

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut an der  
Orthopädischen Universitätsklinik Friedrichsheim  
Direktorin: Prof. Dr. Andrea Meurer

**Adrenozeptor-Expression während der Bandscheibendegeneration  
(Adrenoceptor Expression during Intervertebral Disc Degeneration)**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Johannes Raphael Kupka

aus Bensheim

Frankfurt am Main, 2020

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem  
Referentin: Prof. Dr. Andrea Meurer  
Korreferent/in: Prof. Dr. Bernhard Brüne

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2021

# Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung .....	4
1.1  Deutschsprachige Zusammenfassung .....	4
1.2  Englischsprachige Zusammenfassung .....	6
2. Abkürzungsverzeichnis .....	8
3. Übergreifende Zusammenfassung .....	9
3.1  Einleitung .....	9
3.2  Methoden .....	11
3.3  Diskussion .....	14
3.4  Präsentationen und Ausblick .....	17
4. Übersicht der zur Veröffentlichung angenommenen Manuskripte .....	19
5. Zur Veröffentlichung angenommenes Manuskript .....	20
6. Eigener Anteil an der Arbeit .....	21
7. Literaturverzeichnis .....	24
8. Schriftliche Erklärung .....	30

# 1. Zusammenfassung

## 1.1 Deutschsprachige Zusammenfassung

Die Pathophysiologie der Bandscheibendegeneration (intervertebral disc degeneration, IVDD) und ihre molekularen Mechanismen sind noch in weiten Teilen unverstanden.<sup>1</sup> Ihre Ursachen und Risikofaktoren sind vielfältig und schließen unter anderem Alter, Geschlecht, Umwelteinflüsse oder mechanische Belastungen mit ein.<sup>2,3</sup>

Für das der Bandscheibe eng verwandte Knorpelgewebe wurde in aktuellen Studien der Einfluss des Sympathikus bzw. dessen Neurotransmitters Noradrenalin (NE) via adrenerger Rezeptoren (AR) auf die Zellproliferation, die Expression von Molekülen der extrazellulären Matrix und somit auch auf die Degeneration beschrieben.<sup>4-6</sup> In Bandscheiben wurde bereits das Vorhandensein von sympathischen Nervenendigungen nachgewiesen,<sup>7</sup> allerdings wurde die Expression der Adrenozeptoren hier noch nie untersucht. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war also die Analyse der ARs im Gewebe der Bandscheibe und die Evaluation der Korrelation mit der Bandscheibendegeneration.

Das für die Analyse benötigte Gewebe stammt von Patienten, bei welchen eine Wirbelkörperverblockung (Spondylodese) durchgeführt wurde.<sup>8</sup> Im Rahmen dieser Spondylodese wird das Bandscheibengewebe des betroffenen Segmentes entfernt.<sup>8</sup> Der Degenerationsgrad der anonymisierten Proben wurde prä- und intraoperativ bestimmt und im entnommenen Gewebe sowie in isolierten Zellen die Expression aller bekannten ARs mittels reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) untersucht. Zum Nachweis der ARs auf Proteinebene wurden einzelne humane Proben auch immunhistochemisch analysiert. Des Weiteren wurde anhand von Wildtyp- und sogenannten SM/J-Mäusen, die eine spontane IVDD entwickeln,<sup>9</sup> die Proteinexpression der ARs und der extrazellulären Matrix (ECM) von gesunden und geschädigten Bandscheiben an histologischen Schnitten verglichen. Schließlich wurde an isolierten und kultivierten humanen Zellen ein Stimulationsversuch mit Noradrenalin durchgeführt, um zu prüfen, ob es nach Aktivierung der ARs zu einer intrazellulären Signalweiterleitung kommt.

In Nativgewebe der humanen Bandscheibe konnte die messenger Ribonukleinsäure (mRNA) von  $\alpha 1a$ -,  $\alpha 1b$ -,  $\alpha 2a$ -,  $\alpha 2b$ -,  $\alpha 2c$ -,  $\beta 1$ - und  $\beta 2$ -ARs nachgewiesen werden. Nach siebentägiger Zellkultur im Monolayer präsentierte sich ein nur dezent abweichendes Genexpressionsmuster. Auf Proteinebene war das Signal des  $\beta 2$ -AR nur im Bereich des Annulus fibrosus (AF) detektierbar jedoch nicht im Nucleus pulposus (NP). Selbiges war auch in murinen Schnitten festzustellen, wobei sich bei Wildtype (WT)-Mäusen

hauptsächlich im inneren AF  $\beta$ 2-positive Zellen fanden, während sich das Signal bei der SM/J-Maus weiter in Richtung des äußeren AF und des NP ausdehnte.  $\alpha$ 2a-AR und  $\alpha$ 2c-AR waren hingegen auf Proteinebene nicht nachweisbar. Bei der immunhistochemischen Untersuchung relevanter ECM-Moleküle zeigte sich für Kollagen II, Kollagen XII, cartilage oligomeric matrix protein (COMP) und Decorin (DCN) eine Verteilung, die mit der des  $\beta$ 2-AR-Signals korreliert. Der Stimulationsversuch in humaner Zellkultur ergab eine Aktivierung der für die ARs relevanten Proteinkinase A (PKA)- und extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) -Signalwege.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal die Existenz und Funktionalität von Adrenozeptoren im Bandscheibengewebe nachgewiesen werden. Unterschiede in der Expression der ARs, kombiniert mit Veränderungen der ECM-Zusammensetzung könnten ein Hinweis auf den Einfluss des Sympathikus bei IVDD sein. Die aktuelle demographische Entwicklung und die sich hieraus ergebende gesundheitsökonomische Belastung machen die Ergründung molekularer Mechanismen der IVDD und die daraus resultierende Entwicklung innovativer Behandlungsmethoden zu Kardinalfragen moderner orthopädischer Grundlagenforschung.

## 1.2 Englischsprachige Zusammenfassung

The pathophysiology of the intervertebral disc degeneration and its molecular mechanisms are still not sufficiently understood.<sup>1</sup> Well known causes and risk factors are age, gender, environmental influences and mechanical loading.<sup>2,3</sup>

Recently, the impact of the sympathetic nervous system and its neurotransmitter norepinephrine on cell proliferation, expression of extracellular matrix proteins and, therefore, also on the degeneration of articular cartilage was described.<sup>4,6</sup> Although it is already known that the IVD is innervated by sympathetic nerve fibres, the existence of adrenergic receptors has not been investigated.<sup>7</sup> Thus, the aim of the present study was the analysis of ARs in IVD tissue and their influence on the IVDD.

The analysed IVD tissue originates from patients undergoing spinal fusion (spondylodesis). During this surgery, the IVD of the affected segment is removed.<sup>8</sup> The degree of degeneration was determined pre- and intraoperatively in anonymised samples. Both, isolated and cultured cells as well as native tissue were analysed by reverse transcription polymerase chain reaction to investigate the gene expression of all known ARs. Immunohistochemistry was used to detect ARs on the protein level. Furthermore, the protein expression of ARs and main components of the ECM were evaluated in spine sections of wildtype and SM/J-mice – a mouse line, which develops an early spontaneous disc degeneration.<sup>9</sup> This model made it possible to compare healthy and degenerated IVDs. Finally, a stimulation experiment with norepinephrine was performed on the above-mentioned human cells.

In native tissue, the mRNA of  $\alpha 1a$ -,  $\alpha 1b$ -,  $\alpha 2a$ -,  $\alpha 2b$ -,  $\alpha 2c$ -,  $\beta 1$ - and  $\beta 2$ -ARs could be detected. After seven days of monolayer cell culture, IVD cells showed an only slightly different gene expression pattern. In human IVDs,  $\beta 2$ -AR was detectable on the protein-level in the annulus fibrosus, however, no signal was visible in the nucleus pulposus. The same also applies to murine sections: in wildtype mice  $\beta 2$ -positive cells were restricted to the inner AF while in SM/J-mice the signal was more widespread towards the outer parts and the NP.  $\alpha 2a$ - and  $\alpha 2c$ -AR were not detected in any of the samples. The staining of selected molecules of the ECM revealed that the distribution of collagen II, collagen XII, COMP and decorin correlated with the expression of  $\beta 2$ -AR. An activation of the PKA- and ERK1/2-signalling pathways could be observed after stimulation with NE in human IVD cells.

In the present study, the existence and functionality of ARs in IVD-tissue was demonstrated for the first time. Differences in the AR-expression combined with changes in the extracellular matrix composition suggest that the sympathetic nervous system might play a

role in IVDD. The current demographic trend and the evoked economic burden underline the importance of further investigations on molecular mechanisms and of the resulting development of novel therapy options for the treatment of IVDD. Thereby, these issues are and remain key topics of modern orthopaedic fundamental research.

## 2. Abkürzungsverzeichnis

AF	Annulus fibrosus
AR	Adrenoceptor
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
DCN	Decorin
ECM	Extracellular matrix
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
GPCR	G protein-coupled receptor
IVD	Intervertebral disc
IVDD	Intervertebral disc degeneration
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NE	Norepinephrine
NP	Nucleus pulposus
PCR	Polymerase chain reaction
PKA	Protein kinase A
RT-PCR	Reverse-transcriptase PCR
WT	Wildtype mice



### 3. Übergreifende Zusammenfassung

#### 3.1 Einleitung

Die Bandscheibendegeneration (IVDD) ist ein oft beschriebener, jedoch noch nicht in allen Details verstandener Prozess.<sup>1</sup> Insbesondere in der Häufigkeit des Auftretens als auch in der Schwere der Folgen begründet sich die Relevanz der Thematik.

Die IVDD ist eine der Hauptursachen für Rückenschmerzen,<sup>10</sup> deren Lebenszeitprävalenz mit 40% angegeben wurde.<sup>11</sup> Dieses Problem wird sich wahrscheinlich in den folgenden Jahrzehnten durch eine alternde Gesellschaft weiter verstärken.<sup>12</sup> Andere Folgesymptome einer Schädigung der Bandscheibe (IVD) können ausstrahlender Schmerz, Muskelschwäche, Taubheit und Missempfindungen sein.<sup>13</sup> Außerdem spiegelt sich die Bedeutung der Thematik darin wider, dass Dorsalgien im Lendenwirbelbereich der Hauptverursacher von mit Krankheit/Behinderung verbrachten Lebensjahren (years lived with disability, YLD) in 45 von 50 Industriestaaten sind.<sup>14</sup> In den letzten Jahrzehnten versuchte man sich auf verschiedenste Art der Ätiologie und den Risikofaktoren dieser Erkrankung zu nähern. So konnten unter anderem Rauchen und Diabetes als Risiko steigend<sup>15</sup> und in einer sehr detailorientierten Studie, das Fahren schwedischer und japanischer Autos als Risiko senkend<sup>16</sup> identifiziert werden. Jedoch bleiben grundlegende molekulare Mechanismen noch unverstanden und die Ursache wird weiterhin als multifaktoriell beschrieben.<sup>13</sup> Somit wird deutlich, dass ihrer Entschlüsselung eine entscheidende Rolle zukommt, um möglicherweise sowohl präventiv als auch mit neuen Therapieansätzen agieren zu können.

Da es sich bei der Bandscheibe ähnlich wie beim Gelenkknorpel um ein bradytrophes Gewebe handelt, das nur eine sehr eingeschränkte Regenerationsfähigkeit aufweist,<sup>3,17</sup> ist bisher der Goldstandard in der Therapie die Spondylodese,<sup>18,19</sup> eine Operationstechnik bei der es durch Versteifung benachbarter Segmente zur Stabilisierung der Wirbelsäule kommen soll.<sup>8</sup>

Im Jahr 2011 wurde die Spondylodese in den USA fünfmal häufiger vorgenommen als noch 1990.<sup>8</sup> Hierbei besteht jedoch eine Rate von ca. 12 bis 20% an frühen postoperativen Komplikationen,<sup>20</sup> was die Notwendigkeit der Entwicklung alternativer Behandlungsmethoden der IVDD unterstreicht, für die bislang jedoch wenig Evidenz vorliegt.<sup>21</sup>

Um das Folgende besser verständlich zu machen, soll nun kurz die Pathophysiologie der IVDD betrachtet werden. Im Wesentlichen baut sich die Bandscheibe aus zwei Teilen mit differierendem embryologischem Ursprung auf<sup>3</sup>: außen findet sich der ringförmige,

faserknorpelige Annulus fibrosus und in dessen Innerem der gallertige Nucleus pulposus. Diese zeigen sowohl zellmorphologisch als auch in der Zusammensetzung ihrer extrazellulären Matrix signifikante Unterschiede. Während sich die Zellen des AF spindelförmig präsentieren und damit eher Fibroblasten ähneln, sind Zellen des NP oval und erinnern an Chondrozyten.<sup>22</sup> In Folge der Bandscheibendegeneration kommt es jedoch zu Veränderungen der histologischen und zellfunktionellen Eigenarten sowie der Zusammensetzung der ECM sowohl im AF als auch im NP. In letzterem zeigt sich eine signifikante Verringerung der Kollagen II-Synthese.<sup>7,23</sup> Im NP führt zudem der häufig beschriebene Verlust an Proteoglykanen, die durch ihre negative Ladung und die dadurch verursachte Hydrophilie maßgeblich zur stoßdämpfenden Funktion der Bandscheibe beitragen,<sup>24</sup> zu einer verringerten mechanischen Stabilität.<sup>23</sup> Im AF ist ebenfalls eine Veränderung des zellulären Phänotyps zu beobachten: die normalerweise spindelförmigen Zellen nehmen eine chondrozytenähnliche Morphologie an.<sup>25</sup> Ein Anstieg der Kollagen II-Konzentration im AF ist eine typische Veränderung auf Ebene der extrazellulären Matrix zu Beginn der Bandscheibendegeneration.<sup>25</sup>

Einleitend werden auch kurz Grundlagen des vegetativen Nervensystems Erwähnung finden. Dieses lässt sich klassischerweise in den Sympathikus und den Parasympathikus einteilen, die in Form einer gegenläufigen Regulation präzise die Funktionen des Körpers zu steuern vermögen.<sup>26</sup> Der Parasympathikus entfaltet seine beruhigende und verdauungsfördernde Wirkung über muskarinerge Acetylcholinrezeptoren, während der Transmitter des postganglionären Neurons des Sympathikus in den allermeisten Fällen das auf Adrenozeptoren wirkende Noradrenalin ist, durch das Stress-, Kampf- und Fluchtreaktionen vermittelt werden.<sup>26</sup> Durch die Erforschung dieser Regulationsmechanismen konnten bereits abseits der Orthopädie effektive und fest etablierte Behandlungsmethoden entwickelt werden, wie in der Therapie des Asthma bronchiale und der arteriellen Hypertonie.<sup>27</sup> In den vergangenen Jahren wurde die Relevanz des peripheren sympathischen Nervensystems ebenfalls bei der De- und Regeneration von Gelenkgewebe<sup>4</sup> wie dem artikulären Knorpel deutlich.<sup>5,6</sup>

Das Schlüsselenzym zur Synthese des Noradrenalins, dem zentralen Neurotransmitter des zweiten Neurons des Sympathikus, sowie anderer Katecholamine ist die Tyrosinhydroxylase.<sup>28</sup> Ihr Produkt, das hydroxylierte Tyrosin, oder auch L-DOPA genannt, ist die Vorstufe zur Synthese von Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin. Seine Wirkung entfaltet Noradrenalin als peripherer Hauptneurotransmitter über G-Protein-gekoppelte adrenerge Rezeptoren (ARs), von welchen bisher neun Subtypen bekannt sind, die in  $\alpha$ - und

$\beta$ -ARs unterteilt werden:  $\alpha$ 1a-,  $\alpha$ 1b-,  $\alpha$ 1d-,  $\alpha$ 2a-,  $\alpha$ 2b-,  $\alpha$ 2c-,  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- und  $\beta$ 3-AR. Diese Rezeptoren leiten einen eintreffenden Stimulus hauptsächlich über den ERK1/2- und PKA-Signalweg weiter.<sup>6</sup> Bei Kontakt von  $\beta$ -ARs mit NE kommt es zur Aktivierung der  $G_{\alpha s}$ -Untereinheit, welche das Enzym Adenylatcyclase stimuliert und über einen Anstieg der cAMP-Konzentration schließlich zur PKA-vermittelten Phosphorylierung von Proteinen des Zellstoffwechsels führt.<sup>29</sup> Ein alternativer Signalweg nutzt  $\beta$ -Arrestin, ein Regulatorprotein, das die Interaktion zwischen G-Protein und Rezeptor in der Regel unterbindet und diesen so desensitiviert, zur Aktivierung von ERK1/2.<sup>30,31</sup>

Vermittelt durch  $\alpha$ 2a- und  $\beta$ 2-ARs zeigte Noradrenalin bei Chondrozyten und mesenchymalen Stammzellen eine katabole Wirkung. Beispielsweise hemmt NE in Chondrozytenprogenitorzellen die Produktion von wesentlichen Komponenten der ECM wie Kollagen-Typ II und Glykosaminoglykanen.<sup>32</sup>

Der Einfluss des Sympathikus auf die Bandscheibendegeneration hingegen wurde bislang nur unzureichend untersucht. Allein das Einwachsen von Nervenfasern wurde näher betrachtet, wobei das Augenmerk stärker auf sensorischen als auf sympathischen/autonomen Nervenfasern lag.<sup>33</sup> Erst 2016 berichteten Barczewska et al. erstmalig von der Existenz sympathischer Nervenfasern in degenerierten IVDs.<sup>34</sup>

### **3.2 Methoden**

In der Folge soll nur eine orientierende Darstellung der verwendeten Methoden erfolgen, während Details der vorgelegten Publikation entnommen werden können. Es werden ausgewählte Prozesse der Weiterentwicklung und die Etablierung der Methoden näher beleuchtet und Zusammenhänge, die den Rahmen der Publikation gesprengt hätten, erläutert.

#### **Klassifikation der Proben**

Die Bandscheibenproben wurden anhand ihres prä- und intraoperativ bestimmten Degenerationsgrades eingestuft. Hierfür fand eine vierstufige Klassifikation Anwendung, die sich sowohl an der Pfirrmann- als auch an der Modic-Klassifikation orientierte<sup>35-37</sup> und in ähnlicher Form auch von Tiaden et al. beschrieben wurde (siehe folgende Tabelle).<sup>38</sup> Da es der Zustand der Gewebeproben nicht zuließ, konnte nicht eindeutig zwischen AF und NP unterschieden werden und das Verhältnis variierte höchstwahrscheinlich je nach Probe.<sup>39</sup>

Bis zum heutigen Tag besteht lediglich die Möglichkeit AF und NP im Anschluss an die Probenentnahme aufgrund makroskopischer Eigenschaften zu differenzieren und so eine bestmögliche Trennung der unterschiedlichen Zelltypen zu erreichen.<sup>40</sup> Molekulare Marker-

Gene eröffnen nach Isolation zwar die Möglichkeit die vorherige makroskopische Separation zu prüfen, doch es bestehen nur für gesundes humanes NP-Gewebe signifikante Unterschiede.<sup>41</sup> Auf die vorliegenden zum Teil stark degenerierten Proben ließe sich dies nicht anwenden.

