

AUS DER ABTEILUNG
FÜR INNERE MEDIZIN I – EXPERIMENTELLE
RHEUMATOLOGIE/NEUROIMMUNOLOGIE
PROF. DR: RAINER H STRAUB
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

NEURONALE ALPHA-ADRENERGE STIMULATION VON IFN- γ , IL-6 UND CXCL1
IN MURINEN MILZEN IM TIERMODELL DER ARTHRITISSPÄTPHASE.

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Thomas Raphael Meinel

2015

AUS DER ABTEILUNG
FÜR INNERE MEDIZIN I – EXPERIMENTELLE
RHEUMATOLOGIE/NEUROIMMUNOLOGIE
PROF. DR: RAINER H STRAUB
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

NEURONALE ALPHA-ADRENERGE STIMULATION VON IFN- γ , IL-6 UND CXCL-1
IN MURINEN MILZEN BEIM TIERMODELL DER ARTHRITISSPÄTPHASE.

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Thomas Raphael Meinel

2015

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: *Prof. Dr. Rainer H Straub*

2. Berichterstatter: *Prof. Dr. med. Dr. h.c. Joachim Grifka*

Tag der mündlichen Prüfung: 30.07.2015

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis.....	1
2. Abbildungsverzeichnis	2
3. Tabellenverzeichnis.....	2
4. Abkürzungsverzeichnis	3
5. Einleitung	4
6. Material und Methoden.....	5
a. Tiere	5
b. Arthritisinduktion und Milzaufbereitung	6
c. Superfusionsaufbau	6
d. Experimente mit Antagonisten und elektrischer Stimulation	7
e. Messung der Zytokinkonzentrationen im Superfusat	8
f. Statistische Analyse und Datenpräsentation	8
7. Ergebnisse	9
a. Elektrisch induzierte Inhibition von IFN- γ , CXCL1 und IL-6, sowie Stimulation von TGF- β	9
b. Neurotransmitter-abhängige Regulation der IFN- γ -Freisetzung in der Milz	11
c. Neurotransmitter-abhängige Regulation der CXCL1-Freisetzung in der Milz.....	13
d. Neurotransmitter-abhängige Regulation der IL-6-Freisetzung in der Milz	15
e. Neurotransmitter-abhängige Regulation der TGF- β -Freisetzung in der Milz.....	17
8. Diskussion	19
9. Zusammenfassung.....	22
10. Literaturverzeichnis.....	23
11. Lebenslauf.....	25
12. Danksagung	28
13. Originalarbeit	28

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Versuchsaufbau und Datenanalyse	7
Abbildung 2: Einfluss der elektrischen Stimulation auf Freisetzung von IFN- γ , CXCL1, IL-6 und TGF- β in der Milz.	10
Abbildung 3: Neurotransmitter-abhängige Regulation der IFN- γ -Freisetzung in der Milz.	12
Abbildung 4: Neurotransmitter-abhängige Regulation der CXCL1-Freisetzung in der Milz.	14
Abbildung 5: Neurotransmitter-abhängige Regulation der IL-6-Freisetzung in der Milz.	16
Abbildung 6: Neurotransmitter-abhängige Regulation der TGF- β -Freisetzung in der Milz.	18

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der Zytokinregulation zwischen Früh- und Spätphase des Arthritismodells in der murinen Milz.....	20
--	----

4. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
CIA	Kollagen Typ-II induzierte Arthritis
CXCL1	Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand 1
DPCPX	Dipropyl-8-Cyclopentylxanthine
ES	Elektrische Stimulation
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen
IFN- γ	Interferon-gamma
IL-6	Interleukin-6
KC	CXCL1
NA	Noradrenalin
RA	Rheumatoide Arthritis
SD	Standardabweichung
SNS	Sympathisches Nervensystem
TGF- β	Transforming growth factor β
TH+	Tyrosinhydroxylase-positiv

5. Einleitung

Betrachtet man die ausgeprägte zirkadiane Rhythmik der Gelenkbeschwerden oder den Krankheitsverlauf bei Hemiplegie, wird schnell klar, dass das Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis (RA) stark von endokrinen und neuronalen Einflüssen abhängig ist. So spielt das sympathische Nervensystem (SNS) eine wichtige Rolle im Tiermodell der RA bei Ratten und Mäusen (Levine et al. 1984; Lorton et al. 2002; Lubahn et al. 2004; Härle et al. 2005; Boyle et al. 2006; Levine 2006; Härle et al. 2008; van Maanen, Marjolein A. et al. 2009; Boettger et al. 2010). Das SNS hat im Gegensatz zum proinflammatorischen sensiblen Nervensystem eine ambivalente pro- und antiinflammatorische Wirkung auf den Verlauf der Arthritis.

Vor der klinischen Manifestation der Erkrankung wirkt das SNS proinflammatorisch – nach Ausbruch der Arthritis wirkt es entzündungshemmend (Lubahn et al. 2004; Härle et al. 2005). Es ist möglich, das SNS lokal oder systemisch auszuschalten (=Sympathektomie), indem man 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) injiziert. Mit dieser Methodik wurde eine ambivalente Rolle des SNS auf den Verlauf der experimentellen Arthritis nachgewiesen, je nachdem an welchen Organen des Körpers, z.B. separat an Lymphknoten oder systemisch durch Injektion ins Peritoneum, die Sympathektomie durchgeführt wurde (Lorton et al. 1999). Im Allgemeinen kann das SNS vor Induktion der Arthritis durch Kollageninjektion oder in der frühen asymptomatischen Phase als proinflammatorisch gewertet werden, da die systemische Ausschaltung den Verlauf positiv beeinflusst (Levine et al. 1986; Lorton et al. 1999; Härle et al. 2005, 2008). Der Übergang von pro- zu antiinflammatorischer Wirkung ist allerdings noch nicht hinreichend verstanden. Da der Einfluss auf den klinischen Verlauf sehr ausgeprägt ist, bietet die Beeinflussung des Wechselspiels zwischen SNS und Immunsystem mögliche neue Ansätze für die klinische Therapie der RA.

Der Zeitpunkt des Wechsels von pro- zu antiinflammatorischen Einflüssen könnte bisherige Inkongruenzen in der Literatur erklären. Er ist durch neuroimmunologische Veränderungen beim Ausbruch der Erkrankung charakterisiert. So sind zum Beispiel bei gesunden Tieren das Synovium und die sekundär lymphatischen Organe wie die Milz dicht sympathisch innerviert. Diese Innervation geht allerdings in entzündetem Gewebe von arthritischen Tieren ab Beginn der Erkrankung verloren (Härle et al. 2005; Lorton et al. 2005; del Rey et al. 2008; Straub et al. 2008). Passend dazu wurde auch bei humaner länger bestehender RA ein Verlust von sympathischen Nervenfasern im Synovialgewebe gezeigt, was einen Spezies-unabhängigen Mechanismus eines durch Inflammation ausgelösten Nervenfaserverlust des SNS unterstützt (Pereira da Silva, J A und Carmo-Fonseca 1990; Mapp et al. 1990; Miller et al. 2000).

Mit dem Untergang von sympathischen Nervenfasern treten Tyrosinhydroxylase-positive (TH+), Katecholamin-produzierende Zellen in den Gelenken, im Thymus, im Knochenmark, in drainierenden Lymphknoten und in der Milz von arthritischen Mäusen auf (Capellino et al. 2010; Capellino et al. 2012). Obgleich diese Zellen bereits bei Immunisierung vorhanden sind, steigt ihre Zahl zum Zeitpunkt des Krankheitsausbruchs von Kollagen Typ-II induzierter Arthritis (CIA) an und ist in der Spätphase der

Erkrankung maximal (Capellino et al. 2012). Ebenso konnten diese TH+ und Katecholamin-produzierenden Zellen in Form von Fibroblasten, Makrophagen und B-Zellen im entzündeten Synovialgewebe bei Patienten mit länger bestehender RA als Beleg für ein Spezies-unabhängiges Phänomen nachgewiesen werden (Capellino et al. 2010).

Capellino et al. konnten über eine kurzzeitige Steigerung der Katecholaminfreisetzung die antiinflammatorische Potenz dieser Zellen belegen (Capellino et al. 2010). Aus diesen Überlegungen heraus ist es gut denkbar, dass sich die klassische Schnittstelle zwischen sympathischen Nervenfasern und dem Immunsystem in entzündetem Gewebe, im aktivierten Synovium und in lymphatischem Gewebe wie der Milz im Krankheitsverlauf deutlich ändert. Tatsächlich wurden die pathophysiologischen Auswirkungen des sympathischen Nervenfaserverlusts in der Milz oder das Auftreten von Katecholamin-produzierenden Zellen dort noch nicht hinreichend untersucht.

Straub et al. entwickelten eine Superfusionstechnik, mit Hilfe derer das neuroimmunologische Zusammenspiel in Milzschnitten von gesunden und CIA-erkrankten Mäusen erforscht werden können (Straub et al. 1995; 2004; 2008; 2011). Hiermit konnte bereits gezeigt werden, dass in der Frühphase der Arthritis durch elektrische Stimulation der SNS-Fasern die Sekretion von pro- und anti-entzündlichen Mediatoren wie IFN- γ , IL-6, CXCL1 (KC) und TGF- β über α - und β -adrenerge Rezeptorstimulation beeinflusst wird (Straub et al. 2008, 2011). Die von Capellino et al. beschriebenen Katecholamin-produzierenden Zellen liefern nun auch eine mögliche Erklärung für eine nicht-stimulationsabhängige Freisetzung von Neurotransmittern, da die Katecholaminfreisetzung nicht durch elektrische Stimulation ausgelöst werden sollte (Capellino et al. 2010, 2012).

Unser Projekt nahm nun die Spätphase des CIA-Modells unter die Lupe, da hier das Zusammenspiel von sympathischen Nervenimpulsen auf die Mediatorfreisetzung in der Milz noch nie betrachtet wurde. Unsere Hypothese lautete: Der Verlust von sympathischen Nervenfasern und das Auftreten von TH+ Zellen in der Milz in der Spätphase der Arthritis verändert das neuroimmunologische Zusammenspiel. Es wurden wie in den Vorprojekten die klassischen proinflammatorischen Transmitter IFN- γ , IL-6 und CXCL1 sowie der eher antiinflammatorische Mediator TGF- β quantitativ erfasst. In verschiedenen Experimenten wurde die α 1/2-adrenerge, β -adrenerge und A1-adenosinerge Signalkaskade beeinflusst.

6. Material und Methoden

a. Tiere

Die Experimente wurden an weiblichen DBA/1 Mäuse von Elevage Janvier (Le Genest St. Isle, France) im Alter von 6-8 Wochen durchgeführt. Diese wurden bei standardisierten äußeren Bedingungen (12 Stunden Licht, 12 Stunden Dunkelheit) in Käfigen zu fünf Tieren pro Käfig bei Standardkost *ad libitum* gehalten. Die Experimente wurden im Einklang mit den von der Regierung der Oberpfalz auferlegten Regulationen durchgeführt (Az. 54-2531.1-07/08).

b. Arthritisinduktion und Milzaufbereitung

Zur Induktion der Arthritis wurde den Mäusen 100µg bovines Kollagen Typ II (Chondrex Inc., via MD Biosciences, Zürich, Schweiz) intradermal am Abgang des Schwanzes in einer Emulsion mit Freund Adjuvans injiziert (Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Der Injektionstag stellte den Tag „0“ dar. 21 Tage später wurde eine Boosterung der Immunreaktion mit Freund Adjuvans durchgeführt.

Zwischen Tag 46 und 68, im Mittel \pm Standardabweichung (SD): $58 \pm 5,2$ Tage, also in der Spätphase der symptomatischen Arthritis, wurden die Tiere getötet. Zu diesem Zeitpunkt waren der histologische Gelenkschaden bereits stark ausgeprägt, die sympathischen Nervenfasern in der Milz fast komplett untergegangen und die Katecholamin-produzierenden Zellen in maximaler Ausprägung vorhanden. Daher ist von der Spätphase der Arthritis im Tiermodell auszugehen. In dieser Phase des Erkrankungsverlaufs wurde die Freisetzung von IFN- γ , IL-6, CXCL1 und TGF- β in der Milz untersucht. Die Milz wurde drei Stunden nach Injektion von 300µg Concanavalin A in die Schwanzvene entnommen. Concanavalin A ist ein Stimulator der T-Zell-Aktivität und es wurde verabreicht, um die Zytokin-produzierenden Zellen zu stimulieren und so die Zytokinfreisetzung zu verstärken (Dwyer und Johnson 1981).

Die Milz wurde nach Dekapitation der Mäuse gegen 12:00 Uhr mittags entfernt und auf Eis in Kulturmedium (RPMI 1640, 25 mM HEPES, pH 7,4, 5% fetales Rinderserum, 30µM Mercaptoethanol, 0,57 mM Ascorbinsäure, 1,3 mM Calcium, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin – alle Sigma, Deisenhofen, Deutschland) aufbewahrt. Danach wurden 0,35 mm dicke Scheibchen der Milz mittels eines Gewebezerkleinerers (Mickle Lab., Gomshall, England) erstellt und diese vorsichtig im Kulturmedium gewaschen, um Zelldetritus zu entfernen.

c. Superfusionsaufbau

Diese Milzscheibchen wurden in Silikonkammern von ca. 80µl Volumen, umspült von oben beschriebenem Kulturmedium, zwischen zwei Platinelektroden eingespannt. Sie wurden mit einem PC-gesteuerten Stimulator elektrisch gereizt (MR OEG, Wien, Österreich). Nachgewiesenermaßen bewirkt die elektrische Stimulation Aktionspotentiale und so Neurotransmitterfreisetzung aus den erhaltenen sympathischen Nervenfasern (Straub et al. 1995). Eine flusskontrollierte Pumpe (Ismatec, Wertheim, Deutschland) sorgte für konstante Umspülung der Milzstückchen mit Medium. Dieses Medium mit den ausgewaschenen Mediatoren wurde in sterilen Behältnissen aufgefangen.

Die Superfusion lief sechs Stunden bei einer Flussrate von 66µl pro Minute - diese ähnelt der Flussrate der interstitiellen Flüssigkeit (Chary und Jain 1989). Der Versuchsaufbau sah insgesamt 32 Kammern in vier Reihen zu je acht Kammern vor. Während der ersten zwei Stunden wurden alle Kammern ohne zusätzliche Beeinflussung gleichmäßig gespült. Zwischen Minute 100 und 120 (2h-Wert) wurde das Superfusat jeder einzelnen Kammer gesammelt, um den Baseline-Wert (2h-Wert) für jede Kammer zu bestimmen. Danach wurde je eine Reihe der Kammern Elektrostimulation (ES), Elektrostimulation und Rezeptorenblockern, Rezeptorenblockern alleine oder als Kontrolle keiner Beeinflussung ausgesetzt. Schließlich wurde zwischen

Minute 345 und 360 (6h-Wert) das Superfusat wiederum aufgefangen, um die Zytokinkonzentration des Endwerts (6h-Wert) zu vermessen.

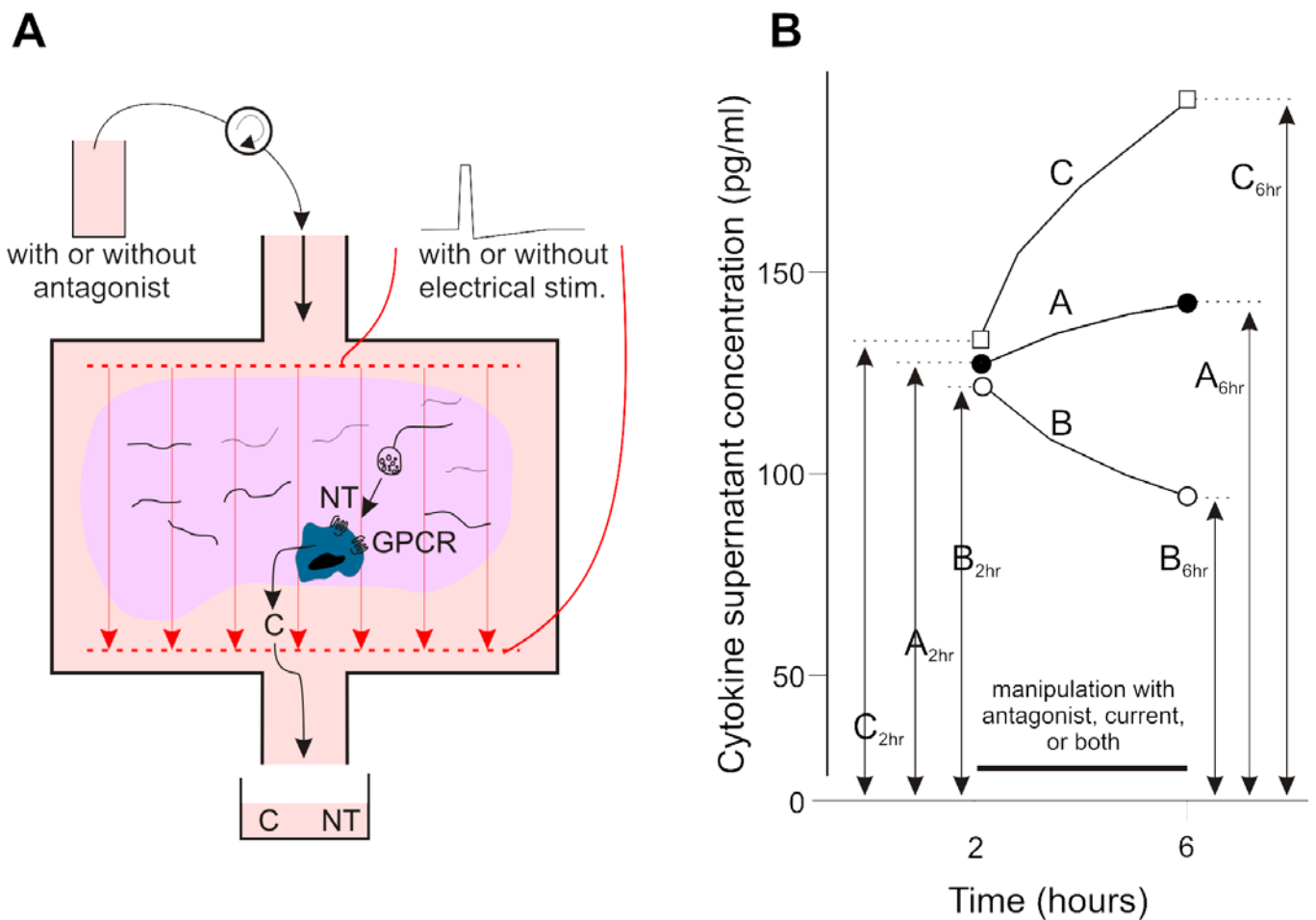


Abbildung 1: Versuchsaufbau und Datenanalyse: (A) Von Medium umspültes Milzstück zwischen zwei Platinelektroden (gestrichelte rote Linie) mit Zytokinen (C) und Neurotransmittern (NT) im Superfusat. (B) Berechnung der Standardisierung der Zytokinkonzentrationen mit Beispielen – z.B. Anstieg der Zytokinkonzentration des Stoffes A auf 110% und C 140% des Ausgangswertes, sowie Abfall der Konzentration des Stoffes B auf 70% des Ausgangswertes. Die Bildung eines Quotienten des Wertes zur 6. Stunde geteilt durch den Wert zur 2. Stunde, zeigt den Anstieg bzw. Abfall eines Zytokins an.

