Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Chirurgie
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik
Direktorin: Prof. Dr. Anita Ignatius

Wechselwirkung mechanischer und ernährungsphysiologischer Faktoren auf Anulus- und Nukleuszellen im Rahmen der Bandscheibendegeneration

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Julia Christina Rinkler
Geboren in Heilbronn

2009

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Anita Ignatius

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf Brenner

Tag der Promotion: 26. Juni 2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abkürzungsverzeichnis III
1 Einleitung 1
1.1 Einführung – klinischer Bezug 1
1.2 Struktur und Funktion der intakten Bandscheibe 3
1.2.1 Anatomie 3
1.2.2 Physiologie 5
1.3 Bandscheibendegeneration 7
1.4 Wirkung mechanischer Belastung auf den Metabolismus von Bandscheibenzellen 9
1.4.1 In vitro 9
1.4.2 In vivo 11
1.5 Ziel der Arbeit 14
2 Material und Methoden 16
2.1 Material 16
2.1.1 Zellen 16
2.1.2 Zellkulturmedien 18
2.1.3 Oligonukleotide (Primer) 21
2.1.4 Kits 23
2.1.5 Lösungen und Puffer 23
2.1.6 Chemikalien 24
2.1.7 Restriktionsenzyme 25
2.1.8 Geräte 26
2.2 Methoden 29
2.2.1 Zellkultur 29
2.2.2 Mechanische Stimulation 36
2.2.3 Auswertungen 42
3 Ergebnisse 52
3.1 Variation der Osmolarität 52
3.1.1 Druckversuche 52
3.1.2 Dehnungsversuche 60
3.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse bei Variation der Osmolarität 65
3.2 Variation der Glucose 66
3.2.1 Ergebnisse aus Druckversuchen 66
3.2.2 Ergebnisse aus Dehnungsversuchen 73
3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse bei Variation der Glucose 78
3.3 Variation des Sauerstoffs 79
3.3.1 Ergebnisse aus Dehnungsversuchen 79
3.3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse bei Variation des Sauerstoffs 83

3.4 Variation des pH 84
3.4.1 Ergebnisse aus Druckversuchen 84
3.4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse bei Variation des pH 87
3.5 Regulation angiogener Faktoren 88
3.5.1 Regulation angiogener Faktoren bei Variation der Osmolarität 88
3.5.2 Regulation angiogener Faktoren bei Variation der Glucose 90
3.5.3 Regulation angiogener Faktoren bei Variation des Sauerstoffs 93
3.5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse bezüglich der Regulation angiogener Faktoren 94
3.6 Spenderabhängige Einflüsse 95
3.6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse bezüglich spenderabhängiger Einflüsse 100
3.7 Variation des Kultursystems 101
3.7.2 Zusammenfassung der Ergebnisse bei Variation des Kultursystems 105
4 Diskussion 106
4.1 Variation der Osmolarität 106
4.1.1 Einfluss der veränderten Mikroumgebung 106
4.1.2 Einfluss mechanischer Belastung 109
4.2 Variation der Glucose 110
4.2.1 Einfluss der veränderten Mikroumgebung 110
4.2.2 Einfluss mechanischer Belastung 113
4.3 Variation des Sauerstoffs 114
4.3.1 Einfluss der veränderten Mikroumgebung 114
4.3.2 Einfluss mechanischer Belastung 117
4.4 Variation des pH 118
4.4.1 Einfluss der veränderten Mikroumgebung 118
4.4.2 Einfluss mechanischer Belastung 121
4.5 Regulation angiogener Faktoren 123
4.6 Spenderabhängige Einflüsse 126
4.7 Variation des Kultursystems 129
5 Zusammenfassung 132
6 Literaturverzeichnis 134

Abkürzungsverzeichnis

AF	Anulus fibrosus
ASIC	acid sensing ion channel
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
BS	Bandscheibe
BSV	Bandscheibenvorfall
ca.	circa
$CaCl_2$	Calciumchlorid
cDNA	copy DNA
d.h.	das heißt
DDD	degenerative disc disease
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fötales Kälberserum
FEM	Finite-Elemente-Modell
g	Gramm
G	Gauge
GAG	Glycosaminoglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glucosetransporter
h	hour
HD	hydrostatischer Druck
Hz	Hertz
H_2O	Wasser
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid

L	Liter
M	Mol
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
ML	Monolayer
mm	Millimeter
mM	Millimol
mOsm	Milliosmol
MMP	Matrixmetalloproteinase
MPa	Megapascal
mRNA	messenger RNA
MSCs	mesenchymale Stammzellen
NaCl	Natriumchlorid
NEA	nicht-essentielle Aminosäuren
nm	Nanometer
NP	Nukleus pulposus
O_2	Sauerstoff
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Picogramm
PG	Proteoglykan
PTN	Pleiotrophin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
Sox-9	Sry (sex determining region Y)-related high mobility group box
TIMP	tissue inhibitor of matrixmetalloproteinase
U	unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
VEGF	vascular endothelial growth factor
vs.	versus
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

z.B.	zum Beispiel
ZD	zyklische Dehnung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
%	Prozent
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional

1 Einleitung

1.1 Einführung – klinischer Bezug

Rückenschmerzen stellen ein weit verbreitetes Symptom dar, das zudem enorme wirtschaftliche Konsequenzen hat [45, 116, 144, 169, 170, 200].

Parsons et al. gaben die Prävalenz von Patienten mit chronischen Schmerzen mit 41% an, davon entfielen 25% auf Rückenschmerzen im Bereich der Lendenwirbelsäule und 18% im Nackenbereich, wobei die Mehrheit der betroffenen Patienten der Altersgruppe von 45 bis 64 Jahren angehörten [144]. Schmidt et al. fanden in ihrer Studie heraus, dass ungefähr 10% der befragten Studienteilnehmer unter Rückenschmerzen litten, die zu starken Beeinträchtigungen führten [169]. Darüber hinaus ermittelten die Autoren, dass der Anteil der Rückenschmerzpatienten unter den Studienteilnehmern während des vergangenen Jahres bei 75% lag bzw. bis auf etwa 85% anstieg, wenn der Untersuchungszeitraum auf die gesamte Lebensspanne ausgedehnt wurde. Diese Zahlen veranschaulichen, dass Rückenschmerzen ein großes gesundheitliches Problem darstellen.

Obwohl einige Studien zeigten, dass eine Bandscheibendegeneration asymptomatisch verlaufen kann [12, 23, 24, 32, 151, 199], gibt es andere Studien, die darauf hindeuten, dass degenerative Veränderungen der Bandscheibe (BS) die Entstehung von Rückenschmerzen (mit-)verursachen [27, 51, 153]. Wenngleich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Bandscheibendegeneration und dem Auftreten von Rückenschmerzen bisher nicht belegt werden konnte, trägt eine degenerativ veränderte Gewebestruktur der Bandscheibe jedoch erheblich zu Erkrankungen wie z.B. dem Bandscheibenvorfall (BSV) bei, die häufig eine klinische Behandlung erfordern.

Die Ursachen der Bandscheibendegeneration sind vielfältig. Dazu gehören biologische, genetische und mechanische Faktoren. In einer Studie, die von Saftic et al. in der kroatischen Bevölkerung durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass eine familiäre Prädisposition, schwere körperliche Arbeit und ein erhöhter *Body Mass Index* die Hauptkriterien für einen lumbalen BSV mit anschließender operativer Behandlung darstellten [164]. In einer retrospektiven Studie von Kumar et al. wurde die Häufigkeit lumbaler BS-Vorfälle in der Altersgruppe bis zu 20 Jahren mit 3,5% angegeben, wobei alle betroffenen Patienten über Rückenschmerzen klagten und 16% bereits starke degenerative Veränderungen des Bandscheibengewebes und der Endplatten aufwiesen [106]. In einer

anderen Studie von Furnes et al. betrug die Inzidenz in der Altersgruppe der 15-19-Jährigen 3,4% aller lumbalen BSV-Patienten [53]. Die überwiegende Mehrheit (85%) hatte Rückenschmerzen, 35% hatten als Vorerkrankung eine Skoliose (Verkrümmung der Wirbelsäule). Außerdem konnte in einer Studie von Ong et al. gezeigt werden, dass eine übermäßige mechanische Beanspruchung des BS-Gewebes bei Spitzenathleten zu einer deutlich stärkeren BS-Degeneration im Vergleich zur Normalbevölkerung führte [141]. In einer Zusammenfassung von Buckwalter wurde bereits dargestellt, dass biologische Veränderungen wie z.B. eine reduzierte Nährstoffversorgung und Zellviabilität degenerative Veränderungen der BS-Matrix begünstigen [30]. Auch Urban et al. wiesen auf einen Zusammenhang von Nährstoffmangel und der BS-Degeneration hin [190]. Paesold et al. erwähnten hinsichtlich der Ätiologie der BS-Degeneration den Einfluss mechanischer Faktoren, einer genetischen Prädisposition und biologischer Komponenten wie z.B. die Nährstoffversorgung, die Aktivität matrixdegradierender Enzyme und ihrer Regulatoren sowie Entzündungsfaktoren [143]. Darüber hinaus untersuchten Neidlinger-Wilke et al. die Auswirkungen mechanischer Belastung auf den Metabolismus von NP-Zellen und stellten fest, dass hoher hydrostatischer Druck die Genexpression anaboler Matrixmoleküle erniedrigte und die Genexpression kataboler Matrixfaktoren erhöhte [133]. Diese mechanisch induzierten Veränderungen im Matrixumsatz könnten ebenfalls degenerative Prozesse initiieren oder fördern. Setton und Chen unterstützten die These, dass hohe mechanische Belastung den zellvermittelten Matrixumbau des BS-Gewebes (Remodeling) negativ beeinflussen und somit zur BS-Degeneration beitragen könnte [174]. Die Autoren wiesen auch darauf hin, dass die Biomechanik der BS-Zellen in einer degenerativen Umgebung bislang kaum untersucht wurde.

Da mechanische und biologische Faktoren mit der BS-Degeneration assoziiert sind, soll in der vorliegenden Arbeit die Interaktion einer degenerativ veränderten Mikroumgebung und mechanischer Belastung auf molekularer Ebene untersucht werden. Die Erkenntnisse sollen zu einem besseren Verständnis der zellulären Prozesse im Rahmen der BS-Degeneration beitragen, um langfristig die BS-Degeneration positiv beeinflussen zu können.

1.2 Struktur und Funktion der intakten Bandscheibe

1.2.1 Anatomie

Die intakte Bandscheibe, die auch als gesunde oder nicht-degenerierte Bandscheibe bezeichnet wird, ist durch verschiedene Geweberegionen charakterisiert [35, 175]. Im Zentrum der Bandscheibe ist der Nukleus pulposus (NP) lokalisiert; die aus diesem Bereich isolierten Zellen werden als Nukleuszellen oder NP-Zellen bezeichnet und weisen einen knorpeligen Phänotyp auf [139, 175]. Die Bandscheibe wird nach außen durch den Anulus fibrosus (AF) begrenzt, dessen Zellen als Anuluszellen oder AF-Zellen bezeichnet werden und einen fibrochondrozytenähnlichen Phänotyp besitzen, der jedoch auch zwischen innerem und äußerem Anulus variiert [29, 30, 59, 150]. Zwischen Nukleus pulposus und Anulus fibrosus befindet sich eine Übergangszone, die jedoch beim Menschen im Gegensatz zum bovinen Organismus schwer zu erkennen ist. Daher wird die humane Bandscheibe im allgemeinen nur in Nukleus pulposus und Anulus fibrosus unterteilt (Abbildung 1).

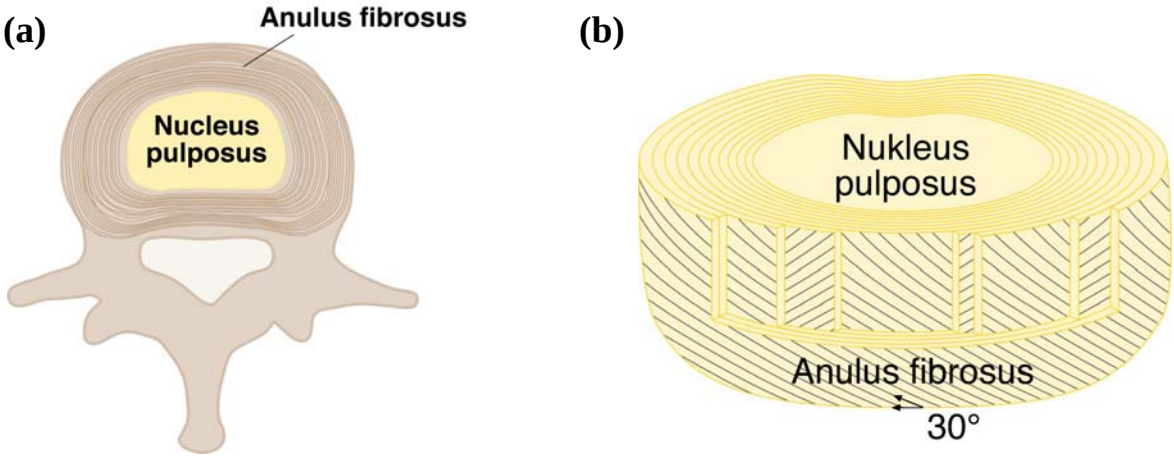


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Bandscheibe. (a) Aufsicht auf die zwei Hauptgeweberegionen in der Bandscheibe. (b) Schnitt durch die Lamellen des Anulus fibrosus, deren Kollagenfasern in der äußersten Schicht im Winkel von etwa 30° zur horizontalen Achse angeordnet sind. (Zeichnungen von Patrizia Horny übernommen, Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm)

Der Nukleus pulposus weist eine gallertartige Konsistenz auf und ähnelt Hyalinknorpel [72, 204]. Der Anulus fibrosus besteht aus bis zu 25 Lamellen, deren Durchmesser vom äußeren Anulusrand nach innen zunimmt [34, 117]. Die Kollagenfasern einer Lamelle sind parallel zueinander angeordnet, wobei die Fasern zweier benachbarter Lamellen in unterschiedlicher Richtung verlaufen [34]. In der äußersten Lamelle bilden die Kollagenfasern einen Winkel von 25°-30° zur horizontalen Achse, der nach innen ebenfalls zunimmt [58, 209]. Die Bandscheibe besitzt mit durchschnittlich 5800 Zellen/mm^3 eine sehr niedrige Zelldichte; lediglich ein kleiner Anteil (< 5%) des Bandscheibenvolumens sind Zellen, welche die umgebende extrazelluläre Matrix synthetisieren [120, 140, 185]. Die wesentlichen Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) in der Bandscheibe sind neben Wasser verschiedene Proteoglykane und Kollagene (Tabelle 1). Die biochemischen und biomechanischen Eigenschaften dieser Matrixmoleküle bestimmen die Funktion der jeweiligen Geweberegion sowie die Art der vorherrschenden mechanischen Belastung [109, 157]. Nukleuszellen sind überwiegend hydrostatischem Druck ausgesetzt, während auf Anuluszellen vor allem Dehnungsreize einwirken [9, 41, 59, 173]. Die Bandscheibe, die jeweils zwischen zwei Wirbelkörpern eingebettet ist, dient als „Stoßdämpfer“, d.h. dass ihre Hauptfunktion in einer Lastenverteilung besteht [7, 109, 154]. Zudem wird durch die Bandscheiben eine hohe Beweglichkeit der Wirbelsäule (Flexion, Extension, Rotation) gewährleistet [7, 50, 109, 154, 159].

Tabelle 1: Biochemische Zusammensetzung in der adulten humanen Bandscheibe. Mit Ausnahme von Wasser bezieht sich der Anteil der Matrixkomponenten auf das Trockengewicht. Der Kollagenanteil bleibt verhältnismäßig stabil, wohingegen der Proteoglykananteil mit zunehmendem Alter sinkt und der Anteil nicht-kollagener Proteine ansteigt. Daten aus Le Maitre et al. [109].

Matrixkomponente	Anteil in %	
	Anulus fibrosus	Nukleus pulposus
Wasser	60-70	70-80
Proteoglykane	15-20	65
Kollagene	50-60	15-20
Elastin und andere Proteine	5-25	20-45

1.2.2 Physiologie

Aufgrund der hohen Proteoglykankonzentration und des daraus resultierenden hohen osmotischen Drucks kann im Nukleus viel Wasser gespeichert werden [7, 175, 186, 189]. Proteoglykan-Monomere bestehen im wesentlichen aus einem Kernprotein (Eiweißkette) und Glykosaminoglykanen (GAG) wie beispielsweise Chondroitinsulfat- und Keratansulfatketten, die eine hohe Ladungsdichte immobilisierter Anionen aufweisen (Abbildung 2) [48, 67, 90, 119, 142]. Die hohe Anionenkonzentration hat zur Folge, dass Wasser und frei bewegliche Kationen in die Bandscheibe einströmen [22, 68, 118]. Dadurch entsteht eine hohe extrazelluläre Osmolarität in der Bandscheibe [187].

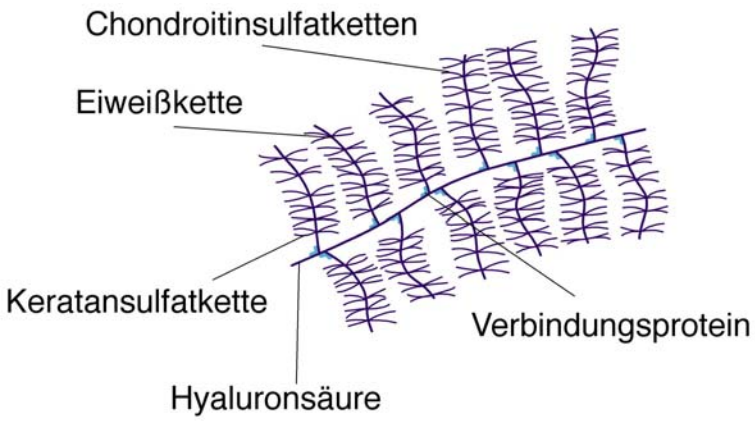


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Proteoglykan-Aggregaten. Die Eiweißkette bildet das Kernprotein, an das Glykosaminoglykanketten gebunden sind. Diese Proteoglykan-Monomere lagern sich über Verbindungsproteine an ein Hyaluronat-Molekül an und bilden dadurch große Aggregate. (Zeichnung von Patrizia Horny übernommen, Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm)

Aufgrund des hohen osmotischen Drucks bzw. der hohen Wasserbindungskapazität von Proteoglykanen kann selbst bei geringer Lasteinwirkung das Wasser in der Bandscheibe zurückgehalten werden [188, 189]. Erst bei höheren mechanischen Belastungen kommt es zum Ausströmen von Wasser aus der Bandscheibe (Abbildung 3). Da die Fluidrichtung von der Belastungssituation abhängt, bedeutet dies, dass im entlasteten Zustand (d.h. im Liegen) Wasser in die Bandscheibe einströmen kann, wohingegen es bei körperlich anstrengenden Tätigkeiten (z.B. Heben von Lasten) zu einem Wasserverlust kommt [25,

28, 104, 128, 189, 201]. Dadurch unterliegen Bandscheibenzellen täglichen Schwankungen der extrazellulären Osmolarität.

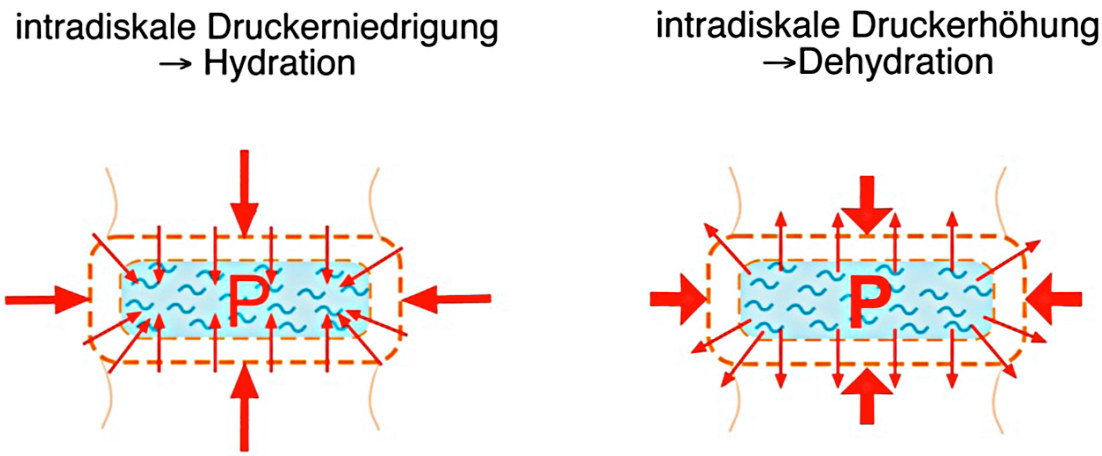


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Fluidbewegung in der Bandscheibe bei geringer (a) bzw. hoher (b) mechanischer Belastung. (Zeichnungen von Patrizia Horny übernommen, Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm)

Im Gegensatz zum Nukleus überwiegt im Anulus der Anteil der Kollagene [109]. Dabei handelt es sich um komplex aufgebaute Strukturproteine, die aus Fibrillen bestehen, welche sich wiederum zu dicken Strängen zusammenlagern. Diese Kollagenfasern besitzen eine hohe Zugfestigkeit, wodurch der Nukleus in seiner Ausdehnung eingeschränkt wird [70, 121]. Strukturelle Veränderungen dieser Kollagennetzwerke erhöhen die Verformbarkeit der Bandscheibe bei Belastung [82].

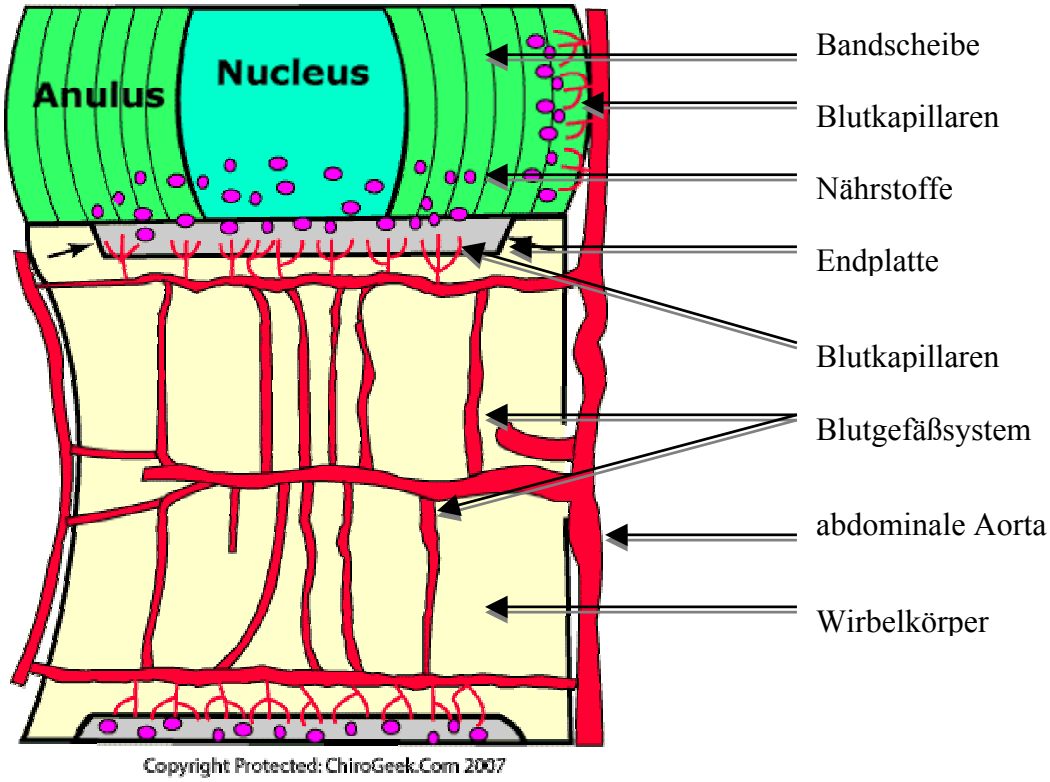


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Nährstoffversorgung von Bandscheibenzellen. (Zeichnung nach Genehmigung von Dr. Doug Gillard aus www.chirogeek.com übernommen)

Da es sich bei Bandscheiben überwiegend um avaskuläres Gewebe handelt, erfolgt die Nährstoffversorgung der Zellen fast ausschließlich durch Diffusion von den Blutkapillaren über die Endplatten in die Bandscheibenmatrix, wobei die Distanz in der adulten humanen Bandscheibe bis zu 8 mm betragen kann (Abbildung 4) [74, 97, 120, 127, 171, 190]. Strukturelle Veränderungen, wie sie bei der Bandscheibendegeneration auftreten, beeinflussen den Transport von Metaboliten in die Bandscheibe hinein bzw. aus der Bandscheibe heraus und somit auch die Viabilität und Aktivität der Bandscheibenzellen (1.3).

1.3 Bandscheibendegeneration

Im Verlauf der Bandscheibendegeneration sinkt die Konzentration der Proteoglykan-Aggregate [60, 84, 148, 159, 175]. Dadurch nimmt die extrazelluläre Osmolarität und infolgedessen der intradiskale Druck ab [72, 167]. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass eine veränderte Osmolarität in bovinen Nukleus- und Knorpelzellen zu einer reduzierten GAG-Produktion im Vergleich zu physiologischen Bedingungen führte [129,

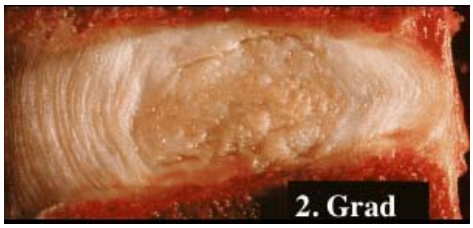
180]. Dies beeinflusst wiederum die Wasserspeicherkapazität und damit die Funktion der Bandscheibe bei mechanischer Belastung [188].

Darüber hinaus wurde eine Kalzifizierung der Endplatten ober- und unterhalb der Bandscheibe beobachtet, wodurch die Nährstoffversorgung (Glucose, Sauerstoff) der Bandscheibenzellen insbesondere im Nukleus pulposus verringert wird [15, 57, 161, 171, 177, 190, 191]. Auch der Abtransport der Metabolite wird dadurch verlangsamt. Da unter anaeroben Bedingungen bei der Glykolyse Laktat gebildet wird, reichert sich dieses in der Bandscheibe an [73]. Infolgedessen verschiebt sich der pH-Wert in den sauren Bereich [11, 47, 75]. Die Veränderung der Mikroumgebung hat auch Einfluss auf den Stoffwechsel und die Viabilität der Bandscheibenzellen [19, 20, 77, 140].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Degenerationsgrad der Bandscheibe mit einem Anstieg matrixdegradierender Enzyme korreliert [44, 108, 109, 158, 163, 198]. Eine reduzierte Zellzahl bzw. Stoffwechselaktivität könnte zu einer verringerten Matrixsynthese führen, wohingegen eine erhöhte Enzymaktivität den verstärkten Abbau der extrazellulären Matrix begünstigen könnte. Im Degenerationsverlauf sinkt die Bandscheibenhöhe [13, 89, 105]. Darüber hinaus wurde das Einsprossen von Blutgefäßen und Nerven in degenerierte Bandscheiben beobachtet [6, 64, 92, 93, 98, 193]. Infolge der Angiogenese steigt die Sauerstoff- und Nährstoffkonzentration in der Mikroumgebung der Bandscheibenzellen [157]. Die Innervation der Bandscheibe könnte hingegen mit der Entstehung von Rückenschmerzen assoziiert sein [51, 153].

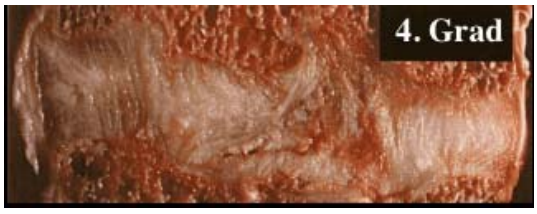
Man unterscheidet verschiedene Grade der Bandscheibendegeneration in Abhängigkeit vom Ausmaß der strukturellen Veränderungen (Abbildung 5) [26, 123, 126, 181]. Bislang ist jedoch noch unklar, inwieweit diese Veränderungen im Zusammenhang mit dem Auftreten von Rückenschmerzen stehen [14, 32, 109].

Grad 1: Gesunde adulte Bandscheine ohne degenerative Veränderung



Grad 2: Leichte Degeneration, beginnend im Nukleus (braune Verfärbung, Fibrosierung)

Grad 3: Moderate Degeneration, Auflösung der Lamellenstruktur und Auswölbung des Anulus in den Nukleus, Veränderung der Endplatten



Grad 4: Starke Degeneration, Abnahme der Bandscheibenhöhe, Zerstörung der Endplatten und Matrixstruktur (Fissuren)

Abbildung 5: Graduelle Einteilung der Bandscheibendegeneration [1, 3, 126]

1.4 Wirkung mechanischer Belastung auf den Metabolismus von Bandscheibenzellen

1.4.1 In vitro

In zahlreichen in vitro Studien konnte an isolierten Bandscheibenzellen gezeigt werden, dass sowohl Nukleus- als auch Anuluszellen auf mechanische Belastung reagierten [55, 88, 102, 132]. Die Reaktion der Bandscheibenzellen auf mechanische Reize war jedoch von der Art, der Dauer, der Amplitude und der Frequenz der applizierten Belastung abhängig. In einer Studie von Neidlinger-Wilke et al. konnte gezeigt werden, dass eine geringe Druckamplitude die Genexpression anaboler Matrixfaktoren in humanen Nukleuszellen tendenziell erhöhte, wohingegen hoher hydrostatischer Druck tendenziell zu einer Erniedrigung anaboler und einer Hochregulation kataboler Matrixfaktoren in bovinen und humanen NP-Zellen führte [133].

Darüber hinaus hat auch der untersuchte Zelltyp (Anulus- bzw. Nukleuszellen) Einfluss auf die Ergebnisse nach mechanischer Belastung. Chen et al. berichteten, dass

Nukleuszellen von Schweinen nicht auf statische Kompression ansprachen, wohingegen in Anuluszellen ein Anstieg der Genexpression von Kollagen-Typ-I und Typ-II, Aggrecan, Biglykan, Decorin und Lumican beobachtet werden konnte [38]. Diese Befunde legen nahe, dass die Responsivität auf mechanische Reize vom Zelltyp abhängig ist. Diese Annahme steht im Konsens mit den Ergebnissen anderer Studien. Beispielsweise wurden in bovinen bzw. humanen Nukleuszellen nach Applikation von hydrostatischem Druck Veränderungen auf Genexpressionsebene nachgewiesen, wohingegen in Anuluszellen keine Veränderungen festgestellt werden konnten [85, 133]. Dagegen reagierten Anuluszellen auf Dehnungsreize mit einem veränderten Genexpressionsprofil im Vergleich zu mechanisch unbelasteten Kulturen [132]. Darüber hinaus gibt es aber auch in vitro Studien, die belegen, dass Zellen auch auf einen eher gewebeuntypischen mechanischen Reiz ansprechen. Beispielsweise untersuchten Kasra et al. den Einfluss hydrostatischer Belastung und fanden heraus, dass sowohl AF- als auch NP-Zellen mit einer verstärkten Kollagensynthese auf hohe dynamische Belastung reagierten [96]. Ebenso konnten Würtz et al. zeigen, dass nicht nur humane AF-Zellen, sondern auch humane NP-Zellen mit einem veränderten Genexpressionsprofil auf zyklische Dehnung reagierten [206]. Jedoch kam es zu zelltypspezifischen Unterschieden in der mechanisch induzierten Genexpression anaboler Matrixfaktoren. Wang et al. stellten in einer Studie unter Durchführung einer Organkultur mit Bandscheiben aus Kaninchen fest, dass die Genexpression anaboler Matrixfaktoren ebenfalls in Abhängigkeit vom Zelltyp (Anulus- bzw. Nukleuszellen) und der Art der mechanischen Belastung (statisch versus dynamisch) variierte [196]. In einer Studie von Korecki et al. konnte auch in bovinen Organkulturen gezeigt werden, dass die Responsivität der AF- und NP-Zellen auf mechanische Belastung unterschiedlich war [103]. So war die Genexpression von Kollagen-Typ-I und MMP-3 in NP-Zellen nach geringer Belastung hochreguliert, während es nach hoher Belastung zu einer Herunterregulation kam. Dagegen wiesen AF-Zellen ein umgekehrtes Genexpressionsmuster auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass NP- und AF-Zellen unterschiedlich auf denselben mechanischen Stimulus reagieren können.

Darüber hinaus konnten mechanisch induzierte Veränderungen auch auf Proteinebene detektiert werden. So berichteten Kasra et al. von einem Anstieg der Kollagensynthese in Anuluszellen von Kaninchen nach hoher dynamischer Belastung im Vergleich zu den unbelasteten Kontrollen bzw. zu Kulturen nach geringer dynamischer Belastung [96]. In einer Studie von Hutton et al. konnte an separat aus Bandscheiben von Hunden isolierten AF- und NP-Zellen gezeigt werden, dass sowohl die Proteoglykan- als auch die

Kollagensynthese durch statische Belastung beeinflusst wurde [79]. Die Autoren konnten ebenfalls eine unterschiedliche Responsivität der AF- und NP-Zellen feststellen, da es in NP-Zellen zu einem mechanisch induzierten Anstieg und in AF-Zellen zu einer Erniedrigung der PG- bzw. Kollagensynthese im Vergleich zu den unbelasteten Kontrollen kam. Handa et al. konnten beobachten, dass die Synthese von Proteoglykanen, Kollagen, MMP-3 und TIMP-1 in humanen Bandscheibenzellen in Abhängigkeit vom Zelltyp, Degenerationsgrad und der Belastungsamplitude nach Stimulation mittels statischem hydrostatischem Druck variierte [63].

Bisher gibt es nur sehr wenige Studien, die den Einfluss des Kultursystems auf die Responsivität der Bandscheibenzellen auf mechanische Belastung untersucht haben. Beispielsweise konnten Kasra et al. in einer in vitro Studie mit separat aus Bandscheiben von Kaninchen isolierten AF- und NP-Zellen zeigen, dass Anuluszellen im Monolayer anders reagierten als Nukleuszellen in Alginatbeads [96]. So war die Kollagenfreisetzung in den Alginatbeadskulturen der mechanisch unbelasteten Kontrollen bzw. bei Belastung mit niedriger Frequenz und geringer Amplitude höherer als bei Belastung mit hoher Frequenz und hoher Amplitude, wohingegen die Kollagenfreisetzung in den Monolayerkulturen zwischen den drei Gruppen ähnlich war. Jedoch muss bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden, dass zwei unterschiedliche Zelltypen miteinander verglichen wurden, was die Ergebnisse ebenfalls beeinflussen kann. Da bekannt ist, dass isolierte Zellen bei einer zweidimensionalen (2D) Kultivierung (Monolayer) ihren Phänotyp verändern und dedifferenzieren können, spielt die Auswahl des Kultursystems bei in vitro Untersuchungen eine große Rolle [16, 39, 76, 168, 197]. Um möglichst physiologische Verhältnisse zu simulieren, stellen dreidimensionale (3D) Kultursysteme (z.B. Alginatbeads, Kollagen-Typ-I-Gele) eine geeignete Alternative zum 2D-System dar [10, 21, 66, 132, 149]. Die 3D-Kultivierung erlaubt daher eine bessere Übertragung der gewonnenen Daten auf die in vivo Situation. Im Gegensatz zu in vivo Versuchen kann jedoch bei in vitro Experimenten der Einfluss einzelner Parameter wie z.B. der extrazellulären Osmolarität bei mechanischer Belastung genauer analysiert werden [206].

1.4.2 In vivo

Da es sich bei in vitro Versuchen jeweils um eine artifizielle Kultivierung isolierter Zellen handelt, können die Ergebnisse von den tatsächlichen Vorgängen in vivo abweichen.

Zudem kann das komplexe Zusammenspiel verschiedener Faktoren, die Einfluss auf die Regulation der Gen- und Proteinexpression in vivo haben, bei in vitro Experimenten nicht ausreichend simuliert werden. Deswegen ist die Untersuchung von mechanisch induzierten Veränderungen in der Bandscheibe an in vivo Modellen geeignet, um Informationen über komplexe physiologische Vorgänge zu erhalten.

In mehreren in vivo Studien konnte gezeigt werden, dass mechanische Belastung den Metabolismus von Bandscheibenzellen beeinflusst. Beispielsweise berichteten Walsh et al., dass die externe Applikation dynamischer Belastung generell eine Zunahme der Proteoglykankonzentration in Mäusen bewirkte, wobei die Effekte von der Frequenz bzw. der Amplitude abhängig waren [195]. Iatridis et al. konnten im Rattenmodell zeigen, dass der Glykosaminoglykangehalt bei externer Applikation einer axialen Kompressionslast über den Verlauf von 56 Tagen im Vergleich zu den Kontrollgruppen anstieg [83]. Dieser Befund steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen von Hutton et al., die in einer Studie an Hunden herausfanden, dass die Proteoglykankonzentration in Bandscheiben unter hoher externer Kompressionsbelastung gegenüber den Kontrollen im Zeitverlauf abnahm [81]. In einer weiteren in vivo Studie an Mäusen applizierten Court et al. statische Belastungen, die zu einer Krümmung der Wirbelsäule führten, über einen Zeitraum von sieben Tagen und stellten fest, dass die Genexpression von Aggrecan und Kollagen-Typ-II im Anulus bei hoher Belastung tendenziell abnahm [43]. Die unterschiedlichen Ergebnisse deuten darauf hin, dass verschiedene mechanische Belastungen zum Teil gegensätzliche Effekte hervorrufen können. Die voneinander abweichenden Ergebnisse könnten sowohl auf Unterschiede im Stimulationsprotokoll (Art des mechanischen Reizes, Applikationsdauer etc.) als auch des verwendeten Tiermodells zurückzuführen sein.

In weiteren in vivo Studien wurden degenerative Veränderungen simuliert und deren Effekte auf den Metabolismus von Bandscheibenzellen ausgewertet, ohne dass zusätzlich externe mechanische Reize appliziert wurden. Da die Bandscheibenzellen bei in vivo Experimenten jedoch ohnehin wechselnden mechanischen Belastungen ausgesetzt sind, kann in diesen Versuchsmodellen ebenfalls die Interaktion einer variierten Mikroumgebung und mechanischer Faktoren analysiert werden. Beispielsweise untersuchten Holm et al. den Einfluss einer Endplattenperforation in den Nukleus auf den Metabolismus der Bandscheibenzellen von Schweinen und fanden heraus, dass es in den degenerierten Bandscheiben zu einem Wasserverlust im äußeren Anulus sowie zu einer erniedrigten Proteoglykankonzentration im Nukleus gegenüber den angrenzenden intakten Bandscheiben kam [72]. Außerdem beobachteten die Autoren, dass der intradiskale Druck

im Nukleus der degenerierten Bandscheiben im Vergleich zu den benachbarten intakten Bandscheiben deutlich geringer war, was zu Unterschieden im viskoelastischen Verhalten der Bandscheibe bei Belastung führte. Kääpä et al. hatten bereits 1994 ebenfalls im Schweinemodell gezeigt, dass Verletzungen des Anulus fibrosus zu strukturellen Veränderungen der Bandscheibe führten. Die Morphologie der betroffenen Bandscheiben wies nach einem Zeitraum von drei Monaten degenerative Merkmale wie z.B. einen verkleinerten, fibrösen Nukleus oder eine partielle Auflösung der Lamellenstruktur des Anulus auf. Außerdem waren die Veränderungen mit einem erniedrigten Wassergehalt im Nukleus verbunden [95]. Der Wasseranteil beeinflusst wiederum die biomechanische Funktion der Bandscheibe bei Belastung. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass dynamische Belastung allein die Bandscheibendegeneration in den untersuchten in vivo Modellen nicht verzögern konnte.

In weiteren in vivo Studien wurde der Einfluss regenerativer Strategien auf den Metabolismus von degenerierten Bandscheibenzellen untersucht. In einer Studie von Paul et al. wurde der Transkriptionsfaktor Sox-9 mit Hilfe adenoviraler Vektoren über eine Nadel in die Bandscheiben von Kaninchen eingeschleust [145]. Gleichzeitig wurde durch das Einführen der Nadel eine Bandscheibendegeneration initiiert. Die histologische Auswertung des Gewebes ergab, dass infolge des Sox-9-Gentransfers der knorpelige Phänotyp sowie die Struktur des Nukleus pulposus über die Zeitspanne von fünf Wochen im Vergleich zum Kontrollgewebe aufrecht erhalten werden konnte. In einer anderen in vivo Studie injizierten An et al. den Wachstumsfaktor osteogenes Protein-1 in den Nukleus von Kaninchen [8]. Die Autoren konnten daraufhin eine Zunahme der Bandscheibenhöhe und der Proteoglykankonzentration gegenüber dem unbehandelten Kontrollgewebe beobachten. Ganey et al. berichteten in einer an Hunden durchgeführten Studie, dass die Matrixzusammensetzung degenerierter Bandscheiben nach Transplantation autologer Chondrozyten der Matrixstruktur einer gesunden Bandscheibe entsprach [54]. In weiteren Tierversuchen am Hund konnten Hohaus et al. ähnliche Ergebnisse auch durch die Transplantation von Zellen aus Fettgewebe erzielen, wobei im Vergleich zu den zelltransplantierten Bandscheiben in den unbehandelten Bandscheiben keine regenerativen Effekte auf die Matrix beobachtet werden konnten [71]. Darüber hinaus stellten Meisel et al. in klinischen Studien fest, dass nach autologer Chondrozytentransplantation die Rückenschmerzen der behandelten Patienten im Vergleich zu unbehandelten Patienten deutlich zurückgegangen waren [122]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Kombination aus den Matrixaufbau fördernden Faktoren, einer ausreichenden Zelldichte

und physiologischer Belastung in vivo zu einer Verlangsamung der Bandscheibendegeneration führen könnte.

1.5 Ziel der Arbeit

Wie bereits unter 1.1 erwähnt, gibt es eine hohe Prävalenz von Rückenschmerzen mit enormen wirtschaftlichen Folgen. Obwohl in mehreren Studien gezeigt werden konnte, dass eine Bandscheibendegeneration auch asymptomatisch verlaufen kann, ist dennoch zu vermuten, dass es einen Zusammenhang zwischen degenerativen Veränderungen der Bandscheibe und dem Auftreten von Rückenschmerzen gibt.

Die Ursachen der Bandscheibendegeneration sind vielfältig. Dazu gehören einerseits Alterungsprozesse, mechanische Beanspruchung (Kompression, Flexion etc.), genetische Faktoren und strukturelle Veränderungen (Kalzifizierung der Endplatten, Arteriosklerose) [2, 13, 17, 43, 61, 62, 99, 107, 113, 174]. Andererseits spielen zelluläre Veränderungen ebenfalls eine große Rolle. Dazu zählen die Umwandlung der Zellpopulation des Nukleus pulposus von notochordalen zu chondrozytenähnlichen Zellen, eine reduzierte Nährstoffversorgung, eine verringerte Zellviabilität und Veränderungen des Zellmetabolismus [5, 19, 20, 33, 37, 138, 139, 183, 190].

Unter 1.3 wurden bereits die Umgebungsfaktoren (Osmolarität, Glucose, Sauerstoff, pH) beschrieben, die bei der Bandscheibendegeneration verändert sind. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Parameter entsprechend variiert, um eine degenerativ veränderte Mikroumgebung zu simulieren. Bisher konnten in der Literatur nur wenige in vitro Studien gefunden werden, in der die Reaktion der Bandscheibenzellen auf mechanische Belastung unter degenerationsbedingten Veränderungen untersucht wurde. In einer früheren Studie haben Würtz et al. [206] den Einfluss von zyklischem hydrostatischem Druck bzw. zyklischer Dehnung auf den Metabolismus von Nukleus- und Anuluszellen unter Variation der extrazellulären Osmolarität analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Responsivität der Bandscheibenzellen auf mechanische Reize von der Umgebungsbedingung abhängig war.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wechselwirkung mechanischer und ernährungsphysiologischer Faktoren auf Anulus- und Nukleuszellen im Rahmen der Bandscheibendegeneration zu untersuchen.

Ziele der Arbeit

1. Welchen Einfluss hat die Variation der Mikroumgebung (Osmolarität, Glucose, Sauerstoff, pH) auf die Genexpression von Bandscheibenzellen?
2. Wie beeinflusst eine veränderte Mikroumgebung die Genexpression von Bandscheibenzellen bei mechanischer Belastung?
3. Welchen Einfluss hat das Kultursystem auf die Genexpression von Bandscheibenzellen bei Variation der Umgebungsparameter bzw. Applikation mechanischer Reize?
4. Spielen spenderabhängige Unterschiede in einem humanen Patientenkollektiv ebenfalls eine Rolle?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden bovine und humane Bandscheibenzellen separat aus dem Gewebe des Anulus fibrosus bzw. des Nukleus pulposus isoliert. Bovine Bandscheibenzellen dienten als Modell für gesunde Bandscheibenzellen, da die klinischen Proben humaner Spender überwiegend aus degeneriertem Gewebe stammten.
Einerseits wurde der Einfluss einer veränderten Mikroumgebung auf die Genexpression analysiert, andererseits wurde die Responsivität der Bandscheibenzellen auf mechanische Reize unter variierten Umgebungsbedingungen untersucht. Die Bandscheibenzellen wurden dabei dem jeweils für die Geweberegion physiologischen mechanischen Reiz ausgesetzt, d.h. dass zyklische Dehnung auf Anuluszellen und zyklischer hydrostatischer Druck auf Nukleuszellen appliziert wurde. Darüber hinaus wurde auch der Einfluss des Kultursystems sowie spenderabhängiger Variabilität auf die Genexpression von Bandscheibenzellen ausgewertet.
Die Genexpressionsanalysen wurden mit Hilfe einer quantitativen real-time RT-PCR durchgeführt. Es wurden sowohl anabole (Aggrecan, Kollagen-Typ-I und Typ-II, Sox-9) als auch katabole (MMPs) Matrixgene sowie angiogene Faktoren (Pleiotrophin, Midkine, VEGF) untersucht. Zur Überprüfung der Übertragung mechanischer Reize auf Bandscheibenzellen wurde die Genexpression des mechanosensitiven Transkriptionsfaktors c-fos untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Primäre bovine Bandscheiben-Zellen

Zellen aus gepoolten Bandscheiben verschiedener Segmente des Rinderschwanzes, der von der Ulmer Fleisch GmbH bezogen wurde.

Primäre humane Bandscheiben-Zellen

Zellen aus humanem Bandscheibengewebe verschiedener Segmente, überwiegend im Bereich der Lendenwirbelsäule (L4/5, L5/S1), die nach Genehmigung durch die Ethikkommission (Ethikantrag 04/2001) nach intraoperativen Eingriffen im Rahmen einer Kooperation mit den Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm zur Verfügung gestellt wurden.

Tabelle 2: Übersicht über die humanen Spender, deren Bandscheibengewebe zur Durchführung von Experimenten verwendet wurde. BSV: Bandscheibenvorfall, DDD: Degenerative Disc Disease (nicht näher bezeichnete degenerative Bandscheibenerkrankung). Altersangabe in Jahren. Nummer: intern verwendeter Code zur Anonymisierung der Patientendaten. f: feminin, m: maskulin, Th: Thorax, L: Lende, S: Steißbein, AF: Anulus fibrosus, NP: Nukleus pulposus.

Nummer	Geschlecht	Alter	Diagnose	Lokalisation
1) T4036	f	19	Trauma	L4
2) T4038	f	20	Trauma	Th12/L1
3) T4105	f	44	BSV	L5/S1
4) T4143	f	48	BSV	L4/5
5) T4247	m	28	BSV	L5/S1
6) T4263	f	47	BSV	L5/S1
7) T4301	m	30	Trauma	L1-3
8) T4337	f	66	DDD	L2-5

9) T4339	f	44	Osteochondrose	L3-5
10) T4347	f	51	Trauma	Th12
11) T4349	f	78	DDD	L3-5
12) T4359	f	47	BSV	L5/S1
13) T4371	m	27	DDD	L5/S1
14) T4373	f	46	BSV	L4/5
15) T4381	f	40	DDD	L5/S1
16) T4383	m	45	Spondylolisthese	L5/S1
17) T4385	f	27	BSV	L5/S1
18) T4391	f	35	BSV	L5/S1
19) T4395	f	44	BSV	L4/5

Nummer	Kapitel	Zellen
1) T4036	3.2.1.2, 3.5.2, 3.6	NP
2) T4038	3.1.1.2, 3.2.1.2, 3.5.1, 3.5.2, 3.6	NP
3) T4105	3.3.1.2, 3.5.3, 3.6	AF
4) T4143	3.3.1.2, 3.5.3, 3.6	AF
5) T4247	3.1.1.2, 3.5.1, 3.6	NP
6) T4263	3.4.1.2	NP
7) T4301	3.1.1.2, 3.5.1, 3.6	NP
8) T4337	3.1.2, 3.5.1, 3.6, 3.7.1.2	AF
9) T4339	3.1.2, 3.5.1, 3.6, 3.7.1.2	AF
10) T4347	3.1.2, 3.5.1, 3.6, 3.7.1.2	AF
11) T4349	3.1.2, 3.5.1, 3.6, 3.7.1.2	AF
12) T4359	3.1.2, 3.5.1, 3.6, 3.7.1.2	AF
13) T4371	3.2.2, 3.5.2, 3.7.1.2	AF
14) T4373	3.2.2, 3.5.2	AF
15) T4381	3.3.1.2, 3.5.3, 3.6, 3.7.1.2	AF
16) T4383	3.2.1.2, 3.2.2, 3.5.2, 3.6	NP, AF
17) T4385	3.2.1.2, 3.2.2, 3.5.2, 3.6, 3.7.1.2	NP, AF
18) T4391	3.3.1.2, 3.5.3, 3.6, 3.7.1.2	AF
19) T4395	3.2.2, 3.5.2	AF

2.1.2 Zellkulturmedien

Alle Zellen wurden in DMEM mit entsprechenden Zusätzen kultiviert.

Transportmedium (Gewebe)	
DMEM (Gibco, 22320)	
Salzlösung (5 M NaCl/0,4 M KCl)	1,5%
Penicillin/Streptomycin	5% (500 U/ml, 500 µg/ml)
Fungizone	5% (12,5 µg/ml)
L-Glutamin	1% (2 mM)
NEA	1%

Verdaumedium (Gewebe, human)	
DMEM (Gibco, 22320)	
Salzlösung (5 M NaCl/0,4 M KCl)	1,5%
Penicillin/Streptomycin	5% (500 U/ml, 500 µg/ml)
Fungizone	5% (12,5 µg/ml)
DNase	1,3 µl/ml
Kollagenase P	2 mg/ml (Anulus), 0,8 mg/ml (Nukleus)
Protease	0,6 mg/ml (Anulus)

Verdaumedium (Gewebe, bovin)	
DMEM (Gibco, 22320)	
Salzlösung (5 M NaCl/0,4 M KCl)	1,5%
Penicillin/Streptomycin	5% (500 U/ml, 500 µg/ml)
Fungizone	5% (12,5 µg/ml)
DNase	1,3 µl/ml
Kollagenase P	3 mg/ml (Anulus), 2 mg/ml (Übergangszone) 0,8 mg/ml (Nukleus)
Protease	0,6 mg/ml (Anulus/Übergangszone)

Expansionsmedium	
DMEM (Gibco, 22320)	
Salzlösung (5 M NaCl/0,4 M KCl)	1,5%
Penicillin/Streptomycin	1% (100 U/ml, 100 µg/ml)
Fungizone	0,5% (1,25 µg/ml)
L-Glutamin	1% (2 mM)
NEA	1%
FCS	5%

Einfriermedium	
DMEM (Gibco, 22320)	
FCS	20%
L-Glutamin	1% (2 mM)
NEA	1%
DMSO	7,5%

Osmolaritätsmedium	
DMEM (Gibco, 22320)	
Salzlösung (5 M NaCl/0,4 M KCl)	300 mOsm: 0,25%, 400 mOsm: 1,5%, 500 mOsm: 2,5%
L-Glutamin	1% (2 mM)
NEA	1%
FCS	0%, 1% (Monolayer)

Glucosemedium	
DMEM (Biochrom F0405, F0415)	G0: 100% F0405, G1: 90% F0405, 10% F0415, G2: 100% F0415
Hepes	2,5% (25 mM)
Salzlösung (5 M NaCl/0,4 M KCl)	1%
L-Glutamin	1% (2 mM)
NEA	1%
FCS	0%, 1% (Monolayer)

pH-Medium	
DMEM (Gibco, 22320)	
Salzlösung (5 M NaCl/0,4 M KCl)	1,5%
L-Glutamin	1% (2 mM)
NEA	1%
HCl	unterschiedliche Volumina zur Einstellung der pH-Werte 6,5 / 6,8 / 7,2

LB-Medium/LB-Agar	
Aqua dest.	
Luria Broth Base	25 g/L
NaCl	1%
Ampicillin	50 µg/ml
Select Agar	15 g/L

2.1.3 Oligonukleotide (*Primer*)

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Ulm, Deutschland) bezogen. Die *Accession* Nummer stammt aus der *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Zielgene. Spezies: Rind. GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, MMP: Matrixmetalloproteinase. Größenangabe in Basenpaaren (bp).

