

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

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

**Noradrenalin inhibiert die Proliferation humaner  
mesenchymaler Knochenmarksstammzellen über die  $\beta$ 2-  
Adrenorezeptor-vermittelte ERK1/2- und PKA-Phosphorylierung**

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

vorgelegt von  
Jessica Hedderich

aus Heppenheim (Bergstraße)

Frankfurt am Main, 2020

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referentin:	Univ.-Prof. Dr. Andrea Meurer
Korreferent:	Prof. Dr. Bernhard Brüne
2. Korreferentin:	Prof. Dr. Evelyn Ullrich
Tag der mündlichen Prüfung:	30.06.2021

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung in deutscher Sprache .....</b>	<b>5</b>
<b>Zusammenfassung in englischer Sprache.....</b>	<b>7</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
<b>Übergreifende Zusammenfassung .....</b>	<b>11</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>11</b>
1.1 Mesenchymale Stammzellen und deren Rolle bei der Reparatur von Knorpelschäden.....	11
1.2 Das sympathische Nervensystem und dessen Einfluss auf das muskuloskelettale System .....	12
1.3 Fragestellung und Ziel des Projekts .....	14
<b>2 Ergebnisse.....</b>	<b>14</b>
2.1 Adrenorezeptor-Genexpressionsprofil von humanen mesenchymalen Knochenmarksstammzellen .....	14
2.2 Proliferationskapazität humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen .....	15
2.3 Effekt von Noradrenalin auf die Proliferationskapazität humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen .....	15
2.4 Effekt von Noradrenalin auf des Adrenorezeptor- Genexpressionsprofil humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen .....	16
2.5 Aktivierung Adrenorezeptor-gekoppelter intrazellulärer Signalwege durch Noradrenalin .....	16
2.6 Umkehrung Noradrenalin-vermittelter Effekte durch die Behandlung humaner mesenchymaler Knochenmarkstammzellen mit Adrenorezeptorantagonisten .....	17
2.7 Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse .....	17
<b>3 Diskussion .....</b>	<b>18</b>
<b>Übersicht der zur Veröffentlichung angenommenen Publikationen.....</b>	<b>23</b>

<b>Publikation .....</b>	<b>24</b>
<b>Darstellung des eigenen Anteils .....</b>	<b>43</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>44</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>49</b>
<b>4 Unveröffentlichte Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
4.1 Adrenorezeptor-Genexpressionsprofil gesunder humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen .....	49
4.2 Proliferationskapazität gesunder humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen .....	51
4.3 Effekt von Noradrenalin auf die Proliferation gesunder humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen .....	52
4.4 Aktivierung Adrenorezeptor-gekoppelter intrazellulärer Signalwege durch Dauerbehandlung humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen mit Noradrenalin.....	53
4.5 Einfluss von Adrenorezeptorantagonisten auf die Proliferationskapazität humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen .....	54
<b>5 Material und Methodik.....</b>	<b>55</b>
5.1 Patientenkollektiv .....	55
5.2 Zellkulturen.....	56
5.3 Proliferationsexperimente.....	57
5.4 Lactatdehydrogenase-Assay .....	57
5.5 Western Blot.....	58
5.6 RNA-Isolation und cDNA-Synthese.....	59
5.7 Realtime PCR und Gelelektrophorese .....	59
5.8 Statistische Auswertung.....	60
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>62</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>64</b>
<b>Schriftliche Erklärung .....</b>	<b>65</b>

## Zusammenfassung in deutscher Sprache

Mesenchymale Knochenmarksstammzellen (engl. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells (BMSCs)) sind hochproliferative multipotente Progenitorzellen mit einem hohen Regenerationspotential. Sie können aus dem Knochenmark in geschädigte Knorpelareale migrieren und dort zu Chondrozyten differenzieren. Somit können sie zur Reparatur traumatisch oder osteoarthrotisch bedingter Knorpelschäden beitragen. In verschiedenen Bereichen des Gelenks konnten zudem sympathische Nervenfasern sowie der sympathische Neurotransmitter Noradrenalin (NE) nachgewiesen werden. NE inhibiert die chondrogene Differenzierungskapazität von BMSCs und kann so zur Pathogenese der Osteoarthritis (OA) beitragen. Unbekannt ist zum derzeitigen Zeitpunkt, inwiefern NE die Proliferation von humanen BMSCs beeinflusst. Ziel unserer Studie war, den Einfluss von NE auf die Proliferationskapazität humaner BMSCs zu untersuchen und beteiligte intrazelluläre Signalwege zu identifizieren.

Zu diesem Zweck wurden BMSCs von Patienten nach stattgehabtem Gelenktrauma (Trauma BMSCs) und von Patienten mit diagnostizierter OA (OA BMSCs) untersucht. Zunächst erfolgte eine Analyse des Genexpressionsmusters der verschiedenen Adrenorezeptoren (ARs). Anschließend wurden sowohl Trauma als auch OA BMSCs mit NE in unterschiedlichen Konzentrationen sowie mit NE in Kombination mit verschiedenen AR-Antagonisten (Doxazosin ( $\alpha$ 1), Yohimbin ( $\alpha$ 2) oder Propranolol ( $\beta$ 2)) behandelt. Die Aktivierung der AR-gekoppelten Signalwege wurde anhand der Phosphorylierung der beiden Hauptsignalwege der extrazellulären signalregulierten Kinasen 1/2 (ERK1/2) und der Proteinkinase A (PKA) via Western Blot untersucht.

Die Genexpression diverser AR-Subtypen konnte in Trauma ( $\alpha$ 2B-,  $\alpha$ 2C- und  $\beta$ 2-AR) und OA BMSCs ( $\alpha$ 2A-,  $\alpha$ 2B- und  $\beta$ 2-AR) nachgewiesen werden. Die Behandlung mit NE in hohen Konzentrationen führte zu einer statistisch signifikanten Inhibition der Proliferation von Trauma und OA BMSCs. Die Behandlung mit NE in niedrigen Konzentrationen hatte hingegen keinen Einfluss auf die Proliferation von Trauma und OA BMSCs. Sowohl ERK1/2 als auch PKA wurden in Trauma und OA BMSCs nach Behandlung mit NE aktiviert. Lediglich

der  $\beta$ 2-Antagonist Propranolol konnte sowohl die Effekte auf die Proliferation als auch auf die Aktivierung von ERK1/2 und PKA aufheben. Doxazosin und Yohimbin hatten hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation sowie die ERK1/2- und PKA-Phosphorylierung.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass NE die Proliferation von Trauma und OA BMSCs konzentrationsabhängig inhibiert. Dieser Effekt wird vornehmlich über eine  $\beta$ 2-AR-gekoppelte ERK1/2- und PKA-Aktivierung vermittelt. Über diesen Mechanismus kann NE das regenerative Potential von humanen BMSCs verringern und somit zur Pathogenese der OA beitragen. Über eine zielgerichtete Beeinflussung des  $\beta$ 2-Signalweges könnten sich zukünftig neue therapeutische Optionen bei der Behandlung osteoarthrotisch oder traumatisch bedingter Knorpelschäden ergeben.

## Zusammenfassung in englischer Sprache

Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells (BMSCs) are multipotent strongly proliferating cells with high regenerative potential. They have been described to migrate to articular cartilage defects and to differentiate into chondrocytes. Therefore, they might play an important role in the repair of articular cartilage defects caused by joint trauma or osteoarthritis (OA). Sympathetic nerve fibers as well as the sympathetic neurotransmitter norepinephrine (NE) have been detected in different joint tissues. NE inhibits the chondrogenic potential of BMSCs and might therefore contribute to OA pathogenesis. However, no studies investigating the effect of NE on the proliferation of human BMSCs have been performed yet. The aim of our study was to investigate the influence of NE on the proliferation capacity of human BMSCs and to identify involved intracellular signaling pathways.

Therefore, we investigated BMSCs obtained from patients after joint trauma (trauma BMSCs) and from patients with OA (OA BMSCs). First, we studied the gene expression profile of adrenergic receptor (AR) subtypes. In further experiments, trauma and OA BMSCs were treated with NE in different concentrations and with NE in combination with AR-antagonists (doxazosin ( $\alpha$ 1), yohimbine ( $\alpha$ 2) or propranolol ( $\beta$ 2)). Activation of intracellular signaling pathways was investigated by analyzing the phosphorylation of the major AR-coupled pathways extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) and protein kinase A (PKA) via Western blot.

A subset of ARs was expressed in trauma ( $\alpha$ 2B-,  $\alpha$ 2C- and  $\beta$ 2-AR) and OA BMSCs ( $\alpha$ 2A-,  $\alpha$ 2B- and  $\beta$ 2-AR). NE in high concentrations significantly inhibited the proliferation of trauma and OA BMSCs. In contrast, NE in low concentrations had no effect on the proliferation of trauma and OA BMSCs. ERK1/2 as well as PKA were activated by treatment with NE in trauma and OA BMSCs. Only the treatment with the  $\beta$ 2-antagonist propranolol abolished the effects on proliferation and on ERK1/2 and PKA phosphorylation, while doxazosin and yohimbine had no effect.

This study demonstrates that NE inhibits the proliferation capacity of human trauma and OA BMSCs dose-dependently. This effect is mainly mediated by  $\beta$ 2-AR-coupled ERK1/2 and PKA phosphorylation and might contribute to OA pathogenesis. Therefore, targeting  $\beta$ 2-signaling might provide novel therapeutic options in treatment of articular cartilage defects caused by OA or joint trauma.



## Abkürzungsverzeichnis

AR	Adrenorezeptor (engl. Adrenergic Receptor)
ASCs	Mesenchymale Stammzellen aus dem synovialen Fettgewebe (engl. Synovial Adipose-Tissue Derived Stem Cells)
BMSCs	Mesenchymale Knochenmarksstammzellen (engl. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells)
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat (engl. Cyclic Adenosine Monophosphate)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. Complementary Desoxy Ribonucleic Acid)
DMEM/F12	Dulbecco's modified eagle's medium und Ham's F-12 medium
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Saline (engl. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
ERK1/2	Extrazelluläre signalregulierte Kinasen 1/2 (engl. Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2)
FBS	Fetales Kälberserum (engl. Fetal Bovine Serum)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
LDH	Lactatdehydrogenase (engl. Lactate Dehydrogenase)
MSCs	Mesenchymale Stammzellen (engl. Mesenchymal Stem Cells)
NE	Noradrenalin, Norepinephrin (engl. Norepinephrine)
OA	Osteoarthrose (engl. Osteoarthritis)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
pERK1/2	Phosphorylierte extrazelluläre signalregulierte Kinasen 1/2 (engl. Phosphorylated Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2)
PKA	Proteinkinase A (engl. Protein Kinase A)
pPKA	Phosphorylierte Proteinkinase A (engl. Phosphorylated Protein Kinase A)

PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic Acid)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (engl. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBST	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-gepufferte Saline mit Tween20 (engl. Tris-Buffered Saline with Tween20)
TH	Tyrosinhydroxylase (engl. Tyrosine Hydroxylase)

# Übergreifende Zusammenfassung

## 1 Einleitung

### 1.1 Mesenchymale Stammzellen und deren Rolle bei der Reparatur von Knorpelschäden

Mesenchymale Stammzellen (engl. Mesenchymal Stem Cells, MSCs) sind hochproliferative, multipotente Progenitorzellen.<sup>1</sup> Sie weisen daher eine hohe Regenerationskapazität auf.<sup>2</sup> In zahlreichen Studien konnten MSCs in verschiedenen Bereichen des Gelenks nachgewiesen werden, u.a. im Synovium, im Gelenkknorpel und im Knochenmark.<sup>3-5</sup> Aufgrund dessen können sie eine wichtige Rolle bei der Reparatur von Knorpelschäden spielen und somit einen wesentlichen Beitrag zur Knorpelregeneration leisten.

#### 1.1.1 Das Potential mesenchymaler Knochenmarksstammzellen bei der Reparatur traumatisch oder osteoarthrotisch bedingter Knorpelschäden

Insbesondere mesenchymale Knochenmarksstammzellen (engl. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, BMSCs) sind in der Lage, aus dem Knochenmark in beschädigte Knorpelareale zu migrieren und dort zu Chondrozyten zu differenzieren.<sup>6,7</sup> Dennoch ist die Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels grundsätzlich stark eingeschränkt, eine endogene Reparatur traumatisch oder osteoarthrotisch bedingter Knorpelschäden findet kaum statt.<sup>8</sup> In zahlreichen Studien wurde daher versucht, über die intraartikuläre Applikation von zuvor isolierten BMSCs eine Reparatur von Knorpelschäden zu erreichen. Bisher konnte in diesen Versuchen jedoch keine erfolgreiche Regeneration des Knorpelgewebes erzielt werden. Die Gründe hierfür sind weitestgehend unbekannt.<sup>9</sup>

#### 1.1.2 Der Einfluss von Faktoren der Mikroumgebung auf das Regenerationspotential mesenchymaler Knochenmarksstammzellen

Das Regenerationspotential der BMSCs ist direkt proportional zur verfügbaren Zellzahl und dementsprechend direkt von ihrer Proliferationskapazität abhängig.<sup>10</sup> Das Proliferationspotential wird wiederum von Faktoren in der

Mikroumgebung der Zellen, z.B. von Wachstumsfaktoren, der Sauerstoffkonzentration, Entzündungsmediatoren oder Hormonen, beeinflusst.<sup>10-12</sup> In den meisten Studien werden BMSCs unter atmosphärischer Sauerstoffkonzentration (21 % O<sub>2</sub>, sog. Hyperoxie) kultiviert.<sup>13</sup> Im Knochenmark konnte hingegen lediglich eine Sauerstoffkonzentration von 1-3 % nachgewiesen werden.<sup>14</sup> Da die Sauerstoffkonzentration einen Einfluss auf die Proliferations- und Differenzierungskapazität von MSCs hat,<sup>15,16</sup> wurden die hier beschriebenen Versuche unter sog. physioxischen Kulturbedingungen (2 % O<sub>2</sub>) durchgeführt. Ein weiterer Faktor der Mikroumgebung, der bezüglich des Proliferationspotentials von Bedeutung sein könnte, ist das sympathische Nervensystem. Das Knochenmark, das Periost und das Synovium werden von sympathischen Nervenfasern innerviert und könnten über die Freisetzung sympathischer Neurotransmitter die Proliferation von BMSCs beeinflussen.<sup>17,18</sup>

## **1.2 Das sympathische Nervensystem und dessen Einfluss auf das muskuloskeletale System**

Das sympathische Nervensystem ist Teil des vegetativen Nervensystems und steuert über die Freisetzung sympathischer Neurotransmitter zahlreiche vegetative Körperfunktionen.<sup>19</sup> So können sympathische Neurotransmitter u.a. als Faktoren der Mikroumgebung wirksam sein und den Stoffwechsel einzelner Zellen beeinflussen.<sup>20</sup>

Einer der wichtigsten peripher wirksamen, sympathischen Neurotransmitter ist Noradrenalin (NE),<sup>19</sup> welches unter physiologischen Bedingungen in Konzentrationen von bis zu 10<sup>-9</sup> M im Knochenmark nachgewiesen werden konnte.<sup>21</sup> Eine lokale NE-Konzentration von bis zu 10<sup>-5</sup> M war direkt nach Aktivierung sympathischer Nervenfasern und nachfolgender Neurotransmitterfreisetzung an den sympathischen Nervenendigungen messbar.<sup>22</sup> Zudem ist NE in Konzentrationen von 10<sup>-9</sup> bis 10<sup>-7</sup> M in der Synovialflüssigkeit von Patienten nach einem Gelenktrauma oder mit bekannter Osteoarthritis (OA) nachweisbar.<sup>23</sup> Dementsprechend könnte die Proliferationskapazität von BMSCs nicht nur im Knochenmark, sondern auch während und nach deren Migration in geschädigte Knorpelareale beeinflusst

werden. Es ist davon auszugehen, dass NE hierbei in einer Konzentration von  $10^{-9}$  bis  $10^{-5}$  M wirksam ist.<sup>21-23</sup>

### 1.2.1 Konzentrationsabhängige Aktivierung der Adrenorezeptoren durch Noradrenalin

Adrenorezeptoren (ARs) gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.<sup>23-25</sup> Die konzentrationsabhängige Bindung von NE an die ARs erfolgt hierbei in Abhängigkeit der Bindungsaffinität der einzelnen ARs zu NE<sup>22</sup>: In niedrigen Konzentrationen ( $\leq 10^{-7}$  M) bindet NE überwiegend an  $\alpha$ -ARs.  $\alpha$ 1-ARs bewirken über ein  $G_q$ -Protein eine Aktivierung der Phospholipase C mit nachfolgender Freisetzung der sekundären Botenstoffe Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerin (DAG).<sup>25</sup> Nach Aktivierung von  $\alpha$ 2-ARs kommt es über die Aktivierung eines inhibitorischen G-Proteins ( $G_i$ ) zu einer Inhibition der Adenylatcyclase, die zu einem Absinken des sekundären Botenstoffes zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und nachfolgend zu einer Inhibition der Proteinkinase A (PKA) führt.<sup>26</sup>

In hohen Konzentrationen ( $> 10^{-7}$  M) bindet NE wiederum vornehmlich an  $\beta$ -ARs, welche an ein stimulatorisches G-Protein ( $G_s$ ) gekoppelt sind. Über eine Aktivierung der Adenylatcyclase und daraus resultierenden steigenden cAMP-Konzentration kommt es zu einer PKA-Aktivierung.<sup>27,28</sup>

Sowohl die Aktivierung von  $\alpha$ 2- als auch von  $\beta$ -ARs kann alternativ über ein  $G_{\beta\gamma}$ -Protein oder durch die Bindung von  $\beta$ -Arrestin an den Rezeptor zu einer Aktivierung der sog. extrazellulär signalregulierten Kinasen 1/2 (ERK1/2) führen.<sup>27-29</sup>

PKA und ERK1/2 werden dabei durch eine Phosphorylierung aktiviert.<sup>25</sup>

### 1.2.2 Einfluss des sympathischen Neurotransmitters Noradrenalin auf Zellen des muskuloskelettalen Systems

In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass NE verschiedene Zelltypen des muskuloskelettalen Systems beeinflusst:

In hohen Konzentrationen inhibiert NE die Proliferationskapazität von humanen Chondrozyten über eine Aktivierung des  $\beta$ 2-AR. Niedrige Konzentrationen führen hingegen zu steigenden Proliferationsraten über die Aktivierung des  $\alpha$ 1-AR.<sup>30</sup>

Vergleichbare Effekte hat NE auf die Proliferation von humanen Osteoblasten.<sup>31</sup> Über eine Aktivierung des  $\alpha$ 2-AR inhibiert NE das chondrogene Differenzierungspotential humaner MSCs aus dem synovialen Fettgewebe (engl. Synovial Adipose-Tissue Derived Stem Cells, ASCs). Dieser Effekt wird über eine verstärkte ERK1/2-Phosphorylierung vermittelt, es konnte jedoch kein Einfluss auf die Proliferationskapazität der ASCs nachgewiesen werden.<sup>32</sup> Ähnliche Effekte von NE konnten auch bei humanen BMSCs nachgewiesen werden: NE reduziert das chondrogene Differenzierungspotential humaner BMSCs über eine Aktivierung des  $\beta$ 2-AR.<sup>23</sup> Über diesen Mechanismus könnte NE eine Ursache für die eingeschränkte Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels sein.

### **1.3 Fragestellung und Ziel des Projekts**

Zum jetzigen Zeitpunkt existieren keine Studien, die sich mit dem Effekt von NE auf die Proliferationskapazität humaner BMSCs beschäftigen. Aus diesem Grund wurde in diesem Projekt untersucht, ob und wie NE die Proliferation von humanen BMSCs von Patienten mit OA oder nach stattgehabtem Gelenktrauma beeinflusst. Ein weiteres Ziel war die Identifikation der beteiligten AR-Subtypen und der AR-gekoppelten intrazellulären Signalwege.

Die Ergebnisse des Projekts können dazu beitragen, die Ursachen für das Versagen BMSC-vermittelter Reparaturprozesse bei der Reparatur von Knorpelschäden besser zu verstehen. Daraus lassen sich zukünftig möglicherweise neue Therapieansätze in der Behandlung von Knorpelschäden ableiten.

## **2 Ergebnisse**

### **2.1 Adrenorezeptor-Genexpressionsprofil von humanen mesenchymalen Knochenmarksstammzellen**

Die Expression von ARs ist die Voraussetzung dafür, dass NE einen Effekt auf BMSCs ausüben kann. Aus diesem Grund wurde zunächst das AR-Genexpressionsprofil von Trauma und OA BMSCs untersucht.

In Trauma BMSCs konnte die Expression des  $\alpha$ 2B-,  $\alpha$ 2C- und  $\beta$ 2-AR an Tag 0 (vor Aussäen der Zellen in die Monolayerkultur) nachgewiesen werden. OA BMSCs exprimierten hingegen  $\alpha$ 2A-,  $\alpha$ 2B- und  $\beta$ 2-ARs. Weder in Trauma noch

in OA BMSCs konnten die ARs  $\alpha 1A$ ,  $\alpha 1B$ ,  $\alpha 1D$ ,  $\beta 1$  und  $\beta 3$  detektiert werden. Auch nach sieben Tagen in Monolayerkultur unter Physioxie (2% O<sub>2</sub>) ergaben sich keine statistisch signifikanten Änderungen des AR-Genexpressionsprofils von Trauma und OA BMSCs (siehe Hedderich et al.,<sup>33</sup> Figure 1).

## **2.2 Proliferationskapazität humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen**

Um die Proliferationskapazität von Trauma und OA BMSCs zu vergleichen, wurden die Proliferationsraten von unbehandelten Trauma und OA BMSCs nach sieben Tagen in Monolayerkultur unter physioxischen Kulturbedingungen bestimmt.