Abkürzungen: GPCR: G-Protein gekoppelter Rezeptor

d. Experimente mit Antagonisten und elektrischer Stimulation

Um die Effekte der freigesetzten endogenen Neurotransmitter indirekt zu überprüfen, wurden Propranolol (β 1,2-adrenerger Antagonist), Benoxathian (α 1-adrenerger Antagonist), Yohimbin (α 2-adrenerger Antagonist) und 1,3-Dipropyl-8-Cyclopentylxanthine (DPCPX, A1-adenosinerger Antagonist – alle Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in den angegebenen Konzentrationen verwendet. Aus Vorversuchen bestimmte relevante Dosisstärken wurden verwendet (Straub et al. 2008, 2011). Die Antagonisten wurden unmittelbar vor Einsatz aufgelöst und dem Kulturmedium bei Minute 100 zugesetzt. Nach einer Einwaschphase von 20 Minuten wurde dann die elektrische Stimulation in Form von 45.000 rechteckigen Spannungspulsen mit 5 Hz, 2 ms und 43 mA angelegt.

e. Messung der Zytokinkonzentrationen im Superfusat

Murines IFN- γ wurde im Superfusat mittels ELISA (BioLegend Inc., San Diego, CA via Biozol, Eching, Deutschland) mit einer Sensitivität < 8 pg/ml und einer Assaybreite von 8 – 500 pg/ml bestimmt. Mit einer Sensitivität von 20 pg/ml und einer Assaybreite von 20 – 1000 pg/ml erfolgte die Messung von murinem CXCL1 mittels ELISA (Cedarlane, Ontario, Canada via Biozol, Eching, Deutschland). Murines IL-6 wurde auf selbstbeschichteten ELISA-Platten (BioLegend Inc., San Diego, CA via Biozol, Eching, Deutschland) mit einer Sensitivität von <8 pg/ml und einer Assaybreite von 8 – 500 pg/ml bestimmt. Murines TGF- β wurde ebenfalls mittels ELISA (eBioscience, Camarillo, CA via NatuTec, Frankfurt, Deutschland) mit einer Sensitivität <60 pg/ml und einer Assaybreite von 60 – 8000 pg/ml bestimmt. Der Intra-assay und Inter-assay Variationskoeffizient war für alle Ansätze <10%.

f. Statistische Analyse und Datenpräsentation

Mit unserem Aufbau war es möglich, 32 Kammern an einem Versuchstag mit einer Mäusemilz zu bestücken. An einem Tag wurden vier verschiedene Reihen mit folgenden Bedingungen angesetzt: Aufbau (A): Acht Milzstückchen, die nach dem 2h-Wert weiterhin ohne elektrische Stimulation und ohne Zusatz von Rezeptorenblockern gelassen wurden (Kontrolle). Aufbau (B): Acht Milzstückchen, die zwischen dem 2h-Wert und dem 6h-Wert allein dem Rezeptorenblocker ausgesetzt waren, um nicht-neuronale Einflüsse aufzudecken. Aufbau (C): Acht Milzstückchen, die zwischen dem 2h-Wert und dem 6h-Wert nur der elektrischen Stimulation ausgesetzt waren. Aufbau (D): Acht Milzstückchen, die zwischen dem 2h-Wert und dem 6h-Wert sowohl elektrischer Stimulation als auch Rezeptorblockern ausgesetzt waren, um die neuronalen Einflüsse auf die Zytokinproduktion zu quantifizieren.

In der Regel wurden 24 bis 32 Milzstückchen, entsprechend drei bis vier Mäusen, pro Antagonistenkonzentration, verwendet. Die Zytokinkonzentrationen des 6h-Werts wurden auf den 2h-Wert standardisiert, um die Variation unterschiedlicher Milzteilchengrößen oder unterschiedlichen Anteils sympathischer Innervation auszugleichen. Bei strenger Korrelation von 2h-Wert mit 6h-Wert wurde das dimensionslose Verhältnis $\phi = 100 \times ([\text{Zytokin}]_{6h} / [\text{Zytokin}]_{2h})$ berechnet. Dabei wurden alle ϕ s auf das Verhältnis von 6h-Wert der Kontrolle zu 2h-Wert der Kontrolle bezogen (ϕ der Kontrolle entspricht 100%). Diese Methode der Normalisierung ist einer Normalisierung bezogen auf die Zahl ausgewaschener Leukozyten, Trockengewicht, Volumen der Schnitte oder Proteingehalt überlegen (Straub et al. 1995).

Der Mann-Whitney-Rang-Test wurde verwendet, um die Gruppen zu vergleichen. Die Spearman-Rang-Korrelation wurde verwendet, um die Korrelation zwischen zwei Variablen zu untersuchen. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ verwendet (alle SPSS 17.0, SPSS Inc., Chicago, USA).

7. Ergebnisse

a. Elektrisch induzierte Inhibition von IFN- γ , CXCL1 und IL-6, sowie Stimulation von TGF- β

Die Freisetzung der drei Zytokine IFN- γ , CXCL1 und IL-6 wurde sowohl in der frühen als auch in der späten Phase des CIA-Modells durch elektrische Stimulation, also durch induzierte Erhöhung des Sympathikotonus, inhibiert (Abb. 2A-C), wohingegen die Freisetzung von TGF- β stimuliert wurde (Abb. 2D). Im Gegensatz zur frühen Phase der Arthritis war die Freisetzung von IFN- γ und CXCL1 in der späten Phase der Arthritis wesentlich geringer ausgeprägt, während die Konzentration von IL-6 und TGF- β vergleichbar blieb (Abb. 2). Zusätzlich war der Einfluss auf die Inhibition von IFN- γ , CXCL1 und IL-6 bzw. die Stimulation der TGF- β -Freisetzung durch den künstlichen Sympathikotonus in der Spätphase der Arthritis wesentlich geringer (Abb. 2). Die relative Effektstärke der Stimulation bzw. Inhibition durch elektrische Impulse war jeweils wesentlich deutlicher in der Frühphase der Arthritis ausgeprägt (Abb.2 Boxen rechts oben).

Um zu untersuchen, ob der Zeitpunkt der Untersuchung nach Immunisierung einen Einfluss auf die Inhibition der proinflammatorischen Zytokine oder Stimulation des antiinflammatorischen TGF- β hatte, wurden Korrelationsanalysen zwischen dem Untersuchungszeitpunkt und der ausgelösten Effektstärke durchgeführt. Hinsichtlich aller untersuchten Zytokine gab es keine signifikante Korrelation zwischen Untersuchungszeitpunkt und Effektstärke. Daher ist von relativ stabilen Verhältnissen in der Milz zwischen Tag 46 und 68 nach Immunisierung auszugehen (Spätphasenmodell der CIA).

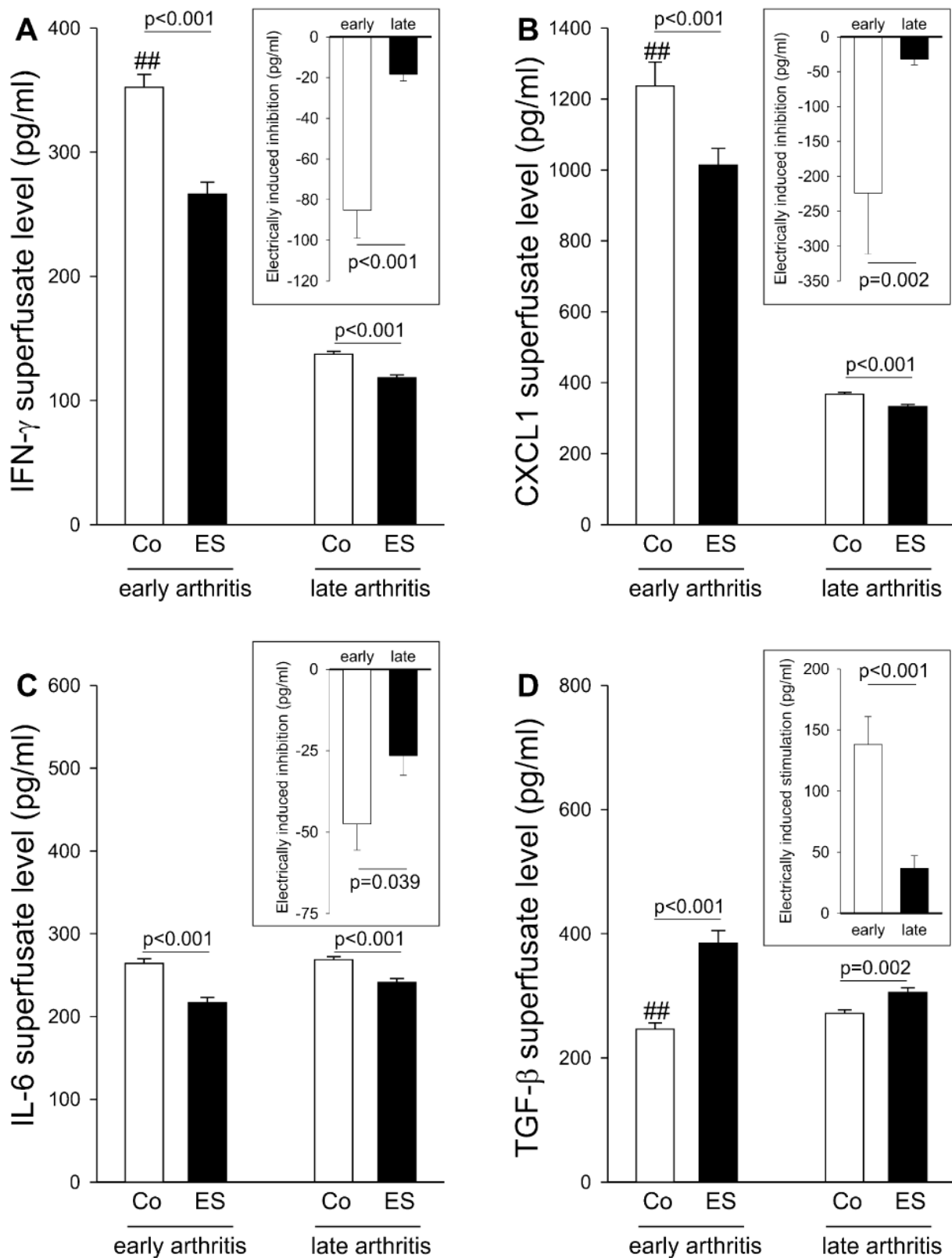


Abbildung 2: Einfluss der elektrischen Stimulation auf die Freisetzung von IFN- γ (A), CXCL1 (B), IL-6 (C) und TGF- β (D) in der Milz. In der Spätphase der Arthritis wurden die Daten von mind. 303 Milzperfusaten von 38 Mäusen pro Bedingung kombiniert. Alle Balken sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Die kleinen Boxen demonstrieren den direkten Vergleich der Effektstärke der Stimulation zwischen Früh- und Spätphase des Arthritismodells in Bezug auf die Zytokininhibition (A-C) bzw. -stimulation (D). ##p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle bei später Arthritis. Abkürzungen: Co: Kontrollbedingungen ohne elektrische Stimulation (ES); ES: mit elektrischer Stimulation (45.000 rechteckige Pulse mit 5 Hz, 2 ms, 43 mA).

b. Neurotransmitter-abhängige Regulation der IFN- γ -Freisetzung in der Milz

Propranolol stimulierte die spontane IFN- γ -Freisetzung unabhängig von elektrischer Stimulation, was auf eine nicht-neuronale Inhibition mittels β -adrenerger Signalwege durch ortsständige Katecholamin-produzierende Zellen hindeutet (Abb. 3A, weiße Balken). Propranolol hatte keinen Einfluss auf die IFN- γ -Freisetzung bei elektrischer Stimulation (Abb. 3A, schwarze Balken). Im Gegensatz dazu ist eine α 1-adrenerge Stimulation erst unter elektrischer Stimulation sichtbar, was auf eine α 1-adrenerge neuronale Stimulation der IFN- γ -Freisetzung hindeutet (Abb. 3B). In ähnlicher Weise ist auch eine α 2-adrenerge Stimulation erst unter elektrischer Stimulation sichtbar (Abb. 3C). Die Effekte von DPCPX auf die IFN- γ -Freisetzung waren bidirektional und dosisabhängig mit einem inhibitorischen Effekt bei einer Konzentration von 5×10^{-10} M und einem stimulatorischen Effekt bei 10^{-9} M (Abb. 3D). Die Effekte des Adenosin-Signalwegs waren unabhängig von der elektrischen Stimulation, da sie in Abwesenheit und Anwesenheit der elektrischen Stimulation nachgewiesen werden konnten (Abb. 3D). In Abbildung 3E werden in einer Synopsis die neuronalen und nicht-neuronalen Effekte auf die IFN- γ -Freisetzung einander gegenübergestellt.

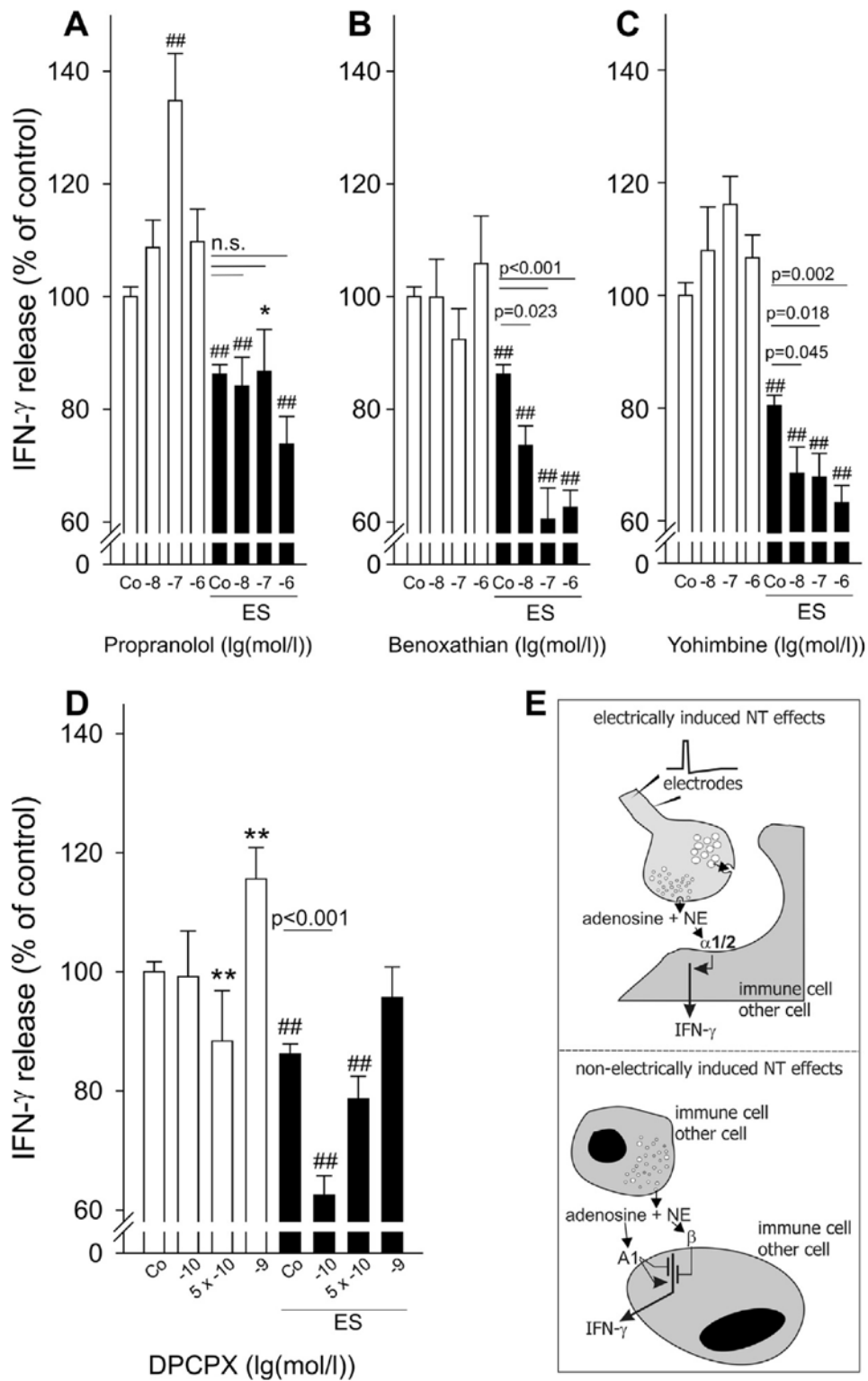


Abbildung 3: Neurotransmitter-abhängige Regulation der IFN- γ -Freisetzung in der Milz. (A) Nicht-neuronale β -adrenerge Inhibition der IFN- γ -Freisetzung. (B) Neuronale α 1-adrenerge Stimulation der IFN- γ -Freisetzung. (C) Neuronale α 2-adrenerge Stimulation der IFN- γ -Freisetzung. (D) Dosisabhängige stimulatorische und inhibitorische Effekte des Adenosin-Signalwegs auf die spontane IFN- γ -Freisetzung. (E) Synopsis der neuronalen und nicht-neuronalen Einflüsse auf die IFN γ -Freisetzung.