Zielgen (bovin)	Primersequenz	Größe	Accession Nummer
Aggrecan	links: 5′-ACA GCG CCT ACC AAG ACA AG-3′ rechts: 5′-ACG ATG CCT TTT ACC ACG AC-3′	155 bp	NM_173981
Aggrecanase-1	links: 5′-GAA GCA ATG CAC TGG TCT GA-3′ rechts: 5′-CTA GGA GAC AGT GCC CGA AG-3′	155 bp	AF192770
Aggrecanase-2	links: 5′-CTC CCA TGA CGA TTC CAA GT-3′ rechts: 5′-TAC CGT GAC CAT CAT CCA GA-3′	155 bp	AF192771
c-fos	links: 5′-CGG CTT TGC AGA CAG AGA TT-3′ rechts: 5′-CCC CCA CTC AGA TCA AGA GA-3′	148 bp	AY322482
GAPDH	links: 5′-ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG-3′ rechts: 5′-CAA CAG ACA CGT TGG GAG TG-3′	178 bp	XM_001252 511
Kollagen-Typ-I	links: 5′-TGA GAG AGG GGT TGT TGG AC-3′ rechts: 5′-AGG TTC ACC CTT CAC ACC TG-3′	142 bp	NM_174520
Kollagen-Typ-II	links: 5′-CCT GTA GGA CCT TTG GGT CA-3′ rechts: 5′-ATA GCG CCG TTG TGT AGG AC-3′	145 bp	X02420
L30	links: 5′-AGG AAG GCT CAA CGA GAA CA-3′ rechts: 5′-CGA GGA GCA GAA ACC TTC AC-3′	155 bp	AB099007
MMP-2	links: 5′-ACC AGA GCA CCA TTG AGA CC-3′ rechts: 5′-AAC CGT AGC GGA GTC ACA TC-3′	208 bp	NM_174745
MMP-3	links: 5′-AAT CAG TTC TGG GCC ATC AG-3′ rechts: 5′-CTC TGA TTC AAC CCC TGG AA-3′	237 bp	AF069642
p53	links: 5′-ATT TAC GCG CGG AGT ATT TG-3′ rechts: 5′-CCA GTG TGA TGA TGG TGA GG-3′	174 bp	X81704
Pleiotrophin	links: 5′-GCA AAC CAT GAA GAC CCA GA-3′ rechts: 5′-GGC TTG GAG ATG GTG ACA GT-3′	189 bp	NM_002825

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Zielgene. Spezies: Mensch. GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, MMP: Matrixmetalloproteinase, Sox: Sry (sex determining region Y)-related high mobility group box, VEGF: vascular endothelial growth factor. Größenangabe in Basenpaaren (bp).

Zielgen (human)	Primersequenz	Größe	Accession Nummer
Aggrecan	links: 5′-TCT GTA ACC CAG GCT CCA AC-3′ rechts: 5′-CTG GCA AAA TCC CCA CTA AA-3′	199 bp	NM_013227
c-fos	links: 5′-CCG GGG ATA GCC TCT CTT AC-3′ rechts: 5′-GGT GAG GGG CTC TGG TCT-3′	216 bp	NM_005252
GAPDH	links: 5′-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3′ rechts: 5′-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3′	224 bp	NM_002046
Kollagen-Typ-I	links: 5′-TGA CCT CAA GAT GTG CCA CT-3′ rechts: 5′-ACC AGA CAT CCC TCT TGT CC-3′	197 bp	NM_000088
Kollagen-Typ-II	links: 5′-CGC ACC TGC AGA GAC CTG AA-3′ rechts: 5′-TCT TCT TGG GAA CGT TTG CTG G-3′	162 bp	NM_001844
Midkine	links: 5′-TGC CCT GCA ACT GGA AGA A-3′ rechts: 5′-CAC TAC CCC CGT GTC CG-3′	83 bp	NM_001012334
MMP-1	links: 5′-ATG CTG AAA CCC TGA AGG TG-3′ rechts: 5′-CTG CTT GAC CCT CAG AGA CC-3′	234 bp	NM_002421
MMP-2	links: 5′-AAG AAC CAG ATC ACA TAC AGG ATC A-3′ rechts: 5′-GTA TCC ATC GCC ATG CTC C-3′	185 bp	NM_004530
MMP-3	links: 5′-GGA GAT GCC CAC TTT GAT GAT-3′ rechts: 5′-CAT CTT GAG ACA GGC GGA AC-3′	187 bp	NM_002422
MMP-13	links: 5′-TTG AGC TGG ACT CAT TGT CG-3′ rechts: 5′-GGA GCC TCT CAG TCA TGG AG-3′	172 bp	NM_002427
Pleiotrophin	links: 5′-GCA AAC CAT GAA GAC CCA GA-3′ rechts: 5′-GGC TTG GAG ATG GTG ACA GT-3′	189 bp	NM_002825
SOX-9	links: 5′-AGT ACC CGC ACT TGC ACA AC-3′ rechts: 5′-GCT TCT CGC TCT CGT TCA GA-3′		NM_000346
VEGF	links: 5′-TGC AGA TTA TGC GGA TCA AA-3′ rechts: 5′-AAA TGC TTT CTC CGC TCT GA-3′	220 bp	NM_003376

2.1.4 Kits

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller	Ort
Blyscan Glycosaminoglycan Assay	Proteinanalyse	Biocolor	Carrickfergus, Großbritannien
HotStarTaq Master Mix Kit	PCR	Qiagen	Hilden, Deutschland
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Zellkultur	Roche	Mannheim, Deutschland
Omniscript RT Kit	cDNA-Synthese	Qiagen	Hilden, Deutschland
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	Real-time RT-PCR	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Qiafilter Plasmid Midi Kit	Plasmid-Isolierung	Qiagen	Hilden, Deutschland
RNase Free DNase Set	RNA-Isolierung	Qiagen	Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit mit Qia Shredder	RNA-Isolierung	Qiagen	Hilden, Deutschland
TOPO TA Cloning Kit	Klonierung	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland

2.1.5 Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Verwendung	Zusammensetzung
Alginatlösung	Alginatbeads	0,9% NaCl 1,2% Alginat
Auflösungspuffer	Alginatbeads	28 mM EDTA 150 mM NaCl, pH 8,0
Calciumchlorid-Lösung	Alginatbeads	102 mM
Enzymverdau-Lösung	RNA-Isolierung aus Kollagen-Typ-I-Gelen	95% RNase freies Wasser 2,5% Kollagenase (2 mg/ml) 2,5% Protease (0,6 mg/ml)
Formalin-Lösung	Alginatbeads	4% Formalinlösung 40 mM $CaCl_2$
Lysepuffer	RNA-Isolierung	RLT-Puffer (Qiagen)

		143 mM 2-Mercaptoethanol (1%)
Salzlösung	Zellkulturmedien	5 M NaCl
		0,4 M KCl
TAE-Puffer	Agarose-	40 mM Tris/0,1%Essigsäure, pH 8,0
	Gelelektrophorese	1 mM EDTA

2.1.6 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller / Vertrieb	Ort
Agarose	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Alginat	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Ampicillin	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Basenpaarleiter (100 bp)	Gibco BRL	Karlsruhe, Deutschland
Basenpaarleiter (5000 bp)	Applichem	Darmstadt, Deutschland
$CaCl_2$ Dihydrat	Fluka	Buchs, Schweiz
DMEM 22320	Gibco BRL	Karlsruhe, Deutschland
DMEM F0405, F0415	Biochrom	Berlin, Deutschland
DMSO	Serva	Heidelberg, Deutschland
DNase	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
EDTA	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethanol vergällt	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Serva	Heidelberg, Deutschland
FCS	Biochrom	Berlin, Deutschland
Fluoresceindiacetat	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Formalin	Baker	Gross-Gerau, Deutschland
Fungizone	Gibco BRL	Karlsruhe, Deutschland
Haematoxylinlösung	Chroma	Münster, Deutschland
HCl	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Hepes	Biochrom	Berlin, Deutschland
KCl	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kollagenase 1A	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Kollagenase P	Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland
Kollagen-Typ-I-Gel	Arthro Kinetics AG	Esslingen, Deutschland

Ladepuffer (6x)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom	Berlin, Deutschland
Luria Broth Base	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Fluka	Buchs, Schweiz
Methanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
NaCl	Riedel-de Haen	Seelze, Deutschland
NaOH	Merck	Darmstadt, Deutschland
NEA	Biochrom	Berlin, Deutschland
Neutralisationslösung	Arthro Kinetics AG	Esslingen, Deutschland
PBS	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
Penicillin / Streptomycin	Gibco BRL	Karlsruhe, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Random-Hexamer-Primer	Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland
RNasin Ribonuklease Inhibitor	Promega	Madison, WI, USA
Select Agar	Gibco BRL	Karlsruhe, Deutschland
Silikon ELM4641A	Wacker	München, Deutschland
Silikonvernetzer ELM4641B	Wacker	München, Deutschland
Tris	Merck	Darmstadt, Deutschland
Trypan Blau	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Trypsin/EDTA (10x) 0,05% / 0,02% (w/v)	Biochrom	Berlin, Deutschland

2.1.7 Restriktionsenzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Restriktionsenzym	Puffer	Spezifität
Bgl II	3	5´-A↓GATCT-3´
EcoR I	3	5´-G↓AATTC-3´
Nco I	3	5´-C↓CATGG-3´
Ssp I	6	5´-AAT↓ATT-3´

2.1.8 Geräte

Bezeichnung	Modellbezeichnung	Hersteller	Ort
Brutschrank 1	Hera Cell 240	Heraeus	Hanau, Deutschland
Brutschrank 2	Hera Cell 240	Heraeus	Hanau, Deutschland
Digitale Kamera	Coolpix 950	Nikon	Düsseldorf, Deutschland
Digitalkamera	IX70	Olympus	Hamburg, Deutschland
DNA-Workstation	UV Cleaner UVC/T-AR	Kisker	Steinfurt, Deutschland
ELISA-Reader	Versamax	Molecular Devices	Ismaning, Deutschland
Feinwaage 1	MC1 Analytic AC 120 S	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Feinwaage 2	EW 600-2M	Kern & Sohn GmbH	Albstadt, Deutschland
Geldokumentations-gerät	75S03227	Biorad	München, Deutschland
Gelelektrophorese-kammer	Horizon11-14	Life Technologies GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
iCycler	Optical Module	Biorad	München, Deutschland
Instron	8871	Zwick/Roell	Ulm, Deutschland
Kühlzentrifuge 1	5417 R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge 2	5804 R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Laminar Flow 1	HA 2448 GS	Heraeus	Hanau, Deutschland
Laminar Flow 2	HB 2460	Holten	Allerod, Dänemark
Laminar Flow 3	HS 12/2	Heraeus	Hanau, Deutschland
Magnetrührer 1	RCT basic	IKA Labortechnik	Staufen, Deutschland
Magnetrührer 2	MR 2002	Heidolph	Schwabach, Deutschland
Magnetrührer 3	MR Hei-Mix S	Heidolph	Schwabach, Deutschland
Mikroskop 1	IX 70	Olympus	Hamburg, Deutschland
Mikroskop 2	IM	Zeiss	Oberkochen, Deutschland

Mikroskop 3	Axiophot 451887	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Osmometer	Osmomat O30	Gonotec	Berlin, Deutschland
PCR-Gerät 1	Robocycler 96 Gradient Combo	Stratagene	Amsterdam, Holland
PCR-Gerät 2	Biometra Thermocycler	Biozym	Hess. Oldendorf, Deutschland
Spektralphotometer	Ultrospec Plus	Pharmacia LKB	Freiburg, Deutschland
Vakuumpumpe	Laboxact	KNF Neuberger GmbH	Freiburg, Deutschland
Wärmeinkubator 1	Function Line	Heraeus	Hanau, Deutschland
Wärmeinkubator 2	HIR 12	Grant-Boekel	Cambridge, Großbritannien
Wärmeinkubator 3	TH 30, SM-30 Control	Edmund Bühler GmbH	Hechingen, Deutschland
Wärmeschüttler	SM-30	EB Labortechnik	Hechingen, Deutschland
Wasserbad	1012	GFL	Burgwedel, Deutschland
Zellstimulations-geräte		Eigenbau	Ulm, Deutschland
Zentrifuge 1	Biofuge 13	Heraeus	Hanau, Deutschland
Zentrifuge 2	UniCen FR	Herolab	Wiesloch, Deutschland

Zellstimulationsgerät

Zur Applikation zyklischer uniaxialer Reize in unterschiedlichen Frequenzen und Dehnungsamplituden wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Zellstimulationsgerät (Abbildung 6) entwickelt [131]. In dieses Gerät konnten zellbesiedelte Silikonschalen eingespannt und in ihrer Längsachse gedehnt werden. Dabei wurde durch die Auswahl des jeweiligen Exzenters die Dehnungsamplitude festgelegt. Die Rotationsgeschwindigkeit der Exzenter und damit die Dehnungsfrequenz konnte am Motor eingestellt werden. Für die Dauer der mechanischen Stimulation wurde das Dehnungsgerät mit den eingesetzten Silikonschalen in den Brutschrank eingebracht und die Proben bei 37 °C, 6% bzw. 1% oder 21% O_2 und 8,5% CO_2 inkubiert.

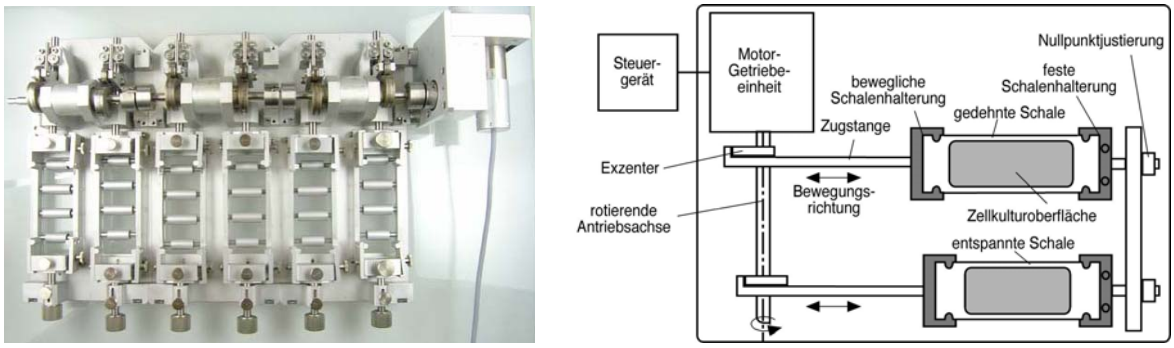


Abbildung 6: Zelldehnungsapparatur zur Applikation uniaxialer Reize auf die Zellen. (Foto von Herbert Schmitt bzw. Zeichnung von Patrizia Horny übernommen, Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm)

Silikonschalen

Um Zellen in einer zweidimensionalen Monolayerkultur mechanisch zu stimulieren, wurden die Zellen in dehnbare Silikonschalen ausgesät, an deren vorbehandelte Oberfläche (Konditionierung mit FCS-haltigem Medium) die Zellen adhärieren konnten und auf der sie nach einer Adaptationsphase einen konfluenten Zellrasen bildeten (Abbildung 7a).

Um mechanische Reize auf Zellen in einer dreidimensionalen Zellkultur zu übertragen, wurden Silikonschalen verwendet, die an beiden Seiten Noppen enthielten, zwischen denen das zellbesiedelte Kollagen-Typ-I-Gel aufgespannt wurde (Abbildung 7b).

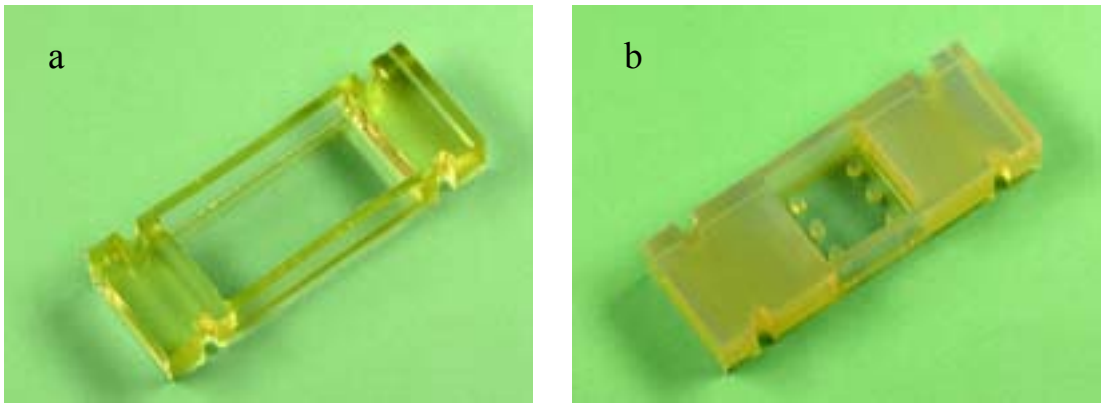


Abbildung 7: Silikonschalen für 2D-Monolayerkultur (a) und 3D-Kollagen-Typ-I-Gelkultur (b). (Fotos von Herbert Schmitt übernommen, Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Isolierung und Anzucht boviner Bandscheibenzellen

Bovine Bandscheibenzellen wurden wie bereits beschrieben [206] aus Rinderschwänzen von jungen weiblichen und männlichen Tieren isoliert, die von der Ulmer Fleisch AG bezogen wurden. Die Präparation des Rinderschwanzes begann unmittelbar nach Schlachtung der Tiere mit der Freilegung der einzelnen Schwanzwirbelkörper durch Abtrennung des umgebenden Muskelgewebes. Unter sterilen Bedingungen wurden danach die Bandscheiben entnommen und eine Trennung in die Bereiche Nukleus, innerer Anulus (Übergangszone) und äußerer Anulus durchgeführt, die anschließend in einer frisch angesetzten, sterilfiltrierten (Porengröße: 0,2 µm) Kollagenase-Protease-Lösung (2.1.2) separat aufgearbeitet wurden. Große Gewebestücke wurden vor der Überführung in das Verdaumedium zerkleinert, um die enzymatische Freisetzung der Zellen zu beschleunigen und somit die Gefahr einer Zellschädigung zu reduzieren. Der Enzymverdau des Gewebes fand im Wärmeschrank bei 37 °C unter stetem Rühren statt, wobei die Inkubationsdauer von der Menge und den strukturellen Eigenschaften der Gewebeproben abhing und bis zu 5 Stunden betrug. Nach Auflösung des Gewebes wurde die Zellsuspension über sterile Filter (Porengröße: zunächst 70 µm, danach 40 µm) von eventuell noch vorhandenen Strukturen getrennt und bei 1000 Upm 6 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit sterilem PBS gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in Expansionsmedium (2.1.2) resuspendiert und zur Anzucht in Zellkulturflaschen überführt. Am folgenden Tag wurde ein Medienwechsel durchgeführt, um tote Zellen zu entfernen.

Um möglichst physiologische Bedingungen zu schaffen, wurden die Bandscheibenzellen im Brutschrank bei einer reduzierten Sauerstoffkonzentration (6%), 37 °C und 8,5% CO_2 kultiviert. Die Osmolarität des verwendeten Expansionsmediums wurde auf 400 mOsm erhöht. Zur optimalen Versorgung der Zellen mit Nährstoffen wurde das Medium zweimal pro Woche vollständig gewechselt. Sobald die Zellen eine mindestens 80%-ige Konfluenz erreichten, wurden sie unter Verwendung von Trypsin/EDTA (2 ml/75 cm^2 bzw. 5 ml/175 cm^2) abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit dem jeweils doppelten Volumen eines FCS-haltigen Mediums (10%) versetzt und zentrifugiert (1000 Upm, 6 min). Das Zellpellet

wurde in Medium resuspendiert und die Zellsuspension auf mehrere Flaschen verteilt. Nach zwei- bis dreimaligem Passagieren standen in der Regel ausreichend Zellen für Versuche zur Verfügung, so dass mit der Aussaat der Zellen in das jeweilige Kultursystem begonnen werden konnte. Zellen, die nicht unmittelbar für Versuche benötigt wurden, wurden in Einfriermedium (2.1.2) aufgenommen und zunächst bei -80 °C eingefroren, bevor sie zur längerfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff eingebracht wurden.

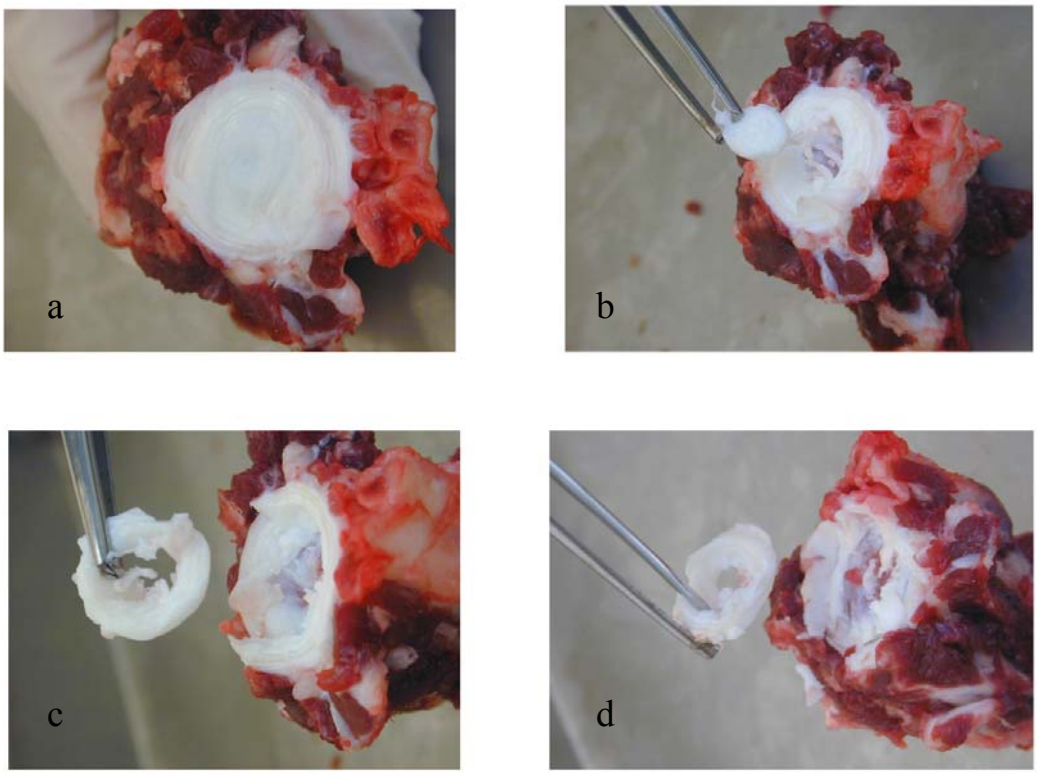


Abbildung 8: Isolierung von Bandscheibenzellen aus verschiedenen Bereichen eines Rinderschwanzes. a: Intakte Bandscheibe vor der Aufarbeitung. b: Isolierung von Gewebe aus dem Nukleus pulposus. c: Isolierung von Gewebe aus der Übergangszone. d: Isolierung von Gewebe aus dem Anulus fibrosus. (Fotos von Herbert Schmitt übernommen, Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm)

2.2.1.2 Isolierung und Anzucht humaner Bandscheibenzellen

Gewebeproben wurden nach Genehmigung durch die Ethikkommission (Ethikantrag 04/2001) und Aufklärung der Patienten intraoperativ entnommen, wobei mit Ausnahme weniger Traumapatienten die Eingriffe aufgrund von degenerativen Erkrankungen der verschiedenen Segmente erfolgten. Während der Entnahme der Bandscheiben wurde eine

Auftrennung in Nukleus und Anulus vorgenommen, deren Genauigkeit infolge der minimal-invasiven Operationstechnik limitiert war. Die Gewebeproben wurden zunächst zentrifugiert (1000 Upm, 6 min), um das Transportmedium (2.1.2) zu entfernen. Daraufhin wurden die Gewebeproben in einer frisch angesetzten, sterilfiltrierten (Porengröße: 0,2 µm) Kollagenase-Protease-Lösung (2.1.2) im Wärmeschrank bei 37 °C unter stetem Rühren separat verdaut. Die weiteren Schritte erfolgten analog zur Isolierung boviner Zellen (2.2.1.1).

2.2.1.3 Aussaat der Zellen in Alginatbeads

Für Druckversuche wurden Nukleuszellen in einer Konzentration von 4 Millionen Zellen/ml in dreidimensionale (3D) Alginatbeads ausgesät. Hierfür mussten zunächst die 1,2%-ige Alginatlösung und die 102 mM Calciumchlorid-Lösung hergestellt und autoklaviert werden. Nach der Isolierung der Zellen mittels Trypsin-Behandlung aus den Zellkulturflaschen wurden die Zellen abzentrifugiert und mehrmals in PBS gewaschen. Die Zellzahl wurde mittels Trypanblaufärbung (2.2.1.7) bestimmt. Das der benötigten Zellzahl entsprechende Volumen der Zellsuspension wurde abzentrifugiert, das Zellpellet in der Alginatlösung sorgfältig resuspendiert, um eine möglichst gleichmäßige Zellverteilung in der Alginatmatrix zu gewährleisten und zugleich das Einbringen von Luftblasen zu vermeiden. Danach wurde die Alginat-Zellsuspension schrittweise mit Hilfe einer 1 ml-Spritze über eine 22G-Kanüle (0,7 mm) in die 102 mM $CaCl_2$-Lösung getropft, in der sich die Zell-Matrix-Suspension unter stetem Rühren zu tropfenförmigen Alginatbeads verfestigte. Die dabei entstandenen Beads hatten ein Volumen von ungefähr 10 µl und enthielten ca. 40000 Zellen. Die Beads wurden mindestens 10 min in der $CaCl_2$-Lösung bis zur vollständigen Polymerisierung inkubiert und danach über ein Nylonsieb (Porengröße: 40 µm) von der $CaCl_2$-Lösung abgetrennt. Anschließend wurden die Beads mehrmals in PBS bzw. Medium gewaschen, bevor sie in sterile Petrischalen oder 6 *Well*-Platten mit Expansionsmedium (2.1.2) überführt und 24 h im Brutschrank bei 37 °C, 6% O_2 und 8,5% CO_2 bis zur Variation der Umgebungsfaktoren (2.2.1.6) kultiviert wurden.

2.2.1.4 Aussaat der Zellen in Silikonschalen (Monolayer)

Für Dehnungsversuche im zweidimensionalen (2D) Monolayer wurden die Silikonschalen (Abbildung 7a) mindestens eine Woche lang mit FCS-haltigem Medium (10%) präinkubiert. Vor der Aussaat der Anuluszellen wurden die Schalen mit sterilem PBS (5 ml/Schale) gespült. Nach der Isolierung der Zellen mittels Trypsin-Behandlung aus den

Zellkulturflaschen wurden die Zellen abzentrifugiert (1000 Upm, 6 min bei allen nachfolgenden Zentrifugationsschritten, wenn nicht anders angegeben), das Zellpellet in PBS resuspendiert und die Zellzahl mittels Trypanblaufärbung (2.2.1.7) bestimmt. Pro Schale wurden bei Monolayerkulturen 300000 Zellen ausgesät. Das der benötigten Zellzahl entsprechende Volumen der Zellsuspension wurde abzentrifugiert, das Zellpellet in Expansionsmedium (2.1.2) sorgfältig resuspendiert und die Zellsuspension in die Silikonschalen pipettiert (5 ml/Schale). Danach wurden die Zellen in den Silikonschalen 3-4 Tage bis zur vollständigen Konfluenz im Brutschrank bei 37 °C, 6% O_2 und 8,5% CO_2 kultiviert, bevor die Umgebungsbedingungen variiert wurden (2.2.1.6).

2.2.1.5 Aussaat der Zellen in Kollagen-Typ-I-Gele

Für Dehnungsversuche mit Anuluszellen in 3D-Kollagen-Typ-I-Gelen wurden sterile Silikonschalen mit Noppen (Abbildung 7b) verwendet, für Druckversuche mit Nukleuszellen in Kollagen-Typ-I-Gelen wurden 6 *Well*-Platten verwendet [132]. Pro Noppenschale bzw. *Well* wurden bei Gelkulturen 900000 Zellen in 3 ml Gelmatrix (3 mg Kollagen-Typ-I/ml) ausgesät. Nach der Isolierung der Zellen mittels Trypsin-Behandlung aus den Zellkulturflaschen wurden die Zellen abzentrifugiert, das Zellpellet in PBS resuspendiert und die Zellzahl mittels Trypanblaufärbung (2.2.1.7) bestimmt. Das der benötigten Zellzahl entsprechende Volumen der Zellsuspension wurde abzentrifugiert und das Zellpellet bei Versuchen zur Variation der extrazellulären Osmolarität in Neutralisationslösung und FCS (20%) resuspendiert. Zur Zellsuspension wurde das gleiche Volumen der Kollagen-Typ-I-Gellösung dazu pipettiert und gleichzeitig sorgfältig gemischt, um eine möglichst gleichmäßige Zellverteilung in der Gelmatrix zu gewährleisten und zugleich das Einbringen von Luftblasen zu vermeiden. Außerdem war hierbei zu beachten, dass die Kollagen-Typ-I-Gellösung gut gekühlt sein musste und die Arbeitsschritte zügig durchgeführt werden mussten, um eine vorzeitige Polymerisierung des Gels zu verhindern. Nach Aussaat der Gel-Zellsuspension in die Noppenschalen wurden diese 20-30 min im Brutschrank inkubiert, bis die Polymerisierung des Gels erfolgt war. Danach wurden die Gele mit jeweils 2 ml Expansionsmedium (2.1.2) pro Schale überschichtet. Bei Versuchen zur Variation der Glucosekonzentration wurden zunächst die drei verschiedenen Gel-Medien hergestellt: Für 0 mM Glucose (G0) wurde FCS-haltiges (1,25%), glucosefreies DMEM (F0405) mit Neutralisationslösung (20%) versetzt, für 0,5 mM Glucose (G1) wurde glucosehaltiges DMEM (90% F0405, 10% F0415) hergestellt und dieses mit FCS (1,25%) und Neutralisationslösung (20%) gemischt, für 5 mM Glucose

(G2) wurde zum FCS-haltigen (1,25%), glucosehaltigen DMEM (F0415) Neutralisationslösung (20%) hinzugefügt. Das benötigte Volumen der Zellsuspension wurde auf drei Ansätze verteilt und abzentrifugiert, das Zellpellet wurde anschließend im jeweiligen Medium (G0, G1, G2) resuspendiert. Zur Zellsuspension wurde das gleiche Volumen der Kollagen-Typ-I-Gellösung dazu pipettiert und gleichzeitig sorgfältig gemischt. Nach Aussaat der Gel-Zellsuspension in die Noppenschalen wurden diese 20-30 min im Brutschrank inkubiert, bis die Polymerisierung des Gels erfolgt war. Danach wurden die Gele mit jeweils 2 ml G2-Glucosemedium (2.1.2, DMEM F0415 mit zusätzlich 5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,5% Fungizone) pro Schale überschichtet. Die Bandscheibenzellen wurden in den Kollagen-Typ-I-Gelen 3-4 Tage bei 37 °C, 6% O_2 und 8,5% CO_2 bis zur Variation der Umgebungsbedingungen (2.2.1.6) kultiviert.

2.2.1.6 Variation der Umgebungsbedingungen

Osmolarität

Da die extrazelluläre Osmolarität im Bandscheibengewebe in vivo hohen, vom Belastungszustand abhängigen Schwankungen unterliegt, wurden diese physiologischen Veränderungen zu Versuchszwecken durch Zugabe unterschiedlicher Volumina einer hochmolaren Salzlösung (5 M NaCl / 0,4 M KCl) im Medium simuliert. Mit Hilfe einer Konzentrationsreihe, deren Werte zuvor durch Messung am Osmometer (Osmomat O30) bestimmt wurden, konnte das Volumen zur Einstellung von 300 mOsm (hypoosmolar), 400 mOsm (isoosmolar) und 500 mOsm (hyperosmolar) ermittelt werden. Um den Einfluss der extrazellulären Osmolarität auf die Genexpression von Bandscheibenzellen sowohl unter mechanisch unbelasteten Bedingungen als auch bei mechanischer Belastung zu untersuchen, wurden die Zellen unter variierten osmotischen Bedingungen 24 Stunden vorkultiviert. Ein Teil der Zellen wurde anschließend mechanisch stimuliert, während die Kontrollansätze keinen zusätzlichen mechanischen Reiz erfuhren und nur der jeweiligen Osmolarität ausgesetzt waren. Die Kultivierung von Bandscheibenzellen in Alginatbeads und Kollagen-Typ-I-Gelen erfolgte mit serumfreiem Osmolaritätsmedium (2.1.2), während für Monolayerkulturen dem Osmolaritätsmedium 1% FCS beigesetzt wurde.

Glucose

Da das Bandscheibengewebe nicht durchblutet ist und die Nährstoffversorgung der Zellen ausschließlich über Diffusion erfolgt, ist die Glucosekonzentration niedriger als in anderen Geweben. Im degenerierten Bandscheibengewebe ist die Diffusion vermindert, wodurch die Glucosekonzentration weiter sinkt. Um den Einfluss der Glucoseversorgung auf die Genexpression von Bandscheibenzellen sowohl unter mechanisch unbelasteten Bedingungen als auch bei mechanischer Belastung zu untersuchen, wurden die Zellen unter variierten Glucosekonzentrationen 24 Stunden kultiviert. Dazu wurde sowohl glucosefreies Medium (0 mM Glucose) als auch Standardglucosemedium (enthält 1 g Glucose/L, entspricht 5 mM Glucose) sowie eine Mischung aus beiden Medien (90% glucosefreies Medium und 10% Standardglucosemedium, entspricht 0,5 mM Glucose) verwendet. Eine Glucosekonzentration von 0,5 mM gilt dabei als kritischer Wert, der für die Minimalversorgung der Bandscheibenzellen unerlässlich ist, während 5 mM Glucose eine hohe Nährstoffversorgung darstellt [20]; mit 0 mM Glucose wurde der Extremfall der Unterversorgung simuliert. Ein Teil der Zellen wurde anschließend mechanisch stimuliert, während die Kontrollansätze keinen zusätzlichen mechanischen Reiz erfuhren und nur der jeweiligen Glucosekonzentration ausgesetzt waren. Die Kultivierung von Bandscheibenzellen in Alginatbeads und Kollagen-Typ-I-Gelen erfolgte mit serumfreiem Glucosemedium (2.1.2), während für Monolayerkulturen dem Glucosemedium 1% FCS beigesetzt wurde. Da FCS zu einem bestimmten Anteil Glucose enthält, wurden die Versuche im Monolayer und in den serumhaltigen Kollagen-Typ-I-Gelen daher nicht unter absolut glucosefreien Bedingungen durchgeführt; dies muss bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden.

Sauerstoffpartialdruck

Da das Bandscheibengewebe nicht durchblutet ist, ist die Sauerstoffversorgung der Zellen in der gesunden Bandscheibe deutlich herabgesetzt, wobei im Zentrum des Nukleus pulposus eine geringere Sauerstoffkonzentration herrscht als im periphären Bereich des Anulus fibrosus. Im Verlauf der Bandscheibendegeneration konnte das Einsprossen von Blutgefäßen beobachtet werden [98], wodurch die Sauerstoffkonzentration im Bandscheibengewebe ansteigt. Um den Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Genexpression von Bandscheibenzellen sowohl unter mechanisch unbelasteten Bedingungen als auch bei mechanischer Belastung zu untersuchen, wurden die Zellen nach der Anzuchtphase in die Zelldehnungsgeräte eingespannt und bis zur mechanischen

Stimulation 24 Stunden unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen präinkubiert. Dazu wurden die Zellen in Brutschränken mit unterschiedlichem Sauerstoffanteil (1% O_2, 6% O_2 bzw. 21% O_2) kultiviert; die Sauerstoffreduktion wurde dabei durch Begasung mit Stickstoff erreicht. Ein Teil der Zellen wurde anschließend mechanisch stimuliert, während die Kontrollansätze keinen zusätzlichen mechanischen Reiz erfuhren und nur der jeweiligen Sauerstoffkonzentration ausgesetzt waren. Die Anzuchtphase und die Sauerstoffvariation erfolgten in Expansionsmedium (2.1.2), wobei aufgrund der Versuchsdauer ein Medienwechsel mit frischem Expansionsmedium durchgeführt wurde, bevor die Silikonschalen in die Zelldehnungsgeräte eingesetzt wurden.

pH-Wert

Aufgrund der Kalzifizierung der Endplatten im Verlauf der Bandscheibendegeneration ist die Diffusion und somit auch der Abtransport der Metabolite aus dem Gewebe verringert, so dass es infolge der Laktatbildung zu einer Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich kommt [161, 177]. Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Genexpression von Bandscheibenzellen sowohl unter mechanisch unbelasteten Bedingungen als auch bei mechanischer Belastung zu untersuchen, wurden die Zellen bei unterschiedlichen pH-Werten 24 Stunden vorkultiviert. Dazu wurde im Versuchsmedium (2.1.2) der pH mit 1 N Salzsäure eingestellt, das Medium sterilfiltriert und dann im Brutschrank präinkubiert. Der pH wurde mit 1 N Salzsäure auf den Sollwert nachjustiert, bevor die Zellen mit diesen Medien weitere 24 Stunden kultiviert wurden. Ein pH-Wert von 7,2 entspricht dabei den physiologischen Verhältnissen in der gesunden Bandscheibe, während ein pH-Wert von 6,8 einem geringen und ein pH von 6,5 einem höheren Degenerationsgrad des Bandscheibengewebes entspricht. Ein Teil der Zellen wurde anschließend mechanisch stimuliert, während die Kontrollansätze keinen zusätzlichen mechanischen Reiz erfuhren und nur der jeweiligen pH-Konzentration ausgesetzt waren.

2.2.1.7 Bestimmung der Zellviabilität

Trypanblaufärbung

Zur Ermittlung der Viabilität müssen lebende Zellen von toten Zellen unterschieden und deren genaue Zellzahlen bestimmt werden. Durch Zugabe von Trypanblau zur Zellsuspension konnte diese Unterscheidung optisch vorgenommen werden, da der Trypanblau-Farbstoff nicht durch die intakte Membran lebender Zellen eindringen kann, so dass nur tote und damit lysierte Zellen angefärbt wurden. Lebende Zellen erschienen dadurch hell, während tote Zellen blau gefärbt waren. Zur Zellzählung wurden jeweils gleiche Volumina Trypanblau und ein Aliquot der Zellsuspension gemischt (10 µl Trypanblau mit 10 µl der Zellsuspension) und sofort mit Hilfe einer Neubauerkammer am Mikroskop ausgezählt. Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurde folgende Gleichung verwendet: Zellzahl/ml = ∑gezählte Zellen : 4 (Anzahl der ausgezählten Quadrate) x 2 (Verdünnungsfaktor) x 10 000 (Kammerfaktor). Zur Berechnung der Gesamtzellzahl musste zusätzlich noch das Gesamtvolumen der Zellsuspension berücksichtigt werden. Die Viabilität errechnete sich nach folgender Gleichung: % lebende Zellen = Zahl lebender Zellen / Gesamtzellzahl (lebende + tote Zellen) x 100.

2.2.2 Mechanische Stimulation

Die Versuche zur Wechselwirkung ernährungsphysiologischer Faktoren und mechanischer Belastung auf Bandscheibenzellen wurden nach folgendem Versuchsschema (Abbildung 9) durchgeführt. Bandscheibenzellen aus dem Bereich des Nukleus pulposus wurden durch Applikation von zyklischem hydrostatischem Druck mechanisch stimuliert, Bandscheibenzellen aus dem Bereich des Anulus fibrosus wurden zyklischer Dehnung unterzogen. Je nach Kultursystem variierte die Anzuchtphase zwischen dem Tag der Aussaat und dem Tag, an dem durch einen vollständigen Medienwechsel die Umgebungsbedingungen verändert wurden. Bei Druckversuchen in Alginatbeads bzw. Kollagen-Typ-I-Gelen dauerte die Anzuchtphase 24 Stunden, wohingegen bei Dehnungsversuchen im Monolayer oder Kollagen-Typ-I-Gel die Adaptationsphase auf 3-4 Tage verlängert wurde, da sich diese Zeiträume in Vorversuchen im Hinblick auf die Viabilität der Zellen als positiv herausgestellt hatten.

2.2.2.1 Hydrostatischer Druck in Alginatbeads

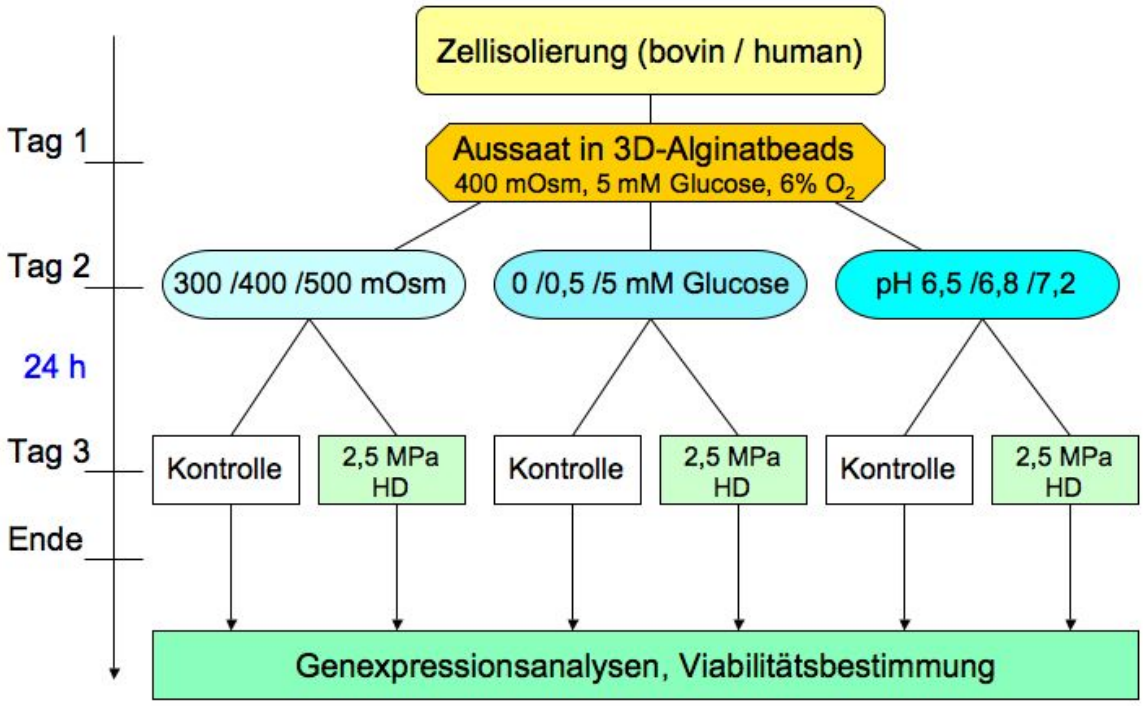


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Wechselwirkung ernährungsphysiologischer Faktoren (Osmolarität, Glucose, pH) und mechanischer Belastung (HD=zyklischer hydrostatischer Druck: 2,5 MPa, 30 Minuten, 0,1 Hz) auf Bandscheibenzellen in 3D-Alginatbeads. Analog dazu erfolgte die Versuchsdurchführung mit Bandscheibenzellen in 3D-Kollagen-Typ-I-Gelen im Kurzzeitversuch (Osmolarität, Glucose).

24 Stunden vor Stimulationsbeginn wurde je nach Versuchsplan eine Umgebungsbedingung (Osmolarität, Glucosekonzentration, pH) im Medium durch einen vollständigen Medienwechsel variiert. Hierfür wurde das Expansionsmedium entfernt, die Beads einmal mit PBS gewaschen und dann das jeweilige Versuchsmedium hinzugegeben. Um die Alginatbeads mechanisch stimulieren zu können, wurde die von Hutton et al. [80] beschriebene Methode modifiziert und an unsere Versuchsbedingungen angepasst (Abbildung 10). Nach der 24-stündigen Präinkubationsphase unter den veränderten Umgebungsbedingungen wurden die Alginatbeads in sterile 10 ml-Spritzen mit dem jeweiligen Medium überführt und die Spritzen möglichst luftblasenfrei verschlossen und mit Paraffinfilm abgedichtet. Die Stimulationsansätze wurden in eine speziell hierfür angefertigte druckstabile Kammer (Abbildung 11) eingebracht, die mit 37 °C warmem

Wasser luftblasenfrei befüllt war und in die Instronmaschine eingesetzt wurde. Anschließend wurde über einen Stempel ein zyklischer Druck von 2,5 MPa mit einer Frequenz von 0,1 Hz für die Dauer von 30 min appliziert. Die mechanisch unstimulierten Proben, die als Kontrollansätze dienten, verblieben während dieser Zeit im Brutschrank. Unmittelbar nach Ende der Stimulation wurden die Zellen aus den Alginatbeads durch Zugabe des Auflösungspuffers (28 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 8,0; Verhältnis 1:4, d.h. ein Bead + 30 µl Puffer) und Zentrifugation der Zellsuspension (1000 Upm, 6 min bzw. 10000 Upm, 30 s) isoliert, das Zellpellet wurde sofort in RLT-Puffer mit 2-Mercaptoethanol resuspendiert und bis zur RNA-Isolierung bei -80 °C eingefroren. Für einen späteren Abbruchzeitpunkt verblieben die Alginatbeads-Zellkulturen für weitere 24 Stunden in den Spritzen im Brutschrank bei 37 °C, 6% O_2 und 8,5% CO_2 und wurden dann zusammen mit den Kontrollansätzen isoliert.

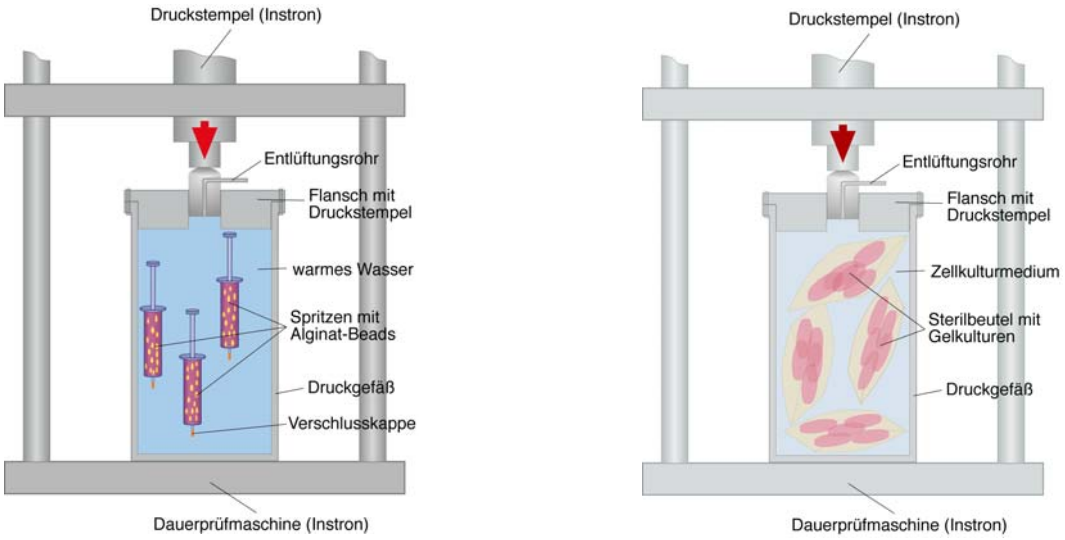


Abbildung 10: Schematische Darstellung der mechanischen Stimulation (zyklischer hydrostatischer Druck) von Bandscheibenzellen in Alginatbeads, die in Spritzen eingebracht wurden (a). Analog dazu erfolgte die Stimulation der Zellen in Kollagen-Typ-I-Gelen, die in sterile Beutel eingeschweißt wurden (b). (Zeichnungen von Patrizia Horny übernommen, Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm)

2.2.2.2 Hydrostatischer Druck in Kollagen-Typ-I-Gelen

24 Stunden vor Stimulationsbeginn wurde je nach Versuchsplan eine Umgebungsbedingung (Osmolarität, Glucosekonzentration) im Medium durch einen vollständigen Medienwechsel variiert. Hierfür wurde das Expansionsmedium entfernt und das jeweilige Versuchsmedium hinzugegeben. Nach der 24-stündigen Präinkubationsphase unter den veränderten Umgebungsbedingungen wurden die Kollagen-Typ-I-Gele in sterile Infusionsbeutel mit dem jeweiligen Medium überführt und möglichst luftblasenfrei eingeschweißt. Die Stimulationsansätze wurden wie bereits beschrieben [133] in eine speziell hierfür angefertigte Druckkammer mit 37 °C warmem Wasser eingebracht und in die Instronmaschine eingesetzt (Abbildung 11). Anschließend wurde über einen Stempel ein zyklischer Druck von 2,5 MPa mit einer Frequenz von 0,1 Hz für die Dauer von 30 min appliziert. Die mechanisch unstimulierten Kontrollansätze, die ebenfalls in Infusionsbeutel eingeschweißt wurden, verblieben während dieser Zeit im Brutschrank. Unmittelbar nach Ende der Stimulation wurden die Zellen in den Kollagen-Typ-I-Gelen in RLT-Puffer mit 2-Mercaptoethanol (1 ml Puffer pro Gel) mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bis zur RNA-Isolierung (2.2.3.1) eingefroren. Mit den Kontrollansätzen wurde analog verfahren.

