

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

AUFTRETEN KATECHOLAMINPRODUZIERENDER ZELLEN BEI
EXPERIMENTELLER ARTHRITIS UND IHRE ZERSTÖRUNG
DURCH SYMPATHEKTOMIE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Magdalena Gelder

2013

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

AUFTRETEN KATECHOLAMINPRODUZIERENDER ZELLEN BEI
EXPERIMENTELLER ARTHRITIS UND IHRE ZERSTÖRUNG
DURCH SYMPATHEKTOMIE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Magdalena Gelder

2013

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Rainer H. Straub
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Joachim Grifka
Tag der mündlichen Prüfung:	15.09.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Rheumatoide Arthritis	1
1.1.1	Epidemiologie und Klinik	1
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese	2
1.2	Sympathisches Nervensystem	4
1.2.1	Allgemeines	4
1.2.2	Stoffwechsel der Katecholamine	5
1.2.3	Verbindung zum Immunsystem	7
1.2.4	Verlust von sympathischen Nervenfasern	8
1.3	Katecholaminproduzierende Immunzellen	9
1.4	Ziel der Arbeit	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Mäuse und Arthritisinduktion	11
2.2	Chemische Sympathektomie	11
2.2.1	Sympathektomie zu einem frühen Zeitpunkt	12
2.2.2	Sympathektomie zu einem späten Zeitpunkt	12
2.3	Gewebeaufbereitung und Immunhistochemie	13
2.4	Statistische Analyse und Darstellung der Daten	16
3	Ergebnisse	17
3.1	Dichte Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen in der Frühphase der Arthritis	17
3.2	Dichte Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen in der Spätphase der Arthritis	20
4	Diskussion	26
5	Zusammenfassung	32
6	Literaturverzeichnis	34
7	Danksagung	45
8	Lebenslauf	46
9	Eidesstattliche Erklärung	47
10	Publikation	48

Abkürzungsverzeichnis

6-OHDA	6-Hydroxydopamin
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CIA	Kollagen Typ II-induzierte Arthritis
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAT	Dopamintransporter
DBH	Dopamin- β -Hydroxylase
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
HLA	humane Leukozytenantigene
HRP	horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
MAO	Monoaminoxidase
MHC	major histocompatibility complex
NAT	Noradrenalintransporter
PBS	phosphate buffered saline
PNMT	Phenylethanolamin-N-Methyltransferase
RA	rheumatoide Arthritis
TGF	transforming growth factor
TH	Tyrosinhydroxylase
TNF	Tumornekrosefaktor
Tregs	regulatorische T-Zellen
VMAT	vesikulärer Monoamintransporter

1 Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

1.1.1 Epidemiologie und Klinik

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch entzündliche Systemerkrankung multifaktorieller Genese, die hauptsächlich die Gelenke betrifft, wo sie durch Synovialitis zu Arthritis führt. Mit einer Prävalenz von einem Prozent weltweit ist sie die häufigste entzündliche rheumatische Erkrankung, wobei Frauen dreimal häufiger betroffen sind als Männer [1]. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 50. und dem 75. Lebensjahr [2]. Patienten die von RA betroffen sind, weisen eine verkürzte Lebenserwartung auf und werden meist innerhalb weniger Jahre erwerbsunfähig [3].

Das typische klinische Bild der RA mit schubförmigem Verlauf, Morgensteifigkeit, Befall vor allem der Hand- sowie Fingergrund- und -mittelgelenke, Gelenkschmerzen auch in Ruhe und Funktionseinschränkung ist Ergebnis struktureller und entzündlicher Prozesse. Zur Diagnosesicherung dienen, abgesehen von der Klinik, typische röntgenologische Veränderungen wie gelenknahe Osteoporose, Knochen- und Knorpeldestruktion und später auch Gelenkfehlstellungen bis zur kompletten Gelenkdestruktion. Auch der Nachweis von Rheumafaktoren - Autoantikörper gegen den F_c-Teil von IgG - kann wegweisend sein [4]. Rheumafaktoren sind allerdings unspezifisch und treten auch bei anderen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises auf. Spezifischer ist der Nachweis von Antikörpern gegen zyklische citrullinierte Peptide [4, 5]. Eine kausale Behandlung der RA ist bisher

nicht möglich, ebenso wenig eine Heilung. Entscheidend für die Prognose der RA sind frühzeitige Diagnose und Therapiebeginn [5].