Abkürzungen: A1 - A1-Adenosin-Rezeptoren; ES – mit elektrischer Stimulation; Co – Kontrollen; NE/NA – Noradrenalin; n.s. – nicht signifikant; NT – Neurotransmitter. Die weißen Balken in A – D stellen die Aufbauten ohne ES dar, die schwarzen Balken die Aufbauten mit ES. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. Kontrolle ohne ES (=100%, 137,2 pg/ml IFN- γ). Mindestens 23 Milzstückchen wurden pro Bedingung untersucht.

c. Neurotransmitter-abhängige Regulation der CXCL1-Freisetzung in der Milz

Propranolol hemmte die spontane CXCL1-Freisetzung unabhängig von elektrischer Stimulation, was auf eine nicht-neuronale Stimulation der CXCL1-Freisetzung über β -adrenerge Signalwege durch spontane NE-Freisetzung hinweist (Abb. 4A, weiße Balken). Ein sehr ähnlicher Effekt wurde unter ES beobachtet, was auf einen hauptsächlich nicht-neuronalen Einfluss hinweist (Abb. 4A, schwarze Balken). Im Gegensatz dazu war eine α 1- und α 2-adrenerge Stimulation nur unter ES nachweisbar, was auf eine neuronale Stimulation der CXCL1-Freisetzung durch das SNS hinweist (Abb. 4B/C). DPCPX stimulierte ohne ES die CXCL1-Freisetzung bei 5×10^{-10} M und 10^{-9} M, was auf eine inhibitorische Wirkung des Adenosins hindeutet (Abb. 4D, weiße Balken). Die Adenosinsignalweg-vermittelten Effekte waren unabhängig von der ES bei gleichen Konzentrationen zu beobachten. In Abbildung 4E werden in einer Synopsis die neuronalen und nicht-neuronalen Effekte auf die CXCL1-Freisetzung einander gegenübergestellt.

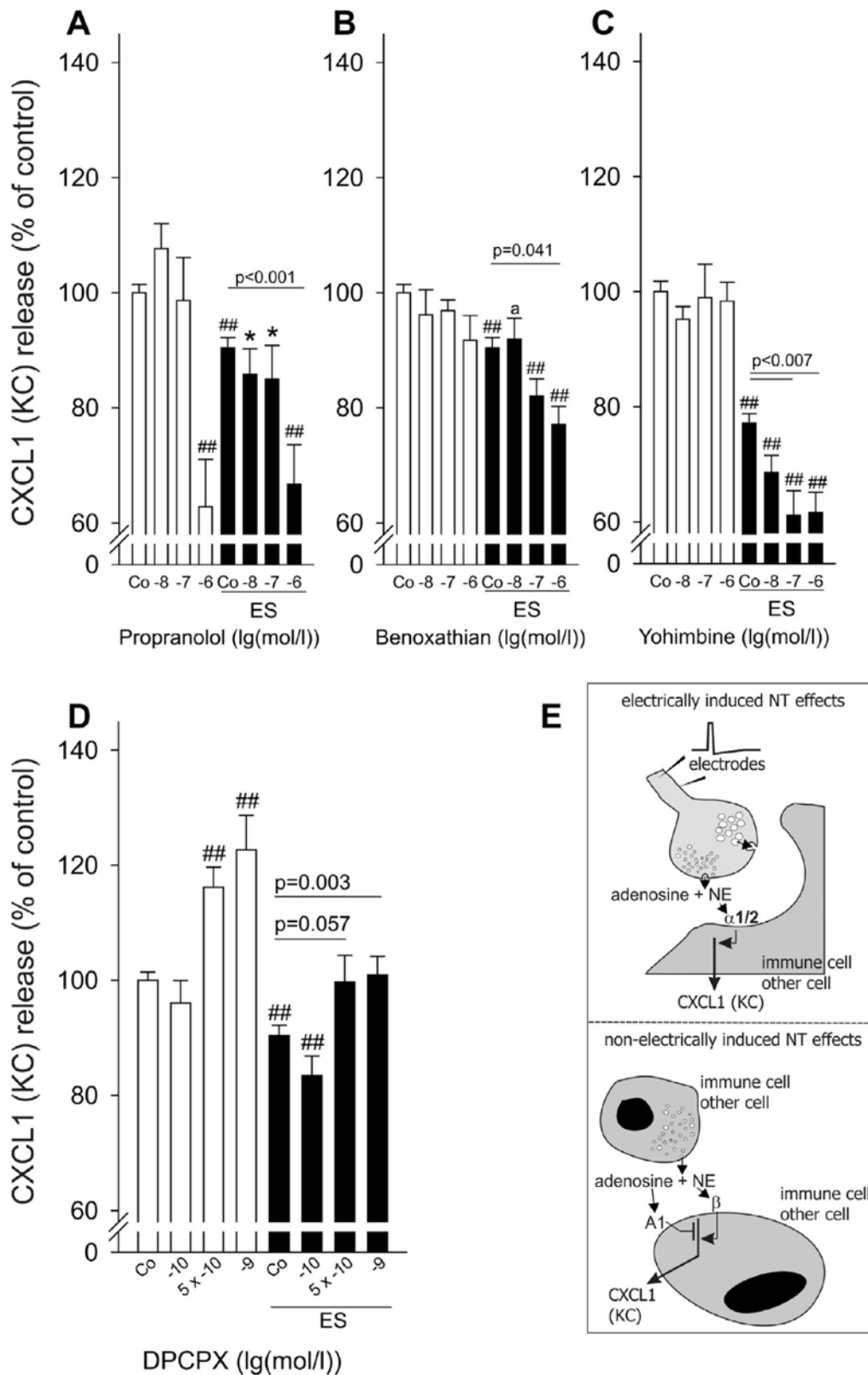


Abbildung 4: Neurotransmitter-abhängige Regulation der CXCL1-Freisetzung in der Milz. (A) Nicht-neuronale β -adrenerge Stimulation von CXCL1. (B) Neuronale α_1 -adrenerge Stimulation von CXCL1. (C) Neuronale α_2 -adrenerge Stimulation von CXCL1. (D) Nicht-neuronale inhibitorische Effekte des Adenosinsignalwegs auf die spontane CXCL1-Freisetzung. (E) Synopsis der neuronalen und nichtneuronalen NT-Effekte auf die CXCL1-Freisetzung. Die weißen Balken in A – D stellen die Aufbauten ohne Elektrostimulation (ES) dar, die schwarzen Balken die Aufbauten mit ES. * $p < 0,01$, ## $p < 0,001$ vs. Kontrolle ohne ES (=100%, 367,9 pg/ml CXCL1). Mindestens 22 Milzstückchen wurden pro Bedingung untersucht. Abkürzungen: s. Legende Abb. 3.

d. Neurotransmitter-abhängige Regulation der IL-6-Freisetzung in der Milz

Propranolol stimulierte die spontane IL-6-Freisetzung unabhängig von der Elektrostimulation (ES), was für eine nicht-neuronale Inhibierung der IL-6-Freisetzung mittels β -adrenerger Signalwege durch eine ortsständige NE-Freisetzung spricht (Abb. 5A, schwarze Balken). Sehr ähnlich verhielt es sich unter ES, was auf einen maßgeblich nicht-neuronalen Effekt hindeutet (Abb. 5A, schwarze Balken). Im Gegensatz dazu konnte die α 1- und α 2-adrenerge Stimulation erst unter ES nachgewiesen werden, was für eine neuronale IL-6-Stimulation über α 1- und α 2-adrenerge Signalwege spricht (Abb. 5B/C). DPCPX hemmte die spontane IL-6-Freisetzung bei einer Konzentration von 5×10^{-10} M in Abwesenheit von elektrischen Impulsen (Abb. 5D, weiße Balken). Dieser Effekt war unabhängig von der ES nachweisbar (Abb. 5D). Abbildung 5E gibt eine Gegenüberstellung der neuronalen und nicht-neuronalen Steuerung der IL-6-Sekretion in der Milz.

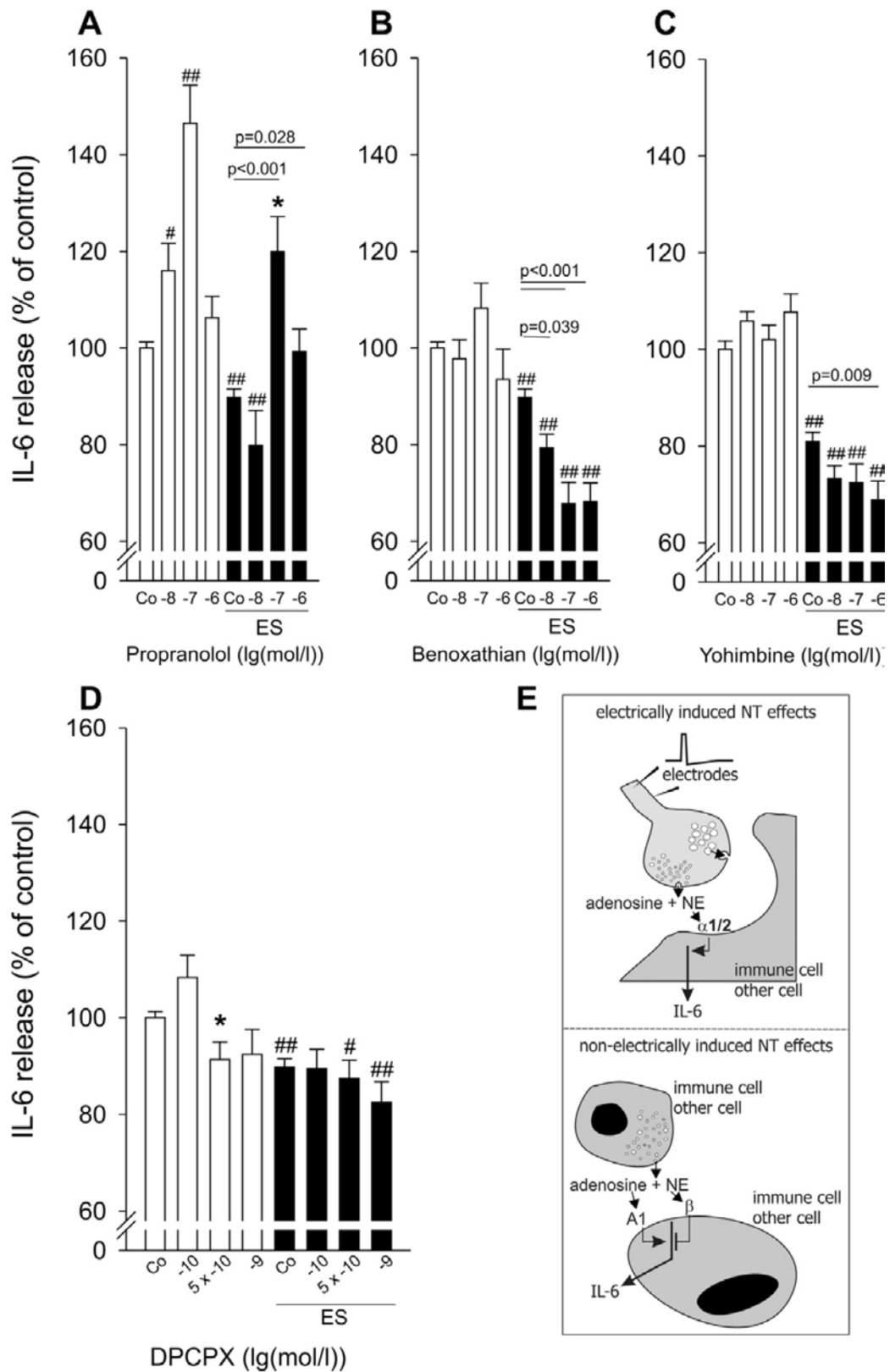


Abbildung 5: Neurotransmitter-abhängige Regulation der IL-6-Freisetzung in der Milz. (A) Nicht-neuronale β -adrenerge Inhibition von IL-6. (B) Neuronale α 1-adrenerge Stimulation von IL-6. (C) Neuronale α 2-adrenerge Stimulation von IL-6. (D) Nicht-neuronale stimulatorische Effekte des Adenosin-Signalwegs auf die spontane IL-6-Freisetzung. (E) Übersicht über die neuronalen und nicht-neuronalen Effekte auf die IL-6-Freisetzung. Die weißen Balken in A – D stellen die Aufbauten ohne ES dar, die schwarzen Balken die Aufbauten mit ES. * $p < 0,05$, # $p < 0,005$, ## $p < 0,001$ vs. Kontrolle ohne ES (=100%, 268,7 pg/ml IL-6). Mindestens 23 Milzstückchen wurden pro Bedingung untersucht. Abkürzungen: s. Legende Abb. 3.

e. Neurotransmitter-abhängige Regulation der TGF- β -Freisetzung in der Milz

Propranolol stimulierte die spontane TGF- β -Freisetzung unabhängig von ES, was eine nicht-neuronale Inhibition mittels β -adrenerger Signalwege zeigt (Abb. 6A, weiße Balken). Unter ES war dieser Effekt ebenfalls nachweisbar, was auf einen hauptsächlich nicht-neuronalen Effekt schließen lässt (Abb. 6A, schwarze Balken). Benoxathian als α 1-Antagonist hemmte die spontane TGF- β -Freisetzung, was für eine nicht-neuronale α 1-adrenerge Stimulation der TGF- β -Freisetzung spricht (Abb. 6B). Allerdings hatte Benoxathian keinen Einfluss mehr unter ES (Abb. 6B). Yohimbin als α 2-adrenerger Antagonist stimulierte die spontane TGF- β -Freisetzung ohne ES (Abb. 6C, weiße Balken) – ein Effekt, der auch unter ES beobachtet werden konnte (Abb. 6C, schwarze Balken). Dies lässt auf eine nicht-neuronale α 2-adrenerge Hemmung der TGF- β -Freisetzung schließen (Abb. 6C). Adenosinerge Beeinflussung hatte keinen Einfluss auf die spontane TGF- β -Freisetzung (Abb. 6D, weiße Balken). Allerdings kam es unter ES in Anwesenheit von DPCPX nicht zu dem sonst erwarteten Anstieg des TGF- β , was auf eine neuronale Stimulation des TGF- β mittels A1-Signalweg hindeutet (Abb. 6D, schwarze Balken). In Abbildung 6E sind die neuronalen und nicht-neuronalen Effekte zusammengefasst.