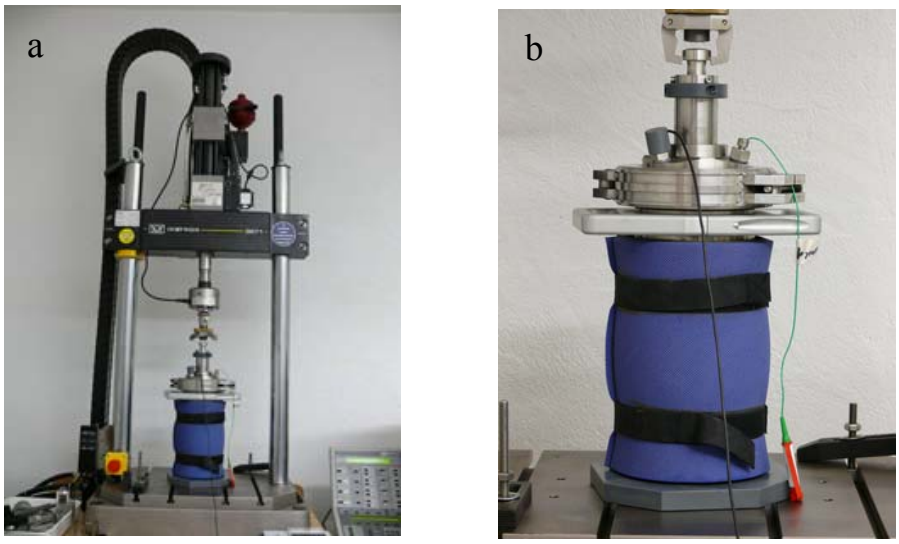


Abbildung 11: Instronmaschine zur Applikation von zyklischem hydrostatischem Druck auf die Zellen (a). Speziell angefertigte Druckkammer, in die die Zellen für die Dauer der Stimulation eingebracht wurden (b). (Fotos von Herbert Schmitt übernommen, Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm)

2.2.2.3 Zyklische Dehnung im Monolayer

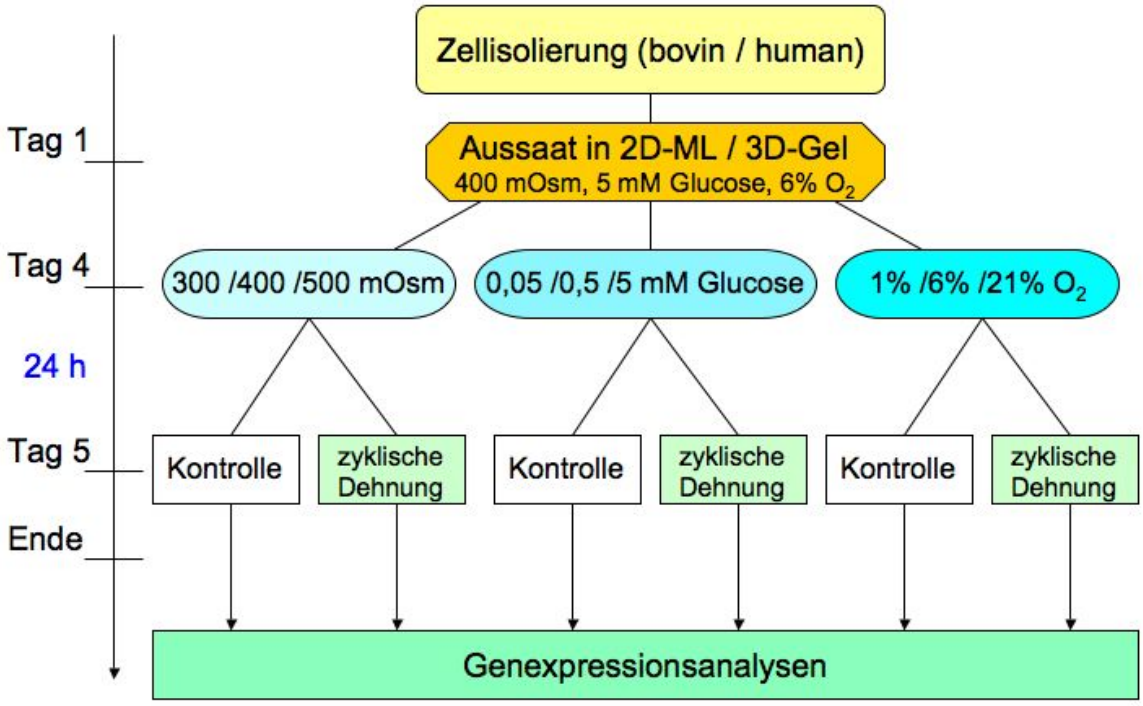


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Wechselwirkung ernährungsphysiologischer Faktoren (Osmolarität, Glucose, Sauerstoff) und mechanischer Belastung (zyklische Dehnung: 1% (ML) bzw. 4% (Gel), 1 Stunde, 1 Hz) auf Bandscheibenzellen im 2D-Monolayer (ML) oder in 3D-Kollagen-Typ-I-Gelen.

24 Stunden vor Stimulationsbeginn wurde je nach Versuchsplan ein Parameter (Osmolarität, Glucosekonzentration) im Medium durch einen vollständigen Medienwechsel variiert. Hierfür wurde das Expansionsmedium entfernt und das jeweilige Versuchsmedium zu den Monolayerkulturen hinzugegeben. Nach der 24-stündigen Präinkubationsphase unter den veränderten Umgebungsbedingungen wurden die zellbesiedelten Silikonschalen in die Stimulationsgeräte eingesetzt und vorgespannt. Die Stimulationsgeräte wurden in den Brutschrank eingebracht, so dass die Zellen während der Stimulationsphase bei 37 °C, 6% O_2 und 8,5% CO_2 kultiviert wurden. Um den Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Genexpression zu untersuchen, wurde der Sauerstoffgehalt im Brutschrank entweder bei atmosphärischer Sauerstoffkonzentration (21% O_2) belassen oder durch Zuleitung von Stickstoff reduziert. Für die Sauerstoffversuche wurden die

zellbesiedelten Silikonschalen bereits vor der 24-stündigen Präinkubationsphase in die Stimulationsgeräte eingespannt und in den jeweiligen Brutschrank eingebracht, um eine Veränderung der Sauerstoffkonzentration unter mechanischer Belastung zu vermeiden. Anschließend wurde über eine motorbetriebene Steuereinheit (Abbildung 6) eine zyklische Dehnung von 1% mit einer Frequenz von 1 Hz für die Dauer von 1 Stunde appliziert. Der mechanische Reiz wurde dabei durch Dehnung der Silikonschalen in ihrer Längsachse auf die an der Schalengrundfläche adhärent wachsenden Zellen übertragen. Die mechanisch unstimulierten Kontrollansätze verblieben während dieser Zeit ebenfalls im Brutschrank. Unmittelbar nach Ende der Stimulation wurde die Vorspannung gelöst und die Schalen aus den Stimulationsgeräten vorsichtig herausgenommen. Das Versuchsmedium wurde entfernt bzw. zur weiteren Analyse gesammelt. Die Zellen wurden einmal mit PBS (5 ml/Schale) gewaschen und danach mit Hilfe eines Zellschabers in RLT-Puffer mit 2-Mercaptoethanol aufgenommen und bis zur RNA-Isolierung (2.2.3.1) bei -80 °C eingefroren. Mit den Kontrollproben wurde analog verfahren.

2.2.2.4 Zyklische Dehnung in Kollagen-Typ-I-Gelen

24 Stunden vor Stimulationsbeginn wurde je nach Versuchsplan ein Parameter (Osmolarität, Glucosekonzentration) im Medium durch einen vollständigen Medienwechsel variiert. Hierfür wurde das Expansionsmedium entfernt und das jeweilige Versuchsmedium zu den Kollagen-Typ-I-Gelkulturen hinzugegeben. Nach der 24-stündigen Präinkubationsphase unter den veränderten Umgebungsbedingungen wurden die Silikonschalen in die Stimulationsgeräte (2.1.8) eingesetzt und vorgespannt. Die Stimulationsgeräte wurden in den Brutschrank eingebracht, so dass die Zellen in den Kollagen-Typ-I-Gelen während der Stimulationsphase bei 37 °C, 6% O_2 und 8,5% CO_2 kultiviert wurden. Um den Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Genexpression zu untersuchen, wurde der Sauerstoffgehalt im Brutschrank entweder bei atmosphärischer Sauerstoffkonzentration (21% O_2) belassen oder durch Zuleitung von Stickstoff reduziert. Für die Sauerstoffversuche wurden die zellbesiedelten Silikonschalen bereits vor der 24-stündigen Präinkubationsphase in die Stimulationsgeräte eingespannt und in den jeweiligen Brutschrank eingebracht, um eine Veränderung der Sauerstoffkonzentration unter mechanischer Belastung zu vermeiden. Anschließend wurde über eine motorbetriebene Steuereinheit (Abbildung 6) eine zyklische Dehnung von 4% mit einer Frequenz von 1 Hz für die Dauer von 1 Stunde appliziert. Der mechanische Reiz wurde dabei über insgesamt sechs auf jeder Schalengrundfläche angebrachten Noppen (jeweils drei Noppen auf einer

Seite), zwischen denen das zellbesiedelte Kollagen-Typ-I-Gel aufgespannt war, von der Schale auf die Zellen übertragen. Die mechanisch unstimulierten Kontrollansätze verblieben während dieser Zeit ebenfalls im Brutschrank. Unmittelbar nach Ende der Stimulation wurde die Vorspannung gelöst und die Silikonschalen aus den Stimulationsgeräten vorsichtig herausgenommen. Die Kollagen-Typ-I-Gele wurden in RLT-Puffer mit 2-Mercaptoethanol (1 ml Puffer pro Gel) überführt und sofort mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die Proben bis zur RNA-Isolierung (2.2.3.1) bei -80 °C eingefroren. Mit den Kontrollansätzen wurden analog verfahren.

2.2.3 Auswertungen

2.2.3.1 Genexpressionsanalyse

Um Veränderungen in der Menge der mRNA nach mechanischer Stimulation bzw. Variation der Umgebungsbedingungen zu bestimmen, wurde die Gesamt-RNA der Proben aus den Zellen isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Mit diesen cDNA-Proben wurden quantitative *Real-Time* RT-PCR-Analysen durchgeführt. Für den Nachweis der Genexpression wurden für jedes Zielgen spezifische Oligonukleotide (Primer) auf Basis publizierter Sequenzen (PubMed Datenbank) mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms (Primer3 V.04.0, Whitehead Institute for Biomedical Research, USA) entworfen. Diese Primer wurden in der *Real-Time* RT-PCR eingesetzt, um das jeweilige Zielgen zu amplifizieren. Die Expression des jeweiligen Zielgens wurde dabei mit Hilfe einer Standardkurve, die anhand von Proben bekannter DNA-Konzentrationen erstellt wurde, quantifiziert. Die so quantifizierte Expression des Zielgens wurde auf die analog ermittelte Expression des *Housekeeping*-Gens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) normiert. Für die Erstellung einer Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit der Plasmid-DNA, welche die zu amplifizierende Sequenz des jeweiligen Zielgens enthielt, in Zehnerpotenzen mit einer Startkonzentration von 1 µg in 10 µl hergestellt. Die Plasmid-DNA wurde durch Klonierung der gewünschten Zielgensequenz in einen pCR4-TOPO-Vektor, anschließende Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien, Vermehrung und nach Isolierung und enzymatischer Linearisierung erhalten. Zusätzlich wurde eine Sequenzanalyse der Plasmid-DNA durchgeführt, um die Übereinstimmung der einklonierten Zielgensequenz mit bekannten Datenbanksequenzen zu bestätigen.

Gesamt-RNA-Isolierung

Die Zellen wurden bei Versuchsabbrüchen aus Monolayerkulturen einmal mit PBS gewaschen und dann mittels eines Zellschabers in RLT-Puffer mit 2-Mercaptoethanol aufgenommen und eingefroren. Die Alginatbeads wurden zunächst mit Auflösungspuffer (28 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 8,0) in einem Volumenverhältnis von 1:4 versetzt, wobei ein Bead ein Volumen von etwa 10 µl aufweist und somit pro Bead 30 µl Auflösungspuffer hinzugefügt werden müssen, die Zellsuspension wurde nach Auflösung der Alginatmatrix abzentrifugiert (1000 Upm, 6 min bzw. 10000 Upm, 30 s) und das Zellpellet in RLT-Puffer mit 2-Mercaptoethanol resuspendiert und eingefroren. Die Kollagen-Typ-I-Gele wurden sofort in RLT-Puffer mit 2-Mercaptoethanol (1 ml Puffer pro Gel) aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Aufarbeitung der RNA aus Monolayer- und Alginatbeadsproben erfolgte bei Raumtemperatur mit Hilfe des RNeasy Mini-Kit nach den Anweisungen des Herstellers. Die Zellen wurden zunächst mit Hilfe einer Qia Shredder-Säule lysiert, die Zelllysate wurden anschließend für die Affinitätsbindung an die Silica-Gel-Membranen der RNeasy-Affinitäts-Säulen mit dem gleichen Probenvolumen an 70%-igem Ethanol versetzt. Nach einer 15-minütigen DNase-Inkubation und mehreren Waschschritten wurde die Gesamt-RNA mit RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert, die Quantität und die Qualität der RNA bei 260 nm/280 nm photometrisch bestimmt und die RNA anschließend bei -80 °C gelagert. Für die Aufarbeitung der RNA aus Kollagen-Typ-I-Gelen mussten diese nach der Schockfrierung in flüssigem Stickstoff zunächst mindestens 10 min lang im 37 °C Wasserbad unter Schütteln inkubiert und dann mit Hilfe von 0,9 mm Kanülen und 3 ml-Spritzen durch mehrfaches Aufziehen homogenisiert werden. Die Homogenate wurden danach 13 min bei 2000 Upm zentrifugiert, der Überstand gesammelt und bei RT gelagert. Das Gel-Zellpellet wurde mit einer Enzymlösung (2 mg/ml Kollagenase 1, 0,6 mg/ml Protease mit H_2O ad 500 µl pro Gel) versetzt und bis zur vollständigen Auflösung im 37 °C Wasserbad unter Schütteln inkubiert, danach erneut zentrifugiert (10-15 min bei 4000 Upm). Das Pellet wurde verworfen und der Überstand mit dem anderen Überstand der jeweiligen Probe vereint. Danach wurde dieser Gesamt-Überstand mit einem halben Probenvolumen an 100%-igem Ethanol versetzt und sorgfältig gemischt, bevor die Proben mit Hilfe einer Vakuumpumpe auf die RNeasy-Affinitäts-Säulen aufgebracht wurden. Nach Bindung des gesamten Probenvolumens an die Säulenmatrix erfolgten die weiteren Schritte nach Angaben des Herstellers bei Raumtemperatur. Im Anschluss an die Elution wurden die

Quantität und die Qualität der RNA bei 260 nm/280 nm photometrisch bestimmt und die RNA anschließend bei -80 °C gelagert.

cDNA-Synthese

Zur Untersuchung der Expression von Genen mittels PCR wurde die mRNA als Matrize für die Synthese einer komplementären DNA (cDNA) benutzt, da diese gegenüber einem Abbau in Lösung stabiler ist als die mRNA. Für die Synthese wurde das Enzym Reverse Transkriptase verwendet, welches eine RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität besitzt. Oligo-dT-Primer und Random-Hexamer-Primer dienten als Startpunkt für die cDNA-Synthese. Für die Synthese von cDNA aus 1 µg RNA in einem 20 µl-Ansatz wurde der Omniscript-Kit verwendet. Zuerst wurde die RNA-Lösung (1 µg RNA in RNase-freiem Aqua dest.) mit Wasser auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt und dann 5 min bei 65 °C im PCR-Gerät denaturiert. Zum Reaktionsansatz wurden 2 µl Reaktionspuffer (zehnfache Konzentration), 2 µl dNTPs (5 mM), 1 µl RNase Inhibitor (1:4 Verdünnung mit einfachem Reaktionspuffer: 10 U/µl; Stammlösung: 40 U/µl), 1 µl Oligo-dT-Primer (0,1 mM), 1 µl Random-Hexamer-Primer (1 mM) und 1 µl Omniscript (4 U) pipettiert und sorgfältig gemischt. Die cDNA Synthese erfolgte im PCR-Gerät zuerst 60 min bei 37 °C, dann weitere 60 min bei 42 °C.

Standard-PCR

Die Standard-Polymerase-Kettenreaktion diente der semiquantitativen Messung der Expression eines Zielgens und der Amplifikation von Zielgensequenzen als Ausgangspunkt für Klonierungsreaktionen. Für die Synthese wurde der HotStarTaq Master Mix-Kit nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Dazu wurden cDNA (ca. 100 ng), Primer-Mix (0,5 µM) und 10 µl PCR-Mix zusammenpipettiert, mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und in das PCR-Gerät eingesetzt. Das PCR-Protokoll des Gerätes 1 (Robocycler) startete mit einer initialen Enzymaktivierung von 14 min bei 95 °C, darauf folgten 32 Zyklen mit den Schritten Denaturierung von 1 min bei 94 °C, Primer-Annealing von 45 s bei 60 °C und einer Elongation von 1 min bei 72 °C, abschließend wurde eine finale Extension für 20 min bei 72 °C durchgeführt. Das PCR-Protokoll des Gerätes 2 (Biometra Thermocycler) startete mit einer initialen Enzymaktivierung von 15 min bei 95 °C, darauf folgten 32 Zyklen mit den Schritten Denaturierung von 1 min bei 95 °C, Primer-Annealing von 45 s bei 60 °C und einer

Elongation von 1 min bei 72 °C, abschließend wurde eine finale Extension für 15 min bei 72 °C durchgeführt.

Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, mit der negativ geladene DNA-Moleküle durch Anlegen eines elektrischen Feldes nach ihrer Größe aufgetrennt werden können.
In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet, um Produkte der Standard-PCR, der *Real-Time* RT-PCR und aufgereinigte Plasmid-DNA auf ihre Größe und Reinheit zu überprüfen. Für PCR-Produkte, deren Größe zwischen 80 und 250 bp lag, wurde ein 2%-iges Agarose-Gel hergestellt, die ca. 4000 bp große Plasmid-DNA wurde in einem 1%-igen Agarose-Gel untersucht. Dafür wurden 2 g bzw. 1 g Agarose abgewogen und mit 100 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle für 3 min erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach einem ersten Abkühlen der Agarose-Lösung wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugegeben. Die Agarose wurde dann nach Einsetzen des gewünschten Gelkamms luftblasenfrei in den Gelschlitten gegossen. Nach vollständigem Gelieren wurde der Gelkamm entfernt und der Gelschlitten mit dem Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt, die Elektrophoresekammer wurde mit TAE-Puffer befüllt, so dass das Gel vollständig mit TAE-Puffer bedeckt war. Die Proben wurden mit sechsfachem Gel-Ladepuffer versetzt und nach vorsichtigem Auftragen von 10 µl Probenvolumen in die Geltaschen bei Elektrophoresebedingungen von 110 V für 30–60 min aufgetrennt. Die DNA-Banden konnten unter UV-Licht mit einem Geldokumentationsgerät detektiert werden. Für die semiquantitative Quantifizierung wurde ein Bild des Agarose-Gels abgespeichert und mit Hilfe der Gel Doc 2000 Software (Gel-Dokumentationssystem, BIO-RAD) ausgewertet.

Real-Time RT-PCR

Das Prinzip der *Real-Time* RT-PCR beruht auf der Quantifizierung des PCR-Produktes über die mit der Menge des PCR-Produktes proportionalen Zunahme des DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs (SYBR Green) während der einzelnen PCR-Zyklen. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Standard-DNA, die zusammen mit den zu untersuchenden Proben amplifiziert wurde. Um die Konzentration der Zielgen-DNA in den Proben zu bestimmen, wurde diese stets auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH normiert.
Für die Auswertung mittels *Real-Time* RT-PCR wurde der Platinum SYBR Green Supermix-Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach Mischen der Mastermix-

Lösung wurden 23 µl des Mastermixes pro *Well* vorgelegt und 2 µl der bis zu 1:10 verdünnten unbekannten cDNA-Probe, Standard-cDNA oder Aqua dest. hinzupipettiert, wobei alle Proben in Doppelbestimmungen und die Standard-cDNA in Dreifachbestimmungen aufgetragen wurden. Für die *Real-Time* RT-PCR im iCycler wurde das in Tabelle 5 beschriebene Protokoll eingesetzt.

Tabelle 5: Ablauf der quantitativen DNA-Messungen mittels Real-Time RT-PCR (iCycler).

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
1. initiale Denaturierung	1	95 °C	2 min
2. Denaturierung/ Annealing/	38	95 °C	30 s
Elongation		60 °C	50 s
3. terminale Denaturierung	1	95 °C	1 min
4. terminale Elongation	1	60 °C	1 min
5. Erstellung der Schmelzkurve	76	60 °C	8 s
6. Ende		15 °C	Ende

Housekeeping-Gen

Um zu untersuchen, ob es sich bei der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) um ein geeignetes, nicht mechanosensitives *Housekeeping*-Gen handelt, wurden die Expressionsdaten der Zielgene zum Vergleich zusätzlich auf ein alternatives *Housekeeping*-Gen (L30) bezogen.

Die Genexpressionsdaten wurden aus drei unabhängigen Experimenten gewonnen. Dazu wurden bovine Nukleuszellen in Alginatbeads unter Variation der extrazellulären Osmolarität bzw. der Glucosekonzentration kultiviert und anschließend mittels zyklischem hydrostatischem Druck mechanisch stimuliert. Unmittelbar nach Stimulationsende wurde die Genexpression analysiert.

Bei der Auswertung der Daten wurde der Quotient aus quantitativer Expression des Zielgens und quantitativer Genexpression von GAPDH bzw. L30 gebildet. Dabei handelt es sich um zwei konstitutiv exprimierte *Housekeeping*-Gene, wobei L30 für eine ribosomale Untereinheit kodiert. Die so normierten Werte der Stimulationsansätze wurden auf die ebenso normierten jeweiligen Kontrollen bezogen; anschließend wurden die Werte dieser Quotienten miteinander verglichen.

Der Vergleich der Expressionswerte aus dem Verhältnis von Stimulation und Kontrolle in Bezug auf das jeweilige *Housekeeping*-Gen zeigte, dass keine großen Unterschiede zwischen den beiden *Housekeeping*-Genen GAPDH und L30 feststellbar waren; es konnte

eine sehr gute Übereinstimmung der Werte (Standardabweichung < 20%) ermittelt werden, so dass in den weiteren Versuchen die Expressionsdaten der Zielgene nur auf GAPDH als *Housekeeping*-Gen bezogen wurden.

Herstellung der Standard-DNA für die *Real-Time* RT-PCR

Mit Hilfe des TOPO TA Cloning-Kit wurde die cDNA der einzelnen Zielgene, die mit Hilfe spezifischer Primerpaare durch PCR amplifiziert wurde, in einen Plasmid-Vektor (pCR4-TOPO) eingefügt. Die isolierte Plasmid-Vektor-DNA konnte dann als Standard für die *Real-Time* RT-PCR verwendet werden. Das Plasmid, in das das spezifische Amplifikationsprodukt kloniert wurde, enthielt ein Ampicillin-Resistenzgen. Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, wurden gegen Ampicillin resistent und konnten auf ampicillinhaltigem Nährboden wachsen. Die Plasmid-DNA der positiven Klone wurde nach ihrer Vermehrung und Isolierung mittels Sequenzanalyse durch die Firma GATC Biotech in Konstanz kontrolliert. Anschließend wurde das Plasmid durch ein spezifisches Restriktionsenzym, welches das enthaltene Insert nicht schneidet, linearisiert und als Standard in einem Konzentrationsbereich von 0,0001-100000 pg/µl für die *Real-Time* RT-PCR eingesetzt.

Herstellung der Agar-Platten und des LB-Mediums

Für die Herstellung des LB-Mediums wurden 25 g Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base) mit 1 L destilliertes Wasser (pH 7,0) gemischt und autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums wurde das Antibiotikum (50 µg/ml) zur selektiven Anreicherung der Ampicillin-resistenten Bakterienklone zugegeben. Für die Herstellung der Agarplatten wurde zu dem gleichen Ansatz noch Bacto-Agar (15 g/L) zugegeben, und der warme, noch flüssige Agar wurde unter der Sterilbank in sterile Petrischalen gegossen, die bis zur vollständigen Gelierung und Trocknung leicht geöffnet blieben.

Klonierungsreaktion und Transformation der Bakterien

Für jeden Ansatz wurde das entsprechende PCR-Produkt nach Angaben des Herstellers in den pCR4-TOPO-Vektor kloniert. Pro Ansatz wurde 1 µl PCR-Produkt, 1 µl TOPO-Vektor (pCR 4-TOPO), 1 µl Salzlösung und 2 µl steriles Wasser zu einem Reaktionsansatz zusammenpipettiert und vorsichtig gemischt. Danach erfolgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Für die sich anschließende Transformation wurde der Reaktionsansatz auf Eis gestellt oder über Nacht bei -20 °C gelagert. Die Transformation

des kompetenten *E. coli* Bakterienstammes (Top10 One Shot Chemical Competent *E.coli*) erfolgte ebenfalls nach dem Protokoll des Herstellers. Für die Transformation wurde der kompetente *E. coli* Bakterienstamm vorsichtig auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2 µl des Transformationsansatzes zu dem Bakterienstamm und vorsichtigem Mischen erfolgte die Transformation der Zellen mittels Hitzeschock für 30-45 Sekunden bei 42 °C im Heizblock. Der Ansatz wurde anschließend sofort auf Eis überführt und mit 250 µl SOC-Medium für 1 h bei 37 °C und 200 Upm geschüttelt. Danach wurden 50 µl und 200 µl der transformierten Bakterien auf vorgewärmten, ampicillinhaltigen LB-Agar-Platten mit einem sterilen Drigalskispatel ausplattiert. Die Ansätze wurden im Wärmeschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Bakterienkultur

Die erfolgreich transformierten Bakterien wurden weiter vermehrt, indem von jeder LB-Platte eine Kolonie gepickt und in ein Röhrchen mit 5 ml LB-Medium überführt wurde. Die Kulturen wurden für ca. 8 h bei 37 °C und 250 Upm geschüttelt. Um die Klonierung zu überprüfen, wurde mit den zugehörigen Primerpaaren eine Standard-PCR mit 1 µl Bakteriensuspension durchgeführt und das Reaktionsprodukt auf einem Agarosegel aufgetrennt. Positive Vorkulturen wurden in 100 ml LB-Medium in Erlenmeyerkolben überführt und für 12-16 h bei 37 °C und 250 Upm inkubiert. Aus diesen Bakterien wurde anschließend die Plasmid-DNA isoliert.

Isolierung der Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmide erfolgte mit Hilfe des Plasmid Midi-Kits nach Protokoll des Herstellers mit Hilfe der Affinitätsbindung über eine Säule. Die Bakterienkulturen wurden abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Bakterien mit dem Puffersystem des Herstellers resuspendiert, lysiert und neutralisiert. Das Lysat wurde filtriert und die Plasmid-DNA an Affinitätssäulen gebunden. Nach einem Waschschritt wurde die DNA eluiert und mit Isopropanol präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde in Aqua dest. aufgenommen. Zur Quantifizierung und Überprüfung der Reinheit wurde die erhaltene DNA im Photometer bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die isolierte Plasmid-DNA wurde auf das enthaltene Insert durch eine Standard-PCR und Sequenzierung (GATC, Konstanz) überprüft. Zusätzlich wurde die Funktionalität der Standards für die *Real-Time* RT-PCR im iCycler überprüft.

Linearisierung des Plasmids

Für die Verwendung der Plasmid-DNA als Standardreihe in der *Real-Time* RT-PCR musste die Plasmid-DNA zuvor mittels geeigneter Restriktionsenzyme linearisiert werden. Die Restriktionsenzyme wurden dabei so ausgewählt, dass das Insert nicht zerschnitten wurde. Für die Restriktion wurden 10 µg Plasmid-DNA mit 2 µl Restriktionsenzym (10 U/µl), und 2 µl Reaktionspuffer (zehnfach) gemischt und mit H_2O auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und das Enzym für weitere 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Von diesem Ansatz wurden Verdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 0,0001-100000 pg/µl erstellt, welche dann als Standardreihe für die *Real-Time* RT-PCR dienten.

2.2.3.2 Proteinanalyse

Um zu überprüfen, ob Veränderungen in der Genexpression auch auf Proteinebene nach Variation der Umgebungsbedingungen nachweisbar sind, wurden Überstände der Proben gesammelt und analysiert.

Glykosaminoglykan-Assay (GAG-Assay)

Mit Hilfe des Glykosaminoglykan-Assays können durch Bindung eines Farbstoffes (1,9-Dimethylmethylenblau) an sulfatierte Glykosaminoglykane (GAG) und Proteoglykane (PG) wie beispielsweise Aggrecan diese in Proben nachgewiesen und spektrophotometrisch quantifiziert werden. Die zu analysierenden Überstände mussten zunächst durch Zentrifugation von Zelldebris (2000 Upm, 6 min) befreit und mit speziellen Zentrifugenröhrchen (Amicon Ultra, Millipore) aufkonzentriert werden (15 min bei 7500 × g, 4 °C, Volumen < 4 ml). Bei ausreichender Proteinkonzentration konnten die Proben mit dem jeweiligen Medium verdünnt werden. Es wurde eine Standardreihe mit der im Kit enthaltenen GAG-Stammlösung pipettiert. Von jeder Probe und jeder Standardkonzentration wurden Doppelbestimmungen gemessen, die Durchführung des GAG-Assays erfolgte in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen und bei Raumtemperatur. Zu jeder Probe und jedem Standard wurde 1 ml Farbstofflösung (Blyscan Dye Reagent) pipettiert und die Proben 30 min im Thermomixer geschüttelt (11 × 100 min^{-1}), danach 10 min zentrifugiert (13000 × g) und die Überstände vorsichtig dekantiert, eventuell vorhandene Restflüssigkeit wurde mit einer Pipette entfernt, um das Pellet möglichst trocken zurückbehalten. Dann wurde das Pellet in 1 ml Dissoziationlösung (Blyscan Dissociation Reagent) resuspendiert und die Proben erneut 10 min im Thermomixer geschüttelt

(11×100 min^{-1}), bevor jeweils 200 µl von jeder Probe in die *Wells* einer 96 *Well*-Platte pipettiert und bei 656 nm gemessen wurden. Mit Hilfe der Standardkurve konnte dann die Proteoglykankonzentration in den einzelnen Proben bestimmt werden.

2.2.3.3 Statistik

Die mittels *Real-Time* RT-PCR bestimmten Expressionswerte der Zielgene wurden jeweils auf die Expression des *Housekeeping*-Gens GAPDH normiert.

Um den Einfluss der Variation von Umgebungsfaktoren (Osmolarität, Glucose, Sauerstoff, pH) auf die Genexpression zu ermitteln, wurden nur die Genexpressionsdaten der mechanisch unbelasteten Proben verwendet. Die Genexpressionswerte bei veränderten Umgebungsbedingungen wurden auf die Genexpressionswerte bei der jeweiligen physiologischen Bedingung bezogen.

Um mechanisch induzierte Effekte nachzuweisen, wurden die Genexpressionswerte der mechanisch stimulierten Ansätze auf die Werte der entsprechenden mechanisch unbelasteten Kontrollkulturen bezogen. Dieser Quotient aus mechanischer Stimulation und dazugehöriger Kontrolle wurde für die jeweilige Umgebungsbedingung gebildet.

Um zu beurteilen, ob die Reaktion der Bandscheibenzellen auf mechanische Belastung von der Umgebungsbedingung beeinflusst wird, wurden die Werte bei veränderten Umgebungsbedingungen auf den Wert bei der jeweiligen physiologischen Standardbedingung bezogen.

Zur statistischen Überprüfung mechanisch induzierter Effekte bzw. des Effekts der Variation von Umgebungsfaktoren (Osmolarität, Glucose, Sauerstoff, pH) auf die Genexpression der Bandscheibenzellen wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummen-Test angewendet. Dabei handelt es sich um ein nicht-parametrisches Verfahren, das für nicht normalverteilte, gepaarte Variablen und kleine Stichproben ($n \geq 6$) geeignet ist.

Die Nullhypothese nahm den Wert eins an, falls kein Unterschied in der Genexpression von mechanisch stimulierten Ansätzen und mechanisch unbelasteten Kontrollansätzen bzw. von variierten Umgebungsbedingungen gegenüber der Standardbedingung vorhanden war. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt, d.h. bei einem p-Wert von $< 0{,}05$ wurde die Nullhypothese abgelehnt und somit ein statistisch signifikanter Effekt aufgrund des mechanischen Reizes bzw. der Umgebungsvariation festgestellt.

Um Unterschiede zwischen zwei verschiedenen Versuchsbedingungen zu ermitteln, wie zum Beispiel zwischen zwei unterschiedlichen Osmolaritäten, wurde ein nicht-parametrischer Gruppenvergleich (Wilcoxon 2-Sample Test) durchgeführt. Das

Signifikanzniveau wurde ebenfalls auf 5% festgelegt, d.h. bei einem p-Wert von $< 0,05$ wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt.

Zur Gewinnung der Daten wurden entweder sechs unabhängige Experimente mit einzelnen Spendern durchgeführt oder ein bis zwei Experimente mit mehreren Parallelansätzen gepoolter Spender.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei ausreichender Probenanzahl ($n \geq 6$) die Ergebnisse als Boxplot-Diagramm mit Maximum, dem Bereich vom 75. Perzentil zum 25. Perzentil, dem Median und dem Minimum dargestellt. Aufgrund der hohen Spendervariabilität humaner Proben wurden bei geringer Probenanzahl ($n \leq 5$) die Genexpressionsdaten individuell dargestellt und nicht statistisch ausgewertet.

In den Diagrammen wurden statistisch signifikante Ergebnisse jeweils mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Variation der Osmolarität

Bandscheibenzellen sind sowohl tageszeitlichen, vom Belastungszustand abhängigen Schwankungen der Osmolarität als auch einer degenerationsbedingten Veränderung der Osmolarität ausgesetzt. Um den Einfluss der extrazellulären Osmolarität auf den Metabolismus von Bandscheibenzellen zu untersuchen, wurden verschiedene Osmolaritäten (300 mOsm=Hypo- / 400 mOsm=Iso- / 500 mOsm=Hyperosmolarität) im Zellkulturmedium durch Zugabe unterschiedlicher Volumina einer hochmolaren Salzlösung (5 M NaCl / 0,4 M KCl) eingestellt.
Das Kapitel ist in Ergebnisse aus den Druckversuchen bzw. aus den Dehnungsexperimenten gegliedert. Zunächst wird auf die Ergebnisse aufgrund von Osmolaritätsänderungen ohne zusätzliche mechanische Belastung eingegangen und anschließend auf die Ergebnisse nach mechanischer Stimulation. Wichtige Ergebnisse der Genexpressionsanalysen mittels iCycler sind darüber hinaus graphisch dargestellt.

3.1.1 Druckversuche

Die Druckversuche unter Variation der extrazellulären Osmolarität wurden mit bovinen und humanen Zellen aus dem Nukleus pulposus (NP), die in Alginatbeads kultiviert wurden, durchgeführt. Die Ergebnisse aus dem Vergleich zweier dreidimensionaler Kultursysteme, Alginatbeads und Kollagen-Typ-I-Gelen, sind gesondert unter 3.7.1.1 beschrieben.

3.1.1.1 Bovine Nukleuszellen

Die auf GAPDH normierten Expressionswerte des Zielgens aus den mechanisch unbelasteten NP-Zellkulturen wurden auf die Genexpressionswerte bei der durchschnittlichen physiologischen Osmolarität (400 mOsm) in der Bandscheibe bezogen. Im Diagramm sind die Werte bei Isoosmolarität durch die Bezugslinie bei 1 dargestellt.

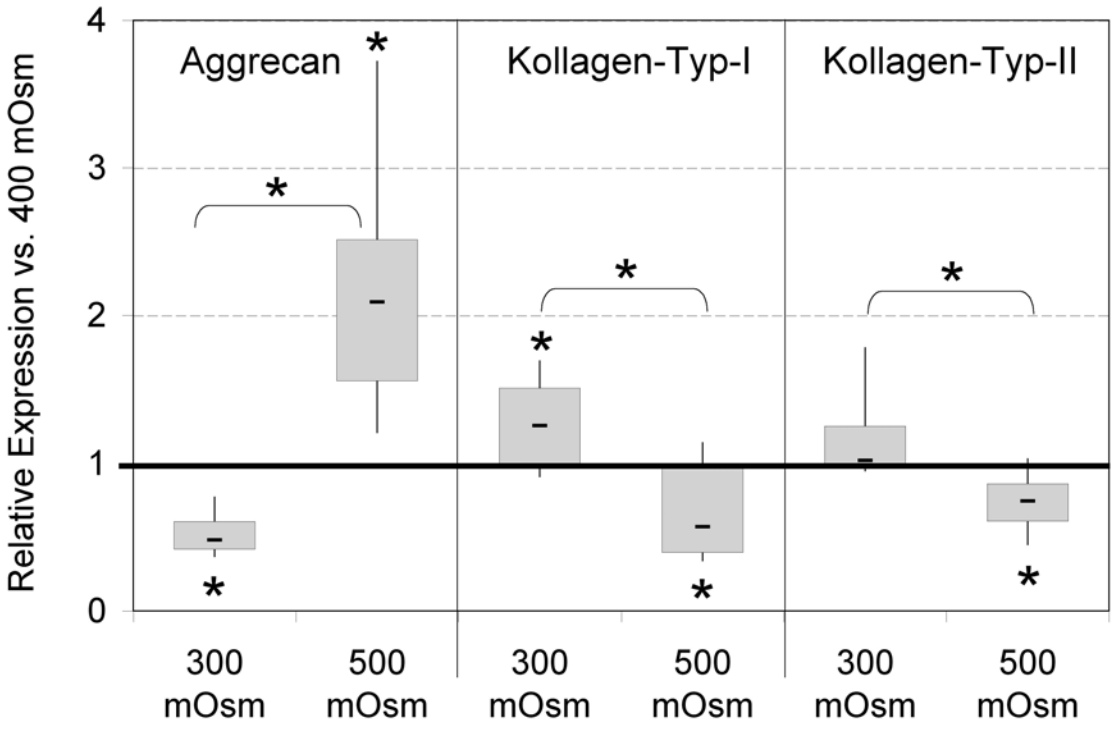


*Abbildung 13: Anabole Matrixgenexpression boviner Nukleuszellen (n=10) in 3D-Alginatbeads bei Hypo- (300 mOsm) und Hyperosmolarität (500 mOsm) in Bezug auf die Isoosmolarität (400 mOsm) = Bezugslinie bei 1. *p<0,03; Wilcoxon Vorzeichen-Rangsummen Test. Gruppenvergleich (300 mOsm–500 mOsm): *p<0,003; Wilcoxon 2-Sample Test.*

Die Veränderung der Osmolarität hatte großen Einfluss auf die Expression der meisten Zielgene, insbesondere auf die Genexpression der anabolen Matrixmoleküle Aggrecan, Kollagen-Typ-I und Typ-II (Abbildung 13) sowie auf die am Matrixumsatz beteiligten Enzyme MMP-3, Aggrecanase-1 und Aggrecanase-2 (Abbildung 14). Unter hyperosmolaren Bedingungen (500 mOsm), die nach hoher Belastung infolge des Wasserverlusts in der Bandscheibe herrschen, war die Genexpression von Kollagen-Typ-I und Typ-II signifikant herunterreguliert, wohingegen die Genexpression von Aggrecan, aber auch der Aggrecanasen-1 und -2 gegenüber 400 mOsm signifikant erhöht war. Bei Hypoosmolarität (300 mOsm), die im entlasteten Zustand in der gesunden Bandscheibe sowie in der degenerierten Bandscheibe auftritt, kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Genexpression von Kollagen-Typ-I und MMP-3 sowie zu einer signifikanten Erniedrigung von Aggrecan und Aggrecanase-2.

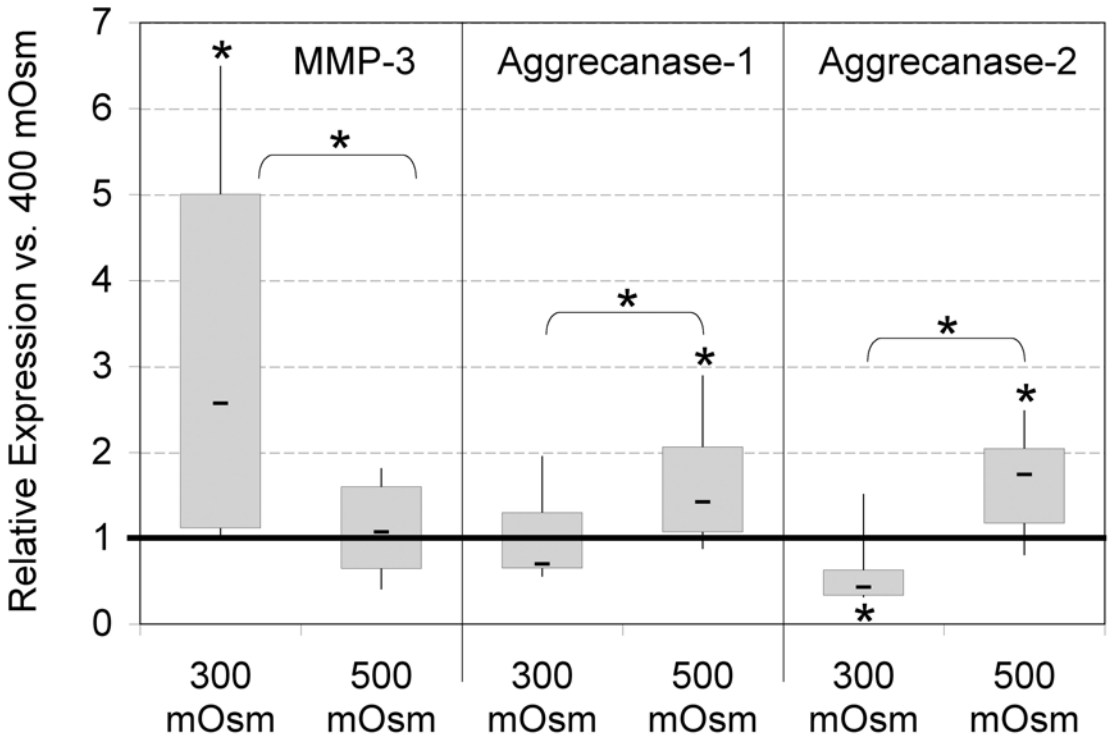


*Abbildung 14: Katabole Matrixgenexpression boviner Nukleuszellen (n=9-10) in 3D-Alginatbeads bei Hypo- (300 mOsm) und Hyperosmolarität (500 mOsm) in Bezug auf die Isoosmolarität (400 mOsm) = Bezugslinie bei 1. *p<0,03; Wilcoxon Vorzeichen-Rangsummen Test. Gruppenvergleich (300 mOsm–500 mOsm): *p<0,04; Wilcoxon 2-Sample Test. MMP: Matrixmetalloproteinase.*

Weiterhin wurden die Genexpressionswerte bei 300 mOsm und 500 mOsm (bezogen auf die Isoosmolarität 400 mOsm) miteinander verglichen, um zu ermitteln, ob statistisch signifikante Unterschiede (*p<0,05, Wilcoxon 2-Sample Test) zwischen der Genexpression bei Hypo- und Hyperosmolarität bestehen.

Bei den meisten untersuchten Zielgenen wurde die Genexpression bei Hypoosmolarität (300 mOsm) anders reguliert als bei Hyperosmolarität (500 mOsm), so dass der Zellmetabolismus in Abhängigkeit von der extrazellulären Osmolarität unterschiedlich beeinflusst wurde. Lediglich bei MMP-2 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Hypo- und Hyperosmolarität festgestellt werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Zur Berechnung mechanisch induzierter Effekte wurden die auf GAPDH normierten Genexpressionswerte der mechanisch stimulierten Proben auf die jeweiligen mechanisch unbelasteten Kontrollansätze bezogen.

Die zusätzliche Applikation von zyklischem hydrostatischem Druck hatte jedoch deutlich geringere Effekte auf die Genexpression als die Variation der extrazellulären Osmolarität

allein. Es kam nur vereinzelt zu statistisch signifikanten Veränderungen, jedoch waren diese in den meisten Fällen eher gering (Ergebnisse nicht dargestellt). So kam es bei 300 mOsm zu einer mechanisch induzierten Herunterregulation der Genexpression von Kollagen-Typ-I (-30%, p=0,002) und Aggrecanase-2 (-30%, p=0,055). In einzelnen Fällen konnte bei Iso- und Hyperosmolarität ein Anstieg der Genexpression beobachtet werden. Nach Druckapplikation war bei 500 mOsm die Genexpression der matrixdegradierenden Enzyme MMP-3 (+20%, p=0,049) und Aggrecanase-1 (+30%, p=0,055) leicht erhöht, während bei Isoosmolarität nur die Genexpression von Aggrecanase-1 (+40%, p=0,008) geringfügig hochreguliert wurde.

Die relativ geringe Responsivität der NP-Zellen auf Druckreize zeigte sich auch an der Genexpression von c-fos, einem mechanosensitiven Transkriptionsfaktor, dessen Expression nach Applikation von zyklischem hydrostatischem Druck nicht bzw. nur geringfügig (+50%) erhöht war. Jedoch war aufgrund des Verlaufs der c-fos-Genexpression feststellbar, dass sich das Expressionsniveau der mechanisch belasteten Proben in Abhängigkeit von der Osmolarität signifikant unterschied (Abbildung 15). Bei den mechanisch unbelasteten Kontrollproben konnte ein ähnlicher Verlauf beobachtet werden, bei dem sich das Expressionsniveau jedoch nur zwischen 300 mOsm und 500 mOsm signifikant unterschied. Dagegen konnten keine Unterschiede zwischen den mechanisch stimulierten Ansätzen und den jeweiligen Kontrollen festgestellt werden.

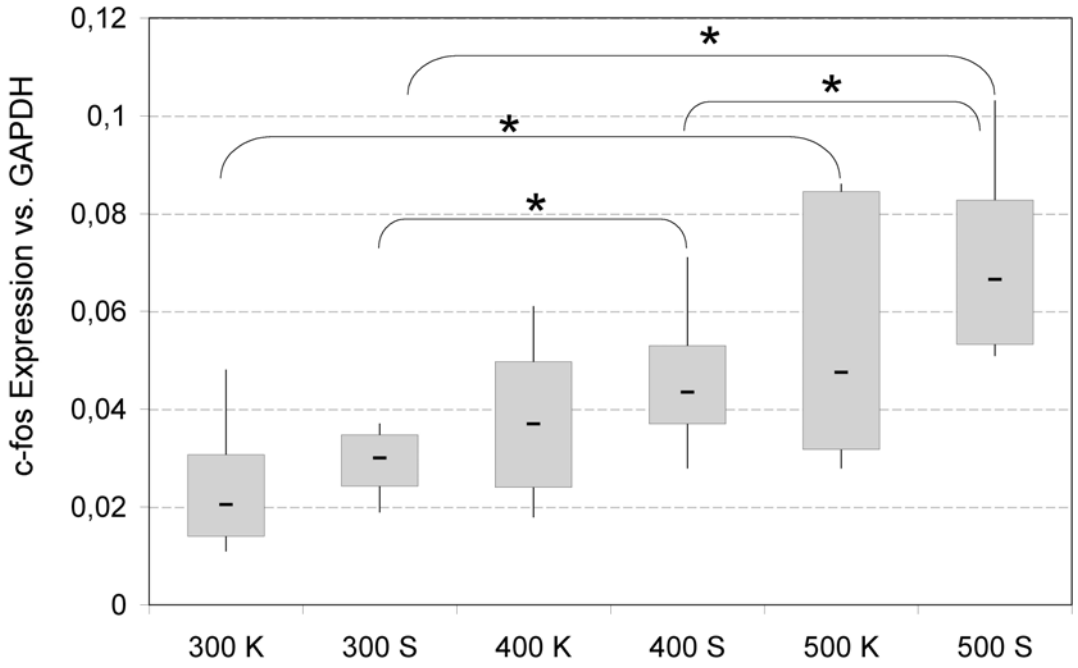


*Abbildung 15: Genexpression des mechanosensitiven Transkriptionsfaktors c-fos boviner Nukleuszellen (n=6) in 3D-Alginatbeads ohne mechanische Belastung (K=Kontrolle) und nach mechanischer Belastung (S=Stimulation mittels zyklischem hydrostatischem Druck) unter Variation der extrazellulären Osmolarität (300 mOsm, 400 mOsm, 500 mOsm). Gruppenvergleich (Kontrolle–Stimulation): *p<0,03; Wilcoxon 2-Sample Test.*

3.1.1.2 Humane Nukleuszellen

Da im Gegensatz zum bovinen Spenderkollektiv bei humanen Spendern häufig größere Schwankungen in der Genexpression beobachtet werden konnten, die möglicherweise auf Unterschiede im Alter, Degenerationsgrad oder der Behandlungsursache zurückzuführen sind, wurden die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen spenderspezifisch dargestellt.

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse ohne zusätzliche Druckapplikation dargestellt. Die Genexpressionswerte bei 300 mOsm und bei 500 mOsm wurden wiederum auf die Werte bei Isoosmolarität (400 mOsm) bezogen, welche in den Graphiken durch die Bezugslinie bei 1 repräsentiert werden.

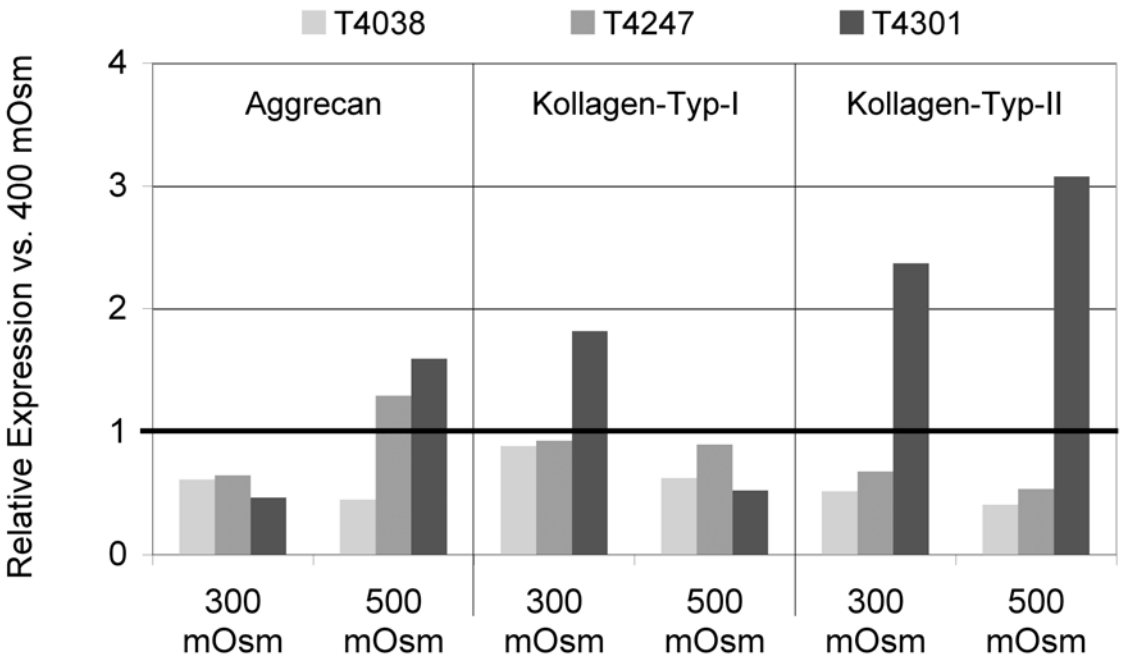


Abbildung 16: Anabole Matrixgenexpression humaner Nukleuszellen verschiedener Spender (n=3) in 3D-Alginatbeads bei Hypo- (300 mOsm) und Hyperosmolarität (500 mOsm) in Bezug auf die Isoosmolarität (400 mOsm) = Bezugslinie bei 1.

Unter hypoosmolaren Bedingungen (300 mOsm) kam es bei allen drei Spendern zu einer Herunterregulation der Aggrecan-Genexpression gegenüber 400 mOsm (Abbildung 16). Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen boviner NP-Zellen, welche als Modell für gesundes Bandscheibengewebe dienten, überein. Die Osmolaritätsänderung führte bei Donor T4301, dessen Bandscheibengewebe infolge einer Traumabehandlung isoliert worden war, zu einer Hochregulation der Genexpression von Kollagen-Typ-I und Typ-II, die bei bovinen NP-Zellen tendenziell ebenfalls beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu kam es bei den Spendern T4038 und T4247 zu keiner Genexpressionsänderung von Kollagen-Typ-I bzw. zu einer Herunterregulation von Kollagen-Typ-II.

Unter hyperosmolaren Bedingungen (500 mOsm) war eine tendenzielle Herunterregulation der Genexpression von Kollagen-Typ-I bei allen drei Spendern zu beobachten, die mit den Ergebnissen boviner NP-Zellen übereinstimmt. Dagegen wies die Genexpression von Aggrecan und Kollagen-Typ-II eine höhere Spendervariabilität auf. So kam es zum Beispiel bei dem Traumapatienten T4301 zu einem dreifachen Anstieg der Genexpression von Kollagen-Typ-II gegenüber 400 mOsm. Dies steht im Widerspruch zum Genexpressionsmuster boviner Spender, bei denen die Kollagen-Typ-II-Genexpression signifikant herunterreguliert war. Ein mit den bovinen NP-Zellen vergleichbares Genexpressionsprofil zeigten hingegen die Spender T4038 und T4247. Jedoch war die

Verteilung der humanen Kollagen-Typ-II-Genexpressionsdaten bei 300 mOsm und 500 mOsm ähnlich. Die Genexpression von Aggrecan wies im Gegensatz zu 300 mOsm eine große Streuung auf.

Die Genexpression des Transkriptionsfaktors Sox-9 war bei 300 mOsm bei allen drei Spendern um mindestens 40% herunterreguliert, während bei 500 mOsm keine Veränderung gegenüber 400 mOsm zu beobachten war (Ergebnisse nicht dargestellt).

