiale Expression in der NR-Gruppe (8-fach) in der qRT-PCR nicht bestätigen. Im Trend zeigt sich wie in der qRT-PCR, eine durchgehend stärkere Expression in der NR-Gruppe. Dabei zeigt sich jedoch auch eine große Streuung der Werte (siehe Abbildung 15 D).

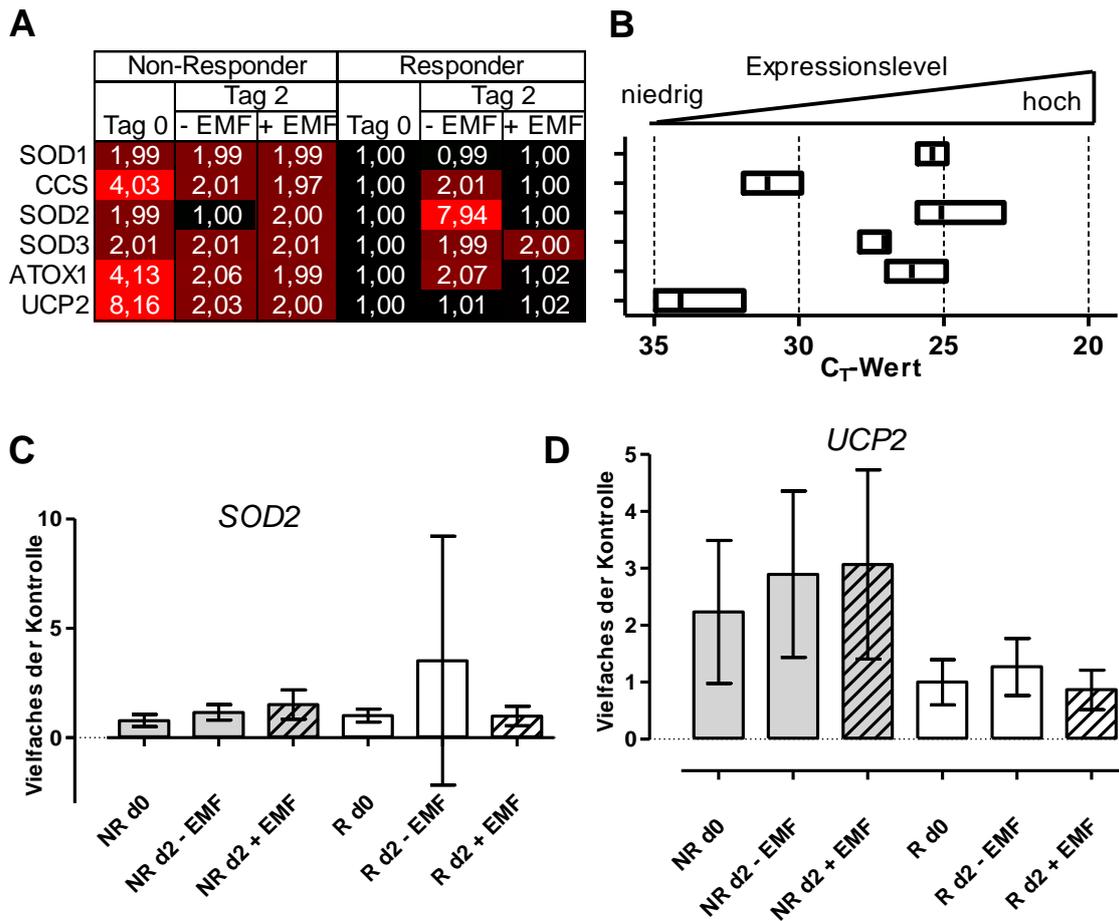


Abbildung 15: **qRT-PCR Array: A:** Ausschnitt der Heatmap. Expression relativ zu der R-Gruppe Tag 0. Ausschnitt mit *UCP2*, *SODs* und *SOD* assoziierten Genen. Dargestellt ist die fold regulation ($2^{-\Delta\Delta CT}$, wenn $2^{-\Delta\Delta CT} < 0,9$: $(-1)/(2^{-\Delta\Delta CT})$). **B:** Expression der Gene in der qPCR. Dargestellt ist die Zyklenzahl invers. Entsprechend nimmt die Expression nach rechts zu (bei abnehmender Zyklenzahl). Detektionslimit: 35 Zyklen. Dargestellt ist der Bereich der gemessenen Zyklenzahlen aller gemessenen Zustände, mit Markierung in Höhe des MW. Stärkste Änderung und Transkription zeigt die *SOD2*. **semiquantitative RT-PCR: C: SOD2** und **D: UCP2**. Normalisierung erfolgte auf *GAPDH*. Werte wurden auf den Mittelwert der Kontrolle (R-Gruppe Tag 0) relativ bezogen. Dargestellt ist der jeweilige MW mit 95 %-KI. **C: SOD2:** N=10, n=1-2. **D: UCP2:** N=6, n=2. Statistische Testung mit Kruskal-Wallis Test und DunnsPost Test, * $p < 0,05$.

3.3.2. Katalase und Glutathion-abhängige Peroxidasen

Änderungen und Unterschiede in der qRT-PCR:

3. Ergebnisse

Die *CAT* zeigt in der NR-Gruppe beinahe durchgehend eine stärkere Expression, insbesondere zum Zeitpunkt Tag 0. Während der Reifung nimmt die Expression in beiden Gruppen zu, sodass sie an Tag 2 in beiden Gruppen gleich stark exprimiert wird. Insbesondere in der R-Gruppe fällt die sehr starke Zunahme während der Reifung auf. Bei PEMF-Stimulation fällt die Zunahme in der R-Gruppe während der Reifung hingegen schwächer aus, während die PEMF-Stimulation in der NR-Gruppe keinen Unterschied macht (siehe Abbildung 16).

In der Gruppe der *GPX* fällt die *GPX3* am deutlichsten auf. In der NR-Gruppe zeigt die *GPX3* eine sehr starke Zunahme (32-fach) während des Reifungsprozesses mit einer etwas stärkeren Zunahme (64-fach) bei zusätzlicher PEMF-Stimulation. In der R-Gruppe nimmt die Expression während der Reifung um den Faktor 64 zu und unter PEMF-Stimulation fällt dies etwas ab (auf eine 32-fache Expression im Vergleich zu R Tag 0). Alle *GPX* zeigen ein sehr hohes Expressionslevel, außer *GPX5* welche außerhalb des Detektionsbereichs ist (nicht dargestellt). Die zytosolische *GPX1* zeigt eine spezifische Zunahme nach PEMF-Stimulation in der NR-Gruppe, jedoch nur um den Faktor 2 (siehe Abbildung 16).

In der Gruppe der Glutathion-Transferasen zeigt eine beinahe durchgehend stärkere Expression der NR-Gruppe im Vergleich mit der R-Gruppe. In der R-Gruppe zeigt sich eine Zunahme während Reifung, die jedoch unter PEMF-Stimulation ausbleibt. Die *GSTZ1* zeigt ein schwaches Expressionslevel, während die *GSTP1* ein sehr hohes Expressionslevel zeigt (siehe Abbildung 16).

Bestätigung der qRT-PCR mittels RT-PCR:

Für die *CAT* ließ sich in der RT-PCR die Zunahme während der Reifung in der Tendenz bestätigen. In der NR-Gruppe fällt diese Zunahme nach PEMF-Stimulation noch deutlicher aus. In der R-Gruppe zeigt sich tendenziell eine leichte Abnahme nach PEMF-Stimulation. Eine deutlich stärkere Expression in der NR-Gruppe lässt sich in der RT-PCR nicht bestätigen. Grundsätzlich besteht eine hohe Streuung zwischen den Spendern (siehe Abbildung 17 A).

Die *GPX1* zeigt in der RT-PCR keine Zunahme nach PEMF-Stimulation in der NR-Gruppe. Insgesamt lassen sich die beinahe gleichbleibende Expression der

3. Ergebnisse

qRT-PCR bestätigen, es bestehen wenig Unterschiede und eine hohe Streuung (siehe Abbildung 17 B).

Für die GPX3 lässt sich der starke Zuwachs in der NR-Gruppe bestätigen, wenn auch in geringerem Ausmaß. Nach PEMF-Stimulation ist der Zuwachs in der NR-Gruppe signifikant. In der R-Gruppe zeigt sich ein geringerer Zuwachs, der nicht signifikant ist. Insbesondere die starke Zunahme durch die Reifung fällt hier deutlich kleiner aus und nach PEMF-Stimulation zeigt sich keine Abnahme gegenüber der Reifung. Es zeigt sich zwischen Reifung mit und ohne PEMF-Stimulation kein Unterschied (siehe Abbildung 17 C).

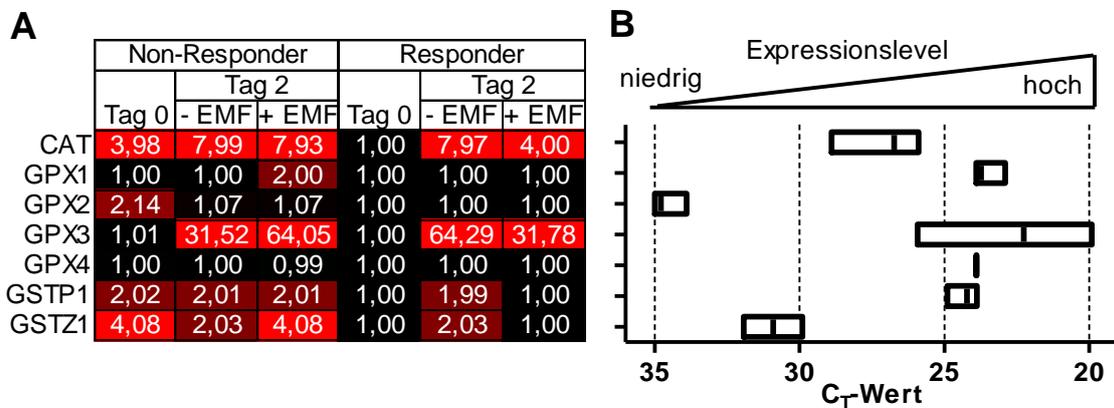


Abbildung 16: qRT-PCR Array: **A:** Ausschnitt der Heatmap. Expression relativ zu der R-Gruppe Tag 0. Ausschnitt mit *CAT* und Glutathion abhängigen Peroxidasen. Dargestellt ist die fold regulation ($2^{-\Delta\Delta CT}$, wenn $2^{-\Delta\Delta CT} < 0,9$: $(-1)/(2^{-\Delta\Delta CT})$). **B:** Expression der Gene in der qPCR. Dargestellt ist die Zyklenzahl invers. Entsprechend nimmt die Expression nach rechts zu (bei abnehmender Zyklenzahl). Detektionslimit: 35 Zyklen. Dargestellt ist der Bereich der gemessenen Zyklenzahlen aller gemessenen Zustände, mit Markierung in Höhe des MW.

3. Ergebnisse

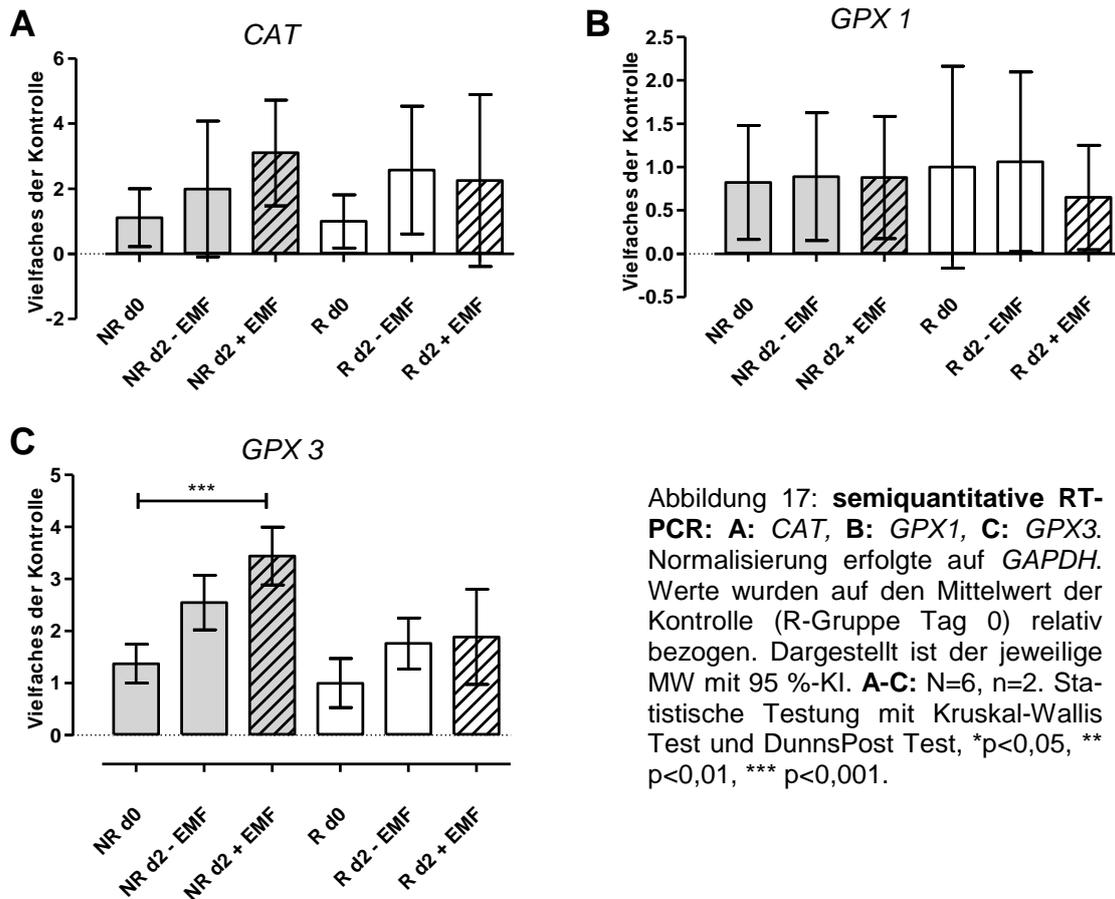


Abbildung 17: **semiquantitative RT-PCR: A: CAT, B: GPX1, C: GPX3.** Normalisierung erfolgte auf *GAPDH*. Werte wurden auf den Mittelwert der Kontrolle (R-Gruppe Tag 0) relativ bezogen. Dargestellt ist der jeweilige MW mit 95 %-KI. **A-C:** N=6, n=2. Statistische Testung mit Kruskal-Wallis Test und DunnsPost Test, *p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

3.3.3. Glutathion System - GSH bildendes und reduzierendes System

Änderungen und Unterschiede in der qRT-PCR:

Das GSH-produzierende System zeigt eine mittelstarke Expression. Die *GSR* zeigt eine sehr schwache Expression nahe des Detektionslimits (siehe Abbildung 18 B).

Der erste Schritt der GSH-Synthese (*GCLC* und *GCLM*) zeigt in der NR-Gruppe eine leichte Zunahme unter PEMF-Stimulation. In der R-Gruppe zeigt sich ein leichter Zuwachs während Reifung, mit leichter Abnahme unter PEMF-Stimulation. Der zweite Schritt der GSH-Synthese, die *GSS*, zeigt eine durchgehend etwas stärkere Expression in der NR-Gruppe ohne Änderung.

Bei der *GSR* zeigt sich initial ein hoher Unterschied zwischen NR- und R-Gruppe. Während des Reifungsprozesses zeigt sich in der NR-Gruppe eine

3. Ergebnisse

leichte Abnahme die nicht von der PEMF-Stimulation beeinflusst wird. Bei der R-Gruppe zeigt sich eine deutliche Zunahme während der Reifung mit leichter Abnahme nach PEMF-Stimulation (siehe Abbildung 18).

Bestätigung der qRT-PCR mittels RT-PCR:

Die GSR wurde aufgrund der initial bestehenden großen Unterschiede zwischen beiden Gruppen ausgewählt. Dieser lässt sich im Trend bestätigen, jedoch besteht hier eine große Streuung zwischen den Spendern, insbesondere in der NR-Gruppe am Tag 0 (siehe Abbildung 19).

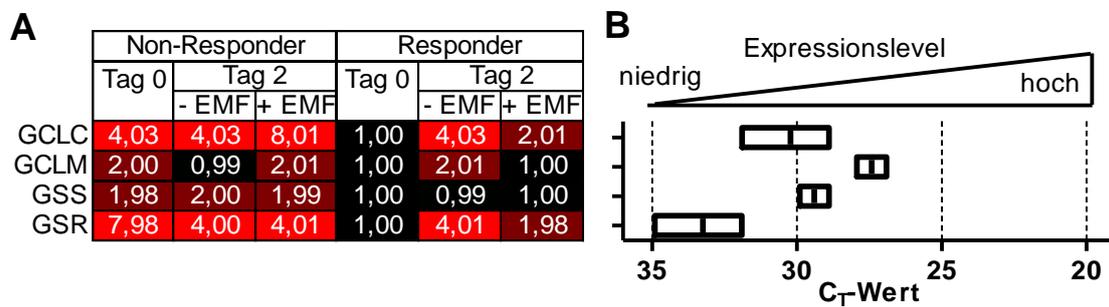


Abbildung 18: **qRT-PCR Array**: **A**: Ausschnitt der Heatmap. Expression relativ zu der R-Gruppe Tag 0. Ausschnitt mit GSH bildendem und reduzierendem System. Dargestellt ist die fold regulation ($2^{-\Delta\Delta CT}$, wenn $2^{-\Delta\Delta CT} < 0,9$: $(-1)/(2^{-\Delta\Delta CT})$). **B**: Expression der Gene in der qPCR. Dargestellt ist die Zyklenzahl invers. Entsprechend nimmt die Expression nach rechts zu (bei abnehmender Zyklenzahl). Detektionslimit: 35 Zyklen. Dargestellt ist der Bereich der gemessenen Zyklenzahlen aller gemessenen Zustände, mit Markierung in Höhe des MW

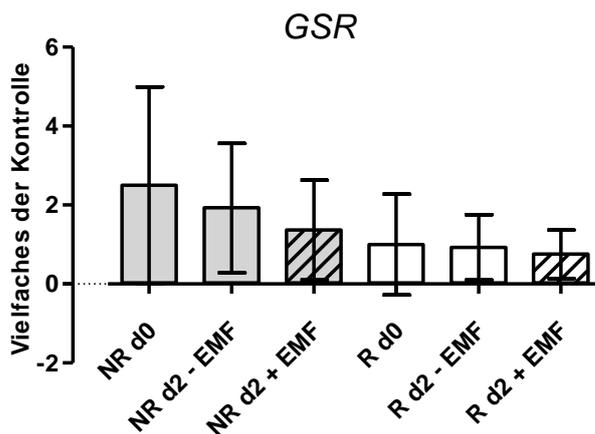


Abbildung 19: **semiquantitative RT-PCR**: GSR. Normalisierung erfolgte auf GAPDH. Werte wurden auf den Mittelwert der Kontrolle (R-Gruppe Tag 0) relativ bezogen. Dargestellt ist der jeweilige MW mit 95 %-KI. N=6, n=2. Statistische Testung mit Kruskal-Wallis Test und DunnsPost Test, * $p < 0,05$.

3.3.4. CCL5

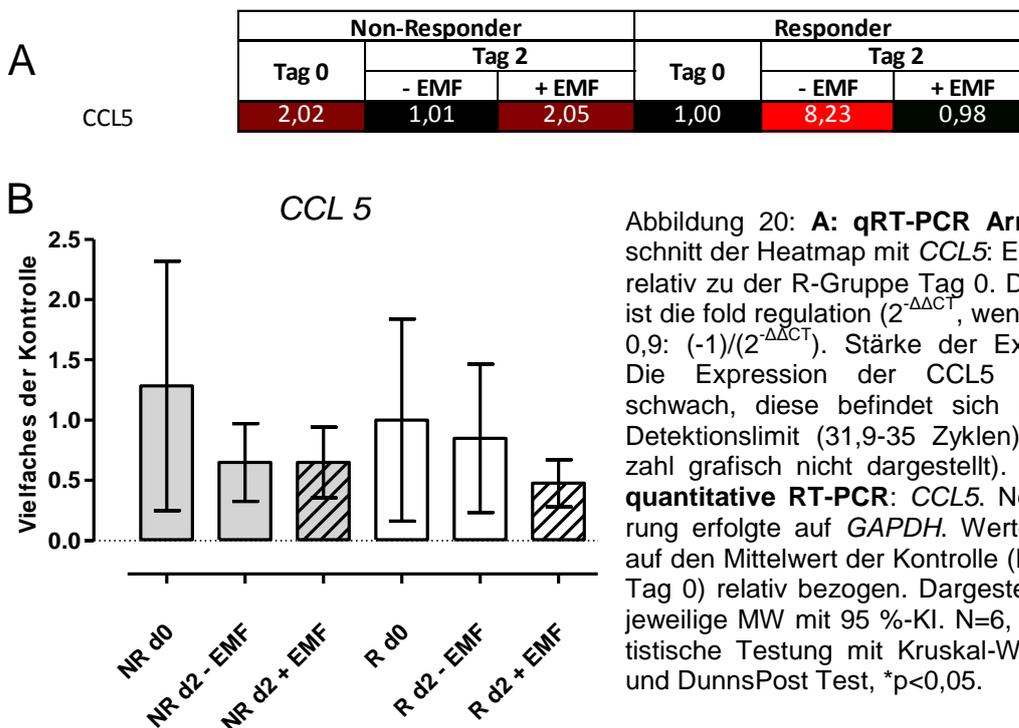
Änderungen und Unterschiede in der qRT-PCR:

3. Ergebnisse

Die CCL5 zeigt während der Reifung eine sehr starke Zunahme der Expression in der R-Gruppe, sodass dies einer der größten Unterschiede zwischen beiden Gruppen nach Reifung ist (siehe Abbildung 20 A). Das Expressionslevel ist insgesamt sehr niedrig, nahe am Detektionslimit.