Sowohl bei Trauma als auch bei OA BMSCs nahm die Zellzahl zwischen Tag 0 und Tag 7 statistisch signifikant zu. Zwischen Trauma und OA BMSCs konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Proliferationsraten festgestellt werden (siehe Hedderich et al.,<sup>33</sup> Figure 2).

## **2.3 Effekt von Noradrenalin auf die Proliferationskapazität humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen**

Trauma und OA BMSCs wurden mit NE in unterschiedlichen Konzentrationen (10<sup>-9</sup> bis 10<sup>-5</sup> M) für sieben Tage in Monolayerkultur unter physioxischen Bedingungen behandelt.

NE führte in beiden Gruppen zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Zellzahl an Tag 7 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Insbesondere die Behandlung mit NE in hohen Konzentrationen (10<sup>-6</sup> bis 10<sup>-5</sup> M) resultierte sowohl bei Trauma als auch bei OA BMSCs in einer signifikanten Reduktion der Zellzahl. Niedrige NE-Konzentrationen hatten hingegen keine statistisch signifikanten Effekte auf die Proliferationsraten (siehe Hedderich et al.,<sup>33</sup> Figure 3).

## **2.4 Effekt von Noradrenalin auf des Adrenorezeptor-Genexpressionsprofil humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen**

Um herauszufinden, ob die Behandlung mit NE zu einer Veränderung des AR-Genexpressionsprofils führt, wurden Trauma und OA BMSCs mit NE in hoher ( $10^{-6}$  M) und niedriger Konzentration ( $10^{-8}$  M) für sieben Tage in Monolayerkultur unter physioxischen Bedingungen behandelt und anschließend das AR-Genexpressionsprofil bestimmt.

Das AR-Genexpressionsprofil der Trauma BMSCs änderte sich durch die Behandlung mit NE im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe nicht (weder in hoher noch in niedriger Konzentration). Lediglich die Behandlung von OA BMSCs mit hohen NE Konzentrationen ( $10^{-6}$  M) führte zu einer leicht reduzierten Genexpression der ARs  $\alpha 2A$  und  $\alpha 2B$  (jedoch nicht statistisch signifikant, keine Veränderung der anderen untersuchten ARs, siehe Hedderich et al.,<sup>33</sup> Figure 4).

## **2.5 Aktivierung Adrenorezeptor-gekoppelter intrazellulärer Signalwege durch Noradrenalin**

Zur Identifikation beteiligter AR-gekoppelter intrazellulärer Signalwege wurden Trauma und OA BMSCs mit NE ( $10^{-6}$  M) für 5, 10, 30 und 60 min behandelt. NE führte nach einer Behandlungsdauer von 5 min zu einem Anstieg der ERK1/2- und PKA-Phosphorylierung in beiden Gruppen.

Nach 5-minütiger Stimulation mit NE kam es in Trauma BMSCs zu einem statistisch signifikanten Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung. Das Maximum wurde nach 30-minütiger Stimulation erreicht, nach 60 min kam es zu einem Rückgang der Phosphorylierung. Die Phosphorylierung der PKA nahm nach 5-minütiger Stimulation zu, das Maximum wurde nach 10-minütiger Stimulation erreicht. Nach 30 min kam es zu einem Rückgang der Phosphorylierung, welche nach 60-minütiger Stimulation wieder ihr Ausgangslevel erreichte.

Bei OA BMSCs stieg sowohl die Phosphorylierung von ERK1/2 als auch von PKA nach 5-minütiger Stimulation mit NE an. Beide erreichten ihr Maximum nach 10-minütiger NE-Stimulation und blieben auf einem konstanten Level nach 30- und 60-minütiger Stimulation (siehe Hedderich et al.,<sup>33</sup> Figure 5).



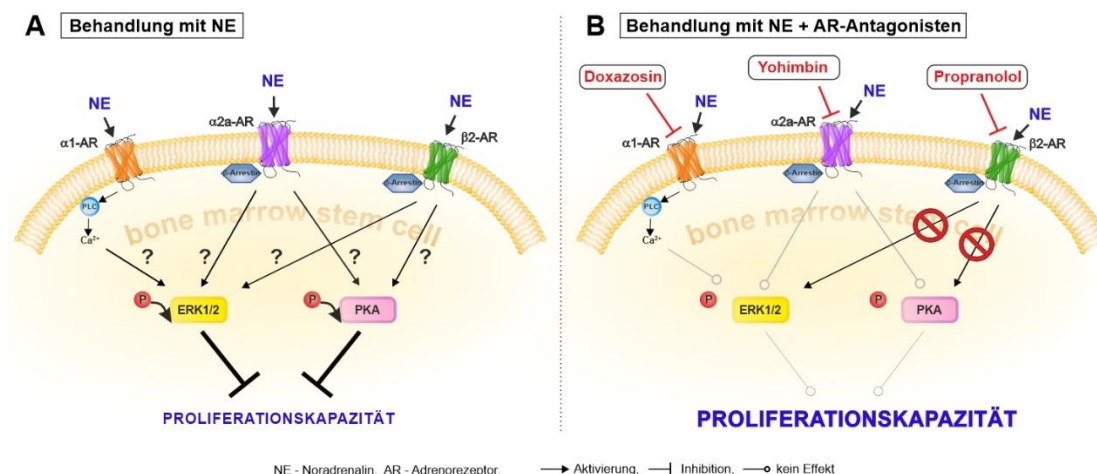
## 2.6 Umkehrung Noradrenalin-vermittelter Effekte durch die Behandlung humaner mesenchymaler Knochenmarkstammzellen mit Adrenorezeptorantagonisten

Zur Identifikation des AR-Subtyps, der die Effekte von NE auf die Proliferation von Trauma und OA BMSCs vermittelt, wurden diese mit NE ( $10^{-6}$  M) in Kombination mit spezifischen AR-Antagonisten für sieben Tage in Monolayerkultur unter physioxischen Bedingungen behandelt. Hierfür wurden der  $\alpha$ 1-AR-Antagonist Doxazosin ( $10^{-7}$  M), der  $\alpha$ 2-AR-Antagonist Yohimbin ( $10^{-7}$  M) sowie der  $\beta$ 2-AR-Antagonist Propranolol ( $10^{-6}$  M) verwendet.

Sowohl bei Trauma als auch bei OA BMSCs führte die Behandlung mit NE in Kombination mit Propranolol zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Zellzahl an Tag 7 im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit NE ( $10^{-6}$  M). Weder die Behandlung mit NE in Kombination mit Doxazosin noch mit Yohimbin führte zu einer Veränderung der Proliferationsraten im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit NE (siehe Hedderich et al.,<sup>33</sup> Figure 6A).

Die NE-bedingte Phosphorylierung von ERK1/2 und PKA konnte lediglich durch die Behandlung mit NE in Kombination mit dem  $\beta$ 2-AR-Antagonisten Propranolol aufgehoben werden (siehe Hedderich et al.,<sup>33</sup> Figure 6B).

## 2.7 Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse



**Abbildung 1** Graphische Zusammenfassung (A) Behandlung der BMSCs mit NE (B) Behandlung der BMSCs mit NE in Kombination mit spezifischen AR-Antagonisten. Graphische Zusammenfassung übernommen und angegliedert an das Graphical Abstract von Hedderich et al.<sup>33</sup>

### 3 Diskussion

Mesenchymale Knochenmarksstammzellen sind multipotente Progenitorzellen mit einem hohen Proliferations- und Regenerationspotential.<sup>34</sup> Aus diesem Grund wurde in zahlreichen Studien versucht, eine Regeneration des Gelenkknorpels durch die intraartikuläre Injektion von BMSCs zu erreichen. Bisher kam es jedoch nicht zu einer erfolgreichen Regeneration des hyalinen Gelenkknorpels, die Gründe hierfür sind weitestgehend unbekannt.<sup>9</sup> Eine Voraussetzung für die stammzellbasierte Knorpelregeneration ist die hohe Proliferationskapazität der applizierten BMSCs. Diese ist u.a. von Faktoren der Mikroumgebung abhängig.<sup>10</sup> Da sowohl sympathische Nervenfasern als auch der sympathische Neurotransmitter NE im menschlichen Knochenmark und der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden konnten,<sup>17,21,23</sup> könnte NE als Faktor der Mikroumgebung die Proliferation von BMSCs beeinflussen. Zum jetzigen Zeitpunkt existieren keine Studien, die den Einfluss von NE auf das Proliferationspotential humaner BMSCs unter physiologischen Sauerstoffkonzentrationen untersucht haben. Dementsprechend war das Ziel dieser Arbeit, die Effekte von NE auf die Proliferationskapazität von humanen BMSCs zu untersuchen und potenzielle AR-gekoppelte Signalwege zu identifizieren, um Anhaltspunkte für zukünftige Therapieoptionen zu gewinnen.

Die Voraussetzung für mögliche Effekte von NE auf die Proliferation humaner BMSCs ist die Expression von ARs. Aus diesem Grund wurde das AR-Genexpressionsprofil von BMSCs gesunder Spender (siehe 4.1) sowie von Trauma- und OA-Patienten untersucht. Sowohl gesunde als auch Trauma und OA BMSCs exprimieren  $\alpha 2A$ -,  $\alpha 2B$ -,  $\alpha 2C$ - und  $\beta 2$ -ARs an Tag 0, während  $\alpha 1A$ -,  $\alpha 1B$ -,  $\alpha 1D$ -,  $\beta 1$ - und  $\beta 3$ -ARs nicht detektiert werden konnten. Dies ist im Einklang mit früheren Studien, in denen in humanen BMSCs  $\alpha$ - und  $\beta 2$ -ARs immunhistochemisch nachgewiesen werden konnten.<sup>23</sup> Durch das Krankheitsgeschehen kommt es folglich nicht zu einer wesentlichen Veränderung der AR-Expression. Mit der Expression von ARs kann NE bereits BMSCs im gesunden Stadium beeinflussen und somit auch im Anfangsstadium zur Pathogenese der OA oder der Aggravation traumatisch bedingter Knorpelschäden beitragen.

Um auszuschließen, dass BMSCs selbst in der Lage sind NE zu synthetisieren, wurde zudem die Expression der Tyrosinhydroxylase (TH), dem Schlüsselenzym der Katecholaminsynthese,<sup>35</sup> analysiert. In Übereinstimmung mit früheren Studien konnte weder in Trauma noch in OA oder gesunden BMSCs die Expression der TH nachgewiesen werden,<sup>23</sup> sodass autokrine Effekte ausgeschlossen werden konnten.

Anschließend wurde die Proliferationskapazität humaner gesunder (siehe 4.2), Trauma und OA BMSCs nach sieben Tagen in Monolayerkultur unter physioxischen Bedingungen (2% O<sub>2</sub>) untersucht. Es konnten keine Unterschiede bezüglich des Proliferationspotentials zwischen gesunden, Trauma und OA BMSCs nachgewiesen werden. Dementsprechend scheint die Proliferationskapazität der BMSCs traumatisch oder OA-bedingt nicht eingeschränkt zu sein. Damit sind BMSCs, gemessen an der Proliferationskapazität, prinzipiell für die intraartikuläre Injektion geeignet. Es scheint jedoch weitere Faktoren in der pathologisch veränderten Mikroumgebung zu geben, die das Regenerationspotential beeinträchtigen.

In der Synovialflüssigkeit von Trauma und OA Patienten konnten erhöhte NE-Konzentrationen festgestellt werden.<sup>23</sup> Aus diesem Grund wurde der Einfluss von NE auf die Proliferationskapazität von gesunden (siehe 4.3), Trauma und OA BMSCs untersucht. Es konnte nachgewiesen, dass NE die Proliferationskapazität von gesunden, Trauma und OA BMSCs konzentrationsabhängig inhibiert. Insbesondere hohe NE-Konzentrationen (10<sup>-6</sup> bis 10<sup>-5</sup> M) führten zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Zellzahl an Tag 7 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Die Zellvitalität, welche anhand der Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität bestimmt wurde, wurde durch die Behandlung nicht beeinflusst. Dies belegt, dass die Reduktion der Zellzahl ein Resultat des reduzierten Proliferationspotentials und nicht von zytotoxischen Effekten der Behandlung ist. Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen konnten sowohl Han et al. als auch Kido et al nachweisen, dass NE in hohen Konzentrationen (10<sup>-7</sup> bis 10<sup>-4</sup> M) zu einer Steigerung der Proliferation muriner BMSCs führt.<sup>13,36</sup> Eine Erklärung für diese Unterschiede könnte die Tatsache sein, dass murine BMSCs untersucht wurden, während die hier durchgeführten Versuche an humanen BMSCs durchgeführt wurden. Da sich die Genexpressionsprofile zwischen verschiedenen Spezies unterscheiden,<sup>37</sup>

können diese unterschiedlich auf externe Faktoren reagieren. Ein weiterer Unterschied besteht in den Versuchsbedingungen: In den Versuchen von Han et al. und Kido et al. wurden murine BMSCs für 0-24 h mit NE unter hyperoxischen Kulturbedingungen (21 % O<sub>2</sub>) behandelt. Die hier durchgeführten Versuche wurden hingegen an humanen BMSCs für sieben Tage unter physioxischen Kulturbedingungen (2 % O<sub>2</sub>) durchgeführt. Diese Kulturbedingungen wurden im Hinblick auf eine nachgewiesene Sauerstoffkonzentration von 1-3 % im Knochenmark gewählt.<sup>14</sup> Zum einen könnten die unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen zu den scheinbar diskrepanten Ergebnissen beigetragen haben, da diese u.a. Einfluss auf die Proliferations- und Differenzierungskapazität von MSCs hat.<sup>15</sup> Zum anderen könnte auch die unterschiedliche Behandlungsdauer einen Einfluss auf die unterschiedlichen Ergebnisse haben: Möglicherweise führt die Kurzzeitstimulierung mit NE zu einer Steigerung der Proliferation von BMSCs, während die Langzeitstimulation mit NE gegenteilige Effekte auf die Proliferation hat. Diese gegensätzlichen Effekte von NE auf die Proliferation konnte bereits für andere Zelltypen nachgewiesen werden.<sup>38</sup> Da NE auch Einfluss auf gesunde BMSCs hat, scheint es nicht nur für die ausbleibende Knorpelregeneration bei OA oder traumatisch bedingten Knorpelschäden verantwortlich zu sein, sondern könnte bereits bei der Entstehung und Aggravation von Knorpelschäden eine wichtige Rolle spielen. Eine Ursache für den inhibitorischen Effekt von NE auf die Proliferationskapazität könnte das Herunterregulieren von ARs sein. Demzufolge wurde das AR-Genexpressionsprofil von Trauma und OA BMSCs nach siebentägiger Behandlung mit NE untersucht. Lediglich die Behandlung von OA BMSCs mit NE in hohen Konzentrationen (10<sup>-6</sup> M) führte zu einer leichten (jedoch nicht signifikanten) Herunterregulation der ARs  $\alpha$ 2A und  $\alpha$ 2B. Keinen Einfluss hatte die Behandlung hingegen auf die Expression des  $\beta$ 2-AR. Vor dem Hintergrund, dass eine leichte Herunterregulation des  $\alpha$ 2-AR lediglich in OA BMSCs beobachtet werden konnte, ist davon auszugehen, dass die NE-induzierte Proliferationsinhibition nicht das Resultat einer  $\alpha$ 2-AR-Herunterregulation ist. Es kann geschlussfolgert werden, dass die inhibitorischen Effekte von NE über den  $\beta$ 2-AR vermittelt werden könnten, da dieser am wenigsten von Veränderungen externer Faktoren beeinflusst zu werden scheint.

Nachdem signifikante Effekte von NE auf die Proliferationskapazität humaner BMSCs nachgewiesen werden konnten, sollten die beteiligten intrazellulären Signalwege identifiziert werden. Der Fokus lag hierbei auf den beiden AR-gekoppelten Hauptsignalwegen PKA und ERK1/2,<sup>18,28</sup> deren Aktivierung bei der Regulation der Proliferation verschiedener Zelltypen eine wichtige Rolle spielt.<sup>39,40</sup> Sowohl PKA als auch ERK1/2 werden bereits nach 5-minütiger Stimulation von Trauma und OA BMSCs mit NE aktiviert. Die Aktivierung von ERK1/2 war ausgeprägter und stabiler als die Aktivierung der PKA. Diese Beobachtung legt nahe, dass die NE-induzierten Effekte auf die Proliferation hauptsächlich über den ERK1/2 vermittelt werden. Wir konnten zudem nachweisen, dass NE in hoher Konzentration ( $10^{-6}$  M) bei Trauma und OA BMSCs auch nach siebentägiger Behandlung noch zu einer Aktivierung des Signalweges ERK1/2 führt (siehe 4.4). Niedrige Konzentrationen ( $10^{-8}$  M) hatten hingegen keinen Einfluss auf den Aktivierungsgrad von ERK1/2. PKA konnte sowohl durch niedrige als auch durch hohe NE-Konzentrationen auf einem konstanten Niveau aktiviert werden. PKA scheint bei der konzentrationsabhängigen Inhibition der Proliferation durch NE demzufolge nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da der inhibitorische Effekt von NE auf die Proliferationskapazität nur in hohen Konzentrationen zum Tragen kommt. In diversen Zelltypen führt die Kurzzeitstimulation von ERK1/2 zu steigenden Proliferationsraten, während die chronische bzw. Langzeitaktivierung sinkende Proliferationsraten zur Folge hat.<sup>41,42</sup> Dies wäre eine weitere Erklärung für die diskrepanten Ergebnisse dieser Arbeit und den Untersuchungen von Han et al. und Kido et al.<sup>13,36</sup>: Die Kurzzeitstimulierung mit NE führt zu einer Steigerung der Proliferationsraten von BMSCs über die kurzzeitige Aktivierung des ERK1/2-Signalweges. Die Langzeitstimulation mit NE hat hingegen als Resultat der chronischen Hyperaktivierung von ERK1/2 mit nachfolgendem Zellzyklusarrest sinkende Proliferationsraten zur Folge.

Zur Identifizierung des AR-Subtyps, der die Effekte von NE auf die Proliferation humaner BMSCs vermittelt, wurden die Zellen mit spezifischen AR-Agonisten und -Antagonisten behandelt. Der spezifische  $\beta$ 2-Agonist Formoterol inhibierte die Proliferation von Trauma und OA BMSCs im selben Umfang wie NE in hohen Konzentrationen. Der  $\alpha$ 2-Agonist UK14,308 hatte hingegen keinen Einfluss auf die Proliferation (siehe Hedderich et al.,<sup>33</sup> Supplementary Material, Figure S2A).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Effekte von NE über den  $\beta$ 2-AR vermittelt werden. Zur Bestätigung dieser Vermutung wurden Trauma und OA BMSCs mit spezifischen AR-Antagonisten allein (siehe 4.5) und in Kombination mit NE behandelt. Der  $\alpha$ 1-Antagonist Doxazosin konnte weder die Effekte von NE auf die Proliferation noch auf die Phosphorylierung von PKA und ERK1/2 aufheben. Dies ist im Einklang mit der Tatsache, dass die Aktivierung von  $\alpha$ 1-AR zu einer Aktivierung der PKC, nicht aber der PKA oder von ERK1/2, führt. Auch der  $\alpha$ 2-Antagonist Yohimbin hatte keinen Einfluss auf die Proliferation, konnte jedoch die NE-vermittelte Phosphorylierung von ERK1/2 teilweise aufheben. Da die Aktivierung des  $\alpha$ 2-AR zu einer Aktivierung des ERK1/2-Signalweges und einer Inhibierung der PKA führt,<sup>25,28</sup> ist dies konsistent mit der Fähigkeit von Yohimbin die Phosphorylierung von ERK1/2, jedoch nicht von PKA aufzuheben. Lediglich der  $\beta$ 2-Antagonist Propranolol konnte sowohl die Effekte von NE auf die Proliferation als auch auf die Phosphorylierung von ERK1/2 und PKA aufheben. Dementsprechend sind die NE-vermittelten Effekte auf Trauma und OA BMSCs das Ergebnis einer  $\beta$ 2-vermittelten PKA- und ERK1/2-Aktivierung.

Zusammenfassend konnte in der vorgelegten Arbeit nachgewiesen werden, dass die Proliferationskapazität humaner BMSCs von Trauma und OA Patienten durch NE in physiologischen Konzentrationen inhibiert wird. Diese Effekte sind das Ergebnis einer  $\beta$ 2-AR-vermittelten ERK1/2 und PKA-Aktivierung, wobei ERK1/2 als der aktivere Signalweg identifiziert werden konnte. Dementsprechend könnte NE die Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels über eine Inhibition der Proliferation der BMSCs einschränken. Hierbei scheint NE bereits in frühen Stadien auf BMSCs einzuwirken und könnte somit bereits eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Knorpelschäden spielen. Die zielgerichtete medikamentöse Beeinflussung des adrenergen Systems, insbesondere des  $\beta$ 2-ARs, könnte demzufolge einen vielversprechenden neuen Therapieansatz bei der Behandlung traumatisch oder OA-bedingter Knorpelschäden darstellen.

## **Übersicht der zur Veröffentlichung angenommenen Publikationen**

Hedderich J, El Bagdadi K, Angele P, Grässel S, Meurer A, Straub R.H, Zaucke F, Jenei-Lanzl Z. 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.



Article

# Norepinephrine Inhibits the Proliferation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells via $\beta$ 2-Adrenoceptor-Mediated ERK1/2 and PKA Phosphorylation

Jessica Hedderich <sup>1</sup>, Karima El Bagdadi <sup>1</sup>, Peter Angele <sup>2</sup>, Susanne Grässel <sup>3</sup> , Andrea Meurer <sup>1</sup>, Rainer H. Straub <sup>4</sup> , Frank Zaucke <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, 60528 Frankfurt/Main, Germany; jessica.hedderich@friedrichsheim.de (J.H.); karima.elbagdadi@friedrichsheim.de (K.E.B.); andrea.meurer@friedrichsheim.de (A.M.); frank.zaucke@friedrichsheim.de (F.Z.)