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der RA ist weitgehend unbekannt und Gegenstand der aktuellen medizinischen Forschung [6]. Sowohl äußere Einflüsse als auch genetische Prädisposition sind bei der Entstehung der RA von Bedeutung. Es scheint so, dass es nicht den einen Auslöser für RA gibt, vielmehr fand man bereits eine Liste von Faktoren, die mit der Pathogenese der RA in Zusammenhang zu stehen scheinen. Dazu zählen zum Beispiel Rauchen [7], oder Infektionen, etwa mit dem Epstein-Barr-Virus [8]. Genetisch spielen Allele in der MHC-Region eine wichtige Rolle, insbesondere HLA-DRB1. HLA-DRB1 kodiert eine definierte Aminosäuresequenz auf der DR- β -Kette des HLA-Klasse-II-Moleküls, das so genannte „*shared epitope*“ [9]. Das PTNP22-Gen [10] und weitere Gene [11] konnten ebenfalls mit RA assoziiert werden.

Schon einige Zeit vor Ausbruch der Erkrankung kommt es zum Auftreten von Autoimmunität. Autoantikörper gegen zyklische citrullinierte Peptide und Rheumafaktoren können bereits Jahre vor Beginn der Gelenkentzündung nachgewiesen werden [12].

Die für die RA charakteristische Zerstörung der Gelenke beginnt mit der Proliferation der Gelenkschleimhaut (Synovialis). Außerdem kommt es zur Aktivierung von Zellen, Gelenkentzündung und Invasion der Synovialis in umliegenden Knorpel und Knochen [13-15]. Die Synovialis ist Teil der Gelenkkapsel und besteht beim Gesunden aus einer dünnen Deckzellschicht mit zwei Zelltypen, den makropha-

genartigen Typ A-Synovialozyten und den fibroblastenartigen Typ B-Synovialozyten, außerdem einer darunterliegenden interstitiellen Zone [16]. Bei der RA wird die Synovialis durch fehlgesteuerte Immunzellen, darunter dendritische Zellen und T- und B-Lymphozyten, infiltriert. Makrophagen, deren Anzahl positiv mit der Gelenkzerstörung korreliert [17], wandern in die synoviale Deckzellschicht ein. Es kommt zur Proliferation von synovialen Fibroblasten [18], deren Apoptoserate vermindert ist [19, 20]. Synoviale Fibroblasten zählen zu den wichtigsten Akteuren in der Gelenkzerstörung [21]. Sie sind in der Lage unabhängig vom Immunsystem zu agieren [22], außerdem scheinen sie für die Ausbreitung der RA in andere Gelenke mitverantwortlich zu sein [23]. Die Synovialis verwandelt sich bei der RA somit in entzündliches hypertrophes Gewebe (Pannus), wächst in den Gelenkspalt, Knorpel und Knochen und führt zur Gelenkzerstörung.

Für die Aktivierung und den Erhalt des Entzündungsgeschehens in der Synovialis werden Zytokine verantwortlich gemacht. Zytokine sind kleine Signalmoleküle, die immunmodulatorisch wirken und für die interzelluläre Kommunikation verantwortlich sind. Man unterscheidet entzündungsfördernde und entzündungshemmende Zytokine. Gerade die proentzündlichen Interleukine (IL) 1 und 6 sowie der Tumornekrosefaktor (TNF), sind bei der RA besonders stark vertreten [24, 25]. Antikörper gegen diese Zytokine werden bereits erfolgreich in der Arthritistherapie eingesetzt [26-28].

Um die Pathogenese der RA besser zu verstehen, und um neue Therapieansätze zu finden, werden für Studien häufig Tiermodelle herangezogen. Ein bewährtes Modell, auf Grund der ähnlichen Pathogenese und Pathologie zur RA, ist die Kollagen Typ II-induzierte Arthritis (*Collagen-induced arthritis*, CIA) bei DBA/1-Mäusen [29]. Diese Mäuse entwickeln nach der Gabe von bovinem Kollagen Typ

II recht zuverlässig eine akute Polyarthritits [30, 31]. Typisch für die CIA ist, genau wie bei der RA, eine Synovialitis mit Infiltration von Immunzellen, Pannusbildung und Zerstörung des Knorpels [31]. Außerdem werden sowohl bei der RA als auch der CIA Autoantikörper gegen Kollagen Typ II und Rheumafaktoren gebildet [29]. Weiterhin finden sich bei beiden Erkrankungen entzündungsfördernde Zytokine, zum Beispiel TNF, in den arthritischen Gelenken [31].

Einen weiteren wichtigen Aspekt in der Pathogenese der RA bilden neuroendokrinologische Veränderungen. Zwei immunregulatorische Systeme, die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, sowie die Achse zwischen Hypothalamus und dem autonomen Nervensystem, sollten eigentlich überschießende Immunreaktionen verhindern und für eine Entzündungsreduktion sorgen [32-34]. Bei der RA scheinen diese beiden Systeme jedoch gestört zu sein. Die Folge ist unter anderem eine inadäquat niedrige Ausschüttung antiinflammatorischer Hormone und sympathischer Neurotransmitter [35-37].