Kupka et al. <sup>42</sup>	Pfirrmann et al. <sup>35</sup>	Modic et al. <sup>37</sup>	Tiaden et al. <sup>38</sup>
<b>Grad I</b> Nicht-/moderat degeneriert	<b>Grade I</b> Homogen hell weiß	-	<b>Grade 1</b> Nicht-degeneriert, normale Bandscheibenhöhe
	<b>Grade II</b> Inhomogen weiß, horizontale Banden möglich	-	
<b>Grad II</b> Moderat degeneriert	<b>Grade III</b> Inhomogen grau, unklare Abgrenzung zw. AF/NP	<b>Typ I</b> Knochenmarksödem und entzündliche Veränderung	<b>Grade 2</b> milde Degeneration, geringe Höhenminderung
<b>Grad III</b> Erheblich degeneriert	<b>Grade IV</b> Inhomogen grau/schwarz, unmögliche Abgrenzung zw. AF/NP	<b>Typ II</b> Fettige Degeneration des roten Knochenmarks	<b>Grade 3</b> moderate Degeneration, moderate Höhenminderung
<b>Grad IV</b> Massiv degeneriert	<b>Grade V</b> Bandscheibenhöhe kollabiert	<b>Typ III</b> Sklerose des subchondralen Knochens	<b>Grade 4</b> schwere Degeneration, Bandscheibenhöhe kollabiert

**Tabelle 1:** Übersicht der Klassifikationssysteme. Zu beachten ist, dass die Zuordnung der Modic- und Pfirrmann- Klassifikation auf der Basis von Studien erfolgt, die eine häufige Übereinstimmung der Grade fanden.<sup>36</sup> Abweichungen sind möglich.

## Isolation der mRNA

Als erster Arbeitsschritt erfolgte die Isolation von mRNA aus Bandscheibengewebe: sowohl Knorpel als auch Bandscheiben zeichnen sich, durch einen hohen Gehalt an Proteoglykanen aus.<sup>43,44</sup> Da es sich hierbei um große, negativ geladene Makromoleküle handelt, lassen sich diese bei der Aufreinigung nur schwer von der mRNA trennen, die sehr ähnliche chemische Eigenschaften aufweist.<sup>45</sup> Während für Knorpel bereits effektive Methoden entwickelt wurden,<sup>46-48</sup> stellt sich die Situation bei Bandscheiben durch den im Vergleich zum Knorpelgewebe höheren Gehalt an Proteoglykanen und die sehr geringe Zahl von etwa 4000 Zellen pro mm<sup>3</sup> schwieriger dar.<sup>49,50</sup> Die geringe Zellkonzentration und die hierdurch bedingte niedrige mRNA-Menge sollte durch eine größere als vom Protokoll standardmäßig vorgesehene Gewebemenge ausgeglichen werden. Außerdem wurde ein Kit verwendet, das mit kleinen Säulen arbeitet, die mRNA spezifisch binden. Derartige Systeme ermöglichen eine besonders effiziente und kontaminationsfreie Isolation.<sup>51,52</sup>

Der Einsatz von Pronase zum Vorverdau wäre im vorliegenden Fall nicht zielführend gewesen, da eine Analyse der Rezeptoren auf Proteinebene aufgrund einer möglichen Proteolyse unmöglich geworden wäre.<sup>53</sup> Die faserknorpelige, zähe Konsistenz der Bandscheiben, die für deren mechanische Aufgaben *in vivo* unabdingbar ist, beeinträchtigte ebenfalls die Zerkleinerung, was weitere Veränderungen des Protokolls nötig machte.

Im Zusammenhang mit der Tatsache, dass es sich bei mRNA um ein temperaturempfindliches Molekül handelt, welches besonderer Sorgfalt in der Behandlung bedarf,<sup>54</sup> musste der erste Schritt, die Zerkleinerung des Gewebes, modifiziert werden. Das Gefrieren mit flüssigem Stickstoff (-196°C) und das Zerstoßen mit dem Mörser waren bei der kleinen Gewebemenge nicht möglich, da die Probe schnell wieder auftaute und eine adäquate Homogenisierung verhinderte. Daher wurde zunächst der Gewebehomogenisator „Precellys“ (VWR, Darmstadt, Hessen, Deutschland) als Alternative erprobt. Ein derartiges Vorgehen wurde unter anderem von Peeters et al. für diese Anwendung empfohlen.<sup>55</sup>

Durch verstärkte Hitzeentwicklung wurde die mRNA vermutlich geschädigt, was zu nicht eindeutigen Gelbanden der ARs und damit zu nicht auswertbaren Ergebnissen der PCR führte. Final wurde der Dispergierer „Polytron 1200 E“ verwendet, dessen rotierendes Messer die Proben besser erfassen konnte, aber erst nachdem ein spezielles Reaktionsgefäß gefunden war, welches keine unerreichbaren Winkel mehr für die Arbeitsspitze des Polytron aufwies.

Erste PCR-Versuche zeigten auch hier keine eindeutigen AR-Banden. Deshalb kam eine zirkumferente permanente Kühlung während des Prozesses zum Einsatz. Diese führte nun zu zufriedenstellenden PCR Ergebnissen, wobei die Intensität der Banden noch recht gering war. Die Anzahl der PCR-Zyklen wurde daraufhin auf 40 erhöht. Banden, die nach 40 Zyklen nicht detektierbar sind, sprechen für ein physiologisch nicht relevantes Ausmaß der Expression.<sup>56</sup> Mit all diesen Modifikationen konnten schließlich konstant, qualitativ zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden.

### **Zellkultur im Monolayer**

Ein weiterer wichtiger Bestandteil dieser Arbeit war die Etablierung einer Methode zur Kultivierung von Bandscheibenzellen. Nach initialer ausgiebiger Literaturrecherche wurde zunächst eine nicht-enzymatische Methode der Zellisolierung nach Tang et al. erprobt.<sup>57</sup> Dem gegenüber stand der gängige Verdau durch Pronase und Kollagenase 1 und 2.<sup>58,59</sup> Dieser kann zwar die Zellmigration beschleunigen und die Zeit bis zur Konfluenz verkürzen, da es jedoch durch den Einsatz von Enzymen sowohl zu Beeinflussung der RNA-Expression als auch zu einer Proteolyse der Oberflächenproteine der Zellen kommen kann,<sup>54</sup> wurde er nicht angewendet. Außerdem wurden Zellen nach höchstens einmaliger Passage zur weiteren Analyse genutzt, da es sonst wie bei Schubert<sup>60</sup> und Kluba<sup>61</sup> beschrieben, zur Dedifferenzierung der Zellen und somit zu verfälschten Ergebnissen kommen kann.

Die Kultur- und Stimulationsbedingungen wurden entsprechend den physiologischen Parametern angepasst. Die Sauerstoffkonzentration ist mit 5% im Gewebe der Bandscheiben

außerordentlich gering und beeinflusst unter anderem die Expression von Bestandteilen der ECM.<sup>62</sup> Das verwendete Medium hat nur einen geringen Einfluss auf das Verhalten der Zellen, deshalb wurde das empfohlene und häufig eingesetzte Dulbeccos modified Eagle medium (DMEM/F12; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Hessen, Deutschland) mit 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Hessen, Deutschland) und 10% FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Hessen, Deutschland) verwendet.<sup>60</sup>

Untersuchungen im Gelenk zeigten, dass in der Synovialflüssigkeit NE-Konzentrationen von etwa  $10^{-8}$  bis  $10^{-6}$  M vorliegen.<sup>32</sup> Dabei handelt es sich um typische Konzentrationen außerhalb des synaptischen Spalts, in diesem liegen sie bei ca.  $10^{-6}$  bis  $10^{-4}$  M<sup>63</sup>. Entsprechend wurden auch die Mengen für die Stimulation in der vorliegenden Arbeit gewählt, um realitätsnahe Bedingungen zu erzeugen.

### **Immunhistochemische Untersuchung**

Zum Vergleich gesunder und degenerierter Bandscheiben wurde die Maus als Modellorganismus gewählt, da Geometrie und relative Belastbarkeit der Bandscheiben mit der des Menschen vergleichbar sind.<sup>64</sup> Die sogenannte SM/J-Maus entwickelt eine spontane Bandscheibendegeneration<sup>65</sup> und zeigt dabei viele Eigenschaften der menschlichen IVDD.<sup>9</sup> In der Literatur finden häufig Tiermodelle Verwendung,<sup>66-68</sup> die sich dadurch auszeichnen, dass die IVDD durch Punktion des AF ausgelöst wird. Von Nachteil ist in diesem Falle jedoch, dass einsetzende Reparaturmechanismen Ergebnisse verfälschen können.<sup>69</sup>

2 bis 5  $\mu\text{m}$  gelten bei der Verwendung der meisten Gewebe als adäquate Schnittdicke für immunhistologische Untersuchungen.<sup>70</sup> Dies verbessert zwar die Detailerkennbarkeit und Schärfe auf zellulärer und subzellulärer Ebene, negativ ist hingegen der mögliche Informationsverlust auf einem höheren Level, wie die Verteilung von ECM-Bestandteilen im Gewebe.<sup>71</sup> In der vorliegenden Versuchsreihe wurde deshalb eine Dicke von 8  $\mu\text{m}$  gewählt. Die grundsätzlichen Abläufe und verwendeten Materialien können der Publikation entnommen werden.

## **3.3 Diskussion**

### **AR-Expression im IVD-Gewebe**

Es war bereits bekannt, dass im Laufe der Bandscheibendegeneration vermehrt sympathische Nervenfasern in das Annulusgewebe einsprießen.<sup>3,34</sup> Andere Untersuchungen im Zusammenhang mit dem Einwachsen von Nervenfasern legten den Fokus vor allem auf

die Modulation des nozizeptiven Systems und die sensorischen Fasern als weniger auf den Einfluss des Sympathikus auf die Degeneration.<sup>33,72</sup> Die Existenz von ARs auf den Zellen der Bandscheibe wurde noch nie untersucht. Deshalb analysierten wir alle bekannten AR-Subtypen, die die Wirkung des Sympathikus im menschlichen Organismus vermitteln. Am Anfang stand der Nachweis auf Genexpressions-Ebene, der zu Tage förderte, dass nahezu alle Rezeptoren – mit Ausnahme von  $\alpha 1D$  und  $\beta 3$  – im Nativgewebe exprimiert werden (Figure 1, Table 1). Dies ist insofern relevant, da NE in Abhängigkeit vom Rezeptor, an den es bindet, unterschiedliche Reaktionen vermittelt. Ähnliche AR-Expressionsmuster sind bereits aus Gelenkknorpel bekannt, der erwiesenermaßen eine große Ähnlichkeit zum Bandscheibengewebe aufweist.<sup>17</sup> Dort zeigte sich beispielsweise, dass NE in hohen Konzentrationen vermittelt durch  $\beta 2$ -ARs die Proliferation von Chondrozyten hemmt, in niedrigen jedoch via  $\alpha 1$ -ARs steigert.<sup>73</sup> Zudem war beim Vergleich der Ergebnisse bei unterschiedlichen Degenerationsgraden festzustellen, dass sämtliche untersuchten ARs zu jedem Zeitpunkt zu finden waren. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass sympathische Fasern laut Barczewska et al. sowohl im gesunden als auch geschädigten IVD-Gewebe vorliegen und eine Reaktion auf ein Signal zu allen Zeitpunkten möglich sein sollte.<sup>34</sup>

### **Die Verteilung der ARs innerhalb der IVD**

Zwar mag die Analyse von Expressionsmustern auf RNA-Ebene ein erster wichtiger Schritt sein, die Expression der Rezeptoren auf Proteinebene ist aber weitaus aussagekräftiger, da nur sie das Vorhandensein funktioneller Rezeptoren bestätigt. Außerdem gibt die Lokalisation der Rezeptoren weiteren Aufschluss über mögliche Funktion und Mechanismen während der Degeneration. Deshalb wurden immunhistochemische Untersuchungen sowohl an humanen als auch murinen Proben zum Nachweis der  $\alpha 2a$ - und  $\beta 2$ -ARs durchgeführt. Dabei handelt es sich um die relevantesten, deren Bedeutung vielfach Erwähnung findet.<sup>74,73,6,32</sup>

Für  $\alpha 2a$  konnte nur eine schwache Färbung im Bereich des AF detektiert werden (Supplementary figure 2), während für  $\beta 2$  bei niedrigem Degenerationsgrad im inneren AF ein deutliches Signal nachweisbar war, das sich bei höherem Degenerationsgrad auch auf die äußeren Schichten und den NP ausdehnte (Figure 3, 5). Da auch nur in diesem Bereich sympathische Innervation nachgewiesen werden konnte, ergibt es durchaus Sinn, dass auch nur hier bei vorhandenem Neurotransmitter entsprechende Rezeptoren in der Membran vorliegen. Andererseits ist es im Sinne einer Adaptation möglich, dass es aufgrund andauernder Liganden-Exposition zur Internalisierung der Rezeptoren und damit zur Desensitivierung kommt.<sup>75,76</sup> Es lässt sich mutmaßen, dass die differierende Art der

mechanischen Belastung eine Rolle bei der Verteilung spielt (NP: hydrostatischer Druck, AF: Scherkräfte),<sup>77,10</sup> da bereits für  $\beta 2$  als auch für andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) ein mechanisch induzierter Einfluss auf das Geweberemodelling und die Homöostase beschrieben wurde.<sup>74,78,79</sup> Damit ließe sich die verstärkte Expression bei fortgeschrittener Degeneration erklären.

### **Die extrazelluläre Matrix**

Veränderungen in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix konnten im murinen Degenerationsmodell genauer betrachtet werden, indem ausgewählte Moleküle durch immunhistochemische Färbungen detektiert wurden (Figure 5).

Zunächst sei Kollagen-Typ II erwähnt. Das verstärkte Vorhandensein von Kollagen-Typ II ist ein typisches Zeichen der beginnenden IVDD, denn erst nach einem initialen kompensatorischen Anstieg kommt es zum Abfall der Synthese.<sup>25</sup> An den Stellen mit verstärkter Kollagen-Typ II Expression zeigte sich auch eine stärkeres  $\beta 2$ -Signal.

Kollagen-Typ XII tritt typischerweise in Wechselwirkung mit COMP und Fibrillen, die Kollagen-Typ I enthalten. Dadurch trägt es zur Organisation der extrazellulären Matrix bei und erhöht die mechanische Widerstandsfähigkeit des jeweiligen Gewebes, was beispielsweise im Gelenkknorpel von Bedeutung ist.<sup>80</sup> Die vermehrte Expression, die im vorliegenden Modell beobachtet wurde, spricht für eine mögliche Reaktion der Zellen, zur Förderung der Geweberegeneration, denn auch diese Funktion wird Kollagen-Typ XII zugeschrieben.<sup>81</sup> Insbesondere in dem der Bandscheibe eng verwandten Knorpelgewebe zeigte sich, dass Regionen die eine erhöhte Konzentration aufwiesen, auch durch eine organsiertere Fibrillenstruktur gekennzeichnet sind.<sup>82</sup>

Beim nicht-kollagenen ECM-Protein COMP handelt es sich um ein homopentameres Glykoprotein, das sich, wie der Name vermuten lässt, vor allem im Knorpel, aber auch im Knochen, in Blutgefäßen, Bändern und ebenso der Bandscheibe finden lässt.<sup>83</sup> Dort nimmt es wahrscheinlich ebenfalls stabilisierende Funktionen wahr.<sup>83</sup> Eine Verringerung des Signals, die besonders in Regionen mit höherer  $\beta 2$ -Expression auftrat, könnte also ein Zeichen der fortschreitenden Degeneration sein, da vermittelt durch genannten Rezeptor Matrixmetalloproteinase-13 induziert wird, die für den Abbau von COMP sorgt.<sup>84</sup> Dieser Prozess wurde sowohl für chondrogene mesenchymale Stammzellen, als auch Kardiofibroblasten beschrieben.<sup>85,86</sup>

Das kleine Leucin-reiche Proteoglycan Decorin bindet spezifisch verschiedene Kollagene (unter anderem Typ I und II) und reguliert hierdurch den Durchmesser der Fibrillen.<sup>87</sup> Die Existenz innerhalb der Bandscheibe wurde bereits vor über 25 Jahren beschrieben.<sup>88-90</sup> Im



speziellen wurde auch die perizelluläre Zunahme bereits für degenerierendes Knorpelgewebe gezeigt.<sup>91,92</sup> Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen wurde auch mit zunehmender Degeneration eine Zunahme der DCN-Konzentration im IVD-Gewebe beobachtet.<sup>89</sup>

### **Bandscheibenzellkultur**

Die Kultivierung der Bandscheibenzellen überschritt in unseren Versuchen nie eine maximale Kulturzeit von zwei Wochen, um zu verhindern, dass es zum Verlust zelltypspezifischer Eigenschaften kommt.<sup>43</sup> Trotzdem war festzustellen, dass die Expression von  $\alpha 1b$  und  $\beta 2$  in Kultur im Vergleich zum Nativgewebe leicht erhöht war. (Figure 6 A, Supplementary figure 4). Eben jenes Phänomen trat auch bei Knorpelzellen nach 7 Tagen in Monolayer-Kultur auf und lässt sich dadurch erklären, dass bereits zu diesem frühen Zeitpunkt eine Dedifferenzierung einsetzt.<sup>43,61</sup> Derartige Vorgänge laufen auch bei der Knorpel-Degeneration ab und wahrscheinlich auch bei der IVDD<sup>60</sup> - sie werden Gegenstand zukünftiger Forschung sein. Insgesamt ist aber festzustellen, dass die Expressionsmuster von Gewebe und Zellen in Kultur weitgehend übereinstimmten, somit ist davon auszugehen, dass es sich um ein realitätsnahes Modell handelt, dass die Reaktion der Zellen korrekt widerspiegelt. Es lässt sich also nicht nur die Existenz der ARs beweisen, sondern auch eine mit NE hervorgerufene Signalantwort via ERK1/2 und PKA im Stimulationsversuch ist möglich und aussagekräftig. Derartige Reaktionen stimmen mit Studien zu Chondrozyten des Gelenkknorpels<sup>5</sup> und auch synovialen Stammzellen<sup>4</sup> überein. Aufgrund der Ähnlichkeit zum Gewebe der Bandscheiben sind Rückschlüsse auf das Verhalten der darin enthaltenen Zellen möglich.<sup>17</sup> Die vorliegenden Ergebnisse lassen noch keine finale Schlussfolgerung zu, öffnen aber die Tür für weitere Versuchsreihen.