<sup>2</sup> Laboratory of Experimental Trauma Surgery, Department of Trauma Surgery, University Hospital Regensburg, 93053 Regensburg, Germany; angele@sporthopaedicum.de

<sup>3</sup> Department of Orthopedic Surgery, Experimental Orthopedics, Centre for Medical Biotechnology (ZMB), University of Regensburg, 93053 Regensburg, Germany; susanne.graessel@ukr.de

<sup>4</sup> Laboratory of Experimental Rheumatology and Neuroendocrine Immunology, Department of Internal Medicine I, University Hospital Regensburg, 93053 Regensburg, Germany; rainer.straub@ukr.de

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

Received: 18 April 2020; Accepted: 28 May 2020; Published: 30 May 2020



**Abstract:** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) represent an alternative to chondrocytes to support cartilage regeneration in osteoarthritis (OA). The sympathetic neurotransmitter norepinephrine (NE) has been shown to inhibit their chondrogenic potential; however, their proliferation capacity under NE influence has not been studied yet. Therefore, we used BMSCs obtained from trauma and OA donors and compared the expression of adrenergic receptors (AR). Then, BMSCs from both donor groups were treated with NE, as well as with combinations of NE and  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2- or  $\beta$ 1/2-AR antagonists (doxazosin, yohimbine or propranolol). Activation of AR-coupled signaling was investigated by analyzing ERK1/2 and protein kinase A (PKA) phosphorylation. A similar but not identical subset of ARs was expressed in trauma ( $\alpha$ 2B-,  $\alpha$ 2C- and  $\beta$ 2-AR) and OA BMSCs ( $\alpha$ 2A-,  $\alpha$ 2B-, and  $\beta$ 2-AR). NE in high concentrations inhibited the proliferation of both trauma and OA BMSCs significantly. NE in low concentrations did not influence proliferation. ERK1/2 as well as PKA were activated after NE treatment in both BMSC types. These effects were abolished only by propranolol. Our results demonstrate that NE inhibits the proliferation and accordingly lowers the regenerative capacity of human BMSCs likely via  $\beta$ 2-AR-mediated ERK1/2 and PKA phosphorylation. Therefore, targeting  $\beta$ 2-AR-signaling might provide novel OA therapeutic options.

**Keywords:** bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs); proliferation; regeneration; sympathetic; norepinephrine

## 1. Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent progenitor cells with high proliferative activity [1,2]. Their existence in joint tissues such as synovium, bone marrow, and articular cartilage as well as their role in cartilage regeneration has been confirmed in previous studies [3–5]. Especially bone marrow-derived MSCs (BMSCs) have been described to migrate to articular cartilage defects and to



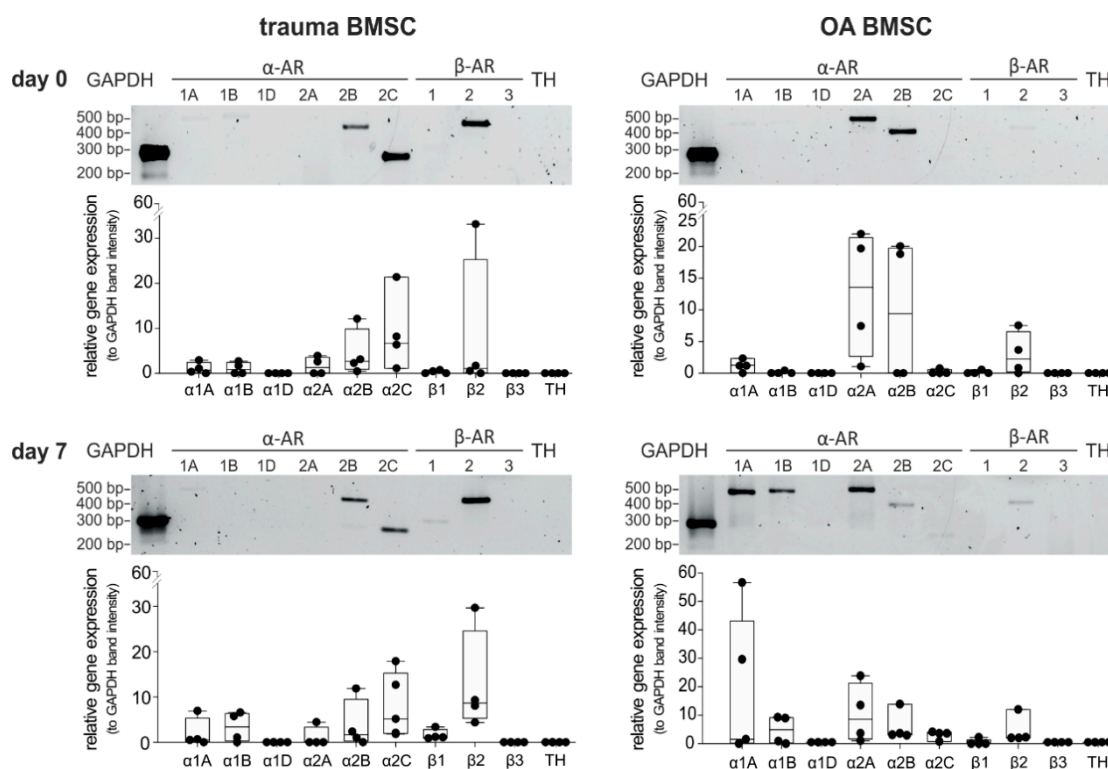
either differentiate into chondrocytes or to influence the self-regeneration capacity of cartilage by acting as trophic mediators [6,7]. Furthermore, recent studies used isolated BMSCs in clinical applications for cartilage repair in knee trauma or osteoarthritis (OA) patients; however, the success of intra-articular BMSC injection/application on articular cartilage repair was very limited [8]. The regenerative potential of BMSCs is directly proportional to the number of available BMSCs and accordingly dependent on their proliferation capacity [9]. The proliferation capacity of BMSCs is affected by numerous microenvironmental factors such as tissue origin, growth factors, oxygen concentration, presence of inflammatory mediators or hormones [9–11]. The bone marrow is innervated by sympathetic nerve fibers [12] and thus, the sympathetic nervous system may influence BMSCs proliferation. Sympathetic nerve fibers express tyrosine hydroxylase (TH), which is the key enzyme for the biosynthesis of catecholamines, such as e.g., norepinephrine (NE), one of the major peripheral sympathetic neurotransmitters. NE is indeed present in the bone marrow in physiological concentrations (up to  $10^{-9}$  M) [12]. In addition, the synovial fluid of knee trauma and OA patients contains relevant NE concentrations, namely  $10^{-9}$  M to  $10^{-7}$  M, suggesting that BMSC proliferation might also be affected after migration from the bone marrow to the damaged cartilage area [13]. Furthermore, NE concentrations up to  $10^{-5}$  M were measured locally at sympathetic nerve fiber terminals immediately after nerve activation and neurotransmitter release. Thus, in sympathetically innervated tissues, such as the bone marrow or the synovium and the synovial fluid, NE can be present in a concentration range from  $10^{-9}$  to  $10^{-5}$  M [14]. It was demonstrated in earlier studies that BMSCs express  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors (AR) belonging to the G-protein coupled receptors [13,15,16]. NE receptor binding affinity depends on its concentration [14]: At low concentrations ( $\leq 10^{-7}$  M) NE binds preferentially to  $\alpha$ -ARs leading to decreasing cAMP concentrations and subsequently to inhibition of protein kinase A (PKA) [17]. At high NE concentrations ( $\geq 10^{-6}$  M),  $\beta$ -ARs are primarily activated resulting in cAMP increase and PKA activation (G $\alpha$ s signaling). In addition,  $\alpha$ - and  $\beta$ -ARs activation alternatively leads to extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) pathway activation [18,19]. Previous studies demonstrated that NE influences the function of various musculoskeletal cell types: NE decreases the proliferation of human chondrocytes via  $\beta$ -AR signaling while low concentrations lead to increased proliferation and apoptosis rates via  $\alpha$ 1-AR signaling [20]. Similar effects of NE on the proliferation of human osteoblasts have been demonstrated in previous studies [21]. Furthermore, NE inhibits differentiation of murine chondrocytes via  $\beta$ 2-AR leading to increased ERK1/2 phosphorylation and PKA activation and similarly [22], the chondrogenic differentiation potential of human BMSCs is reduced by treatment with NE via  $\beta$ 2-AR-activation [13]. Nevertheless, no studies have been performed yet investigating the effects of NE on the proliferation capacity of human BMSCs. Therefore, we investigated if and how NE influences the proliferation of human BMSCs derived from trauma and knee OA patients. In addition, we further aimed to identify the involved ARs and AR-dependent signaling pathways. These findings will help to understand why endogenous BMSC-dependent repair processes or current clinical BMSCs applications often fail and might provide new therapeutic options by application of specific AR modulating drugs.

## 2. Results

### 2.1. AR and TH Gene Expression Profile of BMSCs

Because expression of diverse subtypes of ARs is the precondition for potential NE-mediated effects, the gene expression profile of ARs in trauma and OA BMSCs kept under physioxenic culture conditions (2% O<sub>2</sub>) was investigated by RT-PCR (mRNA levels). To recognize autocrine effects, gene expression of TH was also analyzed. Trauma and OA BMSCs expressed distinct subtypes of ARs on day 0 of monolayer culture. In trauma BMSCs,  $\alpha$ 2B-,  $\alpha$ 2C- and  $\beta$ 2-AR were strongly expressed (Figure 1). In contrast, OA BMSCs showed low expression of  $\beta$ 2-AR, while expression of  $\alpha$ 2A- and  $\alpha$ 2B-AR was strong. Neither trauma nor OA BMSCs expressed the receptors  $\alpha$ 1A,  $\alpha$ 1B-,  $\alpha$ 1D-,  $\beta$ 1-,  $\beta$ 3-AR or TH to a detectable amount on day 0. We also analyzed possible changes in the AR and

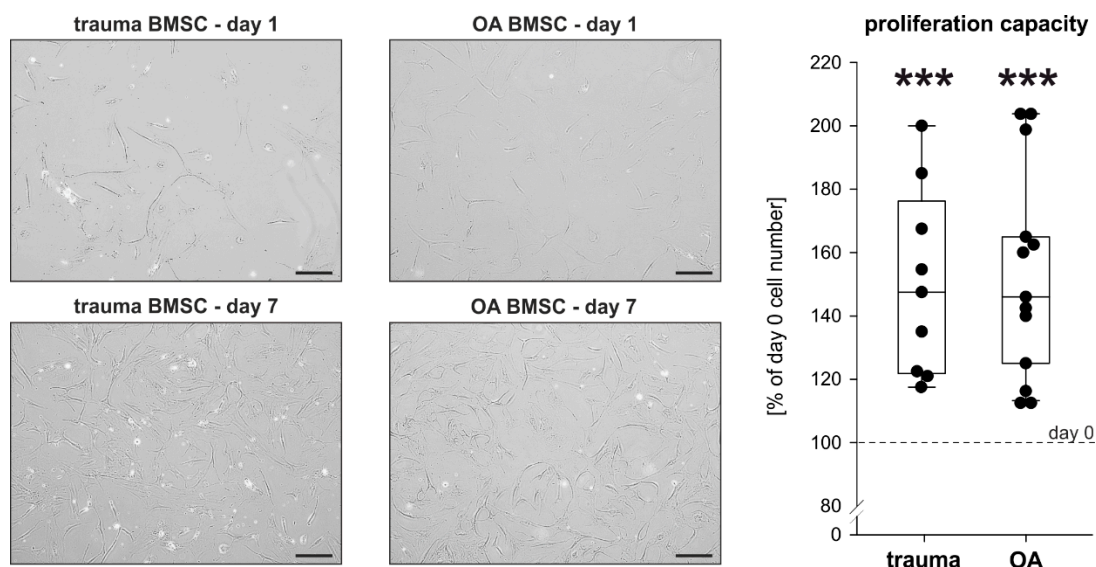
TH gene expression profile after 7 days in monolayer culture without any treatment. We compared the relative gene expression data for each receptor subtype between day 0 and day 7. In addition, we compared the gene expression data for each receptor subtype with respect to age or gender for each time point. The gene expression profile of trauma and OA BMSCs showed no significant differences after 7 days in monolayer culture. No age or gender dependent differences were detected.



**Figure 1.** AR and TH gene expression profile of trauma and OA BMSCs. Gene expression of different AR subtypes and TH in untreated BMSCs isolated from trauma or OA donors in monolayer culture at day 0 and after 7 days (representative PCR gel image of one donor) and average score of gene expression relative to the expression of Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH,  $n = 4$ , mean  $\pm$  standard deviation). Data are shown as box plots where each box represents the 25th to 75th percentiles. The lines inside the boxes represent the median. Lines outside the boxes represent the 10th to 90th percentiles. Each black dot represents one individual donor.

## 2.2. Proliferation Capacity of Trauma and OA BMSCs

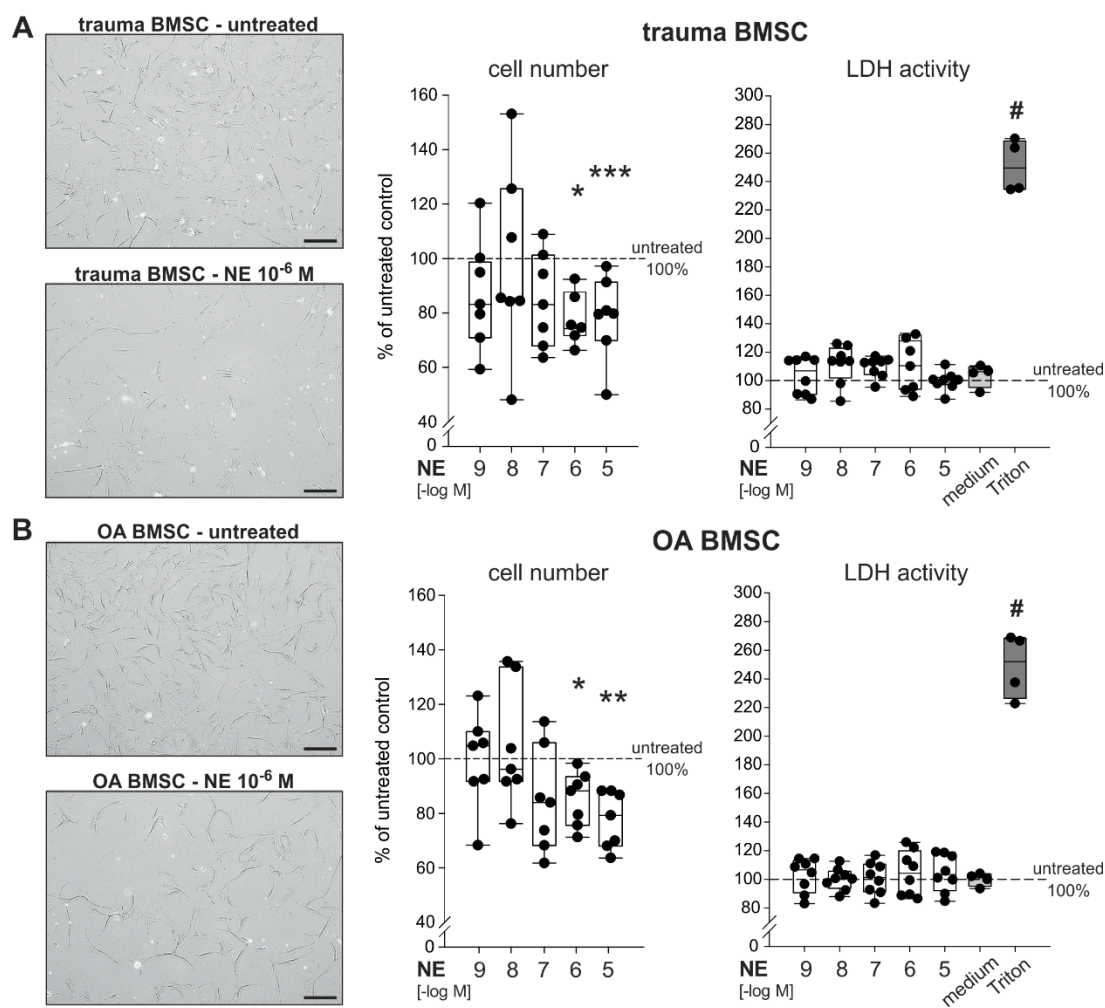
To evaluate and compare the proliferation capacity of trauma and OA BMSCs without any treatment, proliferation rates after 7 days in monolayer culture under physiologic conditions were determined. Compared to the microscopic picture at day 1 (the time point when the seeded cells became adherent) an increase of cell numbers was clearly visible until day 7 in both trauma and OA BMSCs cultures (Figure 2). The cell numbers in both trauma and OA BMSC culture increased significantly from day 0 to day 7 (Figure 2). In comparison, no statistically significant changes of proliferation rates between trauma and OA BMSCs were detected (Figure 2).



**Figure 2.** Proliferation capacity of trauma and OA BMSCs. Representative images at day 1 and day 7 and proliferation rates of trauma and OA BMSCs after 7 days in monolayer culture compared to day 0 (day 0 cell number: 200 000 cells; day 7 cell number: trauma BMSCs  $300\,181 \pm 58\,867$  cells, mean proliferation rate 150.1%,  $p < 0.001$ ; OA BMSCs  $304\,046 \pm 60\,148$  cells, mean proliferation rate 152.0%,  $p < 0.001$ ). Data are presented as percent of the initial cell count on day 0. Data are shown as box plots as explained in legend to Figure 1 ( $n = 9$  for trauma BMSCs,  $n = 13$  for OA BMSCs, bars 200  $\mu\text{m}$ ). Significant  $p$  values are presented as \*\*\*  $p < 0.001$  to the initial controls at day 0.

### 2.3. Effect of NE on Proliferation of Trauma and OA BMSCs

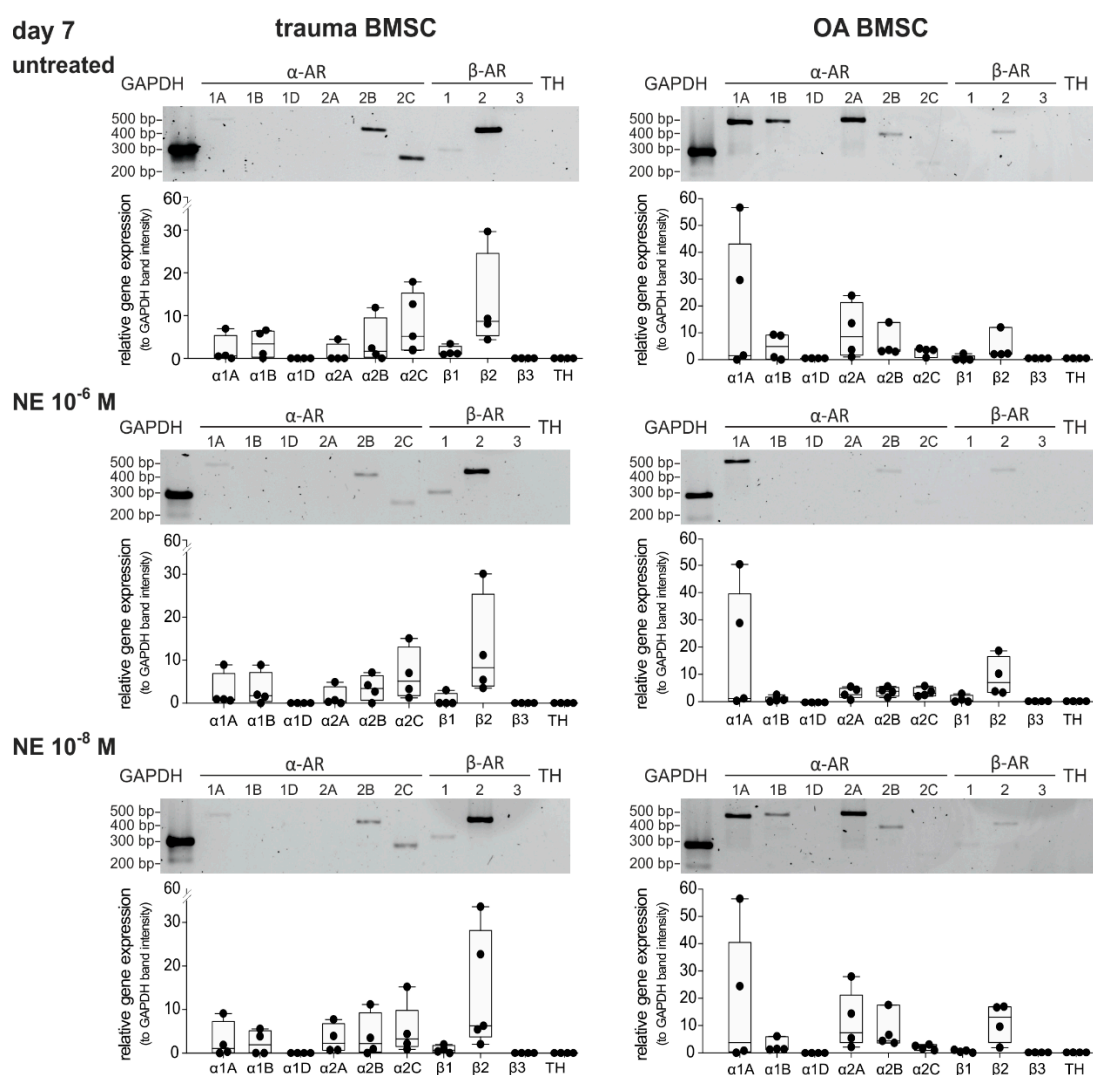
BMSCs derived from trauma and OA patients were treated with NE in different concentrations ( $10^{-9}$  to  $10^{-5}$  M) for 7 days in monolayer culture under physioxic conditions. After 7 days, BMSCs treated with high concentrations of NE ( $10^{-5}$  to  $10^{-6}$  M) showed an apparent microscopically visible decrease of confluency. Treatment with NE led to a clear and dose-dependent reduction in cell numbers on day 7 compared to the untreated control group (Figure 3A,B). Especially high concentrations of NE ( $10^{-5}$  to  $10^{-6}$  M) significantly reduced cell numbers in both trauma (Figure 3A) and OA (Figure 3B) cell cultures. NE in low concentrations ( $10^{-9}$  to  $10^{-7}$  M) had no effect on cell numbers. Cell viability of trauma and OA BMSCs, measured by lactate dehydrogenase (LDH) activity, was not affected by any treatment.