Bestätigung der qRT-PCR mittels RT-PCR:

Die starke Zunahme in der R-Gruppe nach Reifung ließ sich so in der RT-PCR nicht bestätigen. Auffallend ist die durchgehend sehr hohe Streuung in den verschiedenen Gruppen.



3.3.5. ROS-bildendes System: NADPH-Oxidase-System und Dual-Oxidasen

Änderungen und Unterschiede in der qRT-PCR:

Die Expression aller Gene des NADPH-Oxidase-Systems befindet sich in einem sehr schwachen Bereich, nahe dem Detektionslimit. NCF1, DUOX2 und NOS2 sind außerhalb des Detektionslimits und dementsprechend von der Auswertung ausgenommen (siehe Abbildung 21 B). Die NOX4 zeigt einen leichten spezifischen Anstieg nach PEMF-Stimulation in der NR-Gruppe.

3. Ergebnisse

Bestätigung der qRT-PCR mittels RT-PCR:

In der RT-PCR lässt sich eine spezifische Zunahme durch PEMF-Stimulation in der NR-Gruppe nicht bestätigen. Insgesamt besteht eine hohe Streuung (siehe Abbildung 22).

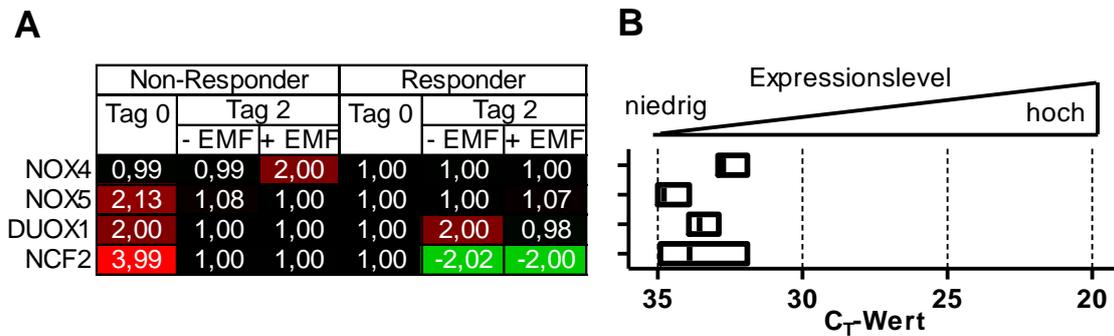


Abbildung 21: **qRT-PCR Array**: A: Ausschnitt der Heatmap NADPH-Oxidase-System und Dual-Oxidasen: Expression relativ zu der R-Gruppe Tag 0. Dargestellt ist die fold regulation ($2^{-\Delta\Delta CT}$, wenn $2^{-\Delta\Delta CT} < 0,9$: $(-1)/(2^{-\Delta\Delta CT})$). B: Expression der Gene in der qPCR. Dargestellt ist die Zyklenzahl invers. Entsprechend nimmt die Expression nach rechts zu (bei abnehmender Zyklenzahl). Detektionslimit: 35 Zyklen. Dargestellt ist der Bereich der gemessenen Zyklenzahlen aller gemessenen Zustände, mit Markierung in Höhe des MW.

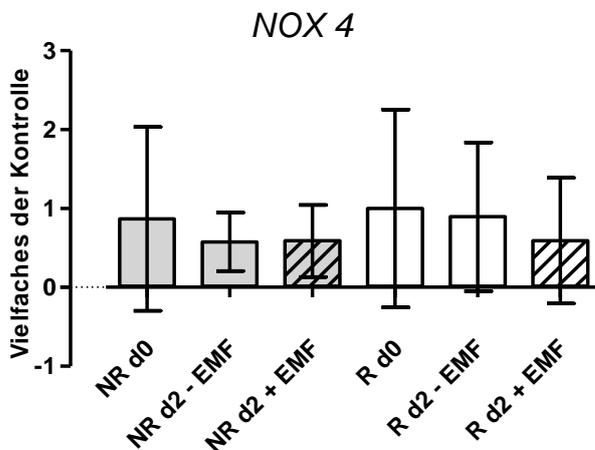


Abbildung 22: **semiquantitative RT-PCR**: NOX 4. Normalisierung erfolgte auf GAPDH. Werte wurden auf den Mittelwert der Kontrolle (R-Gruppe Tag 0) relativ bezogen. Dargestellt ist der jeweilige MW mit 95 %-KI. N=6, n=2. Statistische Testung mit Kruskal-Wallis Test und DunnsPost Test, *p<0,05.

3.4. Enzymmessungen

3.4.1. Enzymassays

Als wesentliche Überträger des PEMF-Effekts wurden das GSH-System, die CAT und die SOD auf Enzymebene untersucht. Eine Messung der GSR-Aktivität wurde versucht, zeigte aber eine zu geringe Aktivität (passend zu der sehr niedrigen Expression in den PCR-Untersuchungen). Ebenso zeigte sich in

3. Ergebnisse

Messungen des GSH/GSSG-Verhältnisses eine nicht ausreichende Konzentration in den Proben.

Die SOD und CAT zeigen, in beiden Gruppen, keine signifikante Änderung nach PEMF-Stimulation. Die GPX zeigt hingegen deutliche Änderungen, die sich jedoch nicht signifikant unterscheiden. Auch ein signifikanter Unterschied zwischen NR- und R-Gruppe ließ sich nicht nachweisen.

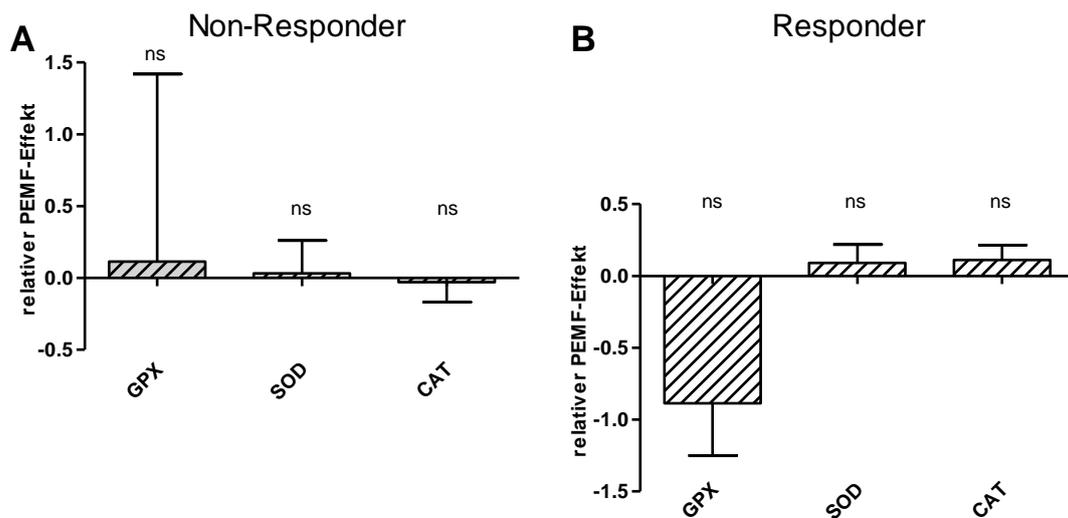


Abbildung 23: **Messung Enzymaktivitäten:** **A:** Non-Responder-Gruppe. **B:** Responder-Gruppe. Dargestellt ist die relative Zunahme oder Abnahme der Enzymaktivität relativ zur unbefeldeten Kontrolle. R-Gruppe: N=5, n=2 (bei GPX: N=2). NR-Gruppe: N=5, n=2 (bei GPX: N=4). Dargestellt ist der MW mit 95 %-KI. Statistische Testung mit Kruskal-Wallis Test und DunnsPost Test, *p<0,05.

3.4.2. Spezifizierung der Spender (für Enzymassays) nach Ansprechen

Bei 11 weiteren Spendern wurde die Reifung, durch Zugabe des Differenzierungsmediums, induziert. Von diesen Spendern wurde die AP-Aktivität und Resazurinkonversion an den Tagen 0, 4 und 7 gemessen. Außerdem die Matrixmineralisierung nach 14 und 21 Tagen mittels Alizarin-Rot-Färbung quantifiziert. Weiter wurde die ROS-Menge mittels DCFH-DA Färbung an den Tagen 4 und 7 quantifiziert.

3.4.2.1. Einteilung nach Ansprechen

Die Spender wurden nach der Zunahme durch EMF-Stimulation in den Punkten Resazurin-Konversion und AP-Aktivität eingeteilt. Dafür wurden die Medianwer-

3. Ergebnisse

te nach EMF-Stimulation relativ zu den Werten der unstimulierten Kontrolle gesetzt. Der Zuwachs durch EMF-Stimulation zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde aufsummiert.

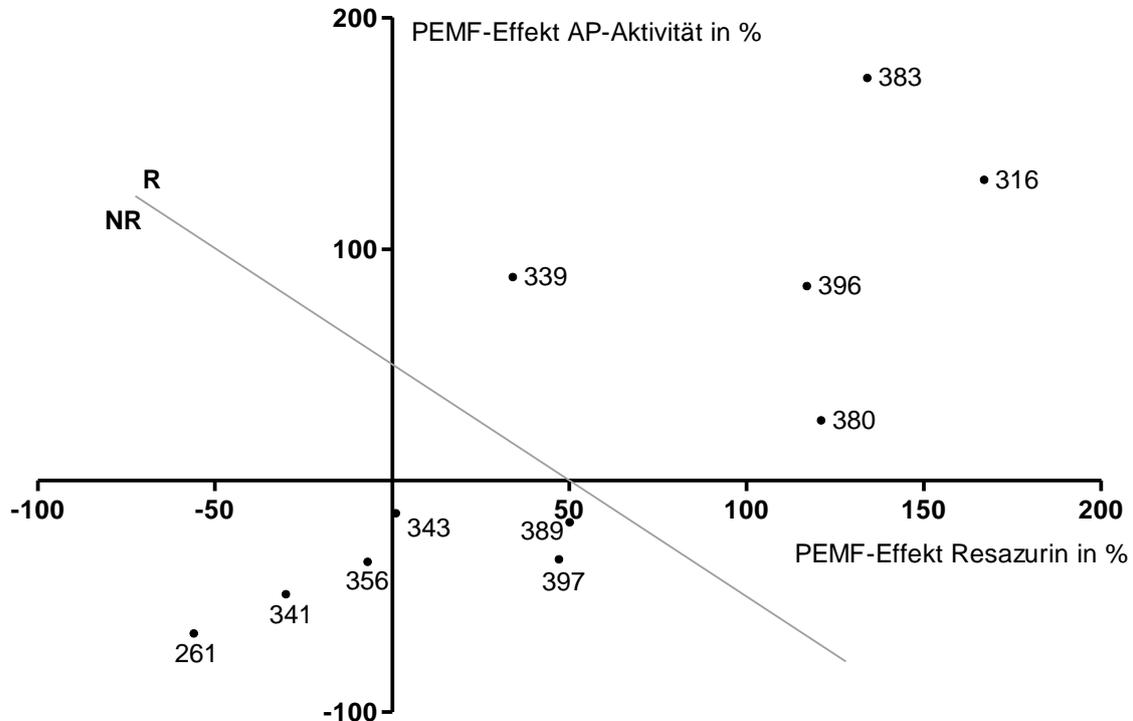


Abbildung 24: Darstellung des PEMF-Effekts, relativer Zuwachs oder Abnahme in %. X-Achse: Effekt auf Resazurinumsatz. Y-Achse: Effekt auf AP-Aktivität. Entsprechend der Einteilung für die qPCR wurde die Grenze für die Trennung nach Responder und Non-Responder bei ca. 64% Gesamtansprechen gesetzt.

Tabelle 34: Tabellarische Aufführung des errechneten Ansprechens für alle 11 Spender der Enzymassays. Dargestellt ist der relative Zuwachs (als Medianwert) unter PEMF-Stimulation relativ zur unbefeldeten Probe (Median der unbefeldeten Probe).

Spender	Resazurin			AP			Res + AP
	d4	d7	Summe	d4	d7	Summe	Summe
261	-23 %	-34 %	-56 %	-38 %	-28 %	-66 %	-122 %
316	174 %	-7 %	167 %	123 %	7 %	130 %	296 %
339	0 %	35 %	34 %	-43 %	131 %	88 %	122 %
341	3 %	-34 %	-30 %	-22 %	-27 %	-49 %	-80 %
343	19 %	-18 %	1 %	-14 %	0 %	-14 %	-13 %
356	30 %	-37 %	-7 %	-20 %	-16 %	-35 %	-42 %
380	66 %	56 %	121 %	14 %	12 %	26 %	148 %
383	96 %	38 %	134 %	130 %	44 %	174 %	308 %
389	28 %	22 %	50 %	-26 %	8 %	-18 %	33 %
396	68 %	49 %	117 %	20 %	64 %	84 %	201 %
397	53 %	-5 %	47 %	8 %	-41 %	-34 %	14 %

3. Ergebnisse

3.4.2.2. Resazurinumsatz, AP-Aktivität und Alizarinrot-Messung

Resazurin-Konversion

In der NR-Gruppe zeigt sich eine deutlich größere Zunahme der Resazurinkonversion. Unter EMF-Stimulation fällt der Anstieg zum Tag 4 hin etwa gleich aus, ohne eine weitere Änderung zum Tag 7 hin. Die Unterschiede zwischen befehdeten und unbefehdeten Proben sind sehr gering und nicht signifikant (siehe Abbildung 25 A).

In der R-Gruppe zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Resazurinkonversion zu Tag 4 und 7 hin. In der EMF-stimulierten Gruppe fiel der Anstieg zum Tag 4 hin beinahe doppelt so hoch aus, hier zeigt sich sogar ein Abfall zum Tag 7 hin (siehe Abbildung 25 B).

AP-Aktivität

In der NR-Gruppe zeigte sich eine signifikante Zunahme der AP-Aktivität während den 7 Tagen Reifung, die EMF-Stimulation zeigte hingegen eine leichte Hemmung der Zunahme von AP-Aktivität. Dabei besteht auch eine größere Streuung zwischen den Spendern, sodass nur der Anstieg zum Tag 7 hin leicht signifikant ist (siehe Abbildung 25 C).

In der R-Gruppe hingegen ließ sich eine sehr kleine nicht-signifikante Zunahme beobachten, die unter EMF-Stimulation etwas zunahm (siehe Abbildung 25 D).

Quantifizierung der Matrixmineralisierung mit Alizarinrot

Sowohl ohne als auch mit EMF-Stimulation zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Matrixmineralisierung von Tag 14 zu Tag 21 hin (siehe Abbildung 25 E + F).

NR- und R-Gruppe unterscheiden sich jedoch bezüglich der Menge der gebildeten Matrix. So zeigt die Gruppe der Non-Responder eine deutlich höhere Matrixmineralisierung im Vergleich zu Gruppe der Responder. In beiden Gruppen zeigen sich jedoch individuelle sehr große Unterschiede in der gebildeten Matrix, auch lässt sich keine Tendenz für eine Zunahme oder Abnahme der Matrixmineralisierung bei den Spendern zeigen.

3. Ergebnisse

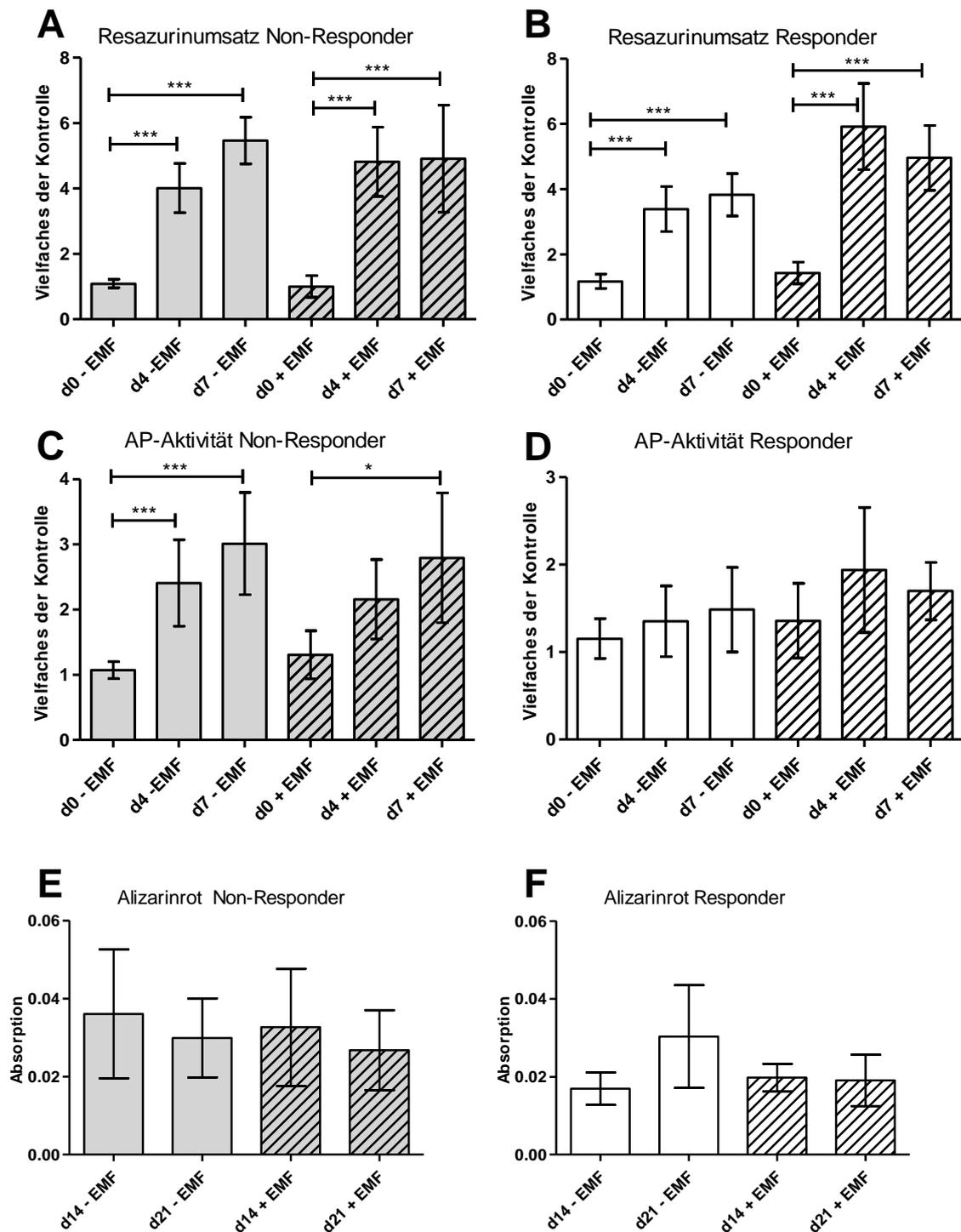


Abbildung 25: **Quantifizierung des Ansprechens auf PEMF-Stimulation.** **A + B:** Resazurin-Konversion **C + D:** AP-Aktivität. Non-Responder: N=6, n=4. Responder: N=5, n=4. Dargestellt ist jeweils das Vielfache der Kontrolle (Tag 0 unbefeldet), als Mittelwert mit 95 %-Konfidenzintervall. Statistische Testung erfolgte mit Kruskal-Wallis und Dunns Post-Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. **E + F:** Quantifizierung der Matrixmineralisierung an Tag 14 und Tag 21 mittels AlizarinRot-Färbung. Non-Responder. N=6, n=3. Responder. N=5, n=3. Darstellung des Mittelwerts der absoluten Werte mit 95 %-Konfidenzintervall. Statistische Testung erfolgte mit Kruskal-Wallis und Dunns Post-Test * $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.4.3. Quantifizierung der gebildeten ROS mit DCFH-DA Messung

Es konnte eine signifikante Zunahme der DCF-Produktion in der Positivkontrolle (Probe nach H₂O₂-Zugabe) gezeigt werden. Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich hingegen an d4 und d7 für den Vergleich von unbefeldeten und befeldeten Zellen.

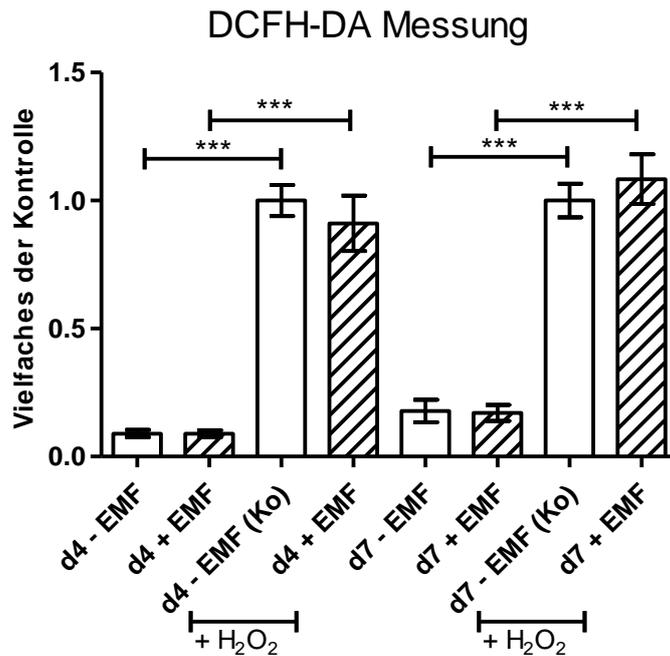


Abbildung 26: **DCFH-DA-Messung:** dargestellt ist die Zunahme der Fluoreszenzintensität des gebildeten DCF, relativ zur Positivkontrolle (Positivkontrolle: unbefeldet + H₂O₂-Stimulation des jeweiligen Tages). Mittelwert mit 95 %-KI. N= 9; n=4. Statistische Testung mit Friedman-Test und Dunn's Test

* p<0,05, *** p<0,001.