### **3.4 Präsentationen und Ausblick**

Die vorliegende Arbeit beschreibt zum ersten Mal die Existenz von ARs in IVD-Gewebe und lässt die Annahme zu, dass der Sympathikus bzw. Noradrenalin an molekularen Vorgängen und zellulärem Signaling, die für die IVDD von Belang sind, beteiligt sind. Um die genaue Funktion der Rezeptoren weiter zu konkretisieren sollen Arbeiten zur mechanistischen Beteiligung an der IVDD folgen. Zunächst sollen, analog zu Studien an Chondrozyten<sup>5</sup> oder Stammzellen des Knochenmarks,<sup>93</sup> spezifische Antagonisten und Agonisten der Rezeptoren zur Stimulation verwendet werden. Daraus lassen sich anschließend neue Erkenntnisse über mögliche Wege der Signalweiterleitung und von bedingten Veränderungen gewinnen.

Mehrere Autoren stellten bereits die Bedeutung inflammatorischer Prozesse und Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  im Kontext der Bandscheibendegeneration heraus.<sup>94,95</sup> Zusammengeführt mit dem Wissen über die Wirkung von Adrenozeptoren im Knorpel unter entzündlichen Bedingungen<sup>96,43</sup> spricht dies für einen Ansatz, der ähnliches auch bei Zellen der IVD untersucht, wodurch neue Einblicke in die Pathophysiologie der IVDD möglich wären. Außerdem sollte in Zukunft auch die mechanische Komponente stärkere Beachtung finden. Als Teil der Wirbelsäule ist die Bandscheibe nicht nur statischer, sondern auch wechselnder mechanische Belastung ausgesetzt<sup>77</sup>, die auf zellulärer Ebene als Stimuli dienen und wie für andere Gewebe bereits gezeigt durch GPCRs Signale evozieren könnten.<sup>10</sup> Zudem ist ein Zusammenhang zwischen der  $\beta$ 2-AR-Expression und mechanischer Belastung denkbar.<sup>74</sup> Hier offenbart sich erneut das große Potential für die künftige Forschung.

„salus aegroti suprema lex“ – getreu diesem Gebot sei erwähnt, dass, auch wenn der Weg noch weit erscheint, die Entwicklung neuer Therapiemaßnahmen das Ziel sein wird. Bereits jetzt arbeiten Nakafero et al. an einer prospektiven Kohortenstudie, welche die Auswirkungen von  $\beta$ -Blockern auf die Entstehung von Osteoarthritis in Knie- und Hüftgelenken analysiert.<sup>97</sup> Diese klinische Betrachtung ist eine wichtige Fortführung und Anwendung der in der Grundlagenforschung errungenen Erkenntnisse.

Großes Interesse an dem Thema dieser Arbeit äußert sich darin, dass schon im Juni 2018 Zwischenergebnisse auf dem European Cells and Materials Congress XVIII in Davos als Poster präsentiert werden konnten. Zuletzt wurde im November auch ein Poster auf dem 14. Deutschen Wirbelsäulenkongress in München vorgestellt – ein Abstract für einen Vortrag beim Annual Meeting der Deutschen Gesellschaft für Matrixbiologie (März 2020) wurde zwar angenommen, jedoch musste die Veranstaltung aufgrund der Covid-19-Pandemie abgesagt werden. Eine große Ehre wurde dem Projekt zuteil, als ein Postervortrag des Erstautors auf dem deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2019 in Berlin mit dem Posterpreis im Bereich Grundlagenforschung prämiert wurde.

In der Summe ergibt sich ein Bild, das den hohen Stellenwert der Thematik unterstreicht und bedingt durch die aktuelle demographische Entwicklung die Erforschung molekularer Mechanismen und daraus resultierender innovativer Behandlungsmethoden zu Kardinalfragen moderner orthopädischer Grundlagenforschung macht.

#### 4. Übersicht der zur Veröffentlichung angenommenen Manuskripte

Kupka, J.; Kohler, A.; El Bagdadi, K.; Bostelmann, R.; Brenneis, M.; Fleege, C.; Chan, D.; Zaucke, F.; Meurer, A.; Rickert, M.; Jenei-Lanzl, Z. Adrenoceptor Expression during Intervertebral Disc Degeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2085.

## **5. Zur Veröffentlichung angenommenes Manuskript**



Article

# Adrenoceptor Expression during Intervertebral Disc Degeneration

Johannes Kupka <sup>1</sup>, Annika Kohler <sup>1</sup>, Karima El Bagdadi <sup>1</sup>, Richard Bostelmann <sup>2</sup> , Marco Brenneis <sup>1</sup>, Christoph Fleege <sup>1</sup>, Danny Chan <sup>3</sup>, Frank Zaucke <sup>1</sup> , Andrea Meurer <sup>1</sup>, Marcus Rickert <sup>1,†</sup> and Zsuzsa Jenei-Lanzl <sup>1,\*,†</sup>

<sup>1</sup> Dr. Rolf M. Schwiete Research Unit for Osteoarthritis, Orthopedic University Hospital Friedrichsheim gGmbH, 60528 Frankfurt/Main, Germany; johannes.kupka@friedrichsheim.de (J.K.); annika.kohler@friedrichsheim.de (A.K.); karima.elbagdadi@friedrichsheim.de (K.E.B.); marco.brenneis@friedrichsheim.de (M.B.); christoph.fleege@friedrichsheim.de (C.F.); frank.zaucke@friedrichsheim.de (F.Z.); andrea.meurer@friedrichsheim.de (A.M.); marcus.rickert@friedrichsheim.de (M.R.)

<sup>2</sup> Clinic of Neurosurgery, Heinrich Heine University, 40225 Duesseldorf, Germany; richard.bostelmann@med.uni-duesseldorf.de

<sup>3</sup> School of Biomedical Sciences, The University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong, China; chand@hku.hk

\* Correspondence: zsuzsa.jenei-lanzl@friedrichsheim.de; Tel.: +49-69-6705-408

† These authors contributed equally to this work.

Received: 14 January 2020; Accepted: 7 March 2020; Published: 18 March 2020



**Abstract:** Healthy and degenerating intervertebral discs (IVDs) are innervated by sympathetic nerves, however, adrenoceptor (AR) expression and functionality have never been investigated systematically. Therefore, AR gene expression was analyzed in both tissue and isolated cells from degenerated human IVDs. Furthermore, human IVD samples and spine sections of wildtype mice (WT) and of a mouse line that develops spontaneous IVD degeneration (IVDD, in SM/J mice) were stained for ARs and extracellular matrix (ECM) components. In IVD homogenates and cells  $\alpha 1a$ -,  $\alpha 1b$ -,  $\alpha 2a$ -,  $\alpha 2b$ -,  $\alpha 2c$ -,  $\beta 1$ -, and  $\beta 2$ -AR genes were expressed. In human sections,  $\beta 2$ -AR was detectable, and its localization parallels with ECM alterations. Similarly, in IVDs of WT mice, only  $\beta 2$ -AR was expressed, and in IVDs of SM/J mice,  $\beta 2$ AR expression was stronger accompanied by increased collagen II, collagen XII, decorin as well as decreased cartilage oligomeric matrix protein expression. In addition, norepinephrine stimulation of isolated human IVD cells induced intracellular signaling via ERK1/2 and PKA. For the first time, the existence and functionality of ARs were demonstrated in IVD tissue samples, suggesting that the sympathicus might play a role in IVDD. Further studies will address relevant cellular mechanisms and thereby help to develop novel therapeutic options for IVDD.

**Keywords:** intervertebral disc (IVD); IVD degeneration (IVDD); sympathicus; adrenoceptors

## 1. Introduction

Degenerative changes of the intervertebral disc (IVD) represent a severe health issue resulting in devastating and disabling symptoms like pain, muscle weakness, numbness, and dysesthesia of the upper and lower limbs [1]. In particular, low back pain is the leading cause of years lived with disability in developed and developing countries [2]. Like articular cartilage tissue, the almost completely avascular and aneural IVD exhibits very limited or no regeneration capacity [3,4]. The standard treatment option of advanced IVD degeneration (IVDD) is surgical spinal fusion in the form of a spondylodesis with an increased frequency of 500% between 1990 and 2011 in the USA [5].

The IVD consists of two main parts with different embryologic origins: The ligamentous annulus fibrosus (AF) and the gelatinous nucleus pulposus (NP) [6]. It is well known that multiple changes in

cellular processes, matrix composition, and functionality occur during the development of IVDD [3]. For example, a decreasing proteoglycan concentration leads to reduced hydration of the NP and lowers the mechanical resistance of the IVD [7]. Furthermore, in the AF, there is a shift from a fibrocytic to a chondrocytic phenotype accompanied by increased type II collagen expression [8]. There is evidence that IVDD pathogenesis is a multifactorial process influenced by age, gender, environmental, and hereditary factors [3,8–10]. Even though our knowledge of the mechanisms leading to disc destruction has increased over the past years, the detailed etiology and pathophysiology are not properly understood.

During the past decades, the role of peripheral sympathetic nerve fibers and their neurotransmitters have gained in importance with regard to degeneration and regeneration of joint tissues like articular cartilage [11]. The key enzyme of the sympathicus is tyrosine hydroxylase (TH), which controls the biosynthesis of the major catecholamines like, e.g., norepinephrine (NE) [12]. NE acts dose-dependently via different subtypes of alpha and beta-adrenoceptors (ARs, namely  $\alpha 1a$ ,  $\alpha 1b$ ,  $\alpha 1d$ ,  $\alpha 2a$ ,  $\alpha 2b$ ,  $\alpha 2c$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ , and  $\beta 3$ ), which results in activation of two major intracellular signaling pathways, ERK1/2 and PKA [11,13]. Studies on chondrocytes and chondrogenically differentiating mesenchymal stem cells demonstrated that sympathetic neurotransmitters, especially norepinephrine (NE), influence cartilage physiology and pathophysiology in a catabolic manner and mainly via  $\alpha 2a$ - and  $\beta 2$ -AR [11]. Although there are many analogies between human intervertebral discs and articular joints [4], only few studies investigated sympathetic nerve fibers, sympathetic neurotransmitters, or their receptors in the context of IVDD. Recently, nerve fiber ingrowth into the IVD during degeneration was observed, however, these studies focused only on sensory nerves [14], on AR expression in dorsal root ganglia [15], or on pain mechanisms [14,16]. The only study on sympathetic nerve fibers in the IVD was performed recently by Barczewska et al., showing that sympathetic nerve fibers are present in lumbar IVDs with pathological changes [17]. At present, still no data exists investigating the expression of ARs in the IVD, which represents a prerequisite for sympathetic neurotransmitter action.

Therefore, the aim of this study was to characterize the expression profile of all AR subtypes in IVD tissue, as well as in isolated IVD cells, to specify their localization, and to correlate this expression profile with the grade of degeneration. In addition, the expression of TH, the rate limiting enzyme of NE biosynthesis was examined.

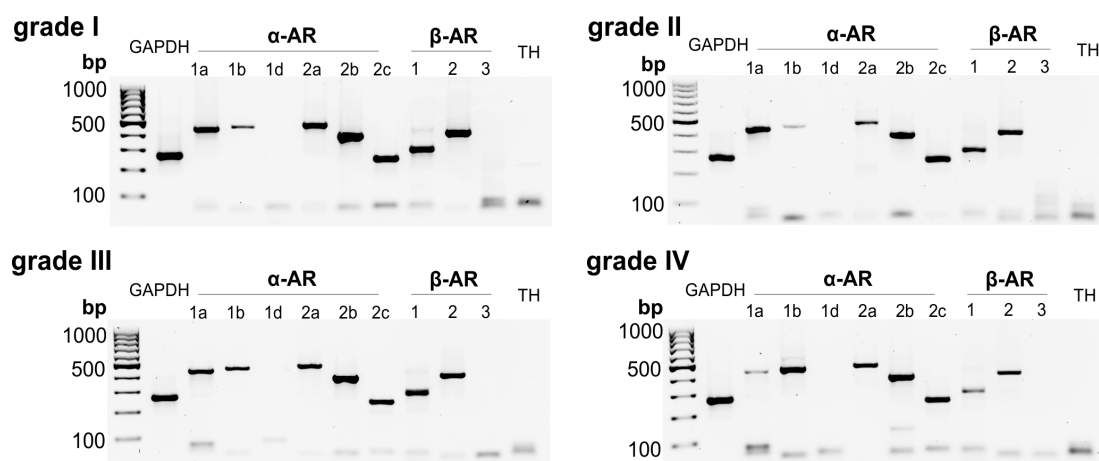
## 2. Results

### 2.1. AR and TH Gene Expression in Human IVD Tissue Samples

In human IVD tissue homogenates, different AR subtypes were detected: The receptors  $\alpha 1a$ - (97.7% of samples),  $\alpha 1b$ - (46.5%),  $\alpha 2a$ - (90.7%),  $\alpha 2b$ - (97.7%),  $\alpha 2c$ - (97.7%),  $\beta 1$ - (100%), and  $\beta 2$ -AR (100%) were highly expressed (Figure 1, Table 1). In contrast,  $\alpha 1D$ -,  $\beta 3$ -AR, and TH genes were not detected (Figure 1). No fundamental changes were visible, depending on the degree of degeneration. Only a slight decrease in the receptors  $\alpha 1a$ -,  $\alpha 2b$ ,  $\beta 1$ -, and  $\beta 2$ -AR was observed, while the expression of  $\alpha 1b$ -AR slightly rose with increasing degree of degeneration (Figure 1).

**Table 1.** AR gene expression distribution in human IVD tissues with different degrees of degeneration ( $n = 43$ ).

AR Subtype	Total ( $n = 43$ )		Grade I ( $n = 5$ )		Grade II ( $n = 9$ )		Grade III ( $n = 21$ )		Grade IV ( $n = 8$ )	
	$n$	%	$n$	%	$n$	%	$n$	%	$n$	%
$\alpha 1a$	42	97.7%	5	100%	8	88.9%	21	100%	8	100%
$\alpha 1b$	20	46.5%	2	40%	5	55.6%	8	38.1%	5	62.5%
$\alpha 2a$	39	90.7%	4	80%	7	77.8%	21	100%	7	87.5%
$\alpha 2b$	42	97.7%	4	80%	9	100%	21	100%	8	100%
$\alpha 2c$	42	97.7%	5	100%	9	100%	20	95.2%	8	100%
$\beta 1$	43	100%	5	100%	9	100%	21	100%	8	100%
$\beta 2$	43	100%	5	100%	9	100%	21	100%	8	100%



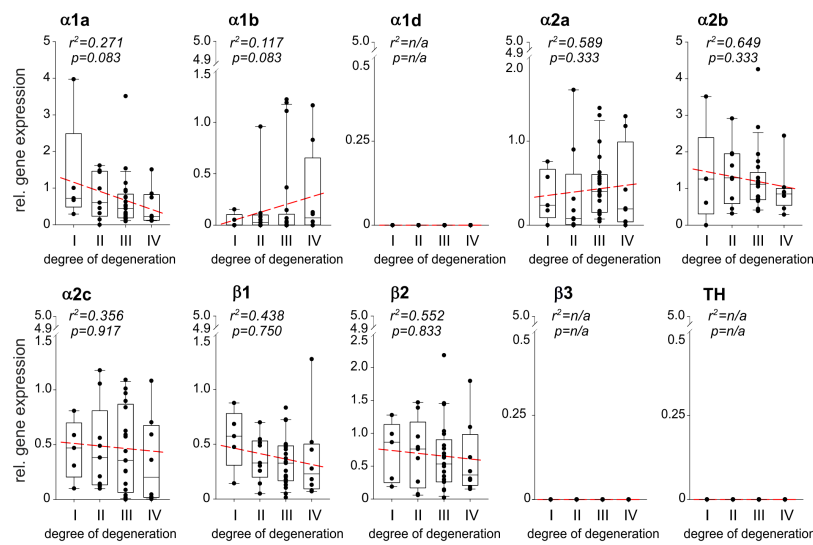
**Figure 1.** Adrenoceptor (AR) and tyrosine hydroxylase (TH) gene expression in human intervertebral disc (IVD) tissue analyzed by RT-PCR. Gene expression of all known AR subtypes as well as of TH in human IVD tissue samples with different degree of degeneration (representative pictures of human IVD samples; 4-grade classification scale: Non-/moderately (grade I), moderately (grade II), significantly (grade III), and massively degenerated (grade IV) ( $n = 43$ )).

### 2.2. Correlation between AR and TH Gene Expression and the Degree of IVD Degeneration

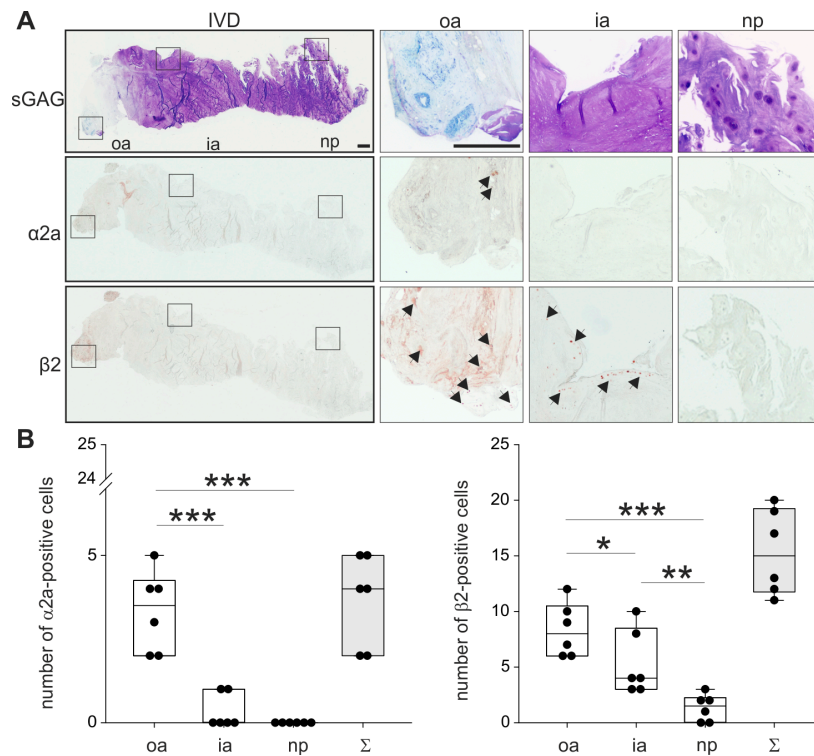
Relative AR gene expression levels during IVDD were calculated and correlations were performed with the degree of degeneration ( $n = 43$ ). Several AR genes were expressed at any stage of IVDD, the  $\alpha 1a$ -,  $\alpha 1b$ -,  $\alpha 2a$ -,  $\alpha 2b$ -,  $\alpha 2c$ -,  $\beta 1$ -AR, and  $\beta 2$ -AR (Figure 2). The expression of  $\alpha 1a$ -,  $\alpha 2b$ -,  $\alpha 2c$ -,  $\beta 1$ -AR, and  $\beta 2$ -AR increased by trend with the degree of degeneration, however, no significant correlation was observed (Figure 2). In contrast,  $\alpha 1b$ - and  $\alpha 2a$ -AR gene expression slightly but not significantly decreased with the degree of degeneration (Figure 2). The ARs  $\alpha 1d$  and  $\beta 3$ , as well as TH, were not detected in any sample (Figure 2). No age- or gender-dependent differences were observed regarding AR or TH expression in human IVD samples.