**Figure 3.** Effect of NE on the proliferation and viability of trauma and OA BMSCs (A) Representative microscopic image of trauma BMSCs in culture treated with NE ( $10^{-6}$  M) as well as vital cell count and LDH release of trauma BMSCs after 7 days of NE treatment ( $10^{-9}$  to  $10^{-5}$  M) in monolayer culture ( $p < 0.001$  for NE  $10^{-5}$  M vs. untreated control,  $p = 0.014$  for NE  $10^{-6}$  M vs. untreated control;  $n = 6-7$ ). (B) Representative microscopic image of OA BMSCs in culture treated with NE ( $10^{-6}$  M) as well as vital cell count and LDH release of OA BMSCs after 7 days NE of treatment ( $10^{-9}$  to  $10^{-5}$  M) in monolayer culture ( $p = 0.002$  for NE  $10^{-5}$  M vs. untreated control,  $p = 0.014$  for NE  $10^{-6}$  M vs. untreated control;  $n = 7-8$ ). Scale bars represent 200  $\mu\text{m}$ . Data are presented as box plots as described in the legend to Figure 1 and as percent of the untreated control (control = 100%, dotted line). Significant  $p$  values are presented as \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  or \*\*\*  $p < 0.001$  to untreated control and #  $< 0.05$  to untreated control and all treatment groups (in the case of LDH release).

#### 2.4. Changes in AR Gene Expression after Treatment with NE

We investigated if NE treatment over 7 days led to alterations in AR gene expression of trauma and OA BMSCs (Figure 4). In trauma BMSCs neither high nor low concentrations of NE had any effect on the AR expression profile compared to untreated controls (Figure 4). In OA BMSCs, the expression of  $\alpha 2A$ - and  $\alpha 2B$ -AR slightly decreased (not significant) after treatment with NE in high concentrations ( $10^{-6}$  M) in comparison to the untreated control group, while the expression of  $\alpha 1A$ -,  $\alpha 1B$ - and  $\beta 2$ -AR did not change significantly. In contrast, treatment with NE in low concentrations ( $10^{-8}$  M) had no influence on the AR expression profile of OA BMSCs.

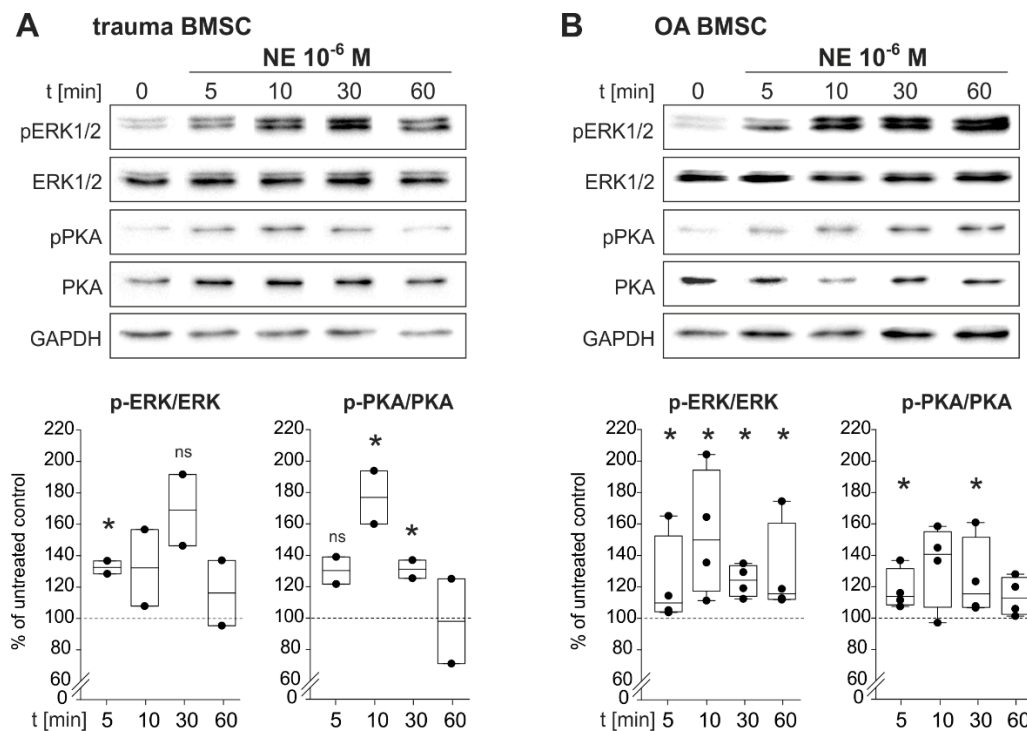


**Figure 4.** Changes in AR expression after NE treatment. Gene expression of different AR subtypes in untreated trauma and OA BMSCs in monolayer culture at day 7 and after treatment with NE  $10^{-6}$  M and NE  $10^{-8}$  M (representative image of one trauma and OA patient) and average score of gene expression ( $n = 4$ , mean  $\pm$  standard deviation). Data are shown as box plots explained in legend to Figure 1.

### 2.5. NE-Induced Intracellular Signaling

To identify NE-induced intracellular signaling pathways, BMSCs of trauma and OA patients were treated with NE ( $10^{-6}$  M) for 5, 10, 30 and 60 min. NE treatment resulted in an increase of ERK1/2 and PKA phosphorylation already after 5 min (Figure 5).

In trauma BMSCs, NE treatment resulted in a statistically significant increase of ERK1/2-phosphorylation already after 5 min. Maximal ERK1/2-phosphorylation was reached after 30 min and started to decline after 60 min of stimulation. An increase in PKA phosphorylation was already detected after 5 min of NE treatment. Maximal phosphorylation was reached after 10 min. After 30 min of stimulation, PKA activation declined and reached its initial level after 60 min (Figure 5A). In OA BMSCs, phosphorylation of ERK1/2 increased significantly after 5 min and ERK1/2 was maximally activated after 10 min. Activation remained constant up to 60 min of stimulation. PKA phosphorylation increased significantly already after 5 min. The maximum was reached after 10 min and remained constant up to 60 min of stimulation (Figure 5B).

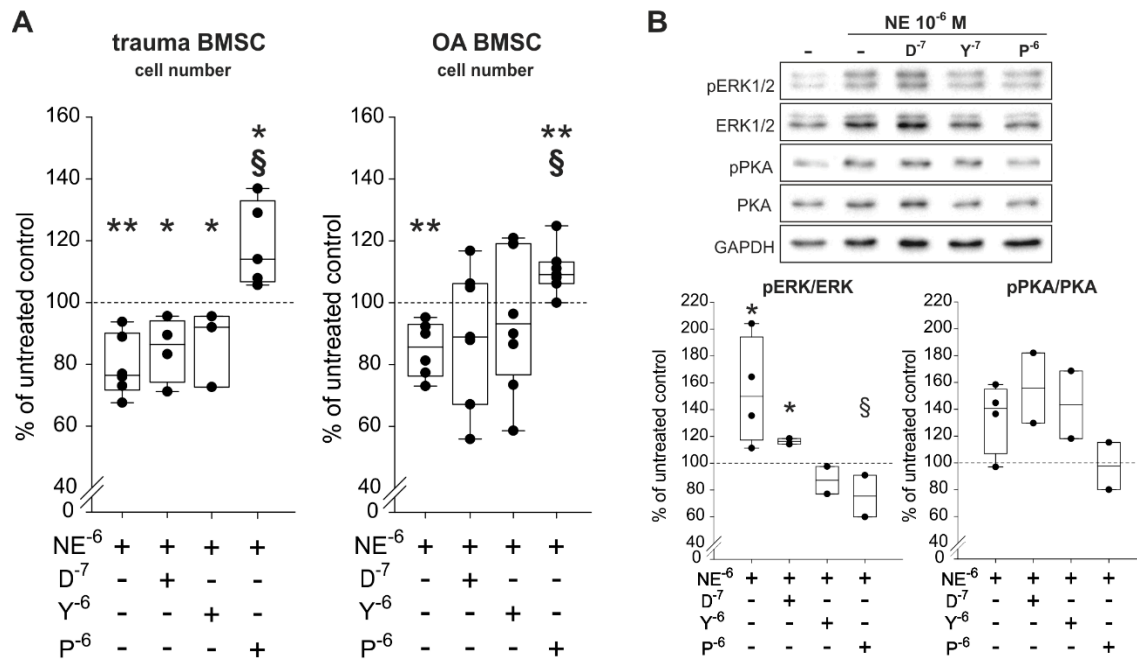


**Figure 5.** NE-mediated activation of intracellular signaling pathways in trauma and OA BMSCs. **(A)** Western Blot analysis of ERK1/2 as well as PKA phosphorylation in trauma BMSCs treated with NE 10<sup>-6</sup> M for 5, 10, 30 and 60 min. ( $n = 2$ , representative blot of one trauma patient, ERK1/2:  $p = 0.045$  for 5 min of NE stimulation vs. untreated control group,  $p = 0.07$  not significant for 30 min of NE stimulation vs. untreated control group; PKA:  $p = 0.075$  not significant for 5 min of NE stimulation vs. untreated control group,  $p = 0.042$  for 10 min of NE stimulation vs. untreated control group,  $p = 0.045$  for 30 min of NE stimulation vs. untreated control group). **(B)** Western Blot analysis of ERK1/2 as well as PKA phosphorylation in OA BMSCs treated with NE 10<sup>-6</sup> M for 5, 10, 30 and 60 min. ( $n = 4$ , representative blot of one OA patient, ERK1/2:  $p < 0.029$  for 5 min of NE stimulation vs. untreated control group,  $p = 0.036$  for 10 min,  $p = 0.018$  for 30 min and  $p < 0.029$  for 60 min; PKA:  $p = 0.029$  for 10 min,  $p = 0.029$  for 30 min). Data are shown as box plots explained in legend to Figure 1. Significant  $p$  values are presented as \*  $p \leq 0.05$  to the untreated control, ns – not significant.

## 2.6. Reversal of NE-Mediated Effects by $\beta$ 2-AR-Antagonist

To identify which ARs are involved in NE-mediated effects on proliferation and which are able to reverse the observed NE-mediated effects, trauma and OA BMSCs were treated with NE (10<sup>-6</sup> M) in combination with specific AR antagonists for 7 days in monolayer culture under physiologic conditions. The  $\alpha$ 1-AR-antagonist doxazosin (D, 10<sup>-7</sup> M), the  $\alpha$ 2-AR-antagonist yohimbine (Y, 10<sup>-7</sup> M) as well as the  $\beta$ 2-AR-antagonist propranolol (P, 10<sup>-6</sup> M) were applied. Treatment of both trauma and OA BMSCs with NE in combination with propranolol led to a significant increased cell count compared to NE treatment alone (Figure 6A). Neither doxazosin nor yohimbine in combination with NE influenced the proliferation rates of trauma and OA BMSCs statistically significantly in comparison to treatment with NE alone (Figure 6A). Cell viability correlated with LDH activity, was not affected by any treatment compared to untreated control groups (Figure S1). For the sake of completeness, cells were also treated with agonists of the two major ARs,  $\alpha$ 2-AR-specific agonist UK14,304 (UK, 10<sup>-8</sup> M) and the specific  $\beta$ 2-AR-agonist formoterol (F, 10<sup>-7</sup> M) were applied for 7 days. In both trauma and OA BMSCs, treatment with formoterol resulted in a significant reduction of the cell number to the same extent as NE in high concentrations (10<sup>-5</sup> to 10<sup>-6</sup> M) when compared to the untreated control group (Figure S2A). In contrast, UK14,304 had no influence on the proliferation of both trauma and OA BMSCs. Cell viability measured by LDH activity was not influenced by any treatment (Figure S2B).

Western Blot analysis of the ERK1/2 and the PKA pathways showed that only the specific  $\beta$ 2-AR-antagonist propranolol was able to reverse NE-induced phosphorylation of ERK1/2 and PKA (Figure 6B). Doxazosin as well as yohimbine were not able to reverse the observed NE-mediated effects on ERK1/2 and PKA phosphorylation (Figure 6B).



**Figure 6.** Proliferation and intracellular signaling in trauma and OA BMSCs treated with NE and AR antagonists. **(A)** Vital cell count of trauma and OA BMSCs treated with NE in combination with  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2- or  $\beta$ 2-AR antagonists for 7 days in monolayer culture (trauma BMSCs:  $p = 0.004$  for NE  $10^{-6}$  M vs. untreated control,  $p = 0.01$  for NE  $10^{-6}$  M + D  $10^{-7}$  M vs. untreated control,  $p = 0.024$  for NE  $10^{-6}$  M + Y  $10^{-7}$  M vs. untreated control,  $p = 0.036$  for NE  $10^{-6}$  M + P  $10^{-6}$  M vs. untreated control,  $p < 0.001$  for NE  $10^{-6}$  M + p  $10^{-6}$  M vs. stimulation with NE  $10^{-6}$  M alone; OA BMSCs:  $p = 0.009$  for NE  $10^{-6}$  M vs. untreated control,  $p = 0.004$  for NE  $10^{-6}$  M + P  $10^{-6}$  M vs. untreated control,  $p < 0.001$  for NE  $10^{-6}$  M + P  $10^{-6}$  M vs. stimulation with NE  $10^{-6}$  M alone;  $n = 3-7$ ). **(B)** Western blot analysis of ERK1/2 and PKA phosphorylation in OA BMSCs stimulated with NE in combination with  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2- or  $\beta$ 2-AR antagonists for 10 min in monolayer culture ( $n = 2$ , representative blot of one OA BMSC donor; ERK1/2:  $p = 0.036$  for NE  $10^{-6}$  M vs. untreated control group,  $p = 0.016$  for NE  $10^{-6}$  M + D  $10^{-7}$  M vs. untreated control group,  $p = 0.041$  for NE  $10^{-6}$  M + P  $10^{-6}$  M vs. stimulation with NE alone; PKA: no significant differences for  $n = 2$ ). Western Blot was only performed for OA BMSCs but based on the other results we would not expect any differences for trauma BMSCs. Data are presented as percent of the untreated control (=100%, broken line). Data are shown as box plots explained in legend to Figure 1. Significant  $p$  values are presented as \*  $p \leq 0.05$  or \*\*  $p < 0.01$  to the untreated control and as §  $p \leq 0.05$  to the NE-treated group. Abbreviations: D<sup>-7</sup>—doxazosin ( $\alpha$ 2-AR antagonist); Y<sup>-6</sup>—yohimbine ( $\alpha$ 2-AR antagonist); p<sup>-6</sup>—propranolol ( $\beta$ 2-AR-antagonist)

### 3. Discussion

Bone marrow-resident stem cells are described as playing an important role in cartilage repair [23]. For this reason, diverse attempts have been performed to apply BMSCs intra-articularly in knee trauma or OA patients; however, the regeneration was not satisfying [8]. The extensive proliferation capacity of BMSCs, which is a prerequisite for regeneration processes, depends on several bone marrow microenvironmental factors [9]. Although the presence of sympathetic nerve fibers and the release of the major sympathetic neurotransmitter NE in the human bone marrow and in the synovial fluid is well known [12,13,24], no studies analyzing the effect of NE on the proliferation capacity of human BMSCs have been performed until now. Therefore, our study aimed to investigate the effect of NE on

the proliferation of human BMSCs. We used BMSCs derived from trauma and knee OA patients, in order to compare the influence of tissue origin on their response to NE.

First, we determined the AR gene expression profile of human trauma and OA BMSCs because the expression of diverse subtypes of AR is a prerequisite for any effect of NE on these cells. We observed that both trauma and OA BMSCs, do express  $\alpha 2A$ -,  $\alpha 2B$ -,  $\alpha 2C$ -, and  $\beta 2$ -AR, while  $\alpha 1A$ -,  $\alpha 1B$ -,  $\alpha 1D$ -  $\beta 1$ - and  $\beta 3$ -AR were not detected on day 0. This is in line with an earlier study in which  $\alpha 1$ - and  $\beta 2$ -AR were identified immunohistochemically in BMSCs obtained from trauma patients [13]. In contrast, Han et al. could only confirm the expression of  $\alpha 1A$ -,  $\alpha 1B$ - and  $\alpha 1D$ -AR in rat BMSCs while  $\alpha 2$ - and  $\beta$ -AR were not detected [25]. One possible reason for this discrepancy might be that the AR gene expression profile differs between species [26] or that gene expression of resident BMSCs changes in the long-lasting pathophysiological microenvironment of OA damaged joint tissues [27]. This might also explain why the expression of  $\alpha 2C$ - and  $\beta 2$ -AR was higher in trauma BMSCs compared to OA BMSCs. Furthermore, the concentration of NE in the synovial fluid of trauma patients is higher as in OA patients [13]. This difference in local NE concentration might influence the gene expression of diverse AR subtypes in a different manner [28,29]. To consider possible autocrine effects, we investigated gene expression of TH, the key enzyme of the catecholamine synthesis [30]. In line with earlier results, TH was neither detected in human trauma nor in OA BMSCs [13]. Thus, autocrine effects could be excluded. After 7 days in monolayer culture,  $\alpha 1A$ - and  $\alpha 1B$ -AR were up-regulated in OA BMSCs, while the expression of  $\alpha 2B$ -AR decreased. In contrast, AR expression profile of trauma BMSCs did not change during monolayer culture. This is in line with the fact that the gene expression of BMSCs might be more vulnerable in OA as a result of the pathophysiological microenvironment [27]. Besides local inflammation in the joint, also systemic inflammation is associated with the disease indicated by elevated serum interleukin levels [31]. In a recent study, we demonstrated that the treatment of articular chondrocytes with OA-characteristic low dose IL-1 $\beta$  resulted in the down-regulation of all AR subtypes already after 7 days [27]. Similarly, the pro-inflammatory microenvironment in the OA bone marrow may have primed the OA BMSCs leading to a stronger response compared to trauma BMSCs with respect to AR regulation in monolayer culture. Next, we investigated the proliferation capacity of human trauma and OA BMSCs under physioxia. We did not detect any differences between trauma and OA BMSCs indicating that the proliferation potential of trauma and OA BMSCs is not impaired, although OA donors were twice as old as trauma donors. This finding is in line with an earlier study demonstrating that donor age has only an influence on activation from dormancy and early proliferation, but does not affect BMSC proliferation after passage 1 in vitro [32]. Due to the increased NE concentration in the synovial fluid of trauma and knee OA patients we examined the influence of NE on the proliferation of trauma and OA BMSCs. We observed that the proliferation capacity of these cells is inhibited dose-dependently by treatment with NE for 7 days. Especially high concentrations of NE ( $10^{-5}$  to  $10^{-6}$  M) decreased the cell count significantly in comparison to the untreated control group. Cytotoxicity expressed as LDH activity was not affected by any treatment indicating that decreased cell counts are due to reduced proliferation potential and not the result of cytotoxic effects. In contrast, Han et al. as well as Kido et al. demonstrated that the treatment of rat BMSCs with NE in high concentrations ( $10^{-4}$  to  $10^{-7}$  M) lead to an increased proliferation [25,33]. One explanation for these discrepancies might be that they investigated the proliferation potential of healthy BMSCs of a different species. In contrast, we studied human BMSCs. In addition, our BMSCs were derived from trauma and OA bone marrow both representing a pathophysiological microenvironment due to inflammatory responses after trauma or during OA progression [34,35]. It might well be that the inflammatory milieu changes the AR signaling as recently demonstrated [36]. Furthermore, rat BMSC treatment was carried out for 0–24 h under hyperoxic conditions while we treated human BMSCs for seven days under physioxia conditions. On the one hand, different oxygen concentrations might contribute to these discrepant results because oxygen tension has an influence on the proliferation and differentiation capacity of MSCs [37]. Also different treatment durations indicate that short-time stimulation of BMSCs might result in enhanced proliferation while long-term stimulation has opposite



effects as it was shown for other cell types [38]. Similarly, earlier studies demonstrated that NE induces cancer cell proliferation and that beta blockers are able to improve the clinical outcome of cancer [39–41]. This difference between somatic stem cells, such as our BMSCs, and cancer stem cells can be explained by the essential differences in their niche. The microenvironment of BMSCs provides proliferation inhibitory signals preventing tumorigenesis, while in cancer stem cells, the loss of this niche results in a different proliferative response [42].

To evaluate if the inhibitory effects of NE on the proliferation capacity are a result of AR regulation, we investigated the AR gene expression profile of OA and trauma BMSCs treated with NE. Treatment with NE in high concentrations ( $10^{-6}$  M) resulted in a slight but not significant  $\alpha$ 2A- and  $\alpha$ 2B-AR down-regulation in OA BMSCs, but especially  $\beta$ 2-AR expression did not change after treatment with NE. In contrast, AR expression profile of trauma BMSCs was not affected by treatment with NE. On the one hand, these data indicate that the pathophysiological microenvironment of OA damaged joint tissues might result in the fact that MSCs are more affected by an imbalance of external factors such as growth factors, inflammatory mediators or hormones [9–11] compared to MSCs resident in healthy joint tissues. On the other hand, NE-induced inhibition of proliferation does not seem to be a result of  $\alpha$ 2-AR down-regulation, because a slight down-regulation of  $\alpha$ 2-AR has only been observed in OA BMSCs. Thus, we concluded that inhibitory effects of NE might be mediated by the  $\beta$ 2-AR, because it seems to be the most stable AR being least affected by alterations of environmental factors.