4. Diskussion

4. Diskussion

4.1. Einordnung der Arbeit in Vorarbeiten und Limitierung der Methodik

4.1.1. Einordnung der Arbeit in Vorarbeiten

EMF-Stimulatoren zur Unterstützung der Knochenheilung werden seit Jahrzehnten eingesetzt. Dabei sind jedoch die *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse uneinheitlich und zeigen in der Summe eine geringe Evidenz. Einer der Gründe hierfür sind die vielen verschiedenen technischen Lösungen und unterschiedlichen Eigenschaften der EMF. In Vorarbeiten von Ehnert *et al.* [51] wurden verschiedene, aus der Literatur gewählte, EMF verblindet an Zellkulturen getestet. In der Summe zeigte das hier genutzte ELF-PEMF mit 16 Hz den größten Effekt. Stimuliert wurden die im Mittelpunkt des Knochenumbaus stehenden Zellen, Osteoblasten und Osteoklasten. Die Reifung der Osteoblasten (quantifiziert mittels der Reifungsmarker alkalische Phosphatase und Resazurin) nahm durch Befeldung zu, während Osteoklasten keinen spezifischen Effekt zeigten. Abhängig von dem Ansprechen auf die Stimulation unterteilte Ehnert *et al.* die Spender in zwei Gruppen, die sogenannte Responder (R) - und Non-Responder (NR) - Gruppe. Das Ansprechen war abhängig von der initialen Expression der Reifungsmarker. So zeigten Spender der NR-Gruppe schon vor Stimulation eine hohe Expression der Reifungsmarker. Initial zeigte die Redox-kontrollierte MAPK ERK1/2 eine Zunahme der Phosphorylierung in Spendern der R-Gruppe. ERK1/2 zeigte sich in einem Inhibitionsexperiment essentiell für den PEMF-Effekt: es zeigte sich eine ausbleibende Zunahme der Reifungsmarker [51]. Auch zeigte sich nach mehreren Tagen Stimulation eine Veränderung des intrazellulären ROS-Anstiegs nach PEMF-Stimulation [164]. An diesem Punkt setzt die vorliegende Arbeit an. Ziel war es die Rolle des Redox-vermittelten Effekts in der NR- und der R-Gruppe genauer zu spezifizieren.

4.1.2. Limitierungen der genutzten Methodik

Zu dem Probenmaterial

4. Diskussion

Das Konzept der vorliegenden Arbeit ist das einer „Pilotstudie“, die zentrale Frage ist die nach Effekten durch die PEMF-Stimulation. Hierbei wurde keine genaue Selektion der Spender vorgenommen, insbesondere keine Selektion nach Cofoundern wie Alter und pathophysiologischer Situation wie z.B. Nebenerkrankungen (Alter in der NR-Gruppe: Mittelwert 71,7 Jahre, im Median 71 Jahre, SD 7,99; Alter in der R-Gruppe: Mittelwert 65,3 Jahre, im Median 63,5 Jahre, SD 12,03). In der Vorarbeit von Ehnert *et al.* erfolgte ebenfalls keine Selektion der Spender [51].

Es wurde ein spezifisches PEMF #16 genutzt mit definierten Applikationszeiten, dies wurde im Vorfeld von Ehnert *et al.* etabliert [51]. Vorexperimente zu diesem spezifischen Feld stammen aus der Arbeitsgruppe von Dr. Ehnert. Da die Signalmorphologie und Intensität sowie die Zelllinie entscheidend für den Wirkmechanismus der EMF-Stimulation ist ergeben sich hier entsprechend Einschränkungen der Vergleichbarkeit (siehe Tabelle 4).

Zur qRT-PCR

Mittels qRT-PCR wurden potentielle Gene aus dem Pool von oxidativen Stress Genen in beiden Gruppen verglichen. Jede Gruppe bestand aus gepooltem Material von 10 Spendern. Die Anteile der Spender am Gesamtmaterial war nicht homogen verteilt ein (NR-Gruppe: Median: 8,5 %; Anteile reichen von 4,2 % bis 21,5 %; R-Gruppe: Median: 9,3 %; Anteile reichen von 6,3 % bis 16,1 %). Auch unterscheiden sich die Spender in den jeweiligen Gruppen doch erheblich in ihrem Ansprechen auf die PEMF-Stimulation. So lag das Ansprechen in der NR-Gruppe im Mittel bei 34 % (SD 21 %) und in der R-Gruppe bei 105 % (SD 53 %). Als Grenze zwischen R- und NR-Gruppe wurde ein rechnerisches Ansprechen von 64 % gewählt. Pro Gruppe erfolgte jeweils ein einzelner Lauf.

Die entsprechend geringe Spezifität bedingt durch die Heterogenität der Proben wurde in Kauf genommen, da es in diesem Schritt lediglich um die Identifikation möglicher Kandidatengene für die folgenden Untersuchungen ging.

Zur semiquantitativen RT-PCR

In der RT-PCR wurden die gleichen Spender untersucht wie in der qRT-PCR. Pro Gen wurden jeweils 6 Spender aus der NR- und aus der R-Gruppe unter-

4. Diskussion

sucht. Bei einzelnen Genen wurde bei fehlender Menge nur ein PCR-Lauf durchgeführt. Bei der *SOD2* wurde zusätzlich jeweils ein PCR-Lauf von 4 weiteren Spendern pro Gruppe durchgeführt. Auch diese Methode zeigt manche Limitationen und Fehlerquellen. Insbesondere Pipettiergenauigkeiten während PCR-Ansatz, bei der Quantifizierung und elektrophoretischen Auftrennung sind hierbei zu erwähnen. Durch die relativ vielen Pipettierschritte kann sich dies doch deutlich auswirken. Zudem konnte trotz Optimierung der PCR-Bedingungen, für manche Spender, eine Messung im nichtlinearen Sättigungsbereich nicht vermieden werden [185].

Zu den Messungen auf Enzymebene

Für die Messung der Enzymaktivitäten wurden andere Spender als in den PCR-Versuchen genutzt. Die Isolation der Mitochondrium- und Zytosolfractionen erfolgte an Tag 2, nach Induktion des Reifungsprozesses, nach einem modifizierten Protokoll von Lake et al. [178]. Puffer, Isolierungsverfahren, Fraktionierung und Lagerung wurden im Vorfeld mehrfach mit anderen Spendern getestet. Ebenso die Messungen der Enzymaktivitäten und die Proteinquantifizierung mittels Lowry. Entsprechend den Pufferzusätzen wurde die Proteinquantifizierung mittels Lowry gewählt, als diejenige welche am wenigsten von den genutzten Pufferzusätzen beeinflusst wird.

Eine angedachte Messung der *GSR*-Aktivität zeigte sich in Vortests nicht durchführbar, weil eine sehr geringe Aktivität bestand, analog zu der gering exprimierten *GSR* in den Proben (siehe S. 66, qRT-PCR). Eine Messung des GSH/GSSG-Verhältnisses wurde ebenfalls getestet. Die Osteoblasten-Proben zeigten auch hier keine ausreichend messbare Konzentration. Entsprechend wurde sowohl von der Messung der *GSR*-Aktivität als auch des GSH/GSSG-Verhältnisses abgesehen.

Für die Messung der Enzymaktivitäten von *SOD*, *GPX* [180] und *CAT* wurde im Vorfeld eine Optimierung der Versuchsbedingungen und der benötigten Proteinmenge, in jeweils mehreren Probeläufen, durchgeführt. Im Versuch wurden letztlich sowohl Proben verschiedener Spender, als auch Proben mit unterschiedlichen Reifungsbedingungen gemessen (Differenzierungsmedium und

4. Diskussion

Differenzierungsmedium mit den Zusätzen BSO bzw. L-Cystein). Im Nachhinein zeigte sich v.a. die Aktivität der *CAT* von diesen Zusätzen stark beeinflusst, so dass sich die Messwerte deutlich außerhalb des vom Standard abgedeckten Bereichs befanden. Entsprechend sind die hier vorliegenden Werte jeweils mit Vorbehalt zu betrachten. Der *CAT*-Standard wurde mittels GraphPad-Prism extrapoliert. Da sich die Messwerte letztlich in einem extrapolierten exponentiellen Bereich befanden, bestehen minimale Unterschiede zwischen befeldeten und unbefeldeten Proben. Dies ist lediglich eine behelfsmäßige Maßnahme, entsprechend kann hier nicht sicher auf das tatsächliche Verhältnis zurückgeschlossen werden. Die Aktivität der *GPX* zeigte sich in den Proben ebenfalls sehr unterschiedlich. Hier zeigte die Mehrheit der gemessenen Proben eine *GPX*-Aktivität deutlich unterhalb des Messbereichs, sodass sich für die *GPX*-Aktivität lediglich bei 6 von 10 Spendern zuverlässige Werte generieren ließen.

4.2. Wie verändert sich die Genexpression während der Reifung der Osteoblasten?

4.2.1. welche Phase der Differenzierung wird hier mit der Reifung betrachtet?

Da die meisten Studien zu MSCs und MC3T3-E1 Zellen publiziert wurden, soll hier kurz auf die Frage nach der Übertragbarkeit auf, die hier genutzten, primären humanen Osteoblasten eingegangen werden.

Osteoblasten differenzieren aus den MSCs (mesenchymale Stromazellen oder Stammzellen) wie auch Osteozyten (differenzieren aus Osteoblasten), Myoblasten, Chondrozyten und Adipozyten. Die Festlegung auf den Differenzierungsweg, z.B. zu Osteoblasten wird durch „master transcriptional regulators“ reguliert. Zuerst erfolgt eine Aktivierung des Sox9 und dadurch eine Festlegung auf die Differenzierung zu Osteoblasten und Chondroblasten (enchondrale Zelllinie) [48]. Anschließend beginnt die osteoblastäre Linie durch Aktivierung des Runx2 (Cbfa1). Die Zellen werden dann als Präosteoblasten bezeichnet [48]. Ab hier erfolgt eine 3 Stufige Reifung, bestehend aus Proliferationsphase, Matrixreifungsphase und Mineralisierungsphase [48, 49].

4. Diskussion

Das hier beschriebene Verfahren betrachtet primäre Zellen, welche aus Spongiosa humaner Spender gewonnen wurden. Nach den Proliferationsphasen exprimieren diese Zellen die osteoblastentypischen Oberflächenmarker in der Durchflußzytometrie (positiv für CD90 und CD105, negativ für CD14 und CD45) [167]. MSCs in den Zellkulturen können nicht ausgeschlossen werden, da sie die gleichen Oberflächenmarker exprimieren können [186]. Der Großteil der Zellkultur wird jedoch von Präosteoblasten gebildet, die proliferieren bzw. EZM bilden und mineralisieren [51].

Welche Phase wird durch MC3T3-E1 Zellen beschrieben?

Die MC3T3-E1 Zelllinie entspricht am ehesten Präosteoblasten [48]. Sie zeigt die 3 Reifungsphasen aus Proliferation, Matrixreifung und Mineralisierung, sehr ähnlich wie sie bei humanen Zellen zu beobachten sind [187]. Die Zelllinie wurde aus der Schädelkalotte der Maus isoliert. Trotz sehr ähnlichem Differenzierungsvorgang bestehen signifikante Unterschiede zu primären humanen Osteoblasten in der Genexpression, die sich am ehesten durch die Speziesunterschiede erklären lassen [188].

4.2.2. Bedeutung der *SOD*, *CAT*, *GPX* und *CCL5* während der osteogenen Differenzierung

Um die Frage nach den Änderungen während der Reifung zu beantworten, schauen wir uns zuerst die größten Änderungen und Unterschiede während des Reifungsprozesses an. Die größte Änderung zeigt dabei die *GPX3* und die *CAT*. Zudem fallen noch die *SOD2* und *CCL5* auf, welche beide in der R-Gruppe eine große Änderung zeigen.

In der qRT-PCR ließ sich keine Änderung der *SOD1* während der Reifung beobachten, während sich in der R-Gruppe ein starker Anstieg der *SOD2* zeigte. Diese starke Zunahme der *SOD2* ließ sich in der RT-PCR nicht bestätigen. In der RT-PCR führten wir auch eine Untersuchung aller Spender der NR- und R-Gruppen aus der qRT-PCR einzeln durch. Der große Anstieg in der NR-Gruppe ließ sich in einem einzelnen Spender in besonders hohem Ausmaß zeigen, so dass hier von einem isolierten Spendereffekt ausgegangen werden kann. In nachfolgenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe untersuchte Ehnert *et al.*

4. Diskussion

die Expression in der RT-PCR und im Western-Blot, hierbei erfolgte jedoch keine Trennung nach NR- und R-Gruppe. Dabei zeigte die *SOD2* in der RT-PCR einen signifikanten Anstieg während des Reifungsprozesses, jedoch ließ sich dieser Anstieg im Western-Blot nicht bestätigen [164].

In der Literatur findet sich eine besondere Rolle der *SOD2* während der Reifung bzw. Differenzierung. Bei der Differenzierung von primären humanen Osteoblasten konnte Spreafico *et al.* eine Zunahme der *SOD2*-Proteinlevel beobachten [189]. Chen *et al.* zeigte bei der osteogenen Differenzierung von hMSCs eine konstante Zunahme der *SOD2* und *CAT* Proteinexpression während die Expression von *SOD1* dabei keine Änderung zeigte [190]. Chaves Neto *et al.* konnte bei der Differenzierung von MC3T3-E1 Zellen, mittels Western-Blot, eine Zunahme der *SOD2*-Aktivität, bei Abnahme der Gesamt-*SOD*-Aktivität, zeigen [191]. Bei der Differenzierung von MC3T3-E1 Zellen und primären murinen Kallotten-Osteoblasten ging, bei Gao *et al.*, die Differenzierung mit einer erhöhten Aktivität der *SOD2* einher, bei gleichzeitig unbeeinflusster *SOD1* Aktivität. Die starke Zunahme der *SOD2* zeigte sich sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene. Auch hier zeigt sich in der qRT-PCR keine Änderung der *SOD1*, jedoch eine Zunahme der *SOD2* in der R-Gruppe. Ehnert *et al.* konnte auch einen *SOD2* Anstieg in der RT-PCR beobachten, im Western-Blot jedoch nicht. Die essentielle Rolle der *SOD2* konnte in einem knockout Experiment bestätigt werden. *SOD2*-knockout Osteoblasten zeigten eine deutlich verschlechterte osteogene Funktion [192]. Die große Bedeutung der *SOD2* im Gegensatz zur *SOD1* zeigt sich auch im Tiermodell, so zeigen *SOD2* knockout Mäuse einen dramatisch stärker geschädigten Phänotyp als *SOD1* Knockout Mäuse [97].

In der qRT-PCR zeigte die *CAT* in beiden Gruppen eine starke Zunahme, v.a. jedoch in der R-Gruppe. Die Zunahme ließ sich im Trend in der RT-PCR auch bestätigen. Jedoch zeigte sich die Expression in beiden Gruppen sehr unterschiedlich zwischen den Spendern. Bei der photometrischen Quantifizierung konnte dieser Bereich nicht optimal abgedeckt werden, sodass viele Spender eine Expression im Sättigungsbereich zeigten. Entsprechend sind die Änderungen in der RT-PCR etwas verfälscht und geben den Effekt kleiner wieder. In nachfolgenden Experimenten konnte Ehnert *et al.* eine Zunahme der *CAT* wäh-

4. Diskussion

rend der Reifung, sowohl in der RT-PCR als auch im Western-Blot, zeigen [164]. Zu der Rolle der Katalase während der osteoblastären Differenzierung finden sich wenige Studien. In hMSCs konnte Chen *et al.* eine Zunahme der Expression und Aktivität der *CAT* während osteogener Differenzierung zeigen [190]. Eine vergleichende Proteomanalyse membrangebundener Proteine, von Osteoblasten welche aus hMSCs differenziert wurden und undifferenzierten hMSCs, zeigte eine deutlich stärkere Expression der *CAT* auf Proteinebene, jedoch ohne stärkere Expression auf mRNA-Ebene [193]. Bei der Differenzierung von MC3T3-E1 Zellen konnte Chaves Neto *et al.* hingegen keine Veränderung der *CAT* zeigen. In *CAT* überexpressierenden Mäusen konnte eine, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, Zunahme der Knochendichte und Knochenmasse beobachtet werden [194].

Bei vorbestehend hohem Expressionslevel zeigt die *GPX3* während Reifung in der qRT-PCR die mit Abstand stärkste Zunahme der Expression in beiden Gruppen. In der R-Gruppe fiel der Zuwachs noch etwas deutlicher aus. In der RT-PCR ließ sich die starke Zunahme der Expression von *GPX3* im Trend bestätigen. Neben der technisch bedingten geringeren Sensitivität der RT-PCR, befanden sich -wie bei der *CAT*- einige Spendermesswerte außerhalb des linearen Bereichs der photometrischen Quantifizierung. In nachfolgenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte Ehnert *et al.* eine Zunahme der Expression der *GPX3*, während der Reifung, sowohl in der RT-PCR als auch im Western-Blot bestätigen [164]. Verschiedene Studien weisen auch auf eine wichtige Rolle der *GPX3* in der Differenzierung von Osteoblasten hin, auch wenn bislang kein Mechanismus beschrieben wurde. In einer systematischen Analyse des Transkriptoms von humanen Osteoblasten, vor und nach Induktion der Differenzierung mit BMP-2 und Dexamethason, konnten Grundberg *et al.* eine deutliche Zunahme der Expression von *GPX3* nach 24 h zeigen [195]. Zhang *et al.* untersuchten hMSCs aus dem Knochenmark vor und nach osteogener Differenzierung und identifizierten dabei verschiedene regulatorische Gene (core regulating gene) u.a. das *GPX3* [196]. Hecht *et al.* untersuchten die Differenzierung von fetalen murinen Osteoblasten. Hierbei verglichen sie Wildtyp-Mäuse mit RUNX2-knockout Mäusen, hierbei zeigte sich eine höhere Expression von

4. Diskussion

GPX3 im Wildtyp in der RT-PCR [197]. Auch bei der Differenzierung von osteogenen Vorläuferzellen aus Zahnfollikeln zeigte sich eine Zunahme der *GPX3* bei der Differenzierung [198]. In einer klinisch-experimentellen Arbeit verglichen Föger-Samwald *et al.* Knochenreste von Hüftköpfen nach osteoporotischer Fraktur mit denen einer Osteoarthrose. Hier zeigte sich eine signifikant höhere Expression von *SOD2* und *GPX3* in der Frakturgruppe [199].

Trotz vieler Beispiele in der Literatur gibt es keine Untersuchung der genauen Rolle von *GPX3* während der Differenzierung von Osteoblasten. Zur GPX-Familie gehört u.a. die *GPX1*. Diese ist das häufigste Isoenzym und in allen Zellen exprimiert, v.a. im Zytosol aber auch im Nukleus und dem Mitochondrium lokalisiert [109]. Die *GPX3* hingegen kommt als einziges Isoenzym auch im Plasma vor und wurde dort initial beschrieben [200, 201]. Für die *GPX1* ist auch eine regulatorische Rolle in der Differenzierung von MSCs beschreiben. Liu *et al.* hemmte die osteogene Differenzierung von primären MSCs von Ratten mittels H_2O_2 -Stimulation und konnte diese Hemmung durch Zugabe von Selen aufheben. Dabei zeigte sich eine Zunahme der *GPX1*-Expression und Aktivität [202]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich lediglich eine geringe Expressionsänderung der *GPX1* in der qRT-PCR, auch in der RT-PCR zeigte sich kein Unterschied zwischen differenzierten und undifferenzierten Zellen.

Während alle bis hier beschriebenen Enzyme eine klare Rolle in der antioxidativen Abwehr einnehmen, ist die Verbindung von *CCL5* und oxidativem Stress nicht so klar [159]. In der qRT-PCR zeigte sich in der R-Gruppe eine deutliche Zunahme der Expression bei Reifung, während sich in der NR-Gruppe eine Abnahme zeigte. In der RT-PCR ließ sich diese Änderung nicht bestätigen, vielmehr zeigte sich eine große Streuung der Expression in den verschiedenen Spendern. Eine mögliche Erklärung hierfür, ist die insgesamt niedrige Expression in der qRT-PCR. *CCL5* ist ein Chemokin für Blutmonozyten, Gedächtnis-T-Helfer-Zellen und eosinophile Granulozyten. Typischerweise wird es von zytotoxischen T-Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sezerniert [203]. *CCL5* spielt jedoch auch eine wichtige Rolle in der Knochenhomöostase, wird auch von Osteoklasten und Osteoblasten sezerniert, und wird unter anderem über das Redox-Signaling reguliert [159]. Es induziert die Chemotaxie

4. Diskussion

von Osteoblasten und Osteoklasten zu dem Ort erhöhten Knochenumsatzes [203]. *CCL5* wird in der osteogenen Differenzierung von hMSCs hochreguliert. Eine Hemmung der endogenen *CCL5*-Expression führt zu einer Blockade der Osteogenese mit Hemmung der Expression der AP und weiteren osteoblastären Markern. Eine Überexpression zeigt hingegen eine erhöhte AP Expression und Aktivität. Die Hemmung des *CCL5*-Rezeptors *CCR1* führt zu einer verminderten Zellzahl während der Osteogenese [204]. Zusammengefasst ist *CCL5* ein Zytokin welches während der Reifung von MSC-Osteoblasten essentiell ist und auch in dieser Phase verstärkt von MSC-Osteoblasten exprimiert wird. Diese Bedeutung zeigt sich auch im Tiermodell, in *CCL5* defekten Mäusen. Im Alter von 6 Monaten zeigt sich bei diesen ein osteopener Phänotyp mit verminderter Knochenbildung v.a. endokortikal und mit erhöhter Osteoklastogenese. Dieser verschwindet jedoch mit zunehmendem Alter [205]. Die Bedeutung der *CCL5*-Expression ist anhand der hier erhobenen Daten nicht einzuordnen. Bei fehlendem Trend in der RT-PCR bleibt dies lediglich Spekulation, eine isolierte Erhöhung in einem einzelnen Spender oder eine Nivellierung der Genexpression in der Summe erscheint am wahrscheinlichsten.