1.2 Sympathisches Nervensystem

1.2.1 Allgemeines

Das sympathische Nervensystem ist Teil des autonomen Nervensystems und dient der Anpassung an Stresssituationen. Durch seine Aktivierung wird der Körper auf Leistung vorbereitet, er wird bereit zu kämpfen oder zu flüchten [38]. Die präganglionären Neurone des Sympathikus befinden sich thorakolumbal und werden von zentralen Kernen des Hirnstammes und Hypothalamus gesteuert. Ihre Umschaltung erfolgt meist in paravertebralen Ganglien, wo ihnen Acetylcholin als Neurotransmitter dient [38, 39]. Die postganglionären sympathischen Neurone

laufen dann zu ihren Zielorganen [38]. Auch primäre und sekundäre Lymphorgane werden sympathisch innerviert [40, 41]. In fast allen Fällen dient Noradrenalin als sympathischer Neurotransmitter, nur die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks setzen hauptsächlich Adrenalin frei. Diese chromaffinen Zellen dienen als zweites sympathisches Neuron und werden von präganglionären sympathisch-cholinergen Nervenfasern innerviert [38, 40]. Adrenalin, Noradrenalin und auch Dopamin nennt man Katecholamine. Dopaminerge Neurone findet man vorwiegend im Mittelhirn.

1.2.2 Stoffwechsel der Katecholamine

Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin werden in mehreren Schritten aus der Aminosäure Tyrosin synthetisiert. Die Tyrosin-Hydroxylase (TH) ist dabei das Schrittmacherenzym [38, 42]. TH findet man in allen katecholaminproduzierenden Zellen, sie wandelt Tyrosin in L-DOPA um. L-DOPA wird mit Hilfe der DOPA-Decarboxylase zu Dopamin, welches dann innerhalb von katecholaminspeichernden Vesikeln durch die Dopamin- β -Hydroxylase in Noradrenalin umgewandelt werden kann [39, 42]. Der Transport von Dopamin in die Vesikel erfolgt durch den vesikulären Monoamintransporter (VMAT)-2, welcher durch Reserpin blockiert werden kann [38, 42, 43]. Manche Zellen, zum Beispiel die chromaffinen Zellen im Nebennierenmark, wandeln Noradrenalin im Zytoplasma in Adrenalin um. Das Enzym für diesen Schritt ist die Phenylethanolamin-N-Methyltransferase [42]. Der Transport von Adrenalin erfolgt hauptsächlich durch den VMAT-1 [44, 45]. Mittels Exozytose der Vesikel gelangen die Katecholamine in den synaptischen Spalt, wo sie an ihren jeweiligen Rezeptoren wirken können. Transporter, wie der Noradrenalintransporter und der Dopamintransporter, transportieren Katecholamine aus

der Synapse zurück ins Zytosol. Solche Transporter können auch 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) – eine gängige Substanz für Sympathektomie – in die Zelle befördern, wo es dann über unterschiedliche Mechanismen neurotoxisch wirkt [42]. Die Monoaminoxidase, ein Enzym der Mitochondrien und die Catechol-O-Methyltransferase, die sich sowohl im Zytoplasma als auch auf der Zelloberfläche befindet, sind schließlich für die Inaktivierung der Katecholamine verantwortlich (Abb. 1). Man findet diese beiden Enzyme in Zellen des gesamten Körpers, auch in den Nervenendigungen [42].