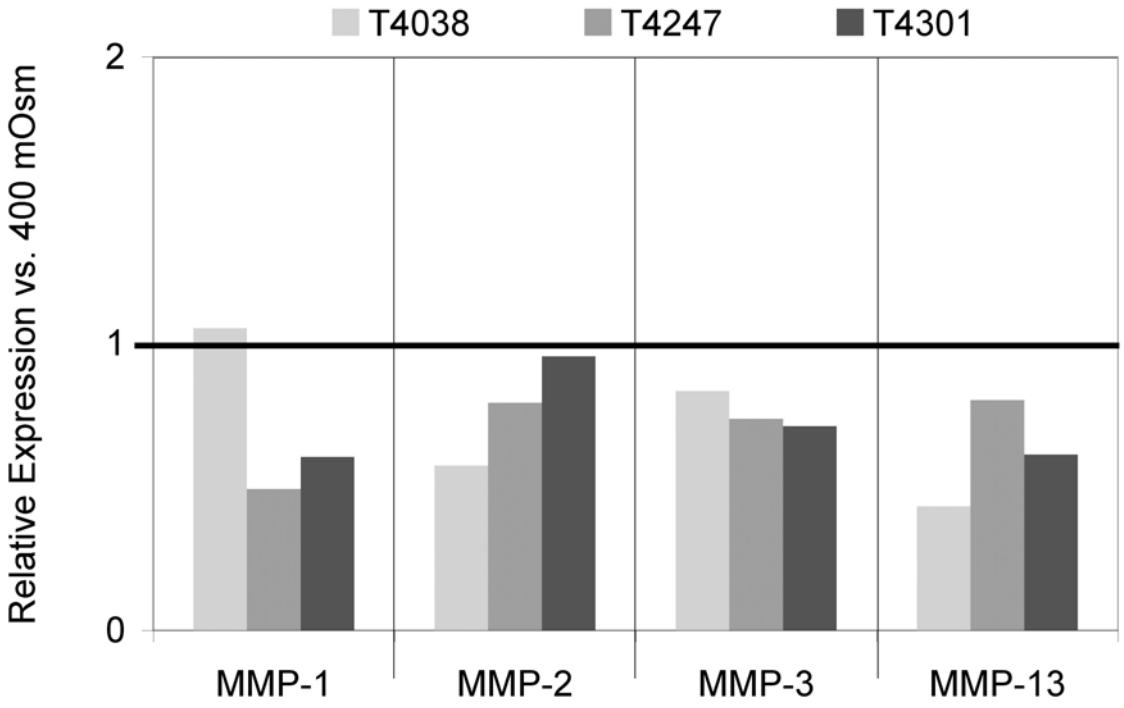


Abbildung 17: Katabole Matrixgenexpression humaner Nukleuszellen verschiedener Spender (n=3) in 3D-Alginatbeads bei Hypoosmolarität (300 mOsm) in Bezug auf die Isoosmolarität (400 mOsm) = Bezugslinie bei 1. MMP: Matrixmetalloproteinase.

Die Genexpression der matrixdegradierenden Enzyme MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-13 war sowohl bei 300 mOsm als auch bei 500 mOsm gegenüber 400 mOsm entweder unverändert oder herunterreguliert (300 mOsm: bis zu -55%, Abbildung 17, 500 mOsm: bis zu -70%, Ergebnisse nicht dargestellt). Lediglich bei Spenderin T4038 kam es bei Hyperosmolarität zu einer Hochregulation (+1,9-fach) der MMP-1-Genexpression. Eine weitgehend unveränderte MMP-3-Genexpression humaner NP-Zellen fand sich bei 500 mOsm auch im bovinen Modell. Bei Hypoosmolarität zeigte sich insbesondere bei den beiden Spendern T4247 und T4301 eine gute Übereinstimmung in der Regulation der MMP-Genexpression. Im bovinen Modell hingegen kam es bei 300 mOsm zu einer

signifikanten Erhöhung der MMP-3-Genexpression, die somit von dem Ergebnis humaner NP-Zellen abwich.
Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Expression der Zielgene humaner Nukleuszellen gegenüber 400 mOsm häufig unverändert oder tendenziell herunterreguliert war, sowohl unter hypo- als auch hyperosmolaren Bedingungen. Nur vereinzelt kam es zu einer Hochregulation, wobei diese zumeist bei dem Traumapatienten T4301 auftrat.

Die Applikation von zyklischem hydrostatischem Druck führte in der Mehrzahl der analysierten Proben zu keinen wesentlichen Veränderungen der Genexpression (Ergebnisse nicht dargestellt). Jedoch konnte bei Kollagen-Typ-II überwiegend eine Herunterregulation der Genexpression um mindestens 25% festgestellt werden, wobei dieser Effekt bei 500 mOsm bei allen drei Spendern zu beobachten war und bei 300 mOsm bzw. 400 mOsm bei jeweils zwei Spendern. Der mechanosensitive Transkriptionsfaktor c-fos wurde bei dem Traumapatienten T4301 bei allen drei Osmolaritäten deutlich hochreguliert (≥ +75%), bei den anderen beiden Spendern konnte vereinzelt ebenfalls ein Anstieg der Genexpression von c-fos festgestellt werden.

Schwankungen der extrazellulären Osmolarität beeinflussten in einzelnen Fällen die Responsivität humaner Nukleuszellen auf mechanische Belastung durch hydrostatischen Druck (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Veränderungen waren jedoch nicht einheitlich, sondern vom jeweiligen Zielgen, dem Donor und der Osmolarität abhängig. Eine allgemeine Aussage ist daher nicht möglich.
Beispielsweise führte die Veränderung der extrazellulären Osmolarität bei Spender T4247 zu einer Erniedrigung der mechanisch induzierten Kollagen-Typ-I-Genexpression um 50% bei 300 mOsm und um etwa 60% bei 500 mOsm gegenüber der durchschnittlichen physiologischen Osmolarität. Osmolaritätsabhängige Unterschiede in der mechanisch induzierten Genexpression von Kollagen-Typ-II gegenüber 400 mOsm waren lediglich bei dem Traumapatienten T4301 sowohl bei 300 mOsm (-45%) als auch bei 500 mOsm (-55%) zu beobachten.
Die Genexpressionsantwort von Sox-9, MMP-3 und MMP-13 auf Druckapplikation wurde kaum von der extrazellulären Osmolarität beeinflusst. Bei Donor T4038 kam es jedoch zu einer Hochregulation der Genexpression von MMP-1 bei 500 mOsm (+1,8-fach) und von MMP-2 bei 300 mOsm (+1,9-fach) und 500 mOsm (+2,2-fach) gegenüber 400 mOsm. Im Gegensatz zu Sox-9 wurde die mechanisch induzierte Genexpression von c-fos durch die

extrazelluläre Osmolarität stark beeinflusst. Die Effekte gegenüber 400 mOsm waren bei 300 mOsm bei Spenderin T4038 (-60%) und bei 500 mOsm bei den Spendern T4247 und T4301 (-40%) am deutlichsten zu sehen.

Um festzustellen, ob die Variation der extrazellulären Osmolarität nicht nur Einfluss auf die Genexpression der Nukleuszellen hat, sondern auch auf Proteinebene nachweisbar ist, wurde ein Glykosaminoglykan (GAG)-Assay durchgeführt. Dabei wurden die Überstände einer Zeitreihe mit Proben eines exemplarischen humanen Spenders (T4371) analysiert und auf GAPDH normiert. Zusätzlich wurde bei diesem Spender auch die Genexpression von Aggrecan bestimmt.
Im Gegensatz zur Aggrecan-Genexpression, bei der analog zu den bisherigen Ergebnissen boviner bzw. humaner NP-Zellen bei Donor T4371 ebenfalls ein Anstieg mit zunehmender Osmolarität zu verzeichnen war, ergab die Proteoglykananalyse am Tag 1 (24 Stunden nach Variation der Osmolarität) noch keine wesentlichen Unterschiede zwischen 300 mOsm, 400 mOsm und 500 mOsm (Ergebnisse nicht dargestellt). Am Tag 3 hingegen war ein Anstieg der PG-Konzentration mit zunehmender Osmolarität zu beobachten. Dieses Ergebnis bestätigt zeitverzögert das Genexpressionsprofil boviner NP-Zellen in Abbildung 13 sowie der humanen Spender T4247 und T4301 in Abbildung 16 und des Spenders T4371 auf Proteinebene.

24 Stunden nach Variation der extrazellulären Osmolarität wurde die durchschnittliche Viabilität humaner Nukleuszellen von zwei Spendern, die in Alginatbeads kultiviert wurden, mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Die Osmolaritätsänderung hatte jedoch keinen wesentlichen Einfluss auf die Zellviabilität (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.1.2 Dehnungsversuche

Die Dehnungsversuche unter Variation der extrazellulären Osmolarität wurden nur mit humanen Zellen aus dem Anulus fibrosus (AF) durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse wurden aus zweidimensionalen (2D) Monolayer-Kulturen gewonnen. Auf den Vergleich mit Daten aus dreidimensionalen (3D) Kollagen-Typ-I-Gelen wird unter 3.7.1.2 näher eingegangen.
Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass analog zu den Ergebnissen aus den (Druck-)Versuchen mit Nukleuszellen die Variation der extrazellulären Osmolarität den

größten Einfluss auf die Genexpression der Anuluszellen hatte. Zyklische Dehnung spielte dagegen bei der Regulation der Genexpression von Anuluszellen eine untergeordnete Rolle.

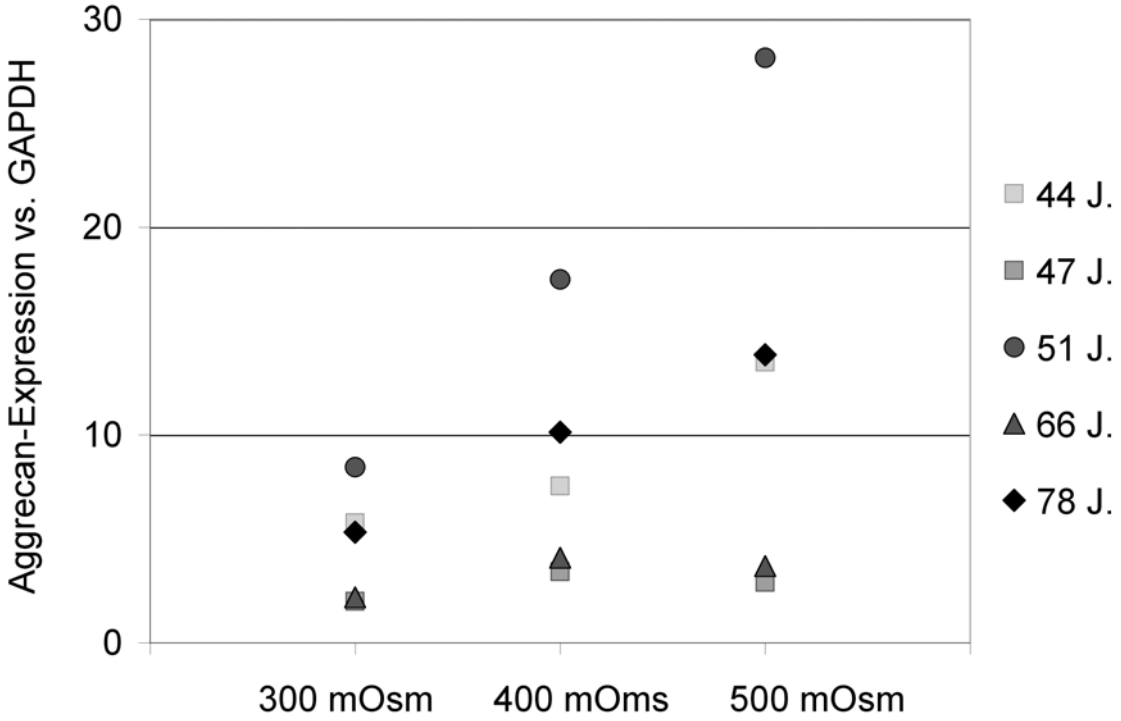


Abbildung 18: Aggrecan-Genexpression humaner Anuluszellen verschiedener Spender (n=5) im 2D-Monolayer nach Variation der extrazellulären Osmolarität (300 mOsm, 400 mOsm, 500 mOsm). Angabe des Spenderalters in Jahren (J.). 44 J.: T4339, 47 J.: T4359, 51 J.: T4347, 66 J.: T4337, 78 J.: T4349.

Wie in Abbildung 18 gezeigt, beeinflusste die Änderung der extrazellulären Osmolarität ohne Applikation eines zusätzlichen mechanischen Reizes bereits die Höhe der Genexpression, wobei das Genexpressionsniveau spenderabhängige Unterschiede aufwies. In der Graphik ist dies am Beispiel von Aggrecan im 2D-Monolayer dargestellt. Bei drei Spenderinnen (44, 51 bzw. 78 Jahre) konnte ein deutlicher Anstieg der Genexpressionshöhe mit zunehmender Osmolarität beobachtet werden. Dieser Verlauf konnte bereits in Abbildung 13 mit bovinen Nukleuszellen bzw. zum Teil auch mit humanen Nukleuszellen (Abbildung 16) in Alginatbeads-Kultur gezeigt werden. Unter hyperosmolaren Bedingungen waren die Unterschiede in der Genexpressionshöhe am größten, wobei die maximale Genexpression etwa um das Zehnfache über dem niedrigsten Genexpressionsniveau lag. Dieser Trend bestätigt die Ergebnisse mit Nukleuszellen, bei

denen die größte Streuung in der Aggrecan-Genexpression ebenfalls bei 500 mOsm auftrat. Jedoch war keine Altersabhängigkeit im Genexpressionsniveau erkennbar.

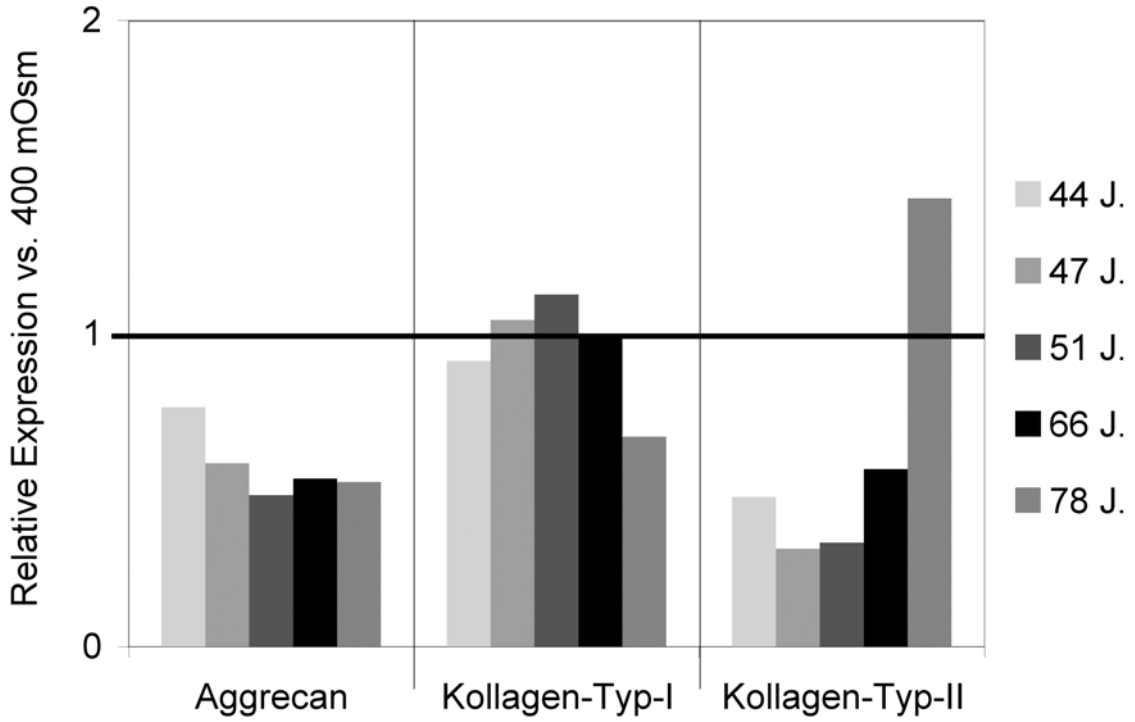


Abbildung 19: Anabole Matrixgenexpression humaner Anuluszellen verschiedener Spender (n=5) im 2D-Monolayer bei Hypoosmolarität (300 mOsm) in Bezug auf die Isoosmolarität (400 mOsm) = Bezugslinie bei 1. Angabe des Spenderalters in Jahren (J.). 44 J.: T4339, 47 J.: T4359, 51 J.: T4347, 66 J.: T4337, 78 J.: T4349.

Um den Einfluss der Osmolaritätsänderung auf die Genexpression anaboler bzw. kataboler Matrixfaktoren festzustellen, wurden die Expressionswerte der Zielgene auf die jeweiligen Werte bei der durchschnittlichen physiologischen Osmolarität (400 mOsm) in der Bandscheibe bezogen. Aufgrund der größeren Spendervariabilität wurden analog zu den humanen Nukleuszellen auch hier die Ergebnisse individuell dargestellt.

Die Erniedrigung der Osmolarität auf 300 mOsm führte bei allen Spenderinnen zu einer Herunterregulation der Aggrecan-Genexpression (Abbildung 19). Mit Ausnahme der ältesten Spenderin (78 Jahre, T4349) war bei den anderen Patientinnen die Genexpression von Kollagen-Typ-II ebenfalls gegenüber 400 mOsm herunterreguliert, wohingegen die Kollagen-Typ-I-Genexpression weitgehend unverändert war. Abgesehen von dem Kollagen-Typ-II-Genexpressionsprofil des Traumapatienten T4301 in Abbildung 16 stimmen die Ergebnisse humaner Anuluszellen weitgehend mit den Befunden aus

Nukleuszellen überein, bei denen es ebenfalls zu einer tendenziellen Herunterregulation von Aggrecan und Kollagen-Typ-II in Alginatbeads kam.

Bei 500 mOsm hingegen zeigte sich ein uneinheitliches Bild, so dass keine Tendenzen in der Genexpression der drei anabolen Matrixfaktoren feststellbar waren. Im Gegensatz dazu war die Sox-9-Genexpression bei allen Spenderinnen gegenüber 400 mOsm erhöht (+80±25%), wohingegen es bei 300 mOsm zu einer tendenziellen Herunterregulation (-50±20%) kam (Ergebnisse nicht dargestellt).

Im Vergleich zur Isoosmolarität war die Expression des katabolen Matrixgens MMP-3 bei 500 mOsm weitgehend unverändert. Bei 300 mOsm gab es jedoch eine große Streuung der Werte, die individuell von einer Herunterregulation (-30%) bis zu einer Verdopplung der MMP-3-Genexpression bei der ältesten Patientin (78 Jahre, T4349) variierten (Ergebnisse nicht dargestellt).

Allgemein ist festzustellen, dass bei einer erniedrigten extrazellulären Osmolarität die Genexpression anaboler Matrixfaktoren tendenziell herunterreguliert war. Bei einer erhöhten Osmolarität kam es zu einer tendenziellen Hochregulation von Sox-9. Das Genexpressionsniveau zeigte spenderabhängige Unterschiede, wobei aufgrund des begrenzten Patientenkollektivs keine altersabhängigen Einflüsse festgestellt werden konnten.

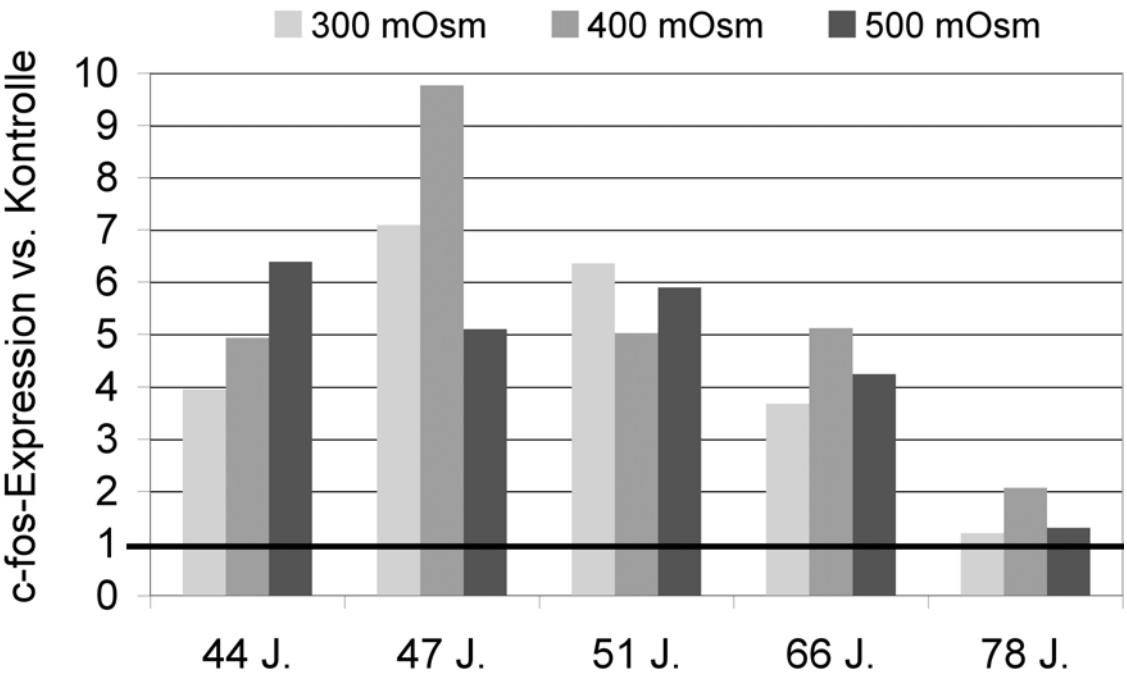


Abbildung 20: c-fos-Genexpression humaner Anuluszellen verschiedener Spender (n=5) im 2D-Monolayer nach mechanischer Belastung (zyklische Dehnung) unter Variation der extrazellulären Osmolarität (300 mOsm, 400 mOsm, 500 mOsm) in Bezug auf die mechanisch unbelastete Kontrolle = Bezugslinie bei 1. Angabe des Spenderalters in Jahren (J.). 44 J.: T4339, 47 J.: T4359, 51 J.: T4347, 66 J.: T4337, 78 J.: T4349.

Um den Einfluss der zyklischen Dehnung auf die Genexpression humaner Anuluszellen zu analysieren, wurde für die jeweilige Osmolarität der Quotient aus mechanisch belasteten Proben und den mechanisch unbelasteten Kontrollen gebildet. Bei einer deutlichen Abweichung des Quotienten von dem Wert 1 konnte eine mechanisch induzierte Genexpressionsänderung verzeichnet werden.

Die graphische Darstellung der individuellen c-fos-Genexpression im 2D-Monolayer zeigt, dass die Anuluszellen auf den mechanischen Reiz reagierten (Abbildung 20). Jedoch wirkte sich die mechanische Belastung in Abhängigkeit von der extrazellulären Osmolarität unterschiedlich auf das Genexpressionsniveau aus. So war die höchste c-fos-Genexpression bei 400 mOsm bei der zweitjüngsten Patientin (47 Jahre, T4359) des Spenderkollektivs zu verzeichnen. Die niedrigste Responsivität auf den mechanischen Stimulus fand sich dagegen bei der ältesten Spenderin (78 Jahre, T4349), wobei auch hier das höchste Genexpressionsniveau bei 400 mOsm lag. Bei 300 mOsm kam es bei vier Spenderinnen zu einer deutlichen Erniedrigung der mechanisch induzierten c-fos-Genexpression gegenüber der Isoosmolarität. Auch bei 500 mOsm unterschied sich das Genexpressionsniveau erheblich von 400 mOsm.

Bei den anderen Zielgenen fiel die Responsivität auf zyklische Dehnung insgesamt gering aus (Ergebnisse nicht dargestellt). Eine mechanisch induzierte Genexpressionsänderung führte zumeist zu einer Herunterregulation wie beispielsweise von Sox-9 unter hypoosmolaren Bedingungen (-40±20%). Aufgrund der geringen mechanischen Effekte konnte nur in Einzelfällen ein osmolaritätsabhängiger Unterschied in der Genexpressionshöhe festgestellt werden. Diese Befunde weisen jedoch darauf hin, dass die Variation der extrazellulären Osmolarität die Regulation der Genexpression, insbesondere mechanosensitiver Gene wie hier am Beispiel von c-fos gezeigt, nach mechanischer Belastung unterschiedlich beeinflusst.

3.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse bei Variation der Osmolarität

- Eine erniedrigte Osmolarität (300 mOsm) führte in bovinen und humanen NP-Zellen sowie in humanen AF-Zellen zu einer Herunterregulation der Aggrecan-Genexpression.
- Anstieg der GAG-Konzentration mit zunehmender Osmolarität, analog zur Aggrecan-Genexpression, aber um 48 Stunden zeitversetzt.
- Osmolaritätsänderungen hatten keinen Einfluss auf die Zellviabilität.
- Kollagen-Typ-II war bei 300 mOsm in humanen NP- und AF-Zellen tendenziell geringer exprimiert als bei 400 mOsm. In bovinen NP-Zellen war die Kollagen-Typ-II-Genexpression unverändert.
- Die Applikation zusätzlicher mechanischer Reize, insbesondere die Stimulation durch zyklischen hydrostatischen Druck, erzeugte sowohl in bovinen als auch in humanen Bandscheibenzellen eher geringe Effekte bezüglich der Expression anaboler und kataboler Matrixgene.
- Humane AF-Zellen reagierten auf zyklische Dehnung mit einer erhöhten c-fos-Genexpression.

3.2 Variation der Glucose

Da es sich bei gesunden Bandscheiben um nicht durchblutetes Gewebe handelt, werden insbesondere die Nukleuszellen im Inneren der Bandscheibe ausschließlich durch Diffusion mit Nährstoffen versorgt. Zu Beginn der Bandscheibendegeneration kommt es zu strukturellen Veränderungen, wodurch die Versorgung der Bandscheibenzellen mit Metaboliten wie beispielsweise Glucose vermindert ist. Diese Veränderungen der Glucosekonzentration wurden im Experiment durch Verwendung von Zellkulturmedien mit unterschiedlichem Glucosegehalt simuliert.
In den folgenden Abschnitten werden zuerst die Ergebnisse aus den Druckversuchen und danach aus den Dehnungsexperimenten zusammengefasst. Diese beiden Einheiten (Druck, Dehnung) sind jeweils untergliedert in Ergebnisse aufgrund von Glucosevariation ohne zusätzliche mechanische Belastung und nach mechanischer Stimulation. Zunächst werden die Ergebnisse mit bovinen Bandscheibenzellen beschrieben, anschließend die Ergebnisse humaner Spender. Wichtige Ergebnisse bestimmter Zielgene sind darüber hinaus auch graphisch dargestellt.

3.2.1 Ergebnisse aus Druckversuchen

Die Druckversuche unter Variation der Glucoseversorgung wurden mit bovinen und humanen Zellen aus dem Nukleus pulposus, die in Alginatbeads kultiviert wurden, durchgeführt. Die Ergebnisse aus dem Vergleich zweier dreidimensionaler Kultursysteme, Alginatbeads und Kollagen-Typ-I-Gelen, sind gesondert unter 3.7.1.1 aufgeführt.

3.2.1.1 Bovine Nukleuszellen

In den mechanisch unbelasteten Kontrollkulturen wurde die quantitativ bestimmte Expression des Zielgens auf die Werte bei normaler Glucoseversorgung (5 mM Glucose, Standardkonzentration im Zellkulturmedium der Bandscheibe) bezogen. Im Diagramm sind die Werte bei Standardglucosekonzentration durch die Bezugslinie bei 1 dargestellt.

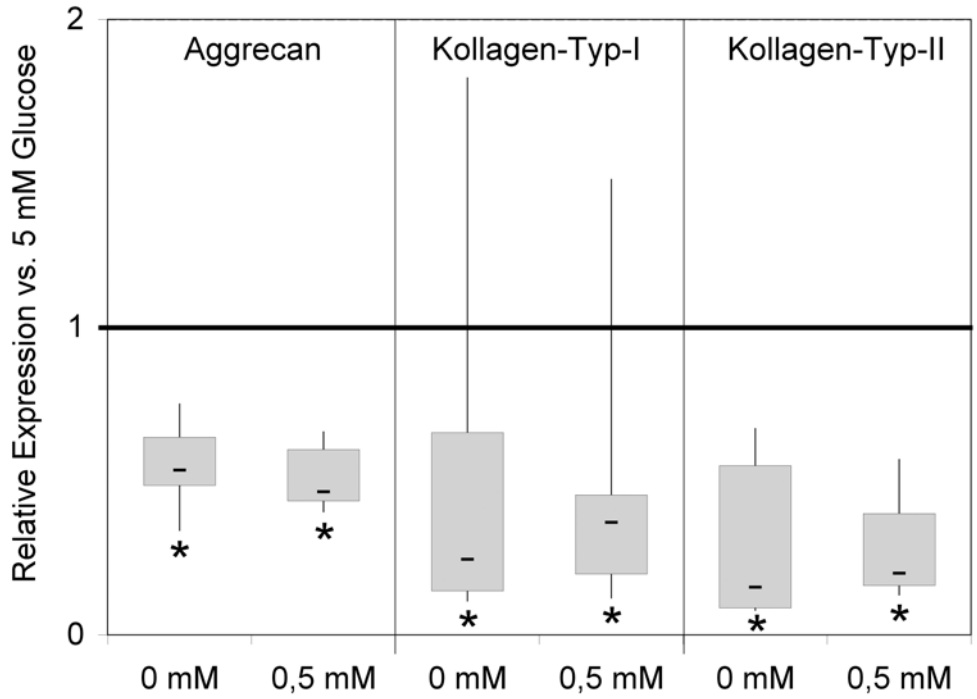


*Abbildung 21: Anabole Matrixgenexpression boviner Nukleuszellen (n=10) in 3D-Alginatbeads bei Glucosereduktion (0 mM, 0,5 mM) in Bezug auf die Standardglucosekonzentration (5 mM) = Bezugslinie bei 1. *p<0,04; Wilcoxon Vorzeichen-Rangsummen Test.*

Die Reduktion der Glucoseversorgung hatte großen Einfluss auf den Metabolismus der Bandscheibenzellen, die zu einer Herunterregulation insbesondere der Expression anaboler Matrixgene führte (Abbildung 21). Die Zellen waren dabei jedoch nicht in einen apoptotischen Zustand eingetreten, da die Genexpression des Apoptosemarkers p53 bei Glucoseunterversorgung im Vergleich zur Standardglucosekonzentration (5 mM) nicht erhöht, sondern sogar signifikant verringert war (p=0,03, Ergebnisse nicht dargestellt).

Bei Glucosereduktion waren bei den matrixdegradierenden Enzymen Aggrecanase-1, Aggrecanase-2 und MMP-3 keine statistisch signifikanten Veränderungen gegenüber der Standardglucosekonzentration zu beobachten; lediglich die Genexpression von MMP-2 war sowohl unter glucosereduzierten (0,5 mM, p=0,002) als auch unter glucosefreien Bedingungen (0 mM, p=0,01) gegenüber der Standardglucosekonzentration (5 mM) statistisch signifikant herunterreguliert (-40%).

Darüber hinaus wurden die Genexpressionswerte bei 0 mM und 0,5 mM Glucose (bezogen auf die Standardglucosekonzentration) miteinander verglichen (Wilcoxon 2-Sample Test). Es konnte jedoch bei keinem der untersuchten Zielgene ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Genexpression unter glucosefreien Bedingungen und bei geringer Glucoseversorgung festgestellt werden.

Zur Berechnung mechanisch induzierter Effekte wurden die auf GAPDH normierten Genexpressionswerte der mechanisch stimulierten Proben auf die jeweiligen mechanisch unbelasteten Kontrollansätze bezogen.
Statistisch signifikante Abweichungen vom Kontrollniveau ergaben sich lediglich bei Aggrecanase-2, deren Genexpression nach mechanischer Belastung bei 0,5 mM Glucose geringfügig hochreguliert wurde (+20%, p=0,047). Bei den anderen untersuchten Zielgenen hatte die Applikation von zyklischem hydrostatischem Druck keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Regulation der Genexpression (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.2.1.2 Humane Nukleuszellen

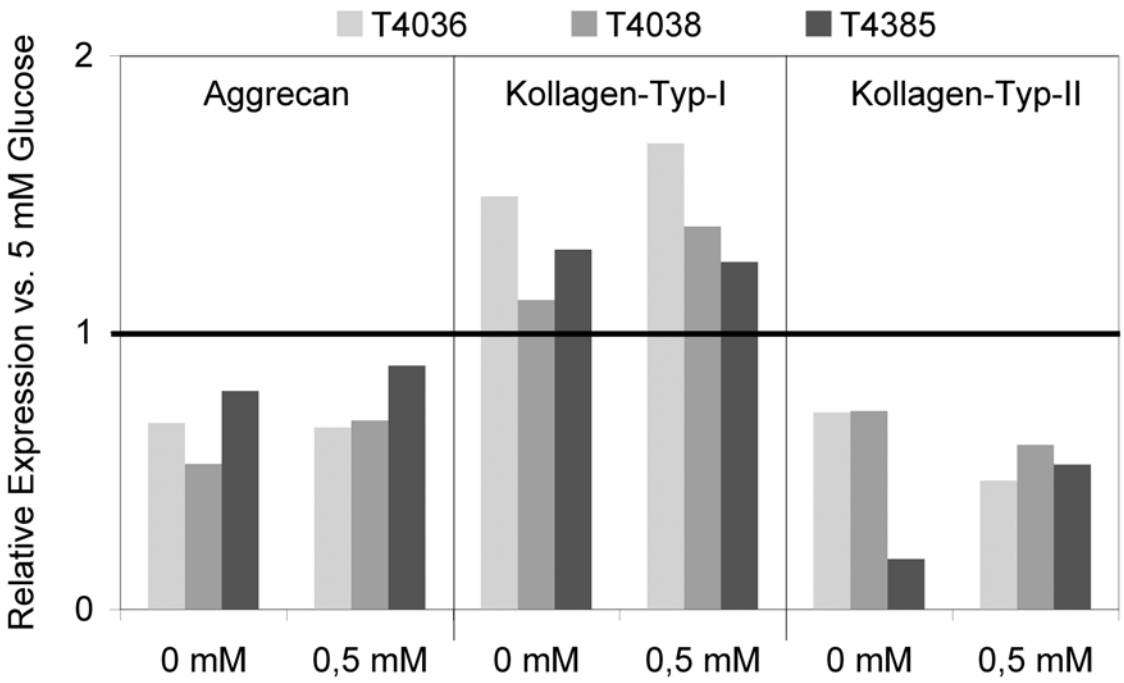


Abbildung 22: Anabole Matrixgenexpression humaner Nukleuszellen verschiedener Spender (n=3) in 3D-Alginatbeads bei Glucosereduktion (0 mM, 0,5 mM) in Bezug auf die Standardglucosekonzentration (5 mM) = Bezugslinie bei 1.

Eine reduzierte Nährstoffversorgung beeinflusste auch in humanen Nukleuszellen die Genexpression anaboler Matrixfaktoren (Abbildung 22). Die Genexpression von Aggrecan und Kollagen-Typ-II, welche die wesentlichen Bestandteile der Matrix des Nukleus pulposus darstellen, war sowohl unter glucosefreien Bedingungen (0 mM) als auch bei eingeschränkter Glucoseversorgung (0,5 mM) herunterreguliert. Die Genexpression von

Kollagen-Typ-I hingegen war sowohl bei 0 mM als auch bei 0,5 mM Glucose gegenüber der Standardglucosekonzentration (5 mM) tendenziell erhöht.

Die Ergebnisse humaner Nukleuszellen stimmen bezüglich der Genexpression von Aggrecan und Kollagen-Typ-II mit den Ergebnissen boviner Nukleuszellen überein, wohingegen die Kollagen-Typ-I-Genexpression davon abweicht, da es im Gegensatz zu humanen NP-Zellen im bovinen Modell ebenfalls zu einer Herunterregulation der Genexpression kam (Abbildung 21).

Das Genexpressionsmuster des Spenders T4383 (Ergebnisse nicht dargestellt) unterschied sich jedoch häufig von dem der anderen drei Spenderinnen. So war bei diesem Spender die Kollagen-Typ-I-Genexpression deutlich erhöht (+4,4-fach bei 0 mM, +6,1-fach bei 0,5 mM, jeweils bezogen auf 5 mM Glucose), während bei Aggrecan keine Veränderung und bei Kollagen-Typ-II lediglich bei 0 mM Glucose eine Herunterregulation (-30%) zu beobachten war. Bei diesem Spender T4383 handelte es sich um den ältesten (45 Jahre) und einzigen männlichen Donor aus dem Patientenkollektiv, bei dem eine Spondylolisthese diagnostiziert worden war, wohingegen die Spenderinnen T4036 (19 Jahre) und T4038 (20 Jahre) aufgrund eines Traumas und Spenderin T4385 (27 Jahre) infolge eines Bandscheibenvorfalls behandelt worden waren.

Dieser Unterschied im Genexpressionsmuster der verschiedenen Spender zeigte sich ebenfalls bei Sox-9. Hier kam es bei Glucosereduktion (0,5 mM) entweder zu keiner Veränderung (T4038) oder einer Herunterregulation (T4036, T4385) der Sox-9-Genexpression um mindestens 50%, während diese bei Spender T4383 gegenüber 5 mM Glucose zweifach hochreguliert war. Unter glucosefreien Bedingungen kam es bei allen drei Patientinnen (T4036, T4038 T4385) zu einer Herunterregulation der Sox-9-Genexpression, wohingegen nur bei Spender T4383 eine Erhöhung (+1,7-fach) gegenüber 5 mM Glucose festgestellt werden konnte (Ergebnisse nicht dargestellt).

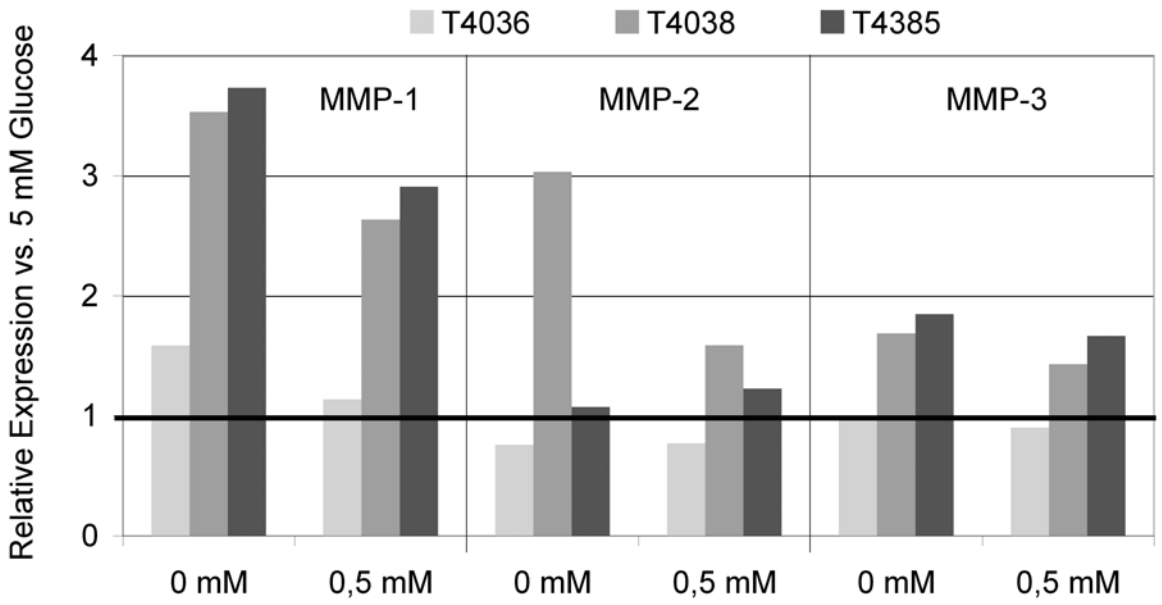


Abbildung 23: Katabole Matrixgenexpression humaner Nukleuszellen verschiedener Spender (n=3) in 3D-Alginatbeads bei Glucosereduktion (0 mM, 0,5 mM) in Bezug auf die Standardglucosekonzentration (5 mM) = Bezugslinie bei 1. MMP: Matrixmetalloproteinase.

Die Genexpression matrixabbauender Enzyme (MMP-1, MMP-2, MMP-3, Abbildung 23) war bei den meisten Spendern erhöht, lediglich Spenderin T4036 zeigte nur geringe Veränderungen gegenüber 5 mM Glucose. Dagegen fand sich nur bei MMP-13 überwiegend eine erniedrigte Genexpression bei Glucoseunterversorgung gegenüber der Standardbedingung (5 mM Glucose, Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Ergebnisse zeigen, dass es bei Nährstoffmangel tendenziell zu einer Herunterregulation anaboler Matrixgene und gleichzeitig zu einer Expressionserhöhung kataboler Faktoren kam.

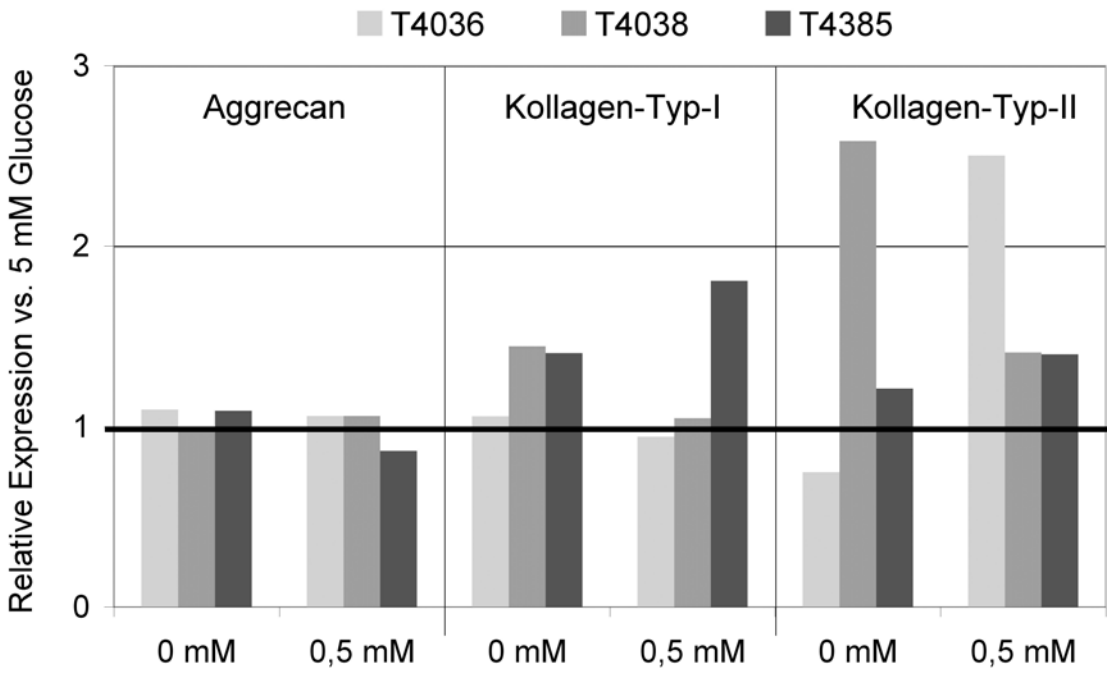


Abbildung 24: Anabole Matrixgenexpression humaner Nukleuszellen verschiedener Spender (n=3) in 3D-Alginatbeads nach mechanischer Belastung (zyklischer hydrostatischer Druck) bei Glucosereduktion (0 mM, 0,5 mM) in Bezug auf die Standardglucosekonzentration (5 mM) = Bezugslinie bei 1.

Die Applikation von zyklischem hydrostatischem Druck führte unter glucosereduzierten Bedingungen (0 mM, 0,5 mM) zu keiner wesentlichen Genexpressionsänderung von Aggrecan im Vergleich zur Standardbedingung (5 mM Glucose, Abbildung 24). Dagegen kam es bei Kollagen-Typ-I und Typ-II in Einzelfällen zu einer tendenziellen Erhöhung (bis zu 2,6-fach) der Genexpression gegenüber 5 mM Glucose.

Im Vergleich zur Standardglucosekonzentration war die Genexpression von Sox-9 bei Glucosereduktion (0 mM, 0,5 mM) nach mechanischer Belastung bei einem Donor (T4036) unverändert, wohingegen bei den Spenderinnen T4038 und T4385 eine tendenzielle Erhöhung (bis zu 1,7-fach) festgestellt werden konnte. Spender T4383 zeigte wiederum ein gegensätzliches Genexpressionsmuster; hier kam es zu einer Herunterregulation um mindestens 30% (Ergebnisse nicht dargestellt).

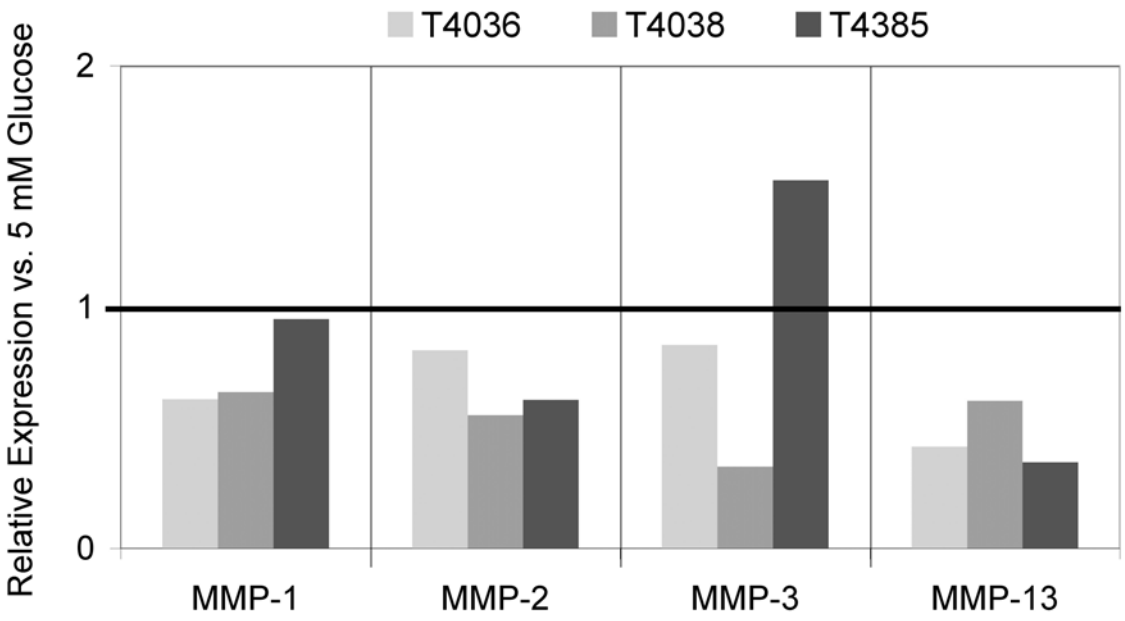


Abbildung 25: Katabole Matrixgenexpression humaner Nukleuszellen verschiedener Spender (n=3) in 3D-Alginatbeads nach mechanischer Belastung (zyklischer hydrostatischer Druck) unter glucosefreien Bedingungen (0 mM) in Bezug auf die Standardglucosekonzentration (5 mM) = Bezugslinie bei 1. MMP: Matrixmetalloproteinase.

Mechanische Belastung führte unter glucosefreien Bedingungen überwiegend zu einer tendenziellen Erniedrigung der Genexpression von Matrixmetalloproteinasen gegenüber 5 mM Glucose (Abbildung 25). Lediglich bei Spenderin T4385 war die MMP-3-Genexpression nach mechanischer Belastung bei 0 mM Glucose im Vergleich zur Standardglucosekonzentration hochreguliert. Bei eingeschränkter Glucoseversorgung (0,5 mM) waren die mechanisch induzierten Effekte häufig geringer als bei glucosefreier Kultivierung.

Nach mechanischer Belastung zeigte Donor T4383 bei Glucosereduktion (0,5 mM) ebenfalls eine tendenziell erniedrigte Genexpression von MMP-1, MM-2 sowie MMP-3; bei MMP-13 kam es jedoch zu einer Erhöhung (+1,4-fach) gegenüber 5 mM Glucose (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Applikation von zyklischem hydrostatischem Druck führte bei einigen Spendern zu einer tendenziellen Erhöhung anaboler Faktoren (Kollagen-Typ-I und Typ-II), während katabole Faktoren (MMP-2, MMP-13) im Vergleich zur Standardglucosekonzentration tendenziell herunterreguliert wurden.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die mechanisch induzierte Genexpression sowohl anaboler als auch kataboler Matrixfaktoren in Abhängigkeit von der Mikroumgebung differentiell reguliert wurde. Dies bedeutet, dass die Nährstoffversorgung

die Responsivität humaner Nukleuszellen auf mechanische Belastung durch zyklischen hydrostatischen Druck beeinflusst.

Um festzustellen, ob die Variation der Glucoseversorgung nicht nur die Genexpression der Nukleuszellen beeinflusst, sondern auch auf Proteinebene nachweisbar ist, wurde ein Glykosaminoglykan (GAG)-Assay durchgeführt. Dabei wurden die Überstände einer Zeitreihe mit Proben eines exemplarischen humanen Spenders (T4371) analysiert und auf GAPDH normiert. Zusätzlich wurde bei diesem Spender auch die Genexpression von Aggrecan bestimmt.
Im Gegensatz zur Aggrecan-Genexpression, die bei Glucosereduktion analog zu den bisherigen Ergebnissen boviner bzw. humaner NP-Zellen bei Spender T4371 ebenfalls herunterreguliert war (-40%), ergab die Proteoglykananalyse am Tag 1 (24 Stunden nach Variation der Glucosekonzentration) noch keine wesentlichen Unterschiede zwischen 0 mM, 0,5 mM und 5 mM Glucose (Ergebnisse nicht dargestellt). Am Tag 3 hingegen konnte die höchste PG-Konzentration bei 5 mM Glucose festgestellt werden, während die PG-Konzentration bei Glucoseunterversorgung deutlich geringer war. Dieses Ergebnis bestätigt zeitverzögert das Genexpressionsprofil boviner NP-Zellen in Abbildung 21 sowie der humanen Spenderinnen T4036, T4038 und T4385 in Abbildung 22 und des Spenders T4371 auf Proteinebene.

24 Stunden nach Variation der Glucoseversorgung zeigte die mittels Trypanblaufärbung bestimmte Viabilität boviner bzw. humaner Nukleuszellen, die in Alginatbeads kultiviert wurden, eine leichte Abnahme mit sinkender Glucosekonzentration. Somit hatte die Nährstoffversorgung im Kurzzeitversuch nur einen geringfügigen Einfluss auf die Zellviabilität (Ergebnisse nicht dargestellt). Dieses Resultat wird durch die Genexpressionsanalyse von p53 bestätigt (3.2.1.1), welche zu diesem frühen Zeitpunkt ebenfalls keinen Hinweis auf einen apoptotischen Zustand der NP-Zellen lieferte.

3.2.2 Ergebnisse aus Dehnungsversuchen

Die Dehnungsversuche unter Variation der Glucosekonzentration wurden nur mit humanen Zellen aus dem Anulus fibrosus durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse wurden aus zweidimensionalen (2D) Monolayer-Kulturen gewonnen. Die Daten aus dem Vergleich

mit dreidimensionalen (3D) Kollagen-Typ-I-Gelen werden gesondert unter 3.7.1.2 beschrieben.

Im Gegensatz zu den Druckexperimenten mit Nukleuszellen in Alginatbeads, die in der 0 mM-Gruppe unter FCS- und glucosefreien Bedingungen erfolgten, wurde bei den Dehnungsexperimenten ein geringer Prozentsatz FCS sowohl im Monolayer (1%) als auch im Kollagen-Typ-I-Gel (1,25%) zugesetzt, welches ebenfalls Glucose enthält, so dass die Anuluszellen dieser Gruppe nicht unter absolut glucosefreien Bedingungen, sondern bei etwa 0,05 mM Glucose kultiviert wurden. Dies muss bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass in Anuluszellen, abweichend von den Ergebnissen aus den (Druck-)Versuchen mit Nukleuszellen, die Variation der Glucoseversorgung und die mechanische Stimulation mittels zyklischer Dehnung nur in Einzelfällen die Regulation der Genexpression beeinflusste.

Um den Einfluss der Glucoseversorgung auf AF-Zellen im Monolayer zu analysieren, wurden die auf GAPDH normierten Expressionswerte des Zielgens bei Glucosereduktion auf die jeweiligen Werte bei der Standardglucosekonzentration (5 mM) bezogen.