4.2.3. Wie lassen sich die Änderungen des antioxidativen Systems während der Differenzierung einordnen?

Während der Differenzierung von MC3T3-E1 Zellen konnte ein im zeitlichen Verlauf zunehmender Anstieg der ROS Produktion gezeigt werden. Die Bedeutung des ROS Anstiegs zeigt sich bei Zugabe von N-acetyl-Cystein. Dadurch konnte die intrazelluläre ROS Produktion und damit die Differenzierung und Mineralisierung signifikant gehemmt werden. Der Differenzierungsprozesses ging mit Änderungen in der Morphologie des Mitochondriums einher [206]. Chaves Neto *et al.* konnte mittels Western-Blot, während der Differenzierung, eine Zunahme der *SOD2*-Expression, bei Abnahme der gesamt-*SOD*-Aktivität und der Expression der *SOD1* zeigen. Dies ging auch mit einer Abnahme der Expression und Aktivität von *CAT*, *GPX* und *GST* einher [191]. Gao *et al.* beobachteten während der Differenzierung, von MC3T3-E1 Zellen, eine erhöhte mitochondriale Aktivität, einen erhöhten Sauerstoff-Verbrauch sowie eine Erhöhung der mitochondrialen Biogenese. Trotz der damit einhergehenden Erhöhung der ROS-

4. Diskussion

Produktion zeigte sich intrazellulär eine Abnahme der ROS bei Zunahme der gesamten antioxidativen Kapazität. Dies lag an einer erhöhten Aktivität der mitochondrialen *SOD2*, sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene, bei unbeeinflusster *SOD1* Aktivität [192]. Die besondere Bedeutung der mitochondrialen Vorgänge und insbesondere der Aktivität von *SOD 2* zeigte sich im Inhibitions-experiment. Durch Hemmung der mitochondrialen Aktivität ließ sich die osteogene Differenzierung unterdrücken und *SOD2* knockout Zellen zeigten eine deutlich verschlechterte osteogene Funktion [192].

Chen *et al.* konnte bei der osteogenen Differenzierung von humanen MSCs aus Knochenmark einen ähnlichen Effekt beobachten. Hier zeigte sich während der initialen Differenzierung eine Zunahme der mtDNA (mitochondriale DNA) und Proteinleveln der Atmungskettenenzyme bei einer Zunahme des Sauerstoffverbrauchs und des intrazellulären ATPs. Trotz der erhöhten mitochondrialen Aktivität zeigte sich jedoch eine Abnahme der intrazellulären Spiegel von H_2O_2 und O_2^- intrazellulär, bei gleichzeitiger Zunahme der Aktivität antioxidativer Enzyme. Dadurch nahm die antioxidative Kapazität zu. Nach initial starker Abnahme der ROS, nahmen diese im Verlauf der Differenzierung wieder zu. *CAT* und *SOD2* zeigten eine zunehmende Expression und Aktivität im Verlauf der Differenzierung. Die Aktivität von *SOD1*, *GPX*, *GR* und *PRX-III*, *PRX-I*, *TrxR* und *Trx-I* zeigten keine Änderungen [190]. Bei Pietilä *et al.* zeigte sich, während der osteogenen Differenzierung von hMSCs, eine Zunahme des Mitochondriums (Verhältnis von Mitochondrium zu Zytoplasma) und eine Zunahme des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs bei zunehmender Superoxidbildung. Nach Differenzierung bestand ein deutlich höherer Sauerstoffverbrauch [207].

Zusammenfassend findet während der Differenzierung, sowohl in MC3T3-E1 Zellen als auch in hMSCs eine Änderung der Morphologie des Mitochondriums, eine Änderung der intrazellulären ROS und der antioxidativen Enzyme statt. Insbesondere die *SOD2* und die *CAT* nehmen dabei zu, während die *SOD1* bzw. gesamt-*SOD*-Aktivität abnimmt. Auch scheint ein kontrolliertes Gleichgewicht der ROS-Level essentiell für die Differenzierung.

4. Diskussion

Grundsätzlich findet während der initialen Phase der Differenzierung von Stammzellen (SZ) ein Wechsel in der Energieerzeugung statt. Dieser Wechsel zeigt sich auch in MSCs. In SZ herrscht die anaerobe Glykolyse vor, Mitochondrien sind meist nur gering ausgeprägt [208]. So konnte gezeigt werden, dass Mitochondrien eine sehr viel schwächere Aktivität in undifferenzierten MSCs zeigen [209]. Durch die Differenzierung wird die oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette aktiviert, bei gleichbleibender Aktivität der Glykolyse [210]. Reife Zellen erzeugen die meiste Energie in der mitochondrialen Atmungskette mit entsprechendem Anfallen von ROS [190, 211]. Dies zeigt sich auch in einer Veränderung der mitochondrialen Morphologie und Lokalisation des Mitochondriums in der Zelle. So sind Mitochondrien in MSCs perinukleär angeordnet, während der Differenzierung werden die Mitochondrien schmaler und verteilen sich über das Zytoplasma. Dabei vergrößert sich auch die Oberfläche des Mitochondriums welche Kontakt zum Zytoplasma hat [211]. Die Bedeutung dieser Energieänderung zeigte sich in Inhibitionsexperimenten. Chen *et al.* konnten, durch Hemmung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung, die Differenzierung von hMSCs hemmen [190]. Die große Stoffwechselaktivität und mitochondriale Aktivität bedingen einen hohen Sauerstoffumsatz. Bei geringer Sauerstoffkonzentration in der Kultur konnte die Differenzierung und damit Mineralisierung gehemmt werden. Diese hohe Sauerstoffkonzentration war insbesondere in der initialen Phase wichtig [212].

Wie lassen sich die aufgeführten Beobachtungen auf primäre humane Osteoblasten übertragen?

Die oben aufgeführten Ergebnisse konnten ähnlich auch in den vorliegenden Experimenten beobachtet werden. In der qRT-PCR zeigte sich ein großer Anstieg der SOD2 und CAT während der Reifung, insbesondere in der R-Gruppe. In der semiquantitativen RT-PCR ließ sich dies jedoch nicht in gleichem Ausmaß bestätigen.

Eine mögliche Deutung der beobachteten Veränderungen während der Reifungsphase fällt in den Bereich der Spekulation. Möglich wäre ein andauernder Wechsel von anaerober Glykolyse hin zur oxidativen Phosphorylierung oder ein

4. Diskussion

erhöhter Energiebedarf z.B. im Rahmen der hohen Proteinbiosyntheserate für die Bildung der EZM und entsprechend hoher Stoffwechselaktivität.

4.2.4. Bedeutung der Unterschiede zwischen NR- und R-Gruppe

4.2.4.1. Welche Unterschiede bestehen zwischen der NR- und der R-Gruppe während des Reifungsprozesses?

Zur Beantwortung dieser Frage sollen in einem ersten Schritt die Unterschiede vor Induktion der Reifung betrachtet werden.

Hier sind, am Tag 0, alle Gene in der NR-Gruppe stärker exprimiert, nur 6 Gene sind in beiden Gruppen gleich stark exprimiert. Deutlichste Unterschiede zeigen *GSR* und *UCP2* (Faktor 8 Unterschied) bei jedoch sehr hohen C_T -Werten.

Das *GSR*-Gen codiert die Glutathion-Disulfid Reduktase, also das Enzym welches die Rückreduktion des GSSG zu GSH nach Oxidation katalysiert. Dadurch ist es essentiell für das GSH/GSSG-Gleichgewicht, einem der wichtigsten zellulären Antioxidantien. In der RT-PCR ließ sich kein signifikanter Unterschied am Tag 0 vor Induktion der Reifung bestätigen. *GSR* Polymorphismen konnten mit der Knochendichte bei postmenopausaler Osteoporose in Verbindung gebracht werden [213]. Zudem konnte für das Verhältnis von GSH/GSSG eine regulatorische Rolle während der osteogenen Differenzierung von Osteoblasten-ähnlichen SaOS-2 Zellen gezeigt werden [214].

Für das *UCP2* ließ sich der große Unterschied an Tag 0 in der RT-PCR ebenfalls nicht bestätigen. *UCP2* spielt eine Rolle in der Differenzierung von Osteoblasten und hMSCs. Es konnte eine Zunahme der Expression von *UCP2* während Differenzierung von hMSCs gezeigt werden [190], auch ist eine regulatorische Funktion in der Differenzierung von Chondrozyten, Myozyten und undifferenzierten Stammzellen beschrieben [215-217]. *UCP2* wirkt als Protonentransporter und kann Protonen direkt in die mitochondriale Matrix transportieren und damit an der Atmungskette vorbeischieben, dadurch sinken der Protonengradient und auch die ROS-Bildung. Über diesen Mechanismus besteht auch eine regulatorische Rolle im Rahmen des Redox-Signalings z.B. bei MAP-Kinasen und Zellzyklusregulation [218].

4. Diskussion

Zusammenfassend zeigen sich systematische Unterschiede zwischen den Gruppen in der qRT-PCR, z.B. eine durchgehend höhere oder zumindest gleichstarke Expression der untersuchten Gene in der NR-Gruppe am Tag 0. Durch die Reifung verändert sich das Bild, sodass die Mehrheit der Gene eine gleich starke Expression in beiden Gruppen zeigt. Dieses Bild eines systematischen Unterschieds, insbesondere am Tag 0 ließ sich so in der RT-PCR nicht bestätigen.

4.2.4.2. Wie lassen sich diese Spenderunterschiede einordnen?

Eine mögliche Erklärung für die Spenderunterschiede findet sich in der Methode der Einteilung in NR- und R-Gruppe: dies erfolgte nach Unterschieden in der Bildung von Markern der Reifung und Mineralisierungsfähigkeit. Es wurde dabei keine Selektion nach möglichen Cofoundern unternommen.

Hier ist insbesondere das Alter der Spender hervorzuheben. Taylor *et al.* beobachtete eine große Abhängigkeit der *in vitro* Matrixbildung und Mineralisierung von Gesundheitszustand, Alter, Geschlecht und Rasse der Spender. Primäre humane Osteoblasten junger gesunder Spender (<40 a) zeigten eine deutlich frühere Knochenbildung als die von älteren kranken Spendern (>65 a) [219].

Pietilä *et al.* konnte Ähnliches bei der osteogenen Differenzierung von hMSCs unterschiedlich alter Spender (hMSCs aus Knochenmark und Nabelschnurblut) beobachten. Die Differenzierung ging mit der Zunahme des Mitochondriums (Verhältnis von Mitochondrium zu Zytoplasma) und mitochondrialem Sauerstoffverbrauchs einher. Bei jungen Spendern (< 18 a) kam es dabei zu Veränderungen der mitochondrialen Morphologie mit EZM Bildung und Vesikelbildung. Dies ging mit einem deutlich höheren und kontinuierlicheren Sauerstoffverbrauch, sowie größerer Erhöhung des mitochondrialen Membranpotenzials, erhöhter Superoxid-Bildung und erhöhter Aktivität der mitochondrialen *SOD2* einher. Bei alten Spendern (> 50 a) hingegen blieb sowohl die Matrixproduktion mit Vesikelbildung als auch der erhöhte Sauerstoffverbrauch und Zunahme der *SOD2* aus [207].

Bei den in der vorliegenden Arbeit genutzten Spendern bestehen keine systematischen Altersunterschiede (siehe Tabelle 9), was einen ähnlichen Cofoun-

4. Diskussion

dereffekt nicht ausschließt. Wodurch die Unterschiede in den beobachteten Gruppen bedingt sind, lässt sich lediglich spekulieren. Denkbar sind Unterschiede in der mitochondrialen Aktivität oder im Stoffwechsel der Zellen z.B. aufgrund unterschiedlicher Differenzierungsstadien oder Cofoundern.

4.3. Wie wirkt sich die PEMF-Stimulation auf die Genexpression während des Reifungsprozesses aus?

4.3.1. Einordnung der Ergebnisse

Durch die PEMF-Stimulation während Reifung ändern nur wenig Gene die Expression. Die in der qRT-PCR beobachtete Zunahme von *SOD2*, *CAT* und *GPX3* in der NR-Gruppe unter PEMF-Stimulation ließ sich in der RT-PCR in der Tendenz bestätigen. Die großen Änderungen von *SOD2* und *CCL5* Expression in der R-Gruppe ließen sich hingegen nicht bestätigen. In den Enzymmessungen konnte kein signifikanter Zuwachs unter PEMF-Stimulation für *SOD*, *CAT* und *GPX* gezeigt werden.

In Folgeexperimenten untersuchte Ehnert *et al.* die Änderungen der Genexpression durch PEMF-Stimulation weiter. Hier wurde jedoch auf eine Trennung nach NR- und R-Gruppe verzichtet. Dabei konnte in der RT-PCR, nach PEMF-Stimulation, ein signifikanter Anstieg der *SOD2*, *GSR* und im Trend ein Anstieg der *CAT* und *GPX3*, im Vergleich mit der unbefeldet gereiften Probe gezeigt werden. Auch konnte dieser Anstieg mittels Western-Blot auf Proteinebene für die *SOD2*, *CAT* und *GSR* signifikant und für die *GPX* im Trend bestätigt werden. Auf der Ebene der Enzymaktivitäten zeigte sich eine signifikante Zunahme für die Aktivität der *SOD*, *CAT* und *GPX* [164].

4.3.2. Der PEMF-Effekt wird über eine Zunahme der intrazellulären ROS vermittelt

Wie EMF auf Zellen und insbesondere auf Knochenzellen wirken, dazu gibt es eine große Bandbreite an Theorien und Erklärungen. Manche dieser Unterschiede lassen sich durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen erklären, z.B. genutzte technischen EMF-Parameter und biologische Materialien. In Vorarbeiten mit dem hier genutzten ELF-PEMF konnte Ehnert *et al.* eine signifi-

4. Diskussion

kante Zunahme des phosphorylierten p38 (Maximum 60 min nach Stimulation) und ERK1/2 (Maximum 30 min nach Stimulation) in NR beobachten. In einem Inhibitionsexperiment, zeigte sich der positive PEMF-Effekt auf AP-Aktivität und Matrixmineralisierung von der ERK1/2-Stimulation abhängig [51]. Eine Stimulation der osteogenen Differenzierung durch EMF-Stimulation, über eine Aktivierung von ERK1/2 und p38, konnte bei Osteoblasten, BMSCs und MC3T3-E1 Zellen beobachtet werden, zudem konnte auch die Hemmung dieses osteogenen Effektes durch ERK-Inhibitoren gezeigt werden [50, 220]. In mehreren Studien konnten eine regulierende Rolle des RAS/MAPK-Signalings mit ERK1/2 und p38 Aktivierung in der Differenzierung von Osteoblasten gezeigt werden [50]. Über den ERK1/2 MAP-Kinase-Weg werden grundlegende Zellfunktionen wie Zellwachstum, Zellproliferation und Differenzierung reguliert. Über ROS wird das Redox-Signaling bei zentralen Zellprozessen beeinflusst, sowie die MAPK-Signalübertragung reguliert und moduliert [221]. Dies ist z.B. für einen NADPH-Oxidase produzierten ROS-Anstieg beschrieben: Friedman *et al.* zeigten eine ERK-Aktivierung durch Mikrowellen (im Mobiltelefon-Frequenzbereichen) welche sich auf einen NADPH-Oxidase produzierten ROS-Anstieg zurückführen ließ [84]. Feng *et al.* konnte eine Zunahme des EGFR-Clusterings durch ein 50 Hz EMF zeigen, vermittelt über einen NADPH-Oxidase erzeugten Superoxid-Anstieg [222]. Eine Induktion der NADPH-Oxidase und dadurch ROS-Anstieg, wie es Friedman und Feng beobachten konnten, zeigte sich bei uns nicht. Die *NOX*-Isoenzyme und *DUOX* zeigten in der vorliegenden Arbeit eine sehr geringe Expression in der qRT-PCR. Da *NOX4* eine, wenn auch schwache, Zunahme der Expression nach PEMF-Stimulation zeigte, erfolgte eine Kontrolle mittels RT-PCR. In der RT-PCR ließ sich keine *NOX4*-Änderung während Differenzierung oder nach PEMF-Stimulation zeigen.

NOX4 spielt in vielen Zellen eine regulatorische Rolle während der Differenzierung. Es wird über das Expressionslevel reguliert und ist an der Regulation langfristiger Prozesse wie Differenzierung und Homöostase beteiligt, z.B. an der Osteoklastogenese [223]. Während BMP2-induzierter Differenzierung von 2T3 Präosteoblasten konnte ein ROS-Anstieg durch Induktion von *NOX4* gezeigt werden [224]. Bei primären humanen Osteoblasten spielt *NOX4* vermutlich eine

4. Diskussion

größere Rolle bei anderen Zellprozessen, so konnte eine TGF-beta induzierte NOX4-Induktion während der Migration gezeigt werden [225].

In Vorexperimenten konnte zudem eine Zunahme der intrazellulären ROS (mit DCFH-DA Assay gemessen), nach PEMF-Stimulation, in phOB gezeigt werden. Hierbei bestand ein signifikanter Unterschied zwischen befeldeten und unbefeldeten Spendern bis zum Tag 2 der Differenzierung [164]. In weiteren Untersuchungen konnte Ehnert *et al.* die ROS-Zunahme intrazellulär spezifizieren. Diese trat in unserem Modell phOB nach wenigen Minuten der Befeldung auf. An den Tagen 0 und 2 der Reifung (nach 1 bzw. 3 Befeldungen) konnte eine signifikante Zunahme des ROS-Levels, nach PEMF-Stimulation, gezeigt werden. Ab Tag 3 der Reifung entsprach das ROS-Level dem der unbefeldeten Kontrolle. An Tag 6 der Reifung zeigte sich hingegen ein signifikant niedrigeres Level in befeldeten Osteoblasten, im Vergleich zu der unbefeldeten Kontrolle. Die initiale ROS-Zunahme in den Osteoblasten entsprach der Zugabe von 0,001 % H₂O₂. Der Stimulationseffekt wird dabei über die ROS-Zunahme vermittelt, so konnte durch Stimulation der Osteoblasten mit 0,001 % H₂O₂, während Reifung, ebenfalls eine Zunahme der AP-Aktivität und Matrixmineralisierung beobachtet werden. Eine Hemmung des ROS-Anstiegs hemmte den stimulierenden Effekt. Die induzierten ROS konnten als O₂⁻ und H₂O₂ identifiziert werden [164].

In zahlreichen anderen Arbeiten wurde die ROS-Bildung durch EMF-Stimulation in verschiedenen Geweben untersucht (siehe Übersichtsarbeit [98]). Die meisten Studien berichten von einer Zunahme des ROS-Levels unter PEMF-Stimulation, jedoch gibt es auch Studien die eine Abnahme oder keine Änderung beschreiben. Die genauen Effekte von ELF-EMFs auf das intrazelluläre ROS-Level sind –ähnlich wie *in vivo* und *in vitro*- von verschiedenen Parametern abhängig, u.a. der MF-Intensität, Frequenz, Expositionsdauer, Zelllinien, Gewebe oder Tiermodellen. Dabei werden die ROS-Änderungen sehr schnell induziert, innerhalb weniger Minuten, sodass für den Versuchsaufbau auch der Messzeitpunkt entscheidend ist. Es bestehen Fenster-Effekte, so treten manche Effekte nur bei bestimmter EMF-Intensität oder in bestimmten Geweben auf und die Menge der gebildeten ROS ist unter anderem abhängig von der Expositi-

4. Diskussion

onsdauer. Für den Versuchsaufbau ist der Messzeitpunkt entscheidend, da sich die ROS-Level nach Befeldung verändern [98].

4.3.3. Wie wirkt sich das intrazelluläre ROS auf die Zelle aus?

Die Verbesserung der osteogenen Differenzierung durch ROS in Osteoblasten klingt angesichts bekannten Wissens zuerst widersprüchlich. Die Zugabe einer geringen H_2O_2 -Menge im nicht-toxischen Bereich führt zu einer Hemmung der Differenzierung von MSCs [190, 226]. Gleichzeitig sind ROS für die Differenzierung möglicherweise essentiell. So beobachteten Arakaki *et al.* in MC3T3-E1 Zellen eine Hemmung der Mineralisierung bei Hemmung der ROS-Produktion mittels Zugabe von NAC (N-acetyl Cystein) [206]. Dies obwohl eine Zugabe von H_2O_2 die Differenzierung von MC3T3-E1 Zellen hemmt. In MC3T3-E1 Zellen konnten Fatokun *et al.* und Chaves Neto *et al.* eine Hemmung der Differenzierung durch H_2O_2 beobachten, wobei der hemmende Effekt bei differenzierten Zellen stärker ausfiel [191, 227].