### 2.3. Localization of ARs in Human Degenerated IVD Tissue

In order to analyze the localization of the two most relevant ARs described in the literature, human IVD sections with degeneration grade II were immunostained for  $\alpha 2a$ - and  $\beta 2$ -AR (no intact human IVD tissue was available with degeneration grades III or IV). Both ARs were detectable in the outer zone of AF, however,  $\alpha 2a$ -AR staining was not as intense as  $\beta 2$ -AR (Figure 3; respective isotype stainings are presented in Supplementary Figure S1). Furthermore,  $\beta 2$ -AR-positive cells were detected in the inner AF, while no  $\alpha 2a$ -AR staining was observed in this zone. In the NP, neither  $\alpha 2a$ -AR nor  $\beta 2$ -AR was detectable (Figure 3). The quantification of  $\alpha 2a$ - and  $\beta 2$ -ARs in 2 sections of 3 different donors confirmed this observation. In the outer annulus, significantly more cells were positive for  $\alpha 2a$ - ( $p = 0.04$ ) and  $\beta 2$ -AR ( $p < 0.001$ ) compared to the inner annulus and also to the nucleus ( $\alpha 2a$   $p < 0.001$  and  $\beta 2$ -AR  $p < 0.001$ ). In addition, significantly more  $\beta 2$ -AR-positive cells were counted in the inner annulus compared to the nucleus ( $p = 0.009$ ). In contrast, no significant differences were detected between  $\alpha 2a$ -positive cells between inner annulus and nucleus ( $p = 0.459$ ). We also performed a Western Blot to detect  $\beta 2$ -AR, because this AR was expressed at the highest level. However,  $\beta 2$ -AR could not be detected in human tissue samples (Supplementary Figure S5), possibly due to the low cell number and accordingly to the low cellular protein amount in the homogenates.



**Figure 2.** Correlation between AR and TH gene expression and the degree of IVD degeneration. Gene expression changes of the ARs as well as of the enzyme TH in different stages of IVD degeneration (gene expression level mean of stage I samples = 1 represented by the dashed-line). Each black circle represents an individual patient ( $n = 43$ ). Data are presented as box plots, where the boxes represent the 25th to 75th percentiles, the lines within the boxes represent the median, and the lines outside the boxes represent the 10th and 90th percentiles. The red dotted lines represent the linear regressions for each gene analyzed.



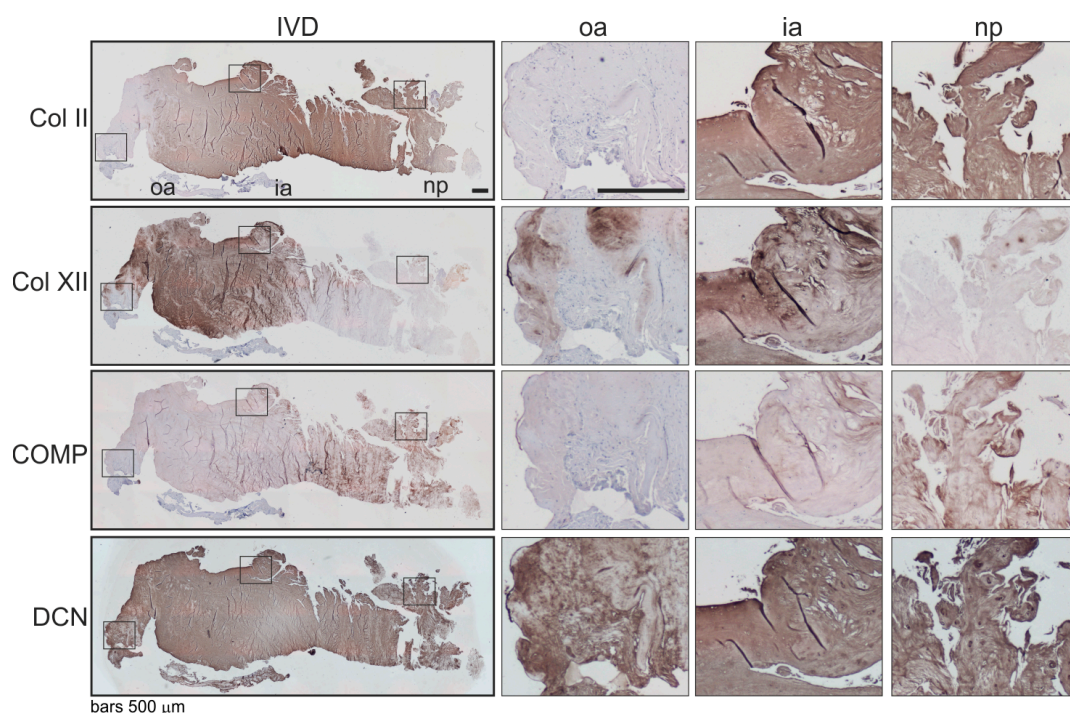
**Figure 3.** Localization and distribution of ARs. (A) Immunohistochemical analysis of the most prominent ARs ( $\alpha 2a$ -AR and  $\beta 2$ -AR, black arrows) in human IVD sections (bars 500  $\mu$ m). Squares in the left panel represent further magnified regions shown to the right ( $n = 3$ ). (B) The number of  $\alpha 2a$ - and  $\beta 2$ -positive cells in human IVD tissue ( $n = 3$ ). Each black circle represents the number of  $\alpha 2a$ - or  $\beta 2$ -positive cells per section of an individual patient (2 sections per patient analyzed). Data are presented as box plots, which are described in the legend to Figure 2. Significant  $p$ -values are presented as \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , or as \*\*\*  $p < 0.001$ .



Abbreviations: sGAG—sulfated glycosaminoglycans, oa—outer annulus, ia—inner annulus, np—nucleus pulposus,  $\Sigma$ —sum of positive cells in oa + ia + np.

#### 2.4. Associations of $\beta$ 2-AR Expression with Changes in ECM Expression in Human IVD Tissue

Associations of the expression level and localization of the  $\beta$ 2-AR with potential changes in the ECM expression were analyzed immunohistochemically. Since there were many analogies between human intervertebral discs and articular joints [4], we analyzed selected minor extracellular matrix proteins, which helped to mediate interactions between fibrils and other major matrix macromolecules and were, therefore, associated with articular cartilage degeneration [18] (type II—Col II, type XII collagen—Col XII, cartilage oligomeric matrix protein—COMP, decorin—DCN) [19–21]. In  $\beta$ 2-AR-positive IVD areas, type II collagen and COMP staining was clearly reduced compared to IVD zones without a  $\beta$ 2-AR signal (Figure 4). In contrast, strong type XII collagen and decorin staining were detected in  $\beta$ 2-AR-positive IVD areas (Figure 4).

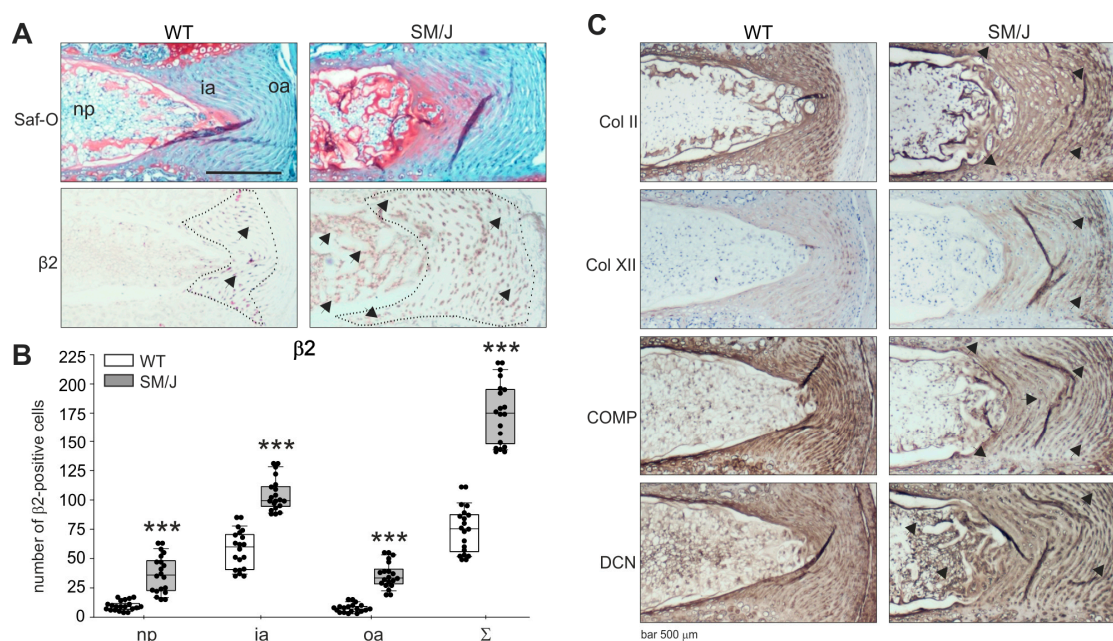


**Figure 4.** Localization and distribution of ECM proteins in human IVD tissue. Immunohistochemical analysis of type II collagen (Col II), type XII collagen (Col XII), cartilage oligomeric matrix protein (COMP) as well as decorin (DCN) in human IVD sections (bars 500  $\mu$ m). Squares in the left panel represent further magnified regions shown to the right ( $n = 3$ ). Abbreviations: oa—outer annulus, ia—inner annulus, np—nucleus pulposus,  $\Sigma$ —sum of positive cells in oa + ia + np.

#### 2.5. AR Protein Expression in Murine IVD Degeneration Models and Associations of ar Expression with Changes in ECM Expression in Murine IVD Tissue

Since no healthy or highly degenerated human IVD sections were available, it was not possible to observe AR expression changes between healthy and degenerated stages [22]. In addition, it was not possible to draw conclusions from representative histological images of only one degeneration grade. Therefore, murine IVD sections of transgenic mice were analyzed in order to compare degenerated with healthy IVD sections regarding AR expression. Using safranin-O/fast green staining, the structure and grade of degeneration were demonstrated. IVD sections of SM/J mice showed clear signs of IVDD [23], while no degenerative changes were observed in WT disc tissue (WT: C57Bl/6, see Section 4.2.) (Figure 5).  $\beta$ 2-AR was detectable in both WT and SM/J IVD sections. Similarly to the human IVD

tissue, most  $\beta$ 2-AR-positive cells were detected in the annulus fibrosus (Figure 5). In WT sections, this AR was predominantly expressed in the inner AF area. In contrast,  $\beta$ 2-AR expression in SM/J samples spread into the degenerating outer AF and NP (Figure 5).  $\alpha$ 2a-AR was not detectable, neither in WT nor in SM/J samples (Supplementary Figure S2; respective isotype stainings for  $\alpha$ 2a-AR and  $\beta$ 2-AR are presented in Supplementary Figure S3). The quantification of  $\beta$ 2-ARs in 6 sections of 3 animals per genotype confirmed this observation. In the outer annulus, significantly more cells were positive for  $\beta$ 2-AR in SM/J mice ( $p < 0.001$ ) compared to WT mice and also in the inner annulus ( $p < 0.001$ ) and in the nucleus ( $p < 0.001$ ) (Figure 5).



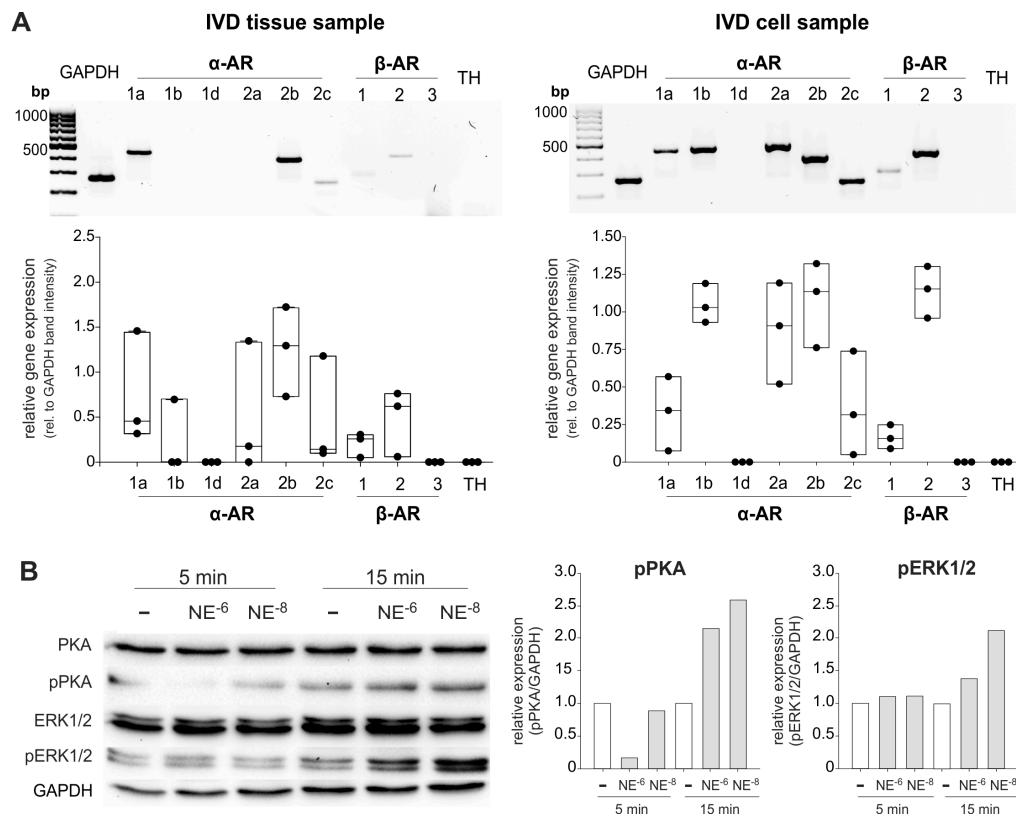
**Figure 5.** Localization of ARs and distribution of ECM proteins in murine IVD tissue. (A) Immunohistochemical analysis of  $\beta$ 2-AR (black arrows and IVD regions indicated by the dotted line) and Col II, Col XII, COMP as well as DCN in IVD sections of WT and SM/J mice (bars 500  $\mu$ m,  $n = 3$ ). (B) The number of  $\beta$ 2-positive cells in WT and SM/J IVD tissue ( $n = 3$ ). Each black circle represents the number of  $\beta$ 2-positive cells per section of an individual mouse (6 sections per mouse per genotype analyzed). Data are presented as box plots, which are described in the legend to Figure 2. Significant  $p$ -values against WT are presented as “\*\*\*\*”  $p \leq 0.0001$ . (C) Immunohistochemical analysis of type II collagen (Col II), type XII collagen (Col XII), cartilage oligomeric matrix protein (COMP) as well as decorin (DCN) in human IVD sections. Abbreviations: Saf-O—safranin-O staining, oa—outer annulus, ia—inner annulus, np—nucleus pulposus,  $\Sigma$ —sum of positive cells in oa + ia + np.

Parallel to the  $\beta$ 2-AR expression changes in the outer AF and NP, alterations in the expression of ECM components were observed in SM/J sections. Type II collagen staining intensity did not increase, but the type II collagen-positive chondrocytic area spread in the same manner as the  $\beta$ 2-AR expression. Moreover, type XII collagen staining increased in the interterritorial ECM of SM/J IVDs, while COMP expression slightly decreased compared to WT samples. In addition, decorin staining became stronger in the pericellular and territorial ECM of SM/J mice (Figure 5).

## 2.6. AR and TH Gene Expression in Isolated Human IVD Cells and IVD Cell Response to NE

In isolated IVD cells, a similar AR profile was detected at the mRNA level as in the IVD tissue ( $\alpha$ 1a-,  $\alpha$ 2a-,  $\alpha$ 2b-,  $\alpha$ 2c-,  $\beta$ 1-, and  $\beta$ 2-AR; Figure 6A). However, individual differences between the IVD cell samples were visible in contrast to IVD tissue. IVD cells of different donors always expressed the AR subtypes  $\alpha$ 1a-,  $\alpha$ 2a-,  $\alpha$ 2b-,  $\alpha$ 2c-,  $\beta$ 1-, and  $\beta$ 2-AR, but in cells of some patients  $\alpha$ 1b- or  $\beta$ 3-AR was not

detectable (Figure 5A, see also Supplementary Figure S4). Compared to the *GAPDH* expression, it seems that  $\beta 2$ -AR expression was upregulated under culture conditions (Figure 6). We also performed  $\beta 2$ -AR Western Blot and confirmed the expression of this AR in two IVD cell lysates (both with degeneration degree II, Supplementary Figure S5).



**Figure 6.** AR gene expression and NE-mediated activation of intracellular signaling pathways in human IVD cells. **(A)** Gene expression of different AR subtypes in untreated primary IVD cells isolated from three patients (representative RT-PCR image of one IVD donor) compared to the respective tissue sample. **(B)** Changes in PKA and ERK1/2 phosphorylation in isolated IVD cells after treatment with low or high NE concentrations ( $10^{-8}$  or  $10^{-6}$  M) after 5 or 15 min ( $n = 3$ ); representative Western Blot images of cells isolated from one IVD donor). The expression of phosphorylated kinases (pPKA and pERK1/2) is shown relative to GAPDH expression (set as 1). White boxes indicate untreated controls, the grey boxes the NE-treatment groups.

Treatment of isolated IVD cells with NE ( $10^{-8}$  or  $10^{-6}$  M) for 5 or 15 min revealed that both the ERK1/2 and the PKA signaling pathway were activated. After 5 min, only a slight PKA phosphorylation was visible and only after treatment with  $10^{-8}$  M NE. Here, ERK was not yet activated (Figure 6B). After 15 min, both NE concentrations induced both PKA and ERK1/2 phosphorylation, however,  $10^{-8}$  M NE stimulation resulted in stronger ERK1/2 phosphorylation compared to the  $10^{-6}$  M NE treated group, while no such concentration-dependent effect was observed regarding PKA activation (Figure 6B).

### 3. Discussion

Although the sympathetic innervation of healthy and degenerating IVDs is known for about 10 years [3], no study analyzing the expression of ARs during IVDD has been performed until now. Therefore, we investigated the expression of all AR subtypes as well as changes in AR expression in healthy and degenerated IVD tissue. Our study demonstrates that genes of almost all AR subtypes are expressed in human IVD tissue and can also be detected in isolated and expanded IVD cells.

However, only the  $\beta$ 2-AR was detected in human and murine sections in relevant amounts at the protein level. The  $\beta$ 2-AR signal increased with the degree of degeneration and was accompanied by changes in the ECM expression. In addition, we demonstrated for the first time that human IVD cells are able to respond to NE by activating the PKA and ERK1/2 intracellular signaling pathways.