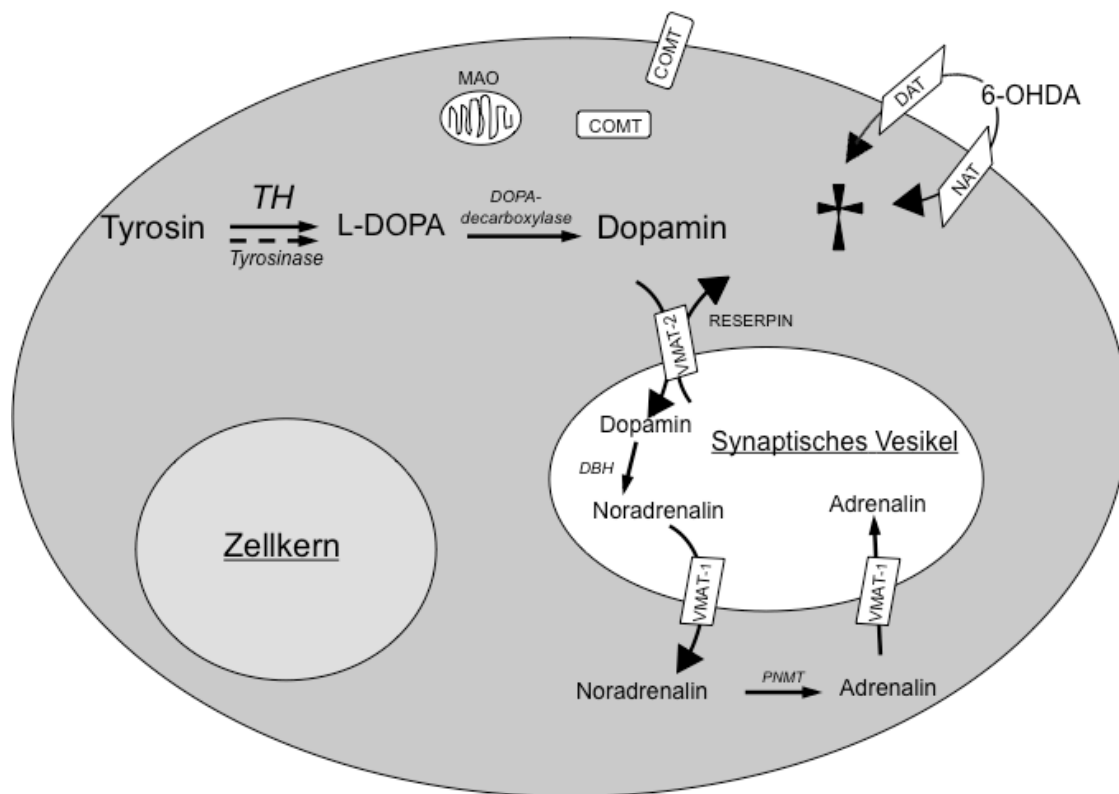


Abb. 1: Stoffwechsel der Katecholamine. Die Tyrosinhydroxylase (TH) ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Katecholaminsynthese. DOPA: Dihydroxyphenylalanin VMAT: vesikulärer Monoamintransporter, DBH: Dopamin- β -Hydroxylase, PNMT: Phenylethanolamin-N-Methyltransferase, DAT: Dopamintransporter, NAT: Noradrenalintransporter, MAO: Monoaminoxidase, COMT: Catechol-O-Methyltransferase, 6-OHDA: 6-Hydroxydopamin

1.2.3 Verbindung zum Immunsystem

Dass das vegetative Nervensystem eine wichtige Rolle in Abwehrreaktionen spielt, ist schon lange bekannt. So beschrieben zum Beispiel Selye und Kollegen 1949, dass autonome Nerven, gesteuert von vegetativen Zentren im Hirnstamm, ihre Impulse zu den jeweiligen Zielorganen befördern, um diese für die Abwehr bereit zu machen [46]. In den darauffolgenden Jahrzehnten gab es viele weitere Studien, die das immunmodulatorische Verhalten des sympathischen Nervensystems untersuchten. Es wurde hauptsächlich die entzündungsfördernde Wirkung des Sympathikus, etwa auf chronische Erkrankungen wie die RA, beschrieben [47]. Mittlerweile weiß man, dass der Sympathikus sowohl eine entzündungsfördernde, als auch eine entzündungshemmende Wirkung haben kann [48, 49]. In Experimenten mit Arthritis an Tiermodellen konnte man durch Sympathektomie oder Blockade von Adrenozeptoren eine Milderung der Arthritis bewirken [48-51]. Das spricht für einen entzündungsfördernden Effekt des sympathischen Nervensystems. Allerdings kam es zu diesem Effekt hauptsächlich, wenn die Blockierung des Sympathikus vor Arthritisinduktion oder in der nicht-symptomatischen Phase der Arthritis durchgeführt wurde. Sympathektomie in der chronischen Phase der Arthritis führte jedoch zu einer Verschlimmerung der Krankheit. Dies zeigte zum Beispiel die Studie von Härle und Kollegen 2005. In dieser wurde Sympathektomie mit 6-OHDA an DBA/1J-Mäusen durchgeführt, was in der Spätphase zu signifikant erhöhten *Arthritis Scores* führte [49]. Auch bei einer Studie zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) führte Sympathektomie zur Verschlimmerung der chronischen Kolitis [52]. Dies lässt eine entzündungshemmende Wirkung des sympathischen Nervensystems in der chronischen Phase von Autoimmunerkrankungen vermuten.

Da Immunzellen Rezeptoren für Neurotransmitter, zu denen auch Katecholamine zählen, exprimieren [53-55], kann das sympathische Nervensystem an dieser Stelle Einfluss auf das Immunsystem nehmen. Dies geschieht zum Beispiel durch Steuerung der Zytokinproduktion [56]. Katecholamine wirken an unterschiedlichen Rezeptoren und Rezeptorsubtypen. Noradrenalin, der wichtigste sympathische Neurotransmitter, bindet, abhängig von der Konzentration, an α - oder β -adrenerge Rezeptoren. Bei niedrigen Konzentrationen bindet es bevorzugt an α -adrenerge Rezeptoren, an β -adrenerge Rezeptoren bindet es erst ab einer Konzentration von 10^{-7} M [36]. Da die Aktivierung der β -adrenergen Rezeptoren zu einer Erhöhung des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) und dies wiederum zu einer verminderten Ausschüttung entzündungsfördernder Mediatoren wie dem TNF oder IL 12 führt, besitzen sie eine entzündungshemmende Wirkung [38, 57, 58]. Aktivierung der α_2 -adrenergen Rezeptoren hingegen führt zu einer verminderten cAMP-Konzentration, was unter anderem das Ausschütten des proinflammatorischen TNF bewirkt [38, 59]. Auch α_1 -adrenerge Rezeptoren können durch Stimulierung der IL 6-Produktion proinflammatorische Effekte haben [60]. Das bedeutet, dass Noradrenalin in hohen Konzentrationen tendenziell antientzündlich wirkt, ansonsten durch Aktivierung von α -adrenergen Rezeptoren Entzündungen eher fördert. Das sympathische Nervensystem kann demnach in Abhängigkeit von Zeitpunkt, Rezeptoren und Katecholaminkonzentration entweder pro- oder antiinflammatorisch wirken.