After having observed significant effects of NE on the proliferation capacity, we aspired to identify the intracellular signaling pathways mediating those effects. We investigated the regulation of the major AR-coupled pathways, PKA and ERK1/2 [19,43]. Activation of these signaling pathways is related to the regulation of cell proliferation in different cell types [44,45]. We demonstrated that the treatment of trauma and OA BMSCs with NE results in PKA and ERK1/2 activation already after 5 min. Our data indicate that the major pathway for NE-mediated effects on proliferation of human trauma and OA BMSCs is the ERK1/2 pathway because phosphorylation of ERK1/2 is more pronounced than phosphorylation of PKA. Furthermore, phosphorylation of ERK1/2 remained stable for a longer period while PKA activation declined after 30 min. of stimulation in trauma BMSCs. In diverse cell types, short time activation of ERK1/2 leads to an increase of proliferation while chronic activation results in decreased proliferation rates [46,47]. Furthermore, this is also in line with the results of Kido et al. and Han et al. as mentioned above [25,33]: Short-time stimulation of BMSCs with NE results in increased proliferation rates possibly mediated via activation of ERK1/2. In contrast, long-time treatment of BMSCs with NE might lead to a decrease of proliferation as a result of chronic hyperactivation of ERK1/2 with subsequent cell cycle arrest.

The next step was to identify the AR subtype mediating the inhibitory effects of NE on the proliferation of human BMSCs. We demonstrated that the treatment with the specific  $\beta$ 2-AR-agonist formoterol inhibited proliferation of trauma and OA BMSCs to the same extent as the treatment with NE in high concentrations, while the treatment with the specific  $\alpha$ 2-AR agonist UK14,304 had no significant influence. These results indicate that the effects of NE on proliferation of human BMSCs are mainly mediated via  $\beta$ 2-AR. For confirmation, we also applied specific AR antagonists. The specific  $\alpha$ 1-antagonist doxazosin could neither abolish NE-mediated proliferation effects nor PKA and ERK1/2 phosphorylation. Treatment with the specific  $\alpha$ 2-AR-antagonist yohimbine did also not influence proliferation rates.  $\alpha$ 2-AR activation leads to PKA inhibition and ERK1/2 activation [16,19], which is consistent with the ability of the specific  $\alpha$ 2-AR-antagonist yohimbine to reverse NE-mediated ERK1/2 activation but not to abolish NE-induced PKA phosphorylation in our experiments. Only propranolol, a specific  $\beta$ 2-AR-antagonist reversed NE-mediated effects on proliferation of trauma and OA BMSCs and also on the phosphorylation of PKA and ERK1/2. Thus, the NE-mediated effects are the result of  $\beta$ 2-AR-mediated PKA and ERK1/2 activation. Using global ERK1/2 and PKA regulators we could show that modulation of these pathways can regulate proliferation. However, a clear link between proliferation and ERK1/2 phosphorylation in different human cell types was published in numerous

previous studies [48–51]. Therefore, we focused on the effects of AR-modulators without manipulating other ERK1/2- or PKA-dependent processes in the cell.

In conclusion, we demonstrated that the proliferation capacity of BMSCs obtained from trauma and OA patients is inhibited in the presence of NE in physiological concentrations and that this effect results from  $\beta$ 2-AR-mediated ERK1/2 and PKA activation with ERK1/2 being the more active pathway. Thus, we suggest that NE suppresses the regeneration capacity of articular cartilage by mainly inhibiting proliferation of BMSCs. This inhibitory effect of NE is not dependent on differences in the BMSCs microenvironment (trauma vs. OA). Therefore, targeting specific adrenergic receptors might represent a promising approach for the development of future therapeutic options for both trauma-induced or OA-related articular cartilage regeneration.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Patients

Human bone marrow was harvested from the iliac crests of patients after knee trauma and from OA patients undergoing total joint replacement. Knee trauma patients (crucial ligament rupture, meniscal tear) underwent surgery 2–3 weeks after injury upon the initial swelling and hematoma abated. The Ethics Committees of the University of Regensburg (vote number 13-101-0135) and of the Goethe University Frankfurt am Main (vote number 148-17B) approved the project. Experiments were performed in consideration of relevant guidelines and regulations. All patients provided their written consent after being informed about the purpose of the study. A total of 31 patients as BMSC donors were recruited for the study. Patient characteristics are shown in Table 1. We analyzed a random set of trauma and OA samples. There was only one exclusion criterion, namely that none of the donors received adrenoceptor-modulating drugs such as beta blockers. The mean age of trauma patients was significantly lower than the mean age of OA patients ( $p < 0.001$ ).

**Table 1.** Characteristics of patients under study.

Patient Characteristics	Trauma BMSC	OA BMSC
	Number/Mean/(%)/(Range)	Number/Mean/(%)/(Range)
total (number, %)	14 (100%)	17 (100%)
female/male (number, %)	2/9 * (18.18%/81.82%)	1 / 16 (5.88% / 94.12%)
age (years (mean $\pm$ stdd., (range)))	34.08 $\pm$ 10.79 (23–51)	66.44 $\pm$ 6.72 (52–76)

Abbreviations: stdd—standard deviation; \* gender of three donors unknown.

### 4.2. Cell Culture

BMSCs were isolated from the bone marrow as described previously [52]. MSC separation from the bone marrow aspirate was performed by Ficoll density-gradient centrifugation. The cells were seeded in 75cm<sup>2</sup> tissue culture flasks in basic medium DMEM/F-12 (1:1) (Dubecco's Modified Eagle Medium, Gibco® life technologies™, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany), supplemented with 10% fetal bovine serum for mesenchymal stem cells (FBS MSC, PAN BIOTECH, Aldenbach, Germany) and 1% penicillin/ streptomycin (Gibco® life technologies™, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany). Cells were cultured at 37 °C under physioxenic conditions (2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) [53], medium was changed twice per week. After expansion, cells were detached at 90–95% confluency by treatment with Accutase® solution (Sigma-Aldrich, Munich, Germany), counted manually and seeded for proliferation experiments as described below (see 4.3.). Stem cell-specific surface markers of MSCs were investigated in cells of randomly selected donors by standardized FACS analysis of CD73, CD90, and CD105 (positive markers) as well as HLA-DR, CD11b, CD19, CD34, and CD45 (negative markers) as suggested by The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy and as described by us earlier [54–56]. Both trauma and OA BMSCs were positive for the surface markers CD73, CD90, and CD105 and were negative for HLA-DR, CD11b, CD19, CD34, and CD45 (Figure S3).

#### 4.3. Proliferation Experiments

BMSCs were seeded at a density of 2.667 cells/cm<sup>2</sup> and allowed to adhere overnight at 37 °C under physioxenic conditions (2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). We used both trauma and OA BMSCs at passages 2–4. Medium was changed after 24 h and supplemented with NE ((±)-Norepinephrine (+)-bitartrate salt, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) in different concentrations (10<sup>-9</sup> to 10<sup>-5</sup> M), the specific β<sub>2</sub>-AR agonist formoterol (10<sup>-7</sup> M, formoterol hemifumerate, Tocris Bioscience, Bristol, UK) or the specific α<sub>2</sub>-AR-agonist UK14,304 (10<sup>-8</sup> M, UK14,304 tartrate, Tocris Bioscience, Bristol, UK). To investigate if effects are reversible, cells were treated with NE (10<sup>-6</sup> M) in combination with the specific α<sub>1</sub>-AR-antagonist doxazosin (10<sup>-7</sup> M, doxazosin mesylate, Tocris Bioscience, Bristol, UK), the specific α<sub>2</sub>-AR-antagonist yohimbine (10<sup>-7</sup> M, yohimbine hydrochloride, Tocris Bioscience, Bristol, UK) or the specific β-AR-antagonist propranolol (10<sup>-6</sup> M, (S)-(-)-Proporanolol hydrochloride, Tocris Bioscience, Bristol, UK) for seven days in further experiments. Medium was replaced and freshly supplemented every two days. Untreated BMSCs served as control group, where the medium without any agonist or antagonist was replaced every two days and the total medium volume was adjusted to the total volume of the treated groups.

BMSC phenotype was investigated by 10x magnification (OLYMPUS CKX41, single replicate per donor). Cells were cultured for seven days and detached as described above. Total cell count and the number of living cells were determined and compared to an untreated control group. To investigate cell viability, supernatants were obtained on day 7 and used immediately for cell viability assays as described below.

#### 4.4. Determination of Cell Viability

To demonstrate possible cytotoxic effects, cell viability was determined by measuring LDH activity in cell culture supernatants using the TaKaRa LDH Cytotoxicity Detection Kit MK401 (Takara, Kusatsu, Japan) according to the manufacturer's instructions. Supernatants were harvested on day 7. In addition, culture medium without cells and dead control treated with 1% Triton-X-100 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 10 min were used as controls. Samples of each donor were analyzed in duplicate in a 96-well plate at 490 nm (TECAN infinite M200PRO, TECAN Magellan V 7.2 (c) 2016).

#### 4.5. Western Blot Analysis

To identify AR-dependent signaling pathways cells were treated with NE 10<sup>-6</sup> M for 5, 10, 30 and 60 min at 37 °C and physioxenic conditions (2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) and the phosphorylation of the two major AR-related pathways PKA and ERK1/2 was investigated (single replicate per donor). At least 6 × 10<sup>4</sup> cells were placed in six well plates and allowed to adhere overnight. After 24 h medium was replaced to remove non-adherent cells. In addition to an untreated group, medium was supplemented with NE 10<sup>-6</sup> M. In further experiments, NE 10<sup>-6</sup> M was combined with 10<sup>-7</sup> M doxazosin, 10<sup>-7</sup> M yohimbine or 10<sup>-6</sup> M propranolol. Cells were incubated for 10 min at 37 °C under physioxenic conditions (2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Subsequently, wells were washed three times with DPBS (1X, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, -CaCl<sub>2</sub>, -MgCl<sub>2</sub>, Gibco® life technologies™, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany). Cells were harvested using PhosphoSafe™ Extraction Reagent according to the manufacturer's instructions (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). A 10% SDS-PAGE-gel was loaded with the samples and electrotransferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Amersham™ Hybond™ P 0.45 PVDF Blotting Membrane, GE Healthcare Life science, Solingen, Germany). Membranes were blocked in 5% BSA for 1 h at room temperature. Afterwards membranes were incubated with primary antibodies for at least 16 h at 4 °C. Primary and secondary antibodies are listed in Table 2, antibodies were diluted as mentioned below. Incubation was stopped by washing with TBST, followed by incubation with HRP-conjugated secondary antibody for 1 h at room temperature. After washing with TBST, protein expression was visualized using an enhanced chemiluminescence (ECL) detection solution (Bio-Rad Laboratories) and detected with Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ with Image Lab™ Software

(Version 5.2.1 build 11, © Bio-Rad Laboratories). Quantification was made with ImageJ 1.52a (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) with GAPDH as loading control.

**Table 2.** The antibodies used for Western Blot.

Antibody	Target Protein/Species/Antibody/Manufacture/Dilution
ERK	p44/42 MAPK (ERK1/2) (3A7)/mouse/mAb/Cell Signaling Technology®/1:2500
p-ERK	p-p44/42 MAPK (T202/ Y204)/rabbit/mAb/Cell Signaling Technology®/1:2500
PKA	ab32514, PKA R2, (Y116), 0,15 mg/mL/rabbit/mAb/Abcam/ 1:5000
p-PKA	ab32390, PKA R2 (E151) (phospho S99), 0,351 mg/mL/rabbit/ mAb/Abcam/1:2500
GAPDH	GAPDH Loading control antibody (GA1R)/mouse/mAb/ invitrogen by Thermo Fisher Scientific/1:2500
anti-mouse	Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulins/HRP/Dako, Glostrup, Denmark/1:1000
anti-rabbit	Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunglobulins/HRP/Dako, Glostrup, Denmark/1:1000

#### 4.6. RNA Isolation and cDNA Synthesis

RNA was isolated using NucleoSpin® RNA/ Protein kit (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined with NanoDrop One spectrophotometer. cDNA synthesis was performed using the qScript™ cDNA Synthesis Kit (Quanta Biosciences, VWR, Darmstadt, Germany) in a thermocycler qTOWER<sup>3</sup> G (Analytik Jena AG, Jena, Germany) using qPCRsoft 3.4 (© 2009–2016 © by Analytik Jena AG, Jena, Germany). Samples were incubated at 22 °C for 5 min, at 42 °C for 30 min, at 85 °C for 5 min, followed by cooling at 4 °C for 60 min.

#### 4.7. Real-Time RT-PCR and Gel Electrophoresis

To analyse gene expression of ARs real-time RT-PCR was performed using TaqPCR Master Mix Kit (QUIAGEN, Hilden, Germany) on day 0 and day 7 (duplicates per donor). 10 µL TaqPCR Master Mix, 5 µL RNase free water, 2 µM of each primer and 10 ng cDNA were added to a final volume of 20 µL. *Human* primers were obtained by Thermo Fisher Custom Primers (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany), sequences are listed in Table 3. *Human GAPDH* served as housekeeping gene, *TH* gene expression was investigated to consider possible autocrine effects. PCR was performed in a thermocycler qTOWER<sup>3</sup> G (Analytik Jena AG, Jena, Germany), programmed with qPCRsoft 3.4 (© 2009–2016 © by Analytik Jena AG, Jena, Germany) under following cycling conditions: at 94 °C for 0:01 min, followed by 36 cycles at 94 °C for 0:30 min, 64 °C for 0:30 min and 72 °C for 0:59 min.

Samples were loaded onto a 1.8% agarose gel subsequently stained with GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, CA, USA). Bands were detected and quantified with Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ with Image Lab™ Software (Version 5.2.1 build 11, © Bio-Rad Laboratories). Bands were standardized to *GAPDH* used as endogenous control.

**Table 3.** Primer sequences used for PCR (for *human* species).

Gene	NCBI Reference	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
<i>GAPDH</i>	NM_001289745.2	CTC CTG TTC GAC AGT CAG CC	TTC CCG TTC TCA GCC TTG AC
<i>ADRA1A</i>	NM_000680.3	CCA TGC TCC AGC CAA GAG TT	TCC TGT CCT AGA CTT CCT CCC
<i>ADRA1B</i>	NM_000679.3	GTC CAC CGT CAT CTC CAT CG	GAA CAA GGA GCC AAG CGG TAG
<i>ADRA1D</i>	NM_000678.3	TGA CTT TCC GCG ATC TCC TG	TTA CCT GCC ACG GCC ATA AG
<i>ADRA2A</i>	NM_000681.3	TGG TCA TCG GAG TGT TCG TG	GCC CAC TAG GAA GAT GGC TC
<i>ADRA2B</i>	NM_000682.6	GAC ATT TCA CCG GCA ACA CC	GGG ACT GAG AAC CAG GAA GC
<i>ADRA2C</i>	NM_000683.3	CGA TGT GCT GTT TTG CAC CT	GGA TGT ACC AGG TCT CGT CG
<i>ADRB1</i>	NM_000684.2	TAG CAG GTG AAC TCG AAG CC	ATC TTC CAC TCC GGT CCT CT
<i>ADRB2</i>	NM_000024.5	CAG AGC CTG CTG ACC AAG AA	GCC TAA CGT CTT GAG GGC TT
<i>ADRB3</i>	NM_000025.2	GCC AAT TCT GCC TTCAAC CC	GCC AGA GGT TTT CCA CAG GT
<i>TH</i>	NM_000360.3	CAG GCA GAG GCC ATC ATG T	GTG GTC CAA GTC CAG GTC AG

#### 4.8. Statistical Analysis

Data were analyzed with SigmaPlot software (SigmaPlot V.13, Systat Software, Erkrath, Germany) via Kruskal-Wallis ANOVA on ranks using the post hoc tests Bonferroni or Mann-Whitney U-test. We used Mann-Whitney U-test to analyze the data between two independent groups. *p* values ≤ 0.05

were considered statistically significant. Experiments were performed with samples of 3–13 patients per experiment using  $n = 6–7$  samples for proliferation experiments under NE influence,  $n = 4$  samples for AR gene expression screenings,  $n = 4–7$  samples for proliferation experiments under NE plus antagonist influence (due to clear and significant results no further replicates were analyzed),  $n = 2–4$  samples for intracellular signaling analysis via Western blot (due to clear and significant results no further replicates were analyzed). Detailed information on replicates is given in the figure legends.

**Supplementary Materials:** Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/11/3924/s1>. Figure S1: LDH release of trauma and OA BMSCs after 7 days of treatment with NE alone and in combination with AR antagonists in monolayer culture ( $n = 3–7$ ). Figure S2: Effect of AR agonists on the proliferation and viability of trauma and OA BMSCs. Figure S3: Characterization of MSC-specific surface markers of BMSCs isolated from trauma and OA donors.

**Author Contributions:** Conceptualization, F.Z., R.H.S., and Z.J.-L.; methodology, J.H. and K.E.B.; validation, F.Z., R.H.S., and Z.J.-L.; formal analysis, J.H. and Z.J.-L.; investigation, J.H.; resources, A.M., F.Z., P.A., R.H.S., and S.G.; writing—original draft preparation, J.H. and Z.J.-L.; writing—review and editing, A.M., F.Z., J.H., P.A., R.H.S., S.G.; and Z.J.-L. visualization, J.H. and Z.J.-L.; supervision, F.Z. and Z.J.-L.; project administration, Z.J.-L.; funding acquisition, F.Z., P.A., R.H.S., S.G.; and Z.J.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was supported by grants of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (to Z.J.-L. and R.H.S. JE642/4-1, to P.A. (SP7: Preconditioning of mesenchymal stem cells with mechanobiological load and hypoxia for joint regeneration in moderate OA), and to S.G. GR1301/19-1 within Research Unit FOR2407 (ExCarBon) and to F.Z. ZA561/3-1 within Research Unit FOR2722, project number 407168728). In addition, A.M., S.G., F.Z. and Z.J.-L. acknowledge financial support from the German Society for Orthopedics and Orthopedic Surgery.

**Acknowledgments:** The authors thank Anja Pasoldt, Daniela Drenkard, Elena Underberg and Madlen Melzer for the excellent technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

AR	Adrenergic receptor
BMSC	Bone marrow-derived stem cells
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
cDNA	Complementary desoxy ribonucleic acid
DMEM/F12	Dulbecco's modified eagle's medium and Ham's F-12 Medium
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
ECL	Enhanced chemiluminescence
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FBS	Fetal bovine serum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HRP	Horse radish peroxidase
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
LDH	Lactate dehydrogenase
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MSC	Mesenchymal stem cells
NE	Norepinephrine
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
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT-PCR	Reverse-transcriptase PCR
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TH	Tyrosine hydroxylase

## References

1. Pittenger, M.F.; Mackay, A.M.; Beck, S.C.; Jaiswal, R.K.; Douglas, R.; Mosca, J.D.; Moorman, M.A.; Simonetti, D.W.; Craig, S.; Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **1999**, *284*, 143–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Dudics, V.; Kunstar, A.; Kovacs, J.; Lakatos, T.; Géher, P.; Gömör, B.; Monostori, E.; Uher, F. Chondrogenic potential of mesenchymal stem cells from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: Measurements in a microculture system. *Cells Tissues Organs* **2009**, *189*, 307–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Koelling, S.; Kruegel, J.; Irmer, M.; Path, J.R.; Sadowski, B.; Miro, X.; Miosge, N. Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis. *Cell Stem Cell* **2009**, *4*, 324–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Richardson, S.M.; Kalamegam, G.; Pushparaj, P.N.; Matta, C.; Memic, A.; Khademhosseini, A.; Mobasheri, R.; Poletti, F.L.; Hoyland, J.A.; Mobasheri, A. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. *Methods* **2016**, *99*, 69–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* **1991**, *9*, 641–650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Granero-Molto, F.; Weis, J.A.; Longobardi, L.; Spagnoli, A. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Application to bone and cartilage repair. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2008**, *8*, 255–268. [[CrossRef](#)]
7. Caplan, A.I.; Dennis, J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell. Biochem.* **2006**, *98*, 1076–1084. [[CrossRef](#)]
8. Ha, C.-W.; Park, Y.-B.; Kim, S.H.; Lee, H.-J. Intra-articular Mesenchymal Stem Cells in Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review of Clinical Outcomes and Evidence of Cartilage Repair. *Arthroscopy* **2019**, *35*, 277–288.e2. [[CrossRef](#)]
9. Liu, S.; Zhou, J.; Zhang, X.; Liu, Y.; Chen, J.; Hu, B.; Song, J.; Zhang, Y. Strategies to Optimize Adult Stem Cell Therapy for Tissue Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*. [[CrossRef](#)]
10. Kim, J.M.; Cho, H.H.; Lee, S.Y.; Hong, C.P.; Yang, J.W.; Kim, Y.S.; Suh, K.T.; Jung, J.S. Role of IRAK1 on TNF-induced proliferation and NF- $\kappa$ B activation in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **2012**, *30*, 49–60. [[CrossRef](#)]
11. Gopi, I.K.; Rattan, S.I.S. Biphasic Dose-Response and Hormetic Effects of Stress Hormone Hydrocortisone on Telomerase-Immortalized Human Bone Marrow Stem Cells In Vitro. *Dose Response* **2019**, *17*, 1559325819889819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Golan, K.; Kollet, O.; Markus, R.P.; Lapidot, T. Daily light and darkness onset and circadian rhythms metabolically synchronize hematopoietic stem cell differentiation and maintenance: The role of bone marrow norepinephrine, tumor necrosis factor, and melatonin cycles. *Exp. Hematol.* **2019**, *78*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Jenei-Lanzl, Z.; Grässel, 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](#)] [[PubMed](#)]
14. Grässel, S.G. The role of peripheral nerve fibers and their neurotransmitters in cartilage and bone physiology and pathophysiology. *Arthritis Res. Ther.* **2014**, *16*, 485. [[CrossRef](#)]
15. Kotova, P.D.; Sysoeva, V.Y.; Rogachevskaja, O.A.; Bystrova, M.F.; Kolesnikova, A.S.; Tyurin-Kuzmin, P.A.; Fadeeva, J.I.; Tkachuk, V.A.; Kolesnikov, S.S. Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1843*, 1899–1908. [[CrossRef](#)]
16. Hein, L. Adrenoceptors and signal transduction in neurons. *Cell Tissue Res.* **2006**, *326*, 541–551. [[CrossRef](#)]
17. Cotecchia, S.; Kobilka, B.K.; Daniel, K.W.; Nolan, R.D.; Lapetina, E.Y.; Caron, M.G.; Lefkowitz, R.J.; Regan, J.W. Multiple second messenger pathways of alpha-adrenergic receptor subtypes expressed in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 63–69.
18. Lai, L.P.; Mitchell, J. Beta2-adrenergic receptors expressed on murine chondrocytes stimulate cellular growth and inhibit the expression of Indian hedgehog and collagen type X. *J. Cell. Biochem.* **2008**, *104*, 545–553. [[CrossRef](#)]
19. Alblas, J.; van Corven, E.J.; Hordijk, P.L.; Milligan, G.; Moolenaar, W.H. Gi-mediated activation of the p21ras-mitogen-activated protein kinase pathway by alpha 2-adrenergic receptors expressed in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 22235–22238.