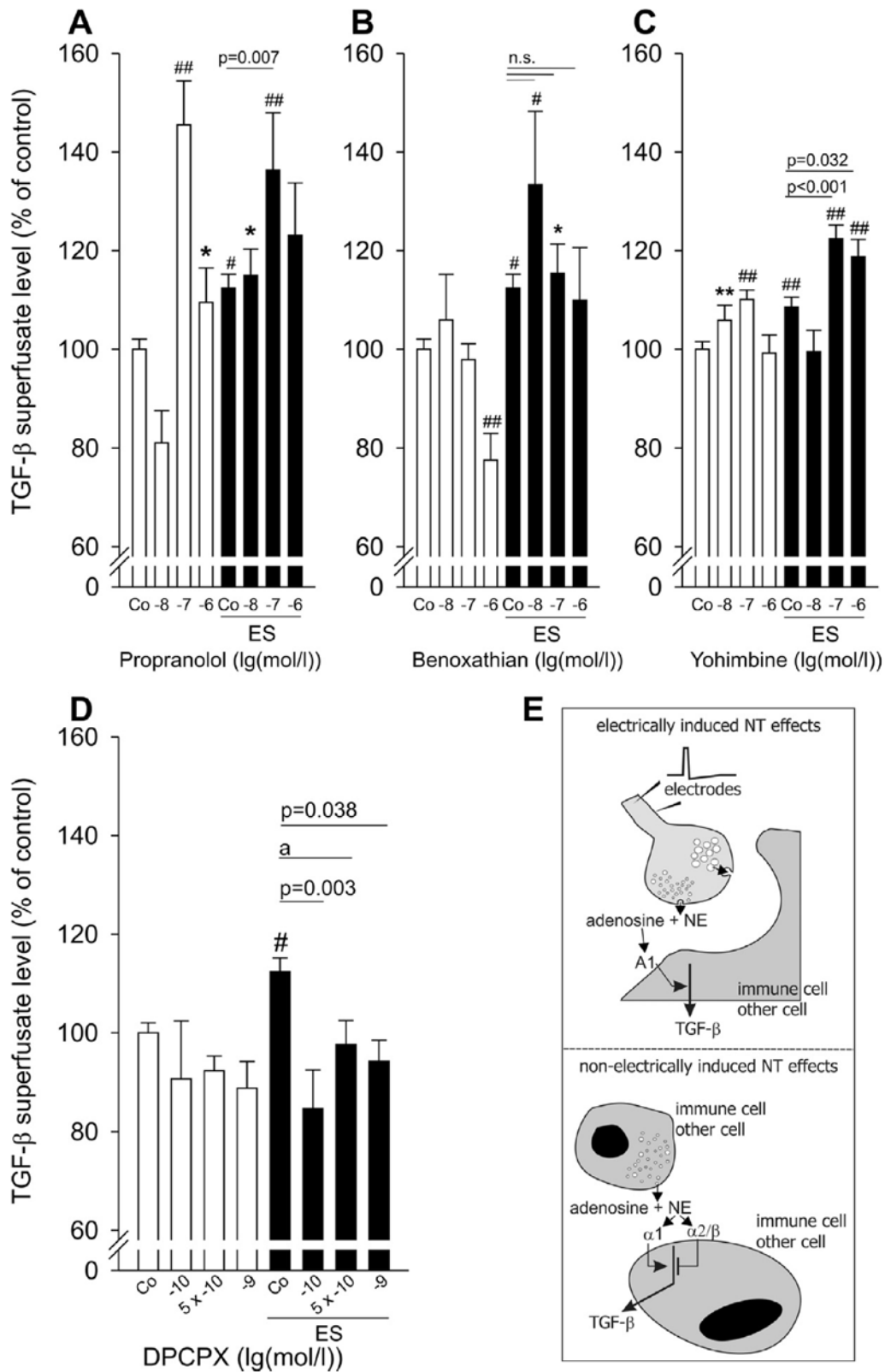


Abbildung 6: Neurotransmitter-abhängige Regulation der TGF-β-Freisetzung in der Milz. (A) Nicht-neuronale β-adrenerge Inhibition von TGF-β. (B) Nicht-neuronale α1-adrenerge Stimulation von TGF-β. (C) Nicht-neuronale und neuronale α2-adrenerge Inhibition von TGF-β. (D) Neuronale A1-adenosinerge Stimulation der TGF-β-Freisetzung. (E) Synopsis der neuronalen und nicht-neuronalen Effekte auf die TGF-β-Freisetzung in der Milz. Die weißen Balken in A – D stellen die Aufbauten ohne ES dar, die schwarzen Balken die Aufbauten mit ES. ^ap < 0,10; *p < 0,05, #p < 0,005, ##p < 0,001 vs. Kontrolle ohne ES (=100%, 272,6 pg/ml TGF-β). Mindestens 20 Milzstückchen wurden pro Bedingung untersucht. Abkürzungen: s. Legende Abb. 3.

8. Diskussion

Diese Studie weist auf einen erheblichen funktionellen Wechsel im neuroimmunologischen Zusammenspiel von der Frühphase der Arthritis zur Spätphase im Tiermodell hin (zusammengefasst in Tabelle 1).

In der Frühphase kurz nach Manifestation der Erkrankung wurden in früheren Studien einzig und allein neuronale Effekte auf die Zytokinfreisetzung beobachtet, da die Antagonisten keinen Effekt ohne ES erzielten (Straub et al. 2008). Im CIA-Modell der Frühphase der Arthritis nahm die Dichte der sympathischen Nervenfasern in der Milz zunehmend ab (Straub et al. 2008). Dennoch muss hier die sympathische Innervation noch einigermaßen intakt sein, da klare neuronale Effekte auf die Zytokinfreisetzung beobachtet werden konnten (Straub et al. 2008; 2011). Ganz ähnliche Umbauprozesse der sympathischen Milzinnervation konnten Lorton et al. 2005 im Modell der adjuvanten Arthritis zeigen.

In der Spätphase der Arthritis ist die Situation allerdings deutlich anders, da hier die sympathischen Nervenfasern fast vollständig verloren gegangen sind (Härle et al. 2005; Straub et al. 2008). Dazu kommt, dass neue Katecholamin-speichernde und -produzierende Zellen in der Milz auftauchen, deren Dichte in der Milz maximal ist (Capellino et al. 2010; 2012). Dies lässt einen deutlichen funktionellen Unterschied der neuroimmunologischen Verbindung in der Milz zwischen Früh- und Spätphase bei den arthritischen Tieren erwarten.

Zuallererst kann man diesen Umbauprozess als Nettoeffekt der neuronalen Zytokinbeeinflussung ausdrücken. In der Frühphase der Arthritis liegt die Hemmung der IFN- γ , CXCL1 und IL-6-Freisetzung zwischen -18,4% und -23,8%, während die Nettostimulation des TGF- β +47,8% betrug (Straub et al. 2008; 2012). Diese Effekte mussten neuronalen Ursprungs sein, da sie nur unter ES beobachtet wurden. Diese Effekte wurden als Verlagerung des immunologischen Gleichgewichts weg von Effektor-T-Zellen hin zu mehr regulatorischer T-Zell-Aktivität mit dem Effekt der Entzündungshemmung interpretiert (Straub et al. 2011). Im Gegensatz dazu konnte durch die vorliegende Studie gezeigt werden, dass die Nettoeffekte auf die Inhibition der proinflammatorischen Zytokine und die Stimulation des TGF- β in der Spätphase der Arthritis wesentlich geringer ausgeprägt sind. Daher lässt sich die Hypothese aufstellen, dass der regulatorische Einfluss des SNS in der Spätphase der Arthritis wesentlich geringer ausgeprägt ist als in der Frühphase (Abbildung 1).

Tabelle 1. Vergleich des Einflusses des SNS auf die Zytokinausschüttung am Tag 32 (Frühphase der Arthritis) und Tag 58 (Spätphase der Arthritis) nach Immunisierung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beziehen sich auf die Daten dreier früherer Studien (Straub et al. 2008, 2011, 2012). Abkürzungen: A1, Adenosin Rezeptor; n.b., nicht bestimmt; NT, Neurotransmitter; TGF- β , transforming growth factor- β ; k.E., kein Einfluss.

	Interferon- γ		CXCL1 (KC)	
	Tag 32	Tag 58	Tag 32	Tag 58
β-adrenerger Effekt	\uparrow^{**}	\downarrow^*	\uparrow^{**}	\uparrow^*
$\alpha 1$-adrenerger Effekt	\downarrow^{**}	\uparrow^{**}	n.b.	\uparrow^{**}
$\alpha 2$-adrenerger Effekt	\downarrow^{**}	\uparrow^{**}	\downarrow^{**}	\uparrow^{**}
A1-adenosinergischer Effekt	\uparrow^{**}	\downarrow, \uparrow^*	n.b.	\downarrow^*
*nicht-neuronale Effekte	k.E.	$\beta, A1$	k.E.	$\beta, A1$

	Interleukin-6		TGF- β	
	Tag 32	Tag 58	Tag 32	Tag 58
β-adrenerger Effekt	\uparrow^{**}	\downarrow^*	\uparrow^{**}	\downarrow^*
$\alpha 1$-adrenerger Effekt	\downarrow^{**}	\uparrow^{**}	k.E.	\uparrow^*
$\alpha 2$-adrenerger Effekt	k.E.	\uparrow^{**}	\downarrow^{**}	$\downarrow^{**}, \downarrow^*$
A1-adenosinergischer Effekt	\uparrow^{**}	\uparrow^*	k.E.	\uparrow^{**}
*nicht-neuronale Effekte	k.E.	$\beta, A1$	k.E.	$\beta, \alpha 1, \alpha 2$

* Spontane, nicht-neuronale Effekte treten ohne elektrische Stimulation auf. Diese erklären sich durch zelluläre NT-Freisetzung unabhängig von sympathischen Nervenfasern.

** Neuronale NT-Effekte treten nur bei elektrischer Stimulation der Milzstückchen auf und sind durch die NT-Ausschüttung der sympathischen Nervenfasern bedingt.

Tabelle 1: Vergleich der Zytokinregulation zwischen Früh- und Spätphase des Arthritismodells in der murinen Milz

Weiterhin änderte sich die Regulation der IFN- γ - und IL-6-Freisetzung deutlich von der Frühphase hin zur Spätphase der Arthritis: In der Frühphase konnte eine neuronale β -adrenerge und A1-adenosinerge Stimulation des IFN- γ und IL-6 bei einer $\alpha 1/2$ -adrenergen Inhibition beobachtet werden (Straub et al. 2011). In der Spätphase hingegen gibt es eine neuronale $\alpha 1/2$ -adrenerge Stimulation ohne β -adrenerge oder A1-adenosinerge Effekte – die Signalwege sind also tatsächlich entgegengesetzt. Dies unterstreicht den Einfluss von $\alpha 1$ -adrenergen Signalwegen bei chronischen Entzündungsprozessen, der schon in anderen Studien gezeigt werden konnte (Heijnen et al. 1996; Heijnen et al. 2002). Ein vergleichbarer Wechsel im adenosinergen Signalweg wurde bisher in chronischen Entzündungsprozessen nicht beschrieben. Dennoch ist ein Anstieg des A1-adenosinergen Signalwegs wahrscheinlich, da die $\alpha 1$ -adrenerge und A1-adenosinerge Stimulation über die gleiche G α_i -cAMP-inhibierende Signalkaskade vermittelt wird. Dieser $\alpha 1$ -adrenerge funktionelle Zugewinn in der Spätphase der Arthritis könnte auf einer Erhöhung der $\alpha 1$ -Rezeptordichte zurückzugehen (Heijnen et al. 1996; Heijnen et al. 2002). Die intrazellulären Signalwege, die das Signal von inhibitorisch zu stimulatorisch verändern und umgekehrt, sind bisher allerdings unbekannt. Es könnte gut sein, dass G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) oder andere proinflammatorische Signalwege wie β -Arrestin und MAP Kinasen in chronischen Entzündungsprozessen

einen wichtigeren Einfluss bekommen (Luttrell et al. 1999; Lombardi et al. 2001). Dies könnte ebenso auf adrenerge wie adenosinerge Rezeptoren zutreffen.

Es könnte darüber hinaus noch eine weitere Erklärung geben, warum in der Spätphase der Arthritis die neuronalen β -adrenergen Effekte verloren gehen und die neuronalen α 1/2-adrenergen Effekte wichtiger werden. In einer neueren Veröffentlichung wurde der Wechsel der Innervation in entzündetem Gewebe durch Verlust sympathischer Nervenfasern als Konzept der β -zu- α -adrenergen Umwandlung eingeführt (Pongratz und Straub 2012). Da Adenosin mittels A1/2-Rezeptoren einen sehr ähnlichen Signalweg hat, kann dieses Konzept möglicherweise auf eine A2-zu-A1-adenosinerge Umwandlung erweitert werden. Das Konzept stützt sich auf die Eigenschaft des Noradrenalins (bzw. Adenosins), α -Adrenorezeptoren (A1-Rezeptoren) mit höherer Affinität und β -Adrenorezeptoren (A2-Rezeptoren) mit geringerer Affinität zu binden. Nur in gesundem Gewebe bzw. gering entzündlich verändertem Gewebe sind noch ausreichend sympathische Nervenfasern vorhanden, um β -adrenerge neuronale Effekte zu induzieren. Allerdings gehen im Entzündungsprozess die sympathischen Nervenfasern verloren oder ziehen sich zurück (Pongratz und Straub 2012), so dass die Konzentration des freigesetzten Noradrenalins abnimmt, vor allem in den massiv entzündeten Organen. Dies bedingt eine β -zu- α -adrenerge Umwandlung mit nun allein neuronalen α -adrenergen Effekten – ein Phänomen, das in dieser Studie für die Spätphase der Arthritis eindeutig belegt werden konnte.

Gleichermaßen sind alle α 1/2-adrenergen Effekte auf IFN- γ , CXCL1 und IL-6 neuronaler Art, da sie nur unter ES beobachtet wurden. Dies deutet darauf hin, dass die ES im Milzgewebe zu einer Noradrenalinfreisetzung führt, die bei geringen Konzentrationen α 1-adrenerge Effekte ausübt. Für TGF- β konnte dies nicht beobachtet werden, da die TGF- β -Freisetzung bereits bei normaler Innervation nur gering über α 1-adrenerge Effekte beeinflusst wurde (Straub et al. 2011). Im Gegensatz dazu sind alle beobachteten β -adrenergen Effekte nicht-neuronal, da sie unabhängig von der ES beobachtet wurden. Das lässt darauf schließen, dass im entzündeten Milzgewebe des Spätphasenmodells der Arthritis Noradrenalin aus anderen Zellen freigesetzt werden muss. Maßgeblich ist weiterhin, dass auch die adenosinergen Effekte auf IFN- γ , CXCL1 und IL-6 nicht-neuronaler Art sind. Dies ist im Einklang mit der Beobachtung, dass die Anzahl der Neurotransmitter-speichernden und -produzierenden Zellen in der Milz in der Spätphase der Arthritis deutlich zunimmt (Capellino et al. 2010; 2012). Höchstwahrscheinlich findet eine spontane Sekretion von Noradrenalin und/oder Adenosin durch diese Zellen statt mit nicht-neuronalen Effekten auf die Zytokinproduktion (Cosentino et al. 2007; Capellino et al. 2010). Dies kann lediglich in der Spätphase der Arthritis beobachtet werden. Passend dazu konnte ein starker antiinflammatorischer Effekt durch die Degranulation dieser Zellen mittels Reserpin nachgewiesen werden (Capellino et al. 2010).

Alternativ könnte auch eine spontane Freisetzung von Noradrenalin aus den sympathischen Nervenfasern die nicht-neuronalen Effekte erklären. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, erscheint aber angesichts des massiven Untergangs der sympathischen Nervenfasern und des Neuauftretens einer

großen Zahl Katecholamin-produzierender Zellen eher unwahrscheinlich. Wir gehen daher von einer geringen Rolle der spontanen Noradrenalinsekretion aus den residuellen sympathischen Nervenfasern aus.

Sowohl in der Spät- als auch in der Frühphase wurde eine durch ES ausgelöste Inhibition von IFN- γ , CXCL1 und IL-6, sowie eine Stimulation von TGF- β gezeigt. Allerdings konnte durch den Einsatz von Antagonisten diese Beeinflussung nicht ausreichend erklärt werden. Andere sympathische Neurotransmitter wie Neuropeptid Y, endogene Opiode wie Methionin-Enkephalin oder Leucin-Enkephalin oder ATP/ADP könnten hierfür eine mögliche Erklärung liefern und sollten in zukünftigen Studien auf ihren Einfluss auf pro- und antiinflammatorische Zytokine im Tiermodell der RA untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich das neuroimmunologische Zusammenspiel in der Spätphase des Tiermodells der RA deutlich ändert. Waren in der Frühphase vor allem neuronale Effekte des SNS für die Zytokinsekretion wichtig, gewinnen in der Spätphase nicht-neuronale Effekte immer mehr Einfluss. Vermutlich stammen diese nicht-neuronalen Einflüsse von Katecholamin-produzierenden und –speichernden Zellen, die im Krankheitsverlauf in der Milz neu auftreten (Capellino et al. 2010; 2012). Die pathophysiologische Rolle dieser neuartigen Zellen hinsichtlich ihres Einflusses auf das Entzündungsgeschehen ist bisher noch nicht vollständig verstanden, könnte aber zu neuen Ansatzpunkten für die Therapie der RA führen. Diese Studie unterstreicht die komplexen neuroimmunologischen Zusammenhänge vor dem Hintergrund des Rückgangs der sympathischen Innervation und dem Neuauftreten von Neurotransmitter-produzierenden Zellen.

9. Zusammenfassung

Es war vorbekannt, dass sympathische Nervenfasern mit Zytokin-produzierenden Zellen in der Milz von Mäusen in der Frühphase (Tag 32) des CIA-Modells kommunizieren (Straub et al. 2008, 2011, 2012). Diese Daten zeigten jeweils ausschließlich eine neuronale sympathische Regulation von IFN- γ , CXCL1, IL-6 und TGF- β . Allerdings könnte sich diese Schnittstelle in der Spätphase der CIA durch den Verlust sympathischer Nervenfasern und das Neuauftreten von NT-produzierenden Zellen ändern. Daher betrachten wir in dieser Arbeit die NT-abhängige Regulation von IFN- γ , CXCL1, IL-6 und TGF- β in der Milz von Mäusen, die sich in der Spätphase (Tag 58) der CIA befinden.

Methodisch wurden hierfür Mäusemilzen am Tag 58 (46-68) nach Immunisierung in ca. 0,35mm dicke Scheibchen geteilt. Diese wurden in einem Superfusionsaufbau elektrischer Stimulation ausgesetzt, um so NT aus den sympathischen Nervenfasern freizusetzen. Durch den Einsatz von NT-Antagonisten und Kontrollbedingungen ohne ES konnte so der Einfluss der NT auf die Zytokinausschüttung untersucht werden.

Es zeigte sich eine Hemmung von IFN- γ , CXCL1, und IL-6, sowie eine Stimulation von TGF- β durch die ES. Diese Effekte waren deutlich schwächer ausgeprägt als in der Frühphase des CIA-Modells. Weiterhin zeigte sich eine β -adrenerge Hemmung von IFN- γ , IL-6 und TGF- β , sowie eine Stimulation von CXCL1. Diese

Effekte waren allesamt unabhängig von der ES und müssen daher als nicht-neuronal interpretiert werden. Neuronal vermittelt konnten wir eine α 1/2 adrenerge Stimulation von IFN- γ , CXCL1 und IL-6, sowie eine A1-adenosinerge Stimulation von TGF- β beobachten.