1.2.4 Verlust von sympathischen Nervenfasern

Bei vielen chronisch-entzündlichen Erkrankungen gehen sympathische Nervenfasern in entzündeten Regionen verloren. Dies konnte in Studien zu CED [52], dem

Charcot-Fuß [61], der RA [36, 62] und auch am experimentellen Arthritismodell [49] gezeigt werden. Bei der RA scheinen, parallel zum Verlust sympathischer Nervenfasern, vermehrt sensible Nervenfasern aufzutreten [36, 62]. Obwohl in der chronischen Phase der Arthritis sympathische Nervenfasern bereits größtenteils verschwunden sind (α -adrenerge proinflammatorische Effekte), bewirkte eine Sympathektomie in der Spätphase der Arthritis in einer Studie von Härle und Kollegen eine starke Verschlimmerung der Gelenkentzündung arthritischer Mäuse [49]. Es stellt sich die Frage, warum eine Zerstörung des Sympathikus, in einer Phase in der sich fast keine sympathischen Nervenfasern in der Gelenkregion mehr befinden, eine solche Wirkung haben konnte.

1.3 Katecholaminproduzierende Immunzellen

Schon seit einiger Zeit kennt man Zellen des Immunsystems, zum Beispiel Lymphozyten oder neutrophile Granulozyten, die Katecholamine aufnehmen oder produzieren können [63, 64]. Diese katecholaminproduzierenden Zellen fand man auch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose [65] oder in der Synovialis von Patienten mit RA [36, 43, 66]. Auch in einem Arthritismodell an Mäusen waren diese Zellen präsent [43]. Die genaue Bedeutung dieser Zellen ist noch nicht bekannt, aber es scheint so, als könnten sie einen entzündungshemmenden Effekt entfalten. Die Gabe von Reserpin, welches durch Blockade von VMAT-2 eine Erhöhung der Katecholaminkonzentration im Zytosol zur Folge hat, führte in einer Studie zu einer verminderten TNF-Produktion und einer verminderten Schwellung der Pfoten von arthritischen Mäusen [43].

Eine mögliche Begründung für die Verschlimmerung der Gelenkentzündung durch Sympathektomie in der Spätphase der Arthritis könnte mit dem Auftreten und der Zerstörung solcher katecholaminproduzierenden Zellen zusammen hängen.

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu überprüfen, ob Sympathektomie mit 6-OHDA einen Einfluss auf die Anzahl katecholaminproduzierender Zellen hat. Dafür wurde, wie in der Studie von Härle und Kollegen 2005 beschrieben, bei DBA/1J-Mäusen CIA induziert und Sympathektomie mit 6-OHDA entweder zu einem frühen oder zu einem späten Zeitpunkt durchgeführt. Die Arthritisinduktion und Organentnahmen der Mäuse ohne Sympathektomie erfolgten größtenteils durch Fr. Dr. Kristina Weber, die Sympathektomie wurde durch Fr. Dr. Silvia Capellino durchgeführt. Anschließend wurden mittels immunhistochemischer Färbungen Tyrosinhydroxylase-positiv (TH+) katecholaminproduzierende Zellen in lymphatischen Organen und Gelenken dieser Mäuse dargestellt und ihre Dichte mit der in arthritischen Mäusen ohne Sympathektomie verglichen. Die Vergleiche wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Früh- und Spätphase der Arthritis vorgenommen.

2 Material und Methoden

2.1 Mäuse und Arthritisinduktion

Es wurden 64 männliche DBA/1J-Mäuse benutzt, die im Alter von 5-8 Wochen bei Janvier (Janvier, Le Genest-St-Isle, Frankreich) gekauft wurden. Die Mäuse wurden zu fünf in einem Käfig untergebracht, bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden. Zu Standard-Laborfutter und Wasser hatten sie freien Zugang.