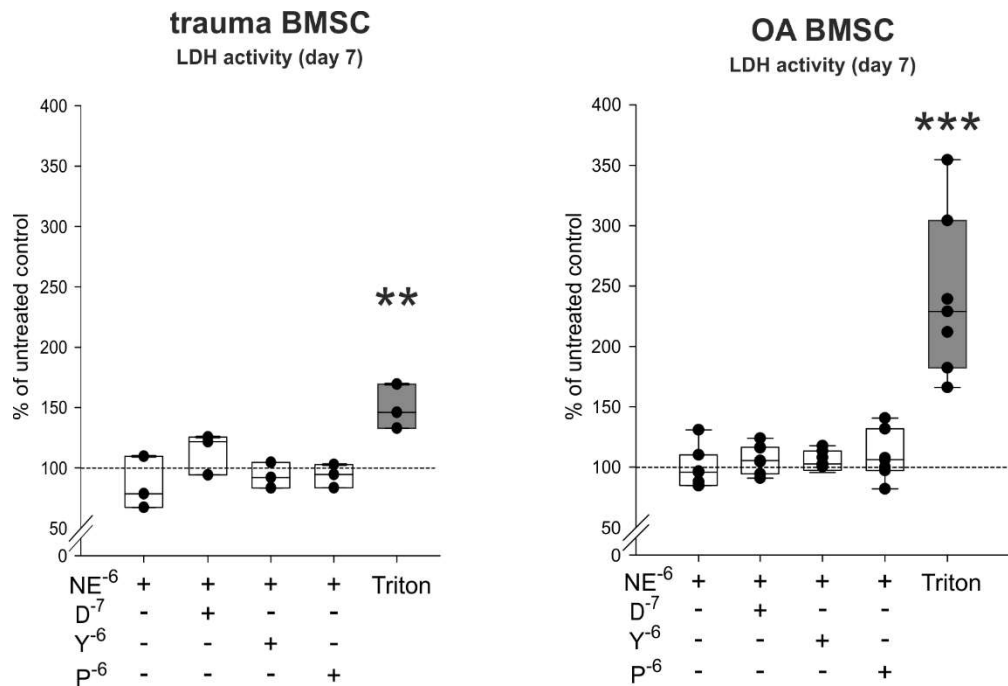
20. Lorenz, J.; Schäfer, N.; Bauer, R.; Jenei-Lanzl, Z.; Springorum, R.H.; Grässel, S. Norepinephrine modulates osteoarthritic chondrocyte metabolism and inflammatory responses. *Osteoarthr. Cartil.* **2016**, *24*, 325–334. [[CrossRef](#)]
21. Kodama, D.; Togari, A. Noradrenaline stimulates cell proliferation by suppressing potassium channels via G(i/o)-protein-coupled  $\alpha(1B)$ -adrenoceptors in human osteoblasts. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *168*, 1230–1239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Mitchell, J.; Lai, L.P.; Peralta, F.; Xu, Y.; Sugamori, K.  $\beta$ 2-adrenergic receptors inhibit the expression of collagen type II in growth plate chondrocytes by stimulating the AP-1 factor Jun-B. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2011**, *300*, E633–E639. [[CrossRef](#)]
23. Murphy, J.M.; Dixon, K.; Beck, S.; Fabian, D.; Feldman, A.; Barry, F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **2002**, *46*, 704–713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Suri, S.; Gill, S.E.; Massena de Camin, S.; Wilson, D.; McWilliams, D.F.; Walsh, D.A. Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **2007**, *66*, 1423–1428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Han, J.; Zou, Z.; Zhu, C.; Deng, J.; Wang, J.; Ran, X.; Shi, C.; Ai, G.; Li, R.; Cheng, T.; et al. DNA synthesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells through alpha1-adrenergic receptors. *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *490*, 96–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Blake, L.E.; Roux, J.; Hernando-Herraez, I.; Banovich, N.E.; Perez, R.G.; Hsiao, C.J.; Eres, I.; Cuevas, C.; Marques-Bonet, T.; Gilad, Y. A comparison of gene expression and DNA methylation patterns across tissues and species. *Genome Res.* **2020**, *30*, 250–262. [[CrossRef](#)]
27. 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*. [[CrossRef](#)]
28. Bengtsson, T.; Cannon, B.; Nedergaard, J. Differential adrenergic regulation of the gene expression of the beta-adrenoceptor subtypes beta1, beta2 and beta3 in brown adipocytes. *Biochem. J.* **2000**, *347 Pt 3*, 643–651. [[CrossRef](#)]
29. Lei, B.; Zhang, Y.; Han, C. Sustained norepinephrine stimulation induces different regulation of expression in three alpha1-adrenoceptor subtypes. *Life Sci.* **2001**, *69*, 301–308. [[CrossRef](#)]
30. Spector, S.; Gordon, R.; Sjoerdsma, A.; Udenfriend, S. End-product inhibition of tyrosine hydroxylase as a possible mechanism for regulation of norepinephrine synthesis. *Mol. Pharmacol.* **1967**, *3*, 549–555.
31. Sokolove, J.; Lopus, C.M. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: Latest findings and interpretations. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* **2013**, *5*, 77–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Dexheimer, V.; Mueller, S.; Braatz, F.; Richter, W. Reduced Reactivation from Dormancy but Maintained Lineage Choice of Human Mesenchymal Stem Cells with Donor Age. *PLoS ONE* **2011**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kido, A.; Yoshitani, K.; Shimizu, T.; Akahane, M.; Fujii, H.; Tsukamoto, S.; Kondo, Y.; Honoki, K.; Imano, M.; Tanaka, Y. Effect of mesenchymal stem cells on hypoxia-induced desensitization of  $\beta$ 2-adrenergic receptors in rat osteosarcoma cells. *Oncol. Lett.* **2012**, *4*, 745–750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Haller, J.M.; McFadden, M.; Kubiak, E.N.; Higgins, T.F. Inflammatory cytokine response following acute tibial plateau fracture. *J. Bone Joint Surg. Am.* **2015**, *97*, 478–483. [[CrossRef](#)]
35. Liu-Bryan, R.; Terkeltaub, R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2015**, *11*, 35–44. [[CrossRef](#)]
36. Jenei-Lanzl, Z.; Zwingenberg, J.; Lowin, T.; Anders, S.; Straub, R.H. Proinflammatory receptor switch from G $\alpha$ s to G $\alpha$ i signaling by  $\beta$ -arrestin-mediated PDE4 recruitment in mixed RA synovial cells. *Brain Behav. Immun.* **2015**, *50*, 266–274. [[CrossRef](#)]
37. Wang, D.W.; Fermor, B.; Gimble, J.M.; Awad, H.A.; Guilak, F. Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells. *J. Cell. Physiol.* **2005**, *204*, 184–191. [[CrossRef](#)]
38. Refsnes, M.; Thoresen, G.H.; Sandnes, D.; Dajani, O.F.; Dajani, L.; Christoffersen, T. Stimulatory and inhibitory effects of catecholamines on DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures: Role of alpha 1- and beta-adrenergic mechanisms. *J. Cell. Physiol.* **1992**, *151*, 164–171. [[CrossRef](#)]
39. Zhang, B.; Wu, C.; Chen, W.; Qiu, L.; Li, S.; Wang, T.; Xie, H.; Li, Y.; Li, C.; Li, L. The stress hormone norepinephrine promotes tumor progression through  $\beta$ 2-adrenoreceptors in oral cancer. *Arch. Oral Biol.* **2020**, *113*, 104712. [[CrossRef](#)]

40. Nilsson, M.B.; Le, X.; Heymach, J.V.  $\beta$ -Adrenergic Signaling in Lung Cancer: A Potential Role for Beta-Blockers. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2020**, *15*, 27–36. [[CrossRef](#)]
41. Coelho, M.; Soares-Silva, C.; Brandão, D.; Marino, F.; Cosentino, M.; Ribeiro, L.  $\beta$ -Adrenergic modulation of cancer cell proliferation: Available evidence and clinical perspectives. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2017**, *143*, 275–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Li, L.; Neves, W.B. Normal stem cells and cancer stem cells: The niche matters. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 4553–4557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Bronnikov, G.; Houstek, J.; Nedergaard, J. Beta-adrenergic, cAMP-mediated stimulation of proliferation of brown fat cells in primary culture. Mediation via beta 1 but not via beta 3 adrenoceptors. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 2006–2013. [[PubMed](#)]
44. Dai, Z.; Li, Y.; Quarles, L.D.; Song, T.; Pan, W.; Zhou, H.; Xiao, Z. Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. *Phytomedicine* **2007**, *14*, 806–814. [[CrossRef](#)]
45. Pullar, C.E.; Isseroff, R.R. The beta 2-adrenergic receptor activates pro-migratory and pro-proliferative pathways in dermal fibroblasts via divergent mechanisms. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 592–602. [[CrossRef](#)]
46. Tombes, R.M.; Auer, K.L.; Mikkelsen, R.; Valerie, K.; Wymann, M.P.; Marshall, C.J.; McMahon, M.; Dent, P. The mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade can either stimulate or inhibit DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes depending upon whether its activation is acute/phasic or chronic. *Biochem. J.* **1998**, *330*, 1451–1460. [[CrossRef](#)]
47. Meloche, S.; Pouyssegur, J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* **2007**, *26*, 3227–3239. [[CrossRef](#)]
48. Dumaz, N.; Marais, R. Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. Based on the anniversary prize of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie Lecture delivered on 5 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. *FEBS J.* **2005**, *272*, 3491–3504. [[CrossRef](#)]
49. Stork, P.J.S.; Schmitt, J.M. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* **2002**, *12*, 258–266. [[CrossRef](#)]
50. Liu, D.; Huang, Y.; Bu, D.; Liu, A.D.; Holmberg, L.; Jia, Y.; Tang, C.; Du, J.; Jin, H. Sulfur dioxide inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via suppressing the Erk/MAP kinase pathway mediated by cAMP/PKA signaling. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1251. [[CrossRef](#)]
51. Zhang, W.; Liu, H.T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* **2002**, *12*, 9–18. [[CrossRef](#)]
52. Jenei-Lanzl, Z.; Straub, R.H.; Dienstknecht, T.; Huber, M.; Hager, M.; Grassel, S.; Kujat, R.; Angele, M.K.; Nerlich, M.; Angele, P. Estradiol inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells via nonclassic signaling. *Arthritis Rheum.* **2010**, *62*, 1088–1096. [[CrossRef](#)]
53. Anderson, D.E.; Markway, B.D.; Weekes, K.J.; McCarthy, H.E.; Johnstone, B. Physioxia Promotes the Articular Chondrocyte-Like Phenotype in Human Chondroprogenitor-Derived Self-Organized Tissue. *Tissue Eng. Part A* **2018**, *24*, 264–274. [[CrossRef](#)]
54. Herrmann, M.; Anders, S.; Straub, R.H.; Jenei-Lanzl, Z. TNF inhibits catecholamine production from induced sympathetic neuron-like cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis in vitro. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9645. [[CrossRef](#)]
55. El Bagdadi, K.; Zaucke, F.; Meurer, A.; Straub, R.H.; Jenei-Lanzl, Z. Norepinephrine Inhibits Synovial Adipose Stem Cell Chondrogenesis via  $\alpha$ 2a-Adrenoceptor-Mediated ERK1/2 Activation. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*. [[CrossRef](#)]
56. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy* **2006**, *8*, 315–317. [[CrossRef](#)]

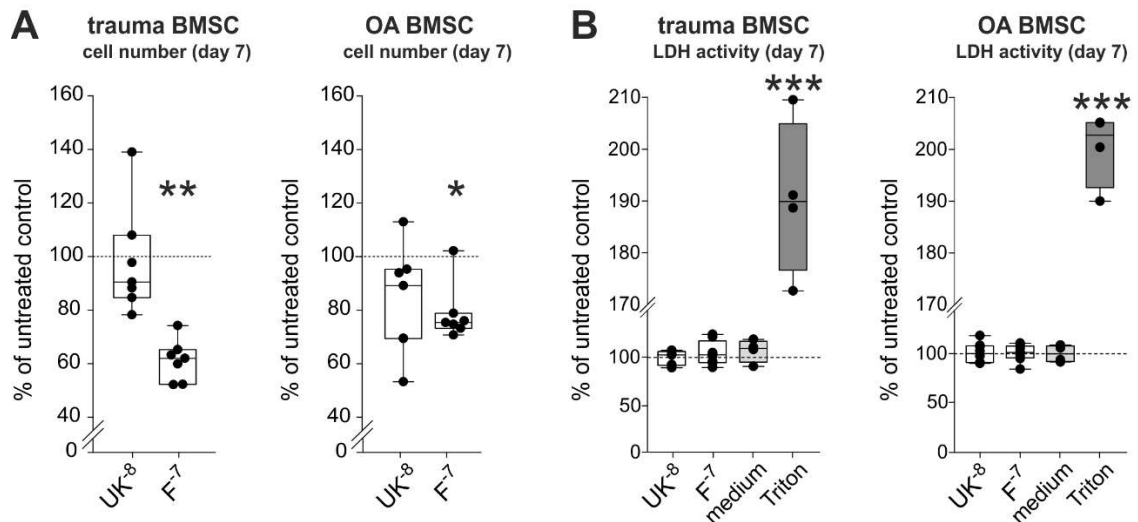




## Supplementary Material

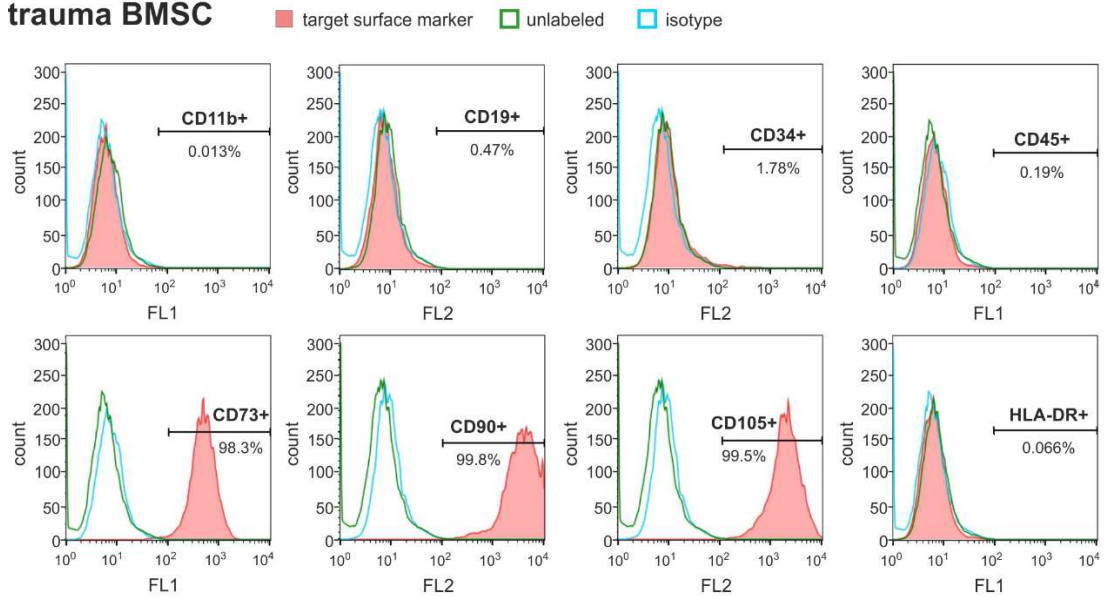


**Supplementary Figure 1.** LDH release of trauma and OA BMSCs after 7 days of treatment with NE alone and in combination with AR antagonists in monolayer culture (n=3-7). Data are presented as box plots as described in the legend to figure 1 and as percent of the untreated control (control= 100 %, broken line). Significant p values are presented as \*\*p<0.01 or p<0.001 to the untreated control. Abbreviations: D-7 – doxazosin ( $\alpha$ 2-AR antagonist); Y-6 – yohimbine ( $\alpha$ 2-AR antagonist); P-6 – propranolol ( $\beta$ 2-AR-antagonist)

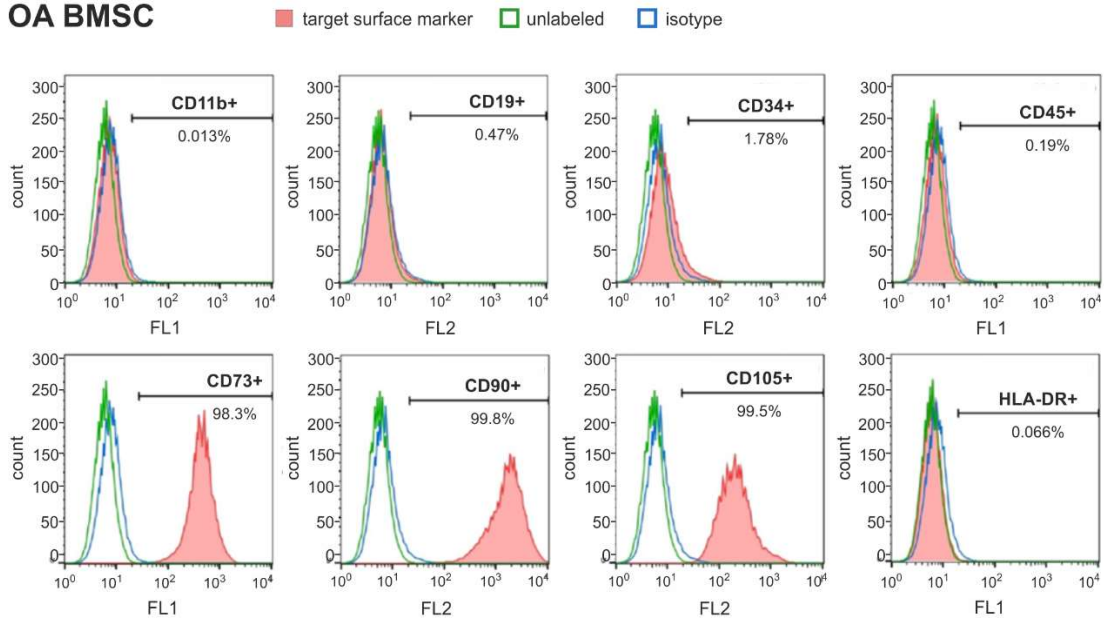


**Supplementary Figure 2.** Effect of AR agonists on the proliferation and viability of trauma and OA BMSCs (A) Vital cell count of trauma and OA BMSCs 7 days after treatment with  $\alpha$ 2-AR-agonist UK14,304 (UK,  $10^{-8}$  M) and  $\beta$ 2-AR-agonist formoterol (F,  $10^{-7}$  M) (trauma BMSCs: p<0.001 for F  $10^{-7}$  M vs. untreated control, OA BMSCs: p=0.026 for F  $10^{-7}$  M vs. untreated control; n=7). (B) LDH release of trauma and OA BMSCs after treatment with  $\alpha$ 2-AR-agonist UK14,304 (UK,  $10^{-8}$  M) and  $\beta$ 2-AR-agonist formoterol (F,  $10^{-7}$  M) (n=4). Data are presented as box plots as described in the legend to Figure 1 and as percent of the untreated control (control= 100 %, broken line). Significant p values are presented as \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 to the untreated control.

### trauma BMSC



### OA BMSC



**Supplementary Figure 3.** Characterization of MSC-specific surface markers of BMSCs isolated from trauma and OA donors. BMSCs of both donor groups were negative for CD11b, CD19, CD34, CD45, and HLA-DR and were positive for CD73, CD90, and CD105 as suggested by *The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* (representative FACS analysis pictures of n=1 trauma and n=1 OA BMSCs).

## **Darstellung des eigenen Anteils**

Die vorliegende Arbeit ist Teil der DFG-geförderten Studie "Sympathic influences on articular cartilage regeneration capacity and osteoarthritis manifestation" (Subproject 8, Resarch Unit 2407 "ExCarBon"). Die Ergebnisse wurden nach Prüfung in einem anonymisierten Peer-Review-Verfahren am 30.05.2020 im *International Journal of Molecular Sciences* publiziert. Das Projekt konnte durch die Zusammenarbeit aller Autoren erfolgreich durchgeführt werden.