First, we analyzed human tissue homogenates prepared from IVDs with different degrees of degeneration and observed that apart from  $\alpha$ 1D- and  $\beta$ 3-AR, all other AR subtypes were expressed at any stage of degeneration, suggesting that IVD tissue is able to respond to adrenergic stimulation at any time point. This would make sense given the fact that both healthy and degenerating IVD are innervated by sympathetic nerve fibers [17]. The fact that many AR subtypes were detected at the mRNA level is not surprising, because a similar AR expression pattern was described for human articular chondrocytes [24], which exhibit multiple phenotypic similarities to IVD cells [25].

However, AR expression at the mRNA level is not as decisive as the expression of functional AR proteins on the cell membrane. Therefore, we performed immunostainings and analyzed the expression and localization of the two most relevant ARs, the  $\alpha$ 2a- and  $\beta$ 2-AR, in human and murine IVD sections. In human slightly degenerated IVD tissue, mainly  $\beta$ 2-AR was detected and exclusively in the AF region. In contrast, only a weak  $\alpha$ 2a-AR signal was visible in the AF. Consistent with our observations in human disc tissue, only the  $\beta$ 2-AR was detected in healthy murine IVDs and only in the AF area. Interestingly, the positive  $\beta$ 2-AR signal spread out into the degenerating outer AF and also into the NP in highly degenerated murine IVDs. The absence of ARs in the NP area of healthy and slightly degenerated IVDs might be explained by the fact that only the AF is innervated by sympathetic nerves, consequently, neurotransmitters are released only to the AF region, which leads to an AR upregulation. However, exactly the opposite has been described in aorta muscle cells, hamster ovary cell line, or in HT29 cell line [26–28]. Another possible explanation could be the difference in the ECM structure between AF and NP and accordingly, the inhomogeneously distributed mechanical loading. While AF cells, surrounded by stiffer ligamentous ECM, are predominantly exposed to tensile strain, the NP cells are mainly under hydrostatic pressure due to their gelatinous matrix with high water content [29,30]. Recent studies described that ARs can function as sensors of cell membrane stretch in the vascular smooth muscle and mediate vasoconstriction [31,32]. Therefore, mechanical stimuli by overloading of the IVD might lead to  $\beta$ 2-AR upregulation. This would explain the enhanced and expanded expression of  $\beta$ 2-AR in highly degenerated IVDs of SM/J mice.

Concomitantly with increased and expanded  $\beta$ 2-AR expression, changes in the ECM deposition were observed in degenerated murine IVD sections. The expanded type II collagen positive AF area is a clear sign of IVD degeneration. The cells there exhibit a more chondrocytic phenotype and produce enhanced amounts of type II collagen [17]. The increased type XII collagen expression in the AF might also indicate that resident cells try to respond to overloading and ongoing catabolic processes by enhanced matrix synthesis as an attempt to repair the tissue. The expression of type XII collagen has been shown to depend on age with decreasing amounts in older tissue [33]. Data from another study on hyaline cartilage suggest that type XII collagen might be necessary to provide a microenvironment that supports proper tissue formation [34]. With regard to function, collagen type XII in cartilage has been shown in areas with more organized collagen fibril orientation. Here, it might play a role in promoting alignment or in stabilizing such an organization, thereby creating a matrix capable of withstanding load-bearing forces [35]. The slightly decreased COMP expression and the increased pericellular and territorial decorin synthesis demonstrate degeneration-related catabolic changes as described earlier for articular chondrocytes [36,37]. COMP is a target of matrix metalloproteinases, including MMP-13 [38], which have been shown to be upregulated in chondrogenically differentiating mesenchymal stem cells as well as in cardiofibroblasts by targeting the  $\beta$ 2-AR [18,39]. Thus, enhanced  $\beta$ 2-AR expression due to mechanical overloading might contribute to the perpetuation of IVDD.

After analyzing AR expression in tissue samples, we investigated the AR expression profile in isolated human IVD cells. We found a very similar AR expression profile in isolated and expanded IVD cells as in IVD tissue homogenates indicating that cell culture conditions over more than 2 weeks

do not substantially influence the AR expression. A similar phenomenon was observed in human articular chondrocytes after 7 days in monolayer culture [40]. However,  $\alpha 1b$ - and  $\beta 2$ -AR expression was slightly upregulated under culture conditions. The reason for this observation might be that monolayer culture conditions lead to dedifferentiation processes, which in turn could result in AR regulation [40]. Indeed, also degeneration results in dedifferentiation, therefore, we believe that our monolayer culture conditions used in the present study and as performed by others [41] optimally mimic the phenotype and behavior of IVD cells in vivo. Furthermore, isolated IVD cells were able to respond to NE stimulation by PKA and ERK1/2 phosphorylation. A similar signaling response was shown for ARs in human articular chondrocytes as well as in synovial stem cells undergoing chondrogenic differentiation [42,43]. These findings provide the opportunity to perform experiments analyzing the functional response of isolated IVDs to sympathetic neurotransmitters, which is, therefore, the focus of our present and future work.

In summary, we demonstrated the existence of ARs, especially of  $\beta 2$ AR, in IVD tissue for the first time. Its differential expression in healthy and degenerated IVD as well as the ability of isolated IVD cells to respond to NE stimulation suggests that the sympathetic might play a role in IVDD. Further studies will address its mechanistic contribution and thereby help to develop novel therapeutic options for IVDD.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Human IVD Tissue

IVD samples were obtained from patients undergoing spondylodesis at the University Hospitals of the Johann Wolfgang Goethe University Frankfurt and the Heinrich Heine University Düsseldorf. The samples were anonymized and according to the the Ethics Committees of both universities no approval was necessary. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. The experimental cohort included 43 patients (Table 2), at least 5 patients per group.

**Table 2.** Characteristics of patients under study.

Patient Characteristics	Number (%) / Mean Age $\pm$ SEM
total (number/age)	43 (100%) / 66.93 $\pm$ 1.83
female (number/age)	33 (76.74%) / 66.64 $\pm$ 2.21
male (number/age)	10 (23.26%) / 67.9 $\pm$ 2.9

Samples were stored at  $-80$  °C until analysis. The degree of degeneration was determined pre- and intraoperatively with a 4-grade classification scale according to the Modic and Pfirmann classification [44]: Non-/moderately (grade I), moderately (grade II), significantly (grade III), and massively degenerated (grade IV). In the majority of cases, the condition of the tissue made it impossible to distinguish between AF and NP, and therefore, their ratio was variable. In addition, few well-preserved IVD samples with AF and NP zones were taken for histological analysis.

##### 4.2. Murine IVD Samples

Murine IVDD models enabled the analysis of all degeneration stages, and especially the healthy situation could be investigated in contrast to human samples. The transgenic mice SM/J developed an early spontaneous disc degeneration [23]. As non-degenerated controls, spine sections of the respective wildtype animals were analyzed (C57BL/6 for SM/J mice). IVD sections of C57BL/6, and SM/J, mice were kindly provided by Prof. Danny Chan (School of Biomedical Sciences, The University of Hong Kong, Hong Kong, China). Spine dissection, fixation, decalcification, and paraffin embedding was performed as described previously [23].

#### 4.3. Adrenoceptor Gene Expression Analysis

The expression of the genes for all adrenoceptor subtypes ( $\alpha 1a$ ,  $\alpha 1b$ ,  $\alpha 1d$ ,  $\alpha 2a$ ,  $\alpha 2b$ ,  $\alpha 2c$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ , and  $\beta 3$ ), and TH was evaluated by RT-PCR in fresh tissue as well as in isolated IVD cells. For RNA isolation, the tissue was minced with a scalpel and further processed according to manufacturers' instructions (NucleoSpin<sup>®</sup> RNA/Protein, Macherey and Nagel, Düren, North Rhine-Westphalia, Germany). Isolated IVD cells did not require special pre-treatments before RNA isolation. cDNA synthesis was performed using Quantabio qScript cDNA Synthesis Kit (VWR, Darmstadt, Hessen, Germany), and about 5 ng of cDNA per optimized primer were used for PCR (Taq PCR Master Mix, Qiagen, Hilden, North Rhine-Westphalia, Germany). All primers were obtained from Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Hessen, Germany, Table 3). The results were visualized by agarose gel electrophoresis with GelRed (Biotium, Fremont, California, USA) and ChemiDoc XRS+ (BioRad, Dreieich, Hessen, Germany). Human *GAPDH* served as a housekeeping gene. The PCR gels were analyzed densitometrically based on the intensities of corresponding PCR bands using the Image Lab software (BioRad, Dreieich, Hessen, Germany). In step 1, *GAPDH* band intensity of each individual patient was defined as "1" and AR expression levels were calculated in relation to that value. Then, semiquantitative relative gene expression levels depending on the grade of degeneration were calculated using grade I samples as a calibrator (mean of grade I results was defined as "1"), and correlations were performed with the degree of degeneration. Genes that did not show a detectable Ct value after 40 amplification cycles were deemed to have "zero" expression.

**Table 3.** The primers used for PCR

Gene Symbol	NCBI Reference	Foward (5'–3')	Reverse (5'–3')
<i>GAPDH</i>	NM_001289745.2	CTCCTGTTTCGACAGTCAGCC	TCCCCGTTCTCAGCCTTGAC
<i>ADRA1A</i>	NM_000680.3	CCATGCTCCAGCCAAGAGTT	TCCTGTCCTAGACTTCCTCCC
<i>ADRA1B</i>	NM_000679.3	GTCCACCGTCATCTCCATCG	GAACAAGGAGCCAAGCGGTAG
<i>ADRA1D</i>	NM_000678.3	TGACTTTCCGCGATCTCCTG	TTACCTGCCACGGCCATAAG
<i>ADRA2A</i>	NM_000681.3	TGGTCATCGGAGTGTTCGTG	GCCCACTAGGAAGATGGCTC
<i>ADRA2B</i>	NM_000682.6	GACATTTACCCGCAACACC	GGGACTGAGAACCAGGAAGC
<i>ADRA2C</i>	NM000683.3	CGATGTGCTGTTTTCACCT	GGATGTACCAGGTCTCGTCG
<i>ADRB1</i>	NM_000684.2	TAGCAGGTGAACTCGAAGCC	ATCTTCCACTCCGGTCTCT
<i>ADRB2</i>	NM_000024.5	CAGAGCCTGCTGACCAAGAA	GCCTAACGTCTTGAGGGCTT
<i>ADRB3</i>	NM_000025.2	GCCAATTCTGCCTTCAACCC	GCCAGAGGTTTTCCACAGGT
<i>TH</i>	NM_000360.3	CAGGCAGAGGCCATCATGT	GTGGTCCAAGTCCAGGTCAG

#### 4.4. Immunohistological Stainings

The protein expression and localization of 3 major adrenoceptors ( $\alpha 2a$ -AR and  $\beta 2$ -AR) in human and murine IVDs was investigated immunohistochemically. Human IVD-tissue samples were fixed in 4% paraformaldehyde (Merck, Darmstadt, Hessen, Germany) in 1x PBS overnight and after rinsed 3 times for 10 min with ddH<sub>2</sub>O embedded in paraffin (Paraplast PLUS, Merck, Darmstadt, Hessen, Germany). Sections of 8  $\mu$ m were then dewaxed using a standard protocol with xylene and gradually rehydrated. After antigen demasking using citrate buffer (10 mM sodium citrate, 0.05% tween 20, pH 6 (Merck, Darmstadt, Hessen, Germany)) for 20 min at 95 °C, the endogenous peroxidase (0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 min, room temperature (Merck, Darmstadt, Hessen, Germany) enzyme was blocked as well as non-specific binding sites using secondary antibody-specific horse serum (VECTASTAIN<sup>®</sup>ABC-AP Staining KIT, Vector Labs or HRP-AEC Kit, Linaris, Dossenheim, Baden-Württemberg, Germany) for 45 min at room temperature. Sections were then incubated with the primary antibodies rabbit anti  $\alpha 2a$ -AR (1:200; ab85570), rabbit anti  $\alpha 2c$ -AR (1:200; ab151618; Abcam, Cambridge, United Kingdom), rabbit anti  $\beta 2$ -AR (1:200; ab213651; Abcam, Cambridge, United Kingdom), at 4 °C overnight. Specific staining was visualized using horseradish peroxidase labeled secondary antibodies and peroxidase substrate solution (Vector Labs or HRP-AEC Kit, Linaris, Dossenheim, Baden-Württemberg, Germany). Control experiments were performed with unspecific isotype antibodies. AR-positive cells were

counted in all stained sections, and different IVD areas (annulus vs. nucleus), as well as the two mouse genotypes, were compared regarding the level of AR expression. Additional sections were stained with dimethyl methylene blue (DMMB) or safranin-O/fast green to visualize tissue structure and proteoglycan distribution.

Furthermore, the expression of ECM proteins was analyzed in human and murine IVDs (type II collagen—Col II, type XII collagen—Col XII, cartilage oligomeric matrix protein—COMP, decorin—DCN). In the case of the Col II staining, the sections were digested using pepsin (0.025% in 0.2M HCL; Merck, Darmstadt, Hessen, Germany) for 15 min at 37 °C at first. An enzymatic digestion with hyaluronidase (500U/mL in Hyaluronidase Puffer pH 5.0; Merck, Darmstadt, Hessen, Germany) for 30 min at 37 °C and Proteinase K (10µg/mL in Proteinase Puffer pH 7.4, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Hessen, Germany) for 10 min at 55 °C was conducted for all the antibodies to demask the antigens. After quenching the endogenous peroxidase with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min and blocking with a blocking solution (Zytomed blocking solution, Zytomed systems ZUC025-100, Berlin, Germany) for 5 min at room temperature, the sections were incubated with the primary antibodies mouse anti-Col II (1:500; CP18, Merck, Darmstadt, Hessen, Germany), rabbit anti-Col XII (1:3000; [45]), rabbit anti-COMP4-1 (1:500; Immundiagnostik AG, Bensheim, Hessen, Germany [46]), rabbit anti-decorin (1:500; [47]) at 4 °C over night. HRP-Polymer anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (ZytoChem Plus, Berlin, Germany) as well as 3,3'-diaminobenzidine (0.05% DAB and 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,01M PBS pH 7.2; Merck, Darmstadt, Hessen, Germany) was used to detect the specific primary antibody bindings. The brownish staining through the oxidation of the DAB was complemented with a nuclear counterstaining with Mayer's Heamatoxylin (Merck, Darmstadt, Hessen, Germany) for 10 s at room temperature.

Murine samples were processed and stained the same way as the human tissue.

#### 4.5. $\beta$ 2-AR Western Blot

IVD tissue and cell protein samples were loaded onto 10% SDS-PAGE and electro-transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Membranes were blocked with 5% bovine serum albumin for 1 h at room temperature before incubation with primary antibody for  $\beta$ 2-AR (ab213651; Abcam, Cambridge, United Kingdom) at 4 °C overnight. The membranes were washed with TBST (Tris-buffered saline with Tween20) and incubated with HRP-conjugated secondary antibody (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) for 1 h at room temperature. The target protein expression was detected using the chemiluminescence (Clarity Western ECL Substrate, BioRad, Dreieich, Hessen, Germany) reagent. A cell lysate of the human squamous carcinoma cell line A431 (Abcam, Cambridge, United Kingdom) was used as a positive control (see also <https://www.abcam.com/beta-2-adrenergic-receptor-antibody-epr707n-ab182136.html> as additional information).

#### 4.6. IVD Cell Isolation and Stimulation with NE

According to a method by Tang et al. [48], the IVD tissue was minced into 2 to 3 mm pieces with a sterile scalpel and placed in 75 cm<sup>2</sup> cell culture flask and cultivated in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM/F12; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Hessen, Germany) [41] with 1% penicillin/streptomycin (P/S) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Hessen, Germany) and 10% FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Hessen, Germany) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> and 2% O<sub>2</sub>. After achieving confluence, cells were detached, and pellets were stored at -80 °C until PCR analysis. The used intervertebral discs were moderately degenerated (grade II).

In order to examine whether isolated IVD cells responded to NE, the 2 major AR-dependent signaling pathways, the phosphorylation of PKA and ERK1/2, were investigated. Cells were treated for 5 and 15 min with NE (10<sup>-8</sup> or 10<sup>-6</sup> M, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Protein isolation was performed using NucleoSpin RNA/Protein kit (Macherey Nagel, Düren, North Rhine-Westphalia, Germany).

#### 4.7. NE-Dependent Signal Transduction

IVD protein samples were loaded onto 10% SDS-Page and electro-transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Membranes were blocked with 5% bovine serum albumin for 1 h at room temperature before incubation with primary antibodies for total ERK (#9170; Cell Signaling Technology), phosphorylated ERK (#4370; Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA), total PKA (#32514; Abcam, Cambridge, United Kingdom), phosphorylated PKA (#32390; Abcam, Cambridge, United Kingdom), and GAPDH (#(MA5-15738); Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Hessen, Germany) at 4 °C overnight. The membranes were washed with TBST and incubated with HRP-conjugated secondary antibody (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) for 1 h at room temperature. The target protein expression was detected using the chemiluminescence (Clarity Western ECL Substrate, BioRad, Dreieich, Hessen, Germany) reagent, with GAPDH as the endogenous control.

#### 4.8. Statistical Analysis

All quantitative gene expression experiments were carried out with samples of at least 5 patients. Data were presented as box plots with medians. Multiple comparisons between groups of different degrees of degeneration were carried out using ANOVA on ranks or Wilcoxon/Mann–Whitney-Test followed by Bonferroni or Dunn’s correction. To analyze associations between AR expression and grade of degeneration, Spearman rank order correlations were performed. p-values less than 0.05 were considered significant. All statistical analyses were performed using SigmaPlot 14.0 software (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany).

**Supplementary Materials:** Supplementary Materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/6/2085/s1>.

**Author Contributions:** A.M., F.Z., M.R., R.B., and Z.J.-L. conceived and designed the experiments; J.K., K.E.B., and A.K. performed the experiments; J.K., A.K., K.E.B., M.B., C.F., D.C., F.Z., M.B., M.R., and Z.J.-L. analyzed the data; A.M., M.B., C.F., M.R., D.C., and R.B. contributed materials; J.K., A.K., M.R., F.Z., and Z.J.-L. prepared the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was supported by grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (to Z.J.-L. and R.H.S. JE642/4-1 within Research Unit FOR2407 ExCarBon).