ROS spielen eine regulatorische Rolle in dem Gleichgewicht aus Knochenaufbau und -abbau (Knochenhomöostase) bzw. dem Gleichgewicht aus Osteoblasten- und Osteoklastenfunktion. Osteoklasten produzieren während des Knochenabbaus ROS, welche das kalzifizierte Gewebe zerstört [95]. ROS kann auch z.B. bei Mikrofrakturen oder hormonellen Signalen, durch Induktion der Apoptose von Osteozyten zustande kommen. Oxidativer Stress führt zu einer Aktivierung der Differenzierung von Präosteoklasten und blockiert die Aktivität und Differenzierung von Osteoblasten. Antioxidantien hingegen unterstützen die Differenzierung von Osteoblasten und erhalten die Funktion der Osteozyten, während die Osteoklastendifferenzierung und Aktivität gehemmt wird. Dies erfolgt über die Regulation des Gleichgewichts von RANKL (Ligand des Rezeptoraktivators von NF- κ B) und Osteoprotegerin (OPG). OPG ist ein löslicher Rezeptor und fähig RANKL zu binden und zu blockieren, dadurch erfolgt eine Inhibition der Osteoklastenaktivität. Oxidativer Stress blockiert die Aktivierung von Osteoblasten und damit die Produktion von OPG. In diesem Zustand bleibt die Funktion von RANKL in Osteoklasten erhalten und die Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten wird induziert. OPG wird in Osteoblasten über eine

4. Diskussion

Aktivierung des Wnt/beta-Catenin Signalpfades produziert (siehe Übersichtsarbeit [92]).

Jones und Sies unterteilten die wichtigsten Funktionen des Redox-Signalings in 4 Prinzipien des „Redox Codes“ wonach biologische Systeme organisiert sind [228]:

1. Organisation von Metabolismus (Anabolismus und Katabolismus) und Energiehaushalt durch Kontrolle der Reduktion von NAD^+ und NADP^+
2. Durch schwefelhaltige „Schalter“ in Proteinen werden die Tertiärstruktur und damit die Aktivität von Proteinen reguliert. Der Status dieser „Schalter“ ist von der Reaktionskinetik abhängig z.B. von dem Gleichgewicht bestimmter Redoxpaare.
3. Lebenszyklen und Differenzierung in Organismen wird durch wellenförmige ROS-Produktion (insbesondere H_2O_2) begleitet. Durch diese Aktivierungs-/Deaktivierungszyklen des H_2O_2 -Metabolismus werden komplexe zeitabhängige Prozesse des Lebenszyklus in Zellen oder Organismen gesteuert.
4. Die Redox-Netzwerke in den Zellen stehen untereinander in Verbindung. Dadurch entsteht ein adaptives System welches auf Umweltveränderungen bis in das kleinste Zellkompartiment reagieren kann.

Insbesondere das 3. und 4. Prinzip bieten eine mögliche Erklärung wie sich ROS in begrenzter und kontrollierter Menge intrazellulär auswirkt.

Eine mögliche andere Erklärung wurde von Ehnert *et al.* vorgeschlagen: Die Induktion einer Adaptationsreaktion durch eine Noxe in geringer Dosis, welche zu einem Schutz gegen die Exposition in höheren Dosen führt, erklärt das Konzept der „adaptiven Homöostase“ [95].

Diese Phänomene bietet auch eine mögliche Erklärung für die Unterschiede wie die R- und die NR-Gruppe auf die PEMF-Stimulation reagieren. Eine mögliche Erklärung sind Unterschiede in Redox-Status und Stoffwechselaktivität. Mögliche Gründe hierfür könnten z.B. Unterschiede im Differenzierungsstadium oder Alter und Nebenerkrankungen sein (wie in 4.2.4.2. diskutiert). Entsprechend wirken sich Änderungen der Redox-Homöostase auch unterschiedlich auf die

4. Diskussion

jeweilige aktuelle Zellfunktion aus. Ein spezifischer Unterschied in Stoffwechselwegen oder eine Induktion eines bestimmten Gens ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht finden. Insgesamt gab es viele kleinere Unterschiede bzw. große deutliche Unterschiede zeigten sich spenderabhängig.

Eine Lücke besteht in der Frage, wodurch der ROS-Anstieg entsteht. Eine ROS-Produktion durch die NADPH-Oxidase konnte in den phOB nicht gezeigt werden. Andere mögliche Quellen wären z.B. Änderungen in der Glykolyse und des Citratzyklus wie sie Storch *et al.* in Krebszellen beobachten konnten [229]. Zudem sind andere Wege beschrieben wie mittels EMF-Stimulation eine ähnliche Reaktion in Zellen vermittelt werden konnte. Die zellvermittelten Effekte zeigten sich abhängig von verschiedenen technischen und biologischen Parametern, sodass nur mit Einschränkung auf das hier genutzte PEMF geschlossen werden kann [42].

Eine andere mögliche Erklärung bieten EMF-sensible DNA-Abschnitte. Dies konnte für einen Abschnitt in der Promoterregion von HSP70 gezeigt werden. Für ein 60 Hz 8 mT EMF konnte die Induktion der Expression des Stressgens HSP70 analog zu einem Temperaturanstieg beobachtet werden, obwohl dies aufgrund der Unterschiede der übertragenen Energie so nicht zu erwarten wäre. Durch Transfer der Promoterregion in andere Genloki konnten auch andere Proteine EMF-abhängig exprimiert werden. Die initiierte Stressantwort ging mit der Aktivierung spezifischer Signaltransduktionskaskaden (z.B. MAPK) einher. Der Promotergenabschnitt wirkte dabei als Antenne und konnte durch ein bestimmtes spezifisches EMF aktiviert werden und so die Expression des folgenden Genabschnitts induzieren [83].

4.4. Wie sinnvoll ist die hier genutzte Einteilung nach Zunahme der Reifungsmarker?

4.4.1. Einteilung nach Ansprechen in den Zellkulturexperimenten

Die Einteilung nach Ansprechen erfolgte wie in den Vorarbeiten von Ehnert *et al.* beschrieben [51]. Beurteilt wurden die Resazurinkonversion und die AP-Aktivität als osteoblastäre Marker der Reifung. Hier besteht jedoch eine metho-

4. Diskussion

disch bedingte Einschränkung der Vergleichbarkeit. In Vorarbeiten wurde die Summe aus drei Zeitpunkten, Tag 2, 4 und 7 gebildet, in der vorliegenden Arbeit wurde die Summe aus Tag 4 und 7 gebildet (bei den Spendern für die Enzymmessungen). Die Trennung in NR- und R-Gruppe wurde, wie für die Spender der qRT-PCR-Messung, bei einem Grenzwert von 64 % (summiertem Ansprechen) vorgenommen.

Messung des Resazurinumsatzes

Der Hauptteil der Resazurin-Reduktion erfolgt in der Atmungskette, wo das Resazurin als intermediärer Elektronenakzeptor wirkt [230]. Daneben besitzen noch andere Enzyme in Zytoplasma und Mitochondrium die Fähigkeit zu Reduktion von Resazurin [231]. Entsprechend kann eine Erhöhung des Resazurinumsatzes durch eine Zunahme der mitochondrialen Aktivität, einer Zunahme der metabolischen Aktivität und durch eine Proliferation der Osteoblasten erklärt werden.

In den hier genutzten Osteoblastenkulturen muss am ehesten von einer Kombination aus allen drei Effekten ausgegangen werden.

Durch die hohe Proteinsyntheserate bei der Bildung der EZM muss von einer Zunahme des Metabolismus und der mitochondrialen Aktivität ausgegangen werden. In hMSCs ließ sich analog eine Zunahme der mitochondrialen Aktivität [190] und Vergrößerung des Mitochondriums [207] während Expression osteogener Reifungsmarker beobachten. Proliferation findet insbesondere während der initialen Phase der Osteoblastenreifung statt. Zu Beginn zeigt sich auch der stärkste Anstieg der Resazurinkonversion in beiden Gruppen, bei einer Zunahme der Menge der Gesamtproteine (gemessen mit Sulforhodhamin-Färbung) und noch geringer Matrixbildung [51].

Messung der AP-Aktivität

Durch Quantifizierung der AP-Aktivität wird auf das Reifungsstadium der Osteoblasten zurückgeschlossen. In den ersten beiden Reifestadien (Proliferation und Matrixreifung) korrelieren ein Anstieg der AP-Aktivität mit zunehmender

4. Diskussion

Differenzierung und ein Abfall der AP-Aktivität mit einem Übergang in das letzte Stadium (Mineralisierung mit Apoptose) [49].

In der NR-Gruppe zeigte sich eine signifikante Zunahme der AP-Aktivität während der ersten sieben Tage Reifung ohne PEMF-Stimulation. Bei PEMF-Stimulation fiel der Anstieg größer und signifikanter aus. In der R-Gruppe zeigte sich eine Zunahme der AP-Aktivität im Trend, in der PEMF-stimulierten Gruppe fiel der Anstieg etwas größer aus, jedoch ebenfalls nicht signifikant.

Eine mögliche Erklärung für den großen Anstieg in der NR-Gruppe ist ein Übergang von der Proliferations- in die Matrixreifungsphase, mit geringem positivem Effekt durch die PEMF-Stimulation. In der R-Gruppe hingegen zeigt sich am ehesten eine sehr langsame Reifung in der die Osteoblasten durchgehend in der Proliferationsphase sind.

Im Wesentlichen zeigen sich diese Beobachtungen auch in den Vorarbeiten von Ehnert *et al.*, wobei jedoch eine deutlich stärkere Zunahme der AP-Aktivität und auch Resazurinkonversion in der R-Gruppe beobachtet werden konnte.

4.4.1.1. Zeigt sich dieser Non-Responder und Responder Effekt auch bei der Matrixmineralisierung?

In beiden Gruppen zeigte sich keine signifikante Zunahme der Mineralisierung von Tag 14 zu Tag 21 hin. Zwischen befeldeten und unbefeldeten Proben zeigte sich auch kein signifikanter Unterschied. In beiden Gruppen ist die Menge mineralisierter Matrix in einem sehr niedrigen Bereich, es bestehen jedoch zwischen den Spendern große Unterschiede, jedoch unabhängig von der Einteilung in R- und NR-Gruppe.

Mögliche Fehlerquellen bei der Mineralisierungsquantifizierung mittels Alizarinrot-Färbung sind unvorsichtiges Waschen welches zu einem Ablösen von mineralisierter Matrix führen könnte und Apoptose. Es wird extrazelluläres Calcium angefärbt, dies wird auch bei Apoptose von Osteoblasten frei.

Wie lässt sich der große Unterschied in der Mineralisierungsbildung zwischen verschiedenen Spendern beurteilen?

4. Diskussion

Spenderabhängige Unterschiede in der Mineralisierungsfähigkeit konnten auch von anderen Autoren beobachtet werden. Z.B. beobachtete Poh *et al.* bei EMF stimulierten hAMSCs (hMSCs aus Fettgewebe gewonnen) ebenfalls große Unterschiede in der Fähigkeit zur Matrixmineralisierung, während der osteogenen Differenzierung [54]. Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte das für phOB beobachtet werden. Ehnert *et al.* beobachtete eine deutlich stärkere Mineralisierung (als in der vorliegenden Arbeit gemessen) bei ebenfalls sehr großen Spenderunterschieden, was zu der initialen Unterteilung in Non-Responder und Responder führte [51].

Eine mögliche Erklärung hierzu findet sich in der Abhängigkeit der Mineralisierung vom Gesundheitszustand, Alter, Geschlecht und Rasse der Spender (siehe 4.2.4.2. Wie lassen sich diese Spenderunterschiede einordnen?). In Zellkulturen zeigten ältere Spender (> 65 a) eine sehr viel spätere Knochenbildung (ab Tag 29) im Vergleich zu jungen Spendern (< 40 a) (ab Tag 14) [219]. Möglicherweise sind also die Messpunkte an Tag 14 und Tag 21, für einen aussagekräftigen Vergleich, zu früh angesetzt.

4.4.1.2. Fazit: wie sinnvoll ist die hier genutzte Unterteilung nach Zunahme der Reifungsmarker?

Die Einteilung in eine NR- und R-Gruppe entstammt den Vorarbeiten von Ehnert *et al.* [51]. Hier ließ sich ein deutlicher Unterschied in der Reaktion auf die PEMF-Stimulation beobachten. In der vorliegenden Arbeit ließ sich diese Unterteilung in diese zwei Gruppen nicht bestätigen. Vielmehr erscheinen die Spender einem Spektrum zu entsprechen, welches sich nicht nach den Kriterien AP-Aktivität, Resazurinumsatz und Mineralisierung einteilen lässt.

Eine mögliche Erklärung hierfür findet sich in der Beobachtung der unterschiedlichen Genexpression in der qRT-PCR. Die NR-Gruppe weist sehr viel größere Änderungen auf. Eine mögliche Erklärung hierfür ist ein anderes Differenzierungsstadium oder eine andere Stoffwechselaktivität bedingt durch nicht beachtete Cofounder (siehe 4.2.4.2. [219]). Z.B. konnte Diniz *et al.* bei der Stimulation von MC3T3-E1 Zellen mit einem 15 Hz PEMF, eine Zunahme unterschiedlicher Parameter (entweder Proliferation, Differenzierung oder Mineralisierung) abhängig vom Reifungsstadium beobachten [71].

4. Diskussion

4.4.2. Weiteres: ROS Quantifizierung mittels DCFH-DA Messung

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied bei den intrazellulären ROS, gemessen mittels DCFH-DA Assay, an Tag 4 und Tag 7 gezeigt werden. In Vorarbeiten von Ehnert *et al.* konnten hingegen signifikante Unterschiede zwischen befeldeten und unbefeldeten Proben an Tag 0 und Tag 2 gemessen werden. Ab Tag 6 konnte zudem eine signifikant geringere ROS-Menge in den befeldeten Proben intrazellulär gemessen werden [164]. Dieser Verlauf konnte in der vorliegenden Arbeit so nicht beobachtet werden.

Eine mögliche Erklärung hierzu findet sich in der Methodik. Bei Ehnert *et al.* wurde das intrazelluläre ROS auf die gesamte Proteinmenge normalisiert (mittels SRB-Färbung gemessen), welche unter PEMF-Stimulation zunahm. Zudem wurden in den Vorarbeiten mehr Spender gemessen [51]. Eine Trennung nach NR- und R-Gruppe zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen befeldeten und unbefeldeten Spendern.

4.5. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten viele Fragen lediglich ‚angerissen‘ werden. In mancher Hinsicht war dies durch die methodischen Limitierungen bedingt. Offene Fragen die in Folgearbeiten untersucht werden könnten, sind u.a.:

-eine genauere Untersuchung der Mechanismen auf Ebene der Genexpression während des Reifungsprozesses in phOB (insbesondere die Rolle von *SOD2*, *GPX3* und *CAT*). Die meisten Versuche hierzu entstammen murinen Zellen oder MSCs.

-unklar ist aktuell noch wie der ROS-Anstieg intrazellulär durch die PEMF-Stimulation induziert wird.

-eine Identifizierung von Cofoundern welche die Reifung von Osteoblasten und die PEMF-Stimulation beeinflussen. Ziel hiervon wäre eine Vorselektion möglicher Patienten und Optimierung der EMF-Parameter und des Stimulationsverfahrens auf diese Gruppe.

-da für die PEMF-Stimulation am Knochen keine Nebenwirkungen beschrieben sind und das Stimulationsverfahren als Therapieoption zugelassen ist, konnte in

4. Diskussion

Folge eine klinische Studie durchgeführt werden: die Publikation hierzu steht zum Zeitpunkt des Einreichens dieser Arbeit aus. Zusammenfassend wurde die hier ebenfalls verwendete PEMF-Stimulation an hohen tibialen Osteotomien untersucht. Hier zeigte sich ein signifikant schnelleres radiologisches Zusammenwachsen der Osteotomie. Der Effekt zeigte sich unabhängig von dem Geschlecht oder BMI, zeigte sich aber in älteren Patienten deutlicher ausgeprägter.

5. Zusammenfassung

5. Zusammenfassung

Im Rahmen des demografischen Wandels steht unsere Gesellschaft zunehmend vor den Herausforderungen medizinischer Bedürfnisse älterer Patienten, z.B. der Frakturversorgung bei Multimorbidität und Osteoporose. Nicht invasive Stimulatoren des Knochenwachstums, insbesondere die EMF-Stimulation, bieten hierbei Hoffnung, jedoch ist die Studienlage widersprüchlich. In Vorarbeiten von Ehnert *et al.* wurde ein spezifisches PEMF in Zellkulturexperimenten (phOB) ausgewählt. Anhand des Ansprechens erfolgte eine Einteilung der Spender von phOB in Non-Responder (NR) und Responder (R) [51]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Stimulationseffekt auf die Genexpression verschiedener mit oxidativem Stress assoziierter Gene untersucht und beide Gruppen miteinander verglichen. Initial erfolgte mittels qRT-PCR, an gepoolten Spendern beider Gruppen, ein Screening zur Identifikation möglicher Kandidatengene. Diese Gene (*GSR*, *UCP2*, *NOX4*, *CCL5*, *GPX1*, *GPX3*, *CAT* und *SOD2*) wurden in Folge mittels RT-PCR und Enzymassays weiter untersucht. Die größte Zunahme während Reifung zeigten *GPX3* und *CAT* in beiden Gruppen sowie *CCL5* und *SOD2* in der R-Gruppe. Die *GPX3* und *CAT* Zunahme ließ sich im Trend in der RT-PCR bestätigen, eine Änderung der *CCL5* und *SOD2* ließ sich nicht bestätigen. Die größte Änderung durch PEMF-Stimulation zeigten *SOD2* und *CCL5* in der R-Gruppe in der qRT-PCR, dies ließ sich in der RT-PCR nicht weiter bestätigen. Auf Enzymebene ließen sich, v.a. methodisch bedingt, diese Effekte nicht bestätigen. Zusammenfassend ließ sich eine Unterteilung in eine NR- und R-Gruppe, wie vorbeschrieben, in der RT-PCR und in weiteren Zellkulturexperimenten nicht sicher zeigen. Die größten Änderungen durch PEMF Stimulation zeigten sich bei *CAT* und *GPX3* in beiden Gruppen. Eine ROS-Induktion durch PEMF konnte hier nicht gezeigt werden. Die Änderungen auf transkriptionsebene und Enzymebene, sowie ein möglicher Übertragungsweg über Redoxgesteuerte Prozesse konnten in der vorliegenden Arbeit nicht genauer eingeordnet werden. Insbesondere eine Trennung nach NR- und R-Gruppe ist möglicherweise besser durch Cofounder wie z.B. Alter oder Nebenerkrankungen erklärt.

5. Zusammenfassung

Tübingen den 02.10.2019

Johannes Birk

6. Literaturverzeichnis

6. Literaturverzeichnis

1. Schürer, C., et al., *Fracture risk and risk factors for osteoporosis—results from two representative population-based studies in North East Germany (Study of Health in Pomerania: SHIP-2 und SHIP-Trend)*. Dtsch Arztebl Int 2015, 2015. **112**.
2. Hernlund, E., et al., *Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA)*. Arch Osteoporos, 2013. **8**: p. 136.
3. World Health Organization (WHO), v.E., *WHO Global Report on Falls Prevention in Older Age*. 2007, Geneva: World Health Organization.
4. Mills, L.A. and A.H. Simpson, *The relative incidence of fracture non-union in the Scottish population (5.17 million): a 5-year epidemiological study*. BMJ Open, 2013. **3**(2).
5. Tzioupis, C. and P.V. Giannoudis, *Prevalence of long-bone non-unions*. Injury, 2007. **38 Suppl 2**: p. S3-9.
6. Hak, D.J., et al., *Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects*. Injury, 2014. **45 Suppl 2**: p. S3-7.
7. Leibson, C.L., et al., *Mortality, disability, and nursing home use for persons with and without hip fracture: a population-based study*. J Am Geriatr Soc, 2002. **50**(10): p. 1644-50.
8. Markov, M.S., *Pulsed electromagnetic field therapy history, state of the art and future*. Environmentalist, 2007. **27**.
9. Basford, J.R., *A historical perspective of the popular use of electric and magnetic therapy*. Arch Phys Med Rehabil, 2001. **82**(9): p. 1261-9.
10. Peterson, F. and A.E. Kennelly, *Physiological experiments with magnets at the Edison laboratory*. N Y Med J, 1892(56): p. 729-32.
11. Victoria, G., et al., *Bone stimulation for fracture healing: What's all the fuss?* Indian J Orthop, 2009. **43**(2): p. 117-20.
12. Funk, R.H., T. Monsees, and N. Ozkucur, *Electromagnetic effects - From cell biology to medicine*. Prog Histochem Cytochem, 2009. **43**(4): p. 177-264.
13. World Health Organization (WHO), v.E. *Environmental Health Criteria Monograph No.238 Extremely Low Frequency Fields* Environmental Health Criteria Monograph 2016 04. August 2016 06.02.2019]; Available from: https://www.who.int/peh-emf/publications/elf_ehc/en/.
14. Shore, R.E., *Electromagnetic radiations and cancer. Cause and prevention*. Cancer, 1988. **62**(8 Suppl): p. 1747-54.
15. Rohde, C.H., et al., *Pulsed Electromagnetic Fields Reduce Postoperative Interleukin-1beta, Pain, and Inflammation: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study in TRAM Flap Breast Reconstruction Patients*. Plast Reconstr Surg, 2015. **135**(5): p. 808e-817e.
16. Sorrell, R.G., et al., *Evaluation of pulsed electromagnetic field therapy for the treatment of chronic postoperative pain following lumbar surgery: a pilot, double-blind, randomized, sham-controlled clinical trial*. J Pain Res, 2018. **11**: p. 1209-1222.
17. Tamrin, S.H., et al., *Electromagnetic Fields and Stem Cell Fate: When Physics Meets Biology*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2016. **171**: p. 63-97.
18. Vadala, M., et al., *Mechanisms and therapeutic applications of electromagnetic therapy in Parkinson's disease*. Behav Brain Funct, 2015. **11**: p. 26.