Aufgrund der höheren Spendervariabilität humaner Bandscheibenzellen wurden die Ergebnisse individuell dargestellt.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit Nukleuszellen (Abbildung 21, Abbildung 22) konnte bei humanen Anuluszellen keine deutliche Herunterregulation anaboler Matrixgene bei eingeschränkter Glucoseversorgung beobachtet werden. Sowohl bei Aggrecan als auch bei Kollagen-Typ-I, welches die Hauptkomponente der Matrix des Anulus fibrosus darstellt, kam es nur in Einzelfällen zu einer Herunterregulation der Genexpression bei 0,05 mM Glucose im Vergleich zur Standardglucosekonzentration. Bei einer Nährstoffversorgung mit 0,5 mM Glucose konnte bei keinem Spender eine Erniedrigung der Genexpression von Aggrecan bzw. Kollagen-Typ-I gegenüber 5 mM Glucose ermittelt werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Genexpression von MMP-2 hingegen war bei den meisten Spendern sowohl bei sehr niedriger (0,05 mM) als auch bei geringer (0,5 mM) Glucoseversorgung gegenüber der Standardglucosekonzentration deutlich erhöht (Abbildung 26). Bei MMP-3 trat dieser Effekt nur in Einzelfällen bei einer Glucosekonzentration von 0,05 mM auf, dagegen konnte bei 0,5 mM Glucose keine Hochregulation beobachtet werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

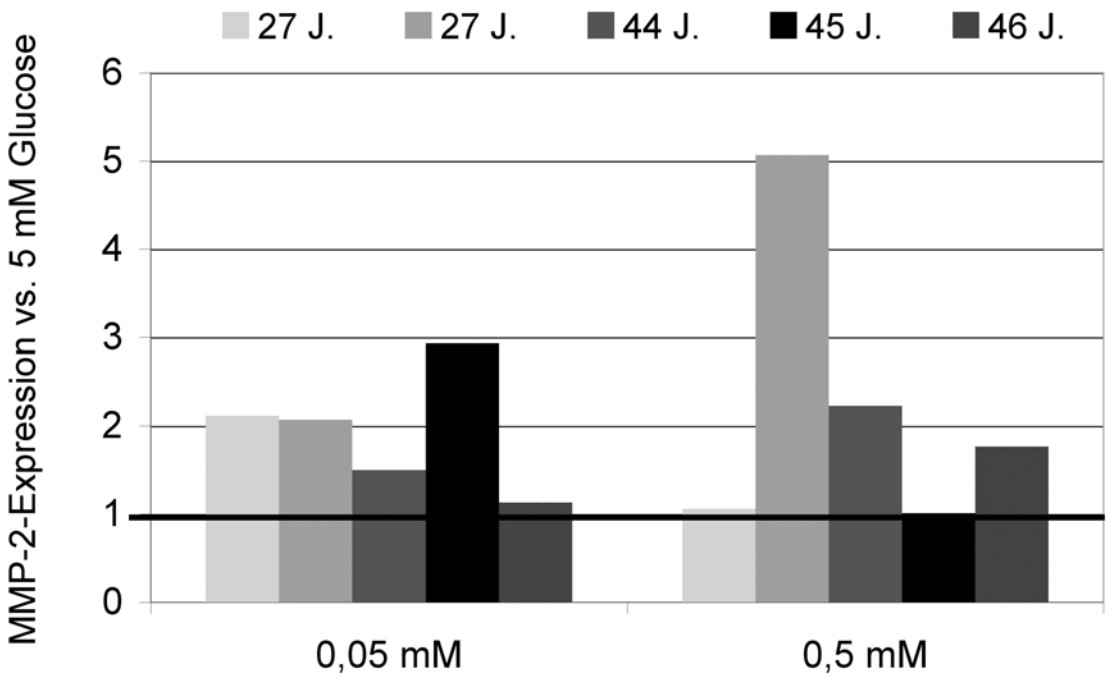


Abbildung 26: Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2)-Genexpression humaner Anuluszellen verschiedener Spender (n=5) im 2D-Monolayer bei Glucosereduktion (0,05 mM, 0,5 mM) in Bezug auf die Standardglucosekonzentration (5 mM) = Bezugslinie bei 1. Angabe des Spenderalters in Jahren (J.). 27 J.: T4385 (hellgrau), T4371 (dunkelgrau), 44 J.: T4395, 45 J.: T4383, 46 J.: T4373.

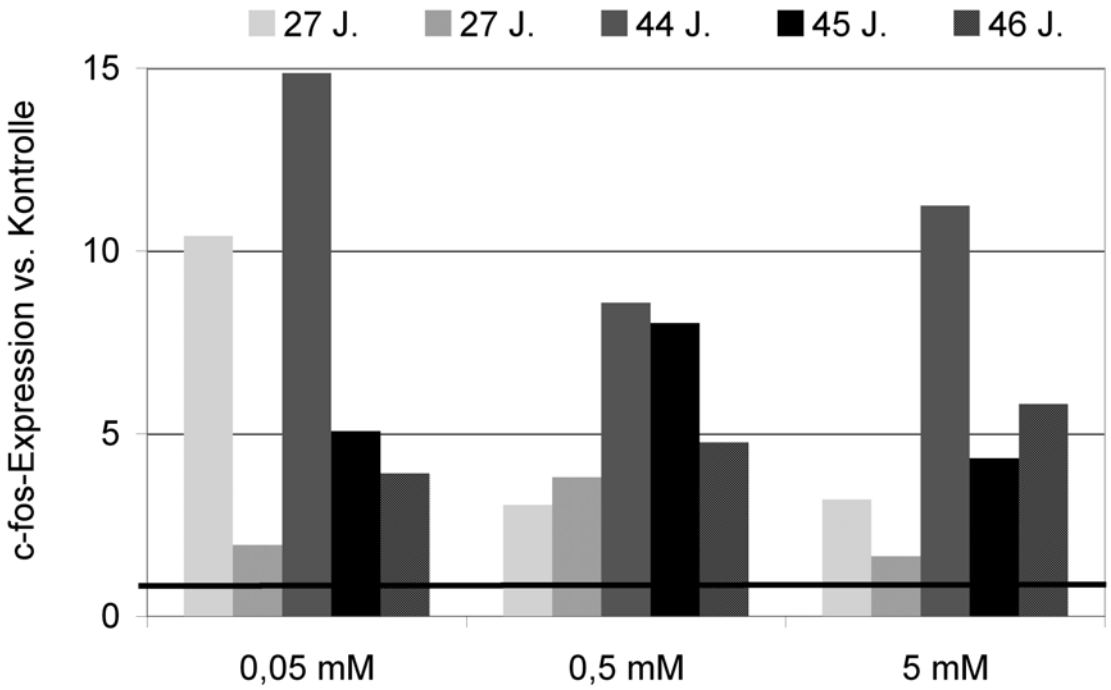


Abbildung 27: c-fos-Genexpression humaner Anuluszellen verschiedener Spender (n=5) im 2D-Monolayer nach mechanischer Belastung (zyklische Dehnung) unter Variation der Glucosekonzentration (0,05 mM, 0,5 mM, 5 mM) in Bezug auf die mechanisch unbelastete Kontrolle = Bezugslinie bei 1. Angabe des Spenderalters in Jahren (J.). 27 J.: T4385 (hellgrau), T4371 (dunkelgrau), 44 J.: T4395, 45 J.: T4383, 46 J.: T4373.

In den 2D-Monolayerkulturen kam es infolge des Dehnungsreizes bei allen Spendern unabhängig von der Glucoseversorgung zu einer Erhöhung der Genexpression von c-fos (Abbildung 27). Jedoch variierte die Genexpressionshöhe der einzelnen Spender sehr stark. So lag bei 0,05 mM Glucose der niedrigste mechanisch induzierte Effekt bei einer Verdopplung der c-fos-Genexpression, wohingegen die maximale Erhöhung der c-fos-Genexpression gegenüber den mechanisch unbelasteten Kontrollen etwa das 15-fache betrug. Es konnte jedoch keine Altersabhängigkeit der Responsivität auf mechanische Reize festgestellt werden.

Bei den weiteren Zielgenen waren Effekte aufgrund mechanischer Belastung nur in Einzelfällen erkennbar, zudem waren diese wesentlich uneinheitlicher und wiesen eine hohe Spendervariabilität auf (Ergebnisse nicht dargestellt).

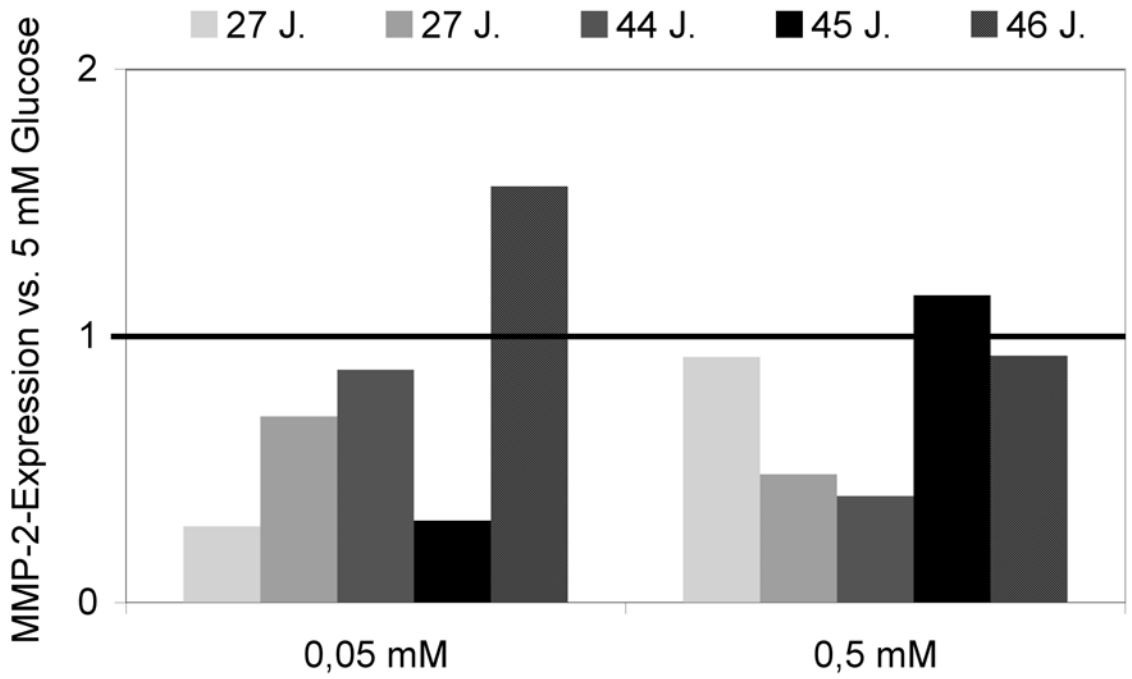


Abbildung 28: Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2)-Genexpression humaner Anuluszellen verschiedener Spender (n=5) im 2D-Monolayer nach mechanischer Belastung (zyklische Dehnung) bei Glucosereduktion (0,05 mM, 0,5 mM) in Bezug auf die Standardglucosekonzentration (5 mM) = Bezugslinie bei 1. Angabe des Spenderalters in Jahren (J.). 27 J.: T4385 (hellgrau), T4371 (dunkelgrau), 44 J.: T4395, 45 J.: T4383, 46 J.: T4373.

Der Einfluss der Nährstoffversorgung auf die dehnungsinduzierten Expressionsänderungen ist am Beispiel der MMP-2-Genexpression dargestellt (Abbildung 28). Bei den meisten Spendern führte mechanische Belastung bei Glucoseunterversorgung zu einer Herunterregulation der MMP-2-Genexpression. In wenigen Fällen hatte die Nährstoffversorgung keinen Einfluss auf die Responsivität der AF-Zellen auf zyklische Dehnung; nur in einem Fall (46 Jahre, T4373) kam es sogar zu einer deutlichen Hochregulation der MMP-2-Genexpression (+55%) bei 0,05 mM Glucose im Vergleich zur Standardglucosekonzentration.

Die Genexpressionshöhe von c-fos wurde nach mechanischer Belastung ebenfalls in Abhängigkeit von der Glucoseversorgung der AF-Zellen unterschiedlich reguliert (Abbildung 27). Jedoch war nicht feststellbar, dass das Genexpressionsniveau bei einer bestimmten Glucosekonzentration am höchsten bzw. am niedrigsten war, da es individuell sehr große Schwankungen gab.

Aufgrund der insgesamt eher geringen mechanischen Effekte konnte ein Einfluss der Nährstoffversorgung auf die Regulation der Genexpression von AF-Zellen nach zyklischer Dehnung nur in Einzelfällen nachgewiesen werden.

Die Viabilität der Anuluszellen wurde im Monolayer mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Es konnte jedoch nach einer Kultivierungsdauer von 24 Stunden kein großer Unterschied zwischen den verschiedenen Glucosekonzentrationen festgestellt werden, so dass davon auszugehen ist, dass Glucosemangel im Kurzzeitversuch keinen negativen Einfluss auf die Zellviabilität hatte. Dieses Ergebnis wird im wesentlichen durch die Auswertung der Viabilität von Nukleuszellen bestätigt (3.2.1.2).

3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse bei Variation der Glucose

- Glucosemangel führte in bovinen und humanen NP-Zellen zu einer Herunterregulation der Genexpression von Aggrecan und Kollagen-Typ-II.
- Geringere GAG-Produktion bei Glucoseunterversorgung, analog zur Aggrecan-Genexpression, jedoch um 48 Stunden zeitverzögert.
- Geringfügige Abnahme der NP-Zellviabilität bei Glucosemangel.
- Die Genexpression matrixabbauender Enzyme war in humanen NP- und AF-Zellen bei Glucosemangel tendenziell erhöht. Mechanische Belastung führte bei Glucosereduktion zu einer tendenziellen Erniedrigung der MMP-Genexpression gegenüber 5 mM Glucose.
- Hydrostatischer Druck erhöhte bei Glucosereduktion tendenziell die Kollagen-Typ-I und Typ-II-Genexpression humaner NP-Zellen im Vergleich zu 5 mM Glucose.
- Es gab keine mechanisch induzierten Effekte auf die Genexpression boviner Nukleuszellen.
- Humane AF-Zellen reagierten auf zyklische Dehnung mit einer erhöhten c-fos-Genexpression. Diese zeigte sowohl individuelle als auch glucoseabhängige Unterschiede.

3.3 Variation des Sauerstoffs

Da die gesunde sowie die leicht degenerierte Bandscheibenmatrix nicht durchblutet ist, ist der Sauerstoffgehalt im Gewebe gegenüber der atmosphärischen Sauerstoffkonzentration deutlich reduziert. In der gesunden Bandscheibe beträgt der Sauerstoffanteil nur etwa 6% und sinkt im Verlauf der Bandscheibendegeneration zunächst weiter ab. Bei stark degenerierten Bandscheiben konnte jedoch das Einwachsen von Blutgefäßen in die Matrix beobachtet werden, wodurch die Sauerstoffversorgung der Bandscheibenzellen über den physiologischen Wert (6% O_2) ansteigt. Diese Veränderungen wurden im Experiment durch unterschiedliche Zufuhr von Stickstoff zur Reduktion des Luftsauerstoffs simuliert.

3.3.1 Ergebnisse aus Dehnungsversuchen

Die Dehnungsversuche unter Variation der Sauerstoffversorgung wurden mit bovinen und humanen Zellen aus dem Anulus fibrosus, die im zweidimensionalen (2D) Monolayer kultiviert wurden, durchgeführt. Die Ergebnisse aus dem Vergleich von 2D-Monolayer-Kultur mit 3D-Kollagen-Typ-I-Gelen sind separat unter 3.7.1.2 beschrieben.

3.3.1.1 Bovine Anuluszellen

Um den Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Genexpression der Anuluszellen zu analysieren, wurden die auf GAPDH normierten Expressionswerte verschiedener Zielgene aus mechanisch unbelasteten Kontrollkulturen sowohl bei erhöhtem (21% O_2) als auch erniedrigtem (1% O_2) Sauerstoffgehalt auf den physiologischen Wert (6% O_2) in der Bandscheibe bezogen.
Im Diagramm sind die Werte bei physiologischer Sauerstoffkonzentration durch die Bezugslinie bei 1 dargestellt.

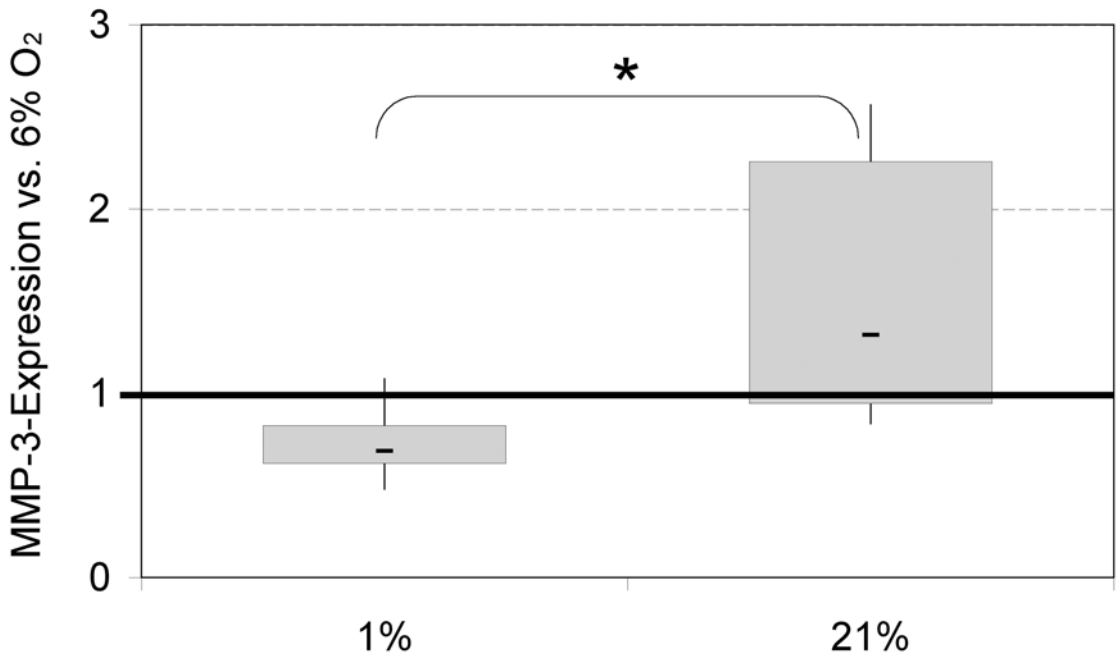


*Abbildung 29: Matrixmetalloproteinase-3 (MMP-3)-Genexpression boviner Anuluszellen (n=6) im 2D-Monolayer bei Sauerstoffunter- (1% O_2) bzw. -überversorgung (21% O_2) in Bezug auf die physiologische Sauerstoffkonzentration (6% O_2) = Bezugslinie bei 1. *p<0,05; Wilcoxon Vorzeichen-Rangsummen Test. Gruppenvergleich (1% O_2 –21% O_2): *p=0,01; Wilcoxon 2-Sample Test.*

Eine erniedrigte Sauerstoffversorgung (1% O_2) führte sowohl gegenüber 6% O_2 (p=0,06) als auch gegenüber 21% O_2 (p=0,01) zu einer Herunterregulation der Genexpression von MMP-3 (Abbildung 29). Die Genexpression von c-fos war sowohl bei 1% O_2 (-95%) als auch bei 21% O_2 (-90%) gegenüber 6% O_2 signifikant erniedrigt (p=0,03). Zudem wies die Genexpressionshöhe von c-fos einen statistisch signifikanten Unterschied (p=0,03) zwischen 1% O_2 und 21% O_2 auf, wobei c-fos bei minimaler Sauerstoffversorgung am geringsten exprimiert war. Dagegen war die Genexpression von Aggrecan von der Sauerstoffversorgung weitgehend unbeeinflusst (Ergebnisse nicht dargestellt).

Neben c-fos als mechanosensitivem Marker wurden als anaboles Matrixgen nur Aggrecan und als kataboles Matrixgen nur MMP-3 untersucht. Weitere Zielgene wurden in diesem Versuchsblock nicht analysiert.

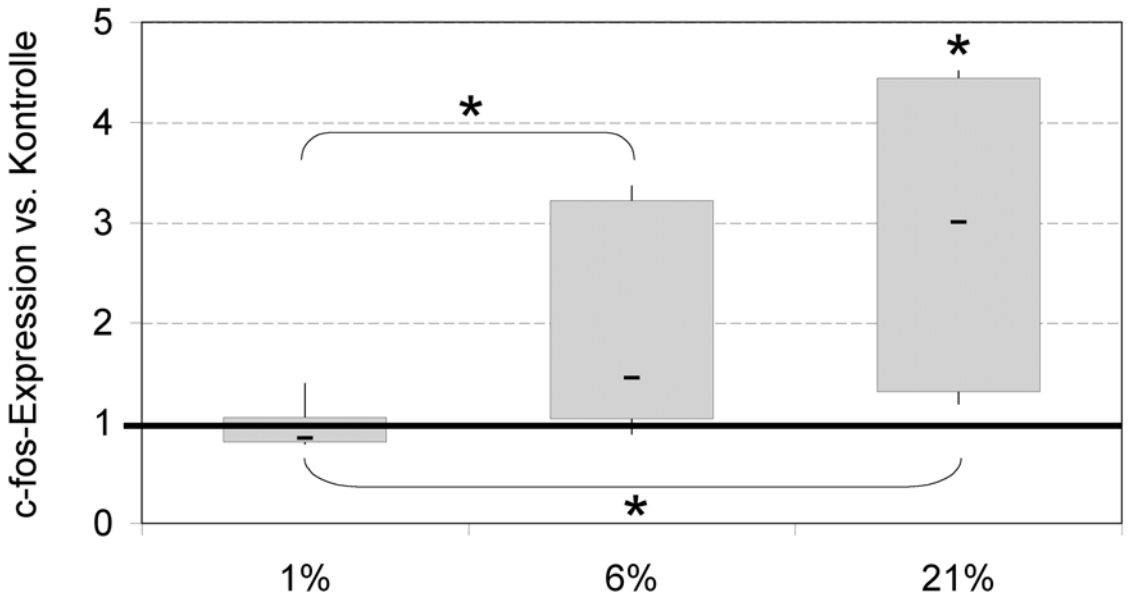


*Abbildung 30: c-fos-Genexpression boviner Anuluszellen (n=6) im 2D-Monolayer nach mechanischer Belastung (zyklische Dehnung) unter Variation der Sauerstoffkonzentration (1% O_2, 6% O_2, 21% O_2) in Bezug auf die mechanisch unbelastete Kontrolle = Bezugslinie bei 1. *p=0,03; Wilcoxon Vorzeichen-Rangsummen Test. Gruppenvergleich (1% O_2 –6% O_2): *p=0,03; Gruppenvergleich (1% O_2 –21% O_2): *p=0,01; Wilcoxon 2-Sample Test.*

Nach Applikation zyklischer Dehnung kam es zu einem Anstieg der Genexpressionshöhe von c-fos mit zunehmendem Sauerstoffgehalt (Abbildung 30). Ein signifikanter mechanischer Effekt (p=0,03) konnte jedoch nur bei einem Sauerstoffanteil von 21% gegenüber der mechanisch unbelasteten Kontrolle beobachtet werden. Die Sauerstoffversorgung beeinflusste jedoch auch die Responsivität boviner AF-Zellen auf zyklische Dehnung, da es zu einem signifikanten Unterschied im Genexpressionsniveau von c-fos zwischen 1% O_2 und 6% O_2 (p=0,03) bzw. 1% O_2 und 21% O_2 (p=0,01) kam. Die Genexpression von Aggrecan wies keine mechanisch induzierten Effekte auf; es gab darüber hinaus auch keine sauerstoffabhängigen Unterschiede. Bezüglich der Genexpression von MMP-3 konnte nach mechanischer Belastung bei 1% Sauerstoffversorgung eine große Streuung der Werte beobachtet werden, wohingegen es bei 6% O_2 zu einer leichten, jedoch signifikanten Erhöhung der Genexpression (+1,4-fach, p=0,03) kam. Zyklische Dehnung führte bei 21% O_2 zu keiner Veränderung der MMP-3-Genexpression.

3.3.1.2 Humane Anuluszellen

Analog zu 3.3.1.1 wurden die mechanisch unbelasteten Expressionswerte verschiedener Zielgene sowohl bei erhöhtem (21% O_2) als auch erniedrigtem (1% O_2) Sauerstoffgehalt auf den physiologischen Wert (6% O_2) in der Bandscheibe bezogen, um sauerstoffabhängige Effekte auf die Genexpression zu ermitteln.

Bei geringster Sauerstoffzufuhr (1% O_2) war die Genexpression von Aggrecan (+100±120%) und Sox-9 (+65±10%) gegenüber den Werten bei physiologischem Sauerstoffgehalt tendenziell erhöht (Ergebnisse nicht dargestellt). Zugleich kam es zu einer deutlichen Herunterregulation der MMP-3-Genexpression bei allen Spenderinnen (-70±10%). Die Genexpressionshöhe von Kollagen-Typ-I und MMP-13 zeigte große spenderabhängige Unterschiede und variierte stark gegenüber 6% O_2.

Eine Erhöhung der Sauerstoffversorgung auf 21% hatte gegenüber 6% O_2 in fast allen Fällen keine großen Effekte auf die Genexpression von Aggrecan und Sox-9. Die Genexpressionswerte von Kollagen-Typ-I, MMP-3 und MMP-13 waren bei 21% O_2 im Vergleich zu 6% O_2 meistens ebenfalls unverändert. Lediglich die jüngste Spenderin T4391 (35 Jahre) bildete eine Ausnahme (Aggrecan: +205%, Kollagen-Typ-I: +145%, MMP-3: -65%, MMP-13: +80%). Im Vergleich zu 1% O_2 waren die Genexpressionswerte von Aggrecan und Sox-9 bei 21% O_2 jedoch alle tendenziell erniedrigt. Bei Kollagen-Typ-I war ein umgekehrtes Genexpressionsmuster erkennbar, da hier die Werte bei 21% O_2 gegenüber 1% O_2 tendenziell erhöht waren.

Insgesamt konnte bei atmosphärischer Sauerstoffversorgung (21% O_2) in den meisten Fällen keine wesentliche Änderung der Genexpression anaboler bzw. kataboler Matrixfaktoren gegenüber den Werten bei physiologischem Sauerstoffgehalt festgestellt werden. Im Gegensatz dazu kam es bei starker Sauerstoffreduktion (1% O_2) tendenziell zu einer Erhöhung der Expression anaboler Matrixgene und einer Verringerung der Expression kataboler Matrixgene gegenüber 6% O_2.

Die Applikation zyklischer Dehnung führte bei allen drei Sauerstoffkonzentrationen zu einem Anstieg der c-fos-Genexpression. Die Responsivität humaner AF-Zellen auf mechanische Reize war hinsichtlich der Genexpression von c-fos nicht von der Sauerstoffversorgung abhängig. Bei den anderen Zielgenen gab es vereinzelt mechanisch induzierte Effekte, die auch durch die Variation der Sauerstoffkonzentration beeinflusst wurden. Aufgrund der Spendervariabilität kam es zu einer hohen Streuung der Werte, die zum Teil gegenläufige Tendenzen aufwiesen. Die meisten Werte waren jedoch nach

mechanischer Stimulation gegenüber den jeweiligen unbelasteten Kontrollen kaum verändert, so dass zyklische Dehnung einen eher geringen Einfluss auf die Genexpression hatte.

3.3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse bei Variation des Sauerstoffs

- Die Genexpression von Aggrecan zeigte lediglich in humanen AF-Zellen bei niedrigem Sauerstoffgehalt (1%) eine Veränderung (Hochregulation) gegenüber 6% O_2.
- Die Genexpression von Sox-9 war in humanen AF-Zellen bei 1% O_2 im Vergleich zu 6% O_2 ebenfalls erhöht.
- Die Genexpression von MMP-3 war in bovinen und humanen AF-Zellen bei Sauerstoffreduktion (1%) gegenüber 6% O_2 erniedrigt.
- Bovine und humane AF-Zellen reagierten auf zyklische Dehnung mit einer erhöhten c-fos-Genexpression. Im Gegensatz zu humanen AF-Zellen kam es in bovinen AF-Zellen zu einem Anstieg der c-fos-Genexpression mit zunehmender Sauerstoffkonzentration.

3.4 Variation des pH

Da es sich bei gesunden sowie leicht degenerierten Bandscheiben um nicht durchblutetes Gewebe handelt, ist das Milieu insbesondere im Zentrum der Bandscheibe anaerob. Daher wird im Zellstoffwechsel Laktat gebildet. Der Abtransport der Metabolite erfolgt durch Diffusion. Im Anfangsstadium der Bandscheibendegeneration kommt es aufgrund der Kalzifikation der Endplatten zu einem verzögerten Abtransport der Metabolite, wodurch sich Laktat in der Bandscheibe anreichert. Infolgedessen verschiebt sich der pH in den sauren Bereich. Diese Veränderungen des pH-Wertes wurden im Experiment durch Zusatz von Salzsäure zu den Zellkulturmedien simuliert.

3.4.1 Ergebnisse aus Druckversuchen

Die Druckversuche unter Variation des pH-Wertes wurden mit bovinen und humanen Zellen aus dem Nukleus pulposus, die in Alginatbeads kultiviert wurden, durchgeführt.

3.4.1.1 Bovine Nukleuszellen

Die auf GAPDH normierten Genexpressionswerte der mechanisch unbelasteten Kontrollen sowie der mittels zyklischem hydrostatischem Druck stimulierten Kulturen wurden jeweils auf den physiologischen pH-Wert (pH 7,2) bezogen und im Diagramm nebeneinander dargestellt (Abbildung 31, Abbildung 32). Dadurch können sowohl der Einfluss der pH-Reduktion als auch mechanisch induzierte Effekte in Bezug auf den physiologischen pH, welcher im Diagramm durch die Bezugslinie bei 1 markiert wird, erfasst werden.

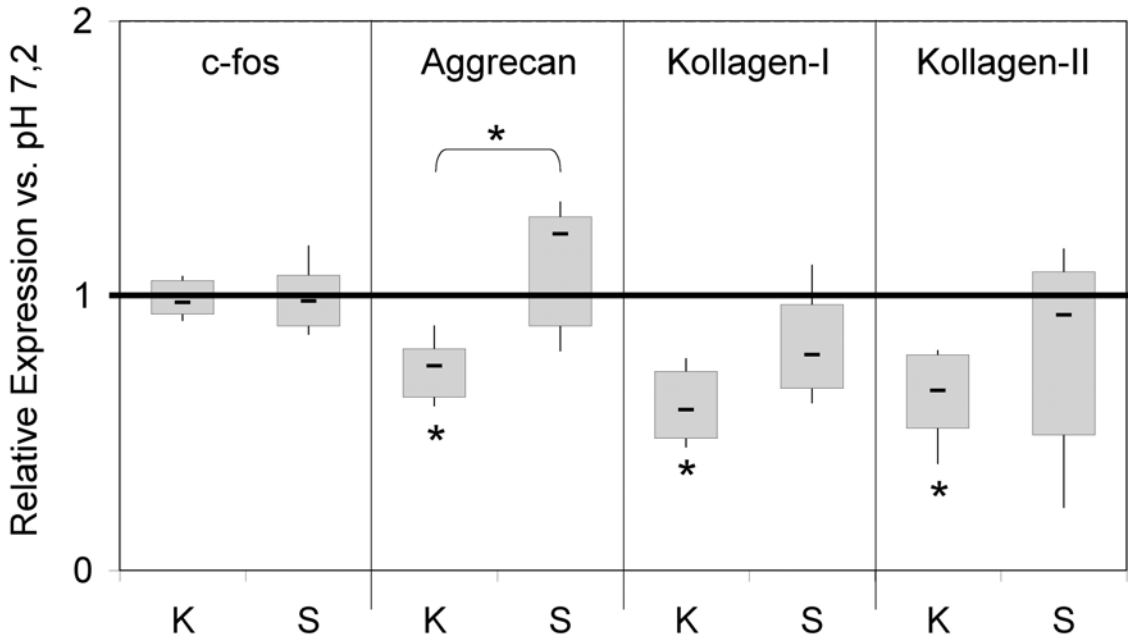


*Abbildung 31: Genexpression boviner Nukleuszellen (n=6) in 3D-Alginatbeads bei pH 6,5 in Bezug auf den physiologischen pH 7,2 = Bezugslinie bei 1. K=mechanisch unbelastete Kontrolle, S=Stimulation mittels zyklischem hydrostatischem Druck. *p=0,03; Wilcoxon Vorzeichen-Rangsummen Test. Gruppenvergleich (Kontrolle-Stimulation): *p=0,008; Wilcoxon 2-Sample Test.*

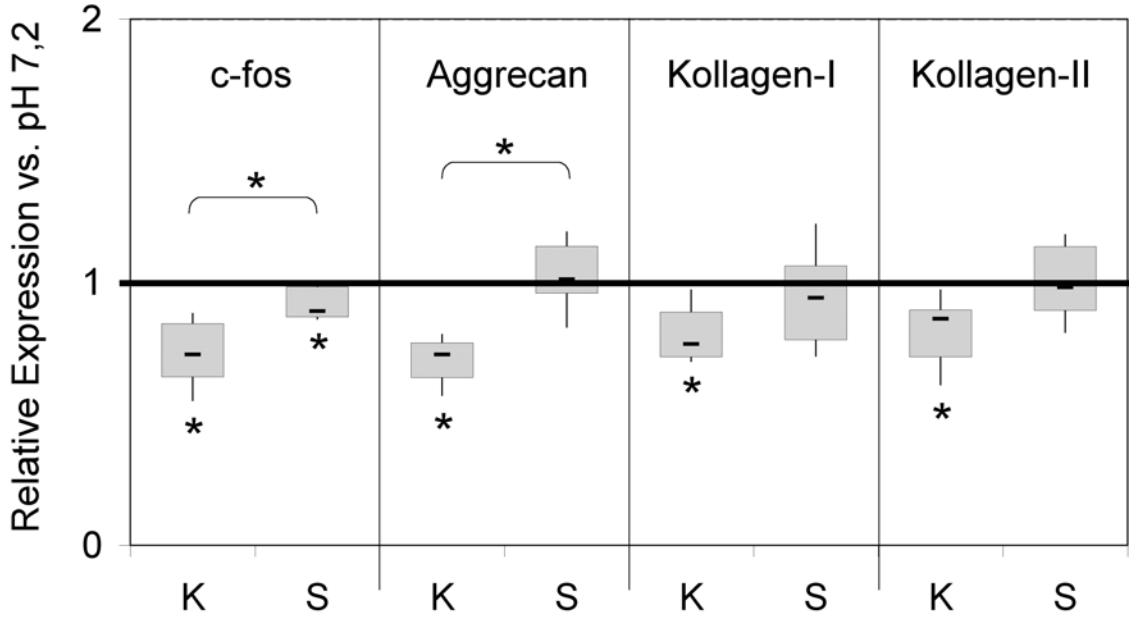


*Abbildung 32: Genexpression boviner Nukleuszellen (n=6) in 3D-Alginatbeads bei pH 6,8 in Bezug auf den physiologischen pH 7,2 = Bezugslinie bei 1. K=mechanisch unbelastete Kontrolle, S=Stimulation mittels zyklischem hydrostatischem Druck. *p=0,03; Wilcoxon Vorzeichen-Rangsummen Test. Gruppenvergleich (Kontrolle–Stimulation): *p≤0,02; Wilcoxon 2-Sample Test.*

Die Ergebnisse zeigen, dass die Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich einen großen Einfluss auf die Genexpression anaboler Matrixfaktoren hatte. Sowohl bei pH 6,5 als auch bei pH 6,8 kam es zu einer signifikanten Herunterregulation der Matrixgene Aggrecan, Kollagen-Typ-I und Typ-II gegenüber dem physiologischen pH-Wert. Infolge mechanischer Belastung wurde die Herunterregulation verringert bzw. aufgehoben. Dieser Effekt war für Aggrecan sowohl bei pH 6,5 ($p=0,008$) als auch bei pH 6,8 ($p=0,005$) statistisch signifikant. Der Unterschied zwischen den Kontroll- und Stimulationsansätzen lag für Kollagen-Typ-I bei pH 6,5 ($p=0,066$) und für Kollagen-Typ-II bei pH 6,8 ($p=0,054$) knapp über dem Signifikanzwert.

Dagegen beeinflusste eine Erniedrigung des pH-Wertes die Genexpression der matrixdegradierenden Enzyme MMP-2 und MMP-3 kaum im Vergleich zu pH 7,2 (Ergebnisse nicht dargestellt). Es kam lediglich bei pH 6,5 zu einer statistisch signifikanten, jedoch geringfügigen Abnahme (< 20%, $p=0,03$) der MMP-2-Genexpression in den mechanisch unbelasteten Kontrollen. Darüber hinaus konnten bei MMP-2 und MMP-3 auch keine mechanisch induzierten Genexpressionsänderungen festgestellt werden.

3.4.1.2 Humane Nukleuszellen

Der Einfluss der pH-Änderung auf die Genexpression humaner Nukleuszellen wurde an einem Donor (T4263) exemplarisch untersucht. Die auf GAPDH normierten Expressionswerte der Zielgene mechanisch unbelasteter Kontrollen und der mittels zyklischem hydrostatischem Druck stimulierten Kulturen wurden jeweils auf den physiologischen pH-Wert (pH 7,2) bezogen.

Wie bereits im bovinen Modell gezeigt, kam es in den mechanisch unbelasteten Kontrollansätzen zu einer tendenziellen Herunterregulation der Kollagen-Typ-I-Genexpression bei pH 6,5 (-30%) und pH 6,8 (-15%) (Ergebnisse nicht dargestellt). Nach mechanischer Stimulation entsprachen die Genexpressionswerte bei pH 6,5 dem Niveau bei physiologischem pH-Wert, so dass aufgrund mechanischer Belastung die durch eine pH-Erniedrigung verursachte Herunterregulation von Kollagen-Typ-I kompensiert werden konnte. Ein mechanisch induzierter Effekt trat bei pH 6,8 nicht auf. Im Gegensatz zum bovinen Modell war die Aggrecan-Genexpression im sauren Milieu sowohl bei pH 6,5 als auch bei pH 6,8 gegenüber den Werten bei physiologischem pH nicht wesentlich verändert, mechanisch induzierte Effekte konnten ebenfalls nicht festgestellt werden.

Bei pH 6,8 war die Genexpression von MMP-3 in den mechanisch unbelasteten Kontrollkulturen gegenüber pH 7,2 tendenziell erhöht (+40%). Nach mechanischer Belastung wurden Werte erreicht, die dem Genexpressionsniveau unter physiologischen pH-Bedingungen entsprachen.

3.4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse bei Variation des pH

- In bovinen NP-Zellen führte eine pH-Erniedrigung (pH 6,5 bzw. 6,8) zu einer signifikanten Herunterregulation anaboler Matrixgene im Vergleich zu pH 7,2.
- Zyklischer hydrostatischer Druck führte in bovinen NP-Zellen sowohl bei pH 6,5 als auch pH 6,8 zu einer Erhöhung der Genexpression anaboler Faktoren gegenüber den mechanisch unbelasteten Kontrollen (bezogen auf pH 7,2).
- Die MMP-Genexpression boviner NP-Zellen war von der pH-Variation und mechanischer Belastung weitgehend unbeeinflusst.
- In humanen NP-Zellen war die Kollagen-Typ-I-Genexpression bei saurem pH tendenziell erniedrigt gegenüber pH 7,2. Mechanische Belastung konnte diesem Effekt bei pH 6,5 entgegenwirken.
- In humanen NP-Zellen konnte eine erhöhte MMP-3-Genexpression bei pH 6,8 nach Druckapplikation auf Werte bei physiologischem pH herunterreguliert werden.

3.5 Regulation angiogener Faktoren

Um den Einfluss der Umgebungsvariation bzw. mechanischer Belastung auf die Genexpression angiogener Faktoren zu analysieren, wurden in den einzelnen Versuchsreihen zusätzlich Pleiotrophin, Midkine und ***v****ascular* ***e****ndothelial* ***g****rowth* ***f****actor* (VEGF) untersucht.

3.5.1 Regulation angiogener Faktoren bei Variation der Osmolarität

Die (Druck-)Versuche wurden mit Bandscheibenzellen aus dem Nukleus pulposus durchgeführt, die in 3D-Alginatbeads 24 Stunden bei unterschiedlicher Osmolarität kultiviert und mittels zyklischem hydrostatischem Druck stimuliert wurden.
Aufgrund der wenigen Effekte, die nach Variation der extrazellulären Osmolarität bzw. mechanischer Stimulation beobachtet werden konnten, wurden die Ergebnisse nicht graphisch dargestellt.
Die auf GAPDH normierten Genexpressionswerte aus den mechanisch unbelasteten Kontrollkulturen wurden auf die Isoosmolarität (400 mOsm) bezogen.
Es konnte jedoch sowohl bei den bovinen als auch bei den humanen NP-Zellen kein Unterschied zwischen der Pleiotrophin-Genexpression bei Hypo- (300 mOsm) und Hyperosmolarität (500 mOsm) im Vergleich zu 400 mOsm festgestellt werden. Dagegen kam es bei 300 mOsm zu einer Erhöhung der Midkine-Genexpression (+60%) und einer Erniedrigung von VEGF (-50%) bei dem Traumapatienten T4301, während bei den anderen beiden Spendern kein Effekt gegenüber 400 mOsm beobachtet werden konnte. Bei 500 mOsm war die Genexpression von Midkine tendenziell sowohl bei T4301 (-30%) als auch bei T4038 (-25%) herunterreguliert, wohingegen die VEGF-Genexpression bei allen drei Spendern gegenüber 400 mOsm unverändert war.
Zur Berechnung mechanisch induzierter Effekte wurden die Genexpressionswerte der mechanisch stimulierten Kulturen auf die jeweiligen mechanisch unbelasteten Kontrollansätze bezogen.
Mechanische Belastung hatte im bovinen Modell sehr geringe, aber statistisch signifikante Effekte auf die Genexpression von Pleiotrophin. Bei 300 mOsm kam es zu einer Herunterregulation (-5%, $p=0{,}004$) und bei 400 mOsm zu einer Hochregulation (+10%, $p=0{,}008$) der Genexpression. Bei den humanen Spendern konnten keine mechanisch

induzierten Effekte auf die Pleiotrophin-Genexpression festgestellt werden. Die Genexpression von Midkine war ebenfalls kaum verändert, lediglich bei Spenderin T4038 kam es bei 500 mOsm zu einer Hochregulation (+85%). Dagegen traten bei 400 mOsm mechanisch induzierte Effekte auf die VEGF-Genexpression bei allen drei Spendern auf, die zu einer tendenziellen Hochregulation (≥ +40%) führten. Bei 500 mOsm war die VEGF-Genexpression nur bei Spenderin T4038 erhöht (+60%).
Zusammenfassend konnten nur vereinzelt osmolaritätsabhängige bzw. mechanisch induzierte Effekte auf die Genexpression angiogener Faktoren beobachtet werden, wobei diese bei den humanen NP-Zellen weitgehend auf die Spender T4038 und T4301 beschränkt waren.

Die (Dehnungs-)Versuche wurden mit humanen Anuluszellen durchgeführt, die im 2D-Monolayer 24 Stunden bei unterschiedlicher Osmolarität kultiviert und durch Applikation zyklischer Dehnung mechanisch stimuliert wurden.
Die Genexpressionswerte aus den mechanisch unbelasteten Kontrollkulturen wurden auf die Isoosmolarität (400 mOsm) bezogen.
Bei 300 mOsm kam es zu einer Herunterregulation der Pleiotrophin-Genexpression bei allen fünf Spenderinnen (-40±12%). Die Genexpression von Midkine war nur bei drei Spenderinnen tendenziell erniedrigt, während bei Spenderin T4359 sowohl Midkine (+40%) als auch VEGF (+60%) gegenüber 400 mOsm erhöht war.
Bei 500 mOsm gab es eine größere individuelle Streuung der Werte von Pleiotrophin und VEGF, während es bei Midkine zu keiner Veränderung der Genexpression gegenüber 400 mOsm kam.
Mechanische Belastung führte häufig zu keiner Genexpressionsänderung. Jedoch kam es bei Spenderin T4359 zu einer Verdopplung der Pleiotrophin-Genexpression bei 300 mOsm und zu einer Herunterregulation (-50%) bei 500 mOsm. Die Genexpression von Midkine war nur bei 400 mOsm bei einer Spenderin (T4337) deutlich verändert (-55%). Dieselbe Spenderin wies bei 400 mOsm eine Erhöhung (+45%) und bei 500 mOsm eine Erniedrigung (-40%) der VEGF-Genexpression auf. Darüber hinaus variierte die VEGF-Genexpression nur bei Spenderin T4359; hier kam es bei 500 mOsm zu einem Anstieg um etwa 90% im Vergleich zu den mechanisch unbelasteten Kontrollen.
Insgesamt hatte die Variation der extrazellulären Osmolarität bzw. mechanische Belastung auch in AF-Zellen keinen großen Einfluss auf die Regulation der Genexpression

angiogener Faktoren. Vereinzelte Genexpressionsänderungen traten überwiegend bei den Spenderinnen T4359 und T4337 auf.

3.5.2 Regulation angiogener Faktoren bei Variation der Glucose

Die Versuche zur Glucosevariation wurden analog zu den Versuchen unter Variation der extrazellulären Osmolarität (3.5.1) durchgeführt. Nukleuszellen wurden hierfür in Alginatbeads kultiviert und durch Druckapplikation mechanisch belastet. Anuluszellen wurden hingegen im Monolayer kultiviert und durch zyklische Dehnung mechanisch stimuliert.

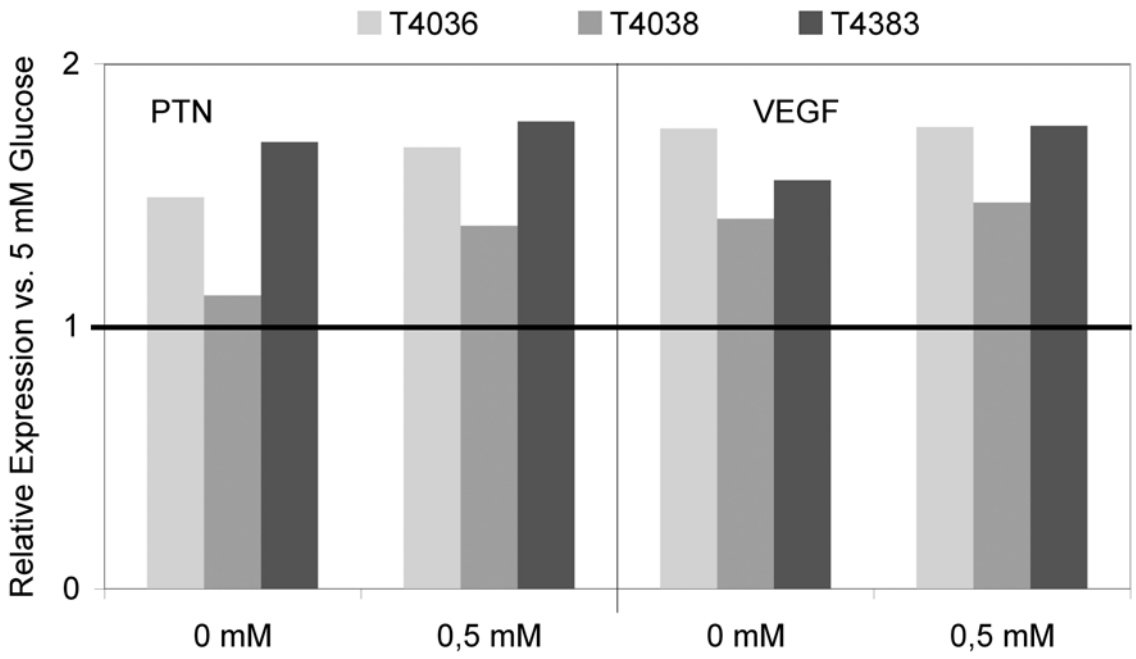


Abbildung 33: Pleiotrophin (PTN)- bzw. vascular endothelial growth factor (VEGF)-Genexpression humaner Nukleuszellen verschiedener Spender (n=3) in 3D-Alginatbeads bei Glucosereduktion (0 mM, 0,5 mM) in Bezug auf die Standardglucosekonzentration (5 mM) = Bezugslinie bei 1.

Bei der Auswertung der Pleiotrophin-Genexpression boviner NP-Zellen in Alginatbeads gab es in den mechanisch unbelasteten Kontrollansätzen bei Glucosereduktion (0 mM, 0,5 mM) keinen signifikanten Unterschied zur Standardglucosekonzentration (5 mM).
Dagegen kam es in den humanen NP-Zellen unter glucosereduzierten Bedingungen bei drei Spendern zu einer tendenziellen Hochregulation von Pleiotrophin und VEGF im Vergleich zu 5 mM Glucose (Abbildung 33). Lediglich bei Spenderin T4385 war die

Genexpression bei Glucosemangel in beiden Fällen um mindestens 40% gegenüber 5 mM Glucose herunterreguliert. Die Genexpression von Midkine des Spenders T4383 war bei Glucosereduktion (0 mM, 0,5 mM) jeweils um das 2,3-fache gegenüber 5 mM Glucose erhöht, während bei den anderen Spenderinnen kaum Veränderungen beobachtet werden konnten.

Mechanische Belastung hatte bei allen drei Glucosekonzentrationen keinen Effekt auf die Pleiotrophin-Genexpression boviner NP-Zellen. Bei humanen NP-Zellen kam es lediglich bei Spenderin T4385 zu einer mechanisch induzierten Herunterregulation der Pleiotrophin-Genexpression (-60%) bei 5 mM Glucose. Dieselbe Spenderin zeigte ebenfalls bei Standardglucoseversorgung eine erniedrigte Genexpression von Midkine (-50%) und VEGF (-30%). Darüber hinaus traten sowohl bei der Genexpression von Midkine als auch von VEGF keine mechanisch regulierten Effekte auf. Eine weitere Ausnahme bildete nur Spender T4383, bei dem es unter vollständiger Glucosereduktion (0 mM) zu einer 2,4-fachen Hochregulation von VEGF in Bezug auf die mechanisch unbelastete Kontrolle kam.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass Nährstoffmangel in Nukleuszellen zu einer tendenziellen Genexpressionserhöhung angiogener Faktoren gegenüber der Standardglucoseversorgung führte. Dagegen gab es nur vereinzelt mechanisch induzierte Effekte.

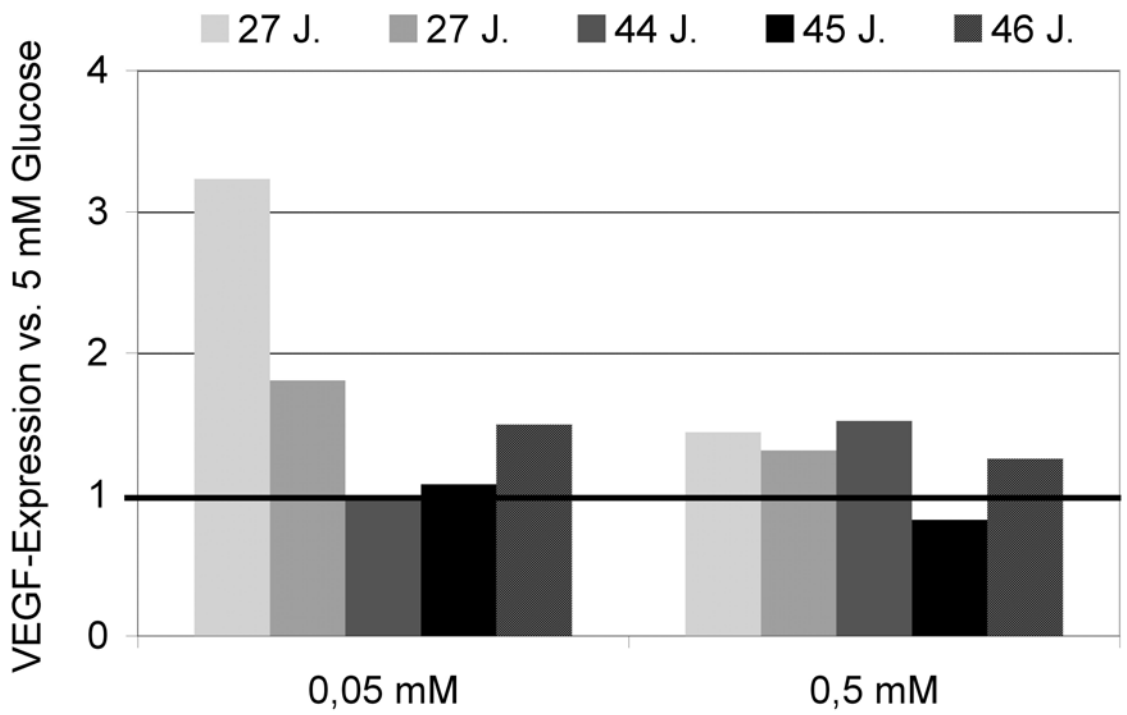


Abbildung 34: vascular endothelial growth factor (VEGF)-Genexpression humaner Anuluszellen verschiedener Spender (n=5) im 2D-Monolayer bei Glucosereduktion (0,05 mM, 0,5 mM) in Bezug auf die Standardglucosekonzentration (5 mM) = Bezugslinie bei 1. Angabe des Spenderalters in Jahren (J.). 27 J.: T4385 (hellgrau), T4371 (dunkelgrau), 44 J.: T4395, 45 J.: T4383, 46 J.: T4373.