**Acknowledgments:** The authors thank Inna Schaible and Natalie Molotkov for excellent technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

#### Abbreviations

AF	Annulus fibrosus
AR	Adrenoceptor
cDNA	Complementary desoxy ribonucleic acid
Col II	Type II collagen
Col VI	Type VI collagen
Col XII	Type XII collagen
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
DCN	Decorin
DMEM/F12	Dulbecco’s modified eagle’s medium and Ham’s F-12 Medium
DMMB	1,9-Dimethyl-methylene blue
ECM	Extracellular matrix
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FBS	Fetal bovine serum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HT29	Human colon cancer cell line



IL	Interleukin
IVD	Intervertebral disc
IVDD	Intervertebral disc degeneration
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NE	Norepinephrine
NP	Nucleus pulposus
OA	Osteoarthritis
P/S	Penicillin streptomycin
PCR	Polymerase chain reaction
pERK	Phosphorylated extracellular signal-regulated kinases
PKA	Protein kinase A
pPKA	Phosphorylated protein kinase A
RT-PCR	Reverse-transcriptase PCR
Saf-O	Safranin-O/fast green staining
sGAG	Sulphated glycosaminoglycans
TH	Tyrosine hydroxylase
WT	Wildtype mice

## References

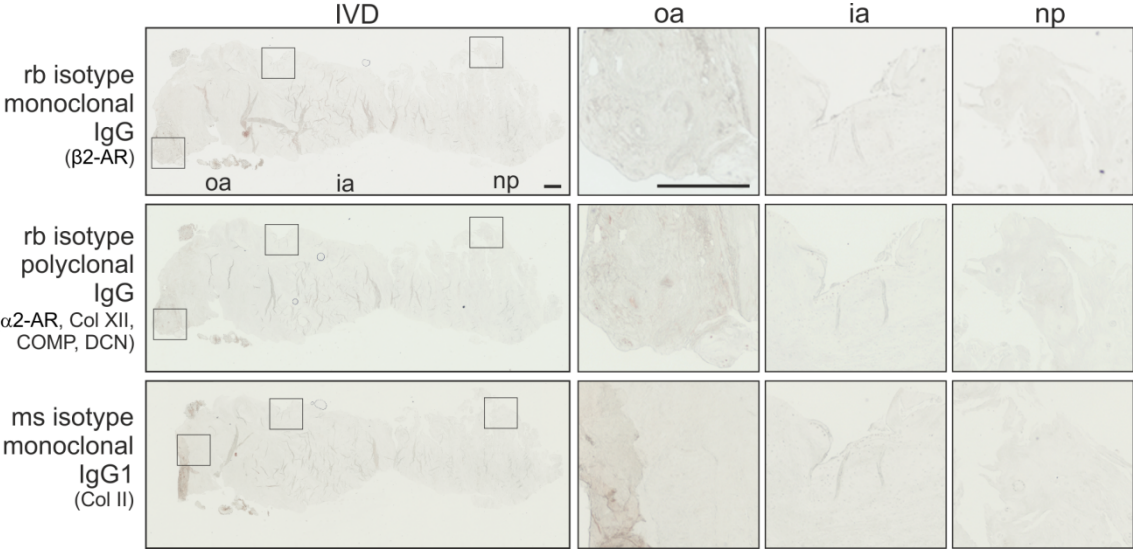
1. Taher, F.; Essig, D.; Lebl, D.R.; Hughes, A.P.; Sama, A.A.; Cammisa, F.P.; Girardi, F.P. Lumbar degenerative disc disease: Current and future concepts of diagnosis and management. *Adv. Orthop.* **2012**, *2012*, 970752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* **2015**, *386*, 743–800. [[CrossRef](#)]
3. Smith, L.J.; Nerurkar, N.L.; Choi, K.S.; Harfe, B.D.; Elliott, D.M. Degeneration and regeneration of the intervertebral disc: Lessons from development. *Dis. Models Mech.* **2011**, *4*, 31–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Rustenburg, C.M.E.; Emanuel, K.S.; Peeters, M.; Lems, W.F.; Vergroesen, P.A.; Smit, T.H. Osteoarthritis and intervertebral disc degeneration: Quite different, quite similar. *Jor Spine* **2018**, *1*, e1033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. de Kunder, S.L.; Rijkers, K.; Caelers, I.; de Bie, R.A.; Koehler, P.J.; van Santbrink, H. Lumbar Interbody Fusion: A Historical Overview and a Future Perspective. *Spine* **2018**, *43*, 1161–1168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Tomaszewski, K.A.; Saganiak, K.; Gladysz, T.; Walocha, J.A. The biology behind the human intervertebral disc and its endplates. *Folia Morphol.* **2015**, *74*, 157–168. [[CrossRef](#)]
7. Kerr, G.J.; Veras, M.A.; Kim, M.K.; Seguin, C.A. Decoding the intervertebral disc: Unravelling the complexities of cell phenotypes and pathways associated with degeneration and mechanotransduction. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *62*, 94–103. [[CrossRef](#)]
8. Kepler, C.K.; Ponnappan, R.K.; Tannoury, C.A.; Risbud, M.V.; Anderson, D.G. The molecular basis of intervertebral disc degeneration. *Spine J.* **2013**, *13*, 318–330. [[CrossRef](#)]
9. Janeczko, L.; Janeczko, M.; Chrzanowski, R.; Zielinski, G. The role of polymorphisms of genes encoding collagen IX and XI in lumbar disc disease. *Neurol. I Neurochir. Pol.* **2014**, *48*, 60–62. [[CrossRef](#)]
10. Martirosyan, N.L.; Patel, A.A.; Carotenuto, A.; Kalani, M.Y.; Belykh, E.; Walker, C.T.; Preul, M.C.; Theodore, N. Genetic Alterations in Intervertebral Disc Disease. *Front. Surg.* **2016**, *3*, 59. [[CrossRef](#)]
11. Grassel, S.G. The role of peripheral nerve fibers and their neurotransmitters in cartilage and bone physiology and pathophysiology. *Arthritis Res.* **2014**, *16*, 485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Nagatsu, T.; Levitt, M.; Udenfriend, S. TYROSINE HYDROXYLASE. THE INITIAL STEP IN NOREPINEPHRINE BIOSYNTHESIS. *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 2910–2917. [[PubMed](#)]
13. Rosenbaum, D.M.; Rasmussen, S.G.; Kobilka, B.K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **2009**, *459*, 356–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Garcia-Cosamalon, J.; del Valle, M.E.; Calavia, M.G.; Garcia-Suarez, O.; Lopez-Muniz, A.; Otero, J.; Vega, J.A. Intervertebral disc, sensory nerves and neurotrophins: Who is who in discogenic pain? *J. Anat.* **2010**, *217*, 1–15. [[CrossRef](#)]
15. Pertovaara, A. The noradrenergic pain regulation system: A potential target for pain therapy. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *716*, 2–7. [[CrossRef](#)]

16. Binch, A.L.; Cole, A.A.; Breakwell, L.M.; Michael, A.L.; Chiverton, N.; Creemers, L.B.; Cross, A.K.; Le Maitre, C.L. Nerves are more abundant than blood vessels in the degenerate human intervertebral disc. *Arthritis Res* **2015**, *17*, 370. [[CrossRef](#)]
17. Barczewska, M.; Juranek, J.; Wojtkiewicz, J. Origins and Neurochemical Characteristics of Porcine Intervertebral Disc Sympathetic Innervation: A Preliminary Report. *J. Mol. Neurosci.* **2017**, *63*, 50–57. [[CrossRef](#)]
18. Jenei-Lanzl, Z.; Grassel, S.; Pongratz, G.; Kees, F.; Miosge, N.; Angele, P.; Straub, R.H. Norepinephrine inhibition of mesenchymal stem cell and chondrogenic progenitor cell chondrogenesis and acceleration of chondrogenic hypertrophy. *Arthritis Rheumatol.* **2014**, *66*, 2472–2481. [[CrossRef](#)]
19. Gotz, W.; Barnert, S.; Bertagnoli, R.; Miosge, N.; Kresse, H.; Herken, R. Immunohistochemical localization of the small proteoglycans decorin and biglycan in human intervertebral discs. *Cell Tissue Res.* **1997**, *289*, 185–190. [[CrossRef](#)]
20. Ishii, Y.; Thomas, A.O.; Guo, X.E.; Hung, C.T.; Chen, F.H. Localization and distribution of cartilage oligomeric matrix protein in the rat intervertebral disc. *Spine* **2006**, *31*, 1539–1546. [[CrossRef](#)]
21. Melrose, J.; Ghosh, P.; Taylor, T.K. A comparative analysis of the differential spatial and temporal distributions of the large (aggrecan, versican) and small (decorin, biglycan, fibromodulin) proteoglycans of the intervertebral disc. *J. Anat.* **2001**, *198*, 3–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Klawitter, M.; Hakozaki, M.; Kobayashi, H.; Krupkova, O.; Quero, L.; Ospelt, C.; Gay, S.; Hausmann, O.; Liebscher, T.; Meier, U.; et al. Expression and regulation of toll-like receptors (TLRs) in human intervertebral disc cells. *Eur. Spine J.* **2014**, *23*, 1878–1891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Zhang, Y.; Xiong, C.; Kudelko, M.; Li, Y.; Wang, C.; Wong, Y.L.; Tam, V.; Rai, M.F.; Cheverud, J.; Lawson, H.A.; et al. Early onset of disc degeneration in SM/J mice is associated with changes in ion transport systems and fibrotic events. *Matrix Biol.* **2018**, *70*, 123–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lorenz, J.; Schafer, N.; Bauer, R.; Jenei-Lanzl, Z.; Springorum, R.H.; Grassel, S. Norepinephrine modulates osteoarthritic chondrocyte metabolism and inflammatory responses. *Osteoarthr. Cartil.* **2016**, *24*, 325–334. [[CrossRef](#)]
25. Lee, C.R.; Sakai, D.; Nakai, T.; Toyama, K.; Mochida, J.; Alini, M.; Grad, S. A phenotypic comparison of intervertebral disc and articular cartilage cells in the rat. *Eur. Spine J.* **2007**, *16*, 2174–2185. [[CrossRef](#)]
26. Hadcock, J.R.; Malbon, C.C. Down-regulation of beta-adrenergic receptors: Agonist-induced reduction in receptor mRNA levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5021–5025. [[CrossRef](#)]
27. Heck, D.A.; Bylund, D.B. Mechanism of down-regulation of alpha-2 adrenergic receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *282*, 1219–1227.
28. Wikberg, J.E.; Akers, M.; Caron, M.G.; Hagen, P.O. Norepinephrine-induced down regulation of alpha 1 adrenergic receptors in cultured rabbit aorta smooth muscle cells. *Life Sci.* **1983**, *33*, 1409–1417. [[CrossRef](#)]
29. Neidlinger-Wilke, C.; Galbusera, F.; Pratsinis, H.; Mavrogenatou, E.; Mietsch, A.; Kletsas, D.; Wilke, H.J. Mechanical loading of the intervertebral disc: From the macroscopic to the cellular level. *Eur. Spine J.* **2014**, *23* (Suppl. 3), S333–S343. [[CrossRef](#)]
30. Vergroesen, P.P.; Kingma, I.; Emanuel, K.S.; Hoogendoorn, R.J.; Welting, T.J.; van Royen, B.J.; van Dieen, J.H.; Smit, T.H. Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: A vicious circle. *Osteoarthr. Cartil.* **2015**, *23*, 1057–1070. [[CrossRef](#)]
31. Mederos y Schnitzler, M.; Storch, U.; Meibers, S.; Nurwakagari, P.; Breit, A.; Essin, K.; Gollasch, M.; Gudermann, T. Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *Embo J.* **2008**, *27*, 3092–3103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Storch, U.; Mederos y Schnitzler, M.; Gudermann, T. G protein-mediated stretch reception. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2012**, *302*, H1241–H1249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Caldeira, J.; Santa, C.; Osorio, H.; Molinos, M.; Manadas, B.; Goncalves, R.; Barbosa, M. Matrisome Profiling During Intervertebral Disc Development And Ageing. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Taylor, D.W.; Ahmed, N.; Parreno, J.; Lunstrum, G.P.; Gross, A.E.; Diamandis, E.P.; Kandel, R.A. Collagen type XII and versican are present in the early stages of cartilage tissue formation by both redifferentating passaged and primary chondrocytes. *Tissue Eng. Part A* **2015**, *21*, 683–693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Gregory, K.E.; Keene, D.R.; Tufa, S.F.; Lunstrum, G.P.; Morris, N.P. Developmental distribution of collagen type XII in cartilage: Association with articular cartilage and the growth plate. *J. Bone Miner. Res.* **2001**, *16*, 2005–2016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

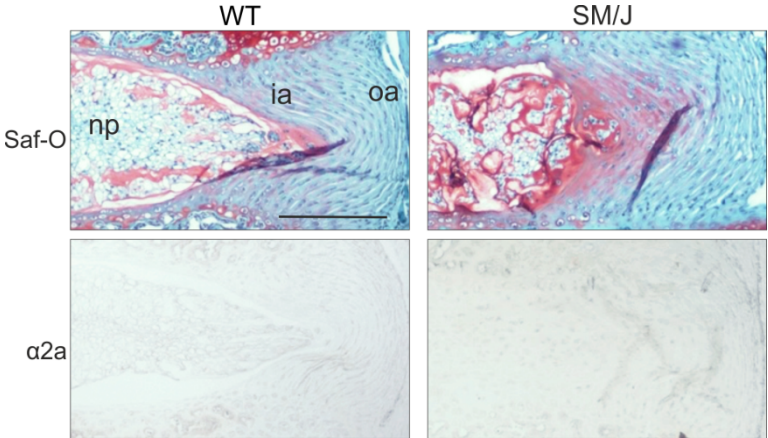
36. Mobasheri, A. Osteoarthritis year 2012 in review: Biomarkers. *Osteoarthr. Cartil.* **2012**, *20*, 1451–1464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Barreto, G.; Soyninen, A.; Ylinen, P.; Sandelin, J.; Konttinen, Y.T.; Nordstrom, D.C.; Eklund, K.K. Soluble biglycan: A potential mediator of cartilage degradation in osteoarthritis. *Arthritis Res.* **2015**, *17*, 379. [[CrossRef](#)]
38. Zhen, E.Y.; Brittain, I.J.; Laska, D.A.; Mitchell, P.G.; Sumer, E.U.; Karsdal, M.A.; Duffin, K.L. Characterization of metalloprotease cleavage products of human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* **2008**, *58*, 2420–2431. [[CrossRef](#)]
39. Guo, D.; Kassiri, Z.; Basu, R.; Chow, F.L.; Kandalam, V.; Damilano, F.; Liang, W.; Izumo, S.; Hirsch, E.; Penninger, J.M.; et al. Loss of PI3Kgamma enhances cAMP-dependent MMP remodeling of the myocardial N-cadherin adhesion complexes and extracellular matrix in response to early biomechanical stress. *Circ. Res.* **2010**, *107*, 1275–1289. [[CrossRef](#)]
40. Speichert, S.; Molotkov, N.; El Bagdadi, K.; Meurer, A.; Zaucke, F.; Jenei-Lanzl, Z. Role of Norepinephrine in IL-1beta-Induced Chondrocyte Dedifferentiation under Physioxia. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*.
41. Schubert, A.K.; Smink, J.J.; Pumberger, M.; Putzier, M.; Sittinger, M.; Ringe, J. Standardisation of basal medium for reproducible culture of human annulus fibrosus and nucleus pulposus cells. *J. Orthop. Surg. Res.* **2018**, *13*, 209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Jiao, K.; Zeng, G.; Niu, L.N.; Yang, H.X.; Ren, G.T.; Xu, X.Y.; Li, F.F.; Tay, F.R.; Wang, M.Q. Activation of alpha2A-adrenergic signal transduction in chondrocytes promotes degenerative remodelling of temporomandibular joint. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 30085. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. El Bagdadi, K.; Zaucke, F.; Meurer, A.; Straub, R.H.; Jenei-Lanzl, Z. Norepinephrine Inhibits Synovial Adipose Stem Cell Chondrogenesis via alpha2a-Adrenoceptor-Mediated ERK1/2 Activation. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3127. [[CrossRef](#)]
44. Tladen, A.N.; Klawitter, M.; Lux, V.; Mirsaidi, A.; Bahrenberg, G.; Glanz, S.; Quero, L.; Liebscher, T.; Wuertz, K.; Ehrmann, M.; et al. Detrimental role for human high temperature requirement serine protease A1 (HTRA1) in the pathogenesis of intervertebral disc (IVD) degeneration. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 21335–21345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Agarwal, P.; Zwolanek, D.; Keene, D.R.; Schulz, J.N.; Blumbach, K.; Heinegard, D.; Zaucke, F.; Paulsson, M.; Krieg, T.; Koch, M.; et al. Collagen XII and XIV, new partners of cartilage oligomeric matrix protein in the skin extracellular matrix suprastructure. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 22549–22559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Spitznagel, L.; Nitsche, D.P.; Paulsson, M.; Maurer, P.; Zaucke, F. Characterization of a pseudoachondroplasia-associated mutation (His587->Arg) in the C-terminal, collagen-binding domain of cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *Biochem. J.* **2004**, *377*, 479–487. [[CrossRef](#)]
47. Mayorca-Guiliani Willacy, O.; Madsen, C.D.; Rafeeva, M.; Heumüller, S.E.; Bock, F.; Sengle, G.; Koch, M.; Imhof, T.; Zaucke, F.; Wagener, R.; et al. Decellularization and Antibody Staining of Mouse Tissues to Map Native Extracellular Matrix Structures in 3D. *Nature Protocols.* **2019**, *14*, 3395–3425. [[CrossRef](#)]
48. Tang, X.; Richardson, W.J.; Fitch, R.D.; Brown, C.R.; Isaacs, R.E.; Chen, J. A new non-enzymatic method for isolating human intervertebral disc cells preserves the phenotype of nucleus pulposus cells. *Cytotechnology* **2014**, *66*, 979–986. [[CrossRef](#)]



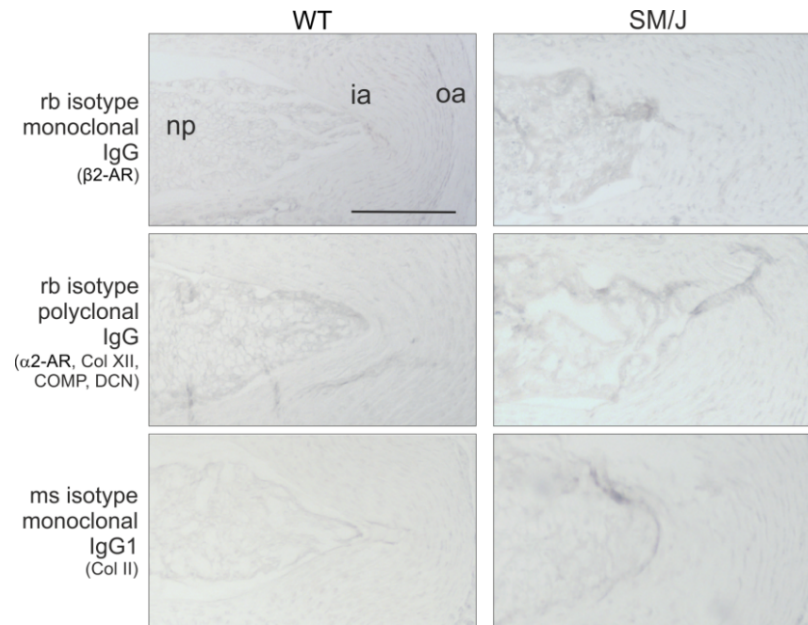
**Supplementary Material - ijms-707703**