6. Literaturverzeichnis

19. Ross, C.L., et al., *The regenerative effects of electromagnetic field on spinal cord injury*. Electromagn Biol Med, 2017. **36**(1): p. 74-87.
20. Mehta, M., et al., *Critical review of the addition of tumor treating fields (TTFields) to the existing standard of care for newly diagnosed glioblastoma patients*. Crit Rev Oncol Hematol, 2017. **111**: p. 60-65.
21. Vadala, M., et al., *Mechanisms and therapeutic effectiveness of pulsed electromagnetic field therapy in oncology*. Cancer Med, 2016. **5**(11): p. 3128-3139.
22. Guerriero, F. and G. Ricevuti, *Extremely low frequency electromagnetic fields stimulation modulates autoimmunity and immune responses: a possible immunomodulatory therapeutic effect in neurodegenerative diseases*. Neural Regen Res, 2016. **11**(12): p. 1888-1895.
23. Tyler, S.E.B., *Nature's Electric Potential: A Systematic Review of the Role of Bioelectricity in Wound Healing and Regenerative Processes in Animals, Humans, and Plants*. Front Physiol, 2017. **8**: p. 627.
24. Redeker, J.I., et al., *Effect of electromagnetic fields on human osteoarthritic and non-osteoarthritic chondrocytes*. BMC Complement Altern Med, 2017. **17**(1): p. 402.
25. Gobbi, A., et al., *Symptomatic Early Osteoarthritis of the Knee Treated With Pulsed Electromagnetic Fields: Two-Year Follow-up*. Cartilage, 2014. **5**(2): p. 78-85.
26. Kuzyk, P.R. and E.H. Schemitsch, *The science of electrical stimulation therapy for fracture healing*. Indian J Orthop, 2009. **43**(2): p. 127-31.
27. Behrens, S.B., Deren, M. E., & Monchik, K. O., *A review of bone growth stimulation for fracture treatment*. Current Orthopaedic Practice, 2013. **24**(1): p. 8.
28. Griffin, M. and A. Bayat, *Electrical stimulation in bone healing: critical analysis by evaluating levels of evidence*. Eplasty, 2011. **11**: p. e34.
29. Hiemer, B., et al., *Magnetically induced electrostimulation of human osteoblasts results in enhanced cell viability and osteogenic differentiation*. Int J Mol Med, 2016. **38**(1): p. 57-64.
30. Aaron, R.K., D.M. Ciombor, and B.J. Simon, *Treatment of nonunions with electric and electromagnetic fields*. Clin Orthop Relat Res, 2004(419): p. 21-9.
31. Zhu, S., et al., *Effects of pulsed electromagnetic fields on postmenopausal osteoporosis*. Bioelectromagnetics, 2017. **38**(6): p. 406-424.
32. van der Jagt, O.P., et al., *Electromagnetic fields do not affect bone micro-architecture in osteoporotic rats*. Bone Joint Res, 2014. **3**(7): p. 230-5.
33. Lei, T., et al., *Effects of four kinds of electromagnetic fields (EMF) with different frequency spectrum bands on ovariectomized osteoporosis in mice*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 553.
34. Jing, D., et al., *Circadian rhythm affects the preventive role of pulsed electromagnetic fields on ovariectomy-induced osteoporosis in rats*. Bone, 2010. **46**(2): p. 487-95.
35. Liu, H.F., et al., *Pulsed electromagnetic fields on postmenopausal osteoporosis in Southwest China: a randomized, active-controlled clinical trial*. Bioelectromagnetics, 2013. **34**(4): p. 323-32.
36. Tabrah, F.L., et al., *Clinical report on long-term bone density after short-term EMF application*. Bioelectromagnetics, 1998. **19**(2): p. 75-8.
37. Yuan, J., F. Xin, and W. Jiang, *Underlying Signaling Pathways and Therapeutic Applications of Pulsed Electromagnetic Fields in Bone Repair*. Cell Physiol Biochem, 2018. **46**(4): p. 1581-1594.

6. Literaturverzeichnis

38. Al-Jabri, T., et al., *The role of electrical stimulation in the management of avascular necrosis of the femoral head in adults: a systematic review*. BMC Musculoskelet Disord, 2017. **18**(1): p. 319.
39. Daish, C., et al., *The Application of Pulsed Electromagnetic Fields (PEMFs) for Bone Fracture Repair: Past and Perspective Findings*. Ann Biomed Eng, 2018. **46**(4): p. 525-542.
40. Aleem, I.S., et al., *Efficacy of Electrical Stimulators for Bone Healing: A Meta-Analysis of Randomized Sham-Controlled Trials*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 31724.
41. Griffin, X.L., et al., *Electromagnetic field stimulation for treating delayed union or non-union of long bone fractures in adults*. Cochrane Database Syst Rev, 2011(4): p. CD008471.
42. Chalidis, B., et al., *Stimulation of bone formation and fracture healing with pulsed electromagnetic fields: biologic responses and clinical implications*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2011. **24**(1 Suppl 2): p. 17-20.
43. Hannemann, P.F., et al., *The effects of low-intensity pulsed ultrasound and pulsed electromagnetic fields bone growth stimulation in acute fractures: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. Arch Orthop Trauma Surg, 2014. **134**(8): p. 1093-106.
44. Dhawan, S.K., et al., *The effect of pulsed electromagnetic fields on hindfoot arthrodesis: a prospective study*. J Foot Ankle Surg, 2004. **43**(2): p. 93-6.
45. Jing, D., et al., *Pulsed electromagnetic fields promote osteogenesis and osseointegration of porous titanium implants in bone defect repair through a Wnt/beta-catenin signaling-associated mechanism*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 32045.
46. Waldorff, E.I., N. Zhang, and J.T. Ryaby, *Pulsed electromagnetic field applications: A corporate perspective*. J Orthop Translat, 2017. **9**: p. 60-68.
47. Park, P., et al., *Electrical stimulation to enhance spinal fusion: a systematic review*. Evid Based Spine Care J, 2014. **5**(2): p. 87-94.
48. Rutkovskiy, A., K.O. Stenslokken, and I.J. Vaage, *Osteoblast Differentiation at a Glance*. Med Sci Monit Basic Res, 2016. **22**: p. 95-106.
49. Lian, J.B. and G.S. Stein, *Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation*. Iowa Orthop J, 1995. **15**: p. 118-40.
50. Wang, R., et al., *Effects of electromagnetic fields on osteoporosis: A systematic literature review*. Electromagn Biol Med, 2016. **35**(4): p. 384-90.
51. Ehnert, S., et al., *Primary human osteoblasts with reduced alkaline phosphatase and matrix mineralization baseline capacity are responsive to extremely low frequency pulsed electromagnetic field exposure — Clinical implication possible*. Bone Reports, 2015. **3**: p. 48-56.
52. Ross, C.L., et al., *The effect of low-frequency electromagnetic field on human bone marrow stem/progenitor cell differentiation*. Stem Cell Res, 2015. **15**(1): p. 96-108.
53. Zhang, Y., et al., *Mechanisms underlying the osteo- and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells*. ScientificWorldJournal, 2012. **2012**: p. 793823.
54. Poh, P.S.P., et al., *Osteogenic Effect and Cell Signaling Activation of Extremely Low-Frequency Pulsed Electromagnetic Fields in Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells*. Stem Cells Int, 2018. **2018**: p. 5402853.
55. Yang, Y., et al., *EMF acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes*. Bioelectromagnetics, 2010. **31**(4): p. 277-85.

6. Literaturverzeichnis

56. Roodman, G.D., *Advances in bone biology: the osteoclast*. Endocr Rev, 1996. **17**(4): p. 308-32.
57. Chang, K., et al., *Pulsed electromagnetic fields stimulation affects osteoclast formation by modulation of osteoprotegerin, RANK ligand and macrophage colony-stimulating factor*. J Orthop Res, 2005. **23**(6): p. 1308-14.
58. Chang, K., et al., *Pulsed electromagnetic fields accelerate apoptotic rate in osteoclasts*. Connect Tissue Res, 2006. **47**(4): p. 222-8.
59. Chang, K., et al., *Pulsed electromagnetic field stimulation of bone marrow cells derived from ovariectomized rats affects osteoclast formation and local factor production*. Bioelectromagnetics, 2004. **25**(2): p. 134-41.
60. Pi, Y., et al., *Lowfrequency pulsed electromagnetic field inhibits RANKLinduced osteoclastic differentiation in RAW264.7 cells by scavenging reactive oxygen species*. Mol Med Rep, 2019. **19**(5): p. 4129-4136.
61. Cook, J.J., N.J. Summers, and E.A. Cook, *Healing in the new millennium: bone stimulators: an overview of where we've been and where we may be heading*. Clin Podiatr Med Surg, 2015. **32**(1): p. 45-59.
62. Zhang, X., et al., *Effects of different extremely low-frequency electromagnetic fields on osteoblasts*. Electromagn Biol Med, 2007. **26**(3): p. 167-77.
63. Mayer-Wagner, S., et al., *Effects of low frequency electromagnetic fields on the chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. Bioelectromagnetics, 2011. **32**(4): p. 283-90.
64. Matsunaga, S., T. Sakou, and K. Ijiri, *Osteogenesis by pulsing electromagnetic fields (PEMFs): optimum stimulation setting*. In Vivo, 1996. **10**(3): p. 351-6.
65. Tsai, M.T., et al., *Pulsed electromagnetic fields affect osteoblast proliferation and differentiation in bone tissue engineering*. Bioelectromagnetics, 2007. **28**(7): p. 519-28.
66. Sul, A.R., S.N. Park, and H. Suh, *Effects of sinusoidal electromagnetic field on structure and function of different kinds of cell lines*. Yonsei Med J, 2006. **47**(6): p. 852-61.
67. Aaron, R.K., et al., *Power frequency fields promote cell differentiation coincident with an increase in transforming growth factor-beta(1) expression*. Bioelectromagnetics, 1999. **20**(7): p. 453-8.
68. Fitzsimmons, R.J., et al., *Frequency dependence of increased cell proliferation, in vitro, in exposures to a low-amplitude, low-frequency electric field: evidence for dependence on increased mitogen activity released into culture medium*. J Cell Physiol, 1989. **139**(3): p. 586-91.
69. Sollazzo, V., et al., *Responses of human MG-63 osteosarcoma cell line and human osteoblast-like cells to pulsed electromagnetic fields*. Bioelectromagnetics, 1997. **18**(8): p. 541-7.
70. Ivancsits, S., et al., *Cell type-specific genotoxic effects of intermittent extremely low-frequency electromagnetic fields*. Mutat Res, 2005. **583**(2): p. 184-8.
71. Diniz, P., et al., *Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts*. Bioelectromagnetics, 2002. **23**(5): p. 398-405.
72. Markov, M.S., *Magnetic field therapy: a review*. Electromagn Biol Med, 2007. **26**(1): p. 1-23.
73. Hannouche, D., H. Petite, and L. Sedel, *Current trends in the enhancement of fracture healing*. J Bone Joint Surg Br, 2001. **83**(2): p. 157-64.
74. Nuccitelli, R., *A role for endogenous electric fields in wound healing*. Curr Top Dev Biol, 2003. **58**: p. 1-26.

6. Literaturverzeichnis

75. Funk, R.H., *Coupling of pulsed electromagnetic fields (PEMF) therapy to molecular grounds of the cell*. Am J Transl Res, 2018. **10**(5): p. 1260-1272.
76. Eiichi Fukada, I.Y., *On the Piezoelectric Effect of Bone*. Journal of the Physical Society of Japan, 1957. **12**(No. 10): p. 5.
77. Marino, A.A., R.O. Becker, and S.C. Soderholm, *Origin of the piezoelectric effect in bone*. Calcif Tissue Res, 1971. **8**(2): p. 177-80.
78. Buza, J.A., 3rd and T. Einhorn, *Bone healing in 2016*. Clin Cases Miner Bone Metab, 2016. **13**(2): p. 101-105.
79. Rubinacci, A., et al., *Changes in bioelectric potentials on bone associated with direct current stimulation of osteogenesis*. J Orthop Res, 1988. **6**(3): p. 335-45.
80. Otter, M., S. Goheen, and W.S. Williams, *Streaming potentials in chemically modified bone*. J Orthop Res, 1988. **6**(3): p. 346-59.
81. Wolf, J.H., [*Julius Wolff and his "law of bone remodeling"*]. Orthopade, 1995. **24**(5): p. 378-86.
82. Morey, E.R. and D.J. Baylink, *Inhibition of bone formation during space flight*. Science, 1978. **201**(4361): p. 1138-41.
83. Blank, M. and R. Goodman, *Electromagnetic fields stress living cells*. Pathophysiology, 2009. **16**(2-3): p. 71-8.
84. Friedman, J., et al., *Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies*. Biochem J, 2007. **405**(3): p. 559-68.
85. Simko, M., *Cell type specific redox status is responsible for diverse electromagnetic field effects*. Curr Med Chem, 2007. **14**(10): p. 1141-52.
86. Cifra, M., J.Z. Fields, and A. Farhadi, *Electromagnetic cellular interactions*. Prog Biophys Mol Biol, 2011. **105**(3): p. 223-46.
87. Birben, E., et al., *Oxidative stress and antioxidant defense*. World Allergy Organ J, 2012. **5**(1): p. 9-19.
88. Symons, M.C., *Radicals generated by bone cutting and fracture*. Free Radic Biol Med, 1996. **20**(6): p. 831-5.
89. Kuyumcu, F. and A. Aycan, *Evaluation of Oxidative Stress Levels and Antioxidant Enzyme Activities in Burst Fractures*. Med Sci Monit, 2018. **24**: p. 225-234.
90. Prasad, G., et al., *Evaluation of oxidative stress after fractures. A preliminary study*. Acta Orthop Belg, 2003. **69**(6): p. 546-51.
91. Manolagas, S.C., *From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis*. Endocr Rev, 2010. **31**(3): p. 266-300.
92. Domazetovic, V., et al., *Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants*. Clin Cases Miner Bone Metab, 2017. **14**(2): p. 209-216.
93. Sies, H., C. Berndt, and D.P. Jones, *Oxidative Stress*. Annu Rev Biochem, 2017. **86**: p. 715-748.
94. Valko, M., et al., *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chem Biol Interact, 2006. **160**(1): p. 1-40.
95. Davies, J.M.S., et al., *The Oxygen Paradox, the French Paradox, and age-related diseases*. Geroscience, 2017. **39**(5-6): p. 499-550.
96. Sies, H., *Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine*. Redox Biol, 2015. **4**: p. 180-3.
97. Schieber, M. and N.S. Chandel, *ROS function in redox signaling and oxidative stress*. Curr Biol, 2014. **24**(10): p. R453-62.

6. Literaturverzeichnis

98. Wang, H. and X. Zhang, *Magnetic Fields and Reactive Oxygen Species*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(10).
99. Scandalios, J.G., *Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses*. Braz J Med Biol Res, 2005. **38**(7): p. 995-1014.
100. Devasagayam, T.P. and J.P. Kamat, *Biological significance of singlet oxygen*. Indian J Exp Biol, 2002. **40**(6): p. 680-92.
101. Reczek, C.R. and N.S. Chandel, *ROS-dependent signal transduction*. Curr Opin Cell Biol, 2015. **33**: p. 8-13.
102. Farr, S.B. and T. Kogoma, *Oxidative stress responses in Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Microbiol Rev, 1991. **55**(4): p. 561-85.
103. Berndt, C., C.H. Lillig, and L. Flohe, *Redox regulation by glutathione needs enzymes*. Front Pharmacol, 2014. **5**: p. 168.
104. Mailloux, R.J. and M.E. Harper, *Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(6): p. 1106-15.
105. Cadenas, S., *Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection*. Biochim Biophys Acta Bioenerg, 2018. **1859**(9): p. 940-950.
106. Miao, L. and D.K. St Clair, *Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(4): p. 344-56.
107. Margis, R., et al., *Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview*. FEBS J, 2008. **275**(15): p. 3959-70.
108. Science, W.I.o. *GPX1 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GPX1>.
109. Drevet, J.R., *The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **250**(1-2): p. 70-9.
110. Nebert, D.W. and V. Vasiliou, *Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family*. Hum Genomics, 2004. **1**(6): p. 460-4.
111. Science, W.I.o. *GCLC Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GCLC&keywords=gclc>.
112. Science, W.I.o. *GCLM Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GCLM&keywords=gclm>.
113. Science, W.I.o. *GSR Gene*. 08.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GSR&keywords=GSR>.
114. Rhee, S.G., *Overview on Peroxiredoxin*. Mol Cells, 2016. **39**(1): p. 1-5.
115. Science, W.I.o. *CYBB Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYBB>.
116. Science, W.I.o. *CYGB Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYGB&keywords=cygb>.
117. Science, W.I.o. *PTGS1 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTGS1&keywords=PTGS1>.
118. Science, W.I.o. *PTGS2 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTGS2&keywords=PTGS1>.
119. Science, W.I.o. *AOX1 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AOX1>.
120. Science, W.I.o. *BNIP3 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?id=Q12983>.

6. Literaturverzeichnis

121. Science, W.I.o. *EPHX2 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EPHX2&keywords=ephx2>.
122. Science, W.I.o. *MPV17 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MPV17&keywords=MPV17>.
123. Science, W.I.o. *SFTPD Gene*. [cited 07.11.2018; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SFTPD&keywords=SFTPD>.
124. Schroder, K., *NADPH oxidases in bone homeostasis and osteoporosis*. Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(1): p. 25-38.
125. Bedard, K. and K.H. Krause, *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 245-313.
126. Kaya, A., B.C. Lee, and V.N. Gladyshev, *Regulation of protein function by reversible methionine oxidation and the role of selenoprotein MsrB1*. Antioxid Redox Signal, 2015. **23**(10): p. 814-22.
127. Labunskyy, V.M., D.L. Hatfield, and V.N. Gladyshev, *Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles*. Physiol Rev, 2014. **94**(3): p. 739-77.
128. Sun, Y. and H. Li, *Functional characterization of SAG/RBX2/ROC2/RNF7, an antioxidant protein and an E3 ubiquitin ligase*. Protein Cell, 2013. **4**(2): p. 103-16.
129. Kondoh, K. and E. Nishida, *Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1227-37.
130. Science, W.I.o. *DUSP1 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DUSP1>
131. Ono, R., T. Kaisho, and T. Tanaka, *PDLIM1 inhibits NF-kappaB-mediated inflammatory signaling by sequestering the p65 subunit of NF-kappaB in the cytoplasm*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 18327.
132. Science, W.I.o. *PDLIM1 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PDLIM1>.
133. Tran, M.K., et al., *Protein-protein interactions of the LIM-only protein FHL2 and functional implication of the interactions relevant in cardiovascular disease*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1863**(2): p. 219-28.
134. Science, W.I.o. *SQSTM1 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SQSTM1>
135. Science, W.I.o. *FOXM1 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FOXM1>.
136. Singh, C.K., et al., *The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling*. Antioxid Redox Signal, 2018. **28**(8): p. 643-661.
137. Singh, P., P.S. Hanson, and C.M. Morris, *Sirtuin-2 Protects Neural Cells from Oxidative Stress and Is Elevated in Neurodegeneration*. Parkinsons Dis, 2017. **2017**: p. 2643587.
138. Science, W.I.o. *NCOA7 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NCOA7&keywords=NCOA7>.
139. Science, W.I.o. *SELENOP Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SELENOP>.
140. Zoidis, E., et al., *Selenium-Dependent Antioxidant Enzymes: Actions and Properties of Selenoproteins*. Antioxidants (Basel), 2018. **7**(5).
141. Shchedrina, V.A., et al., *Structure-function relations, physiological roles, and evolution of mammalian ER-resident selenoproteins*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(7): p. 839-49.