Als Erstautorin (J.H.) war ich zunächst unter Anleitung durch Karima El Bagdadi (K.E.B.), später allein, für die Durchführung der Versuche verantwortlich. Unter ständiger Supervision durch meine Betreuer Frau Professorin Andrea Meurer (A.M.), Herrn Professor Frank Zaucke (F.Z.) und Frau Dr. Zsuzsa Jenei-Lanzl (Z.J.-L.) und stetiger Verbesserung der Methodik konnten diese erfolgreich durchgeführt werden. Die gesamte statistische Auswertung oblag in Rücksprache mit meiner Betreuerin Z.J.-L. meiner Verantwortung. Dies gilt ebenso für die graphische Darstellung und die Verfassung der ersten Version des Manuskripts. In enger Zusammenarbeit mit meiner Betreuerin Z.J.-L. erfolgte die Überarbeitung und Fertigstellung des Manuskriptes unter Supervision durch F.Z. Das Manuskript konnte schließlich den Mitautoren zur Korrektur vorgelegt werden. Nach Einbeziehung der Korrekturvorschläge konnten wir dieses im *International Journal of Molecular Sciences* einreichen. Nach Begutachtung in einem anonymisierten Peer-Review-Verfahren erfolgte die Einarbeitung der Korrekturvorschläge durch mich und meine Betreuerin Z.J.-L.

Die Konzeptualisierung des Projektes, Projektverwaltung, Fördergeldakquise und Ressourcenbeschaffung wurde freundlicherweise vollständig von Z.J.-L., F.Z. und A.M. übernommen.

## Literaturverzeichnis

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
2. Dudics V, Kunstár A, Kovács J, et al. Chondrogenic potential of mesenchymal stem cells from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: measurements in a microculture system. *Cells Tissues Organs (Print)*. 2009;189(5):307-316. doi:10.1159/000140679.
3. Koelling S, Kruegel J, Irmer M, et al. Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis. *Cell Stem Cell*. 2009;4(4):324-335. doi:10.1016/j.stem.2009.01.015.
4. Richardson SM, Kalamegam G, Pushparaj PN, et al. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. *Methods*. 2016;99:69-80. doi:10.1016/j.ymeth.2015.09.015.
5. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-650. doi:10.1002/jor.1100090504.
6. Granero-Molto F, Weis JA, Longobardi L, Spagnoli A. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. *Expert Opin Biol Ther*. 2008;8(3):255-268. doi:10.1517/14712598.8.3.255.
7. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98(5):1076-1084. doi:10.1002/jcb.20886.
8. Hardingham TE. Fell-Muir lecture: cartilage 2010 - the known unknowns. *Int J Exp Pathol*. 2010;91(3):203-209. doi:10.1111/j.1365-2613.2010.00719.x.
9. Ha C-W, Park Y-B, Kim SH, Lee H-J. Intra-articular Mesenchymal Stem Cells in Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review of Clinical Outcomes and Evidence of Cartilage Repair. *Arthroscopy*. 2019;35(1):277-288.e2. doi:10.1016/j.arthro.2018.07.028.
10. Liu S, Zhou J, Zhang X, et al. Strategies to Optimize Adult Stem Cell Therapy for Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6). doi:10.3390/ijms17060982.
11. Kim JM, Cho HH, Lee SY, et al. Role of IRAK1 on TNF-induced proliferation and NF- $\kappa$ B activation in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem*. 2012;30(1):49-60. doi:10.1159/000339045.

12. Gopi IK, Rattan SIS. Biphasic Dose-Response and Hormetic Effects of Stress Hormone Hydrocortisone on Telomerase-Immortalized Human Bone Marrow Stem Cells In Vitro. *Dose Response*. 2019;17(4):1559325819889819. doi:10.1177/1559325819889819.
13. Han J, Zou Z, Zhu C, et al. DNA synthesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells through alpha1-adrenergic receptors. *Arch Biochem Biophys*. 2009;490(2):96-102. doi:10.1016/j.abb.2009.08.009.
14. Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, et al. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature*. 2014;508(7495):269-273. doi:10.1038/nature13034.
15. Wang DW, Fermor B, Gimble JM, Awad HA, Guilak F. Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells. *J Cell Physiol*. 2005;204(1):184-191. doi:10.1002/jcp.20324.
16. Anderson DE, Markway BD, Weekes KJ, McCarthy HE, Johnstone B. Physioxia Promotes the Articular Chondrocyte-Like Phenotype in Human Chondroprogenitor-Derived Self-Organized Tissue. *Tissue Eng Part A*. 2018;24(3-4):264-274. doi:10.1089/ten.TEA.2016.0510.
17. Suri S, Gill SE, Massena de Camin S, Wilson D, McWilliams DF, Walsh DA. Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(11):1423-1428. doi:10.1136/ard.2006.063354.
18. Bronnikov G, Houstěk J, Nedergaard J. Beta-adrenergic, cAMP-mediated stimulation of proliferation of brown fat cells in primary culture. Mediation via beta 1 but not via beta 3 adrenoceptors. *J Biol Chem*. 1992;267(3):2006-2013.
19. Karemaker JM. An introduction into autonomic nervous function. *Physiol Meas*. 2017;38(5):R89-R118. doi:10.1088/1361-6579/aa6782.
20. Maestroni GJ. Neurohormones and catecholamines as functional components of the bone marrow microenvironment. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;917:29-37. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb05370.x.
21. Golan K, Kollet O, Markus RP, Lapidot T. Daily light and darkness onset and circadian rhythms metabolically synchronize hematopoietic stem cell differentiation and maintenance: The role of bone marrow norepinephrine, tumor necrosis factor, and melatonin cycles. *Exp Hematol*. 2019;78:1-10. doi:10.1016/j.exphem.2019.08.008.

- 22.Grassel SG. The role of peripheral nerve fibers and their neurotransmitters in cartilage and bone physiology and pathophysiology. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(6):485.
- 23.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 & rheumatology (Hoboken, N.J.).* 2014;66(9):2472-2481. doi:10.1002/art.38695.
- 24.Kotova PD, Sysoeva VY, Rogachevskaja OA, et al. Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843(9):1899-1908. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.05.002.
- 25.Hein L. Adrenoceptors and signal transduction in neurons. *Cell Tissue Res.* 2006;326(2):541-551. doi:10.1007/s00441-006-0285-2.
- 26.Cotecchia S, Kobilka BK, Daniel KW, et al. Multiple second messenger pathways of alpha-adrenergic receptor subtypes expressed in eukaryotic cells. *J Biol Chem.* 1990;265(1):63-69.
- 27.Lai LP, Mitchell J. Beta2-adrenergic receptors expressed on murine chondrocytes stimulate cellular growth and inhibit the expression of Indian hedgehog and collagen type X. *J Cell Biochem.* 2008;104(2):545-553. doi:10.1002/jcb.21646.
- 28.Alblas J, van Corven EJ, Hordijk PL, Milligan G, Moolenaar WH. Gi-mediated activation of the p21ras-mitogen-activated protein kinase pathway by alpha 2-adrenergic receptors expressed in fibroblasts. *J Biol Chem.* 1993;268(30):22235-22238.
- 29.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.
- 30.Lorenz J, Schäfer N, Bauer R, Jenei-Lanzl Z, Springorum RH, Grassel S. Norepinephrine modulates osteoarthritic chondrocyte metabolism and inflammatory responses. *Osteoarthr Cartil.* 2016;24(2):325-334. doi:10.1016/j.joca.2015.08.007.
- 31.Kodama D, Togari A. Noradrenaline stimulates cell proliferation by suppressing potassium channels via G(i/o) -protein-coupled  $\alpha(1B)$  -

- adrenoceptors in human osteoblasts. *Br J Pharmacol.* 2013;168(5):1230-1239. doi:10.1111/bph.12000.
- 32.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.
- 33.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.
- 34.Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46(3):704-713. doi:10.1002/art.10118.
- 35.Spector S, Gordon R, Sjoerdsma A, Udenfriend S. End-product inhibition of tyrosine hydroxylase as a possible mechanism for regulation of norepinephrine synthesis. *Mol Pharmacol.* 1967;3(6):549-555.
- 36.Kido A, Yoshitani K, Shimizu T, et al. Effect of mesenchymal stem cells on hypoxia-induced desensitization of  $\beta$ 2-adrenergic receptors in rat osteosarcoma cells. *Oncol Lett.* 2012;4(4):745-750. doi:10.3892/ol.2012.813.
- 37.Blake LE, Roux J, Hernando-Herraez I, et al. A comparison of gene expression and DNA methylation patterns across tissues and species. *Genome Res.* 2020;30(2):250-262. doi:10.1101/gr.254904.119.
- 38.Refsnes M, Thoresen GH, Sandnes D, Dajani OF, Dajani L, Christoffersen T. Stimulatory and inhibitory effects of catecholamines on DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures: role of alpha 1- and beta-adrenergic mechanisms. *J Cell Physiol.* 1992;151(1):164-171. doi:10.1002/jcp.1041510121.
- 39.Dai Z, Li Y, Quarles LD, et al. Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. *Phytomedicine.* 2007;14(12):806-814. doi:10.1016/j.phymed.2007.04.003.

40. Pullar CE, Isseroff RR. The beta 2-adrenergic receptor activates pro-migratory and pro-proliferative pathways in dermal fibroblasts via divergent mechanisms. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 3):592-602. doi:10.1242/jcs.02772.
41. Tombes RM, Auer KL, Mikkelsen R, et al. The mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade can either stimulate or inhibit DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes depending upon whether its activation is acute/phasic or chronic. *Biochem J.* 1998;330 (Pt 3):1451-1460. doi:10.1042/bj3301451.
42. Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene.* 2007;26(22):3227-3239. doi:10.1038/sj.onc.1210414.



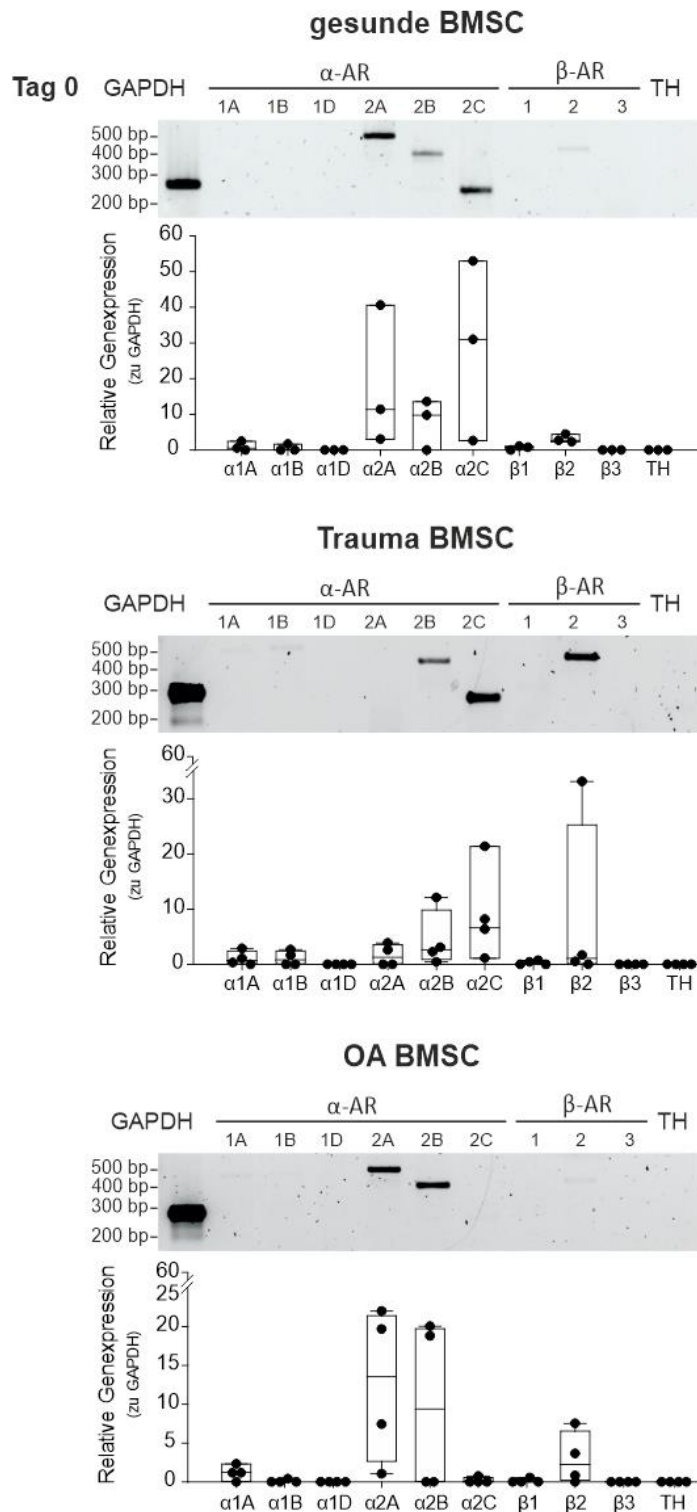
## Anhang

### 4 Unveröffentlichte Ergebnisse

#### 4.1 Adrenorezeptor-Genexpressionsprofil gesunder humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen

Die Voraussetzung für einen potenziellen Einfluss von NE auf die Pathogenese der OA, ist die Expression von AR durch gesunde BMSCs. Dementsprechend wurde das AR-Genexpressionsprofil gesunder BMSCs an Tag 0 bestimmt. Zum Ausschluss autokriner Effekte wurde zudem die TH-Expression untersucht.

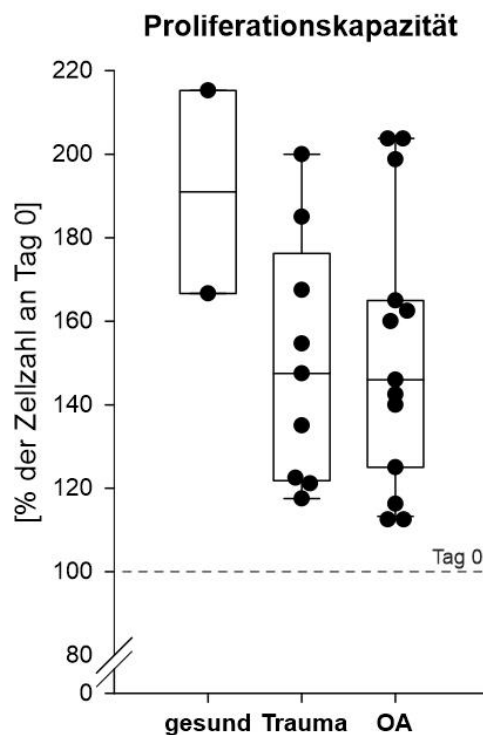
Gesunde BMSCs exprimieren die AR  $\alpha$ 2A,  $\alpha$ 2B,  $\alpha$ 2C und  $\beta$ 2. Die Rezeptoren  $\alpha$ 1A,  $\alpha$ 1B,  $\alpha$ 1D,  $\beta$ 1 und  $\beta$ 3 sowie das Enzym TH konnten an Tag 0 nicht detektiert werden. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zu dem AR-Genexpressionsmuster der Trauma und OA BMSCs (verglichen mit den publizierten Daten von Hedderich et al.,<sup>33</sup> Chapter 2.1) festgestellt werden ( $p \geq 0,05$ , Abbildung 2).



**Abbildung 2** Adrenorezeptor- (AR) und Tyrosinhydroxylase (TH)-Genexpressionsprofil humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen (BMSCs). Genexpression verschiedener AR-Subtypen und der TH in unbehandelten BMSCs gesunder Spender sowie von Trauma- und Osteoarthrose (OA)-Patienten (jeweils repräsentatives PCR-Gel eines Spenders) an Tag 0 der Monolayerkultur und Darstellung der relativen mittleren Genexpression zu der Expression von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, n=3 für gesunde BMSCs, n=4 für Trauma und OA BMSCs) in Form von Boxplots (siehe 5.8). Teile der Daten und Darstellungen übernommen von Hedderich et al.<sup>33</sup>, Figure 1.

## 4.2 Proliferationskapazität gesunder humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen

Zur weiteren Beurteilung der Proliferationskapazität von Trauma und OA BMSCs, wurden die Proliferationsraten unbehandelter, gesunder BMSCs nach sieben Tagen in Monolayerkultur unter physioxischen Bedingungen bestimmt und mit den Proliferationsraten von unbehandelten Trauma und OA BMSCs verglichen. Es zeigte sich eine messbare Zunahme der Zellzahl der gesunden BMSCs zwischen Tag 0 und Tag 7 (Zellzahl an Tag 7:  $381\,946 \pm 68\,747$  Zellen, mittlere Proliferationsrate: 191,0%). Im Vergleich zu den Proliferationsraten unbehandelter Trauma und OA BMSCs (verglichen mit den publizierten Daten von Hedderich et al.,<sup>33</sup> Chapter 2.2) konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden ( $p \geq 0,05$ , Abbildung 3).



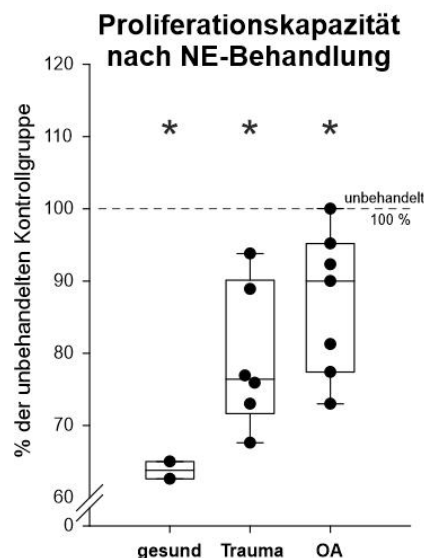
**Abbildung 3** Proliferationskapazität humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen (BMSCs). Proliferationsraten der BMSCs gesunder Spender sowie von Trauma- und Osteoarthritis (OA)-Patienten nach sieben Tagen in Monolayerkultur (verglichen zur Zellzahl an Tag 0, n=2 für gesunde BMSCs, n=9 für Trauma BMSCs, n=13 für OA BMSCs). Darstellung der Daten als Prozentsatz der initialen Zellzahl an Tag 0 (gestrichelte Linie = 100 %) in Form von Boxplots (siehe 5.8). Teile der Daten und Darstellungen übernommen von Hedderich et al.<sup>33</sup>, Figure 2.

### 4.3 Effekt von Noradrenalin auf die Proliferation gesunder humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen

Zur abschließenden Beurteilung der beobachteten inhibitorischen Effekte von NE auf die Proliferationskapazität von Trauma und OA BMSCs, wurden BMSCs gesunder Spender mit NE ( $10^{-6}$  M) für sieben Tage in Monolayerkultur unter physioxischen Bedingungen behandelt.

Die siebentägige Behandlung mit NE führte zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $p=0,021$ ). Im Vergleich zu den Proliferationsraten mit NE behandelte Trauma und OA BMSCs (verglichen mit den publizierten Daten von Hedderich et al.,<sup>33</sup> Chapter 2.3) konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden ( $p \geq 0,05$ , Abbildung 4).

Zytotoxizitätsuntersuchungen, welche anhand der LDH-Aktivität gemessen wurden, zeigten keine Unterschiede zwischen der unbehandelten und der mit NE behandelten Gruppe ( $p \geq 0,05$ ).

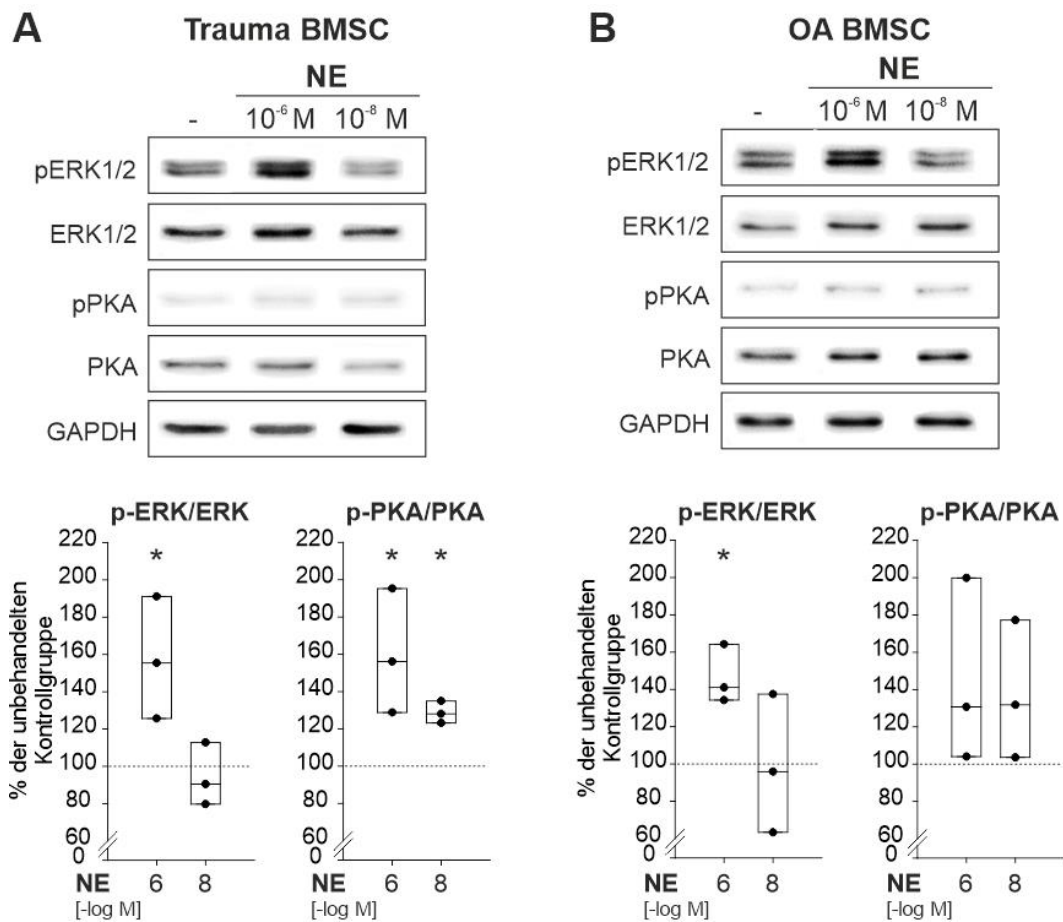


**Abbildung 4** Effekt von Noradrenalin (NE) auf die Proliferationskapazität humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen (BMSCs). Proliferationsraten der BMSCs gesunder Spender sowie von Trauma- und Osteoarthritis (OA)-Patienten nach siebentägiger Behandlung mit NE ( $10^{-6}$  M) in Monolayerkultur (verglichen zur Zellzahl an Tag 0,  $n=2$  für gesunde BMSCs,  $n=6$  für Trauma BMSCs,  $n=7$  für OA BMSCs). Darstellung der Daten als Prozentsatz der unbehandelten Kontrollgruppe an Tag 7 (gestrichelte Linie = 100 %) in Form von Boxplots (siehe 5.8). Teile der Daten und Darstellungen übernommen von Hedderich et al.<sup>33</sup>, Figure 3. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

#### **4.4 Aktivierung Adrenorezeptor-gekoppelter intrazellulärer Signalwege durch Dauerbehandlung humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen mit Noradrenalin**

Zur Beurteilung der beobachteten Aktivierung der AR-gekoppelten intrazellulären Signalwege ERK1/2 und PKA, wurde die Phosphorylierung der beiden Signalwege nach siebentägiger Behandlung von Trauma und OA BMSCs mit NE in hoher ( $10^{-6}$  M) und niedriger Konzentration ( $10^{-8}$  M) bestimmt.