Daraus lässt sich ableiten, dass in der Spätphase des CIA-Modells der Einfluss nicht-neuronaler Zytokinregulation zunimmt, während der neuronale Einfluss abnimmt. Hierbei werden β -adrenerge Effekte nicht-neuronal vermittelt, während α 1/2 adrenerge Effekte offensichtlich neuronal vermittelt werden. Daraus lässt sich ableiten, dass zeitgleich mit der Veränderung der sympathischen Innervation der Milz sich auch die neuroimmunologische Wechselwirkung zwischen SNS und dem Immunsystem deutlich verändert.

10. Literaturverzeichnis

- Boettger, Michael Karl; Weber, Konstanze; Grossmann, David; Gajda, Mieczyslaw; Bauer, Reinhard; Bär, Karl-Jürgen et al. (2010): **Spinal tumor necrosis factor α neutralization reduces peripheral inflammation and hyperalgesia and suppresses autonomic responses in experimental arthritis: A role for spinal tumor necrosis factor α during induction and maintenance of peripheral inflammation.** *Arthritis & Rheumatism* 62 (5), S. 1308–1318. DOI: 10.1002/art.27380.
- Boyle, David L.; Jones, Toni L.; Hammaker, Deepa; Svensson, Camille I.; Rosengren, Sanna; Albani, Salvatore et al. (2006): **Regulation of Peripheral Inflammation by Spinal p38 MAP Kinase in Rats.** *PLoS Med* 3 (9), S. e338 EP -. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030338.
- Capellino, S.; Cosentino, M.; Wolff, C.; Schmidt, M.; Grifka, J.; Straub, R. H. (2010): **Catecholamine-producing cells in the synovial tissue during arthritis: modulation of sympathetic neurotransmitters as new therapeutic target.** *Annals of the Rheumatic Diseases* 69 (10), S. 1853–1860. DOI: 10.1136/ard.2009.119701.
- Capellino, Silvia; Weber, Kristina; Gelder, Magdalena; Härle, Peter; Straub, Rainer H. (2012): **First appearance and location of catecholaminergic cells during experimental arthritis and elimination by chemical sympathectomy.** *Arthritis & Rheumatism* 64 (4), S. 1110–1118. DOI: 10.1002/art.33431.
- Cosentino, M.; Fietta, A. M.; Ferrari, M.; Rasini, E.; Bombelli, R.; Carcano, E. et al. (2007): **Human CD4+CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop.** *Blood* 109 (2), S. 632–642. DOI: 10.1182/blood-2006-01-028423.
- del Rey, Adriana; Wolff, Christine; Wildmann, Johannes; Randolph, Anke; Hahnel, Anja; Besedovsky, Hugo O.; Straub, Rainer H. (2008): **Disrupted brain-immune system-joint communication during experimental arthritis.** *Arthritis Rheum* 58 (10), S. 3090–3099. DOI: 10.1002/art.23869.
- Dwyer, J. M.; Johnson, C. (1981): **The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells.** *Clin Exp Immunol* 46 (2), S. 237–249.
- Härle, Peter; Möbius, Daniel; Carr, Daniel J. J.; Schölmerich, Jürgen; Straub, Rainer H. (2005): **An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis.** *Arthritis Rheum* 52 (4), S. 1305–1313. DOI: 10.1002/art.20987.

- Härle, Peter; Pongratz, Georg; Albrecht, Julia; Tarner, Ingo H.; Straub, Rainer H. (2008): **An early sympathetic nervous system influence exacerbates collagen-induced arthritis via CD4+CD25+ cells.** *Arthritis Rheum* 58 (8), S. 2347–2355. DOI: 10.1002/art.23628.
- Heijnen, C.; RouppevanderVoort, C.; Vandenpol, M.; Kavelaars, A. (2002): **Cytokines regulate α 1-adrenergic receptor mRNA expression in human monocytic cells and endothelial cells.** *Journal of Neuroimmunology* 125 (1-2), S. 66–72. DOI: 10.1016/S0165-5728(02)00034-6.
- Heijnen, Cobi J.; van der Voort, Charlotte Rouppe; Wulffraat, Nico; van der Net, Janjaap; Kuis, Wietse; Kavelaars, Annemieke (1996): **Functional α 1-adrenergic receptors on leukocytes of patients with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis.** *J Neuroimmunol* 71 (1), S. 223–226. Online verfügbar unter <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165572896001257?showall=true>.
- Levine, J.; Clark, R.; Devor, M.; Helms, C.; Moskowitz, M.; Basbaum, A. (1984): **Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis.** *Science* 226 (4674), S. 547–549. DOI: 10.1126/science.6208609.
- Levine, J. D. (2006): **Neurogenic Inflammation and Arthritis.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1069 (1), S. 155–167. DOI: 10.1196/annals.1351.014.
- Levine, J. D.; Dardick, S. J.; Roizen, M. F.; Helms, C.; Basbaum, A. I. (1986): **Contribution of sensory afferents and sympathetic efferents to joint injury in experimental arthritis.** *The Journal of Neuroscience* 6 (12), S. 3423–3429.
- Lombardi, Maria Stella; Kavelaars, Annemieke; Cobelens, Pieter M.; Schmidt, Reinhold E.; Schedlowski, Manfred; Heijnen, Cobi J. (2001): **Adjuvant Arthritis Induces Down-Regulation of G Protein-Coupled Receptor Kinases in the Immune System.** *The Journal of Immunology* 166 (3), S. 1635–1640.
- Lorton, Dianne; Lubahn, Cheri; Klein, Nathan; Schaller, Jill; Bellinger, Denise L. (1999): **Dual Role for Noradrenergic Innervation of Lymphoid Tissue and Arthritic Joints in Adjuvant-Induced Arthritis.** *Brain, Behavior, and Immunity* 13 (4), S. 315–334. DOI: 10.1006/brbi.1999.0564.
- Lorton, Dianne; Lubahn, Cheri; Lindquist, Carl A.; Schaller, Jill; Washington, Cathy; Bellinger, Denise L. (2005): **Changes in the density and distribution of sympathetic nerves in spleens from Lewis rats with adjuvant-induced arthritis suggest that an injury and sprouting response occurs.** *J. Comp. Neurol.* 489 (2), S. 260–273. DOI: 10.1002/cne.20640.
- Lorton et. al. (2002): **Increasing Sympathetic Tone during the Initiation Phase of Disease Development Exacerbates Adjuvant Arthritis.** PNIRS ABSTRACTS. *Brain, Behavior, and Immunity* 16 (2), S. 198–199. DOI: 10.1006/brbi.2002.0660.
- Lubahn, Cheri L.; Schaller, Jill A.; Bellinger, Denise L.; Sweeney, Sarah; Lorton, Dianne (2004): **The importance of timing of adrenergic drug delivery in relation to the induction and onset of adjuvant-induced arthritis.** *Brain, Behavior, and Immunity* 18 (6), S. 563–571. DOI: 10.1016/j.bbi.2004.02.004.
- Luttrell, L. M.; Ferguson, S. S. G.; Daaka, Y.; Miller, W. E.; Maudsley, S.; Della Rocca, G. J.; Lin, F.-T.; Kawakatsu, H. et al. (1999): **Beta-Arrestin-Dependent Formation of 2 Adrenergic Receptor-Src Protein Kinase Complexes.** *Science* 283 (5402), S. 655–661. DOI: 10.1126/science.283.5402.655.
- Mapp, P. I.; Kidd, B. L.; Gibson, S. J.; Terry, J. M.; Revell, P. A.; Ibrahim, N.B.N. et al. (1990): **Substance P-, calcitonin gene-related peptide-and C-flanking peptide of neuropeptide Y-immunoreactive fibres are present in normal synovium but depleted in patients with rheumatoid arthritis.** *Neuroscience* 37 (1), S. 143–153. DOI: 10.1016/0306-4522(90)90199-E.

- Miller, Luitpold E.; Jüsten, Hans-Peter; Schölmerich, Jürgen; Straub, Rainer H. (2000): **The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages.** *The FASEB Journal* 14 (13), S. 2097–2107. DOI: 10.1096/fj.99-1082com.
- Pereira da Silva, J A; Carmo-Fonseca, M. (1990): **Peptide containing nerves in human synovium: immunohistochemical evidence for decreased innervation in rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 17 (12), S. 1592–1599.
- Pongratz, Georg; Straub, Rainer H. (2012): **Role of peripheral nerve fibres in acute and chronic inflammation in arthritis.** *Nat Rev Rheumatol* 9 (2), S. 117–126. DOI: 10.1038/nrrheum.2012.181.
- Straub, R. H.; Lang, B.; Falk, W.; Scholmerich, J.; Singer, E. A. (1995): **In vitro superfusion method for the investigation of nerve-immune cell interaction in murine spleen.** *J Neuroimmunol* 61 (1), S. 53–60.
- Straub, Rainer H. (2004): **Complexity of the bi-directional neuroimmune junction in the spleen.** *Trends Pharmacol Sci* 25 (12), S. 640–646. DOI: 10.1016/j.tips.2004.10.007.
- Straub, Rainer H.; Meinel, Thomas; Rauch, Luise; Fassold, Alexander; Lowin, Torsten; Pongratz, Georg (2012): **Corrigendum et addendum** to Arthritis & Rheumatism 2008;58:3450-60. *Arthritis & Rheumatism* 64 (5), S. 1695–1696. DOI: 10.1002/art.34416.
- Straub, Rainer H.; Rauch, Luise; Fassold, Alexander; Lowin, Torsten; Pongratz, Georg (2008): **Neuronally released sympathetic neurotransmitters stimulate splenic interferon- γ secretion from T cells in early type II collagen-induced arthritis.** *Arthritis Rheum* 58 (11), S. 3450–3460. DOI: 10.1002/art.24030.
- Straub, Rainer H.; Rauch, Luise; Rauh, Lena; Pongratz, Georg (2011): **Sympathetic inhibition of IL-6, IFN- γ , and KC/CXCL1 and sympathetic stimulation of TGF- β in spleen of early arthritic mice.** *Brain, Behavior, and Immunity* 25 (8), S. 1708–1715. DOI: 10.1016/j.bbi.2011.07.001.
- van Maanen, Marjolein A.; Lebre, Maria C.; van der Poll, Tom; LaRosa, Gregory J.; Elbaum, Daniel; Vervoordeldonk, Margriet J.; Tak, Paul P. (2009): **Stimulation of nicotinic acetylcholine receptors attenuates collagen-induced arthritis in mice.** *Arthritis Rheum* 60 (1), S. 114–122. DOI: 10.1002/art.24177.

11. Lebenslauf

12. Danksagung

Ich danke sehr herzlich Prof. Rainer Straub, meinem Doktorvater, der mich über das Projekt hindurch hervorragend betreut hat. Seine ausgeprägte Leidenschaft und Begeisterung für das Verständnis pathophysiologischer neuroimmunologischer Zusammenhänge hat mich dazu bewogen, die Arbeit unter seiner Supervision durchzuführen. Einerseits hatte ich Freiraum, die Dinge erst selbst zu probieren – andererseits war er, wenn ich Fragen hatte, schnell und kompetent zur Stelle. Über die ein oder andere Durststrecke half er mit freundlicher Motivation und unerschütterlichem Optimismus hinweg.

Ich danke meinen lieben Eltern, die mir das Studium und die Zeit zum Forschen durch ideelle Förderung von Kindesbeinen an und materielle Förderung zu Studiumszeiten ermöglicht haben.

Ich danke Prof. Rainer Schreiber, der mich hinsichtlich des apparativen Aufbaus mehrfach sehr herzlich, selbstlos und freundlich beraten hat.

Ich danke Susanne Klatt, Luise Rauch, Madlen Melzer, Angelika Gräber, Hubert Stangl, Zsuzsa Jenei-Lanzl, Georg Pongratz, Torsten Lowin und Christine Wolff, die mich alle sehr freundlich und kooperativ in ihr Labor aufgenommen haben. Durch ihre Hilfe, Gespräche und Anregungen war die Zeit im Labor sowohl fachlich ertragreich als auch menschlich befruchtend.

Ich danke herzlich der Studienstiftung des Deutschen Volkes und dem Max-Weber-Programm, die mich über die Dauer meines Studiums ebenfalls ideell und materiell unterstützten. Durch das Lebenswissenschaftliche Kolleg, die Akademien und die finanzielle Förderung wurden Interesse geweckt und Freiräume für wissenschaftliche Arbeit geschaffen. Ich danke auch der DFG, deren Unterstützung ich im Rahmen der Forschergruppe FOR696 erfahren durfte.

13. Originalarbeit



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Brain, Behavior, and Immunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybrbi

Neuronal α 1/2-adrenergic stimulation of IFN- γ , IL-6, and CXCL-1 in murine spleen in late experimental arthritis

Thomas Meinel, Georg Pongratz, Luise Rauch, Rainer H. Straub*

Laboratory of Experimental Rheumatology and Neuroendocrine Immunology, Department of Internal Medicine, University Hospital Regensburg, 93042 Regensburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 January 2013

Received in revised form 1 June 2013

Accepted 7 June 2013

Available online 17 June 2013

Keywords:

Sympathetic nervous system

Spleen

Chronic experimental arthritis

Neurotransmitters

Cytokines

ABSTRACT

Objective: Functional cross-talk exists between sympathetic nerve fibers and cytokine-producing splenic cells in early collagen type II-induced arthritis (CIA) (day 32). These earlier experiments demonstrated exclusively neuronal sympathetic regulation of IFN- γ , CXCL1, IL-6, and TGF- β . However, in late arthritis, the sympathetic influence might change due to loss of sympathetic nerve fibers and appearance of neurotransmitter-producing cells. We aimed to investigate neurotransmitter-dependent regulation of IFN- γ , CXCL1, IL-6, and TGF- β in murine spleen in late CIA.

Methods: Spleens were removed when animals reached day 58 (46–68) after immunization to generate 0.35 mm-thick spleen slices, which were transferred to superfusion microchambers to electrically induce release of neurotransmitters. Using respective neurotransmitter antagonists, effects of released neurotransmitters on cytokine secretion were investigated.

Results: There was electrically induced inhibition of IFN- γ , CXCL1, and IL-6, and stimulation of TGF- β , which was much less pronounced than in early CIA. There existed β adrenergic inhibition of IFN- γ , IL-6, and TGF- β (and stimulation of CXCL1) independent of electrical stimulation (interpreted as non-neuronal). However, there was a neuronal α 1/2 adrenergic stimulation of IFN- γ , CXCL1, and IL-6 and, we observed neuronal A1-adenosinergic stimulation of TGF- β .

Conclusions: In the late phase of CIA, non-neuronal modulation of cytokine secretion increases while neuronal regulation strikingly decreases. Particularly, β -adrenergic effects are non-neuronal while α 1/2-adrenergic effects are clearly neuronal. We suggest that alterations in sympathetic innervation of the spleen fundamentally change the functional neuroimmune interplay in the spleen of arthritic mice.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Arthritis in humans is strongly influenced by neuronal and endocrine factors, which is best illustrated by circadian rhythms of symptoms in rheumatoid arthritis (RA), or by considering strong influences of hemiplegia on joint inflammation and destruction in RA (Keyszer et al., 2004; Straub and Cutolo, 2007). Similarly, the nervous system plays an important role in experimental arthritis in rats and mice (Levine et al., 1984; Lorton et al., 2002; Lubahn et al., 2004; Härle et al., 2005; Boyle et al., 2006; Levine et al., 2006; Härle et al., 2008; van Maanen et al., 2009; Boettger et al., 2010). While the sensory nervous system has a proinflammatory role, the sympathetic nervous system (SNS) has a bi-modal pro- and antiinflammatory influence on arthritis.

The SNS was found to have proinflammatory effects before outbreak of the disease and anti-inflammatory effects thereafter (Lubahn et al., 2004; Härle et al., 2005). Bi-modal effects of the SNS have also been described when sympathectomy was per-

formed at different locations, e.g., injection of 6-hydroxydopamine into draining lymph nodes or systemically into the peritoneum (Lorton et al., 1999). Despite some confusion in this field of research, there seems to be a general picture that demonstrates a proinflammatory influence of the SNS when systemic sympathectomy is performed prior to immunization or in the early asymptomatic phase of the disease (Levine et al., 1986; Lorton et al., 1999; Härle et al., 2005, 2008). However, the transition from proinflammatory effects of the SNS until disease outbreak to an anti-inflammatory role thereafter is not understood. Effects are so strong that some important pathophysiological mechanisms are hidden in these observations (Härle et al., 2005), possibly leading to new therapeutic approaches from the field of neuroimmunology.

Divergent results might depend on marked changes of the SNS influence on the immune system, exactly, at disease outbreak: While in healthy animals synovial tissue and secondary lymphoid organs like the spleen are densely innervated by sympathetic nerve fibers, this innervation is lost in inflamed tissue of arthritic animals starting at the outbreak of symptomatic disease (Härle et al., 2005; Lorton et al., 2005; Del Rey et al., 2008; Straub et al., 2008).

* Corresponding author. Tel.: +49 941 944 7120.

E-mail address: rainer.straub@klinik.uni-regensburg.de (R.H. Straub).

A similar loss of sympathetic nerve fibers was reported in inflamed synovial tissue in long-standing RA indicating a species-unspecific consequence of local inflammation (Pereira da Silva and Carmo-Fonseca, 1990; Mapp et al., 1990; Miller et al., 2000).