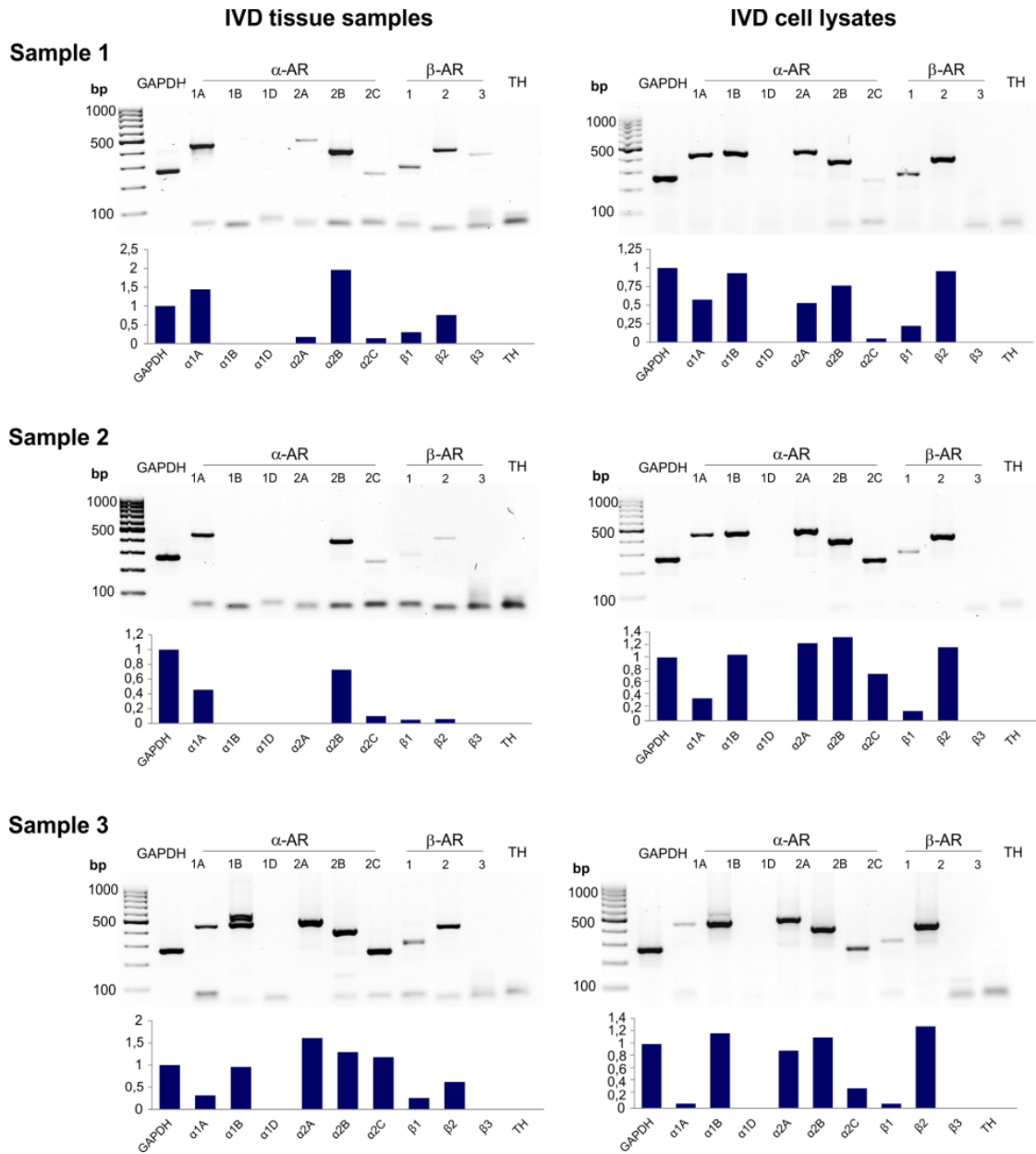
**Supplementary figure 1.** Isotype controls for the respective immunohistochemical staining in human IVD sections (bars 500 μm). Squares in the left panel indicate further magnified regions shown to the right. Abbreviations: oa – outer annulus, ia – inner annulus, np – nucleus pulposus, Col II - type II collagen, Col XII - type XII collagen, COMP - cartilage oligomeric matrix protein, DCN - decorin



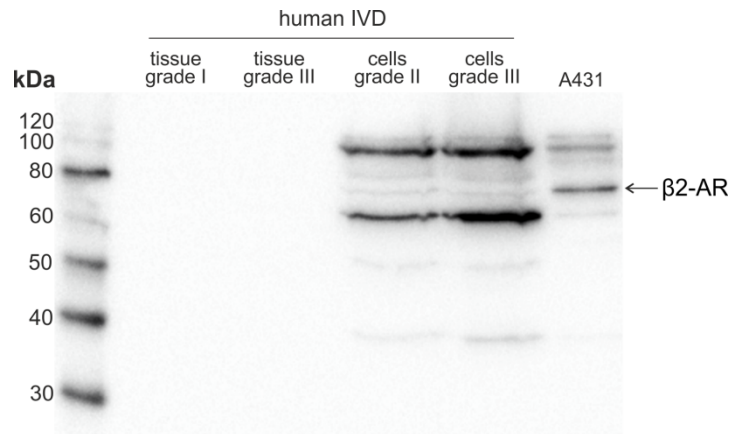
**Supplementary figure 2.** Immunohistochemical analysis of α2a-AR in IVD sections of WT and SM/J mice (bars 500 μm). Abbreviations: Saf-O – safranin-O staining, oa – outer annulus, ia – inner annulus, np – nucleus pulposus



**Supplementary figure 3.** Isotype controls for the respective immunohistochemical staining in murine IVD sections (bars 500  $\mu$ m). Col II - type II collagen, Col XII - type XII collagen, COMP - cartilage oligomeric matrix protein, DCN - decorin



**Supplementary figure 4.** Adrenoceptor (AR) and tyrosine hydroxylase (TH) gene expression in human IVD tissue and in corresponding isolated IVD cells analyzed by RT-PCR from three samples. Gene expression of all known AR subtypes as well as of TH in human IVD tissue samples (representative pictures of human IVD samples; grade II of degeneration, (n=3)). GAPDH band intensity of each individual patient was defined as „1“ and AR expression levels were calculated in relation to that value.



**Supplementary figure 5.** Protein expression of  $\beta$ 2-AR examined by western blot analysis. Immunoblot of  $\beta$ 2-AR protein in extracts from representative IVD tissue (grade I and III) and IVD cells (isolated from grade II tissues)(A431=positive control, see also <https://www.abcam.com/beta-2-adrenergic-receptor-antibody-epr707n-ab182136.htm>).

## 6. Eigener Anteil an der Arbeit

Im Folgenden sollen nach und nach die Autoren und ihre Beteiligung an der Arbeit kurz beschrieben werden bevor zuletzt der Anteil des Erstautors ausführlicher beleuchtet wird.

Annika Kohler unterstützte das Projekt, indem Sie an der Herstellung und Färbung der histologischen-Schnitte der Mausbandscheiben großen Anteil hatte. Karima El Bagdadi steuerte vor allem labortechnisches Know-how bei und unterstützte durch fachliche Kompetenz die Versuchsabläufe und Konzeptionen. Als ärztliche Mitarbeiter der orthopädischen Universitätsklinik Friedrichsheim waren Dr. Marco Brenneis und Dr. Christoph Fleege an der Beschaffung der Gewebeproben und der prä- und intraoperativen Zuordnung zu einem Degenerationsgrad beteiligt. Diese Aufgaben erfüllte auch Dr. Markus Rickert, der darüber hinaus auch an der Konzeption und der Korrektur des Manuskripts seinen Anteil hatte. Dr. Richard Bostelmann leistete als Mitarbeiter der Universität Düsseldorf ebenfalls einen wichtigen Beitrag, da er humane Proben liefern konnte, deren Struktur ausreichend erhalten geblieben war, um Sie histologisch zu untersuchen. Für den Nachweis von ARs im Mausmodell war es selbstverständlich notwendig, dass auch ein solches zu Verfügung steht. Es wurde von Prof. Dr. Danny Chan (Universität HongKong) entwickelt und ausgewählte Proben wurden uns freundlicherweise zur näheren Untersuchung zur Verfügung gestellt.

Der Rahmen, in dem qualitativ hochwertige Forschung betrieben werden kann, muss als essenziell für das Gelingen jeder Dissertation angesehen werden. Dieser wurde durch Univ.-Prof. Dr. Andrea Meurer geschaffen und auch durch Erfahrung, Wissen und hingebungsvolle Betreuung war Ihr Tun unverzichtbar für die Realisierung des Projekts. Als Leiter der Forschungsabteilung lieferte Prof. Dr. Frank Zaucke immer neue Ideen, die die Arbeit vorantrieben und brachte durch umfassende Kenntnisse das Manuskript zur Publikation. Die direkteste Betreuung erfuhr der Erstautor durch Dr. Zsuzsa Jenei-Lanzl, die – auch wenn dies schwer konkret quantifizierbar bleibt – einen großen Anteil an der initialen Idee, der Konzeption der Versuche, dem Verfassen des Manuskripts und der Auswertung der Daten hatte. Trotz der Ihr anvertrauten übergreifenden Organisation, war Sie stets so nahe am Geschehen, dass Fehlermanagement und Lösungsfindung schnell und effektiv erfolgen konnte. Hiermit möchte ich allen, die an dem Projekt mitgewirkt haben, meinen größten Dank aussprechen.



Der Erstautor selbst war in weitestgehend allen Bereichen eingebunden und um dies zu spezifizieren soll nun eine Aufzählung erfolgen:

### **Versuchsplanung**

Zunächst galt es den vorläufigen Versuchsplan im Labor zu realisieren. Die auftretenden Probleme wurden bereits ausführlich in der obenstehenden Zusammenfassung beschrieben. Somit war die Etablierung neuer Methoden ein zeitaufwendiges Unterfangen, das durch Beharrlichkeit aber zu gewünschten Ergebnissen führte. Im Verlauf des Projekts reifte die zunächst geplante rein auf humanes Gewebe beschränkte Arbeit zu einem umfassenden Ergebnis, das sowohl ein Mausmodell als auch ein Funktionsversuch in Zellkultur beinhaltet.

### **Entwicklung / Etablierung neuer Methoden**

Die Untersuchung der Funktion von Adrenozeptoren auf Bandscheibenzellen war zuvor noch nie durchgeführt worden. Es wurde also eine Methode entwickelt, die zur Beantwortung von weiterführenden Fragestellungen unabdingbar sein wird und als Monolayerzellkultur einfach durchzuführen und deshalb auch universell einsetzbar ist. Der Versuchsaufbau zur Stimulation der Zellen mit Noradrenalin ist bereits im Einsatz, um die Funktion der Rezeptoren weiter zu spezifizieren und Ihre Wirkung zu entschlüsseln. Mit großem Interesse können also bald neue Ergebnisse in diesem Bereich erwartet werden.

### **Versuchsdurchführung**

Die zeitaufwendige Durchführung der Versuche mit humanem Bandscheibengewebe beinhaltete sowohl RNA-Isolierung und RT-PCR als auch Protein-Isolierung und Western-Blotting. Außerdem wurden die Proben immunhistochemisch und durch Übersichtsfärbungen untersucht. Dies zeigt die Vielfalt der unter Anleitung erlernten und in ihren Feinheiten modifizierten Methoden. Die Kultur der Zellen erforderte zunächst deren Isolation aus dem nativen Gewebe, an welche sich nach einigen Wochen Inkubation die Untersuchung auf RNA- als auch Proteinebene anschloss. Ebenso erfolgte nach Stimulation der Zellen mit Noradrenalin die Untersuchung der relevanten Signalwege mittels Western-Blot-Analyse der phosphorylierten bzw. unphosphorylierten Form der relevanten Kinasen.

### **Auswertung**

Nicht nur die Durchführung, sondern auch die Analyse der erlangten Ergebnisse oblag dem Erstautor. Hierzu zählte sowohl die software-gestützte Quantifizierung der Gelbanden als

auch die statistische Auswertung und letzten Endes die graphische Umsetzung und Interpretation.

### **Verfassen des Manuskripts und Präsentationen**

Mit Unterstützung der erfahrenen Wissenschaftler der Forschungsabteilung konnte der Erstautor an dem Verfassen des Manuskripts und der Revision im Rahmen des Peer-Review-Verfahrens mitwirken. Wie oben bereits genannt konnte die Arbeit auf folgenden Veranstaltungen präsentiert werden:

- März 2020: Abstract angenommen für einen Vortrag beim Annual Meeting der Deutschen Gesellschaft für Matrixbiologie (DGMB) – aufgrund von Covid-19 abgesagt
- November 2019: Poster auf dem 14. Deutschen Wirbelsäulenkongress in München
- Oktober 2019: Postervortrag auf dem Deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2019 in Berlin; **Posterpreis** im Bereich Grundlagenforschung
- April 2019: Stipendium der DGOOC für Doktoranden
- Juni 2018: Poster auf dem European Cells and Materials Congress XVIII in Davos

## 7. Literaturverzeichnis

1. Sampara P, Banala RR, Vemuri SK, Av GR, Gpv S. *Understanding the Molecular Biology of Intervertebral Disc Degeneration and Potential Gene Therapy Strategies for Regeneration: A Review*; 2018 Apr.
2. Martirosyan NL, Patel AA, Carotenuto A, et al. Genetic Alterations in Intervertebral Disc Disease. *Front Surg*. 2016;3:59. doi:10.3389/fsurg.2016.00059
3. Smith LJ, Nerurkar NL, Choi K-S, Harfe BD, Elliott DM. Degeneration and regeneration of the intervertebral disc: lessons from development. *Dis Model Mech*. 2011;4(1):31-41. doi:10.1242/dmm.006403
4. El Bagdadi K, Zaucke F, Meurer A, Straub RH, Jenei-Lanzl Z. Norepinephrine Inhibits Synovial Adipose Stem Cell Chondrogenesis via  $\alpha$ 2a-Adrenoceptor-Mediated ERK1/2 Activation. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13). doi:10.3390/ijms20133127
5. Jiao K, Zeng G, Niu L-N, et al. Activation of  $\alpha$ 2A-adrenergic signal transduction in chondrocytes promotes degenerative remodelling of temporomandibular joint. *Sci Rep*. 2016;6:30085. doi:10.1038/srep30085
6. Grässel SG. The role of peripheral nerve fibers and their neurotransmitters in cartilage and bone physiology and pathophysiology. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(6):485. doi:10.1186/s13075-014-0485-1
7. Tomaszewski KA, Saganiak K, Gładysz T, Walocha JA. The biology behind the human intervertebral disc and its endplates. *Folia Morphol (Warsz)*. 2015;74(2):157-168. doi:10.5603/FM.2015.0026
8. Kunder SL de, Rijkers K, Caelers, Inge J M H, Bie RA de, Koehler PJ, van Santbrink H. Lumbar Interbody Fusion: A Historical Overview and a Future Perspective. *Spine*. 2018;43(16):1161-1168. doi:10.1097/BRS.0000000000002534
9. Choi H, Tessier S, Silagi ES, et al. A novel mouse model of intervertebral disc degeneration shows altered cell fate and matrix homeostasis. *Matrix Biol*. 2018;70:102-122. doi:10.1016/j.matbio.2018.03.019
10. Vergroesen P-PA, Kingma I, Emanuel KS, et al. Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: a vicious circle. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(7):1057-1070. doi:10.1016/j.joca.2015.03.028
11. Hoy D, Bain C, Williams G, et al. A systematic review of the global prevalence of low back pain. *Arthritis & Rheumatism*. 2012;64(6):2028-2037. doi:10.1002/art.34347
12. Manchikanti L, Singh V, Falco FJE, Benyamin RM, Hirsch JA. Epidemiology of Low Back Pain in Adults. *Neuromodulation: Technology at the Neural Interface*. 2014;17(S2):3-10. doi:10.1111/ner.12018
13. Taher F, Essig D, Lebl DR, et al. Lumbar degenerative disc disease: current and future concepts of diagnosis and management. *Adv Orthop*. 2012;2012:970752. doi:10.1155/2012/970752
14. Vos T, Barber RM, Bell B, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2015;386(9995):743-800.
15. Huang W, Han Z, Liu J, Yu L, Yu X. Risk Factors for Recurrent Lumbar Disc Herniation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(2):e2378. doi:10.1097/MD.0000000000002378
16. Kelsey JL, Githens PB, O'Conner T, et al. Acute Prolapsed Lumbar Intervertebral Disc An Epidemiologic Study with Special Reference to Driving Automobiles and Cigarette Smoking. *Spine*. 1984;9(6).  
[https://journals.lww.com/spinejournal/Fulltext/1984/09000/Acute\\_Prolapsed\\_Lumbar\\_Intervertebral\\_Disc\\_An.12.aspx](https://journals.lww.com/spinejournal/Fulltext/1984/09000/Acute_Prolapsed_Lumbar_Intervertebral_Disc_An.12.aspx)