Sowohl bei Trauma als auch bei OA BMSCs kam es durch NE in hoher Konzentration ( $10^{-6}$  M) zu einer statistisch signifikanten Aktivierung von ERK1/2 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Trauma BMSCs:  $p=0,039$ ; OA BMSCs:  $p=0,007$ ). Niedrige NE-Konzentrationen ( $10^{-8}$  M) hatten hingegen keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK1/2 ( $p \geq 0,05$ ). Die PKA wurde bei Trauma und bei OA BMSCs sowohl durch NE in hoher ( $10^{-6}$  M) als auch in niedriger ( $10^{-8}$  M) Konzentration aktiviert (Trauma BMSCs:  $p=0,036$  für NE  $10^{-6}$  M,  $p=0,001$  für NE  $10^{-8}$  M; OA BMSCs:  $p \geq 0,05$  für NE  $10^{-6}$  M und NE  $10^{-8}$  M, Abbildung 5).

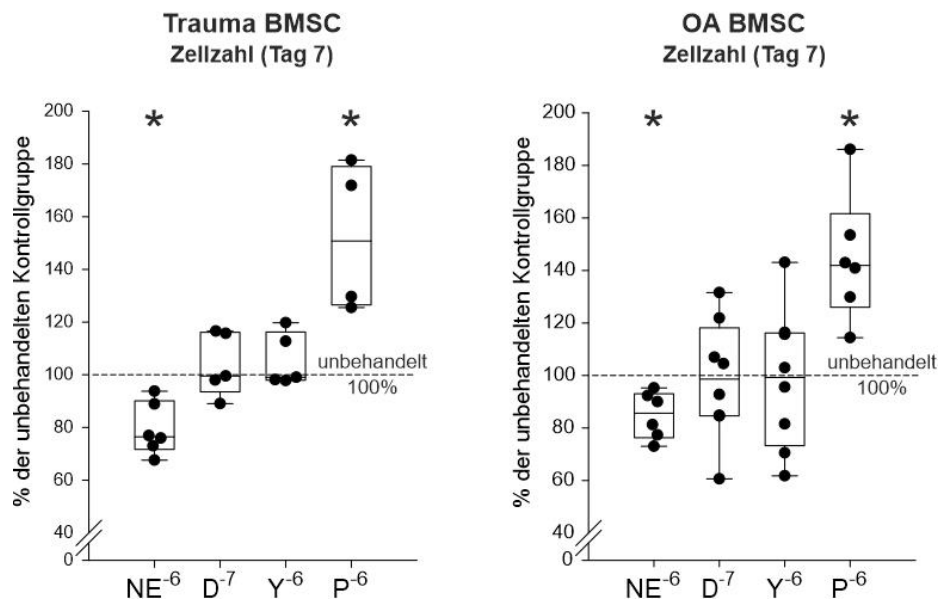


**Abbildung 5** Aktivierung Adrenorezeptor (AR)-gekoppelter intrazellulärer Signalwege in humanen mesenchymalen Knochenmarksstammzellen (BMSCs) nach Dauerbehandlung mit Noradrenalin (NE). (A) Western Blot Analyse des Phosphorylierungsgrades der beiden AR-gekoppelten Hauptsignalwege ERK1/2 und PKA in Trauma BMSCs nach sieben-tägiger Behandlung mit NE in hoher (10<sup>-6</sup> M) und niedriger (10<sup>-8</sup> M) Konzentration in Monolayerkultur (n=3, repräsentativer Blot eines Traumapatienten). Darstellung der Daten als Quotient der phosphorylierten Form zum Gesamtprotein sowie als Prozentsatz der unbehandelten Kontrollgruppe (gestrichelte Linie = 100%) in Form von Boxplots (siehe 5.8). (B) Western Blot Analyse des Phosphorylierungsgrades von ERK1/2 und PKA in Osteoarthrose (OA) BMSCs nach sieben-tägiger Behandlung mit NE (10<sup>-6</sup> und 10<sup>-8</sup> M) in Monolayerkultur (n=2, repräsentativer Blot eines OA-Patienten). \* p<0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

#### 4.5 Einfluss von Adrenorezeptorantagonisten auf die Proliferationskapazität humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen

Zur Identifikation des für die inhibitorischen Effekte von NE verantwortlichen AR, wurden Trauma und OA BMSCs mit spezifischen AR-Antagonisten für sieben Tage in Monolayerkultur unter physiologischen Bedingungen behandelt. Dabei

fanden der  $\alpha$ 1-AR-Antagonist Doxazosin ( $10^{-7}$  M), der  $\alpha$ 2-AR-Antagonist Yohimbin ( $10^{-7}$  M) sowie der  $\beta$ 2-AR-Antagonist Propranolol ( $10^{-6}$  M) Anwendung. Die Behandlung mit Propranolol führte sowohl bei Trauma als auch bei OA BMSCs zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Zellzahl an Tag 7 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Trauma BMSCs:  $p=0,036$ ; OA BMSCs:  $p<0,001$ ). Doxazosin und Yohimbin hatten keinen Einfluss auf die Proliferationsraten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $p\geq 0,05$ , Abbildung 6).



**Abbildung 6** Einfluss von Adrenorezeptor (AR)-Antagonisten auf die Proliferationskapazität humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen (BMSCs). Proliferationsraten von BMSCs von Trauma- und Osteoarthrose (OA)-Patienten nach Behandlung mit Noradrenalin ( $10^{-6}$  M, NE), dem  $\alpha$ 1-AR-Antagonisten Doxazosin ( $10^{-7}$  M, D<sup>7</sup>), dem  $\alpha$ 2-AR-Antagonisten ( $10^{-7}$  M, Y<sup>7</sup>) und dem  $\beta$ 2-AR-Antagonisten Propranolol ( $10^{-6}$  M, P<sup>6</sup>) für sieben Tage in Monolayerkultur ( $n=4-6$  für Trauma BMSCs,  $n=6-7$  für OA BMSCs). Darstellung als Prozentsatz der unbehandelten Kontrollgruppe (gestrichelte Linie = 100 %) in Form von Boxplots (siehe 5.8). Teile der Daten und Darstellungen übernommen von Hedderich et al.<sup>33</sup>, Figure 3.

\*  $p<0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

## 5 Material und Methodik

### 5.1 Patientenkollektiv

Humanes Knochenmark wurde aus dem Beckenkamm von Patienten, welche sich als Spender für eine allogene Stammzelltransplantation zur Verfügung stellten (gesunde BMSCs), oder von Patienten mit einem stattgehabten Knie trauma (Trauma BMSCs) gewonnen. Als Knie trauma wurden die Ruptur der

Kreuzbänder oder der Menisken gewertet. Nach Abklingen der initialen Schwellung unterzogen sich diese Patienten zwei bis drei Wochen nach dem Unfall einem operativen Eingriff, in dem u.a. Beckenkammpongiosa entnommen wurde. Zudem wurde humanes Knochenmark von Patienten mit diagnostizierter Knie-OA, welche sich der Implantation einer Knie-Total-Endoprothese unterzogen, verwendet (OA BMSCs). Die Ethikkommissionen der Universität Regensburg (Kennziffer 13-101-0135) sowie der Universität Frankfurt am Main (Kennziffer 148-17B) haben das Projekt geprüft und genehmigt. Nach ausführlicher Aufklärung und Information über das Projekt haben alle Patienten der Verwendung ihres Zellmaterials für Studienzwecke zugestimmt und ihr schriftliches Einverständnis erklärt. Eine Gesamtzahl von 33 Patienten konnte als BMSC-Spender in die Studie aufgenommen werden (für Patientendaten siehe Hedderich et al.,<sup>33</sup> Table 1). Einziges Ausschlusskriterium war die Einnahme von Medikamenten, die auf das adrenerge System wirken (z.B. von  $\beta$ -Rezeptorenblockern). Die Gruppe der Traumapatienten war signifikant jünger als die Gruppe der OA-Patienten ( $p < 0,001$ ).

## 5.2 Zellkulturen

Nach Isolation der BMSCs aus dem Knochenmark (für detaillierte Informationen siehe Hedderich et al.,<sup>33</sup> Chapter 4.2) wurden diese in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in Basismedium *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM/F12 (1:1), Gibco® life technologies™, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland), welchem 10% Kälberserum für MSCs (FBS MSC, PAN BIOTECH, Aldenbach, Deutschland) und 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco® life technologies™, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) zugesetzt wurde, überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C unter physioxischen Kulturbedingungen (2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Das Medium wurde zweimalig in der Woche erneuert. Nachdem eine Konfluenz von 90-95% erreicht wurde, wurden die Zellen mithilfe von Accutase® solution (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) abgelöst, manuell gezählt und wie unten beschrieben für die Proliferationsexperimente ausgesät (siehe 5.3).



### 5.3 Proliferationsexperimente

BMSCs in Passage 2-4 wurden mit einer Dichte von 2 667 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Nach Adhäsion der Zellen über Nacht bei 37°C unter physioxischen Kulturbedingungen (2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) wurde das Medium gewechselt und mit NE ((±)-Norepinephrine (+)-bitartrate salt, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in unterschiedlichen Konzentrationen (10<sup>-9</sup> bis 10<sup>-5</sup> M), dem spezifischen β<sub>2</sub>-AR-Agonisten Formoterol (10<sup>-7</sup> M, formoterol hemifumerate, Tocris Bioscience, Bristol, UK) oder dem spezifischen α<sub>2</sub>-AR-Agonisten UK14,304 (10<sup>-8</sup> M, UK14,304 tartrate, Tocris Bioscience, Bristol, UK) versetzt. In weiteren Versuchen wurde die Reversibilität der Behandlung überprüft, indem Zellen mit NE (10<sup>-6</sup> M) in Kombination mit dem α<sub>1</sub>-AR-Antagonisten Doxazosin (10<sup>-7</sup> M, doxazosin mesylate, Tocris Bioscience, Bristol, UK), dem α<sub>2</sub>-AR-Antagonisten Yohimbin (10<sup>-7</sup> M, yohimbine hydrochloride, Tocris Bioscience, Bristol, UK) oder dem β<sub>2</sub>-AR-Antagonisten Propranolol (10<sup>-6</sup> M, (S)-(-)-propranolol hydrochloride, Tocris Bioscience, Bristol, UK) oder mit den jeweiligen Antagonisten alleine für sieben Tage in Monolayerkultur behandelt wurden. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Unbehandelte BMSCs dienten als Kontrollgruppe.

Das Wachstum der BMSCs wurde mikroskopisch bei 10-facher Vergrößerung (OLYMPUS CKX41) kontrolliert. Nach siebentägiger Behandlung wurden die Zellen mithilfe von Accutase® solution (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) abgelöst und manuell gezählt. Somit konnten die Gesamtzellzahl sowie die Zahl der lebenden Zellen bestimmt und mit der unbehandelten Kontrollgruppe verglichen werden. Zur Untersuchung der Zellviabilität wurden die Mediumüberstände an Tag 7 aufbewahrt und umgehend für Zytotoxizitätsuntersuchungen, wie im nachfolgenden Kapitel beschrieben, verwendet (siehe 5.4).

### 5.4 Lactatdehydrogenase-Assay

Um potenziell zytotoxische Effekte der Behandlung auszuschließen, wurde die LDH-Aktivität in den Zellüberständen mithilfe des TaKaRa LDH Cytotoxicity Detection Kits MK401 (Takara, Kusatsu, Japan) den Herstellerangaben entsprechend bestimmt. Die Zellüberstände wurden an Tag 7 gewonnen und umgehend für die LDH-Aktivitätsmessungen verwendet. Die LDH-Aktivität von

Zellkulturmedium ohne Zellen sowie einer Totkontrolle, welche für 10 min mit 1 % Triton-X-100 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) behandelt wurde, dienten als Vergleichswerte. Alle Proben wurden in zweifacher Ausfertigung bei einer Wellenlänge von 490 nm (TECAN infinite M200PRO, TECAN Magellan V 7.2 © 2016) analysiert.

## 5.5 Western Blot

Zur Identifizierung der intrazellulären Signalwege wurden Trauma und OA BMSCs mit NE ( $10^{-6}$  M) für 5 bis 60 min bzw. für sieben Tage mit NE in hoher ( $10^{-6}$  M) und niedriger Konzentration ( $10^{-8}$  M) bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter physioxischen Kulturbedingungen (2%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) behandelt und anschließend die Phosphorylierung der beiden AR-gekoppelten Hauptsignalwege PKA und ERK1/2 untersucht. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 2 667 Zellen/ $\text{cm}^2$  ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach Adhäsion der Zellen über Nacht wurde das Medium gewechselt und mit NE ( $10^{-6}$  M bzw.  $10^{-6}$  M und  $10^{-8}$  M) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5, 10, 30 oder 60 min bzw. sieben Tagen wurden die Proteine, wie nachfolgend beschrieben, extrahiert. In weiteren Versuchen wurde das Medium mit NE ( $10^{-6}$  M) in Kombination mit Doxazosin ( $10^{-7}$  M), Yohimbin ( $10^{-7}$  M) oder Propranolol ( $10^{-6}$  M) versetzt. Nach Inkubation der Zellen für 10 min wurden diese dreimalig mit Dulbecco's Phosphat-gepufferter Saline (DPBS 1X, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, - $\text{CaCl}_2$ , - $\text{MgCl}_2$ , Gibco® life technologies™, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) gewaschen. Die Proteine wurden mithilfe des PhosphoSafe™ Extraction Reagents (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) den Herstellerangaben entsprechend extrahiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 10%-iges Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE-Gel) geladen. Nach einer Gelelektrophorese bei 150 V für 75 min wurden die Proben auf eine Polyvinylidendifluorid Membran (Amersham™ Hybond™ P 0,45 PVDF Blotting Membrane, GE Healthcare Life Science, Solingen, Deutschland) elektrotransferiert (200 mA für 60 min). Anschließend wurden die Membranen für 1 h in 5%-igem bovinem Serumalbumin (BSA) bei Raumtemperatur geblockt und nachfolgend für mindestens 16 h bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit dem primären Antikörper, welcher in 5%igem BSA gelöst wurde, inkubiert (für detaillierte Informationen zu den verwendeten primären Antikörpern sowie

Verdünnungsfaktoren siehe Hedderich et al.,<sup>33</sup> Table 2). Die Inkubation wurde durch das fünfmalige Waschen der Membranen mit Tris(hydroxymethyl)aminomethan-gepufferter Saline mit Tween-20 (engl. Tris-Buffered Saline with Tween20, TBST) für jeweils 5 min gestoppt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem in 5%-igem BSA gelösten sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur (für detaillierte Informationen zu den verwendeten primären und sekundären Antikörpern sowie Verdünnungsfaktoren siehe Hedderich et al.,<sup>33</sup> Table 2). Diese wurde ebenfalls durch das fünfmalige Waschen der Membranen mit TBST für jeweils 5 min gestoppt. Anschließend wurde die Proteinexpression mithilfe der *Enhanced Chemiluminescence Detection Solution* (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA) und dem Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS mit Image Lab™ Software (Version 5.2.1, Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, Kalifornien, USA) visualisiert. Die Quantifizierung wurde mithilfe der Software ImageJ 1.52 (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Ladekontrolle durchgeführt.

## **5.6 RNA-Isolation und cDNA-Synthese**

Die RNA-Isolation erfolgte mithilfe des NucleoSpin® RNA/Protein Kits (MACHERY-NAGEL, Düren, Deutschland) den Herstellerangaben entsprechend. Die RNA-Konzentration wurde mithilfe des NanoDrop™ One Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) bestimmt. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese aus der isolierten RNA mithilfe des qScript™ cDNA Synthesis Kits (Quanta Biosciences, VWR, Darmstadt, Deutschland) den Herstellerangaben entsprechend in dem Thermozykler qTOWER<sup>3</sup> G (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) mithilfe der Software qPCRsoft 3.4 (© 2009-2016, © by Analytik Jena AG, Jena, Deutschland). Die Proben wurden für 5 min bei 22°C, für 30 min bei 42°C, für 5 min. bei 85°C, gefolgt von einer Kühlungsperiode von 60 min bei 4°C inkubiert.

## **5.7 Realtime PCR und Gelelektrophorese**

Zur Analyse der AR-Genexpression wurde eine Realtime Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) mithilfe des

TaqPCR Master Mix Kits (QUIAGEN, Hilden, Deutschland) an Tag 0 und 7 durchgeführt. 10 µl TaqPCR Master Mix (enthält u.a. eine Taq-DNA-Polymerase), 5 µl RNase-freies Wasser, je 2 µl des Vorwärts- und Rückwärtsprimers (2µM) sowie 1 µl cDNA mit einer Konzentration von 10 ng/µl wurden zusammengeführt (Endvolumen: 20 µl). Primer für humane Gensequenzen wurden bei Thermo Fisher Custom Primers (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) erworben (für Gensequenzen siehe Hedderich et al.,<sup>33</sup> Table 3). GAPDH diene als endogene Kontrolle. Zum Ausschluss autokriner Effekte erfolgte die Untersuchung der Genexpression des Enzyms TH. Im Thermozykler qTOWER<sup>3</sup> (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) wurden folgende Zyklen durchlaufen: ein Zyklus bei 94°C für 1 sec, gefolgt von 36 Zyklen mit der Denaturierung bei 94°C für 30 sec, der Primerhybridisierung bei 64°C für 30 sec und der Elongation bei 72°C für 59 sec.

Anschließend wurden die PCR-Produkte auf ein 1,8%-iges Agarosegel geladen, welches mit 10 µl GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, Kalifornien, USA) zum Färben von Nukleinsäuren versetzt wurde. Die Gelelektrophorese erfolgte in einem elektrischen Feld mit einer angelegten Spannung von 120 V für 90 min. Die Banden konnten anhand der Produktlänge identifiziert werden, welche im Vergleich mit den Referenzbanden des aufgetragenen DNA-Markers Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) bestimmt wurde. Die Detektion und Quantifizierung der Banden erfolgte mithilfe des Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS mit der Image Lab™ Software (Version 5.2.1, Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, Kalifornien, USA) mit anschließender Normierung auf das Haushaltsgen GAPDH.

## **5.8 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der zu vergleichenden Gruppen erfolgte mithilfe des Programms SigmaPlot (SigmaPlot V.13, Systat Software, Erkrath, Deutschland) via Kruskal-Wallis ANOVA-on-ranks mit nachfolgendem Bonferroni- oder Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test. p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Die graphische Darstellung der Daten in Form von Box Plots erfolgte ebenfalls mithilfe des Programms Sigma Plot (SigmaPlot V.13, Systat Software, Erkrath, Deutschland). Die Box entspricht dem Bereich der 25. bis 75. Perzentile

mit Kennzeichnung des Medians in Form der horizontalen Linie innerhalb der Box. Die vertikalen Linien außerhalb der Box decken den Bereich der 10. bis 90. Perzentile ab. Die Daten jedes einzelnen Spenders werden durch schwarze Datenpunkte dargestellt. Die Experimente wurden mit  $n=3-13$  Proben durchgeführt.

## Lebenslauf



## Danksagung



## 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

Noradrenalin inhibiert die Proliferation humaner mesenchymaler Knochenmarkstammzellen über die  $\beta$ 2-Adrenorezeptor-vermittelte ERK1/2- und PKA-Phosphorylierung

in der Orthopädischen Universitätsklinik Friedrichsheim, im Dr. Rolf M. Schwiete Forschungsbereich für Osteoarthritis, unter Betreuung und Anleitung von Univ.-Prof. Dr. med. Andrea Meurer mit Unterstützung durch Prof. Dr. rer. nat. Frank Zaucke und Dr. rer. nat. Zsuzsa Jenei-Lanzl 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 in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Publikation: Hedderich J, El Bagdadi K, Angele P, Grässel S, Meurer A, Straub R.H, Zaucke F and Jenei-Lanzl Z. 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).

Vortrag: Hedderich J, El Bagdadi K, Straub R, Meurer A., Zaucke F, Jenei-Lanzl Z. Der Einfluss von Noradrenalin auf die Proliferation von humanen mesenchymalen Knochenmarkstammzellen. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2019, Berlin

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)