Parallel to loss of sympathetic nerve fibers, tyrosine hydroxylase-positive, catecholamine-producing cells appear in joints, thymus, bone marrow, draining lymph nodes, and spleen of arthritic mice (Capellino et al., 2010, 2012). Although these cells are already present during the immunization period, the number of cells largely increases around disease outbreak in collagen type II – induced arthritis (CIA), and the number is maximal in the late phase of the disease (Capellino et al., 2012). Importantly, similar tyrosine hydroxylase-positive, catecholamine-producing cells were found in inflamed synovial tissue of patients with long-standing RA (mainly, fibroblasts, macrophages, and a few B lymphocytes) (Capellino et al., 2010). This again indicates a species-unspecific phenomenon.

Short-term increase of catecholamine release of these cells demonstrated their anti-inflammatory capacity (Capellino et al., 2010). Thus, during arthritis, it is expected that classical neuronal crosstalk between sympathetic nerve fibers and immune cells might markedly change in inflamed or immune-activated synovial or lymphoid tissue such as the spleen. However, the functional impact of nerve fiber loss in the spleen or appearance of catecholamine-producing cells in the spleen has never been investigated.

We previously demonstrated a technique to investigate the neuroimmune crosstalk in spleen of healthy mice and mice with early experimental arthritis (Straub, 2004, 2008, 2011). Experiments in early arthritic mice (score 3 of 16 at around day 32 after immunization) displayed a marked influence of electrically induced, neuronally released neurotransmitters on cytokines such as IFN- γ , IL-6, CXCL1 (KC), and TGF- β as tested by incubation with neurotransmitter antagonists (Straub et al., 2008, 2011). Importantly, neurotransmitter antagonist effects on these cytokines were only apparent during electrical stimulation, which shows the “neuronal influence” in this neuroimmune crosstalk (Straub, 2004, 2008, 2011). Without electrical stimulation, no effects of neurotransmitter antagonists were observed in all our earlier studies (e.g., Refs. (Straub, 2004, 2008, 2011)). If neurotransmitter antagonist show effects without electrical stimulation, one must expect that effects are most probably of “non-neuronal nature”. Since catecholamine-producing cells accumulate in the spleen in late arthritis, non-neuronal effects might depend on these cells (Capellino et al., 2010, 2012).

These electrically mediated neurotransmitter effects were never studied in the spleen of animals with late experimental arthritis. We hypothesized that the classical neuronal influence on cytokine secretion changes in the chronic phase of late arthritis due to the loss of sympathetic nerve fibers and appearance of neurotransmitter-producing cells. This study aimed to investigate the neuroimmune crosstalk in the spleen in late arthritis by focusing on IFN- γ , IL-6, CXCL1, and TGF- β . Experiments focused on α 1-adrenergic, β -adrenergic, and A1-adenosinergic pathways.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Female DBA/1 mice, 6–8 weeks old, were purchased from Eleveage Janvier (Le Genest St. Isle, France). Mice were housed by five animals in a cage and were fed standard laboratory chow and water *ad libitum* under standard conditions. Animals were exposed to 12 h of light and dark cycles. Experiments were conducted according to institutional and governmental regulations for animal use (Government of the Oberpfalz AZ 54–2531.1-07/08).

2.2. Induction of arthritis, arthritis scoring, and removal of the spleen

We performed these experiments as recently described (Härle et al., 2005). Briefly, mice were immunized intradermally at the base of the tail with 100 μ g of bovine collagen type II (Chondrex, Inc., via MD Biosciences, Zurich, Switzerland) emulsified in equal volume of complete Freund's adjuvant on day 0 (Sigma, Taufkirchen, Germany). Twenty-one days later, animals were boosted with incomplete Freund's adjuvant.

Mice were sacrificed between day 46 and 68, on average \pm SD: 58 ± 5.2 days (the late symptomatic phase of arthritis). We expected that animals were already in the late phase of arthritis because histological joint damage was severe, sympathetic nerve fibers were almost completely lost, and catecholamine-producing cells were maximum during this time. At this time point, release of splenic IFN- γ , IL-6, CXCL1, and TGF- β was detected when animals received 300 μ g of Concanavalin A *i.v.* three hours before sacrifice. Concanavalin A was given in order to stimulate already present cytokine-producing immune cells.

The spleen was removed after cervical dislocation at 11:00–12:00 AM. The spleen was kept on ice-cold culture medium for 25 min (RPMI 1640, 25 mM HEPES, pH 7.4, 5% fetal calf serum, 30 μ M mercaptoethanol, 0.57 mM ascorbic acid, 1.3 mM calcium, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin; all additions from Sigma, Deisenhofen, Germany; and 8 μ g/ml ciprofloxacin; Bayer, Leverkusen, Germany). Then, it was cut into 0.35 mm thick slices using a tissue chopper (Mickle Lab., Gomshall, England) (direction of cutting at a right angle to the longitudinal axis of the spleen), and slices were washed carefully in the above-mentioned medium to remove small particles and extravasated cells.

2.3. Superfusion technique, superfusion protocol, and standardization of slices

The technique was recently demonstrated (Straub et al., 2008). Briefly, spleen slices were transferred in the above-mentioned medium to silicon superfusion microchambers with a volume of approximately 80 μ l (Straub et al., 2008) (custom-made by F.I.T GmbH Fruth, 92331 Parsberg, Germany). The bottom and the top of the microchamber were equipped with platinum electrodes in order to apply electrical field stimulation to the tissue. The pulsating electrical field stimulates nerve fibers in the tissue leading to release of neurotransmitters from viable nerve terminals (Straub et al., 2008). The electrical current was applied by a computer-driven current-controlled voltage-regulated stimulator (MR OEG, Vienna, Austria). The superfusion fluid was transported from sterile medium reservoirs (medium see above) using speed-controlled pumps (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Germany).

Superfusion was performed for 6 h and a flow rate of 66 μ l/min (1 slice per chamber, 32 chambers in parallel = 4 racks with 8 chambers each). The flow rate of 66 μ l/min is similar to the flow rate of interstitial fluid. During the first 2 h of the superfusion period, all slices were superfused with culture medium without any additional drugs or electrical stimulation. Between 100 and 120 min superfusate was collected to determine the released cytokine of interest at baseline (=baseline value for each slice). During the second part of the superfusion period (2nd–6th h) neurotransmitter antagonists in the medium, continuous electrical stimulation (see below) or both were applied to modulate cytokine secretion. Finally, between 345 and 360 min, superfusate was collected to determine cytokine concentration in the superfusate a second time.

Since cytokine secretion at 2 and 6 h correlated closely, the cytokine concentration at baseline (=2 h) was used to standardize the cytokine secreting capacity of the different slices (Straub et al., 2008). The dimensionless ratio $\phi = 100 \times (\text{cytokine}_{6\text{h}}/\text{cytokine}_{2\text{h}})$ was used to standardize cytokine secretion of each slice at 6 h

(Suppl. Fig. 1B; for cytokine A: $\phi_{iA} = 100 \times A_{6h}/A_{2h}$; cytokine B: $\phi_{iB} = 100 \times B_{6h}/B_{2h}$; cytokine C: $\phi_{iC} = 100 \times C_{6h}/C_{2h}$ etc.). This standardization technique was found to be superior to standardization using the leukocyte count of the slice, wet weight, dry weight, volume of the slice, or protein content (determined in earlier studies).

2.4. Experiments with antagonists and electrical stimulation

To indirectly study the effect of electrically released endogenous transmitters propranolol ($\beta_1,2$ -adrenergic antagonist; Sigma, Deisenhofen, Germany), benoxathian (α_1 -adrenergic antagonist; Sigma), and 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX, A1 adenosine receptor antagonist; Sigma) were used in the indicated concentrations. These antagonists have been used earlier by us [Straub et al. \(2008, 2011\)](#) and, thus, only the most relevant concentrations were used in the present experiments. The dilutions of the antagonists were prepared immediately before the experiments. In experiments to study neurotransmitter effects, antagonists were

added at 100 min until the end of superfusion. After a drug equilibration period of 20 min between 100 and 120 min, slices were electrically stimulated using a continuous train of 45.000 pulses of an action potential-like form (5 Hz, 2 ms, 43 mA).

2.5. Determination of cytokine concentration in the superfusate

Mouse IFN- γ in superfusate fractions was determined by ELISA (antibody pairs of BioLegend, Inc., San Diego, CA, via Biozol, Eching, Germany). Sensitivity was below 8 pg/ml. The assay ranges from 8 to 500 pg IFN- γ /ml. Similarly, mouse CXCL1 was determined by ELISA (antibody pairs of Cedarlane, Ontario, Canada, via Biozol, Eching, Germany). Sensitivity was below 20 pg/ml. The assay ranges from 20 to 1000 pg CXCL1/ml. Mouse IL-6 in superfusate fractions was determined by a self-coated ELISA (antibody pairs of BioLegend, Inc., San Diego, CA, via Biozol, Eching, Germany). Sensitivity was <8 pg/ml and the assay ranges from 8 to 500 pg/ml. Mouse TGF- β was similarly determined by ELISA (antibody pairs

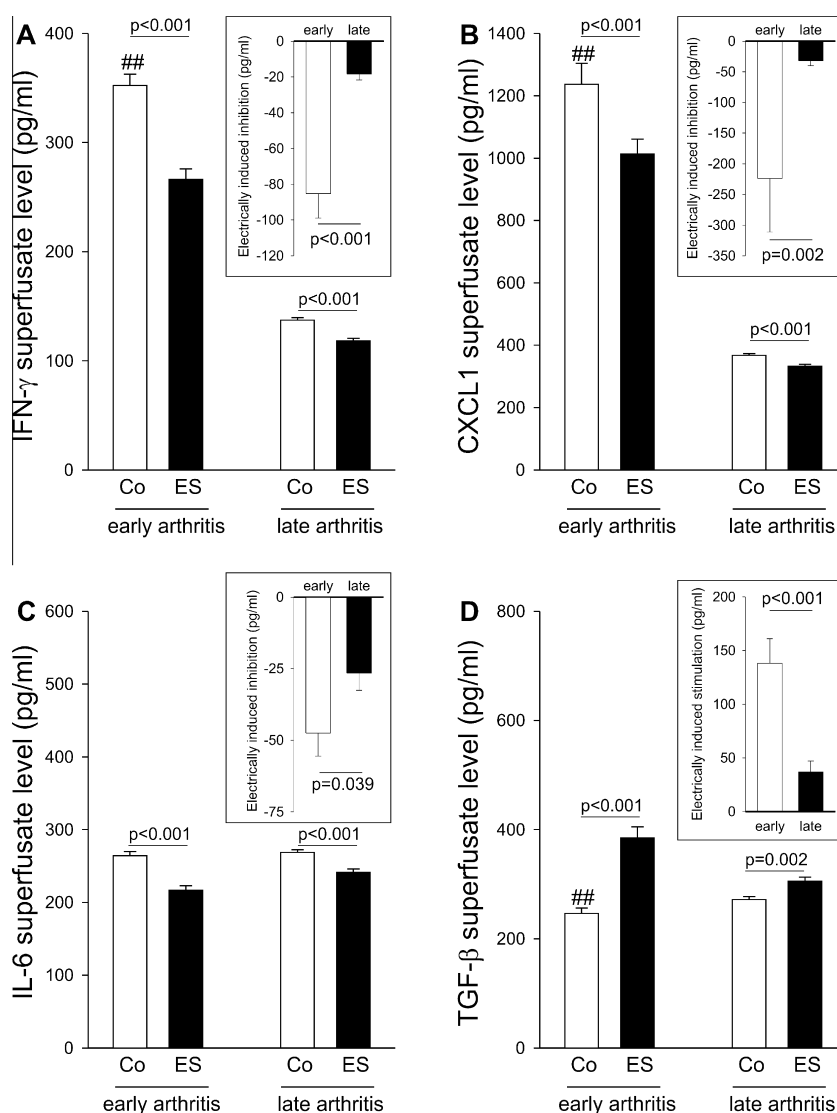


Fig. 1. Overall electrical influences on splenic release of IFN- γ (A), CXCL1 (B), IL-6 (C), and TGF- β (D). In late arthritis, the data of at least 303 slices of 38 mice per condition were combined. In early arthritis, the data of at least 98 slices of 12 mice per condition were combined. In all panels, data are given as means \pm SEM. The figure insertion demonstrates the direct comparison between early and late arthritis in terms of cytokine inhibition (A–C) or cytokine stimulation (D). $##p < 0.001$ for the comparison of control conditions of early arthritis versus late arthritis. Abbreviation: Co, control conditions without electrical stimulation; ES, with electrical stimulation (45.000 pulses of an action potential-like stimulus, 5 Hz, 2 ms, 43 mA).

of eBioscience, Camarillo, CA via NatuTec, Frankfurt, Germany). Sensitivity was <60 pg/ml and the assay ranges from 60 pg/ml to 8000 pg/ml. Intra-assay and inter-assay coefficients of variation for all assays were below 10%.

2.6. Presentation of the data and statistical analysis

Using 32 chambers, we were able to investigate 32 slices in one experiment of one arthritic mouse on one experimental day. Four different conditions were investigated: (A) eight control slices without drug or electrical stimulation (control), (B) eight slices

with an antagonist only to study non-neuronal effects of released neurotransmitters, (C) eight slices with electrical stimulation only, and (D) eight slices with an antagonist and electrical stimulation to study the neuronal influence. Typically, 24–32 slices (of 3–4 mice) were used to study the effect of an antagonist at one single concentration (=one week of experimental work for one person for one single concentration). Since average phi of one experiment varies from mouse to mouse the effects are demonstrated in percent of the control of each mouse (phi of the control is 100%). Mann–Whitney signed rank test (SPSS, SPSS Inc., Chicago) was used to compare groups, Spearman rank correlation analysis (SPSS) was used to

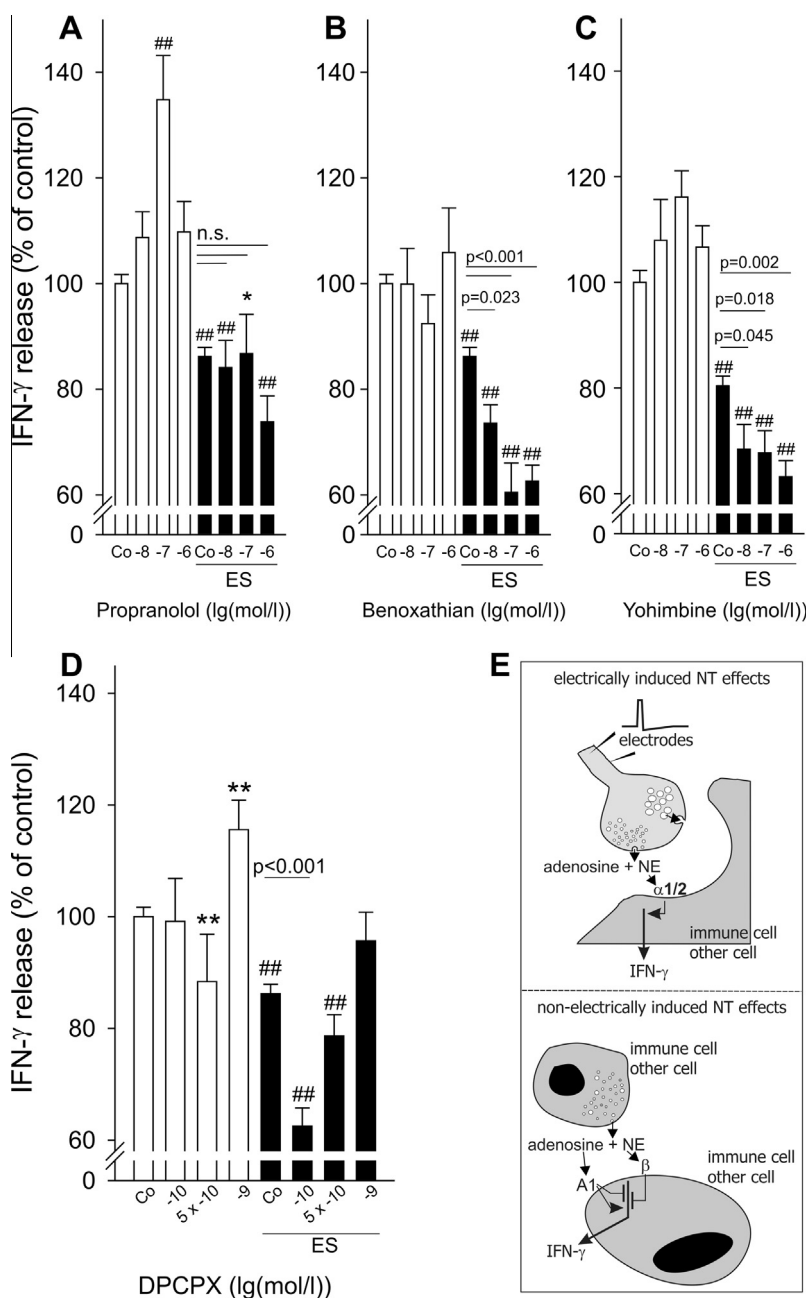


Fig. 2. Neurotransmitter-dependent regulation of splenic interferon-gamma (IFN- γ) release. (A) Non-neuronal β -adrenergic inhibition of IFN- γ . (B) Neuronal $\alpha 1$ -adrenergic stimulation of IFN- γ . (C) Neuronal $\alpha 2$ -adrenergic stimulation of IFN- γ . (D) Dose-dependent, stimulatory and inhibitory effects of adenosine signaling on spontaneous IFN- γ release. (E) Summary of neuronal neurotransmitter effects and non-neuronal neurotransmitter effects on IFN- γ release. Abbreviations: A1, A1 adenosine receptor; Co, control; NE, norepinephrine; n.s., not significant; NT, neurotransmitter. For panels A–D: white bars represent conditions without electrical stimulation, black bars represent conditions with electrical stimulation (ES). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus control without electrical stimulation (=100%, 137.2 pg of IFN- γ per ml). At least 23 slices of three mice were used per condition.

study the correlation between two variables, and $p < 0.05$ was the significance level.