6. Literaturverzeichnis

142. Science, W.I.o. *TRAPPC6A Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TRAPPC6A>.
143. Science, W.I.o. *AKR1C2 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AKR1C2&keywords=AKR1C2>.
144. Science, W.I.o. *GLA Gene*. Weizmann Institute of Science]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GLA&keywords=GLA>.
145. Science, W.I.o. *LHPP Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LHPP&keywords=lhpp>.
146. Kuehnle, K., et al., *Prosurvival effect of DHCR24/Seladin-1 in acute and chronic responses to oxidative stress*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(2): p. 539-50.
147. Science, W.I.o. *DHCR24 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DHCR24&keywords=dhcr24>.
148. Science, W.I.o. *NQO1 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NQO1&keywords=nqo1>.
149. Espiritu, D.J. and T. Mazzone, *Oxidative stress regulates adipocyte apolipoprotein e and suppresses its expression in obesity*. Diabetes, 2008. **57**(11): p. 2992-8.
150. Tarnus, E., et al., *Apolipoprotein E limits oxidative stress-induced cell dysfunctions in human adipocytes*. FEBS Lett, 2009. **583**(12): p. 2042-8.
151. Science, W.I.o. *APOE Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=APOE&keywords=apoe>.
152. Wong, B.S., et al., *Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein*. J Neurochem, 2001. **76**(2): p. 565-72.
153. Collins, S.J., et al., *Prion protein cleavage fragments regulate adult neural stem cell quiescence through redox modulation of mitochondrial fission and SOD2 expression*. Cell Mol Life Sci, 2018. **75**(17): p. 3231-3249.
154. Orino, K., et al., *Ferritin and the response to oxidative stress*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 1): p. 241-7.
155. Science, W.I.o. *BAG2 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BAG2>
156. Khurana, N. and S. Bhattacharyya, *Hsp90, the concertmaster: tuning transcription*. Front Oncol, 2015. **5**: p. 100.
157. Science, W.I.o. *HSPA1A Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HSPA1A&keywords=HSPa1a>.
158. Science, W.I.o. *NUDT1 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NUDT1&keywords=NUDT1>.
159. Sacconi, A., et al., *Redox regulation of chemokine receptor expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(6): p. 2761-6.
160. Science, W.I.o. *CCL5 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCL5>.
161. Science, W.I.o. *PTGR1 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTGR1>.
162. Science, W.I.o. *SLC7A11 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC7A11&keywords=slc7a11>.
163. Science, W.I.o. *SPINK1 Gene*. 07.11.2018]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SPINK1>.

6. Literaturverzeichnis

164. Ehnert, S., et al., *Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields cause antioxidative defense mechanisms in human osteoblasts via induction of *O₂- and H₂O₂*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 14544.
165. Beresford, J.N., et al., *Human bone cells in culture. A novel system for the investigation of bone cell metabolism*. Clin. Sci., 1983. **64**: p. 38-39.
166. Gallagher, J.A., et al., *Human bone cell cultures - studies of steroid action*. Calcif Tissue Int, 1982. **34 [Suppl]**: p. 33.
167. Ehnert, S., et al., *TGF-beta 1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e14073.
168. O'Brien, J., et al., *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*. Eur J Biochem, 2000. **267**(17): p. 5421-6.
169. Bessey, O.A., O.H. Lowry, and M.J. Brock, *A method for the rapid determination of alkaline phosphates with five cubic millimeters of serum*. J Biol Chem, 1946. **164**: p. 321-9.
170. Tietz, N.W., et al., *A reference method for measurement of alkaline phosphatase activity in human serum*. Clin Chem, 1983. **29**(5): p. 751-61.
171. Wildemann, B., et al., *Proliferating and differentiating effects of three different growth factors on pluripotent mesenchymal cells and osteoblast like cells*. J Orthop Surg Res, 2007. **2**: p. 27.
172. Sheehan, D. and B. Hrapchak, *Theory and Practice of Histotechnology*. 2nd ed. 1980, Columbus, OH: Battelle Press.
173. Keston, A.S. and R. Brandt, *The Fluorometric Analysis of Ultramicro Quantities of Hydrogen Peroxide*. Anal Biochem, 1965. **11**: p. 1-5.
174. Kalyanaraman, B., et al., *Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(1): p. 1-6.
175. Rastogi, R.P., et al., *Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium Anabaena variabilis PCC 7937*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **397**(3): p. 603-7.
176. Sambrook, J.F. and D.W. Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. 2001, Long Island, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
177. Antiabong, J.F., M.G. Ngoepe, and A.S. Abechi, *Semi-quantitative digital analysis of polymerase chain reaction-electrophoresis gel: Potential applications in low-income veterinary laboratories*. Vet World, 2016. **9**(9): p. 935-939.
178. Lake, B.G., *Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism*, in *Biochemical Toxicology, A Practical Approach*, K. Snell and B. Mulloch, Editors. 1987: Oxford, UK. p. 183.
179. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
180. Weydert, C.J. and J.J. Cullen, *Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue*. Nat Protoc, 2010. **5**(1): p. 51-66.
181. Mohanty, J.G., et al., *A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative*. J Immunol Methods, 1997. **202**(2): p. 133-41.
182. Ukeda, H., et al., *Spectrophotometric Assay for Superoxide Dismutase Based on the Reduction of Highly Water-soluble Tetrazolium Salts by Xanthine-Xanthine Oxidase*. Biosci Biotechnol Biochem, 1999. **63**(3): p. 485-8.

6. Literaturverzeichnis

183. Smith, I.K., T.L. Vierheller, and C.A. Thorne, *Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)*. *Anal Biochem*, 1988. **175**(2): p. 408-13.
184. Rahman, I., A. Kode, and S.K. Biswas, *Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(6): p. 3159-65.
185. Marone, M., et al., *Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample*. *Biol Proced Online*, 2001. **3**: p. 19-25.
186. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. *Cytotherapy*, 2006. **8**(4): p. 315-7.
187. Quarles, L.D., et al., *Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development*. *J Bone Miner Res*, 1992. **7**(6): p. 683-92.
188. Czekanska, E.M., et al., *A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing*. *J Biomed Mater Res A*, 2014. **102**(8): p. 2636-43.
189. Spreafico, A., et al., *A proteomic study on human osteoblastic cells proliferation and differentiation*. *Proteomics*, 2006. **6**(12): p. 3520-32.
190. Chen, C.T., et al., *Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. *Stem Cells*, 2008. **26**(4): p. 960-8.
191. Chaves Neto, A.H., et al., *Antioxidant defense and apoptotic effectors in ascorbic acid and beta-glycerophosphate-induced osteoblastic differentiation*. *Dev Growth Differ*, 2011. **53**(1): p. 88-96.
192. Gao, J., et al., *SIRT3/SOD2 maintains osteoblast differentiation and bone formation by regulating mitochondrial stress*. *Cell Death Differ*, 2018. **25**(2): p. 229-240.
193. Foster, L.J., et al., *Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation*. *Stem Cells*, 2005. **23**(9): p. 1367-77.
194. Alund, A.W., et al., *Reactive Oxygen Species Differentially Regulate Bone Turnover in an Age-Specific Manner in Catalase Transgenic Female Mice*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2016. **358**(1): p. 50-60.
195. Grundberg, E., et al., *Systematic assessment of the human osteoblast transcriptome in resting and induced primary cells*. *Physiol Genomics*, 2008. **33**(3): p. 301-11.
196. Zhang, W., et al., *Differential long noncoding RNA/mRNA expression profiling and functional network analysis during osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells*. *Stem Cell Res Ther*, 2017. **8**(1): p. 30.
197. Hecht, J., et al., *Detection of novel skeletogenesis target genes by comprehensive analysis of a Runx2(-/-) mouse model*. *Gene Expr Patterns*, 2007. **7**(1-2): p. 102-12.
198. Morsczeck, C., et al., *Gene expression profiles of dental follicle cells before and after osteogenic differentiation in vitro*. *Clin Oral Investig*, 2009. **13**(4): p. 383-91.
199. Foger-Samwald, U., et al., *Molecular mechanisms of osteoporotic hip fractures in elderly women*. *Exp Gerontol*, 2016. **73**: p. 49-58.
200. Maddipati, K.R. and L.J. Marnett, *Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. Purification and properties of a selenium-dependent glutathione peroxidase*. *J Biol Chem*, 1987. **262**(36): p. 17398-403.

6. Literaturverzeichnis

201. Takahashi, K., et al., *Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme*. Arch Biochem Biophys, 1987. **256**(2): p. 677-86.
202. Liu, H., et al., *Selenium protects bone marrow stromal cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation by suppressing oxidative stress and ERK signaling pathway*. Biol Trace Elem Res, 2012. **150**(1-3): p. 441-50.
203. Yano, S., et al., *Functional expression of beta-chemokine receptors in osteoblasts: role of regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in osteoblasts and regulation of its secretion by osteoblasts and osteoclasts*. Endocrinology, 2005. **146**(5): p. 2324-35.
204. Liu, Y.C., et al., *CCL5/RANTES is important for inducing osteogenesis of human mesenchymal stem cells and is regulated by dexamethasone*. Biosci Trends, 2014. **8**(3): p. 138-43.
205. Wintges, K., et al., *Impaired bone formation and increased osteoclastogenesis in mice lacking chemokine (C-C motif) ligand 5 (Ccl5)*. J Bone Miner Res, 2013. **28**(10): p. 2070-80.
206. Arakaki, N., et al., *Involvement of reactive oxygen species in osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells accompanied by mitochondrial morphological dynamics*. Biomed Res, 2013. **34**(3): p. 161-6.
207. Pietila, M., et al., *Mitochondrial function and energy metabolism in umbilical cord blood- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(4): p. 575-88.
208. Zhang, H., K.J. Menzies, and J. Auwerx, *The role of mitochondria in stem cell fate and aging*. Development, 2018. **145**(8).
209. Sanchez-Arago, M., et al., *Degradation of IF1 controls energy metabolism during osteogenic differentiation of stem cells*. EMBO Rep, 2013. **14**(7): p. 638-44.
210. Shum, L.C., et al., *Energy Metabolism in Mesenchymal Stem Cells During Osteogenic Differentiation*. Stem Cells Dev, 2016. **25**(2): p. 114-22.
211. Li, Q., et al., *The role of mitochondria in osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. Protein Cell, 2017. **8**(6): p. 439-445.
212. Nicolaije, C., M. Koedam, and J.P. van Leeuwen, *Decreased oxygen tension lowers reactive oxygen species and apoptosis and inhibits osteoblast matrix mineralization through changes in early osteoblast differentiation*. J Cell Physiol, 2012. **227**(4): p. 1309-18.
213. Mlakar, S.J., et al., *Antioxidant enzymes GSR, SOD1, SOD2, and CAT gene variants and bone mineral density values in postmenopausal women: a genetic association analysis*. Menopause, 2012. **19**(3): p. 368-76.
214. Romagnoli, C., et al., *Role of GSH/GSSG redox couple in osteogenic activity and osteoclastogenic markers of human osteoblast-like SaOS-2 cells*. FEBS J, 2013. **280**(3): p. 867-79.
215. Chen, X., et al., *In vitro evidence suggests that miR-133a-mediated regulation of uncoupling protein 2 (UCP2) is an indispensable step in myogenic differentiation*. J Biol Chem, 2009. **284**(8): p. 5362-9.
216. Rupprecht, A., et al., *Uncoupling protein 2 and 4 expression pattern during stem cell differentiation provides new insight into their putative function*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88474.
217. Miao, Y., et al., *Increasing UCP2 expression and decreasing NOX1/4 expression maintain chondrocyte phenotype by reducing reactive oxygen species production*. Oncotarget, 2017. **8**(38): p. 63750-63763.

6. Literaturverzeichnis

218. Jezek, P., et al., *Mitochondrial Uncoupling Proteins: Subtle Regulators of Cellular Redox Signaling*. *Antioxid Redox Signal*, 2018. **29**(7): p. 667-714.
219. Taylor, S.E., M. Shah, and I.R. Orriss, *Generation of rodent and human osteoblasts*. *Bonekey Rep*, 2014. **3**: p. 585.
220. Yumoto, H., et al., *Electromagnetic wave irradiation promotes osteoblastic cell proliferation and up-regulates growth factors via activation of the ERK1/2 and p38 MAPK pathways*. *Cell Physiol Biochem*, 2015. **35**(2): p. 601-15.
221. Ray, P.D., B.W. Huang, and Y. Tsuji, *Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling*. *Cell Signal*, 2012. **24**(5): p. 981-90.
222. Feng, B., et al., *NADPH oxidase-produced superoxide mediated a 50-Hz magnetic field-induced epidermal growth factor receptor clustering*. *Int J Radiat Biol*, 2016. **92**(10): p. 596-602.
223. Schroder, K., *NADPH oxidases in bone homeostasis and osteoporosis*. *Free Radic Biol Med*, 2018.
224. Mandal, C.C., et al., *Reactive oxygen species derived from Nox4 mediate BMP2 gene transcription and osteoblast differentiation*. *Biochem J*, 2011. **433**(2): p. 393-402.
225. Ehnert, S., et al., *Immune Cell Induced Migration of Osteoprogenitor Cells Is Mediated by TGF-beta Dependent Upregulation of NOX4 and Activation of Focal Adhesion Kinase*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(8).
226. Bai, X.C., et al., *Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **314**(1): p. 197-207.
227. Fatokun, A.A., T.W. Stone, and R.A. Smith, *Responses of differentiated MC3T3-E1 osteoblast-like cells to reactive oxygen species*. *Eur J Pharmacol*, 2008. **587**(1-3): p. 35-41.
228. Jones, D.P. and H. Sies, *The Redox Code*. *Antioxid Redox Signal*, 2015. **23**(9): p. 734-46.
229. Storch, K., et al., *BEMER Electromagnetic Field Therapy Reduces Cancer Cell Radioresistance by Enhanced ROS Formation and Induced DNA Damage*. *PLoS One*, 2016. **11**(12): p. e0167931.
230. Page, B., M. Page, and C. Noel, *A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro*. *Int J Oncol*, 1993. **3**(3): p. 473-6.
231. Rampersad, S.N., *Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays*. *Sensors (Basel)*, 2012. **12**(9): p. 12347-60.

Anhang

7. Anhang – Abbildungen und Tabellen

7.1. Anhang zu Materialien

Tabelle 35: Verwendete Chemikalien und Substanzen

Substanz	Hersteller	Bestellnr.
2,7-Dichlorofluorescein (DCFH-DA) >90%	Sigma Aldrich	35848-5G
4-Nitrophenol Lösung 10mM (pNP)	Sigma Aldrich	N7660
4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat (pNPP)	Carl Roth	4165.1
5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB	Carl Roth	6334.1
Agarose	Carl Roth	2267.1
Alizarinrot S	Carl Roth	0348.2
Antibiotika/Antimykotika Lösung	PAA	P11-002
Borsäure	Carl Roth	6943.1
Bromphenolblau, Na-Salz	Carl Roth	A512.1
Calciumchloride	Carl Roth	CN93.1
Cetylpyridiumchlorid Monohydrat 98 %	Carl Roth	CN27.1
Chloroform	Carl Roth	Y015.1
Cumolhydroperoxid	Sigma Aldrich	247502-100G
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Carl Roth	K028.3
Dexamethasone	Sigma Aldrich	D4902-100MG
Dikaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4	Carl Roth	T875.1
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich	D8418-100ML
pUC19-Marker ready-to-use	Carl Roth	X901.1
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	PAA	H15-002
Dulbecco's PBS ohne Ca & Mg	PAA	H15-002
EDTA Dikaliumsalz Dihydrat	Carl Roth	3053.1
Essigsäure $\geq 99,0 \%$	Carl Roth	3738.4
Ethanol, 99%	Apotheke UKT	
Ethidiumhomodimer	Sigma Aldrich	46043-1MG-F
FCS (fetales Kälberserum)	PAA	A15-151
Folin's Reagent	Sigma Aldrich	F9252
Formaldehydlösung, 37 %	Carl Roth	4979.1
Glutathione peroxidase (from bovine erythrocytes)	Sigma Aldrich	G6137-100UN
Glutathione reductase from bakers yeast	Sigma Aldrich	G3664
Glycerin	Carl Roth	7530.1

Anhang

Glycerin	Carl Roth	7530.1
Glycin 99%, p.a.	Carl Roth	3908.2
GR (Glutathione reductase from bakers yeast)	Sigma Aldrich	G3664-500UN
GSH reduziert (für GPX-Assay)	Carl Roth	6382.1
GSSG (für GR-Assay)	Sigma Aldrich	G4501-250MG
Ham's F12	PAA	E15-016
HEPES, 99,5%	Carl Roth	HN78.2
Isopropanol	VWR	20.842.330
Kaliumchlorid KCl, 99%	Carl Roth	HNO2.2
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4	Carl Roth	3904.2
Kollagenase II	PAA	K21-240
Kupfersulfat $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Carl Roth	P024.1
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma Aldrich	A8960-5G
Magnesiumchlorid, MgCl_2	Carl Roth	KK36.2
MEM Earle's	PAA	E15-024
Meta Phosphorsäure	Sigma Aldrich	239275
Na_2EDTA 99%	Carl Roth	8043.2
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99%	Carl Roth	3053
NADPH-Tetranatriumsalz	Carl Roth	AE14.1
Na-K-Tartrate	Sigma Aldrich	S2377
Natriumazid NaN_3	Sigma Aldrich	S2002-25G
Natriumcarbonat	Carl Roth	P028.1
Natriumchlorid NaCl	VWR	27.810.295
Natriumhydroxid NaOH 2N	Carl Roth	T135.1
Natriumhydroxid, 2M NaOH	Carl Roth	T135.1
Natriumthiosulfat	Carl Roth	HN25.2
Penicillin / Streptomycin	Sigma Aldrich	P0781
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA	P11-010
Pepstatin A	Sigma Aldrich	P4265-5MG
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth	6367.1
Resazurin Natriumsalz	Sigma Aldrich	199303-1G
Salzsäure, 4M	Carl Roth	N076.1
Serumalbumin von Rindern (BSA)/Albumin Fraktion V	Carl Roth	8076.4
Silbernitrat	Carl Roth	9370.1
β -Glycerol-Phosphate, Glycerolphosphat- Dinatriumsalz-Hydrat (β)	AppliChem	A2253,0100
Sulforhodamine B Natriumsalz	Sigma Aldrich	S1402-1G

Anhang

TRIS Base	Carl Roth	AE15.2
Tris Base (Trizma)	Sigma Aldrich	T1503-1KG
Trypanblau 0.5 %	Carl Roth	CN76.1
Trypsin / EDTA	PAA	L11-004
Wasserstoffperoxid Lösung, 30 %	Carl Roth	5982.1

Tabelle 36 Auflistung Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller	Artikel Nr.	Vermerk
0,2 ml Mikroreaktionsgefäß für PCR	Carl Roth	CH88.1	blau
		CH89.1	grün
		CH90.1	rot
0,5 ml Mikroreaktionsgefäß	Sarstedt	72.699	
1,5 ml Mikroreaktionsgefäß	Carl Roth	4209.1	grün
		4189.1	rot
96-F-bottom-Well-Platte	Greiner bio-one	E14030HI	
Falcon tube	Greiner bio-one	188271	15 ml
	Sarstedt	62.547.004	50 ml
Handschuhe	Paul Hartmann AG Kimberly Clark	9422071 52002M	Nitril Hand- schuhe
Kulturflaschen	Greiner bio-one	660025	T25
	Corning	430641	T75
	Greiner bio-one	660175	T175
Pasteurpipette	Carl Roth	4518.1	150 mm 230 mm
Petrischalen 100x20 mm	Greiner bio-one	664 160	
Pipettenspitzen	Biozym Scientific GmbH	720011	10 µl
	Sarstedt	70760	100 µl
	Ratiolab	2100610	1000 µl
Sterilfilter	Millipore Ireland Ltd.	SLGPO33RS	Porengröße: 0,22 µm
Spritze	BBraun, Melsungen	4606108V	10 ml
		4606205V	20 ml

Anhang

Stripetten	Corning	20612013 21512025 17712012	5 ml 10 ml 25 ml 50 ml
Zellschaber	Corning	13312013	
96 Well Streifenplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen	705 070 705 185	96 Well

Tabelle 37: qRT-PCR Array Genübersicht (englisches Original) Human Oxidative Stress Plus - Qiagen PAHS-065Y

Position	Unigene	GeneBank	Symbol	Description
A01	Hs.418167	NM_000477	ALB	Albumin
A02	Hs.654431	NM_000697	ALOX12	Arachidonat 12-lipoxygenase
A03	Hs.406238	NM_001159	AOX1	Aldehydoxidase 1
A04	Hs.654439	NM_000041	APOE	Apolipoprotein E
A05	Hs.125213	NM_004045	ATOX1	ATX1 antioxidant protein 1 homolog (yeast)
A06	Hs.144873	NM_004052	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
A07	Hs.502302	NM_001752	CAT	Catalase
A08	Hs.514821	NM_002985	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
A09	Hs.502917	NM_005125	CCS	Copper chaperone for superoxide dismutase
A10	Hs.292356	NM_000397	CYBB	Cytochrome b-245, beta polypeptide
A11	Hs.95120	NM_134268	CYGB	Cytoglobin
A12	Hs.498727	NM_014762	DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase
B01	Hs.272813	NM_175940	DUOX1	Dual oxidase 1
B02	Hs.71377	NM_014080	DUOX2	Dual oxidase 2
B03	Hs.171695	NM_004417	DUSP1	Dual specificity phosphatase 1
B04	Hs.212088	NM_001979	EPHX2	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
B05	Hs.279259	NM_000502	EPX	Eosinophil peroxidase
B06	Hs.239	NM_021953	FOXM1	Forkhead box M1
B07	Hs.645560	NM_002032	FTH1	Ferritin, heavy polypeptide 1
B08	Hs.654465	NM_001498	GCLC	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit
B09	Hs.76686	NM_000581	GPX1	Glutathione peroxidase 1
B10	Hs.2704	NM_002083	GPX2	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)
B11	Hs.386793	NM_002084	GPX3	Glutathione peroxidase 3 (plasma)
B12	Hs.433951	NM_002085	GPX4	Glutathione peroxidase 4 (phospholipid hydroperoxidase)
C01	Hs.248129	NM_001509	GPX5	Glutathione peroxidase 5 (epididymal androgen-related protein)
C02	Hs.271510	NM_000637	GSR	Glutathione reductase