Im Monolayer kam es in den mechanisch unbelasteten Kontrollen bei Glucosemangel ebenfalls mehrheitlich zu einer tendenziellen Erhöhung der VEGF-Genexpression humaner AF-Zellen im Vergleich zu 5 mM Glucose (Abbildung 34). Bei der Genexpression von Pleiotrophin und Midkine konnten keine wesentlichen Veränderungen beobachtet werden.
Nach zyklischer Dehnung kam es bei Glucosereduktion nur vereinzelt zu mechanisch induzierten Effekten, die bei VEGF überwiegend zu einer tendenziellen Hochregulation führten. Bei Standardglucoseversorgung hingegen war die VEGF-Genexpression bei den drei Spenderinnen erhöht (≥ 40%), während es bei den zwei männlichen Spendern zu einer Erniedrigung in Bezug auf die mechanisch unbelastete Kontrolle kam.

3.5.3 Regulation angiogener Faktoren bei Variation des Sauerstoffs

Bovine bzw. humane Anuluszellen wurden im 2D-Monolayer 24 Stunden unter Variation der Sauerstoffzufuhr kultiviert und anschließend durch zyklische Dehnung mechanisch stimuliert.

Im bovinen Modell kam es in den mechanisch unbelasteten Kontrollkulturen zu keiner wesentlichen Veränderung der Genexpression von Pleiotrophin unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen. Auch zyklische Dehnung hatte keinen Einfluss auf die PTN-Genexpression boviner AF-Zellen.

Im Vergleich zur physiologischen Sauerstoffkonzentration (6% O_2) kam es bei stark reduzierter Sauerstoffversorgung (1% O_2) in den mechanisch unbelasteten Kontrollen zu einem deutlichen Anstieg der VEGF-Genexpression bei allen vier humanen Spenderinnen (+80±32%). Auch die Genexpression von Pleiotrophin war tendenziell erhöht (+50±30%). Dagegen kam es unter atmosphärischen Sauerstoffbedingungen (21% O_2) nur vereinzelt zu Veränderungen gegenüber 6% O_2.

Zyklische Dehnung hatte kaum einen Einfluss auf die Genexpression angiogener Faktoren im Vergleich zu den mechanisch unbelasteten Kontrollen. So kam es nur bei 6% O_2 zu einer mechanisch induzierten Hochregulation der VEGF-Genexpression (+70%) bei Spenderin T4105 und zu einer tendenziellen Erhöhung der Pleiotrophin-Genexpression (+40%) bei Spenderin T4391.

Abschließend ist festzustellen, dass eine starke Reduktion der Sauerstoffversorgung unter den physiologischen Wert in humanen Anuluszellen allgemein zu einer Hochregulation angiogener Faktoren führte, wohingegen mechanische Belastung die Genexpression sowohl in bovinen als auch in humanen AF-Zellen wenig beeinflusste.

3.5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse bezüglich der Regulation angiogener Faktoren

- Bei 400 mOsm wurde VEGF in humanen NP-Zellen nach Druckapplikation tendenziell höher exprimiert als in den mechanisch unbelasteten Kontrollen.
- Bei 300 mOsm war die PTN-Genexpression humaner AF-Zellen gegenüber 400 mOsm tendenziell herunterreguliert.
- Im Vergleich zur Standardglucoseversorgung führte eine Glucosereduktion zu einer tendenziellen Hochregulation der Genexpression von PTN und VEGF in humanen NP-Zellen und von VEGF in humanen AF-Zellen.
- Im Vergleich zur physiologischen Sauerstoffkonzentration (6%) kam es bei erniedrigter Sauerstoffversorgung (1%) zu einem Anstieg der VEGF- und PTN-Genexpression in humanen AF-Zellen.
- Eine Sauerstofferhöhung auf 21% sowie die Applikation zyklischer Dehnung bei unterschiedlichem O_2-Anteil hatte kaum Einfluss auf die Genexpression angiogener Faktoren.

3.6 Spenderabhängige Einflüsse

Um spenderabhängige Einflüsse auf die Genexpression von Bandscheibenzellen zu untersuchen, wurden die Ergebnisse im Hinblick auf verschiedene Parameter (Alter, Geschlecht, Diagnose) analysiert.

Der Einfluss der Behandlungsursache wurde mit Hilfe von Nukleuszellen bestimmt, die entweder aus Bandscheibengewebe infolge eines Bandscheibenvorfalls (BSV) oder einer Traumabehandlung stammten. Die von jeweils einem exemplarischen Spender gewonnenen NP-Zellen wurden unter Variation der extrazellulären Osmolarität in 3D-Alginatbeads kultiviert und mittels zyklischem hydrostatischen Druck stimuliert. Bei den Spendern handelte es sich um männliche Patienten im Alter von 28 Jahren (BSV, T4247) bzw. 30 Jahren (Trauma, T4301). Der genaue Degenerationsgrad der Gewebeproben konnte jedoch nicht bestimmt werden.

Unter 3.1.1.2 wurden bereits die Ergebnisse aus den Versuchen mit den NP-Zellen dieser beiden Spender beschrieben. Daher soll in diesem Unterkapitel näher auf die Unterschiede im Genexpressionsmuster von degeneriertem bzw. Traumagewebe eingegangen werden.

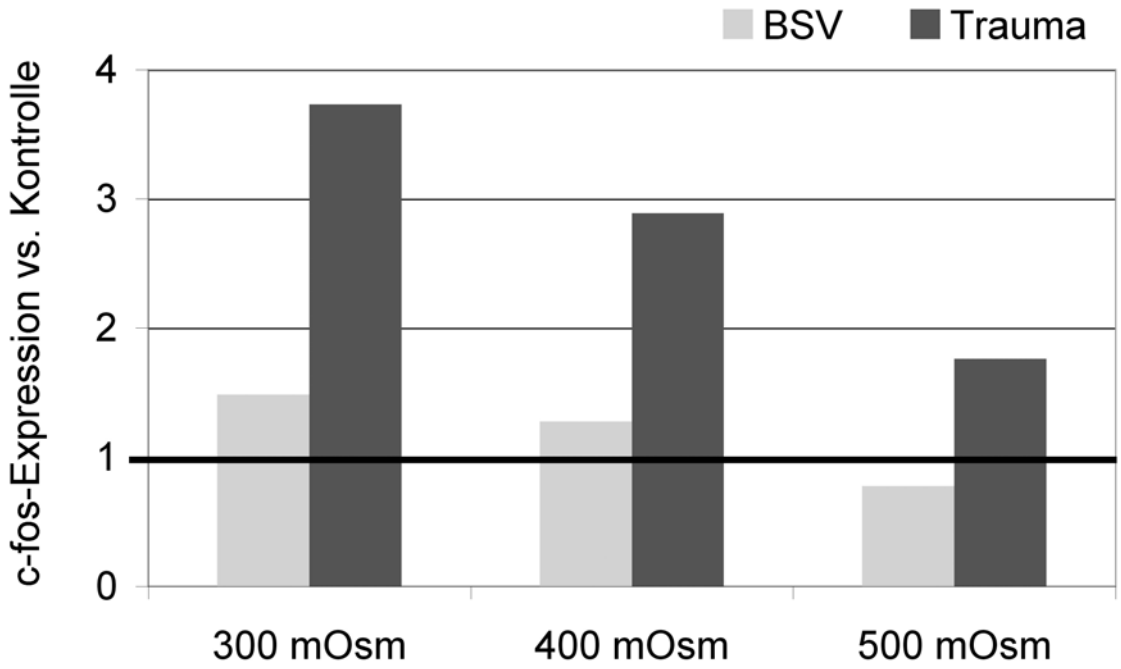


Abbildung 35: c-fos-Genexpression humaner Nukleuszellen verschiedener Spender (jeweils n=1) in 3D-Alginatbeads nach mechanischer Belastung (zyklischer hydrostatischer Druck) unter Variation der extrazellulären Osmolarität (300 mOsm, 400 mOsm, 500 mOsm) in Bezug auf die mechanisch unbelastete Kontrolle = Bezugslinie bei 1. BSV=Bandscheibenvorfall: T4247, Trauma: T4301.

Wie in Abbildung 35 gezeigt, war die Genexpressionshöhe von c-fos nach mechanischer Stimulation bei 300 mOsm in beiden Fällen am höchsten und nahm mit steigender Osmolarität ab. Das Genexpressionsniveau und damit die Responsivität auf mechanische Reize war jedoch bei Nukleuszellen aus Traumagewebe jeweils ungefähr doppelt so hoch wie bei NP-Zellen aus degeneriertem Bandscheibengewebe. Die größten mechanisch induzierbaren Effekte traten bei 300 mOsm auf.

So war beispielsweise die Genexpression von Aggrecan nach mechanischer Belastung nur bei 300 mOsm erhöht; dabei lag das Genexpressionsniveau des Spenders T4301 um etwa 60% höher als das des Spenders T4247 (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Genexpression matrixdegradierender Enzyme (MMPs) wies kaum mechanisch induzierbare Effekte auf. Zudem gab es keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Spendern T4247 und T4301 (Ergebnisse nicht dargestellt).

Dagegen waren die Genexpressionswerte von MMP-1, MMP-2 und MMP-13 im Traumagewebe deutlich erhöht im Vergleich zum degenerierten Bandscheibengewebe des Spenders T4247 (am Beispiel von MMP-2 in Abbildung 36 gezeigt).

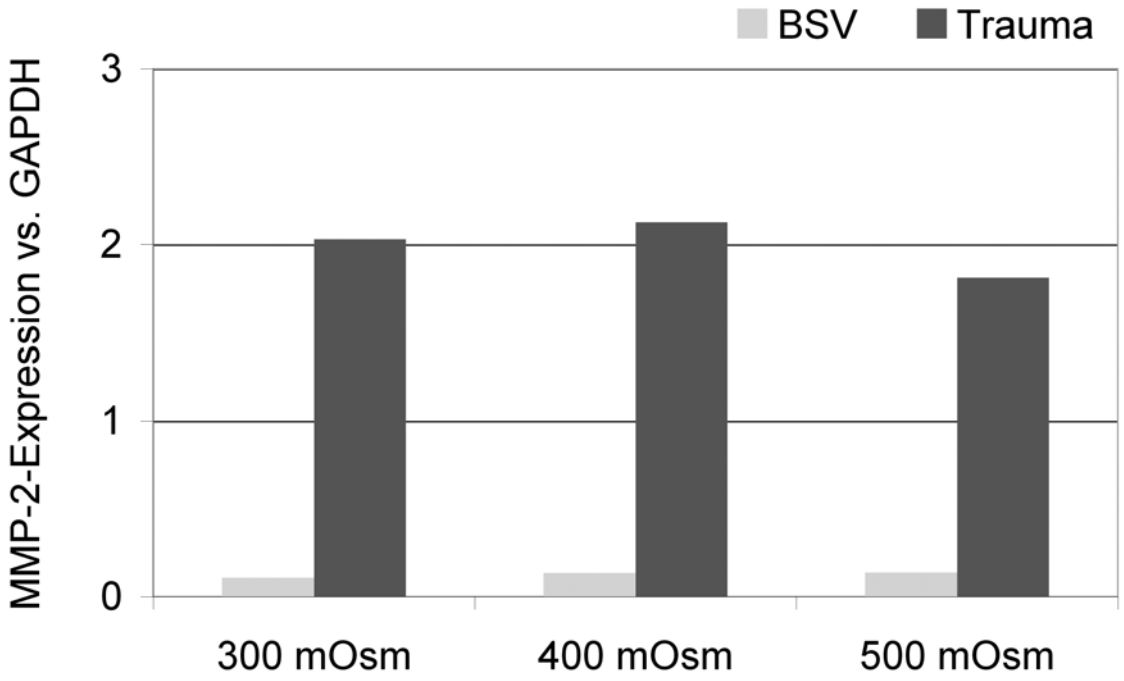


Abbildung 36: Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2)-Genexpression humaner Nukleuszellen verschiedener Spender (jeweils n=1) in 3D-Alginatbeads nach Variation der extrazellulären Osmolarität (300 mOsm, 400 mOsm, 500 mOsm). BSV=Bandscheibenvorfall: T4247, Trauma: T4301.

Der Einfluss des Alters bzw. Geschlechts wurde sowohl an Nukleus- als auch an Anuluszellen untersucht, die entweder in 2D- oder 3D-Kultursystemen unter Variation verschiedener Umgebungsfaktoren kultiviert und mechanisch belastet wurden.

Beispielsweise umfasste das Spenderkollektiv bei den Versuchen mit AF-Zellen, die im 2D-Monolayer unter Variation der extrazellulären Osmolarität kultiviert und mittels zyklischer Dehnung stimuliert wurden, fünf Patientinnen unterschiedlichen Alters.

Wie bereits in Abbildung 18 gezeigt, wies das Genexpressionsniveau von Aggrecan individuelle Unterschiede auf. Jedoch war keine altersabhängige Korrelation erkennbar, da das niedrigste Genexpressionsniveau bei allen drei Osmolaritäten bei den Spenderinnen T4359 (47 Jahre) und T4337 (66 Jahre) auftrat, während bei den Spenderinnen T4339 (44 Jahre) und T4349 (78 Jahre) Aggrecan wesentlich stärker exprimiert wurde. Die höchste Aggrecan-Genexpression war jeweils bei Spenderin T4347 (51 Jahre) zu verzeichnen.

Im Gegensatz dazu war bei der Genexpression des mechanosensitiven Transkriptionsfaktors c-fos in Abbildung 20 deutlich erkennbar, dass die Responsivität der AF-Zellen auf mechanische Belastung bei der ältesten Spenderin (78 Jahre, T4349) am geringsten war. Bei Hypo- und Hyperosmolarität nahm die mechanisch induzierte c-fos-Genexpression ab Spenderin T4347 (51 Jahre) mit zunehmendem Alter ab. Jedoch ist auch bei c-fos insgesamt kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Genexpressionshöhe und dem Alter erkennbar. Da es sich ausschließlich um Patientinnen handelte, sind geschlechtsspezifische Unterschiede als Einflussgröße ausgeschlossen. Dagegen kommen die Diagnose (Bandscheibenvorfall, Osteochondrose, Trauma), der Degenerationsgrad sowie genetische Unterschiede als mögliche Einflussfaktoren in Betracht.

Bei den NP-Zellen, die in 3D-Alginatbeads unter Variation der Glucoseversorgung kultiviert und durch Applikation von zyklischem hydrostatischem Druck stimuliert wurden, bestand das Spenderkollektiv aus drei Patientinnen im Alter zwischen 19 und 27 Jahren (T4036, T4038, beide Traumapatientinnen, T4385, Bandscheibenvorfall) und einem Patienten im Alter von 45 Jahren (T4383, Spondylolisthese).

In den mechanisch unbelasteten Kontrollkulturen war die Kollagen-Typ-I-Genexpression des männlichen Donors T4383 sowohl bei 0 mM als auch bei 0,5 mM Glucose (bezogen auf 5 mM Glucose) deutlich erhöht (+3-fach) im Gegensatz zu den drei Spenderinnen, zwischen denen keine großen Unterschiede im Genexpressionsniveau auftraten (Abbildung 22). Bei den anderen beiden anabolen Matrixgenen Aggrecan und Kollagen-Typ-II trat ein solcher Unterschied bezüglich des Spenders T4383 nicht auf.

Jedoch kam es nach mechanischer Belastung bei Glucoseunterversorgung zu einem umgekehrten Genexpressionsprofil des Spenders T4383 in Bezug auf die Standardglucosekonzentration. Während bei Glucosemangel bei den drei Spenderinnen die mechanisch induzierte Genexpression von Kollagen-Typ-II tendenziell erhöht war (bis zu 2,6-fach), kam es bei Donor T4383 hingegen zu einer deutlichen Erniedrigung der Kollagen-Typ-II-Genexpression um mindestens 50% gegenüber 5 mM Glucose. Auch bei MMP-13 war unter glucosefreien Bedingungen ein inverses Genexpressionsmuster erkennbar, da hier bei Spender T4383 eine mechanisch induzierte Hochregulation der MMP-13-Genexpression (+2,2-fach) gegenüber 5 mM Glucose beobachtet werden konnte, wohingegen es bei den drei Patientinnen zu einer Herunterregulation um mindestens 40% kam.
Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass bei bestimmten Zielgenen die Responsivität auf eine veränderte Nährstoffversorgung bzw. auf mechanische Belastung möglicherweise auch in Abhängigkeit vom Geschlecht, Alter bzw. der Diagnose unterschiedlich reguliert wird.

Darüber hinaus wurden Anuluszellen im 2D-Monolayer unter Variation der Sauerstoffkonzentration kultiviert und mittels zyklischer Dehnung stimuliert. Das Spenderkollektiv war hierbei relativ einheitlich; es bestand aus vier Patientinnen im Alter zwischen 35 und 48 Jahren, die aufgrund von Bandscheibenvorfällen bzw. einer nicht näher beschriebenen degenerativer Erkrankung behandelt wurden.

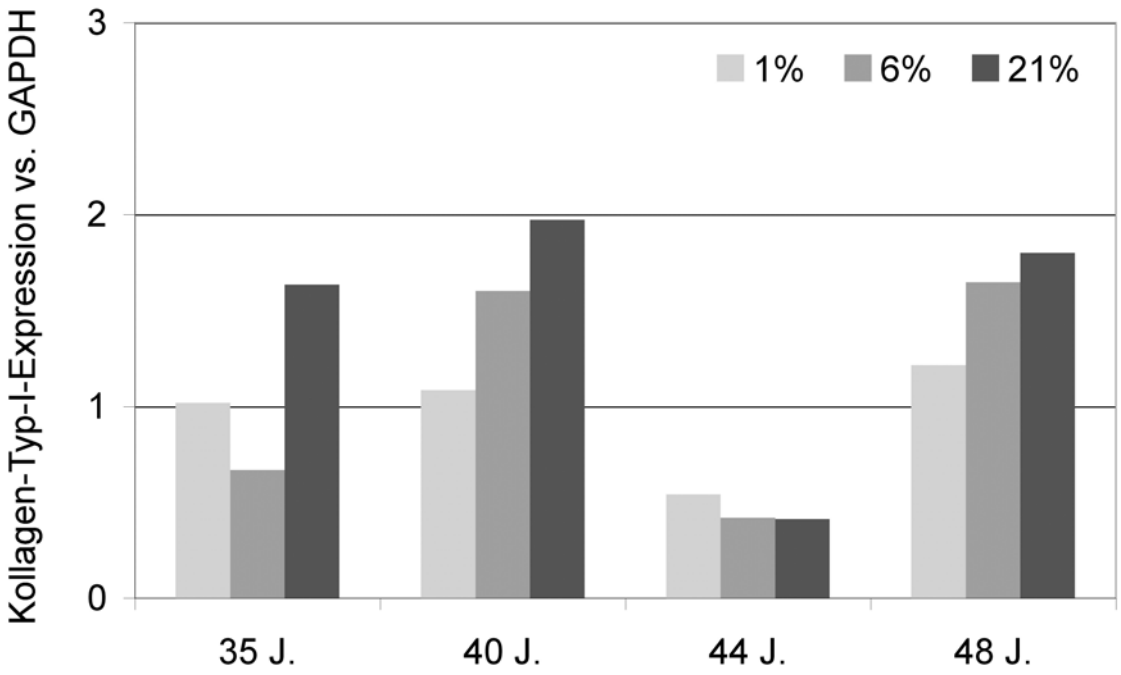


Abbildung 37: Kollagen-Typ-I-Genexpression humaner Anuluszellen verschiedener Spender (n=4) im 2D-Monolayer nach Variation der Sauerstoffversorgung (1%, 6%, 21%). Angabe des Spenderalters in Jahren (J.). 35 J.: T4391, 40 J.: T4381, 44 J.: T4105, 48 J.: T4143.

Wie in Abbildung 37 gezeigt, gab es neben dem Einfluss der Sauerstoffversorgung spenderabhängige Unterschiede im Genexpressionsniveau von Kollagen-Typ-I, die nicht unmittelbar mit dem Alter korrelierbar sind. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der Genexpression weiterer anaboler Faktoren wie Aggrecan und Sox-9 sowie kataboler Faktoren wie MMP-3 und MMP-13 beobachtet (Ergebnisse nicht dargestellt).
Möglicherweise spielen hier Unterschiede im Degenerationsgrad eine Rolle bei der unterschiedlichen Regulation der Genexpression. Aufgrund fehlender Angaben zum Degenerationsgrad der Gewebeproben ist eine genauere Analyse jedoch nicht möglich.

Abschließend ist anzumerken, dass aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit humaner Gewebeproben nur exemplarisch Daten gesammelt werden konnten. Es war daher nicht möglich, die Ergebnisse statistisch auszuwerten. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss deshalb berücksichtigt werden, dass die Daten nur eine deskriptive Aussagekraft besitzen.

3.6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse bezüglich spenderabhängiger Einflüsse

- Im Gegensatz zu NP-Zellen aus Gewebe nach einem Bandscheibenvorfall kam es in NP-Zellen aus Traumagewebe zu einer starken Genexpressionserhöhung von MMPs.
- Zyklischer hydrostatischer Druck führte in NP-Zellen aus Traumagewebe zu einem höheren c-fos-Anstieg als in NP-Zellen aus Gewebe nach einem Bandscheibenvorfall.
- Es gab eine hohe Spendervariabilität, jedoch konnte allgemein keine alters- oder geschlechtsabhängige Korrelation mit einem bestimmten Genexpressionsmuster festgestellt werden.

3.7 Variation des Kultursystems

3.7.1.1 Vergleich 3D-Alginatbeads versus 3D-Kollagen-Typ-I-Gel

Um den Einfluss zweier verschiedener dreidimensionaler Kultursysteme auf die Genexpression *in vitro* zu ermitteln, wurden bovine Nukleuszellen von drei gepoolten Spendern einerseits in Alginatbeads und andererseits in Kollagen-Typ-I-Gelen 24 Stunden unter Variation der extrazellulären Osmolarität bzw. der Glucoseversorgung kultiviert und anschließend mechanisch durch zyklischen hydrostatischen Druck stimuliert.
Die Ergebnisse zeigten, dass das Kultursystem die Reaktion der Bandscheibenzellen auf Veränderungen der Umgebungsbedingungen bzw. auf mechanische Reize beeinflusste.

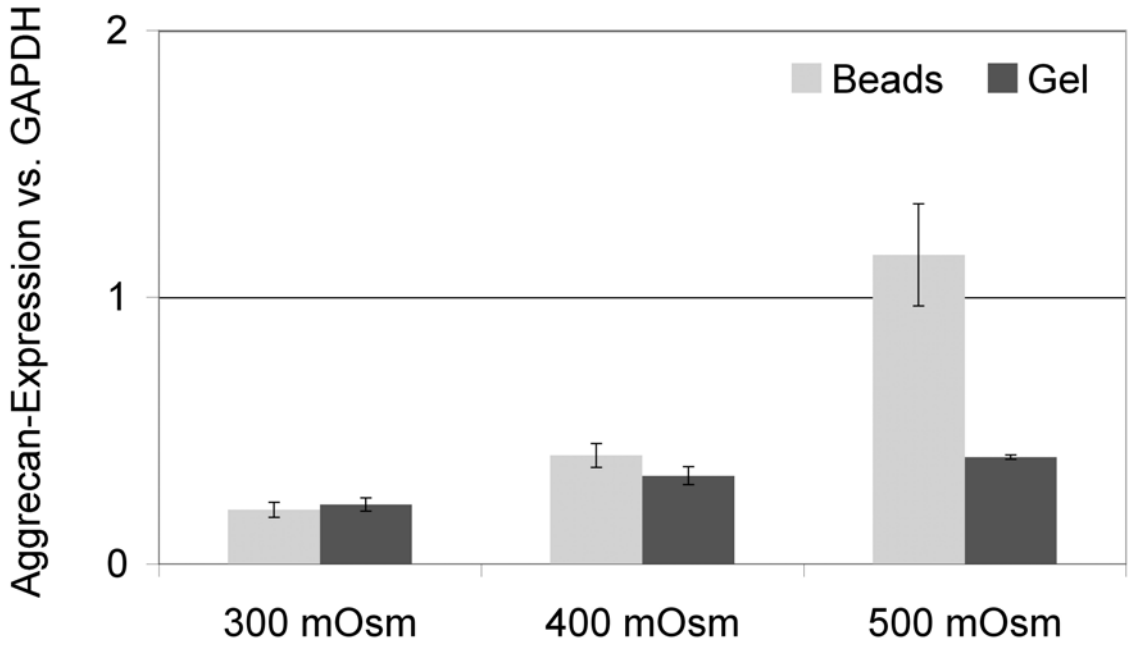


Abbildung 38: Aggrecan-Genexpression boviner Nukleuszellen (n=3) nach Variation der extrazellulären Osmolarität (300 mOsm, 400 mOsm, 500 mOsm). Vergleich zweier 3D-Kultursysteme: Beads=Alginatbeads (hellgraue Säulen), Gel=Kollagen-Typ-I-Gel (dunkelgraue Säulen).

Nach Veränderung der Osmolarität war beispielsweise das Genexpressionsniveau von Aggrecan, der Hauptkomponente der NP-Matrix, bei 300 mOsm und 400 mOsm in beiden Kultursystemen ähnlich hoch (Abbildung 38). Erst bei 500 mOsm kam es zu einem ungefähr dreifachen Anstieg der Genexpressionshöhe von Aggrecan in den Alginatbeads im Vergleich zu den Kollagen-Typ-I-Gelen. Die Genexpression von Kollagen-Typ-I und

Typ-II hingegen war bei allen drei Osmolaritäten in den Kollagen-Typ-I-Gelen deutlich erhöht gegenüber den Alginatbeads (Ergebnisse nicht dargestellt).

Dagegen waren die katabolen Matrixgene Aggrecanase-1, MMP-2 und MMP-3 in den Alginatbeads wesentlich geringer exprimiert als in den Kollagen-Typ-I-Gelen (Ergebnisse nicht dargestellt).

Mechanisch induzierte Effekte wirkten sich in den Alginatbeads ebenfalls günstiger aus im Hinblick auf den Matrixabbau. In den meisten Fällen war nach mechanischer Belastung das Genexpressionsniveau matrixdegradierender Enzyme in den Alginatbeads niedriger als in den Kollagen-Typ-I-Gelen (hier am Beispiel von Aggrecanase-2 in Abbildung 39 gezeigt). Bei den anabolen Matrixgenen konnten bei allen drei Osmolaritäten sowohl in den Alginatbeads als auch in den Kollagen-Typ-I-Gelen kaum mechanisch induzierte Veränderungen beobachtet werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

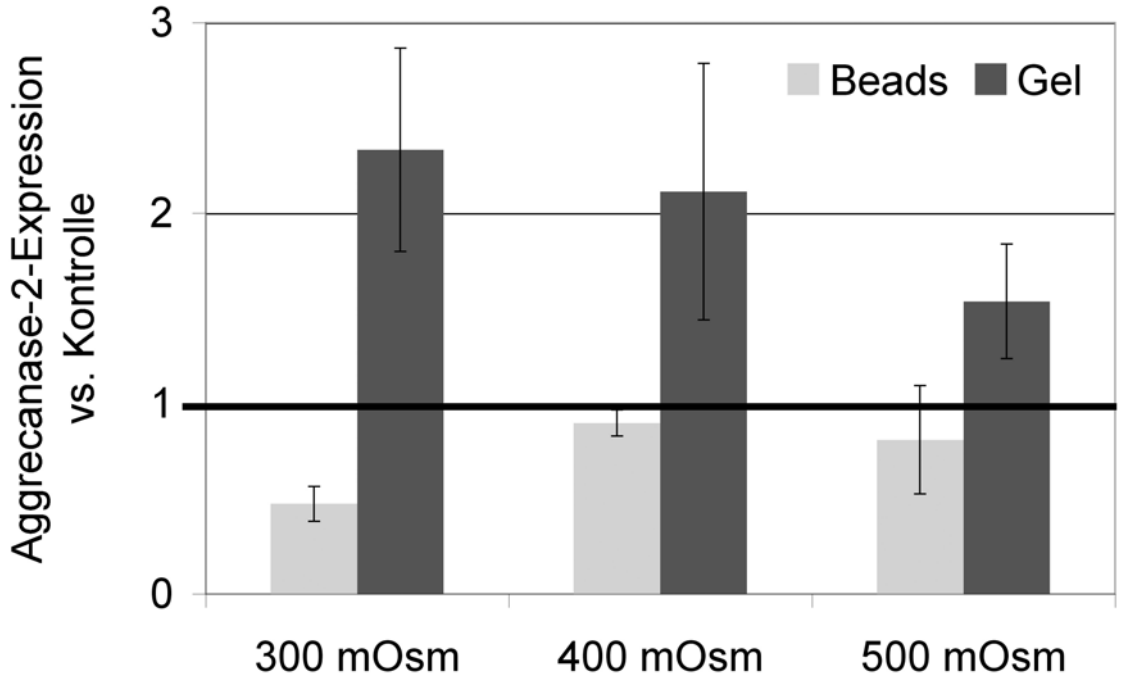


Abbildung 39: Aggrecanase-2-Genexpression boviner Nukleuszellen (n=3) nach mechanischer Belastung (zyklischer hydrostatischer Druck) unter Variation der extrazellulären Osmolarität (300 mOsm, 400 mOsm, 500 mOsm) in Bezug auf die mechanisch unbelastete Kontrolle = Bezugslinie bei 1. Vergleich zweier 3D-Kultursysteme: Beads=Alginatbeads (hellgraue Säulen), Gel=Kollagen-Typ-I-Gel (dunkelgraue Säulen).

Das Kultursystem hatte bei unterschiedlicher Nährstoffversorgung ebenfalls Einfluss auf die Genexpression.

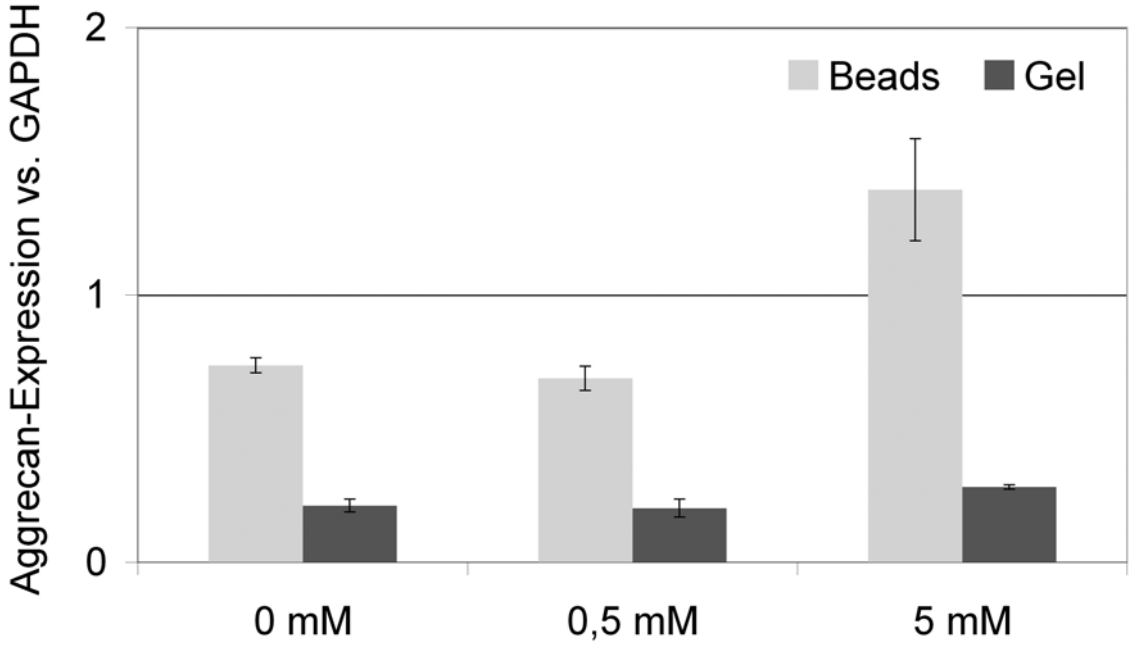


Abbildung 40: Aggrecan-Genexpression boviner Nukleuszellen (n=3) nach Variation der Glucosekonzentration (0 mM, 0,5 mM, 5 mM). Vergleich zweier 3D-Kultursysteme: Beads=Alginatbeads (hellgraue Säulen), Gel=Kollagen-Typ-I-Gel (dunkelgraue Säulen).

Während Aggrecan in den Alginatbeads bei allen drei Glucosekonzentrationen mindestens dreifach höher exprimiert wurde als in den Kollagen-Typ-I-Gelen (Abbildung 40), war das Genexpressionsprofil von Kollagen-Typ-I genau umgekehrt (Ergebnisse nicht dargestellt). Bei Kollagen-Typ-II kam es lediglich bei 5 mM Glucose zu einem Unterschied im Genexpressionsniveau, wobei dieses in den Alginatbeads beinahe doppelt so hoch war wie in den Kollagen-Typ-I-Gelen.

In den Alginatbeads war die Genexpression von MMP-2 tendenziell und die Genexpression von MMP-3 deutlich niedriger als in den Kollagen-Typ-I-Gelen.

Mechanische Stimulation erzeugte sowohl in den Alginatbeads als auch in den Kollagen-Typ-I-Gelen nur geringe Effekte, so dass das Kultursystem bei mechanischer Belastung eine untergeordnete Rolle spielte.

Insgesamt lassen die Ergebnisse im Hinblick auf den Matrixumsatz vermuten, dass Alginatbeads eine bessere Alternative zu den Kollagen-Typ-I-Gelen für die Kultivierung von NP-Zellen darstellen.

3.7.1.2 Vergleich 2D-Monolayer versus 3D-Kollagen-Typ-I-Gel

Um den Einfluss zwei- bzw. dreidimensionaler Kultivierung auf die Genexpression *in vitro* zu untersuchen, wurden humane Anuluszellen im 2D-Monolayer bzw. im 3D-Kollagen-Typ-I-Gel entweder unter Variation der extrazellulären Osmolarität, der Glucose- oder der Sauerstoffversorgung kultiviert und anschließend durch zyklische Dehnung stimuliert.

Die Ergebnisse zeigten, dass das Genexpressionsniveau zum Teil ebenfalls in Abhängigkeit vom Kultursystem variierte.

Bei den Osmolaritätsversuchen waren beispielsweise Aggrecan und Kollagen-Typ-I im 2D-Monolayer tendenziell höher exprimiert als in den Kollagen-Typ-I-Gelen. Bei Sox-9 und MMP-3 hingegen war eine solche Zuordnung nicht möglich (Ergebnisse nicht dargestellt).

Auch die Mechanosensitivität der AF-Zellen, die mittels der Genexpression von c-fos untersucht wurde, war bei den Osmolaritätsversuchen nicht prinzipiell in einem Kultursystem höher als im anderen Kultursystem. In einigen Fällen konnte eine relativ gute Übereinstimmung der Genexpressionshöhe von c-fos im Monolayer bzw. Kollagen-Typ-I-Gel festgestellt werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Bei den Glucose- und Sauerstoffversuchen waren die anabolen Matrixgene Aggrecan und Kollagen-Typ-I sowie das katabole Matrixgen MMP-3 im Monolayer tendenziell höher exprimiert als im Kollagen-Typ-I-Gel.

Nach mechanischer Belastung gab es keine wesentlichen Unterschiede im Genexpressionsniveau zwischen 2D- und 3D-Kultivierung. Lediglich bei den Sauerstoffversuchen konnte eine höhere Genexpression von c-fos im Monolayer beobachtet werden.

Aufgrund der vorliegenden Genexpressionsergebnisse konnte nicht festgestellt werden, dass es in einem Kultursystem ein wesentlich günstigeres Verhältnis anaboler bzw. kataboler Faktoren bezüglich des Matrixumsatzes gab.

3.7.2 Zusammenfassung der Ergebnisse bei Variation des Kultursystems

- In bovinen NP-Zellen wurde Aggrecan in den Alginatbeads tendenziell stärker exprimiert als in den Kollagen-Typ-I-Gelen.
- Die Kollagen-Typ-I-Genexpression boviner NP-Zellen war in den Alginatbeads niedriger als in den Kollagen-Typ-I-Gelen.
- In bovinen NP-Zellen war die Genexpression matrixdegradierender Enzyme in den Alginatbeads tendenziell geringer als in den Kollagen-Typ-I-Gelen.
- Zyklischer hydrostatischer Druck erzeugte in beiden Kultursystemen (Alginatbeads, Kollagen-Typ-I-Gel) nur geringe Effekte.
- Im Vergleich zu Kollagen-Typ-I-Gelen konnte im Monolayer eine tendenziell höhere Genexpression von Aggrecan und Kollagen-Typ-I in humanen AF-Zellen beobachtet werden.
- Zyklische Dehnung führte in beiden Kultursystemen zu einem Anstieg der c-fos-Genexpression humaner AF-Zellen.

4 Diskussion

4.1 Variation der Osmolarität

4.1.1 Einfluss der veränderten Mikroumgebung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Variation der extrazellulären Osmolarität die Expression anaboler und kataboler Matrixgene in Bandscheibenzellen beeinflusste.

Wie bereits in einer früheren Studie von Würtz et al. beschrieben [206], veränderte eine variierte extrazelluläre Osmolarität das Genexpressionmuster humaner NP- und AF-Zellen im Hinblick auf die anabolen Matrixfaktoren Aggrecan, Kollagen-Typ-I und Typ-II. Sowohl bei humanen NP- als auch AF-Zellen, die in 3D-Kollagen-Typ-I-Gelen über fünf Tage kultiviert wurden, konnten Würtz et al. einen Anstieg der Aggrecan-Genexpression mit zunehmender Osmolarität beobachten. Obwohl in der vorliegenden Arbeit sowohl für bovine und humane NP-Zellen (3D-Alginatbeads) als auch für humane AF-Zellen (2D-Monolayer) ein anderes Kultursystem verwendet wurde und die Kultivierungsdauer unter variierter Osmolarität nur 24 Stunden betrug, konnte dieser Verlauf der Aggrecan-Genexpression in beiden Spezies weitgehend bestätigt werden. Dagegen waren die Daten der Genexpressionsanalysen von Kollagen-Typ-I und Typ-II nur zum Teil in Einklang mit der früheren Studie. Obwohl die Ergebnisse einer Herunterregulation der Kollagen-Typ-II-Genexpression humaner NP- und AF-Zellen bei 300 mOsm in der vorliegenden Arbeit mit den Befunden von Würtz et al. übereinstimmten, konnten die Ergebnisse der Kollagen-Typ-II-Genexpression bei 500 mOsm jedoch nur in Einzelfällen die früheren Befunde einer erhöhten Genexpression bestätigen [206]. Zudem war in der vorliegenden Arbeit die Genexpression von Kollagen-Typ-I in humanen AF-Zellen bei 300 mOsm gegenüber 400 mOsm kaum verändert oder tendenziell herunterreguliert, wohingegen Würtz et al. einen Anstieg im Vergleich zu 400 mOsm detektieren konnten [206]. Diese Unterschiede im Genexpressionsprofil könnten auf die Verwendung verschiedener Kultursysteme und die hohe Spendervariabilität humaner Proben zurückzuführen sein.

Haschtmann et al. simulierten tageszeitliche Schwankungen der extrazellulären Osmolarität durch eine achtstündige Kultivierung unter isoosmolaren Bedingungen im Wechsel mit einer 16-stündigen Kultivierung unter hyperosmolaren Bedingungen [65].

Der Einfluss der Osmolarität wurde in einer Organkultur aus Kaninchen über den Verlauf von 28 Tagen untersucht. Am Tag 7 und Tag 21 konnte ebenfalls eine höhere Aggrecan-Genexpression in hyperosmolaren Kulturen im Vergleich zur Isoosmolarität festgestellt werden, was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmt.
Dagegen konnten Chen et al. in einer Studie an isolierten NP-Zellen aus Schweinen keine deutlichen Veränderungen der Expression anaboler Matrixgene sowohl bei Hypo- als auch bei Hyperosmolarität detektieren [36]. Als mögliche Ursachen für die voneinander abweichenden Befunde kommt einerseits die Einstellung unterschiedlicher Osmolaritätswerte (z.B. geringere Isoosmolarität) in Betracht, andererseits aber auch die Verwendung verschiedener Spezies.
In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl die Genexpression anaboler als auch kataboler Matrixfaktoren untersucht. Da in degenerierten Bandscheiben die extrazelluläre Osmolarität infolge der Proteoglykanabbaus sinkt, könnten die Genexpressionsergebnisse unter hypoosmolaren Bedingungen Hinweise auf die Beteiligung matrixdegradierender Enzyme bei der BS-Degeneration liefern. In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass die MMP-3-Genexpression boviner NP-Zellen bei 300 mOsm signifikant anstieg. Auch in humanen AF-Zellen fand sich bei der ältesten Spenderin (78 Jahre) mit einer degenerativen Erkrankung eine zweifache Erhöhung der MMP-3-Genexpression unter Hypoosmolarität. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass eine erhöhte MMP-Transkription eine wichtige Rolle bei degenerativen Prozessen spielt. Diese Hypothese wird durch Daten aus der Literatur unterstützt. Nemoto et al. untersuchten die MMP-3-Synthese in gesunden und degenerierten humanen Bandscheiben und fanden heraus, dass die MMP-3-Expression in degenerierten Bandscheiben signifikant erhöht war [134]. Bei der Analyse humaner Bandscheiben konnten Weiler et al. ebenfalls feststellen, dass es eine signifikante Korrelation zwischen der MMP-Expression und degenerativen Symptomen (z.B. Risse) gab [198]. Auch Rutges et al. konnten zeigen, dass die Enzymaktivität signifikant mit dem Degenerationsgrad korrelierte [163]. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit nicht generell ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Transkription kataboler Matrixgene und einer hypoosmolaren Umgebung ermittelt werden. Diese Befunde weisen auf eine komplexe Regulation der Matrixenzyme in Bezug auf die BS-Degeneration hin.
Zur Verifizierung der Genexpressionsdaten von Aggrecan auf Proteinebene wurde die Glykosaminoglykan-Konzentration bestimmt. Mit steigender Osmolarität konnte in der vorliegenden Arbeit eine Zunahme der GAG-Produktion humaner NP-Zellen beobachtet

werden. Diese Ergebnisse bestätigten die Auswertung der Aggrecan-Genexpression auf Proteinebene mit einer zeitlichen Verzögerung um 48 Stunden.

In einer Studie konnten Ishihara et al. ebenfalls beobachteten, dass bovine NP-Zellen auf eine Erhöhung der extrazellulären Osmolarität von 280 mOsm auf 430 mOsm mit einer Verdopplung der Proteoglykansynthese reagierten [87]. Haschtmann et al. hingegen konnten keine großen Unterschiede zwischen der GAG-Konzentration bei Iso- und bei Hyperosmolarität zu verschiedenen Zeitpunkten über einen Zeitraum von 4 Wochen feststellen [65]. Allerdings wurde diese Studie an einer Organkultur aus 4-6 Monate alten Kaninchen durchgeführt, welche in diesem Stadium notochordale Bandscheibenzellen besitzen [178]. Im Gegensatz zu Kaninchen wird dieser Zelltyp, der sich bei der Embryogenese aus dem Notochord entwickelt [162], bei Rindern bis zur Geburt und beim Menschen bis zum frühen Kindesalter weitgehend durch einen knorpeligen Zelltyp ersetzt [31, 146, 147]. Daher weisen die Bandscheiben der für die beiden Studien verwendeten Tierarten im Nukleus pulposus verschiedene Zelltypen auf, was zu unterschiedlichen Reaktionen führen kann. Neben speziesspezifischen Unterschieden könnte auch die Kultivierung der Bandscheibenzellen in ihrer physiologischen Matrix statt in einer artifiziellen 3D-Matrix (Alginatbeads) eine Rolle spielen.

Analog zu der vorliegenden Arbeit wurden in einer Studie von Takeno et al. bovine NP-Zellen in einer Konzentration von 4 Mio Zellen/ml in Alginatbeads ausgesät, jedoch über einen Zeitraum von 2 bzw. 6 Tagen bei 21% O_2 und mit 6% FCS-haltigem Medium kultiviert [180]. Durch Zugabe von NaCl wurden verschiedene Osmolaritäten zwischen 270 mOsm und 570 mOsm eingestellt. Abweichend von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten die Autoren jedoch ein Maximum der GAG-Produktion bei 370 mOsm feststellen, was ungefähr dem physiologischen Wert im NP-Gewebe entspricht. Im Vergleich dazu war die GAG-Synthese bei Hypo- und Hyperosmolarität verringert, wobei die Werte bei 570 mOsm jeweils höher waren als bei 270 mOsm. In der vorliegenden Arbeit konnte die niedrigste GAG-Konzentration ebenfalls bei Hypoosmolarität detektiert werden, jedoch wurde der höchste Wert bei 500 mOsm gemessen. Dieser Unterschied könnte darauf zurückzuführen sein, dass Takeno et al. bovine statt humaner NP-Zellen verwendet haben und der Kultivierungszeitraum von 24 Stunden auf 48 Stunden bzw. 6 Tage verlängert wurde. Zudem wurden die Zellen nicht serumfrei und auch nicht bei physiologischem Sauerstoffgehalt (6% O_2) kultiviert, wie in der vorliegenden Arbeit, sondern in 6% FCS-haltigem Medium und bei atmosphärischer Sauerstoffkonzentration

(21% O_2). Diese Faktoren könnten die GAG-Synthese beeinflussen und zu unterschiedlichen Resultaten führen.
Darüber hinaus konnten in der vorliegenden Arbeit keine osmolaritätsabhängigen Effekte auf die Viabilität der NP-Zellen beobachtet werden. In der Studie von Takeno et al. konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die Viabilität boviner NP-Zellen trotz Variation der Osmolarität zwischen 270 mOsm und 570 mOsm kaum variierte [180].

4.1.2 Einfluss mechanischer Belastung

In der Literatur gibt es bislang nur wenige Studien, die den Einfluss mechanischer Belastung bei veränderter extrazellulärer Osmolarität auf den Metabolismus von Bandscheibenzellen untersucht haben.
Mechanisch induzierte Effekte infolge zyklischer Dehnung (AF-Zellen) oder mittels zyklischem hydrostatischem Druck (NP-Zellen) waren sowohl in der vorigen Studie von Würtz et al. [206] als auch in der jetzigen Arbeit bei allen drei Osmolaritäten eher gering. Obwohl in beiden Studien hydrostatischer Druck mit unterschiedlicher Amplitude (0,25 MPa vs. 2,5 MPa) appliziert wurde, war keine Zunahme des mechanischen Effekts mit höherer Amplitude zu erkennen. Eine verlängerte Stimulationsdauer (zyklische Dehnung: 24 Stunden statt einer Stunde) bewirkte ebenfalls keine Erhöhung mechanischer Effekte. Die Befunde beider Arbeiten zeigen, dass Schwankungen der extrazellulären Osmolarität einen größeren Einfluss auf die Genexpression hatten als die Applikation zusätzlicher mechanischer Reize.
Eine mögliche Ursache für die geringe Responsivität insbesondere boviner NP-Zellen auf hydrostatischen Druck könnte darin liegen, dass ein solcher mechanischer Stimulus nur zu einer geringen Verformung des Cytoskeletts führt. In einem Finite Element Model (FEM) von Baer et al. wurden im Gegensatz zum NP-Gewebe, in dem hydrostatischer Druck vorherrscht, deformationsrelevante Dehnungsreize nur für die AF- und Übergangsregion berechnet [9]. In einer Publikation von Setton und Chen wurde ebenfalls darauf hingewiesen, dass die Applikation von hydrostatischem Druck nur eine geringe Volumenänderung von NP-Zellen bewirkte [174]. Zudem konnten Chen et al. zeigen, dass zwar AF-Zellen aus Schweinen auf statische Kompression mit einem veränderten Genexpressionsmuster reagierten, nicht jedoch NP-Zellen [38].
Aufgrund der Variation der extrazellulären Osmolarität kommt es bereits zu einer deutlichen Verformung des Cytoskeletts durch Schrumpfung (Wasserverlust infolge hoher

extrazellulärer Osmolarität) oder Schwellung (Wasseraufnahme infolge niedriger extrazellulärer Osmolarität) der Bandscheibenzellen. Pritchard und Guilak berichteten in einer Studie, dass AF-Zellen aus Schweinen auf Hypoosmolarität mit einer Zunahme des Zellvolumens reagierten [152]. Außerdem fanden die Autoren Hinweise darauf, dass das F-Aktin-Netzwerk und Calcium-Ionen eine wichtige Rolle bei der Anpassung der Zellen an eine veränderte extrazelluläre Osmolarität spielten. Takeno et al. konnten in ihrer Studie ebenfalls beobachten, dass das Zellvolumen bei 270 mOsm am größten war und mit steigender Osmolarität abnahm [180]. Die Veränderung der extrazellulären Osmolarität kann daher als mechanischer Reiz betrachtet werden.
In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg der extrazellulären Osmolarität zu einer Erhöhung der Genexpression des mechanosensitiven Transkriptionsfaktors c-fos führte (3.1.1.1, Abbildung 15). Die zusätzliche Applikation eines mechanischen Reizes bewirkte nur bei starker Verformung des Cytoskeletts, d.h. bei Applikation zyklischer Dehnung auf AF-Zellen, eine Hochregulation der c-fos-Genexpression (3.1.2, Abbildung 20). Die Genexpression der anderen Zielgene wurde jedoch kaum durch mechanische Belastung verändert.

4.2 Variation der Glucose

4.2.1 Einfluss der veränderten Mikroumgebung

In der vorliegenden Arbeit führte ein Nährstoffmangel in Nukleuszellen überwiegend zu einer Herunterregulation der Genexpression anaboler Matrixmoleküle, wohingegen die Genexpression der am Matrixabbau beteiligten Enzyme im Vergleich zum physiologischen Wert bei Standardglucoseversorgung weitgehend konstant blieb oder sogar erhöht war. Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, dass es zu einem Ungleichgewicht im Matrixumsatz kommt, wobei der Matrixabbau im Vergleich zum Matrixaufbau überwiegt. Diese Veränderung im Matrixumsatz bedingt vermutlich die Abnahme der Bandscheibenhöhe im Degenerationsverlauf.
Selard et al. hatten mit Hilfe einer FEM-Studie berechnet, dass die Nährstoffkonzentration in der Bandscheibe mit einem Verlust der Austauschfläche an den Endplatten abnahm, wobei die Glucoseversorgung der Zellen im NP am geringsten war [171]. Van der Werf et al. konnten diese Ergebnisse experimentell bestätigen [191]. Dadurch sind NP-Zellen von

einem Nährstoffmangel infolge einer Kalzifizierung der Endplatten, wie sie im Rahmen der Bandscheibendegeneration auftritt, am meisten betroffen [15, 161].

Es konnte beobachtet werden, dass Glucosemangel bei gleichzeitig serumfreier Kultivierung zu einer leichten Abnahme der Viabilität der NP-Zellen führte. Bei den AF-Zellen konnte ein solcher Glucoseeffekt auf die Zellviabilität nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zu den NP-Zellen gab es bei den AF-Zellen allerdings keine absolut glucosefreie Gruppe, da dem Medium der Monolayerkulturen in allen drei Gruppen jeweils 1% FCS (entspricht 0,05 mM Glucose) beigefügt wurde. Die darin enthaltene Glucose reichte vermutlich zur Aufrechterhaltung essentieller Stoffwechselaktivitäten aus und verhinderte dadurch eine erhöhte Apoptose der AF-Zellen bei Glucosereduktion.

Diese These wird durch eine neuere Studie von Johnson et al. unterstützt, in der gezeigt wurde, dass die Zellproliferation bei Kultivierung in glucosefreiem, aber serumhaltigem (20%) Medium signifikant höher war als bei serumfreier Kultivierung [94]. Horner et al. beobachteten ebenfalls, dass bovine NP-Zellen bei Kultivierung in glucose- und serumfreiem Medium innerhalb von drei Tagen abstarben, während durch Serumzusatz (6%) die Viabilität erhöht werden konnte [77].