3. Results

3.1. Electrically induced inhibition of IFN- γ , KC, and IL-6 and stimulation of TGF- β

The three cytokines IFN- γ , KC, and IL-6 were inhibited by electrical stimulation in early and late arthritis (Fig. 1A–C), whereas release of TGF- β was stimulated (Fig. 1D). In contrast to early arthritis, splenic release of IFN- γ and CXCL1 was markedly lower in late arthritis, while release of IL-6 and TGF- β was similar (Fig. 1). In addition, electrically induced inhibition of IFN- γ , CXCL1,

and IL-6 or electrically induced stimulation of TGF- β were much smaller in the spleen of late arthritic animals compared to results in spleen of early arthritic animals (Fig. 1). In a direct comparison of inhibitory (IFN- γ , CXCL1, and IL-6, Fig. 1A–C) or stimulatory effects (TGF- β , Fig. 1D) of electrical stimulation, effects were always much more pronounced in early as compared to late arthritis (see figure insertions to Fig. 1).

In order to test whether the time point of investigation after immunization had an influence on electrically induced inhibition of IFN- γ , KC, and IL-6 or electrically induced stimulation of TGF- β in late arthritic animals, correlation analyses between time point of investigation and electrically induced effects were performed. With respect to all tested cytokines, there existed no significant positive or negative correlation between time point of investigation

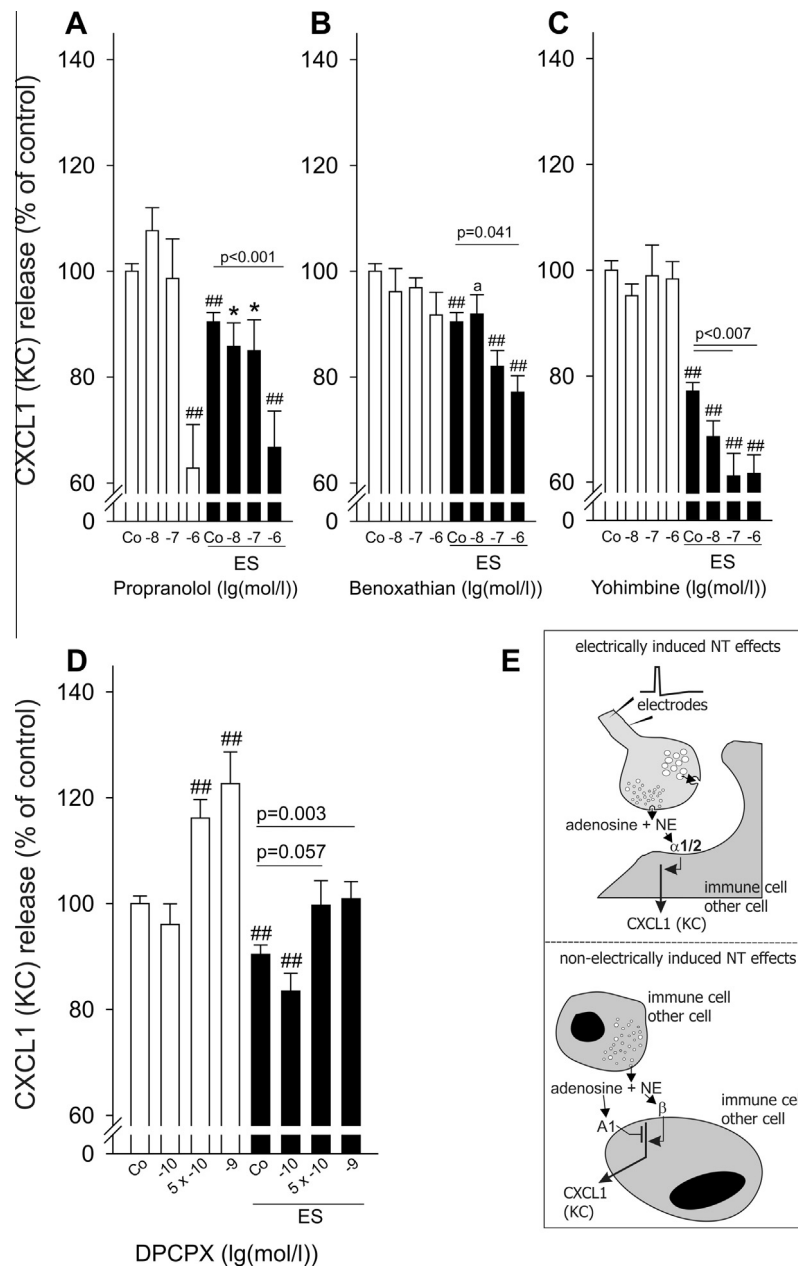


Fig. 3. Neurotransmitter-dependent regulation of splenic CXCL1 (KC) release. (A) Non-neuronal β -adrenergic stimulation of CXCL1. (B) Neuronal α_1 -adrenergic stimulation of CXCL1. (C) Neuronal α_2 -adrenergic stimulation of CXCL1. (D) Non-neuronal inhibitory effects of adenosine signaling on spontaneous CXCL1 release. (E) Summary of neuronal neurotransmitter effects and non-neuronal neurotransmitter effects on CXCL1 release. For panels A–D: Colors of bars, abbreviations, and electrical stimulation are explained in legend to Fig. 2. * $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ versus control without electrical stimulation (=100%, 367.9 pg CXCL1 per ml). At least 22 slices of three mice were used per condition.

and electrically induced effects (data not shown), which indicates that in a range between day 46 and day 68 after immunization no marked changes of conditions appeared in the spleen.

3.2. Neurotransmitter-dependent regulation of splenic IFN- release

Propranolol stimulated spontaneous IFN- γ release independent of electrical stimulation, which indicates a non-neuronal inhibition of IFN- γ via β -adrenergic signaling of non-neuronally released norepinephrine (Fig. 2A, white bars). Propranolol had no influence on IFN- γ release in the presence of electrical stimulation (Fig. 2A, black bars). In contrast, an α 1-adrenergic stimulation is only visible in the presence of electrical stimulation, which indicates α 1-adrenergic neuronal stimulation of IFN- γ (Fig. 2B). Similarly, α 2-adren-

ergic stimulation is only visible in the presence of electrical stimulation (Fig. 2C). Effects of adenosine were bimodal and dose-dependent with a stimulatory effect at 5×10^{-10} M and an inhibitory effect at 10^{-9} M on IFN- γ release (Fig. 2D). Adenosine effects were independent of electrical stimulation because they were observed without and with electrical stimulation (Fig. 2D). Fig. 2E summarizes non-neuronal and neuronal effects.

3.3. Neurotransmitter-dependent regulation of splenic CXCL1 release

Propranolol inhibited spontaneous CXCL1 release independent of electrical stimulation, which indicates a non-neuronal stimulation of CXCL1 via β -adrenergic pathways by spontaneously released norepinephrine (Fig. 3A, white bars). A very similar effect

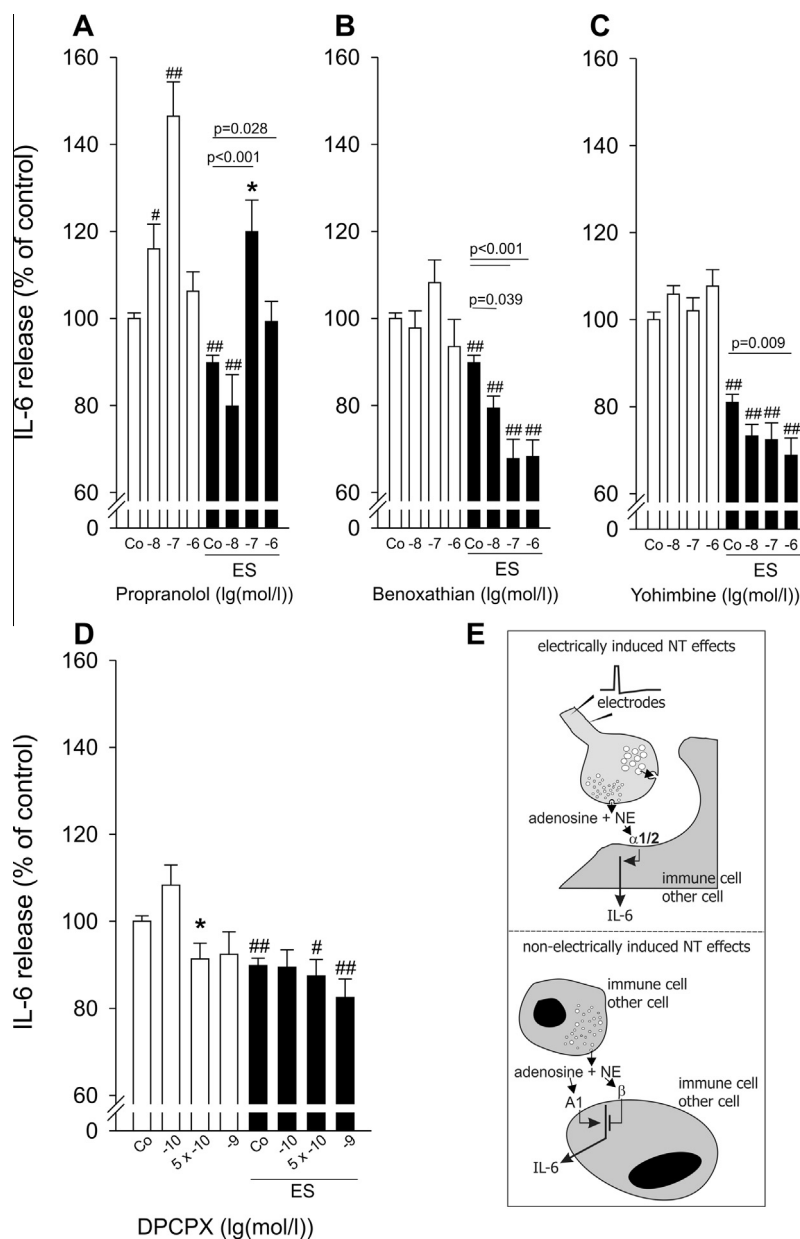


Fig. 4. Neurotransmitter-dependent regulation of splenic interleukin-6 (IL-6) release. (A) Non-neuronal β -adrenergic inhibition of IL-6. (B) Neuronal α 1-adrenergic stimulation of IL-6. (C) Neuronal α 2-adrenergic stimulation of IL-6. (D) Non-neuronal stimulatory effects of adenosine signaling on spontaneous IL-6 release. (E) Summary of neuronal neurotransmitter effects and non-neuronal neurotransmitter effects on IL-6 release. For panels A–D: Colors of bars, abbreviations, and electrical stimulation are explained in legend to Fig. 2. * $p < 0.05$, * $p < 0.005$, ** $p < 0.001$ versus control without electrical stimulation (=100%, 268.7 pg IL-6 per ml). At least 23 slices of three mice were used per condition.

was observed under electrical conditions, which demonstrates a mainly non-neuronal effect (Fig. 2A, black bars). In contrast, α 1-adrenergic and α 2-adrenergic stimulation was only present in the presence of electrical stimulation, which indicates α 1- and α 2-adrenergic neuronal stimulation of CXCL1 (Fig. 3B/C). Adenosine inhibited CXCL1 release at 5×10^{-10} M and at 10^{-9} M via the A1 adenosine receptor in the absence of electrical stimulation (Fig. 3D, white bars). Adenosine effects were independent of electrical stimulation because they were observed without and with electrical stimulation at the same concentrations (Fig. 3D). Fig. 3E summarizes non-neuronal and neuronal effects.

3.4. Neurotransmitter-dependent regulation of splenic IL-6 release

Propranolol stimulated spontaneous IL-6 release independent of electrical stimulation, which indicates a non-neuronal inhibition of IL-6 via β -adrenergic pathways by spontaneously released norepinephrine (Fig. 4A, white bars). A very similar effect was observed under electrical conditions, which demonstrates a mainly non-neuronal effect (Fig. 4A, black bars). In contrast, α 1- and α 2-adrenergic stimulation was only present in the presence of electrical stimulation, which indicates α 1- and α 2-adrenergic neuronal stimulation of IL-6 (Fig. 4B/C). Adenosine stimulated

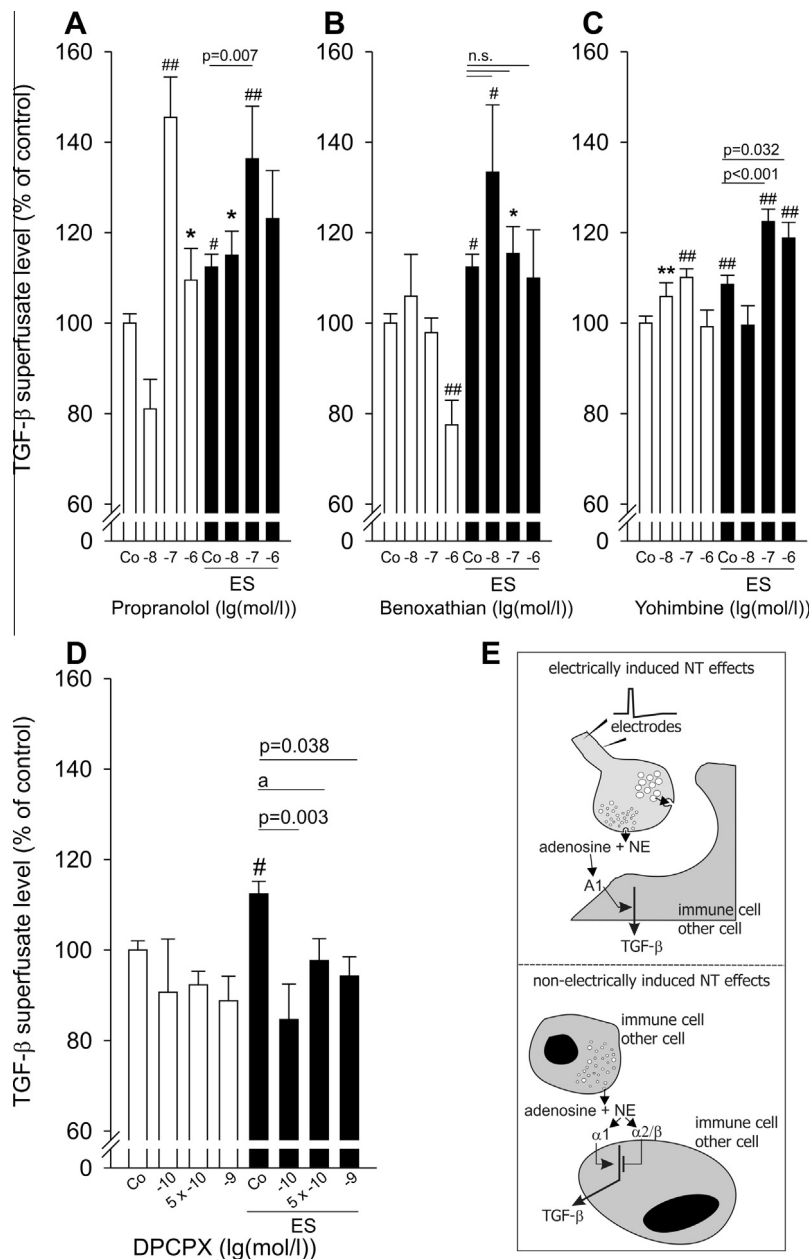


Fig. 5. Neurotransmitter-dependent regulation of splenic transforming growth factor- β (TGF- β) release. (A) Non-neuronal β -adrenergic inhibition of TGF- β . (B) Non-neuronal α 1-adrenergic stimulation of TGF- β . (C) Non-neuronal and neuronal α 2-adrenergic inhibition of TGF- β . (D) Neuronal A1-adenosinergic stimulation of TGF- β release. (E) Summary of neuronal neurotransmitter effects and non-neuronal neurotransmitter effects on TGF- β release. For panels A–D: Colors of bars, abbreviations, and electrical stimulation are explained in legend to Fig. 2. ^a $p < 0.10$, ^{*} $p < 0.05$, [#] $p < 0.005$, ^{##} $p < 0.001$ versus control without electrical stimulation (=100%, 272.6 pg TGF- β per ml). At least 20 slices of three mice were used per condition.

IL-6 release at 5×10^{-10} M via the A1 adenosine receptor in the absence of electrical stimulation (Fig. 4D, white bars). Adenosine effects were independent of electrical stimulation because they were observed without electrical stimulation (Fig. 4D). Fig. 4E summarizes non-neuronal and neuronal effects.