Anhang

C03	Hs.82327	NM_000178	GSS	Glutathione synthetase
C04	Hs.523836	NM_000852	GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1
C05	Hs.655292	NM_001513	GSTZ1	Glutathione transferase zeta 1
C06	Hs.274402	NM_005345	HSPA1A	Heat shock 70kDa protein 1A
C07	Hs.80828	NM_006121	KRT1	Keratin 1
C08	Hs.234742	NM_006151	LPO	Lactoperoxidase
C09	Hs.517586	NM_005368	MB	Myoglobin
C10	Hs.499674	NM_000242	MBL2	Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble
C11	Hs.458272	NM_000250	MPO	Myeloperoxidase
C12	Hs.75659	NM_002437	MPV17	MpV17 mitochondrial inner membrane protein
D01	Hs.490981	NM_012331	MSRA	Methionine sulfoxide reductase A
D02	Hs.73133	NM_005954	MT3	Metallothionein 3
D03	Hs.647047	NM_000265	NCF1	Neutrophil cytosolic factor 1
D04	Hs.587558	NM_000433	NCF2	Neutrophil cytosolic factor 2
D05	Hs.709191	NM_000625	NOS2	Nitric oxide synthase 2, inducible
D06	Hs.371036	NM_016931	NOX4	NADPH oxidase 4
D07	Hs.657932	NM_024505	NOX5	NADPH oxidase, EF-hand calcium binding domain 5
D08	Hs.534331	NM_002452	NUDT1	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 1
D09	Hs.368525	NM_020992	PDLIM1	PDZ and LIM domain 1
D10	Hs.180909	NM_002574	PRDX1	Peroxiredoxin 1
D11	Hs.432121	NM_005809	PRDX2	Peroxiredoxin 2
D12	Hs.523302	NM_006793	PRDX3	Peroxiredoxin 3
E01	Hs.83383	NM_006406	PRDX4	Peroxiredoxin 4
E02	Hs.502823	NM_181652	PRDX5	Peroxiredoxin 5
E03	Hs.120	NM_004905	PRDX6	Peroxiredoxin 6
E04	Hs.472010	NM_183079	PRNP	Prion protein
E05	Hs.201978	NM_000962	PTGS1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
E06	Hs.196384	NM_000963	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
E07	Hs.134623	NM_014245	RNF7	Ring finger protein 7
E08	Hs.32148	NM_203472	VIMP	Selenoprotein S
E09	Hs.745017	NM_005410	SEPP1	Selenoprotein P, plasma, 1
E10	Hs.253495	NM_003019	SFTPD	Surfactant protein D
E11	Hs.466693	NM_012237	SIRT2	Sirtuin 2
E12	Hs.443914	NM_000454	SOD1	Superoxide dismutase 1, soluble
F01	Hs.487046	NM_000636	SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial
F02	Hs.2420	NM_003102	SOD3	Superoxide dismutase 3, extracellular
F03	Hs.587290	NM_003900	SQSTM1	Sequestosome 1
F04	Hs.516830	NM_080725	SRXN1	Sulfiredoxin 1
F05	Hs.467554	NM_000547	TPO	Thyroid peroxidase

Anhang

F06	Hs.134602	NM_003319	TTN	Titin
F07	Hs.443430	NM_006440	TXNRD2	Thioredoxin reductase 2
F08	Hs.80658	NM_003355	UCP2	Uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)
F09	Hs.460260	NM_001354	AKR1C2	Aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III)
F10	Hs.745046	NM_004282	BAG2	BCL2-associated athanogene 2
F11	Hs.443687	NM_001450	FHL2	Four and a half LIM domains 2
F12	Hs.596052	NM_002061	GCLM	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit
G01	Hs.69089	NM_000169	GLA	Galactosidase, alpha
G02	Hs.727017	NM_002133	HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1
G03	Hs.525600	NM_001017963	HSP90AA1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1
G04	Hs.527748	NM_022126	LHPP	Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase
G05	Hs.171426	NM_181782	NCOA7	Nuclear receptor coactivator 7
G06	Hs.406515	NM_000903	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
G07	Hs.584864	NM_012212	PTGR1	Prostaglandin reductase 1
G08	Hs.390594	NM_014331	SLC7A11	Solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc-system), member 11
G09	Hs.407856	NM_003122	SPINK1	Serine peptidase inhibitor, Kazal type 1
G10	Hs.466929	NM_024108	TRAPPC6A	Trafficking protein particle complex 6A
G11	Hs.435136	NM_003329	TXN	Thioredoxin
G12	Hs.690011	NM_003330	TXNRD1	Thioredoxin reductase 1
H01	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta
H02	Hs.534255	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	Hs.592355	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	Hs.412707	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	Hs.546285	NM_001002	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
H06	N/A	SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07-09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10-12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control

Tabelle 38: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller	Nummer
Abzug Secuflow	WALDNER Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG	200/02895/300
Analysewaage ABJ 120-4M	KERN & Sohn GmbH	WB1140084
CO2-Inkubator C-150 (37 °C, 5 % CO ₂)	Binder	9040-0078

Anhang

Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA	
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, Hercules, USA	
EMF-Stimulator: Somagen® Master	Sachtleben GmbH, Hamburg, Germany	
Fluoreszenzmikroskop EVOS	AMG	91-AF-4301
Gefrierschrank (-20°C) Power Cooling Forma 900 Series	LIEBHERR	7081896-04
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific	827860-2521
Geldokumentationssystem P93 DW	Intas Science Imaging Instruments GmbH	776C371C40
Kühlschrank/ Gefrier- Kombi (+4 °C/ -20 °C)	Liebherr	7081896-04
Laborwaage Kern PCB	KERN & Sohn GmbH	WD110036863
Luer Hohlmeißelzange	BBraun	
LVis Platte	BMG Labtech	0680B0001C
Mehrkanalpipette Lambda Plus (10-50 µl, 20-200 µl)	Corning Incorporated	151820048 & 151630049
Mikrowelle	Severin	80.680.000
Netzgerät Power Pac 200 B	io-Rad, Hercules, USA	
Netzgerät Power Pac HC	io-Rad, Hercules, USA	
PCR-Gerät Arktik Thermal Cycler	Thermo Scientific	TCA0096
PCR-Gerät Veriti 96-Well Thermal Cycler	Applied Biosystems	4375786
pH-Meter Five Easy FE20	Mettler Toledo AG	1232315296
Pipetten Lambda Plus (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Corning Incorporated	
Pipettierhilfe ROTA-Filler 3000	Heathrow Scientific, Vernon Hills (USA)	HS08348
plate reader FluoStar Omega	BMG Labtech	415-1264
qPCR: Applied Biosystems™ StepOnePlus™ Real-Time PCR System	ThermoFisher Scientific	
Rothiphorese PROclamp MINI System	Carl ROTH	3501.1
Rührwerk, Magnetrührer mit Edelstahlheizplatte, RH B 2	"IKA®-Werke GmbH & Co. KG	6.050.357
Sterilbank Thermo Scientific Safe 2020	Thermo Scientific	51026934
Temperiergerät, Thermostat	Alpha A	LCED 0226-10-1160
Thermoshaker TS-100	PeqlabBiosysteme GmbH	010120-1106-0186 & 010120-1103-
Tischzentrifuge Hereaus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Scientific	41250019
Ultraschall-Reinigungsgerät GT-7810A	Globaltronics GmbH&Co. KG, Hamburg	
Umkehrmikroskop Primo Vert	Carl Zeiss Microimaging GmbH	415510-1101-000

Anhang

Vortexer	Corning	S1101243
Wasserbad AUQAline AL 25	LAUDA	LCB0727
Wippschüttler DRS-12	LTF Labortechnik GmbH & Co. KG	11DE090 & 11DE243
Zählkammer	Carl Roth	
Zentrifuge HERAEUS MEGAFUGE 40R Centrifuge	Thermo Scientific	75004518

7.2. Ergebnisse

7.2.1. Heatmap: Übersicht

Anhang

	Non-Responder			Responder		
	Fold Regulation $>1: 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$; $<1: (-1)/(-\Delta\Delta Ct)$					
	Tag 0	Tag 2		Tag 0	Tag 2	
- PEFM		+ PEFM	- PEFM		+ PEFM	
ALB	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
ALOX12	1,000	1,000	1,062	1,000	1,000	1,000
AOX1	2,008	8,050	16,071	1,000	3,978	4,018
APOE	2,111	1,060	1,058	1,000	1,000	1,000
ATOX1	4,131	2,058	1,991	1,000	2,073	1,021
BNIP3	1,979	-1,007	1,989	1,000	-1,007	1,002
CAT	3,984	7,990	7,927	1,000	7,967	4,002
CCL5	2,017	1,007	2,051	1,000	8,228	-1,025
CCS	4,027	2,005	1,974	1,000	2,007	1,003
CYBB	4,301	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CYGB	-1,001	-2,014	-1,002	1,000	-1,002	-1,001
DHCR24	1,997	8,015	8,002	1,000	3,955	4,006
DUOX1	2,005	1,000	1,000	1,000	2,004	-1,018
DUOX2	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
DUSP1	2,006	4,015	8,039	1,000	4,023	1,979
EPHX2	1,996	1,008	-1,014	1,000	1,019	-2,032
EPX	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
FOXM1	3,993	1,004	-1,010	1,000	1,006	1,004
FTH1	1,999	1,993	2,000	1,000	2,003	-1,002
GCLC	4,033	4,029	8,014	1,000	4,028	2,008
GPX1	1,001	1,000	1,996	1,000	1,004	1,004
GPX2	2,142	1,073	1,068	1,000	1,000	1,000
GPX3	1,005	31,517	64,046	1,000	64,290	31,778
GPX4	-1,002	1,001	-1,006	1,000	1,002	1,001
GPX5	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
GSR	7,983	4,004	4,008	1,000	4,012	1,983
GSS	1,976	1,998	1,990	1,000	-1,005	-1,001
GSTP1	2,024	2,011	2,013	1,000	1,992	1,000
GSTZ1	4,084	2,030	4,081	1,000	2,030	1,000
HSPA1A	2,009	2,004	4,026	1,000	2,009	2,018
KRT1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
LPO	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
MB	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
MBL2	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
MPO	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
MPV17	2,025	2,060	2,021	1,000	2,068	1,016
MSRA	2,004	-1,014	2,005	1,000	-1,003	-2,035
MT3	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
NCF1	1,068	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
NCF2	3,992	-1,002	-1,002	1,000	-2,017	-2,000
NOS2	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
NOX4	-1,008	-1,006	2,000	1,000	-1,004	-1,000
NOX5	2,133	1,075	1,000	1,000	1,000	1,066
NUDT1	1,995	1,002	1,990	1,000	1,002	-1,003
PDLIM1	4,028	4,013	7,968	1,000	4,005	4,008
PRDX1	1,993	-1,009	1,997	1,000	1,001	-1,003
PRDX2	2,007	-1,003	1,995	1,000	1,002	-2,025
PRDX3	1,994	1,997	1,984	1,000	1,987	1,003
PRDX4	1,987	-1,004	-1,026	1,000	-2,030	-1,995
PRDX5	1,991	2,023	2,001	1,000	2,018	1,003
PRDX6	4,118	2,041	4,129	1,000	2,045	1,004
PRNP	4,033	-1,002	2,001	1,000	1,005	1,010
PTGS1	1,993	-4,011	-2,005	1,000	-4,048	-4,000
PTGS2	2,021	-3,951	-1,976	1,000	-3,956	-7,942
RNF7	3,980	2,005	3,993	1,000	2,003	1,006
VIMP	3,991	2,004	4,007	1,000	2,002	1,003
SEPP1	4,030	1,004	-1,010	1,000	1,007	-1,992
SFTPD	1,995	1,985	1,998	1,000	1,000	-1,003
SIRT2	1,999	1,994	2,001	1,000	-1,009	-1,003
SOD1	1,992	1,990	1,988	1,000	-1,008	-1,001
SOD2	1,994	-1,004	2,000	1,000	7,938	-1,002
SOD3	2,009	2,009	2,012	1,000	1,993	2,004
SQSTM1	2,009	2,008	2,019	1,000	1,998	1,005
SRXN1	1,990	2,001	1,992	1,000	1,987	1,984
TPO	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
TTN	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
TXNRD2	1,991	1,999	1,996	1,000	1,988	2,000
UCP2	8,163	2,035	1,996	1,000	1,014	1,020
AKR1C2	-1,012	-1,998	-2,037	1,000	-2,013	-1,997
BAG2	2,003	-1,004	1,001	1,000	-1,987	-4,032
FHL2	1,965	1,004	-1,015	1,000	-2,017	-1,991
GCLM	1,996	-1,005	2,013	1,000	2,013	1,004
GLA	2,007	1,002	2,008	1,000	1,004	1,004
HMOX1	4,012	-1,003	-1,002	1,000	-2,010	-2,009
HSP90AA1	2,007	1,002	-1,007	1,000	-2,023	-2,001
LHPP	2,000	-1,006	2,001	1,000	1,002	1,002
NCOA7	2,010	1,004	-1,009	1,000	1,002	-2,028
NQO1	2,002	1,001	1,979	1,000	1,003	-2,007
PLTGR1	2,010	1,001	2,001	1,000	1,001	-1,000
SLC7A11	3,998	-2,007	-1,005	1,000	-2,014	-1,996
SPINK1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
TRAPP6A	2,006	2,004	4,022	1,000	1,987	2,002
TXN	2,018	2,033	2,004	1,000	2,028	1,005
TXNRD1	1,998	4,003	3,985	1,000	4,004	1,993

Anhang

Abbildung 27: vollständige Heatmap: Übersicht qRT-PCR Array ohne Trennung nach Gruppen. Auch aufgeführt sind die Gene welche aufgrund geringer Expression von einer Auswertung ausgenommen wurden. Kontrollen und House-Keeping Gene sind nicht aufgeführt

8. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Siegfried Weller Institut für Unfallmedizinische Forschung (SWI) der Universität Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Andreas Nüssler durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Sabrina Ehnert.

Die qRT-PCR und RT-PCR Versuche wurden (Einarbeitung durch Dr. Sabrina Ehnert, Anja Tschida, Heike Monshausen) von mir in Zusammenarbeit mit Daria Bykova durchgeführt. Die mRNA Isolation für qRT-PCR und RT-PCR erfolgte in Vorarbeiten durch andere nicht namentlich genannten Mitarbeiter. Die Aufreinigung, cDNA-Synthese und das Poolen der Proben erfolgte durch mich. Die Proteinisolation und Messung der Enzymaktivitäten wurde von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Dr. Sabrina Ehnert.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 19.05.2021

Johannes Birk

9. Veröffentlichungen

Posterveröffentlichung auf der bone-tec 2015 in Stuttgart:



Primary human osteoblasts with reduced baseline function are responsive to extremely low frequency pulsed electromagnetic fields - clinical implication possible?

J. Birk¹, S. Ehnert¹, K. Falldorf², A.-K. Fentz², P. Ziegler¹, T. Freude¹, J. Sachtleben², and A. K. Nüssler¹

¹ Siegfried Weller Institute for Trauma Research, Eberhard Karls Universität Tübingen, Schnarrenbergstr. 95, 72076 Tübingen, Germany

² Sachtleben GmbH, Stratenberg 27, 22393 Hamburg, Germany

Objectives:
 Since the early 70's electromagnetic fields (EMFs) have been used as an exogenous stimulation method to promote fracture healing.
But: Underlying mechanisms of action or EMF parameters responsible for certain effects remain unclear.
Aim: to investigate the influence of defined ELF-PEMFs on human osteoblasts' and osteoclasts' viability and function in cell culture.

Materials and Methods:

Primary human osteoblasts
 (obtained by collagenase digestion of spongy bone samples)

Human Osteoclasts
 (differentiated from blood mononuclear cells using M-CSF and RANKL)

Experimental design: Cells were treated 3 times weekly during their maturation process using the Somagen® device (Fig. 1). 10 different programs were tested with variations in frequency (10-90,6Hz), waveform, intensity and send-pause intervals.

Measurements: Viability was monitored by mitochondrial activity and total protein content. Functional parameters: AP/Trap5B activity and matrix mineralization. Pathway analysis: Western Blot.

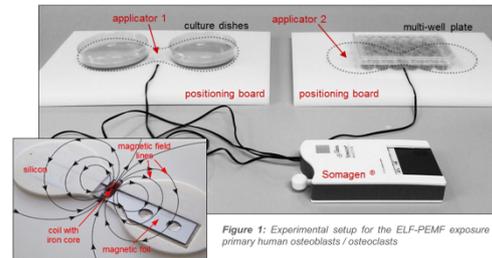


Figure 1: Experimental setup for the ELF-PEMF exposure of the primary human osteoblasts / osteoclasts

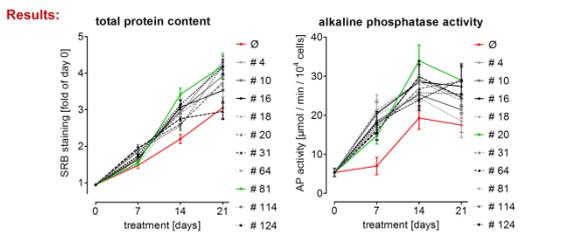


Figure 2: Total protein content (SRB staining) and AP activity of primary human osteoblasts after defined ELF-PEMF treatment (Mitochondrial activity/Resazurin not shown)

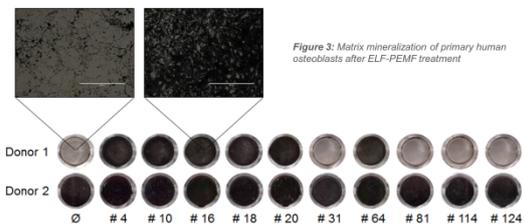


Figure 3: Matrix mineralization of primary human osteoblasts after ELF-PEMF treatment

ELF-PEMF treatment significantly increased total protein content (up to 66%), mitochondrial activity (up to 91.1%) (Fig. 2) as well as alkaline phosphatase (AP) activity (up to 129.9%) and consequently formation of mineralized matrix (up to 276%) (Fig. 2 & 3). Overall the strongest effect was observed with program #16.

Donor dependent effect

Only osteoblasts with a poor initial osteoblast function responded to the ELF-PEMF treatment as can be seen by increased AP activity (Fig. 4) or matrix mineralization. Osteoblasts with high initial function showed no significant difference to untreated cells.

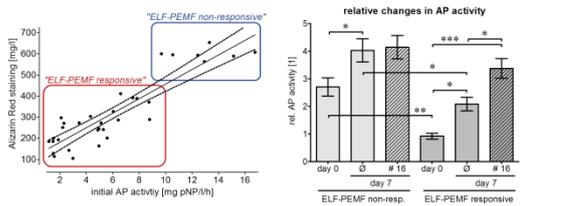


Figure 4: AP activity and matrix mineralization in primary human osteoblasts after ELF-PEMF #16 treatment

Possible regulatory mechanism

As a possible regulatory mechanism MAPKinase signaling was investigated. Both p38 and ERK1/2 signaling were activated upon ELF-PEMF exposure. However, only inhibition of ERK1/2 signaling blocked the ELF-PEMF effect on primary human osteoblast (Fig. 5).

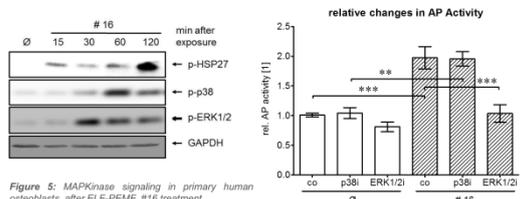


Figure 5: MAPKinase signaling in primary human osteoblasts after ELF-PEMF #16 treatment

Effect on osteoclasts

Interestingly, maturation of osteoclasts from human monocytes was not affected by the ELF-PEMF treatment with program # 16 (Fig. 6).

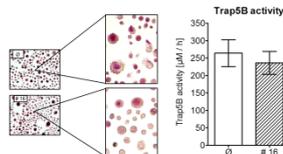


Figure 6: ELF-PEMF exposure has no significant effect on osteoclast maturation

Conclusions:

In summary the results indicate that specific ELF-PEMF treatment with the Somagen® device improves viability and maturation of osteoblasts while osteoclast viability and maturation was not affected.

Hence, ELF-PEMF might represent an interesting adjunct to conventional therapy supporting bone formation during fracture healing or even for the treatment of osteoporosis.

Veröffentlichungen

Die vorliegende Arbeit ist in folgendes Paper mit eingeflossen:

Ehnert S, Fentz AK, Schreiner A, Birk J, Wilbrand B, Ziegler P, *et al.*

Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields cause antioxidative defense mechanisms in human osteoblasts via induction of $^*O_2^-$ and H_2O_2 .

Sci Rep. 2017;7(1):14544. doi: 10.1038/s41598-017-14983-9

Danksagung

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei verschiedenen Personen bedanken welche zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Prof. Dr. Andreas Nüssler für die Möglichkeit zu dieser Arbeit und für die Betreuung und Begutachtung während der Zeit praktischer Tätigkeit im Labor und in Folge während des Schreibprozesses.

Bei Dr. Sabrina Ehnert für die Betreuung während der Zeit im Labor und insbesondere für die langen Gespräche während der Fertigstellung der Schriftform.

Auch möchte ich mich bei meinen Kollegen im Labor bedanken mit denen ich zusammenarbeiten durfte. Besonders Sara Biermann, Daria Bykova, Anja Tschida, Heike Monshausen und Romina Aspera.

Das meiste zu Verdanken habe ich meiner Familie, meinen Eltern Kurt und Erika Birk und meinen Geschwistern Michael, Samuel und Alexander. Vielen Dank für die Unterstützung während meines Studiums und während der Fertigstellung meiner Doktorarbeit.