Die Immunisierung der Mäuse zur Arthritisinduktion erfolgte mit 100 µg bovinem Kollagen Typ II (Chondrex, Redmond, USA), emulgiert in einer gleichen Menge des kompletten Freund-Adjuvant (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), das intrakutan in die Schwanzwurzel gespritzt wurde. Einundzwanzig Tage später erhielten die Tiere eine erneute Immunisierung mit 100 µg bovinem Kollagen Typ II emulgiert in inkomplettem Freund-Adjuvant. Die Hälfte aller Mäuse wurde immunisiert. Als Tag 0 gilt der Tag an dem die Immunisierung stattfand. An den Tagen 14, 21, 49, 56, 60, 70 und 80 nach Arthritisinduktion, wurden je zwei immunisierte und zwei nicht immunisierte Tiere geopfert (Abb. 2). Die beiden Tiere, die am Tag 0 geopfert wurden, wurden nicht immunisiert.

2.2 Chemische Sympathektomie

Sympathektomie wurde zu einem frühen und einem späten Zeitpunkt durchgeführt. Die Methode wurde bereits beschrieben und ihre Effektivität getestet [49]. Hier noch einmal in Kürze.

2.2.1 Sympathektomie zu einem frühen Zeitpunkt

Sieben Tage vor der ersten Immunisierung der Mäuse wurde mit der Sympathektomie begonnen. An diesem und den beiden folgenden Tagen wurden 80 mg 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) pro Kilogramm Körpergewicht in 0,1% Ascorbinsäure intraperitoneal injiziert. Um die Sympathektomie aufrecht zu erhalten, wurden die intraperitonealen Injektionen mit 6-OHDA (80 mg/kg Körpergewicht) alle zehn Tage wiederholt. Die letzte Injektion erfolgte am Tag 45. Zwanzig Tiere wurden benutzt, die Hälfte von ihnen wurde mit Kollagen immunisiert. Die beiden Tiere, die am Tag 0 geopfert wurden, wurden nicht immunisiert. An den Tagen 14, 21, 49 und 56 wurden je zwei immunisierte und zwei nicht-immunisierte Tiere geopfert (Abb. 2).

2.2.2 Sympathektomie zu einem späten Zeitpunkt

Für die späte Sympathektomie begann man am 56. Tag nach Immunisierung mit der intraperitonealen Injektion von 80 mg 6-OHDA pro Kilogramm Körpergewicht, was an den beiden Folgetagen wiederholt wurde. Es wurden sechzehn Tiere sympathektomiert, davon wurden acht mit Kollagen immunisiert, acht dienten als Kontrolle. An den Tagen 56, 60, 70 und 80 wurden wieder je zwei immunisierte und zwei nicht-immunisierte Mäuse geopfert (Abb. 2).

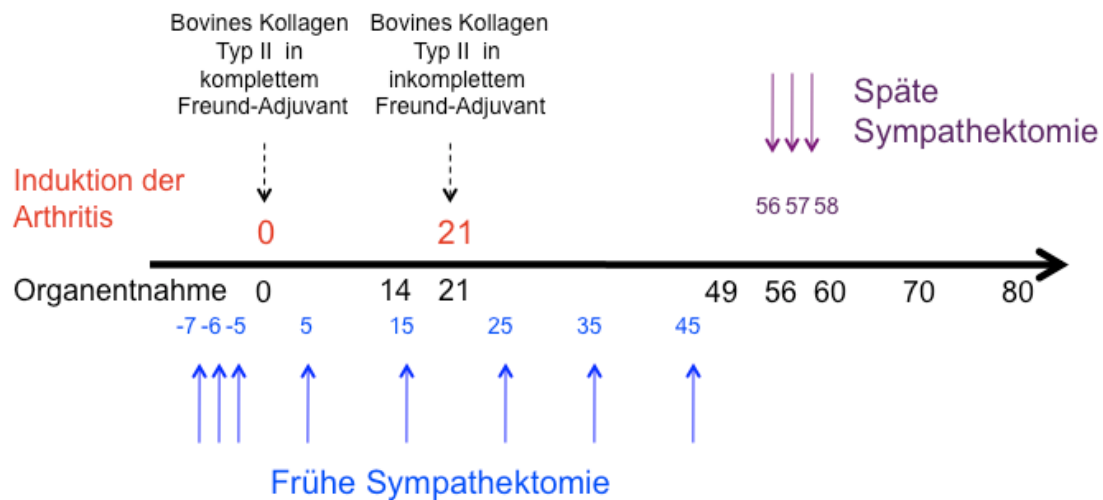


Abb. 2: Immunisierung, Sympathektomie und Organentnahme - zeitlicher Ablauf.

2.3 Gewebeaufbereitung und Immunhistochemie

Lymphknoten, Milzen und Pfoten wurden bei allen Tieren isoliert und zunächst 24 Stunden in 3,7% Formaldehyd in phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) fixiert. Die Pfoten wurden außerdem in *rapid decalcifier* (RDO, Apex Engineering Products Corp., Aurora, USA) für 36 Stunden entkalkt. Anschließend wurden die Organe in PBS gewaschen und in 20% Saccharose über Nacht inkubiert. Die Organe wurden dann im Einfriermedium TissueTek (Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Niederlanden) eingebettet und mit Hilfe flüssigen Stickstoffs tiefgefroren. Die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt.