3.5. Neurotransmitter-dependent regulation of splenic TGF- β release

Propranolol stimulated spontaneous TGF- β release independent of electrical stimulation, which indicates a non-neuronal inhibition of TGF- β via β -adrenergic pathways by spontaneously released norepinephrine (Fig. 5A, white bars). A very similar effect was observed under electrical conditions, which demonstrates a mainly non-neuronal effect (Fig. 5A, black bars). Benoxathian, the α 1-adrenergic antagonist, inhibited spontaneous TGF- β release, which indicates a non-neuronal α 1-adrenergic stimulation of TGF- β release (Fig. 5B). However, benoxathian had no effect on TGF- β under electrical conditions (Fig. 5B). Yohimbine, the α 2-adrenergic antagonist, slightly inhibited TGF- β release without electrical stimulation (Fig. 5C, white bars), which was similarly observed under electrical stimulation (Fig. 5C, black bars). This indicates non-neuronal α 2-adrenergic inhibition of TGF- β release (Fig. 5C). Adenosine had no effect on spontaneous TGF- β release in the absence of electrical stimulation (Fig. 5D, white bars). However, electrically stimulated TGF- β release was inhibited by DPCPX, which indicates that neuronally released adenosine is able to stimulate TGF- β via A1 adenosinergic pathways (Fig. 5D, black bars). Fig. 5E summarizes non-neuronal and neuronal effects.

4. Discussion

This study demonstrated a remarkable functional change of the neuroimmune cross-talk in the spleen of early compared to late arthritic animals (summarized in Table 1). In early arthritis, shortly after outbreak of the disease, only neuronal neurotransmitter-dependent effects on cytokine release were observed in the murine spleen (no antagonist effects without electrical stimulation) (Straub et al., 2008). In the CIA model of early arthritis, density of sympathetic nerve fibers in the spleen decreased during outbreak of the disease (Straub et al., 2008). However, sympathetic innervation must be still relatively intact because clear neuronal effects on cytokine secretion can be observed (Straub et al., 2008, 2011). A similar change of sympathetic innervation in the spleen was observed in the adjuvant arthritis model presented by Lorton et al. (2005).

In late arthritis, the situation is quite different because sympathetic nerve fibers are almost completely lost (Härle et al., 2005; Straub et al., 2008), and because novel catecholamine-producing and catecholamine-storing cells appear, whose numbers are maximal in the spleen and elsewhere (Capellino et al., 2010, 2012).

Thus, one expects marked functional changes of the neuroimmune cross-talk in the spleen when comparing early and late arthritic animals.

Firstly, these expected changes can be observed as a change of the net effect of electrical stimulation. In early arthritis, net inhibition of IFN- γ , CXCL1, and IL-6 ranged between -18.4% and -23.8% , while net stimulation of TGF- β was $+47.8\%$ (Straub et al., 2011). These effects were neuronal because they were observed in the presence of electrical stimulation only. We interpreted these findings as a net shift to more T cell regulatory control of inflammation (high TGF- β , low IL-6) away from T effector control (Straub et al., 2011). In contrast, in late arthritis demonstrated in the present work, the net electrical inhibition of IFN- γ , CXCL1, and IL-6 is much smaller, and net stimulation of TGF- β is also much smaller. One might speculate that the regulatory influence of the SNS in the spleen observed in early arthritis (with low IL-6 and high TGF- β) is much smaller in late arthritis (Fig. 1).

Secondly, regulation of IFN- γ and IL-6 markedly changed from early to late arthritis as follows: In spleen of early arthritic animals, we observed neuronal β -adrenergic and A1-adenosinergic stimulation of IFN- γ and IL-6 but neuronal α 1/2-adrenergic inhibition (Straub et al., 2011). In late arthritis, there is only neuronal α 1/2-adrenergic stimulation but non-neuronal β -adrenergic and A1-adenosinergic inhibition. Thus, effects of neurotransmitters on IFN- γ and IL-6 are more or less opposite in early arthritis compared to late arthritis. This supports studies that demonstrate a more important influence of α 1-adrenergic pathways in chronic inflammation (Heijnen et al., 1996, 2002). A similar change of adenosinergic pathways has not been described in chronic inflammation. However, a similar increase of an A1-adenosinergic influence probably exists because α 1-adrenergic and A1-adenosinergic stimulation signal through the same $G\alpha_i$ cAMP-inhibiting pathways. It seems that α -adrenoceptors are increasingly upregulated in the late phase of arthritis leading to α -adrenergic functional influence (Heijnen et al., 1996, 2002). However, the important intracellular pathways that switch the influence from inhibitory to stimulatory and vice versa are presently not exactly known. It might well be that G-protein coupled receptor kinases (GRKs) or proinflammatory pathways through β -arrestin and MAP kinase become more important during the chronic inflammatory process (Luttrell et al., 1999; Lombardi et al., 2001). This might apply to adrenergic and adenosinergic receptors.

There might be another explanation why in late arthritis neuronal β -adrenergic effects are lost and neuronal α 1/2-adrenergic become important. We recently discussed the change of innervation in inflamed tissue, and we introduced the concept of the beta-to-alpha adrenergic shift due to loss of sympathetic innervation in inflamed tissue (Pongratz and Straub, 2013). Since adenosine via A1/A2 adenosine receptors show a very similar signaling compared to adrenoceptors, the concept can be extended to an A2-to-A1 adenosinergic shift. The concept depends on the fact that norepinephrine

Table 1

Comparison of sympathetic neurotransmitter-dependent cytokine regulation on day 32 (score three arthritis) and day 58 \pm 5.2 after immunization in animals with early and late arthritis, respectively. The results of the present study are related to data published in three earlier studies (Straub et al. 2008, 2011, 2012). Abbreviations: A1, adenosine receptor 1; n.d., not determined; NT, neurotransmitter; TGF- β , transforming growth factor- β .

	Interferon- γ		CXCL1 (KC)		Interleukin-6		TGF- β	
	Day 32	Day 58	Day 32	Day 58	Day 32	Day 58	Day 32	Day 58
β -adrenergic effect	\uparrow^{**}	\downarrow^*	\uparrow^{**}	\uparrow^*	\uparrow^{**}	\downarrow^*	\uparrow^{**}	\downarrow^*
α 1-adrenergic effect	\downarrow^{**}	\uparrow^{**}	n.d.	\uparrow^{**}	\downarrow^{**}	\uparrow^{**}	none	\uparrow^{**}
α 2-adrenergic effect	\downarrow^{**}	\uparrow^{**}	\downarrow^{**}	\uparrow^{**}	none	\uparrow^{**}	\downarrow^{**}	$\downarrow^{**}, \downarrow^*$
A1 adenosine effect	\uparrow^{**}	\downarrow^*	n.d.	\downarrow^*	\uparrow^{**}	\uparrow^*	none	\uparrow^{**}
*non-neuronal NT effects	none	$\beta, A1$	none	$\beta, A1$	none	$\beta, A1$	none	$\beta, \alpha 1, 2$

* Spontaneous neurotransmitter (NT) effects appear without electrically stimulated release of NT. Spontaneous effects can happen as a consequence of cellular production of NT independent of nerve fibers.

** Electrical NT effects appear only when spleen slices were electrically stimulated.

(adenosine) binds to α -adrenoceptors (A1 adenosine receptors) with high affinity and to β -adrenoceptors (A2 adenosine receptors) with low affinity. In the presence of sympathetic nerve fibers in normal or little inflamed tissue, neuronal β -adrenergic (A2-adenosinergic) effects can still be observed as seen in the spleen in early arthritis. When nerve fibers are present concentrations of neuronally released norepinephrine (adenosine) can be high enough to induce neuronal β -adrenergic (A2-adenosinergic) effects.

However, when sympathetic nerve fibers get lost or repelled during the process of inflammation (Pongratz and Straub, 2013), the concentration of neuronally released norepinephrine decreases, particularly, in the major inflammatory areas. With the beta-to-alpha adrenergic shift, one would expect neuronal α -adrenergic instead of neuronal β -adrenergic effects. Importantly, this phenomenon is exactly observed in the present study in late arthritis.

Similarly, all α 1/2-adrenergic effects on IFN- γ , CXCL1, and IL-6 are neuronal because they depend on electrical stimulation. This indicates that electrical stimulation of spleen tissue still leads to norepinephrine release that acts at low concentrations relevant to α 1-adrenergic crosstalk (this is not observed for TGF β because it was generally not much influenced by α 1-adrenergic signalling, Ref. (Straub et al., 2011)). However, all β -adrenergic effects on IFN- γ , CXCL1, IL-6, and TGF β are non-neuronal and independent of electrical stimulation because they are observable without electrical stimulation. This indicates that other sources of norepinephrine must exist in inflamed splenic tissue in late arthritis. Importantly, adenosinergic effects are also non-neuronal for IFN- γ , CXCL1, and IL-6. This fits to the concept that numbers of neurotransmitter-producing and -storing cells largely increase in the spleen in the late phase of arthritis (Capellino et al., 2010, 2012). Most probably, these cells spontaneously release norepinephrine and/or adenosine leading to non-neuronal effects (Cosentino et al., 2007; Capellino et al., 2010), which only happens in the late phase of arthritis. A recent study demonstrated a strong anti-inflammatory role of these cells when neurotransmitter secretion is increased by a one-shot reserpine effect (Capellino et al., 2010).

Alternatively, so-called non-neuronal effects might appear when sympathetic nerve fibers would release neurotransmitters in a spontaneous way without the help of electrical stimulation. While this has not been tested in the present study, the presence of this mechanism is unlikely because the increase of splenic catecholamine-producing cells and the loss of sympathetic nerve fibers are very pronounced. Thus, there are probably little sympathetic nerve fibers to release sympathetic neurotransmitters in a spontaneous way.

In early and late arthritis, the reader might recognize electrically induced inhibition of IFN- γ , CXCL1, and IL-6, and electrically induced stimulation of TGF- β , but effects of tested antagonists do not explain the observed influence on these cytokines. We can only speculate that another sympathetic neurotransmitter like neuropeptide Y, endogenous opioids (methionine-enkephalin or leucine-enkephalin), or ATP/ADP explain the inhibitory electrical influence on IFN- γ , CXCL1, and IL-6, and the stimulatory electrical influence on TGF- β . This must be tested in future studies.

In conclusion, the neuroimmune crosstalk substantially changes in late arthritis. While in early arthritis mainly neuronal effects of the SNS dominate cytokine regulation, in late arthritis, non-neuronal effects become much more important. This study and recent publications of our group suggest that these non-neuronal effects depend on catecholamine-producing and catecholamine-storing cells in late arthritis (Capellino et al., 2010, 2012). The functional spectrum of these cells, whether anti-inflammatory or proinflammatory, is presently not fully understood but comprehension of their manipulation might lead to novel therapeutic targets. This study undoubtedly demonstrated the complexity of the functional

neuroimmune interplay when sympathetic innervation changes and neurotransmitter-producing cells start to play a role.

Acknowledgments

This study was funded by the institution and by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG FOR696).

References

- Boettger, M.K., Weber, K., Grossmann, D., Gajda, M., Bauer, R., Bar, K.J., Schulz, S., Voss, A., Geis, C., Brauer, R., Schaible, H.G., 2010. Spinal tumor necrosis factor alpha neutralization reduces peripheral inflammation and hyperalgesia and suppresses autonomic responses in experimental arthritis: a role for spinal tumor necrosis factor alpha during induction and maintenance of peripheral inflammation. *Arthritis Rheum.* 62, 1308–1318.
- Boyle, D.L., Jones, T.L., Hammaker, D., Svensson, C.L., Rosengren, S., Albani, S., Sorkin, L., Firestein, G.S., 2006. Regulation of peripheral inflammation by spinal p38 MAP kinase in rats. *PLoS Med.* 3, e338.
- Capellino, S., Cosentino, M., Wolff, C., Schmidt, M., Grifka, J., Straub, R.H., 2010. Catecholamine-producing cells in the synovial tissue during arthritis: modulation of sympathetic neurotransmitters as new therapeutic target. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 1853–1860.
- Capellino, S., Weber, K., Gelder, M., Harle, P., Straub, R.H., 2012. First appearance and location of catecholaminergic cells during experimental arthritis and elimination by chemical sympathectomy. *Arthritis Rheum.* 64, 1110–1118.
- Cosentino, M., Fietta, A.M., Ferrari, M., Rasini, E., Bombelli, R., Carcano, E., Saporiti, F., Meloni, F., Marino, F., Lecchini, S., 2007. Human CD4+CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. *Blood* 109, 632–642.
- Del Rey, A., Wolff, C., Wildmann, J., Randolph, A., Hahnel, A., Besedovsky, H.O., Straub, R.H., 2008. Disrupted joint-immune-brain communication during experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 58, 3090–3099.
- Härle, P., Mobius, D., Carr, D.J., Schölmerich, J., Straub, R.H., 2005. An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 52, 1305–1313.
- Härle, P., Pongratz, G., Albrecht, J., Tarner, I.H., Straub, R.H., 2008. An early sympathetic nervous system influence exacerbates collagen-induced arthritis via CD4+CD25+ cells. *Arthritis Rheum.* 58, 2347–2355.
- Heijnen, C.J., Roupe van der Voort, C., Wulffraat, N., van der, N.J., Kuis, W., Kavelaars, A., 1996. Functional alpha 1-adrenergic receptors on leukocytes of patients with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *J. Neuroimmunol.* 71, 223–226.
- Heijnen, C.J., Rouppe, v.d., V., Van de, P.M., Kavelaars, A., 2002. Cytokines regulate alpha(1)-adrenergic receptor mRNA expression in human monocytic cells and endothelial cells. *J. Neuroimmunol.* 125, 66–72.
- Keyszer, G., Langer, T., Kornhuber, M., Taute, B., Horneff, G., 2004. Neurovascular mechanisms as a possible cause of remission of rheumatoid arthritis in hemiparetic limbs. *Ann. Rheum. Dis.* 63, 1349–1351.
- Levine, J.D., Clark, R., Devor, M., Helms, C., Moskowitz, M.A., Basbaum, A.I., 1984. Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science* 226, 547–549.
- Levine, J.D., Dardick, S.J., Roizen, M.F., Helms, C., Basbaum, A.I., 1986. Contribution of sensory afferents and sympathetic efferents to joint injury in experimental arthritis. *J. Neurosci.* 6, 3423–3429.
- Levine, J.D., Khasar, S.G., Green, P.G., 2006. Neurogenic inflammation and arthritis. *Ann. NY Acad. Sci.* 1069 (155–67), 155–167.
- Lombardi, M.S., Kavelaars, A., Cobelens, P.M., Schmidt, R.E., Schedlowski, M., Heijnen, C.J., 2001. Adjuvant arthritis induces down-regulation of G protein-coupled receptor kinases in the immune system. *J. Immunol.* 166, 1635–1640.
- Lorton, D., Lubahn, C., Klein, N., Schaller, J., Bellinger, D.L., 1999. Dual role for noradrenergic innervation of lymphoid tissue and arthritic joints in adjuvant-induced arthritis. *Brain Behav. Immun.* 13, 315–334.
- Lorton, D., Schaller, J., Bellinger, D., Lubahn, C., 2002. Increasing sympathetic tone during the initiation phase of disease development exacerbates adjuvant arthritis. *Brain Behav. Immun.* 16, 198–199.
- Lorton, D., Lubahn, C., Lindquist, C.A., Schaller, J., Washington, C., Bellinger, D.L., 2005. Changes in the density and distribution of sympathetic nerves in spleens from Lewis rats with adjuvant-induced arthritis suggest that an injury and sprouting response occurs. *J. Comp. Neurol.* 489, 260–273.
- Lubahn, C.L., Schaller, J.A., Bellinger, D.L., Sweeney, S., Lorton, D., 2004. The importance of timing of adrenergic drug delivery in relation to the induction and onset of adjuvant-induced arthritis. *Brain Behav. Immun.* 18, 563–571.
- Luttrell, L.M., Ferguson, S.S., Daaka, Y., Miller, W.E., Maudsley, S., Della Rocca, G.J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D.K., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., 1999. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283, 655–661.
- Mapp, P.I., Kidd, B.L., Gibson, S.J., Terry, J.M., Revell, P.A., Ibrahim, N.B., Blake, D.R., Polak, J.M., 1990. Substance P-, calcitonin gene-related peptide- and C-flanking peptide of neuropeptide Y-immunoreactive fibres are present in normal synovium but depleted in patients with rheumatoid arthritis. *Neuroscience* 37, 143–153.

- Miller, L.E., Jüsten, H.P., Schölmerich, J., Straub, R.H., 2000. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J.* 14, 2097–2107.
- Pereira da Silva, J.A., Carmo-Fonseca, M., 1990. Peptide containing nerves in human synovium: immunohistochemical evidence for decreased innervation in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 17, 1592–1599.
- Pongratz, G., Straub, R.H., 2013. Role of peripheral nerve fibres in acute and chronic inflammation in arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9, 117–126.
- Straub, R.H., 2004. Complexity of the bi-directional neuroimmune junction in the spleen. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 640–646.
- Straub, R.H., Cutolo, M., 2007. Circadian rhythms in rheumatoid arthritis: implications for pathophysiology and therapeutic management. *Arthritis Rheum.* 56, 399–408.
- Straub, R.H., Rauch, L., Fassold, A., Lowin, T., Pongratz, G., 2008. Neuronally released sympathetic neurotransmitters stimulate splenic interferon-gamma secretion from T cells in early type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 58, 3450–3460.
- Straub, R.H., Rauch, L., Rauh, L., Pongratz, G., 2011. Sympathetic inhibition of IL-6, IFN-gamma, and KC/CXCL1 and sympathetic stimulation of TGF-beta in spleen of early arthritic mice. *Brain Behav Immun.* 25, 1708–1715.
- Straub, R.H., Meinel, T., Rauch, L., Fassold, A., Lowin, T., Pongratz, G., 2012. Corrigendum et addendum to *Arthritis & Rheumatism* 2008;58:3450–60. *Arthritis Rheum.* 64, 1695–1696.
- van Maanen, M.A., Lebre, M.C., van der, P.T., Larosa, G.J., Elbaum, D., Vervoordeldonk, M.J., Tak, P.P., 2009. Stimulation of nicotinic acetylcholine receptors attenuates collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 60, 114–122.