Darüber hinaus gibt es weitere Studien, die darauf hindeuten, dass die Glucosekonzentration einen limitierenden Faktor für die Zellviabilität darstellt. Bibby et al. ermittelten als kritischen Grenzwert für die Zellviabilität eine Konzentration von 0,4 mM Glucose [19]. In einer früheren Studie konnten Bibby et al. bereits zeigen, dass die Zellviabilität in skoliotischen Bandscheiben mit der Glucosekonzentration korrelierte [18]. Weiterhin konnten Bibby und Urban beobachten, dass es bei Glucoseentzug innerhalb von 24 Stunden zu einer Abnahme der Zellviabilität im sauren pH-Bereich kam, während bei physiologischem pH ein solcher Effekt nach 48 Stunden zu beobachten war [20]. Da die Zelldichte in der Bandscheibe ohnehin gering ist, könnte eine Reduktion der Zellzahl bei Nährstoffmangel dazu führen, dass die verbleibenden Zellen nicht in der Lage sind, ausreichend extrazelluläre Matrix zu synthetisieren.

Außerdem wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass es in degenerierten Bandscheiben, in denen insbesondere NP-Zellen mit Nährstoffen unterversorgt sind, zu einem ungünstigen Verhältnis der MMP- und TIMP-Konzentration kommen kann [158, 176]. In der vorliegenden Arbeit wurde die TIMP-Genexpression nicht näher untersucht. Allerdings konnte ebenfalls ein tendenzieller Anstieg der MMP-Genexpression bei Glucosemangel detektiert werden. Dadurch könnte eine erhöhte Matrixdegradation begünstigt werden, welche wiederum zu einer Reduktion der Bandscheibenhöhe führt. Dennoch gibt es auch

andere Studien, die eine parallele Zunahme der Synthese von katabolen und anti-katabolen Matrixmolekülen in degenerierten Bandscheiben beobachten konnten [108, 137].

Obwohl in mehreren Studien der Einfluss einer veränderten Glucoseversorgung auf die Zellviabilität untersucht wurde, gibt es kaum in vitro Studien, die glucoseabhängige Effekte auf die Gen- oder Proteinexpression von Matrixfaktoren in Bandscheibenzellen untersucht haben.

Johnson et al. stellten fest, dass bei Glucosemangel die Synthese von Kollagen-Typ-I und Typ-II in bovinen NP-Zellen sowohl im Monolayer als auch in Alginatbeads reduziert war [94]. Wie unter 3.2.1.1 gezeigt, kam es bei Glucosereduktion in bovinen NP-Zellen, die in Alginatbeads kultiviert wurden, ebenfalls zu einer Herunterregulation von Kollagen-Typ-I und Typ-II. Die Befunde von Johnson et al. bestätigen die Genexpressionsergebnisse der vorliegenden Arbeit auf Proteinebene.

Würtz et al. untersuchten den Einfluss der Glucoseversorgung auf die Genexpression von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) aus der Ratte [205]. Im Vergleich zum verwendeten Standardmedium, das eine 4,5-fach höhere Glucosekonzentration enthielt, konnte in Bandscheibenmedium, dessen Glucosekonzentration wie in der vorliegenden Arbeit 1 g/L betrug, ein statistisch signifikanter Anstieg der Aggrecan- und Kollagen-Typ-I-Genexpression in reifen MSCs beobachtet werden. Die Zellproliferation reifer MSCs war unter diesen Bedingungen ebenfalls signifikant erhöht gegenüber der Standardbedingung mit hoher Glucoseversorgung (25 mM). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Glucosekonzentration bei der Regulation des Zellmetabolismus eine wichtige Rolle spielt.

Die Glucoseaufnahme in die Bandscheibenzellen erfolgt über verschiedene Glucose-Transporter (GLUT), von denen beispielsweise die Isoformen GLUT-1, GLUT-3 und GLUT-9 in humanen BS-Zellen nachgewiesen wurden [155]. Mögliche Effekte der verschiedenen Glucosebedingungen auf die GLUT-Genexpression wurden in der vorliegenden Arbeit nicht analysiert. Jedoch ist aus der Literatur bekannt, dass die GLUT-Expression sowohl zwischen AF- und NP-Zellen variiert als auch zwischen den verschiedenen Degenerationsstadien [155]. In einer Studie von Bibby et al. konnte festgestellt werden, dass der Glucoseverbrauch von BS-Zellen bei Konzentrationen zwischen 1 mM und 5 mM Glucose ähnlich war, was auf eine Sättigung der GLUT-Moleküle hindeuten könnte [19]. Vergleichbare Werte sind auch aus Untersuchungen von Chondrozyten, die eine morphologische Ähnlichkeit zu NP-Zellen der Bandscheibe aufweisen, bekannt. Beispielsweise verzeichneten Windhaber et al. bei Gelenkknorpelzellen nur noch einen geringfügigen Anstieg der Glucoseaufnahme bei

Konzentrationen zwischen 1 mM und 2,5 mM Glucose [203]. Dagegen kam es bei Konzentrationen zwischen 0,4 mM und 0,7 mM Glucose zu einem starken Rückgang des Glucoseverbrauchs mit fallender Glucosekonzentration [19]. Ein ähnlicher Verlauf konnte auch von Windhaber et al. in Chondrozyten bestätigt werden [203]. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass die Glucosekonzentration die GLUT-Expression beeinflusst, wobei die Anzahl der GLUT-Moleküle umgekehrt wiederum die Glucoseaufnahme in die Zellen reguliert. Eine niedrige Glucosekonzentration könnte zu einer deutlichen Verringerung der Anzahl an GLUT-Molekülen führen, wodurch ein strukturell bedingter Nährstoffmangel (z.B. durch Kalzifizierung der Endplatten) verschlimmert und eine erhöhte Apoptose der BS-Zellen ausgelöst werden könnte. Diese Kaskade könnte die BS-Degeneration beschleunigen.

4.2.2 Einfluss mechanischer Belastung

In der vorliegenden Arbeit wurden in vitro Versuche zur Applikation mechanischer Reize (Druck, Dehnung) unter variierten Glucosebedingungen durchgeführt. Die in Einzelfällen in humanen AF- und NP-Zellen beobachteten Genexpressionsänderungen nach mechanischer Belastung wurden von der Glucosekonzentration beeinflusst. In bovinen NP-Zellen führte hydrostatischer Druck allerdings zu keiner nachweisbaren Veränderung auf Genexpressionsebene. Die unterschiedliche Responsivität humaner und boviner NP-Zellen auf mechanische Belastung könnte mit speziesspezifischen Unterschieden zusammenhängen.

Bisher sind keine in vitro Studien in der Literatur bekannt, in denen die Interaktion von Glucoseversorgung und mechanischer Belastung auf die Gen- und/oder Proteinexpression von Bandscheibenzellen untersucht wurde. Daher ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse mit Daten aus der Literatur nicht möglich.

Eine Wechselwirkung mechanischer und ernährungsphysiologischer Faktoren kann als wahrscheinlich angenommen werden. So berichteten Lee et al. beispielsweise, dass hoher hydrostatischer Druck zu einer verringerten GLUT-Aktivität in Gelenkknorpelzellen führte [111]. Außerdem beschrieben die Autoren, dass intrazelluläre Veränderungen (z.B. pH) durch den Wasserverlust aufgrund mechanischer Belastung die Aktivität glycolytischer Enzyme in Gelenkknorpelzellen herabsetzen können. In einer weiteren Studie von Windhaber et al. konnte ebenfalls an Gelenkknorpelzellen gezeigt werden, dass eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks von 1 MPa auf 30 MPa die Glucoseaufnahme in die

Zellen um bis zu 30% verringerte [203]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass unphysiologisch hohe Belastungen den Energiestoffwechsel negativ beeinflussen können, wobei unklar ist, ob eine Nährstoffreduktion um 30% bereits zu einer Beeinträchtigung der Zellfunktionen führt.
Im Gegensatz dazu ergaben die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit, dass die kurzzeitige Applikation von zyklischem hydrostatischem Druck mit einer Amplitude von 2,5 MPa bei Glucosemangel eine tendenzielle Erhöhung von Kollagen-Typ-I und -Typ-II und eine tendenziell verringerte MMP-Genexpression in humanen NP-Zellen bewirkte.
Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein adäquater mechanischer Reiz den Matrixumsatz positiv beeinflussen könnte und somit möglicherweise zu einer Verlangsamung der BS-Degeneration führt. Allerdings scheinen die beobachteten Effekte sehr stark von spenderspezifischen Eigenschaften wie z.B. dem genetischen Hintergrund oder der Behandlungsursache abhängig zu sein. Die Abweichungen zwischen den Befunden aus der vorliegenden Arbeit und den Angaben aus der Literatur könnten allerdings auch durch unterschiedliche Belastungsprotokolle bedingt sein.

4.3 Variation des Sauerstoffs

4.3.1 Einfluss der veränderten Mikroumgebung

Da das intakte BS-Gewebe avaskulär ist und Nährstoffe wie z.B. Sauerstoff nur durch Diffusion zu den BS-Zellen gelangen, ist die Sauerstoffkonzentration in der BS-Matrix gegenüber atmosphärischem Sauerstoff erniedrigt [73, 171, 190]. In einer FEM-Studie gaben Soukane et al. Sauerstoffkonzentrationen zwischen 5% und 6% O_2 für die Endplattenregion bzw. den äußeren Anulus an [177]. In der vorliegenden Arbeit wurden die BS-Zellen bei einer Sauerstoffzufuhr von 6% O_2 kultiviert, welche den durchschnittlichen physiologischen Wert in der gesunden Bandscheibe darstellen sollte.
In einer Studie von Bartels et al. wurde die Sauerstoffkonzentration humaner Bandscheiben in vivo bestimmt, jedoch kam es zu sehr großen Schwankungen der Messwerte, die sich auch nicht einem bestimmten Degenerationsgrad zuordnen ließen [11]. Bei den verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, handelt es sich daher um Schätzwerte, die sowohl den Zustand in der gesunden Bandscheibe, als auch in degenerierten Bandscheiben widerspiegeln sollten.

In den Sauerstoffversuchen wurden AF-Zellen zur Simulation degenerativer Bedingungen bei 1% O_2 kultiviert. Da in der Literatur bei der in vitro Kultivierung von BS-Zellen häufig keine Sauerstoffreduktion auf physiologische Werte durchgeführt wird, wurde eine Gruppe zur besseren Vergleichbarkeit der Daten auch bei atmosphärischen Sauerstoffbedingungen (21% O_2) kultiviert, wenngleich dieser Wert selbst in vaskularisiertem degeneriertem Bandscheibengewebe nicht erreicht wird.

Die Genexpressionsanalysen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Sauerstoffkonzentration bei Abweichungen vom physiologischen Wert eine stark erniedrigte Genexpression des mechanosensitiven Transkriptionsfaktors c-fos in bovinen AF-Zellen bewirkte, während die Genexpressionshöhe in humanen AF-Zellen zwischen den drei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen geringere Unterschiede aufwies. Die Genexpressionsdaten boviner AF-Zellen lassen darauf schließen, dass das Expressionsniveau von c-fos nicht nur mechanisch (4.3.2), sondern auch durch die Sauerstoffzufuhr regulierbar ist.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration auf 21% O_2 im allgemeinen keinen großen Einfluss auf die Expression der weiteren Zielgene hatte. In einer Studie von Holm et al. wurde berichtet, dass der Sauerstoffverbrauch von NP-Zellen erst bei sehr niedrigem Sauerstoffgehalt konzentrationsabhängige Unterschiede aufwies [73]. Ishihara und Urban beobachteten ebenfalls, dass der Sauerstoffverbrauch von AF-Zellen bei Konzentrationen zwischen 5% und 21% O_2 weitgehend konstant war und erst bei Werten unter 5% O_2 stark abfiel [86]. Möglicherweise reagieren AF-Zellen weniger stark auf eine Überversorgung mit Sauerstoff im Vergleich zu einer Unterversorgung.

Eine Verringerung der Sauerstoffversorgung auf 1% O_2 führte zwar zu keiner Änderung der Aggrecan-Genexpression in bovinen AF-Zellen, jedoch kam es zu einer erniedrigten MMP-3-Genexpression im Vergleich zur physiologischen Sauerstoffkonzentration. In humanen AF-Zellen konnte ebenfalls eine Herunterregulation der MMP-3-Genexpression bei 1% O_2 beobachtet werden, wohingegen die Genexpression der anabolen Faktoren Aggrecan und Sox-9 gegenüber 6% O_2 sogar erhöht war.

Risbud et al. berichteten, dass das Genexpressionsniveau von Aggrecan, Kollagen-Typ-II und Sox-9 von NP-Zellen aus Ratten nach einer 48-stündigen Kultivierung bei 2% deutlich höher war als bei 21% O_2 [156]. Trotz gewebe- (AF- vs. NP-Zellen) und speziesspezifischer (Mensch vs. Ratte) Unterschiede und einer unterschiedlichen Kultivierungsdauer (24 Stunden statt 48 Stunden) und Sauerstoffkonzentration (Hypoxie:

1% statt 2% O_2, Kontrollgruppe: 6% vs. 21% O_2) stimmen die Befunde der vorliegenden Arbeit mit denen von Risbud et al. tendenziell überein. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass BS-Zellen in einer degenerativen Mikroumgebung mit einer Umstellung des Metabolismus reagieren, so dass dieses veränderte Genexpressionsprofil dem Matrixabbau entgegenwirken könnte.

Ishihara und Urban fanden heraus, dass bovine NP-Zellen die höchste Einbaurate von Sulfat bei 5% O_2 erreichten, was in etwa der physiologischen Sauerstoffversorgung entspricht [86]. Dagegen war bei einer Reduktion des Sauerstoffgehalts auf 1% die geringste Einbaurate von Prolin und Sulfat zu verzeichnen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass NP-Zellen unter degenerativen Bedingungen weniger Kollagen und Proteoglykan neu synthetisieren, was schließlich zu einer Abnahme der BS-Matrix führen könnte. Diese Befunde konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da es in bovinen AF-Zellen keine wesentlichen Unterschiede in der Aggrecan-Genexpression zwischen 1% O_2 und 6% O_2 gab. Möglicherweise ist die Ursache hierfür auf zellspezifische Unterschiede zwischen NP- und AF-Zellen zurückzuführen.

Die Ergebnisse einer verringerten PG-Synthese bei Sauerstoffmangel von Ishihara und Urban konnten in einer weiteren Studie von Horner und Urban ebenfalls belegt werden [77]. Bei absolutem Sauerstoffentzug (0%) konnten die Autoren feststellen, dass die GAG-Synthese trotz hoher Zellviabilität sehr viel geringer war als bei höheren Sauerstoffkonzentrationen (5% O_2, 21% O_2). Die Ergebnisse beider Studien deuten darauf hin, dass starker Sauerstoffmangel die Matrixsynthese deutlich vermindert, wohingegen eine erhöhte Sauerstoffversorgung den Matrixumsatz vergleichsweise kaum beeinflusst.

In FEM-Studien konnte ermittelt werden, dass die Diffusionsfläche an den Endplatten den Nährstofftransport (Sauerstoff, Glucose) in die BS-Matrix entscheidend beeinflusst, wobei deutliche Einschränkungen in der Nährstoffversorgung der BS-Zellen erst bei einer Verringerung der Austauschfläche um mindestens 50% auftraten [115, 171].

Somit stellt die Diffusionsfläche an den Endplatten die entscheidende Komponente beim Nährstofftransport in die Bandscheibe dar, was bereits früher in der Literatur beschrieben wurde [73]. Diese Aussage wird durch eine FEM-Studie von Soukane et al. unterstützt, in der die Autoren feststellten, dass infolge einer Endplattenfraktur kritische Nährstoffkonzentrationen, d.h. minimale Sauerstoff- und Glucosekonzentrationen, im Zentrum des NP unterhalb der Frakturfläche auftraten [177]. Da die Austauschfläche an den Endplatten im Verlauf der BS-Degeneration abnimmt [15], kommt es zu einer Unterversorgung der BS-Zellen mit Nährstoffen. Dieser Nährstoffmangel könnte

wiederum die Matrixsynthese beeinträchtigen, wodurch degenerative Prozesse vermutlich gefördert werden.

4.3.2 Einfluss mechanischer Belastung

In der vorliegenden Arbeit führte die Applikation zyklischer Dehnung in bovinen AF-Zellen zu einem Anstieg der c-fos-Genexpression mit zunehmender O_2-Konzentration, während die Responsivität humaner AF-Zellen auf mechanische Belastung nicht von der Sauerstoffversorgung abhängig war. Die Ergebnisse der c-fos-Genexpression deuten darauf hin, dass die Mechanosensitivität boviner AF-Zellen durch die Sauerstoffkonzentration beeinflusst wird, wobei die Zellen bei hoher Sauerstoffversorgung am stärksten auf mechanische Reize reagierten.
Bei den anderen Zielgenen kam es nur vereinzelt zu mechanisch induzierten Effekten, wobei diese in Abhängigkeit vom jeweiligen Spender stark variierten und zum Teil gegenläufige Expressionstendenzen aufwiesen. Daher war es in der vorliegenden Arbeit nicht möglich, einen eindeutigen Zusammenhang zwischen mechanischer Belastung und einem günstigeren Matrixumsatz bei Variation der Sauerstoffversorgung zu belegen. Aufgrund des begrenzten Patientenkollektivs konnten die ermittelten Unterschiede im Genexpressionsprofil keinen spenderspezifischen Eigenschaften (z.B. Alter, Behandlungsursache) zugeordnet werden.
Bisher sind in der Literatur keine in vitro Studien bekannt, in denen die Effekte einer Interaktion von Sauerstoffvariation und mechanischer Belastung auf die Gen- oder Proteinexpression von BS-Zellen oder Chondrozyten untersucht wurden. Es gibt auch nur wenige FEM-Studien, in denen diese Wechselwirkung analysiert wurde.
Beispielsweise konnten Huang et al. mit Hilfe eines numerischen Modells zeigen, dass dynamische Kompression zu einer Erhöhung der Sauerstoffkonzentration und des Sauerstoffverbrauchs in der Bandscheibe führte, wobei die beobachteten Effekte von dem mechanischen Stimulus abhängig waren und sich bei einer Verringerung der Endplattenpermeabilität von 50% auf 0% verstärkten [78]. Aus den berechneten Daten ist zu vermuten, dass mechanische Belastung unter degenerativen Bedingungen eine verbesserte Sauerstoffversorgung der BS-Zellen bewirken könnte.
Die ermittelten FEM-Daten von Soukane et al. belegten ebenfalls einen positiven Effekt mechanischer Belastung auf die Nährstoffversorgung der BS-Zellen [177]. Zwar kam es aufgrund mechanischer Belastung zu einem Flüssigkeitsverlust, wodurch das

Diffusionsvermögen in der BS-Matrix herabgesetzt wird, zugleich führte die Kompression aber zu einer Reduktion der BS-Höhe, wodurch der Nährstofftransport zu den BS-Zellen erleichtert wird. Da der Effekt einer verringerten BS-Höhe bei der FEM-Simulation überwog, könnte mechanische Belastung unter degenerativen Bedingungen zu einer verbesserten Nährstoffversorgung der BS-Zellen insbesondere im Nukleus führen und damit möglicherweise die BS-Degeneration verlangsamen.

4.4 Variation des pH

4.4.1 Einfluss der veränderten Mikroumgebung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer pH-Verschiebung in den sauren Bereich untersucht, da aus der Literatur bekannt ist, dass der pH-Wert aufgrund der Laktatanreicherung unter den neutralen pH-Bereich abfallen kann, wenngleich kein direkter Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und der BS-Degeneration festgestellt werden konnte [47, 125, 177].

Die Absenkung des pH-Wertes in den sauren Bereich führte in der vorliegenden Arbeit zu einer Herunterregulation anaboler Matrixgene in bovinen NP-Zellen, während gleichzeitig die Genexpression matrixdegradierender Enzyme im Vergleich zum physiologischen pH kaum verändert war. In humanen NP-Zellen konnte tendenziell ein ähnliches Genexpressionsmuster festgestellt werden, wobei die beobachteten Effekte geringer waren als in bovinen NP-Zellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es unter degenerativen Bedingungen zu einem Ungleichgewicht im Matrixumsatz kommt. Da die Matrixsynthese im Vergleich zum Matrixabbau reduziert ist, könnte daraus ein Verlust von BS-Gewebe resultieren.

In der vorliegenden Arbeit erfolgten die pH-Versuche in Hepes-gepuffertem Medium, so dass der anfangs eingestellte pH-Wert über den Versuchszeitraum von 24 Stunden nicht konstant blieb, sondern mit der Zeit anstieg, wie die Messungen bei Versuchsende zeigten. Dies stellt eine Limitation dar, welche bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss. Möglicherweise sind die beobachteten pH-Effekte auf den Matrixumsatz bei der Kultivierung der Zellen in konstant saurem pH-Medium noch größer als in der vorliegenden Arbeit.

Um unbeabsichtigte pH-Verschiebungen zu vermeiden, wurden in einer Studie von Wilkins und Hall bovine Knorpelzellen nur über einen Zeitraum von drei Stunden bei unterschiedlichen pH-Werten kultiviert [202]. Die Autoren berichteten, dass es bei einer Verringerung des pH im Bereich zwischen 7,1 und 6,6 zu einer starken Abnahme des Sulfat- und Prolinverbrauchs durch bovine Chondrozyten kam. Ein ähnlicher Verlauf konnte auch bei einer Erhöhung der Laktatkonzentration beobachtet werden.

Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Befunden von Gray et al., die ebenfalls feststellten, dass die Sulfat- und Prolininkorporation in bovine Chondrozyten bei einer Ansäuerung des pH von 8,0 auf 5,5 stetig abnahm [56].

Oshima et al. ermittelten in einer Studie an bovinen und humanen NP-Zellen, dass die Sulfat- und Prolinaufnahme bei einem pH von ungefähr 7 am höchsten war, wohingegen eine Absenkung des pH-Wertes bis auf etwa 5,9 zu einer kontinuierlichen Abnahme des Sulfat- und Prolinverbrauchs führte [140]. Außerdem konnten die Autoren zeigen, dass die pH-Änderung unmittelbar für den Rückgang der Matrixsynthese verantwortlich war und nicht allein die Laktatakkumulation, da trotz hoher Laktatkonzentrationen (bis zu 20 mM) nach Stabilisierung des pH auf einen Wert von 7,4 durch Zugabe von Natriumhydroxid vergleichbare Syntheseraten erreicht wurden wie bei pH 7,4 in Abwesenheit von Laktat. Dieser Befund legt die Schlussfolgerung nahe, dass eine Laktatanreicherung zwar eine pH-Reduktion bewirken kann, aber die Matrixsynthese nicht direkt beeinträchtigt.

In einer Studie von Ishihara und Urban wurde der Einfluss einer Zunahme der Laktatkonzentration bei Verringerung der Sauerstoffzufuhr auf den Metabolismus boviner BS-Zellen untersucht [86]. Es konnte festgestellt werden, dass sich die Laktatproduktion im äußeren Anulus bei einer Reduktion der Sauerstoffkonzentration von 10% auf 5% O_2 ungefähr verdoppelte, wodurch der pH absinkt. Analog dazu nahm der Prolinverbrauch durch AF-Zellen ab. Die Laktatkonzentration blieb bei einer weiteren Verringerung des Sauerstoffgehalts auf 1% O_2 im äußeren Anulus annähernd konstant. Dieser Verlauf spiegelte sich auch in einer weitgehend unveränderten Prolinaufnahme in AF-Zellen wider. Im Nukleus konnte bei O_2-Werten unter 5% ebenfalls eine Laktatanreicherung und folglich eine pH-Erniedrigung mit sinkender Sauerstoffversorgung detektiert werden. Gleichzeitig verringerten sich der Prolin- und der Sulfatverbrauch durch NP-Zellen.

Die Ergebnisse einer verminderten Kollagen- und Proteoglykansynthese bei pH-Reduktion, die auf eine Inhibierung des Matrixaufbaus in einer degenerativen Mikroumgebung hindeuten, konnten in den oben zitierten Studien übereinstimmend belegt

werden und bestätigen die Resultate der Genexpressionsanalysen in der vorliegenden Arbeit.

Dagegen konnten Bibby et al. feststellen, dass die Laktatproduktion in bovinen NP-Zellen sowohl mit fallender Sauerstoffzufuhr abnahm, als auch mit sinkendem pH [19]. Einen ähnlichen Verlauf beschrieben auch Lee et al. in bovinen Gelenkknorpelzellen, da es in ihrer Studie ebenfalls zu einer Reduktion der Laktatbildung bei abfallendem pH kam [111]. Diese Beobachtungen lassen auf Rückkopplungsmechanismen schließen, wodurch der pH-Wert nicht nur von der Laktatkonzentration beeinflusst wird, sondern umgekehrt auch Einfluss auf die Laktatproduktion hat. Da die Laktatbildung an die Glykolyse gekoppelt ist, könnten diese Ergebnisse bedeuten, dass in einer degenerativen Umgebung mit sauren pH-Werten die Glykolyse beeinträchtigt ist, wodurch den Zellen weniger ATP zur Verfügung steht. Diese Hypothese könnte die Herunterregulation der Genexpression bzw. der Matrixproduktion erklären.

Windhaber et al. konnten zwar zeigen, dass die Regulation der Glucoseaufnahme in Chondrozyten in einem Bereich zwischen pH 6 und pH 8 nicht vom pH-Wert abhängig war, allerdings wurde die Glykolyserate in dieser Studie nicht analysiert [203]. Lee et al. wiesen in ihrer Publikation darauf hin, dass die Aktivität der an der Glykolyse beteiligten Enzyme bei einer intrazellulären pH-Verschiebung verringert ist [111]. Deshalb ist es denkbar, dass zwar Glucose in die Zellen gelangt, die Glykolyserate jedoch aufgrund der pH-Variation reduziert ist, weshalb nicht genügend ATP für die Matrixbiosynthese gebildet werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde nur der pH-Wert in einem Bereich zwischen 6,5 und 7,2 variiert, während die anderen Parameter (Osmolarität, Glucose- und Sauerstoffversorgung) physiologischen Bedingungen entsprachen. Sofern die Ergebnisse von Windhaber et al. aus Chondrozyten auch auf die knorpelzellähnlichen NP-Zellen zutreffen, ist zu vermuten, dass es aufgrund der durchgeführten pH-Reduktion nicht zu einer Unterversorgung der NP-Zellen mit Glucose kam. Möglicherweise sind die Ergebnisse aus Chondrozyten aber nicht auf BS-Zellen übertragbar. Wenn in diesem Fall die Glucoseaufnahme in die BS-Zellen durch die Absenkung des pH-Wertes beeinträchtigt wurde, könnte ein Glucosemangel, wie unter 4.2.1 beschrieben, die Ursache für die verringerte Genexpression anaboler Matrixmoleküle sein. Darüber hinaus könnte es auch aufgrund der pH-Variation zu einem Aktivitätsverlust glykolytischer Enzyme gekommen sein, der sich wiederum infolge eines ATP-Mangels auf die Genexpression auswirken könnte.

Möglicherweise sind aber auch andere Mechanismen an der Regulation des Zellmetabolismus bei einer pH-Verschiebung beteiligt. Die Ergebnisse einer Studie von Uchiyama et al. an BS-Zellen aus der Ratte unterstützen die Hypothese, dass die Zelladaption an eine saure bzw. hyperosmolare Mikroumgebung durch säuresensitive Ionenkanäle (acid sensing ion channel, ASIC) vermittelt wird, die den Transmembrantransport von Kationen (Na^+, K^+, Ca^{2+}) regulieren [184]. In einer weiteren Studie von Dascalu et al. wurden Chondrozyten aus Hühnerembryonen in einer hyperosmolaren Mikroumgebung kultiviert, wodurch es zu einer intrazellulären Ansäuerung des pH gefolgt von einem Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration kam [46]. Außerdem konnten Sanchez und Wilkins in einer Studie an bovinen Gelenkknorpelzellen zeigen, dass sowohl Natrium- als auch Kaliumionen wichtige Mediatoren bei der Regulation des intrazellulären pH (pH_i) waren, wohingegen Zinkionen die Anpassung des pH_i blockierten [166]. Yamazaki et al. konnten ebenfalls nachweisen, dass die Normalisierung des pH_i in bovinen Chondrozyten vom Na^+/H^+-Austausch abhängig war [207]. Auch aus anderen Organismen ist bekannt, dass Kationen-aktivierte Signalwege an der pH-Adaption von Zellen beteiligt sind. Beispielsweise berichteten Serrano et al. in einer Studie an Hefezellen, dass die Expression einer Vielzahl von Genen durch eine leicht alkalische Mikroumgebung beeinflusst wurde, wobei Calcium-abhängige Signalwege eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkription spielten [172]. Die Ergebnisse von Lin et al. aus einer Studie an Bakterien weisen darauf hin, dass die pH-Adaption durch Kalium-vermittelte Signalwege erfolgt [112]. Eine Beteiligung Kationen-abhängiger Signalwege an einer pH-induzierten Regulation der Genexpression in Bandscheiben wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, kann aber als wahrscheinlich angenommen werden.

4.4.2 Einfluss mechanischer Belastung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulation der Genexpression anaboler Matrixfaktoren bei pH-Reduktion durch die Applikation zyklischen hydrostatischen Drucks verringert oder aufgehoben werden konnte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass mechanische Belastung in einer degenerativen Mikroumgebung einen positiven Effekt auf den Matrixumsatz haben könnte und somit zu einer Verlangsamung der BS-Degeneration führen könnte.

Bisher konnten in der Literatur keine in vitro Studien gefunden werden, in denen die Interaktion einer pH-Reduktion und mechanischer Belastung auf den Metabolismus von BS-Zellen auf Gen- oder Proteinebene untersucht wurde. Daher wurden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit Literaturdaten, die aus Studien an NP-zellähnlichen Chondrozyten stammten, verglichen.

In einer Studie von Gray et al. wurde der Effekt einer pH-Variation auf die Sulfat- und Prolinaufnahme in bovine Chondrozyten unter mechanischer Belastung analysiert [56]. Bei einer 12-stündigen Kompressionsphase auf 50% des anfänglichen Probendurchmessers konnten die Autoren feststellen, dass die Sulfat- und Prolinaufnahme in einem Bereich zwischen pH 5,5 und pH 6,9 gegenüber der mechanisch unbelasteten Kontrolle bei pH 7,05 sehr niedrig war, wohingegen es zwischen pH 6,9 und pH 7,3 zu einer deutlichen Zunahme des Sulfat- und Prolinverbrauchs mit ansteigendem pH kam. Die maximale Sulfat- und Prolininkorporation wurde unter Kompression bei pH 7,3 erreicht, wobei die Werte ungefähr denen der mechanisch unbelasteten Kontrollen bei pH 7,05 entsprachen. Diese Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass bei statischer Belastung im sauren pH-Milieu eine Inhibierung der Matrixsynthese erfolgt. Statische Belastung erscheint daher nicht geeignet, um der BS-Degeneration entgegenzuwirken.

Dagegen konnte in der vorliegenden Arbeit nach mechanischer Belastung im sauren pH-Bereich ein Anstieg der Aggrecan- und Kollagengenexpression auf Werte bei physiologischem pH beobachtet werden. Allerdings trat dieser Effekt bei dynamischer Belastung auf, während Gray et al. statische Kompression applizierten, die im sauren pH-Milieu keine Erhöhung des Sulfat- und Prolinverbrauchs bewirkte. Möglicherweise beruhen die unterschiedlichen Ergebnisse auf der Art und der Applikationsdauer des mechanischen Reizes. Die Analyse des Matrixumsatzes hinsichtlich der Genexpression oder der Proteinsynthese kann ebenfalls zu verschiedenen Resultaten führen. Jedoch lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass in einer degenerativen Mikroumgebung dynamische Belastung im Gegensatz zu statischer Belastung einen positiven Einfluss auf den Matrixumsatz haben könnte.

Diese Hypothese wird auch durch theoretische Modelle unterstützt. In einer FEM-Studie simulierten Huang und Gu den Effekt dynamischer Belastung auf die Laktatproduktion in degenerierten Bandscheiben, in denen die Endplattenpermeabilität um 50% reduziert war [78]. Die Autoren berechneten, dass die kurzzeitige (100 Sekunden) dynamische Stimulation im Vergleich zur statischen Kompression zu einem Anstieg der Laktatbildung mit zunehmender Frequenz führte. Diese Daten könnten bedeuten, dass dynamische

Belastung die Glykolyserate erhöht und damit die Matrixsynthese fördert. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass infolge der Laktatanreicherung auch der pH absinkt, was sich wiederum negativ auf den Matrixaufbau auswirken könnte.
Zusammenfassend finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass die Matrixsynthese bei Ansäuerung des pH in Kombination mit statischer Kompression des Gewebes reduziert ist, wohingegen dynamische Belastung tendenziell die Matrixproduktion stimuliert. In der vorliegenden Arbeit konnte experimentell bestätigt werden, dass zyklischer hydrostatischer Druck die Genexpression anaboler Matrixfaktoren erhöhte, während die Genexpression matrixabbauender Enzyme sowohl bei einer pH-Verschiebung als auch bei Applikation dynamischer Belastung weitgehend unverändert war. Dieses Genexpressionsprofil legt die Schlussfolgerung nahe, dass dynamische Belastung zu einem ausgeglichenen Matrixumsatz und somit zu einer Verlangsamung der BS-Degeneration führen könnte.

4.5 Regulation angiogener Faktoren

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation angiogener Faktoren (Pleiotrophin, Midkine, VEGF) unter veränderten Umgebungsbedingungen (extrazelluläre Osmolarität, Glucose- oder Sauerstoffversorgung) und unter mechanischer Belastung auf Transkriptionsebene untersucht.
In den Versuchen zur Variation der extrazellulären Osmolarität konnten in humanen NP-Zellen nur vereinzelt Veränderungen der Genexpression angiogener Faktoren festgestellt werden, wobei diese hauptsächlich bei den Traumapatienten auftraten. Mechanisch induzierte Effekte waren ebenfalls überwiegend in den NP-Zellen der Traumapatienten nachweisbar. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Regulation der Transkription angiogener Faktoren sehr stark vom individuellen Gewebszustand beeinflusst wird.
Auch in der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass angiogene Faktoren in Abhängigkeit von der Gewebestruktur unterschiedlich stark exprimiert werden. In einer Studie von Johnson et al. wurde humanes Gewebe aus nicht-degenerierten, intakten Bandscheiben, aus degenerierten Bandscheiben sowie nach einem Bandscheibenvorfall (BSV) immunhistologisch untersucht, um Pleiotrophin nachzuweisen [93]. Die Autoren konnten zeigen, dass PTN sowohl in BS-Zellen als auch in der extrazellulären BS-Matrix vorhanden war, wobei mehr PTN in degenerierten als in intakten Bandscheiben und die stärkste Färbung in BSV-Gewebe zu sehen war.

Lee et al. konnten in ihrer Studie an Ratten altersabhängige Unterschiede in der Genexpression feststellen [110]. Die Autoren untersuchten die Transkription verschiedener Gene im NP, AF und im Gelenkknorpel und fanden heraus, dass in jungen Ratten die PTN-Expression im NP signifikant höher war als im AF oder Gelenkknorpel. Dagegen war die PTN-Expression im AF-Gewebe von älteren Ratten deutlich erhöht. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Regulation der Transkription angiogener Faktoren von Alterungs- bzw. Degenerationsprozessen beeinflusst wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte in den AF-Zellen unter hypoosmolaren Bedingungen, die eine degenerative Mikroumgebung simulieren sollten, eine tendenzielle Herunterregulation der Genexpression von Pleiotrophin und Midkine, welches eine große Sequenzhomologie zu PTN aufweist, festgestellt werden. Die Erniedrigung dieser Faktoren bei Hypoosmolarität könnte darauf hindeuten, dass eine degenerativ veränderte Mikroumgebung nicht mit angiogenen Prozessen assoziiert sein muss. Diese Hypothese wird durch eine Studie von Nerlich et al. unterstützt, in der die Autoren selbst in degenerierten Bandscheiben von Patienten im Alter bis zu 86 Jahren keine Blutgefäße im Zentrum der Bandscheibe nachweisen konnten [136]. Die Autoren schlossen daraus, dass es im Verlauf der BS-Degeneration nicht zwangsläufig zur Angiogenese und infolgedessen zur Vaskularisierung des BS-Gewebes kommt.

In der Literatur finden sich jedoch vielfach Angaben, die nahelegen, dass die Vaskularisierung des adulten Bandscheibengewebes, auch über die Peripherie hinaus in den Nukleus pulposus, mit der BS-Degeneration assoziiert ist. Beispielsweise konnten Kauppila et al. beobachten, dass die Vaskularisierung des AF im Verlauf der Bandscheibendegeneration signifikant zunahm [98]. Johnson et al. konnten ebenfalls zeigen, dass mit zunehmendem Degenerationsgrad der Bandscheibe generell auch die Anzahl der Blutgefäße im Gewebe anstieg [92]. In einer weiteren Studie stellten Johnson et al. einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Anzahl PTN-positiver BS-Zellen und der Vaskularisierung des BS-Gewebes fest [93]. Haro et al. konnten sowohl VEGF als auch die VEGF-Rezeptoren 1 und 2 in vaskularisiertem humanem Prolapsgewebe nachweisen und postulierten, dass VEGF bei der Einsprossung von Blutgefäßen in das BSV-Gewebe eine wichtige Rolle spielt [64]. In zahlreichen weiteren Studien wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen VEGF und der Neubildung von Blutgefäßen im BS-Gewebe beschrieben [91, 101, 165, 182]. Darüber hinaus analysierten Zhou et al. den Effekt von Midkine auf die Resorption von Prolapsgewebe im Kaninchenmodell in vivo und fanden heraus, dass das BSV-Gewebe in der Midkine-behandelten Gruppe schneller

abgebaut wurde als in der unbehandelten Kontrollgruppe [208]. Außerdem beobachteten die Autoren, dass das Midkine-behandelte Gewebe mehr neu gebildete Blutgefäße aufwies als die unbehandelte Kontrollgruppe. Diese Studien zeigen, dass angiogene Faktoren die Matrixstruktur bzw. den Matrixumsatz der Bandscheibe beeinflussen können.

Im Gegensatz zu den Effekten bei Hypoosmolarität konnte in der vorliegenden Arbeit bei einem Nährstoffmangel (Glucose, Sauerstoff) ein tendenzieller Anstieg der VEGF- und PTN-Genexpression verzeichnet werden. Möglicherweise werden angiogene Prozesse bei einer Nährstofflimitation stärker gefördert als bei einer Veränderung der extrazellulären Osmolarität.

In einer Studie von Murata et al. konnten die Autoren nachweisen, dass ein 24-stündiger Sauerstoffmangel im Vergleich zu atmosphärischen Sauerstoffbedingungen zu einer signifikanten Erhöhung der VEGF-Expression in humanen Gelenkknorpelzellen führte [124]. Fujita et al. konnten zeigen, dass VEGF im NP von Mäusen stark exprimiert ist, wobei es unter Hypoxie ebenfalls zu einem Anstieg der VEGF-Expression kam [52]. Weiterhin konnten die Autoren feststellen, dass die Bindung von VEGF an in vitro zugesetzte VEGF-Rezeptor 1-Kompetitormoleküle die Apoptose der NP-Zellen erhöhte. Diese Beobachtungen legen nahe, dass VEGF nicht nur bei der Angiogenese, sondern auch bei der Zelladaption an hypoxische Bedingungen eine Rolle spielt.

In der vorliegenden Arbeit wurde in bovinen BS-Zellen nur das Genexpressionsprofil von Pleiotrophin untersucht. Alle drei Umgebungsparameter (Osmolarität, Glucose, Sauerstoff) hatten sowohl im mechanisch unbelasteten Zustand als auch nach Applikation zyklischer Dehnung bzw. hydrostatischen Drucks keinen wesentlichen Einfluss auf die PTN-Genexpression. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es speziesabhängige Unterschiede in der Regulation von PTN gibt, wobei die PTN-Transkription in bovinen BS-Zellen von äußeren Faktoren relativ unbeeinflusst zu sein scheint.

In der vorliegenden Arbeit konnten auch unter variierten Umgebungsbedingungen kaum mechanisch induzierte Effekte bezüglich der Regulation angiogener Faktoren beobachtet werden.

In der Literatur ist zum Einfluss mechanischer Belastung auf die Expression angiogener Faktoren bislang noch wenig bekannt. In einer früheren Arbeit applizierten Neidlinger-Wilke et al. zyklische Dehnung auf AF-Zellen bzw. zyklischen hydrostatischen Druck auf NP-Zellen aus humanem BS-Gewebe [130]. Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit, in der eine degenerative Mikroumgebung durch Variation verschiedener Parameter simuliert wurde, wurde in der Studie von Neidlinger-Wilke et al. die mechanisch induzierte

Genexpression von Pleiotrophin unter physiologischen Bedingungen analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass es in beiden Zelltypen innerhalb einer Stunde nach Ende der Stimulation zu einer signifikanten Erhöhung der PTN-Genexpression im Vergleich zu den mechanisch unbelasteten Kontrollen kam. Auch auf Proteinebene konnte in AF-Zellen exemplarischer Spender ein mechanisch induzierter Anstieg der PTN-Expression detektiert werden, wobei dieser Effekt in AF-Zellen aus degeneriertem BS-Gewebe etwa doppelt so hoch war wie in AF-Zellen aus Traumagewebe. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass die Responsivität der BS-Zellen auf mechanische Belastung in einer degenerierten extrazellulären Matrix höher ist, wodurch sich pro-angiogene Effekte im Verlauf der BS-Degeneration verstärken könnten.

4.6 Spenderabhängige Einflüsse

Spenderabhängige Unterschiede (z.B. Degenerationsgrad des BS-Gewebes, Erkrankung, Alter, Geschlecht, genetischer Hintergrund) können die Regulation der Genexpression beeinflussen und somit zur Streuung der Ergebnisse beitragen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse im Hinblick auf einzelne Spendereinflüsse untersucht. Statistisch signifikante Korrelationen zwischen donorspezifischen Eigenschaften und dem Genexpressionsmuster konnten aufgrund des begrenzten Patientenkollektivs jedoch nicht ermittelt werden.

Um degenerative Einflüsse auf Transkriptionsebene zu analysieren, wurde die Genexpressionshöhe des mechanisch regulierbaren Transkriptionsfaktors c-fos in NP-Zellen aus Trauma-Gewebe oder degeneriertem BS-Gewebe von jeweils einem exemplarischen Donor miteinander verglichen. Die nach mechanischer Belastung gewonnenen Daten (3.6, Abbildung 35) weisen darauf hin, dass die Mechanosensitivität der Zellen im Verlauf der BS-Degeneration nachlässt. Im unbelasteten Zustand war die MMP-Genexpression der NP-Zellen aus degeneriertem Gewebe, das nach einem Bandscheibenvorfall (BSV) entnommen wurde, wesentlich niedriger als in NP-Zellen aus BS-Gewebe nach einem Trauma (z.B. MMP-2, 3.6, Abbildung 36). Diese Ergebnisse zeigen, dass sich das Genexpressionsprofil der Zellen aus Trauma-Gewebe und aus degenerierten Bandscheiben deutlich voneinander unterscheidet.

Diese Divergenzen, die vermutlich durch den Zustand des Gewebes bedingt sind, können durch weitere Studien aus der Literatur belegt werden. Lyons et al. verglichen in einer Studie die Verteilung der Hauptmatrixkomponenten in gesundem und degeneriertem BS-

Gewebe [114]. Obwohl die Kollagenverteilung zwischen intaktem und degeneriertem Gewebe kaum variierte, konnten die Autoren beobachten, dass der Proteoglykan- und Wasseranteil in degenerierten Bandscheiben geringer war als in gesunden Bandscheiben.
Zu ähnlichen Resultaten kamen auch Pearce et al., die humanes BS-Gewebe anhand des Degenerationsgrades klassifizierten und herausfanden, dass sowohl der PG- als auch Wassergehalt im Verlauf der BS-Degeneration abnahm [148]. Dagegen blieb die Kollagenkonzentration annähernd konstant.
Außerdem konnten Roberts et al. feststellen, dass sich die MMP-Expression sogar zwischen BSV-Gewebe und anders degeneriertem Bandscheibengewebe (z.B. durch Spondylolisthese) unterscheidet [158]. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass auch die Art der Erkrankung den Zellmetabolismus unterschiedlich verändert.
Diese Ergebnisse aus der Literatur lassen Rückschlüsse darauf zu, dass individuelle Gewebeunterschiede die Gen- und Proteinexpression stark beeinflussen können und bestätigen somit die Befunde der vorliegenden Arbeit.
Jedoch konnten aufgrund der fehlenden Bestimmung des Degenerationsgrades und der begrenzten Verfügbarkeit humaner Gewebeproben keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen individuellen Spendereinflüssen und der Genexpression ermittelt werden. Dennoch gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass ein solcher Zusammenhang bestehen könnte.
Hinsichtlich der Altersabhängigkeit wurde beispielsweise in einer Studie von Weiler et al. die Expression verschiedener matrixdegradierender Enzyme (MMPs) in humanem BS-Gewebe der Lendenwirbelsäule analysiert [198]. Das Patientenkollektiv bestand aus Spendern im Alter zwischen 0 und 86 Jahren. Im BS-Gewebe von Kindern und Jugendlichen waren fast keine der untersuchten MMPs nachweisbar, wohingegen im BS-Gewebe von jungen und älteren Erwachsenen MMP-1 und MMP-3 exprimiert waren. Dagegen fanden die Autoren heraus, dass die MMP-2-Expression unabhängig vom Alter war. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Expressionsmuster der am Matrixabbau beteiligten Enzyme und dem Alter der Spender gibt. Weiterhin konnten die Autoren auch eine signifikante Korrelation zwischen der MMP-Expression und degenerativen Veränderungen des BS-Gewebes (z.B. Risse) feststellen.
Boos et al. analysierten ebenfalls lumbales BS-Gewebe von humanen Spendern im Alter zwischen 0 und 88 Jahren [26]. Die Autoren berichteten, dass degenerative Veränderungen vor allem zwischen der dritten und der fünften Dekade zunahmen, wobei sich der

Degenerationsgrad hauptsächlich zwischen der sechsten und siebten Dekade verschlimmerte. Diese Resultate deuten auf eine Verbindung von degenerativen Prozessen und dem Patientenalter hin.

Die Studie von Miller et al. legt nicht nur eine Korrelation der BS-Degeneration mit dem Alter nahe, sondern auch mit dem Geschlecht [123]. Die Autoren werteten die Daten von 600 Bandscheiben aus 273 humanen Spendern im Alter von 0 bis 96 Jahren aus und stellten fest, dass die Bandscheiben von Männern im allgemeinen früher degenerierten als die Bandscheiben von Frauen. Zudem war der Degenerationsgrad umso höher, je älter das Spendergewebe war.

In der vorliegenden Arbeit stammte die Mehrzahl der klinischen Bandscheibenvorfall-Gewebeproben von Patientinnen, wie in Tabelle 2 unter 2.1.1 ersichtlich ist. Diese ungleiche Verteilung von Bandscheibenvorfällen zwischen Männern und Frauen könnte auf eine geschlechtsspezifische Disposition hinweisen, die auch aus der Literatur bekannt ist. Strömqvist et al. werteten 301 BSV-Daten aus, davon gingen 165 von Patienten und 136 von Patientinnen in die Studie ein [179]. Das Kollektiv von Verešciagina et al. setzte sich aus 53 BSV-Patienten und 47 BSV-Patientinnen zusammen [192]. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit deuten diese Daten allerdings darauf hin, dass die Inzidenz unter Männern geringfügig erhöht ist.

Außerdem gaben Verešciagina et al. in ihrer Studie an, dass ein Bandscheibenvorfall am häufigsten zwischen L5 und S1 auftrat, gefolgt von einem BSV zwischen L4 und L5. Diese Daten bestätigen die Verteilung in der vorliegenden Arbeit, in der die BSV-Proben ebenfalls aus den Segmenten L4/5 bzw. L5/S1 stammten. Im Gegensatz dazu weisen die Daten in der Studie von Miller et al. nicht darauf hin, dass die L5-Bandscheibe häufiger degeneriert ist als die Bandscheiben der anderen Segmente [123]. Jedoch zeigten die Daten eine tendenzielle Zunahme des Degenerationsgrades der Bandscheiben in caudaler Richtung.

Darüber hinaus wurde anhand einer Zwillingsstudie von Videman et al. auch der Einfluss genetischer Faktoren auf die BS-Degeneration untersucht [194]. Die Autoren konnten feststellen, dass bestimmte Polymorphismen im Vitamin D-Rezeptor-Gen mit der BS-Degeneration assoziiert waren. In einer weiteren Zwillingsstudie, die von Hestbaek et al. durchgeführt wurde, konnte ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen genetischen Faktoren und der Entstehung von Rückenschmerzen hergestellt werden [69]. In der vorliegenden Arbeit wurden genetische Unterschiede zwischen den Individuen in Bezug auf eine Prädisposition für eine BS-Degeneration nicht analysiert. Da die genetische

Variabilität aber vermutlich die Hauptursache für die beobachteten Schwankungen der Genexpressionsergebnisse darstellt, soll in einer Folgearbeit (EU-gefördertes Projekt Genodisc Health-F2-2008-201626) der Einfluss genetischer Faktoren bei der Pathogenese der Bandscheibendegeneration untersucht werden.

4.7 Variation des Kultursystems

In der vorliegenden Arbeit wurde unter 3.7 dargestellt, dass die Variation des Kultursystems das Genexpressionsprofil der BS-Zellen beeinflusste. Diese Unterschiede konnten nicht nur zwischen 2D- und 3D-Kultivierung, sondern auch bei Verwendung zweier verschiedener 3D-Systeme beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden bovine NP-Zellen sowohl in 3D-Alginatbeads als auch in 3D-Kollagen-Typ-I-Gelen kultiviert. Es konnte festgestellt werden, dass Aggrecan, welches die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix im Nukleus pulposus darstellt, in den Alginatbeads tendenziell höher exprimiert wurde, während die Genexpression kataboler Matrixmoleküle niedriger war als in den Kollagen-Typ-I-Gelen. Diese Ergebnisse deuten auf einen günstigeren Matrixumsatz von NP-Zellen in den Alginatbeads hin, was darauf schließen lässt, dass Alginatbeads für die Kultivierung von NP-Zellen besser geeignet sind als Kollagen-Typ-I-Gele.

Diese Hypothese konnte auch durch eine Studie von Horner et al. bestätigt werden, in der bovine NP-Zellen ebenfalls sowohl in 3D-Alginatbeads als auch in 3D-Kollagen-Gelen kultiviert wurden [76]. Es konnte festgestellt werden, dass die Proteoglykansynthese der NP-Zellen in den Alginatbeads deutlich höher war als im Kollagen-Gel.

In der Literatur ist bereits mehrfach beschrieben worden, dass Chondrozyten bzw. die knorpelähnlichen NP-Zellen ihren Phänotyp bei der Kultivierung in Alginatbeads weitgehend beibehalten [21, 42, 66, 76, 149]. Zudem ist bekannt, dass das NP-Gewebe überwiegend Kollagen-Typ-II enthält, jedoch kein Kollagen-Typ-I, während im AF sowohl Kollagen-Typ-I als auch Typ-II nachgewiesen werden konnte [4, 49, 135, 160]. Deshalb ist es naheliegend, dass das Kollagen-Typ-I-Gel für NP-Zellen im Gegensatz zu den AF-Zellen keine physiologische Matrix darstellt.

Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit humane AF-Zellen sowohl im 2D-Monolayer als auch in 3D-Kollagen-Typ-I-Gelen kultiviert. Unabhängig von der Variation der Umgebungsbedingungen waren die anabolen Matrixgene Aggrecan und Kollagen-Typ-I, dessen Anteil in der AF-Matrix überwiegt, im ML tendenziell stärker exprimiert als in den

Kollagen-Typ-I-Gelen. Jedoch war auch das katabole Matrixgen MMP-3 im ML häufig höher exprimiert als in den Kollagen-Typ-I-Gelen. Da die Expressionshöhe des *Housekeeping-Gens* GAPDH in beiden Kultursystemen vergleichbar war, können die quantitativen Unterschiede im Genexpressionsniveau nicht auf eine niedrigere RNA-Ausbeute aus den Kollagen-Typ-I-Gelen zurückgeführt werden. Aufgrund des Genexpressionsmusters konnte in keinem der beiden Kultursysteme ein wesentlich günstigeres Verhältnis von anabolen und katabolen Faktoren im Hinblick auf den Matrixumsatz festgestellt werden. Es kann daher angenommen werden, dass für Kurzzeitversuche auch das zweidimensionale Monolayer-System geeignet ist.