17. Rustenburg CME, Emanuel KS, Peeters M, Lems WF, Vergroesen P-PA, Smit TH. Osteoarthritis and intervertebral disc degeneration: Quite different, quite similar. *JOR Spine*. 2018;1(4):e1033. doi:10.1002/jsp2.1033
18. Schnake KJ, Rappert D, Storzer B, Schreyer S, Hilber F, Mehren C. Lumbar fusion-Indications and techniques. *Orthopade*. 2019;48(1):50-58. doi:10.1007/s00132-018-03670-w
19. Jarmuzek T. *Evaluierung Von Anschlussdegenerationen Zervikaler Bandscheibenprothesenimplantation Im Vergleich Zur Ventralen Platten-Schrauben-Spondylodese*. 2017.
20. Chou R, Baisden J, Carragee EJ, Resnick DK, Shaffer WO, Loeser JD. Surgery for low back pain: a review of the evidence for an American Pain Society Clinical Practice Guideline. *Spine*. 2009;34(10):1094-1109. doi:10.1097/BRS.0b013e3181a105fc
21. Dowdell J, Erwin M, Choma T, Vaccaro A, Iatridis J, Cho SK. Intervertebral Disk Degeneration and Repair. *Neurosurgery*. 2017;80(3S):S46-S54. doi:10.1093/neuros/nyw078
22. Raj PP. Intervertebral Disc: Anatomy-Physiology-Pathophysiology-Treatment. *Pain Practice*. 2008;8(1):18-44. doi:10.1111/j.1533-2500.2007.00171.x
23. Sivan SS, Hayes AJ, Wachtel E, et al. Biochemical composition and turnover of the extracellular matrix of the normal and degenerate intervertebral disc. *Eur Spine J*. 2014;23 Suppl 3:S344-53. doi:10.1007/s00586-013-2767-8
24. March L, Little C. 6 - ARTICULAR CARTILAGE IN HEALTH AND DISEASE. In: Sambrook P, Schrieber L, Taylor T, Ellis AM, eds. *The Musculoskeletal System (Second Edition)*. Churchill Livingstone; 2010:77-95.
25. Kepler CK, Ponnappan RK, Tannoury CA, Risbud MV, Anderson DG. The molecular basis of intervertebral disc degeneration. *Spine J*. 2013;13(3):318-330. doi:10.1016/j.spinee.2012.12.003
26. Karemaker JM. An introduction into autonomic nervous function. *Physiol Meas*. 2017;38(5):R89-R118. doi:10.1088/1361-6579/aa6782
27. McCorry LK. Physiology of the autonomic nervous system. *Am J Pharm Educ*. 2007;71(4):78. doi:10.5688/aj710478
28. Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem*. 1964;239:2910-2917.
29. Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2009;459(7245):356-363. doi:10.1038/nature08144
30. Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Transduction of Receptor Signals by  $\beta$ -Arrestins. *Science*. 2005;308(5721):512. doi:10.1126/science.1109237
31. Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, et al. beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem*. 2006;281(2):1261-1273. doi:10.1074/jbc.M506576200
32. Jenei-Lanzl Z, Grassel S, Pongratz G, et al. Norepinephrine inhibition of mesenchymal stem cell and chondrogenic progenitor cell chondrogenesis and acceleration of chondrogenic hypertrophy. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(9):2472-2481. doi:10.1002/art.38695
33. García-Cosamalón J, del Valle ME, Calavia MG, et al. Intervertebral disc, sensory nerves and neurotrophins: who is who in discogenic pain? *J Anat*. 2010;217(1):1-15. doi:10.1111/j.1469-7580.2010.01227.x
34. Barczewska M, Juranek J, Wojtkiewicz J. Origins and Neurochemical Characteristics of Porcine Intervertebral Disc Sympathetic Innervation: a Preliminary Report. *J Mol Neurosci*. 2017;63(1):50-57. doi:10.1007/s12031-017-0956-3
35. Pfirrmann CW, Metzdorf A, Zanetti M, Hodler J, Boos N. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine*. 2001;26(17):1873-1878. doi:10.1097/00007632-200109010-00011
36. Yu L-P, Qian W-W, Yin G-Y, Ren Y-X, Hu Z-Y. MRI assessment of lumbar intervertebral disc degeneration with lumbar degenerative disease using the Pfirrmann grading systems. *PLoS One*. 2012;7(12):e48074. doi:10.1371/journal.pone.0048074

37. Modic MT, Steinberg PM, Ross JS, Masaryk TJ, Carter JR. Degenerative disk disease: assessment of changes in vertebral body marrow with MR imaging. *Radiology*. 1988;166(1 Pt 1):193-199. doi:10.1148/radiology.166.1.3336678
38. Tiaden AN, Klawitter M, Lux V, et al. Detrimental role for human high temperature requirement serine protease A1 (HTRA1) in the pathogenesis of intervertebral disc (IVD) degeneration. *J Biol Chem*. 2012;287(25):21335-21345. doi:10.1074/jbc.M112.341032
39. Klawitter M, Hakozaki M, Kobayashi H, et al. Expression and regulation of toll-like receptors (TLRs) in human intervertebral disc cells. *Eur Spine J*. 2014;23(9):1878-1891. doi:10.1007/s00586-014-3442-4
40. van den Akker, Guus G H, Cremers A, Surtel DAM, Voncken W, Welting TJM. Isolation of Nucleus Pulposus and Annulus Fibrosus Cells from the Intervertebral Disc. *Methods Mol Biol*. 2021;2221:41-52. doi:10.1007/978-1-0716-0989-7\_4
41. Risbud MV, Schoepflin ZR, Mwale F, et al. Defining the phenotype of young healthy nucleus pulposus cells: recommendations of the Spine Research Interest Group at the 2014 annual ORS meeting. *J Orthop Res*. 2015;33(3):283-293. doi:10.1002/jor.22789
42. Kupka J, Kohler A, El Bagdadi K, et al. Adrenoceptor Expression during Intervertebral Disc Degeneration. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6). doi:10.3390/ijms21062085
43. Speichert S, Molotkov N, El Bagdadi K, Meurer A, Zaucke F, Jenei-Lanzl Z. Role of Norepinephrine in IL-1 $\beta$ -Induced Chondrocyte Dedifferentiation under Physioxia. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5). doi:10.3390/ijms20051212
44. Kos N, Gradisnik L, Velnar T. A Brief Review of the Degenerative Intervertebral Disc Disease. *Med Arch*. 2019;73(6):421-424. doi:10.5455/medarh.2019.73.421-424
45. Mallein-Gerin F, Gouttenoire J. RNA extraction from cartilage. *Methods Mol Med*. 2004;100:101-104. doi:10.1385/1-59259-810-2:101
46. McKenna LA, Gehrsitz A, Söder S, Eger W, Kirchner T, Aigner T. Effective isolation of high-quality total RNA from human adult articular cartilage. *Anal Biochem*. 2000;286(1):80-85. doi:10.1006/abio.2000.4779
47. Reno C, Marchuk L, Sciore P, Frank CB, Hart DA. Rapid isolation of total RNA from small samples of hypocellular, dense connective tissues. *Biotechniques*. 1997;22(6):1082-1086. doi:10.2144/97226bm16
48. Smale G, Sasse J. RNA isolation from cartilage using density gradient centrifugation in cesium trifluoroacetate: an RNA preparation technique effective in the presence of high proteoglycan content. *Anal Biochem*. 1992;203(2):352-356. doi:10.1016/0003-2697(92)90324-z
49. Caprez S, Menzel U, Li Z, Grad S, Alini M, Peroglio M. Isolation of high-quality RNA from intervertebral disc tissue via pronase predigestion and tissue pulverization. *JOR Spine*. 2018;1(2):e1017. doi:10.1002/jsp2.1017
50. Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine*. 2006;31(18):2151-2161. doi:10.1097/01.brs.0000231761.73859.2c
51. Gehrsitz A, McKenna LA, Söder S, Kirchner T, Aigner T. Isolation of RNA from small human articular cartilage specimens allows quantification of mRNA expression levels in local articular cartilage defects. *J Orthop Res*. 2001;19(3):478-481. doi:10.1016/S0736-0266(00)90028-7
52. Baelde HJ, Cleton-Jansen AM, van Beerendonk H, Namba M, Bovée JV, Hogendoorn PC. High quality RNA isolation from tumours with low cellularity and high extracellular matrix component for cDNA microarrays: application to chondrosarcoma. *J Clin Pathol*. 2001;54(10):778-782. doi:10.1136/jcp.54.10.778
53. Ikejima K, Enomoto N, Seabra V, Ikejima A, Brenner DA, Thurman RG. Pronase destroys the lipopolysaccharide receptor CD14 on Kupffer cells. *Am J Physiol*. 1999;276(3):G591-8. doi:10.1152/ajpgi.1999.276.3.G591
54. Bratsman A, Couasnay G, Elefteriou F. A step-by-step protocol for isolation of murine nucleus pulposus cells. *JOR Spine*. 2019;2(4):e1073. doi:10.1002/jsp2.1073

55. Peeters M, Huang CL, Vonk LA, et al. Optimisation of high-quality total ribonucleic acid isolation from cartilaginous tissues for real-time polymerase chain reaction analysis. *Bone Joint Res.* 2016;5(11):560-568. doi:10.1302/2046-3758.511.BJR-2016-0033.R3
56. Caraguel CGB, Stryhn H, Gagné N, Dohoo IR, Hammell KL. Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches. *J Vet Diagn Invest.* 2011;23(1):2-15. doi:10.1177/104063871102300102
57. Tang X, Richardson WJ, Fitch RD, Brown CR, Isaacs RE, Chen J. A new non-enzymatic method for isolating human intervertebral disc cells preserves the phenotype of nucleus pulposus cells. *Cytotechnology.* 2014;66(6):979-986. doi:10.1007/s10616-013-9650-7
58. Cui M, Wan Y, Anderson DG, et al. Mouse growth and differentiation factor-5 protein and DNA therapy potentiates intervertebral disc cell aggregation and chondrogenic gene expression. *Spine J.* 2008;8(2):287-295. doi:10.1016/j.spinee.2007.05.012
59. Kushioka J, Kaito T, Chijimatsu R, et al. A novel and efficient method for culturing mouse nucleus pulposus cells. *Spine J.* 2019;19(9):1573-1583. doi:10.1016/j.spinee.2019.04.005
60. Schubert A-K, Smink JJ, Pumberger M, Putzier M, Sittinger M, Ringe J. Standardisation of basal medium for reproducible culture of human annulus fibrosus and nucleus pulposus cells. *J Orthop Surg Res.* 2018;13(1):209. doi:10.1186/s13018-018-0914-y
61. Kluba T, Niemeyer T, Gaissmaier C, Gründer T. Human annulus fibrosus and nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: effect of degeneration and culture system on cell phenotype. *Spine.* 2005;30(24):2743-2748. doi:10.1097/01.brs.0000192204.89160.6d
62. Lakstins K, Yeater T, Arnold L, Khan S, Hoyland JA, Purmessur D. Investigating the role of culture conditions on hypertrophic differentiation in human cartilage endplate cells. *J Orthop Res.* 2020. doi:10.1002/jor.24692
63. Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J.* 2000;14(13):2097-2107. doi:10.1096/fj.99-1082com
64. Elliott DM, Sarver JJ. Young investigator award winner: validation of the mouse and rat disc as mechanical models of the human lumbar disc. *Spine.* 2004;29(7):713-722. doi:10.1097/01.brs.0000116982.19331.ea
65. Zhang Y, Xiong C, Kudelko M, et al. Early onset of disc degeneration in SM/J mice is associated with changes in ion transport systems and fibrotic events. *Matrix Biol.* 2018;70:123-139. doi:10.1016/j.matbio.2018.03.024
66. Su Q-H, Zhang Y, Shen B, Li Y-C, Tan J. Application of molybdenum target X-ray photography in imaging analysis of caudal intervertebral disc degeneration in rats. *World J Clin Cases.* 2020;8(16):3431-3439. doi:10.12998/wjcc.v8.i16.3431
67. Glaeser JD, Salehi K, Kanim LEA, et al. NF- $\kappa$ B inhibitor, NEMO-binding domain peptide attenuates intervertebral disc degeneration. *Spine J.* 2020;20(9):1480-1491. doi:10.1016/j.spinee.2020.04.025
68. NaPier Z, Kanim LEA, Arabi Y, et al. Omega-3 Fatty Acid Supplementation Reduces Intervertebral Disc Degeneration. *Med Sci Monit.* 2019;25:9531-9537. doi:10.12659/MSM.918649
69. Ao X, Wang L, Shao Y, et al. Development and Characterization of a Novel Bipedal Standing Mouse Model of Intervertebral Disc and Facet Joint Degeneration. *Clin Orthop Relat Res.* 2019. doi:10.1097/CORR.0000000000000712
70. Mulisch M. Immunlokalisation. In: Mulisch M, Welsch U, eds. *Romeis - Mikroskopische Technik.* Springer Berlin Heidelberg; 2015:417-443.
71. Matenaers C, Popper B, Rieger A, Wanke R, Blutke A. Practicable methods for histological section thickness measurement in quantitative stereological analyses. *PLoS One.* 2018;13(2):e0192879. doi:10.1371/journal.pone.0192879

72. Binch ALA, Cole AA, Breakwell LM, et al. Nerves are more abundant than blood vessels in the degenerate human intervertebral disc. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:370. doi:10.1186/s13075-015-0889-6
73. Grässel S, Muschter D. Peripheral Nerve Fibers and Their Neurotransmitters in Osteoarthritis Pathology. *Int J Mol Sci*. 2017;18(5). doi:10.3390/ijms18050931
74. Hamano S, Tomokiyo A, Hasegawa D, et al. Functions of beta2-adrenergic receptor in human periodontal ligament cells. *J Cell Biochem*. 2020. doi:10.1002/jcb.29706
75. Hadcock JR, Malbon CC. Down-regulation of beta-adrenergic receptors: agonist-induced reduction in receptor mRNA levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(14):5021-5025. doi:10.1073/pnas.85.14.5021
76. Wikberg JE, Akers M, Caron MG, Hagen PO. Norepinephrine-induced down regulation of alpha 1 adrenergic receptors in cultured rabbit aorta smooth muscle cells. *Life Sci*. 1983;33(14):1409-1417. doi:10.1016/0024-3205(83)90824-x
77. Neidlinger-Wilke C, Galbusera F, Pratsinis H, et al. *Mechanical Loading of the Intervertebral Disc: From the Macroscopic to the Cellular Level*; 2014 Jun.
78. Monnouchi S, Maeda H, Yuda A, et al. Mechanical induction of interleukin-11 regulates osteoblastic/cementoblastic differentiation of human periodontal ligament stem/progenitor cells. *J Periodontol Res*. 2015;50(2):231-239. doi:10.1111/jre.12200
79. Nguyen M-N, Kiriazis H, Ruggiero D, et al. Spontaneous ventricular tachyarrhythmias in  $\beta$ 2-adrenoceptor transgenic mice in relation to cardiac interstitial fibrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;309(5):H946-57. doi:10.1152/ajpheart.00405.2015
80. Taylor DW, Ahmed N, Parreno J, et al. Collagen type XII and versican are present in the early stages of cartilage tissue formation by both redifferentating passaged and primary chondrocytes. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(3-4):683-693. doi:10.1089/ten.TEA.2014.0103
81. Caldeira J, Santa C, Osório H, et al. Matrisome Profiling During Intervertebral Disc Development And Ageing. *Sci Rep*. 2017;7(1):11629. doi:10.1038/s41598-017-11960-0
82. Gregory KE, Keene DR, Tufa SF, Lunstrum GP, Morris NP. Developmental distribution of collagen type XII in cartilage: association with articular cartilage and the growth plate. *J Bone Miner Res*. 2001;16(11):2005-2016. doi:10.1359/jbmr.2001.16.11.2005
83. Ishii Y, Thomas AO, Guo XE, Hung CT, Chen FH. Localization and distribution of cartilage oligomeric matrix protein in the rat intervertebral disc. *Spine*. 2006;31(14):1539-1546. doi:10.1097/01.brs.0000221994.61882.4a
84. Marti C, Neidhart M, Gerber T, Hauser N, Michel BA, Häuselmann HJ. Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP): Die Rolle eines nichtkollagenen Knorpel-Matrix- Proteins als Marker der Krankheitsaktivität und Gelenkzerstörung bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und Arthrose. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 1999;58(2):79-87. doi:10.1007/s003930050156
85. Jenei-Lanzl Z, Grässel S, Pongratz G, et al. Norepinephrine inhibition of mesenchymal stem cell and chondrogenic progenitor cell chondrogenesis and acceleration of chondrogenic hypertrophy. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(9):2472-2481. doi:10.1002/art.38695
86. Guo D, Kassiri Z, Basu R, et al. Loss of PI3K $\gamma$  enhances cAMP-dependent MMP remodeling of the myocardial N-cadherin adhesion complexes and extracellular matrix in response to early biomechanical stress. *Circ Res*. 2010;107(10):1275-1289. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.229054
87. Haubeck H-D. Decorin. In: Gressner AM, Arndt T, eds. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Berlin Heidelberg; 2019:662.
88. Götz W, Barnert S, Bertagnoli R, Miosge N, Kresse H, Herken R. Immunohistochemical localization of the small proteoglycans decorin and biglycan in human intervertebral discs. *Cell Tissue Res*. 1997;289(1):185-190. doi:10.1007/s004410050864
89. Oliveira CP de, Rodrigues LMR, Fregni, Maria Vitória Ventura Dias, Gotfryd A, Made AM, Pinhal, Maria Aparecida da Silva. Extracellular matrix remodeling in experimental intervertebral disc degeneration. *Acta Ortop Bras*. 2013;21(3):144-149. doi:10.1590/S1413-78522013000300003

90. Melrose J, Ghosh P, Taylor TK. A comparative analysis of the differential spatial and temporal distributions of the large (aggrecan, versican) and small (decorin, biglycan, fibromodulin) proteoglycans of the intervertebral disc. *J Anat.* 2001;198(Pt 1):3-15. doi:10.1046/j.1469-7580.2001.19810003.x
91. Mobasheri A. Osteoarthritis year 2012 in review: biomarkers. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012;20(12):1451-1464. doi:10.1016/j.joca.2012.07.009
92. Barreto G, Soininen A, Ylinen P, et al. Soluble biglycan: a potential mediator of cartilage degradation in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:379. doi:10.1186/s13075-015-0902-0
93. Hedderich J, El Bagdadi K, Angele P, et al. Norepinephrine Inhibits the Proliferation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells via  $\beta$ 2-Adrenoceptor-Mediated ERK1/2 and PKA Phosphorylation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11). doi:10.3390/ijms21113924
94. Johnson ZI, Schoepflin ZR, Choi H, Shapiro IM, Risbud MV. Disc in flames: Roles of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in intervertebral disc degeneration. *Eur Cell Mater.* 2015;30:104-117. doi:10.22203/ecm.v030a08
95. Cunha C, Q Teixeira G, Ribeiro-Machado C, et al. Modulation of the In Vivo Inflammatory Response by Pro- Versus Anti-Inflammatory Intervertebral Disc Treatments. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5). doi:10.3390/ijms21051730
96. Lorenz J, Schäfer N, Bauer R, Jenei-Lanzl Z, Springorum RH, Grässel S. Norepinephrine modulates osteoarthritic chondrocyte metabolism and inflammatory responses. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016;24(2):325-334. doi:10.1016/j.joca.2015.08.007
97. Nakafero G, Grainge M, Valdes A, et al. Do  $\beta$ -adrenoreceptor blocking drugs associate with reduced risk of symptomatic osteoarthritis and total joint replacement in the general population? A primary care-based, prospective cohort study using the Clinical Practice Research Datalink. *BMJ Open.* 2019;9(8):e032050. doi:10.1136/bmjopen-2019-032050



## 8. Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

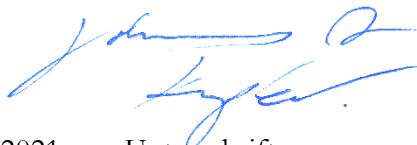
### **Adrenozeptor-Expression während der Bandscheibendegeneration (Adrenoceptor Expression during Intervertebral Disc Degeneration)**

in der Orthopädischen Universitätsklinik Friedrichsheim  
unter Betreuung und Anleitung von Univ.-Prof. Dr. med. Andrea Meurer mit Unterstützung durch Prof. Dr. rer. nat. Frank Zaucke, Dr. rer. nat. Zsuzsa Jenei-Lanzl und PD Dr. med. Marcus Rickert ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden (oder werden) in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Kupka, J.; Kohler, A.; El Bagdadi, K.; Bostelmann, R.; Brenneis, M.; Fleege, C.; Chan, D.; Zaucke, F.; Meurer, A.; Rickert, M.; Jenei-Lanzl, Z. Adrenoceptor Expression during Intervertebral Disc Degeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2085.



Frankfurt am Main, 25.06.2021

Unterschrift