Aus den tiefgefrorenen Proben wurden an einem Gefriermikrotom 8 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf Objektträger (Super Frost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) übertragen. Die Schnitte wurden, nachdem sie eine Stunde lang an der Luft getrocknet wurden, zehn Minuten in PBS rehydriert. Gewebeschnitte von Milzen wurden anschließend noch acht Minuten in 3% Wasser-

stoffperoxid inkubiert und dann zwei mal drei Minuten in PBS gewaschen. Alle Schnitte wurden nun mit einer Blocklösung aus 10% bovinem Serumalbumin (BSA), 10% fetalem Kälberserum und 10% Hühnerserum in PBS für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Blocklösung diente zur Verhinderung unspezifischen Bindens der Antikörper. Nach fünfminütigem Waschen der Gewebeschnitte mit PBS wurde der primäre Antikörper gegen TH (*Tyrosine 3-Hydroxylase Rabbit Monoclonal IgG #2129*, Epitomics, via Biomol, Hamburg, Deutschland) in einer Konzentration von 1:250 aufgetragen. Die Verdünnung aller verwendeten Antikörper erfolgte stets in 10% BSA in PBS. Bei jedem Organ wurde parallel ein Gewebeschnitt pro Zeitpunkt mit einem Isotyp versehen (#ISO-2129, Epitomics), der in gleicher Konzentration wie der primäre Antikörper aufgetragen wurde. Die Isotypkontrolle diente zum Ausschluss unspezifischen Färbens des primären Antikörpers. Ebenso wurden stets Negativkontrollen angefertigt, auf die nur 10% BSA in PBS pipettiert wurde. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurden die Objektträger drei Mal für fünf Minuten gewaschen: Die ersten beiden Male mit PBS und Triton (0,3%), das dritte Mal nur mit PBS. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper auf die Objektträger aufgetragen. Auf die Negativkontrollen wurde nur 10% BSA in PBS pipettiert, außerdem wurden Kontrollen nur mit sekundärem Antikörper angefertigt.

Für Gewebeschnitte von Lymphknoten und Pfoten wurde als Sekundärantikörper ein mit Alexa Fluor 546 konjugierter Ziegenantikörper, der gegen Kaninchen gerichtet ist, verwendet (#A-11010, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland). Er wurde 1:500 verdünnt auf die Proben aufgetragen und für 90 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer bei Dunkelheit inkubiert. Alle weiteren Schritte er-

folgten ebenfalls in Dunkelheit. Nachdem die Proben wieder zwei Mal fünf Minuten in PBS und 0,3% Triton, das dritte Mal nur in PBS, gewaschen wurden, folgte eine dreiminütige Inkubation mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI; Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland), 1:10000 verdünnt in PBS. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der selektiv an DNS bindet und zur Anfärbung der Zellkerne benutzt wurde. Im Anschluss wurden die Objektträger mit Hilfe von *Fluorescence Mounting Medium* (Dako, Hamburg, Deutschland) eingedeckt. Die Proben wurden in Dunkelheit bei 4°C aufbewahrt und innerhalb der folgenden 4 Tage mikroskopiert. Als Positivkontrolle, um zu beweisen, dass die Färbung funktioniert hat, diente stets ein Gewebeschnitt von einem Mäusekolon, in dessen Wand sich viele sympathische Nervenfasern befinden, der nach gleichem Protokoll mitgefärbt wurde.

Da in den Milzen die Immunfluoreszenzfärbung durch einen hohen Anteil an Autofluoreszenz gestört wurde, wurde hier ein anderer sekundärer Antikörper zur immunhistochemischen Färbung benutzt. Der mit Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelte Ziege Anti-Kaninchen Antikörper (*Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP*, #P0448, Dako) wurde 1:100 verdünnt auf die Schnitte pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Schnitte, zwei Mal mit PBS und 0,3% Triton, das dritte Mal nur mit PBS, wurde eine Färbereaktion mit dem Diaminobenzidin (DAB) Substrat Kit (*DAB Substrate Kit for Peroxidase*, #SK-4100, Vector Laboratories, Burlingame, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach zwanzigminütiger Inkubationszeit wurden die Objektträger für eine Minute in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit *Faramount Aqueous Mounting Medium* (Dako) eingedeckt.

2.4 Statistische Analyse und Darstellung der Daten

Um die Dichte Tyrosinhydroxylase-positiver (TH+) Zellen zu ermitteln, wurden am Mikroskop (Leitz DMRBE, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) je 17 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder pro Organ, Zeitpunkt und Tier, bei einer 400-fachen Vergrößerung ausgezählt. Die Darstellung erfolgte pro Quadratmillimeter. Die Negativkontrollen, Kontrollen mit nur sekundärem Antikörper und Isotypkontrollen wurden ebenfalls betrachtet und zeigten stets negative Ergebnisse.