In der Literatur gibt es viele Studien, in denen die Effekte einer 2D- oder 3D-Kultivierung auf den Metabolismus von BS-Zellen untersucht wurden. Es finden sich jedoch zum Teil widersprüchliche Angaben, inwiefern das jeweilige Kultursystem den Phänotyp der BS-Zellen beeinflusst.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass BS-Zellen unterschiedlicher Spezies bei einer Kultivierung im Monolayer zur Dedifferenzierung neigten, die auch zu Veränderungen im Genexpressionsprofil führte [100, 168, 197]. Diese Veränderungen waren jedoch bei Rekultivierung der BS-Zellen im 3D-System (z.B. Alginatbeads) zum Teil reversibel.

Dagegen wurde in anderen Studien berichtet, dass Bandscheibenzellen aus den verschiedenen Geweberegionen auch im Monolayer ihren physiologischen Phänotyp bei einer Kultivierungsdauer von weniger als zwei Wochen beibehielten [40, 76].

Da in der vorliegenden Arbeit nur Kurzzeitversuche von weniger als einer Woche durchgeführt wurden, ist davon auszugehen, dass es in diesem Zeitraum noch zu keinen wesentlichen Veränderungen im Phänotyp der AF-Zellen kam.

Ein Vorteil der Zellkultivierung im Monolayer bestand darin, dass die Variation der Umgebungsbedingungen, welche Hauptgegenstand der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit war, im Monolayer besser durchführbar war als im Kollagen-Typ-I-Gel. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich die Versuche im ML-Kultursystem ausgewertet.

Neben dem Einfluss einer degenerativ veränderten Mikroumgebung wurden in der vorliegenden Arbeit auch mechanisch induzierte Effekte auf die Expression der Zielgene in den verschiedenen Kultursystemen untersucht. Da nach mechanischer Belastung insgesamt kaum einheitliche Tendenzen einer Genexpressionsänderung beobachtet werden konnten, ist zu vermuten, dass das Kultursystem bei der Wahrnehmung mechanischer Reize durch

die BS-Zellen eine untergeordnete Rolle spielte. Auch hinsichtlich der Genexpression von c-fos konnte kein Kultursystem eindeutig favorisiert werden.

In der Literatur wurde bislang nur wenig über den Einfluss mechanischer Belastung auf den Metabolismus von Bandscheibenzellen in unterschiedlichen Kultursystemen beschrieben.

Kasra et al. applizierten intermittierend dynamische Belastung mittels zyklischem hydrostatischem Druck auf BS-Zellen aus Kaninchen [96]. In dieser Studie wurden NP-Zellen in 3D-Alginatbeads ausgesät, während äußere AF-Zellen im 2D-Monolayer kultiviert wurden. Die Studie von Kasra et al. weist allerdings mehrere Limitationen auf. Einerseits wurde nicht derselbe Zelltyp parallel in den zwei verschiedenen Kultursystemen untersucht, sondern AF-Zellen im Monolayer und NP-Zellen in Alginatbeads. Andererseits wurden in beiden Kultursystemen unterschiedliche Druckamplituden appliziert. Dies kann erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse haben, wodurch ein Vergleich der beiden Kultursysteme hinsichtlich einer physiologischeren Bedingung unter mechanischer Belastung nicht möglich ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass für die Kultivierung von NP-Zellen Alginatbeads am besten geeignet zu sein scheinen, während AF-Zellen im Kurzzeitversuch sowohl im Monolayer als auch im Kollagen-Typ-I-Gel kultiviert werden können. Obwohl das Kollagen-Typ-I-Gel aufgrund seiner dreidimensionalen Struktur die in vivo Situation besser simuliert, bietet das Monolayersystem einige Vorteile, wie z.B. eine effizientere Übertragung der Umgebungsparameter (Glucose- und Sauerstoffversorgung, extrazelluläre Osmolarität, pH) auf die Zellen, da diese nicht durch eine 3D-Matrix „abgeschirmt“ werden. Daher muss die Auswahl des Kultursystems unter Berücksichtigung der jeweiligen Fragestellung getroffen werden.

5 Zusammenfassung

Rückenschmerzen stellen eine weit verbreitete Erkrankung dar, die zu Arbeitsausfällen, persönlichen Einschränkungen und enormen finanziellen Belastungen des Gesundheitssektors führt. Bisher konnte zwar nicht eindeutig belegt werden, dass degenerative Veränderungen der Bandscheibe die Entstehung von Rückenschmerzen (mit-) verursachen, jedoch gibt es Hinweise auf einen solchen Zusammenhang.
Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wechselwirkung mechanischer und ernährungsphysiologischer Faktoren auf Anulus- und Nukleuszellen im Rahmen der Bandscheibendegeneration zu untersuchen.

Zur Untersuchung der Fragestellung wurden einzelne Umgebungsparameter (Osmolarität, Glucose, Sauerstoff, pH) variiert, um eine degenerativ veränderte Mikroumgebung zu simulieren. Zusätzlich wurden Zellkulturen einer Versuchsgruppe unter den veränderten Umgebungsbedingungen mechanisch belastet, wobei Anuluszellen zyklischer Dehnung und Nukleuszellen zyklischem hydrostatischem Druck unterzogen wurden. Mit Hilfe von quantitativen Genexpressionsanalysen wurden die Effekte einer variierten Mikroumgebung bzw. mechanischer Belastung auf den Metabolismus der Bandscheibenzellen und auf die Regulation angiogener Faktoren ermittelt. Um Veränderungen der Proteoglykansynthese auf Proteinebene nachzuweisen, wurde ein Glykosaminoglykan (GAG)-Assay durchgeführt. Die Viabilität der Bandscheibenzellen wurde mittels Zellzählungen nach Trypanblaufärbung bestimmt. Außerdem wurde der Einfluss unterschiedlicher Kultursysteme (Monolayer, Alginatbeads, Kollagen-Typ-I-Gele) und spenderabhängiger Faktoren auf den Zellmetabolismus untersucht.

Eine degenerative Mikroumgebung veränderte den Zellmetabolismus gegenüber der physiologischen Situation. Eine erniedrigte Osmolarität verringerte die Genexpression von Aggrecan und die GAG-Synthese. Glucosemangel führte zu einer Abnahme der Zellviabilität, der GAG-Synthese und der Expression anaboler Matrixgene (Aggrecan, Kollagen-Typ-I und -Typ-II, Sox-9), wohingegen die Transkription kataboler Matrixgene unverändert oder tendenziell erhöht war. Bei einer Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich kam es ebenfalls zu einer erniedrigten Genexpression anaboler Matrixfaktoren. Sauerstoffmangel führte tendenziell zu einer Hochregulation anaboler und Herunterregulation kataboler Matrixgene. Hinsichtlich der Regulation angiogener Faktoren

(Pleiotrophin, VEGF) konnte bei Nährstofflimitation (Glucose, Sauerstoff) ein tendenzieller Anstieg der Genexpression beobachtet werden.
Nur vereinzelt wurden mechanisch induzierte Effekte detektiert, die sich vor allem auf die Genexpression von c-fos auswirkten. In humanen NP-Zellen konnte gezeigt werden, dass mechanische Belastung bei Glucosemangel zu einer tendenziellen Erhöhung der Kollagen-Typ-II-Genexpression führte, wohingegen matrixdegradierende Enzyme tendenziell herunterreguliert wurden. In bovinen NP-Zellen kam es im sauren pH-Bereich zu einer mechanisch induzierten Erhöhung der Genexpression anaboler Matrixfaktoren.
Spenderabhängige Einflüsse konnten tendenziell zwischen Bandscheibenzellen aus Traumagewebe und aus degeneriertem Gewebe festgestellt werden, alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede konnten aufgrund des begrenzten Spenderkollektivs nicht eindeutig belegt werden. Bezüglich des Matrixumsatzes konnte ein günstigeres Genexpressionsprofil von NP-Zellen in Alginatbeads als in Kollagen-Typ-I-Gele beobachtet werden, für Anuluszellen war ein solcher Unterschied zwischen Monolayerkultur und Kollagen-Typ-I-Gel nicht erkennbar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die sich die Variation der Umgebungsfaktoren sehr stark auf die Gen- und Proteinexpression der Bandscheibenzellen auswirkte. Diese Erkenntnisse konnten durch weitere Studien aus der Literatur bestätigt werden. Dagegen verursachten mechanische Reize, insbesondere hydrostatischer Druck, eher geringe Effekte. Jedoch wurde die Responsivität der Bandscheibenzellen auf mechanische Belastung von der Mikroumgebung beeinflusst. Diese Interaktion ist aus der Literatur bislang nicht bekannt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Auswahl des Kultursystems bei in vitro Versuchen eine wichtige Rolle spielt, was ebenfalls durch zahlreiche Studien aus der Literatur belegt werden konnte.

In einer degenerativen Mikroumgebung wurde der Metabolismus von Bandscheibenzellen generell so verändert, dass die Matrixsynthese tendenziell erniedrigt und der Matrixabbau verstärkt wurde. Dieses veränderte Expressionsprofil könnte zur Förderung degenerativer Prozesse beitragen. Nach mechanischer Belastung konnte in exemplarischen humanen Spendern ein günstigerer Matrixumsatz erzielt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein adäquater mechanischer Reiz zu einer Verlangsamung der Bandscheibendegeneration führen könnte.

6 Literaturverzeichnis

1. Adams M, Bogduk N, Burton K, Dolan P: The Biomechanics of Back Pain., Churchill Livingstone, Edinburgh, UK (2002)

2. Adams MA: Biomechanics of back pain. Acupunct Med 22: 178-88 (2004)

3. Adams MA, Roughley PJ: What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? Spine 31: 2151-61 (2006)

4. Adams P, Eyre DR, Muir H: Biochemical aspects of development and ageing of human lumbar intervertebral discs. Rheumatol Rehabil 16: 22-9 (1977)

5. Aguiar DJ, Johnson SL, Oegema TR: Notochordal cells interact with nucleus pulposus cells: regulation of proteoglycan synthesis. Exp Cell Res 246: 129-37 (1999)

6. Ali R, Le Maitre CL, Richardson SM, Hoyland JA, Freemont AJ: Connective tissue growth factor expression in human intervertebral disc: implications for angiogenesis in intervertebral disc degeneration. Biotech Histochem 83: 239-45 (2008)

7. Alini M, Roughley PJ, Antoniou J, Stoll T, Aebi M: A biological approach to treating disc degeneration: not for today, but maybe for tomorrow. Eur Spine J 11 Suppl 2: S215-20 (2002)

8. An HS, Takegami K, Kamada H, Nguyen CM, Thonar EJ, Singh K, Andersson GB, Masuda K: Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits. Spine 30: 25-31; discussion 31-2 (2005)

9. Baer AE, Laursen TA, Guilak F, Setton LA: The micromechanical environment of intervertebral disc cells determined by a finite deformation, anisotropic, and biphasic finite element model. J Biomech Eng 125: 1-11 (2003)

10. Baer AE, Wang JY, Kraus VB, Setton LA: Collagen gene expression and mechanical properties of intervertebral disc cell-alginate cultures. J Orthop Res 19: 2-10 (2001)

11. Bartels EM, Fairbank JC, Winlove CP, Urban JP: Oxygen and lactate concentrations measured in vivo in the intervertebral discs of patients with scoliosis and back pain. Spine 23: 1-7; discussion 8 (1998)

12. Barth M, Diepers M, Weiss C, Thome C: Two-year outcome after lumbar microdiscectomy versus microscopic sequestrectomy: part 2: radiographic evaluation and correlation with clinical outcome. Spine 33: 273-9 (2008)

13. Battie MC, Videman T, Levalahti E, Gill K, Kaprio J: Heritability of low back pain and the role of disc degeneration. Pain 131: 272-80 (2007)

14. Beattie PF: Current understanding of lumbar intervertebral disc degeneration: a review with emphasis upon etiology, pathophysiology, and lumbar magnetic resonance imaging findings. J Orthop Sports Phys Ther 38: 329-40 (2008)

15. Benneker LM, Heini PF, Alini M, Anderson SE, Ito K: 2004 Young Investigator Award Winner: vertebral endplate marrow contact channel occlusions and intervertebral disc degeneration. Spine 30: 167-73 (2005)

16. Benya PD, Shaffer JD: Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. Cell 30: 215-24 (1982)

17. Bernick S, Cailliet R: Vertebral end-plate changes with aging of human vertebrae. Spine 7: 97-102 (1982)

18. Bibby SR, Fairbank JC, Urban MR, Urban JP: Cell viability in scoliotic discs in relation to disc deformity and nutrient levels. Spine 27: 2220-8; discussion 2227-8 (2002)

19. Bibby SR, Jones DA, Ripley RM, Urban JP: Metabolism of the intervertebral disc: effects of low levels of oxygen, glucose, and pH on rates of energy metabolism of bovine nucleus pulposus cells. Spine 30: 487-96 (2005)

20. Bibby SR, Urban JP: Effect of nutrient deprivation on the viability of intervertebral disc cells. Eur Spine J 13: 695-701 (2004)

21. Binette F, McQuaid DP, Haudenschild DR, Yaeger PC, McPherson JM, Tubo R: Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro. J Orthop Res 16: 207-16 (1998)

22. Bishop PB: Proteoglycans and degenerative spondylosis. J Manipulative Physiol Ther 11: 36-40 (1988)

23. Boden SD, Davis DO, Dina TS, Patronas NJ, Wiesel SW: Abnormal magnetic-resonance scans of the lumbar spine in asymptomatic subjects. A prospective investigation. J Bone Joint Surg Am 72: 403-8 (1990)

24. Boden SD, McCowin PR, Davis DO, Dina TS, Mark AS, Wiesel S: Abnormal magnetic-resonance scans of the cervical spine in asymptomatic subjects. A prospective investigation. J Bone Joint Surg Am 72: 1178-84 (1990)

25. Boos N, Wallin A, Gbedegbegnon T, Aebi M, Boesch C: Quantitative MR imaging of lumbar intervertebral disks and vertebral bodies: influence of diurnal water content variations. Radiology 188: 351-4 (1993)

26. Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, Weiler C, Spratt KF, Nerlich AG: Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science. Spine 27: 2631-44 (2002)

27. Brisby H: Pathology and possible mechanisms of nervous system response to disc degeneration. J Bone Joint Surg Am 88 Suppl 2: 68-71 (2006)

28. Broberg KB: Slow deformation of intervertebral discs. J Biomech 26: 501-12 (1993)

29. Bruehlmann SB, Rattner JB, Matyas JR, Duncan NA: Regional variations in the cellular matrix of the annulus fibrosus of the intervertebral disc. J Anat 201: 159-71 (2002)

30. Buckwalter JA: Aging and degeneration of the human intervertebral disc. Spine 20: 1307-14 (1995)

31. Butler WF: Comparative anatomy and development of the mammalian disc. In: Ghosh P (Hrsg) The Biology of the Intervertebral Disc., CRC Press, Boca Raton, S. 84 – 108 (1989)

32. Buttermann GR, Mullin WJ: Pain and disability correlated with disc degeneration via magnetic resonance imaging in scoliosis patients. Eur Spine J 17: 240-9 (2008)

33. Cappello R, Bird JL, Pfeiffer D, Bayliss MT, Dudhia J: Notochordal cell produce and assemble extracellular matrix in a distinct manner, which may be responsible for the maintenance of healthy nucleus pulposus. Spine 31: 873-82; discussion 883 (2006)

34. Cassidy JJ, Hiltner A, Baer E: Hierarchical structure of the intervertebral disc. Connect Tissue Res 23: 75-88 (1989)

35. Chelberg MK, Banks GM, Geiger DF, Oegema TR, Jr.: Identification of heterogeneous cell populations in normal human intervertebral disc. J Anat 186 (Pt 1): 43-53 (1995)

36. Chen J, Baer AE, Paik PY, Yan W, Setton LA: Matrix protein gene expression in intervertebral disc cells subjected to altered osmolarity. Biochem Biophys Res Commun 293: 932-8 (2002)

37. Chen J, Yan W, Setton LA: Molecular phenotypes of notochordal cells purified from immature nucleus pulposus. Eur Spine J 15 Suppl 3: S303-11 (2006)

38. Chen J, Yan W, Setton LA: Static compression induces zonal-specific changes in gene expression for extracellular matrix and cytoskeletal proteins in intervertebral disc cells in vitro. Matrix Biol 22: 573-83 (2004)

39. Chou AI, Bansal A, Miller GJ, Nicoll SB: The effect of serial monolayer passaging on the collagen expression profile of outer and inner anulus fibrosus cells. Spine 31: 1875-81 (2006)

40. Chou AI, Reza AT, Nicoll SB: Distinct intervertebral disc cell populations adopt similar phenotypes in three-dimensional culture. Tissue Eng Part A 14: 2079-87 (2008)

41. Chuang SY, Odono RM, Hedman TP: Effects of exogenous crosslinking on in vitro tensile and compressive moduli of lumbar intervertebral discs. Clin Biomech (Bristol, Avon) 22: 14-20 (2007)

42. Chubinskaya S, Huch K, Schulze M, Otten L, Aydelotte MB, Cole AA: Gene expression by human articular chondrocytes cultured in alginate beads. J Histochem Cytochem 49: 1211-20 (2001)

43. Court C, Colliou OK, Chin JR, Liebenberg E, Bradford DS, Lotz JC: The effect of static in vivo bending on the murine intervertebral disc. Spine J 1: 239-45 (2001)

44. Crean JK, Roberts S, Jaffray DC, Eisenstein SM, Duance VC: Matrix metalloproteinases in the human intervertebral disc: role in disc degeneration and scoliosis. Spine 22: 2877-84 (1997)

45. Dagenais S, Caro J, Haldeman S: A systematic review of low back pain cost of illness studies in the United States and internationally. Spine J 8: 8-20 (2008)

46. Dascalu A, Korenstein R, Oron Y, Nevo Z: A hyperosmotic stimulus regulates intracellular pH, calcium, and S-100 protein levels in avian chondrocytes. Biochem Biophys Res Commun 227: 368-73 (1996)

47. Diamant B, Karlsson J, Nachemson A: Correlation between lactate levels and pH in discs of patients with lumbar rhizopathies. Experientia 24: 1195-6 (1968)

48. DiFabio JL, Pearce RH, Caterson B, Hughes H: The heterogeneity of the non-aggregating proteoglycans of the human intervertebral disc. Biochem J 244: 27-33 (1987)

49. Eyre DR, Muir H: Types I and II collagens in intervertebral disc. Interchanging radial distributions in annulus fibrosus. Biochem J 157: 267-70 (1976)

50. Ferguson SJ, Steffen T: Biomechanics of the aging spine. Eur Spine J 12 Suppl 2: S97-S103 (2003)

51. Freemont AJ, Peacock TE, Goupille P, Hoyland JA, O'Brien J, Jayson MI: Nerve ingrowth into diseased intervertebral disc in chronic back pain. Lancet 350: 178-81 (1997)

52. Fujita N, Imai J, Suzuki T, Yamada M, Ninomiya K, Miyamoto K, Iwasaki R, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Watanabe S, Suda T, Toyama Y, Miyamoto T:

Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for nucleus pulposus cells in the intervertebral disc. Biochem Biophys Res Commun 372: 367-72 (2008)

53. Furnes O, Boe A, Sudmann E: [Lumbar intervertebral disk prolapse in adolescents]. Tidsskr Nor Laegeforen 116: 2993-5 (1996)

54. Ganey T, Libera J, Moos V, Alasevic O, Fritsch KG, Meisel HJ, Hutton WC: Disc chondrocyte transplantation in a canine model: a treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. Spine 28: 2609-20 (2003)

55. Gantenbein B, Grunhagen T, Lee CR, van Donkelaar CC, Alini M, Ito K: An in vitro organ culturing system for intervertebral disc explants with vertebral endplates: a feasibility study with ovine caudal discs. Spine 31: 2665-73 (2006)

56. Gray ML, Pizzanelli AM, Grodzinsky AJ, Lee RC: Mechanical and physiochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. J Orthop Res 6: 777-92 (1988)

57. Gruber HE, Gordon B, Williams C, Norton HJ, Hanley EN, Jr.: Vertebral endplate and disc changes in the aging sand rat lumbar spine: cross-sectional analyses of a large male and female population. Spine 32: 2529-36 (2007)

58. Gruber HE, Hanley EN, Jr.: Observations on morphologic changes in the aging and degenerating human disc: secondary collagen alterations. BMC Musculoskelet Disord 3: 9 (2002)

59. Guilak F, Ting-Beall HP, Baer AE, Trickey WR, Erickson GR, Setton LA: Viscoelastic properties of intervertebral disc cells. Identification of two biomechanically distinct cell populations. Spine 24: 2475-83 (1999)

60. Guiot BH, Fessler RG: Molecular biology of degenerative disc disease. Neurosurgery 47: 1034-40 (2000)

61. Hadjipavlou AG, Tzermiadianos MN, Bogduk N, Zindrick MR: The pathophysiology of disc degeneration: a critical review. J Bone Joint Surg Br 90: 1261-70 (2008)

62. Haefeli M, Kalberer F, Saegesser D, Nerlich AG, Boos N, Paesold G: The course of macroscopic degeneration in the human lumbar intervertebral disc. Spine 31: 1522-31 (2006)

63. Handa T, Ishihara H, Ohshima H, Osada R, Tsuji H, Obata K: Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis and matrix metalloproteinase production in the human lumbar intervertebral disc. Spine 22: 1085-91 (1997)

64. Haro H, Kato T, Komori H, Osada M, Shinomiya K: Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced angiogenesis in herniated disc resorption. J Orthop Res 20: 409-15 (2002)

65. Haschtmann D, Stoyanov JV, Ferguson SJ: Influence of diurnal hyperosmotic loading on the metabolism and matrix gene expression of a whole-organ intervertebral disc model. J Orthop Res 24: 1957-66 (2006)

66. Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ: Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. J Cell Sci 107 (Pt 1): 17-27 (1994)

67. Hayes AJ, Benjamin M, Ralphs JR: Extracellular matrix in development of the intervertebral disc. Matrix Biol 20: 107-21 (2001)

68. Heneghan P, Riches PE: The strain-dependent osmotic pressure and stiffness of the bovine nucleus pulposus apportioned into ionic and non-ionic contributors. J Biomech 41: 2411-6 (2008)

69. Hestbaek L, Iachine IA, Leboeuf-Yde C, Kyvik KO, Manniche C: Heredity of low back pain in a young population: a classical twin study. Twin Res 7: 16-26 (2004)

70. Hickey DS, Hukins DW: Relation between the structure of the annulus fibrosus and the function and failure of the intervertebral disc. Spine 5: 106-16 (1980)

71. Hohaus C, Ganey TM, Minkus Y, Meisel HJ: Cell transplantation in lumbar spine disc degeneration disease. Eur Spine J 17 Suppl 4: 492-503 (2008)

72. Holm S, Holm AK, Ekstrom L, Karladani A, Hansson T: Experimental disc degeneration due to endplate injury. J Spinal Disord Tech 17: 64-71 (2004)

73. Holm S, Maroudas A, Urban JP, Selstam G, Nachemson A: Nutrition of the intervertebral disc: solute transport and metabolism. Connect Tissue Res 8: 101-19 (1981)

74. Holm S, Selstam G: Oxygen tension alterations in the intervertebral disc as a response to changes in the arterial blood. Ups J Med Sci 87: 163-74 (1982)

75. Holm S, Selstam G, Nachemson A: Carbohydrate metabolism and concentration profiles of solutes in the canine lumbar intervertebral disc. Acta Physiol Scand 115: 147-56 (1982)

76. Horner HA, Roberts S, Bielby RC, Menage J, Evans H, Urban JP: Cells from different regions of the intervertebral disc: effect of culture system on matrix expression and cell phenotype. Spine 27: 1018-28 (2002)

77. Horner HA, Urban JP: 2001 Volvo Award Winner in Basic Science Studies: Effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc. Spine 26: 2543-9 (2001)

78. Huang CY, Gu WY: Effects of mechanical compression on metabolism and distribution of oxygen and lactate in intervertebral disc. J Biomech 41: 1184-96 (2008)

79. Hutton WC, Elmer WA, Boden SD, Hyon S, Toribatake Y, Tomita K, Hair GA: The effect of hydrostatic pressure on intervertebral disc metabolism. Spine 24: 1507-15 (1999)

80. Hutton WC, Elmer WA, Bryce LM, Kozlowska EE, Boden SD, Kozlowski M: Do the intervertebral disc cells respond to different levels of hydrostatic pressure? Clin Biomech (Bristol, Avon) 16: 728-34 (2001)

81. Hutton WC, Toribatake Y, Elmer WA, Ganey TM, Tomita K, Whitesides TE: The effect of compressive force applied to the intervertebral disc in vivo. A study of proteoglycans and collagen. Spine 23: 2524-37 (1998)

82. Iatridis JC, MaClean JJ, Ryan DA: Mechanical damage to the intervertebral disc annulus fibrosus subjected to tensile loading. J Biomech 38: 557-65 (2005)

83. Iatridis JC, Mente PL, Stokes IA, Aronsson DD, Alini M: Compression-induced changes in intervertebral disc properties in a rat tail model. Spine 24: 996-1002 (1999)

84. Inkinen RI, Lammi MJ, Lehmonen S, Puustjarvi K, Kaapa E, Tammi MI: Relative increase of biglycan and decorin and altered chondroitin sulfate epitopes in the degenerating human intervertebral disc. J Rheumatol 25: 506-14 (1998)

85. Ishihara H, McNally DS, Urban JP, Hall AC: Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in different regions of the intervertebral disk. J Appl Physiol 80: 839-46 (1996)

86. Ishihara H, Urban JP: Effects of low oxygen concentrations and metabolic inhibitors on proteoglycan and protein synthesis rates in the intervertebral disc. J Orthop Res 17: 829-35 (1999)

87. Ishihara H, Warensjo K, Roberts S, Urban JP: Proteoglycan synthesis in the intervertebral disk nucleus: the role of extracellular osmolality. Am J Physiol 272: C1499-506 (1997)

88. Iwashina T, Mochida J, Miyazaki T, Watanabe T, Iwabuchi S, Ando K, Hotta T, Sakai D: Low-intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation and proteoglycan production in rabbit intervertebral disc cells cultured in alginate. Biomaterials 27: 354-61 (2006)

89. Iwashina T, Mochida J, Sakai D, Yamamoto Y, Miyazaki T, Ando K, Hotta T: Feasibility of using a human nucleus pulposus cell line as a cell source in cell transplantation therapy for intervertebral disc degeneration. Spine 31: 1177-86 (2006)

90. Jahnke MR, McDevitt CA: Proteoglycans of the human intervertebral disc. Electrophoretic heterogeneity of the aggregating proteoglycans of the nucleus pulposus. Biochem J 251: 347-56 (1988)

91. Jia CQ, Zhao JG, Zhang SF, Qi F: Stromal cell-derived factor-1 and vascular endothelial growth factor may play an important role in the process of neovascularization of herniated intervertebral discs. J Int Med Res 37: 136-44 (2009)

92. Johnson WE, Evans H, Menage J, Eisenstein SM, El Haj A, Roberts S: Immunohistochemical detection of Schwann cells in innervated and vascularized human intervertebral discs. Spine 26: 2550-7 (2001)

93. Johnson WE, Patterson AM, Eisenstein SM, Roberts S: The presence of pleiotrophin in the human intervertebral disc is associated with increased vascularization: an immunohistologic study. Spine 32: 1295-302 (2007)

94. Johnson WE, Stephan S, Roberts S: The influence of serum, glucose and oxygen on intervertebral disc cell growth in vitro: implications for degenerative disc disease. Arthritis Res Ther 10: R46 (2008)

95. Kaapa E, Holm S, Han X, Takala T, Kovanen V, Vanharanta H: Collagens in the injured porcine intervertebral disc. J Orthop Res 12: 93-102 (1994)

96. Kasra M, Goel V, Martin J, Wang ST, Choi W, Buckwalter J: Effect of dynamic hydrostatic pressure on rabbit intervertebral disc cells. J Orthop Res 21: 597-603 (2003)

97. Katz MM, Hargens AR, Garfin SR: Intervertebral disc nutrition. Diffusion versus convection. Clin Orthop Relat Res243-5 (1986)

98. Kauppila LI: Ingrowth of blood vessels in disc degeneration. Angiographic and histological studies of cadaveric spines. J Bone Joint Surg Am 77: 26-31 (1995)

99. Kauppila LI, Penttila A, Karhunen PJ, Lalu K, Hannikainen P: Lumbar disc degeneration and atherosclerosis of the abdominal aorta. Spine 19: 923-9 (1994)

100. Kluba T, Niemeyer T, Gaissmaier C, Grunder T: Human anulus fibrosis and nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: effect of degeneration and culture system on cell phenotype. Spine 30: 2743-8 (2005)

101. Koike Y, Uzuki M, Kokubun S, Sawai T: Angiogenesis and inflammatory cell infiltration in lumbar disc herniation. Spine 28: 1928-33 (2003)

102. Korecki CL, Kuo CK, Tuan RS, Iatridis JC: Intervertebral disc cell response to dynamic compression is age and frequency dependent. J Orthop Res (2008)

103. Korecki CL, MacLean JJ, Iatridis JC: Dynamic compression effects on intervertebral disc mechanics and biology. Spine 33: 1403-9 (2008)

104. Kraemer J, Kolditz D, Gowin R: Water and electrolyte content of human intervertebral discs under variable load. Spine 10: 69-71 (1985)

105. Kroeber MW, Unglaub F, Wang H, Schmid C, Thomsen M, Nerlich A, Richter W: New in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effects of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration. Spine 27: 2684-90 (2002)

106. Kumar R, Kumar V, Das NK, Behari S, Mahapatra AK: Adolescent lumbar disc disease: findings and outcome. Childs Nerv Syst 23: 1295-9 (2007)

107. Kurunlahti M, Tervonen O, Vanharanta H, Ilkko E, Suramo I: Association of atherosclerosis with low back pain and the degree of disc degeneration. Spine 24: 2080-4 (1999)

108. Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA: Localization of degradative enzymes and their inhibitors in the degenerate human intervertebral disc. J Pathol 204: 47-54 (2004)

109. Le Maitre CL, Pockert A, Buttle DJ, Freemont AJ, Hoyland JA: Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration. Biochem Soc Trans 35: 652-5 (2007)

110. Lee CR, Sakai D, Nakai T, Toyama K, Mochida J, Alini M, Grad S: A phenotypic comparison of intervertebral disc and articular cartilage cells in the rat. Eur Spine J 16: 2174-85 (2007)

111. Lee RB, Wilkins RJ, Razaq S, Urban JP: The effect of mechanical stress on cartilage energy metabolism. Biorheology 39: 133-43 (2002)

112. Lin DX, Tang H, Wang ET, Chen WX: An ABC transporter is required for alkaline stress and potassium transport regulation in Sinorhizobium meliloti. FEMS Microbiol Lett 293: 35-41 (2009)

113. Lotz JC, Colliou OK, Chin JR, Duncan NA, Liebenberg E: Compression-induced degeneration of the intervertebral disc: an in vivo mouse model and finite-element study. Spine 23: 2493-506 (1998)

114. Lyons G, Eisenstein SM, Sweet MB: Biochemical changes in intervertebral disc degeneration. Biochim Biophys Acta 673: 443-53 (1981)

115. Magnier C, Boiron O, Wendling-Mansuy S, Chabrand P, Deplano V: Nutrient distribution and metabolism in the intervertebral disc in the unloaded state: A parametric study. J Biomech 42: 100-8 (2009)

116. Maniadakis N, Gray A: The economic burden of back pain in the UK. Pain 84: 95-103 (2000)

117. Marchand F, Ahmed AM: Investigation of the laminate structure of lumbar disc anulus fibrosus. Spine 15: 402-10 (1990)

118. Maroudas A: Distribution and diffusion of solutes in articular cartilage. Biophys J 10: 365-79 (1970)

119. Maroudas A, Muir H, Wingham J: The correlation of fixed negative charge with glycosaminoglycan content of human articular cartilage. Biochim Biophys Acta 177: 492-500 (1969)

120. Maroudas A, Stockwell RA, Nachemson A, Urban J: Factors involved in the nutrition of the human lumbar intervertebral disc: cellularity and diffusion of glucose in vitro. J Anat 120: 113-30 (1975)

121. McNally DS, Arridge RG: An analytical model of intervertebral disc mechanics. J Biomech 28: 53-68 (1995)

122. Meisel HJ, Siodla V, Ganey T, Minkus Y, Hutton WC, Alasevic OJ: Clinical experience in cell-based therapeutics: disc chondrocyte transplantation A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. Biomol Eng 24: 5-21 (2007)

123. Miller JA, Schmatz C, Schultz AB: Lumbar disc degeneration: correlation with age, sex, and spine level in 600 autopsy specimens. Spine 13: 173-8 (1988)

124. Murata M, Yudoh K, Nakamura H, Kato T, Inoue K, Chiba J, Nishioka K, Masuko-Hongo K: Distinct signaling pathways are involved in hypoxia- and IL-1-induced VEGF expression in human articular chondrocytes. J Orthop Res 24: 1544-54 (2006)

125. Nachemson A: Intradiscal measurements of pH in patients with lumbar rhizopathies. Acta Orthop Scand 40: 23-42 (1969)

126. Nachemson A: Lumbar intradiscal pressure. Experimental studies on post-mortem material. Acta Orthop Scand Suppl 43: 1-104 (1960)

127. Nachemson A, Lewin T, Maroudas A, Freeman MA: In vitro diffusion of dye through the end-plates and the annulus fibrosus of human lumbar inter-vertebral discs. Acta Orthop Scand 41: 589-607 (1970)

128. Nachemson AL: Disc pressure measurements. Spine 6: 93-7 (1981)

129. Negoro K, Kobayashi S, Takeno K, Uchida K, Baba H: Effect of osmolarity on glycosaminoglycan production and cell metabolism of articular chondrocyte under three-dimensional culture system. Clin Exp Rheumatol 26: 534-41 (2008)

130. Neidlinger-Wilke C, Liedert A, Wuertz K, Buser Z, Rinkler C, Kafer W, Ignatius A, Claes L, Roberts S, Johnson WE: Mechanical stimulation alters pleiotrophin and aggrecan expression by human intervertebral disc cells and influences their capacity to stimulate endothelial migration. Spine 34: 663-9 (2009)

131. Neidlinger-Wilke C, Wilke HJ, Claes L: Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental method and its application. J Orthop Res 12: 70-8 (1994)

132. Neidlinger-Wilke C, Wurtz K, Liedert A, Schmidt C, Borm W, Ignatius A, Wilke HJ, Claes L: A three-dimensional collagen matrix as a suitable culture system for the comparison of cyclic strain and hydrostatic pressure effects on intervertebral disc cells. J Neurosurg Spine 2: 457-65 (2005)

133. Neidlinger-Wilke C, Wurtz K, Urban JP, Borm W, Arand M, Ignatius A, Wilke HJ, Claes LE: Regulation of gene expression in intervertebral disc cells by low and high hydrostatic pressure. Eur Spine J 15 Suppl 3: S372-8 (2006)

134. Nemoto O, Yamagishi M, Yamada H, Kikuchi T, Takaishi H: Matrix metalloproteinase-3 production by human degenerated intervertebral disc. J Spinal Disord 10: 493-8 (1997)

135. Nerlich AG, Boos N, Wiest I, Aebi M: Immunolocalization of major interstitial collagen types in human lumbar intervertebral discs of various ages. Virchows Arch 432: 67-76 (1998)

136. Nerlich AG, Schaaf R, Walchli B, Boos N: Temporo-spatial distribution of blood vessels in human lumbar intervertebral discs. Eur Spine J 16: 547-55 (2007)

137. Nishida T: Kinetics of tissue and serum matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intervertebral disc degeneration and disc herniation. Kurume Med J 46: 39-50 (1999)

138. Oda J, Tanaka H, Tsuzuki N: Intervertebral disc changes with aging of human cervical vertebra. From the neonate to the eighties. Spine 13: 1205-11 (1988)

139. Oegema TR, Jr.: The role of disc cell heterogeneity in determining disc biochemistry: a speculation. Biochem Soc Trans 30: 839-44 (2002)

140. Ohshima H, Urban JP: The effect of lactate and pH on proteoglycan and protein synthesis rates in the intervertebral disc. Spine 17: 1079-82 (1992)

141. Ong A, Anderson J, Roche J: A pilot study of the prevalence of lumbar disc degeneration in elite athletes with lower back pain at the Sydney 2000 Olympic Games. Br J Sports Med 37: 263-6 (2003)

142. Ortolani F, Raspanti M, Franchi M, Marchini M: Localization of different alcian blue-proteoglycan particles in the intervertebral disc. Basic Appl Histochem 32: 443-53 (1988)

143. Paesold G, Nerlich AG, Boos N: Biological treatment strategies for disc degeneration: potentials and shortcomings. Eur Spine J 16: 447-68 (2007)

144. Parsons S, Breen A, Foster NE, Letley L, Pincus T, Vogel S, Underwood M: Prevalence and comparative troublesomeness by age of musculoskeletal pain in different body locations. Fam Pract 24: 308-16 (2007)

145. Paul R, Haydon RC, Cheng H, Ishikawa A, Nenadovich N, Jiang W, Zhou L, Breyer B, Feng T, Gupta P, He TC, Phillips FM: Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease. Spine 28: 755-63 (2003)

146. Pazzaglia UE, Salisbury JR, Byers PD: Development and involution of the notochord in the human spine. J R Soc Med 82: 413-5 (1989)

147. Peacock A: Observations on the postnatal structure of the intervertebral disc in man. J Anat 86: 162-79 (1952)

148. Pearce RH, Grimmer BJ, Adams ME: Degeneration and the chemical composition of the human lumbar intervertebral disc. J Orthop Res 5: 198-205 (1987)

149. Petit B, Masuda K, D'Souza AL, Otten L, Pietryla D, Hartmann DJ, Morris NP, Uebelhart D, Schmid TM, Thonar EJ: Characterization of crosslinked collagens synthesized by mature articular chondrocytes cultured in alginate beads: comparison of two distinct matrix compartments. Exp Cell Res 225: 151-61 (1996)

150. Poiraudeau S, Monteiro I, Anract P, Blanchard O, Revel M, Corvol MT: Phenotypic characteristics of rabbit intervertebral disc cells. Comparison with cartilage cells from the same animals. Spine 24: 837-44 (1999)

151. Powell MC, Wilson M, Szypryt P, Symonds EM, Worthington BS: Prevalence of lumbar disc degeneration observed by magnetic resonance in symptomless women. Lancet 2: 1366-7 (1986)

152. Pritchard S, Guilak F: The role of F-actin in hypo-osmotically induced cell volume change and calcium signaling in anulus fibrosus cells. Ann Biomed Eng 32: 103-11 (2004)

153. Purmessur D, Freemont AJ, Hoyland JA: Expression and regulation of neurotrophins in the nondegenerate and degenerate human intervertebral disc. Arthritis Res Ther 10: R99 (2008)

154. Renier JC: [Introduction to the biomechanics of the lumbar spine]. Rev Rhum Mal Osteoartic 55: 341-50 (1988)

155. Richardson SM, Knowles R, Tyler J, Mobasheri A, Hoyland JA: Expression of glucose transporters GLUT-1, GLUT-3, GLUT-9 and HIF-1alpha in normal and degenerate human intervertebral disc. Histochem Cell Biol 129: 503-11 (2008)

156. Risbud MV, Fertala J, Vresilovic EJ, Albert TJ, Shapiro IM: Nucleus pulposus cells upregulate PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways under hypoxic conditions and resist apoptosis induced by serum withdrawal. Spine 30: 882-9 (2005)

157. Roberts S: Disc morphology in health and disease. Biochem Soc Trans 30: 864-9 (2002)

158. Roberts S, Caterson B, Menage J, Evans EH, Jaffray DC, Eisenstein SM: Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc. Spine 25: 3005-13 (2000)

159. Roberts S, Evans H, Trivedi J, Menage J: Histology and pathology of the human intervertebral disc. J Bone Joint Surg Am 88 Suppl 2: 10-4 (2006)

160. Roberts S, Menage J, Duance V, Wotton S, Ayad S: 1991 Volvo Award in basic sciences. Collagen types around the cells of the intervertebral disc and cartilage end plate: an immunolocalization study. Spine 16: 1030-8 (1991)

161. Roberts S, Urban JP, Evans H, Eisenstein SM: Transport properties of the human cartilage endplate in relation to its composition and calcification. Spine 21: 415-20 (1996)

162. Rufai A, Benjamin M, Ralphs JR: The development of fibrocartilage in the rat intervertebral disc. Anat Embryol (Berl) 192: 53-62 (1995)

163. Rutges J, Kummer J, Oner F, Verbout A, Castelein R, Roestenburg H, Dhert W, Creemers L: Increased MMP-2 activity during intervertebral disc degeneration is correlated to MMP-14 levels. J Pathol 214: 523-30 (2008)

164. Saftic R, Grgic M, Ebling B, Splavski B: Case-control study of risk factors for lumbar intervertebral disc herniation in Croatian island populations. Croat Med J 47: 593-600 (2006)

165. Salo J, Kaigle Holm A, Indahl A, Mackiewicz Z, Sukura A, Holm S, Jamsen E, Konttinen YT: Expression of vascular endothelial growth factor receptors coincide with

blood vessel in-growth and reactive bone remodelling in experimental intervertebral disc degeneration. Clin Exp Rheumatol 26: 1018-26 (2008)

166. Sanchez JC, Wilkins RJ: Effects of hypotonic shock on intracellular pH in bovine articular chondrocytes. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 135: 575-83 (2003)

167. Sato K, Kikuchi S, Yonezawa T: In vivo intradiscal pressure measurement in healthy individuals and in patients with ongoing back problems. Spine 24: 2468-74 (1999)

168. Sato M, Kikuchi T, Asazuma T, Yamada H, Maeda H, Fujikawa K: Glycosaminoglycan accumulation in primary culture of rabbit intervertebral disc cells. Spine 26: 2653-60 (2001)

169. Schmidt CO, Raspe H, Pfingsten M, Hasenbring M, Basler HD, Eich W, Kohlmann T: Back pain in the German adult population: prevalence, severity, and sociodemographic correlates in a multiregional survey. Spine 32: 2005-11 (2007)

170. Schneider S, Mohnen SM, Schiltenwolf M, Rau C: Comorbidity of low back pain: representative outcomes of a national health study in the Federal Republic of Germany. Eur J Pain 11: 387-97 (2007)

171. Selard E, Shirazi-Adl A, Urban JP: Finite element study of nutrient diffusion in the human intervertebral disc. Spine 28: 1945-53; discussion 1953 (2003)

172. Serrano R, Ruiz A, Bernal D, Chambers JR, Arino J: The transcriptional response to alkaline pH in Saccharomyces cerevisiae: evidence for calcium-mediated signalling. Mol Microbiol 46: 1319-33 (2002)

173. Setton LA, Chen J: Cell mechanics and mechanobiology in the intervertebral disc. Spine 29: 2710-23 (2004)

174. Setton LA, Chen J: Mechanobiology of the intervertebral disc and relevance to disc degeneration. J Bone Joint Surg Am 88 Suppl 2: 52-7 (2006)

175. Sive JI, Baird P, Jeziorsk M, Watkins A, Hoyland JA, Freemont AJ: Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs. Mol Pathol 55: 91-7 (2002)

176. Sobajima S, Shimer AL, Chadderdon RC, Kompel JF, Kim JS, Gilbertson LG, Kang JD: Quantitative analysis of gene expression in a rabbit model of intervertebral disc degeneration by real-time polymerase chain reaction. Spine J 5: 14-23 (2005)

177. Soukane DM, Shirazi-Adl A, Urban JP: Computation of coupled diffusion of oxygen, glucose and lactic acid in an intervertebral disc. J Biomech 40: 2645-54 (2007)

178. Sowa G, Vadala G, Studer R, Kompel J, Iucu C, Georgescu H, Gilbertson L, Kang J: Characterization of intervertebral disc aging: longitudinal analysis of a rabbit model by magnetic resonance imaging, histology, and gene expression. Spine 33: 1821-8 (2008)

179. Stromqvist F, Ahmad M, Hildingsson C, Jonsson B, Stromqvist B: Gender differences in lumbar disc herniation surgery. Acta Orthop 79: 643-9 (2008)

180. Takeno K, Kobayashi S, Negoro K, Uchida K, Miyazaki T, Yayama T, Shimada S, Baba H: Physical limitations to tissue engineering of intervertebral disc cells: effect of extracellular osmotic change on glycosaminoglycan production and cell metabolism. Laboratory investigation. J Neurosurg Spine 7: 637-44 (2007)

181. Thompson JP, Pearce RH, Schechter MT, Adams ME, Tsang IK, Bishop PB: Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc. Spine 15: 411-5 (1990)

182. Tolonen J, Gronblad M, Virri J, Seitsalo S, Rytomaa T, Karaharju EO: Platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor expression in disc herniation tissue: and immunohistochemical study. Eur Spine J 6: 63-9 (1997)

183. Trout JJ, Buckwalter JA, Moore KC, Landas SK: Ultrastructure of the human intervertebral disc. I. Changes in notochordal cells with age. Tissue Cell 14: 359-69 (1982)

184. Uchiyama Y, Cheng CC, Danielson KG, Mochida J, Albert TJ, Shapiro IM, Risbud MV: Expression of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc is regulated by p75NTR and ERK signaling. J Bone Miner Res 22: 1996-2006 (2007)

185. Urban J: Biochemistry: Disc biochemistry in relation to function. In: Wiesel S, Weinstein J, Herkowitz H (Hrsg) The lumbar spine., WB Saunders, Philadelphia, S. 271-281 (1996)

186. Urban JP, Maroudas A: Swelling of the intervertebral disc in vitro. Connect Tissue Res 9: 1-10 (1981)

187. Urban JP, Maroudas A, Bayliss MT, Dillon J: Swelling pressures of proteoglycans at the concentrations found in cartilaginous tissues. Biorheology 16: 447-64 (1979)

188. Urban JP, McMullin JF: Swelling pressure of the inervertebral disc: influence of proteoglycan and collagen contents. Biorheology 22: 145-57 (1985)

189. Urban JP, McMullin JF: Swelling pressure of the lumbar intervertebral discs: influence of age, spinal level, composition, and degeneration. Spine 13: 179-87 (1988)

190. Urban JP, Smith S, Fairbank JC: Nutrition of the intervertebral disc. Spine 29: 2700-9 (2004)

191. van der Werf M, Lezuo P, Maissen O, van Donkelaar CC, Ito K: Inhibition of vertebral endplate perfusion results in decreased intervertebral disc intranuclear diffusive transport. J Anat 211: 769-74 (2007)

192. Veresciagina K, Ambrozaitis KV, Spakauskas B: Health-related quality-of-life assessment in patients with low back pain using SF-36 questionnaire. Medicina (Kaunas) 43: 607-13 (2007)

193. Vernon-Roberts B, Moore RJ, Fraser RD: The natural history of age-related disc degeneration: the pathology and sequelae of tears. Spine 32: 2797-804 (2007)

194. Videman T, Leppavuori J, Kaprio J, Battie MC, Gibbons LE, Peltonen L, Koskenvuo M: Intragenic polymorphisms of the vitamin D receptor gene associated with intervertebral disc degeneration. Spine 23: 2477-85 (1998)

195. Walsh AJ, Lotz JC: Biological response of the intervertebral disc to dynamic loading. J Biomech 37: 329-37 (2004)

196. Wang DL, Jiang SD, Dai LY: Biologic response of the intervertebral disc to static and dynamic compression in vitro. Spine 32: 2521-8 (2007)

197. Wang JY, Baer AE, Kraus VB, Setton LA: Intervertebral disc cells exhibit differences in gene expression in alginate and monolayer culture. Spine 26: 1747-51; discussion 1752 (2001)

198. Weiler C, Nerlich AG, Zipperer J, Bachmeier BE, Boos N: 2002 SSE Award Competition in Basic Science: expression of major matrix metalloproteinases is associated with intervertebral disc degradation and resorption. Eur Spine J 11: 308-20 (2002)

199. Weishaupt D, Zanetti M, Hodler J, Boos N: MR imaging of the lumbar spine: prevalence of intervertebral disk extrusion and sequestration, nerve root compression, end plate abnormalities, and osteoarthritis of the facet joints in asymptomatic volunteers. Radiology 209: 661-6 (1998)

200. Wenig CM, Schmidt CO, Kohlmann T, Schweikert B: Costs of back pain in Germany. Eur J Pain (2008)

201. Wilke HJ, Neef P, Caimi M, Hoogland T, Claes LE: New in vivo measurements of pressures in the intervertebral disc in daily life. Spine 24: 755-62 (1999)

202. Wilkins RJ, Hall AC: Control of matrix synthesis in isolated bovine chondrocytes by extracellular and intracellular pH. J Cell Physiol 164: 474-81 (1995)

203. Windhaber RA, Wilkins RJ, Meredith D: Functional characterisation of glucose transport in bovine articular chondrocytes. Pflugers Arch 446: 572-7 (2003)

204. Wu JJ, Eyre DR: Intervertebral disc collagen. Usage of the short form of the alpha1(IX) chain in bovine nucleus pulposus. J Biol Chem 278: 24521-5 (2003)

205. Wuertz K, Godburn K, Neidlinger-Wilke C, Urban J, Iatridis JC: Behavior of mesenchymal stem cells in the chemical microenvironment of the intervertebral disc. Spine 33: 1843-9 (2008)

206. Wuertz K, Urban JP, Klasen J, Ignatius A, Wilke HJ, Claes L, Neidlinger-Wilke C: Influence of extracellular osmolarity and mechanical stimulation on gene expression of intervertebral disc cells. J Orthop Res 25: 1513-22 (2007)

207. Yamazaki N, Browning JA, Wilkins RJ: Modulation of Na(+) x H(+) exchange by osmotic shock in isolated bovinearticular chondrocytes. Acta Physiol Scand 169: 221-8 (2000)

208. Zhou G, Dai L, Jiang X, Ma Z, Ping J, Li J, Li X: Effects of human midkine on spontaneous resorption of herniated intervertebral discs. Int Orthop (2009)

209. Zhu D, Chen S, Dong X, Zhu W, Lu H: [An observation on the micro-structure and form of annulus fibrosus of lumbar interverbral disc 4, 5]. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi 24: 842-5 (2007)

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Lutz Claes und Prof. Dr. Anita Ignatius für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik.

Prof. Dr. Anita Ignatius für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, ihre Betreuung und ihr Interesse am Fortgang der Arbeit.

Prof. Dr. Rolf Brenner für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Dr. Cornelia Neidlinger-Wilke für ihre Betreuung und Unterstützung bei dieser Arbeit.

Daniela Kuschel, Claudia Kinzelmann, Jenny Marinaci und Nadine Todt für ihre Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Arbeit.

Dr. Frank Heuer für die Durchführung der hydrostatischen Druckstimulation und seine sonstige Unterstützung.

Werner Ohmayer und Herbert Schmitt für ihre Hilfsbereitschaft in vielen Dingen.

Allen Mitarbeitern des Institutes für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Meinen Bürokollegen Robert Blakytny, Martina Reusch, Philipp Jermendy, Susanne Laumen, Angela Thiel und Christian Ehrnthaller für die stets angenehme Atmosphäre, ein immer offenes Ohr für die zahlreichen Probleme und die vielen wissenschaftlichen und sonstigen Diskussionen. ☺

Meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und ihr Verständnis für den Mangel an Zeit. ☺

Meiner Schwester Susanne, die stets ein offenes Ohr hatte und mir beim Durchhalten die wichtigste Stütze war. ☺☺☺

Julia Christina Rinkler

geboren am 09.04.1980 in Heilbronn

Schulbildung

1986–1990	Grundschule Oberstenfeld
1990–1999	Herzog-Christoph-Gymnasium Beilstein Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/1999–11/2004	Diplomstudiengang Molekulare Biotechnologie Universität Bielefeld Abschluss: Diplom-Biotechnologin
12/2003–11/2004	Diplomarbeit Technische Fakultät, Abteilung Zelluläre Genetik Betreuer: Prof. Dr. H. Ragg und PD Dr. K. Friehs Thema: „Versuche zur Identifizierung von Bindungspartnern von Heparin-Kofaktor-II“

Berufstätigkeit

12/2004-09/2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Freiburg Leiter: Prof. Dr. Christian Bogdan
10/2005-12/2005	Praktikantin in der Abteilung DNA-Analytik am Landeskriminalamt Stuttgart Leiter: Dr. Werner Pflug
Seit 03/2006	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Universität Ulm Leiterin: Prof. Dr. Anita Ignatius

Ulm, 20. Mai 2009