Die statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von Sigmaplot (Sigmaplot 11.0, Systat Software, Erkrath, Deutschland). Zwei Gruppen wurden mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Testes verglichen. Eine Gruppe bestand aus je 4 Mäusen (2 Mäuse pro Zeitpunkt, 2 Zeitpunkte zusammengefasst). Der p-Wert wurde mit Hilfe der Software Sigma Stat (Sigma Stat © 3.5) ermittelt, das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt. Die Boxplots zeigen die 25., 50. (Median) und 75. Perzentile. Zur Darstellung der einzeln erfassten Werte wurden Scatterplots darüber gelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Dichte Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen in der Frühphase der Arthritis

In Gelenken von arthritischen Mäusen fand sich ab Tag 14-21 eine signifikant höhere Dichte an TH+ Zellen als in Gelenken von Kontrollmäusen (Abb. 3). Besonders deutlich wurde der Unterschied an Tag 49-56. Gelenke hatten verglichen mit den anderen Organen insgesamt eine deutlich niedrigere Dichte an TH+ Zellen. In den Gelenken von Mäusen die zu einem frühen Zeitpunkt sympathektomiert wurden, sah man deutlich, dass die Dichte der TH+ Zellen erniedrigt war, verglichen mit Arthritismäusen ohne Sympathektomie (Abb. 3).

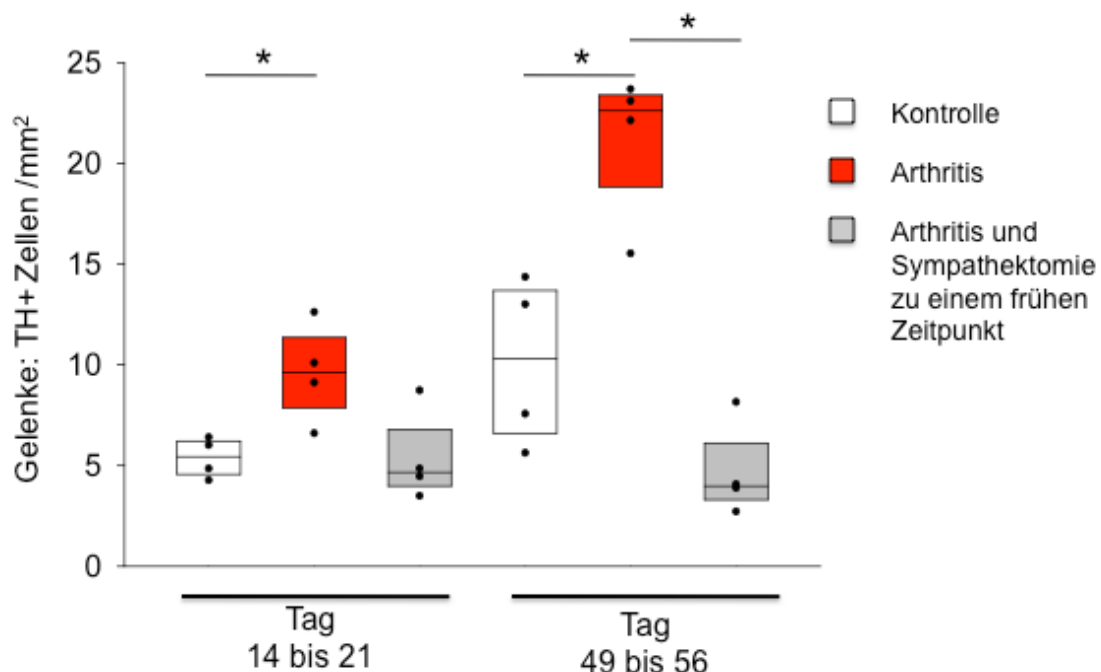


Abb. 3: Mittlere Dichte Tyrosinhydroxylase-positiver (TH+) Zellen in Gelenken von Mäusen mit induzierter Arthritis (rot) im Vergleich zu früh sympathektomierten arthritischen Mäusen (grau), und im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiß). Die X-Achse zeigt die Tage nach Arthritisinduktion. Die Boxplots zeigen den Median, sowie die 25. und 75. Perzentile. Die Scatterplots zeigen die einzeln erfassten Mittelwerte (n=4 Mäuse pro Gruppe). * = p<0,05.

In den Lymphknoten konnte insgesamt die höchste Dichte an TH+ Zellen gezählt werden. Bereits ab Tag 14-21 war die Dichte an TH+ Zellen in Gewebeproben arthritischer Mäuse bedeutend höher als in jenen der Kontrollmäuse (Abb. 4). In Lymphknoten von sympathektomierten Tieren fand man eine nur sehr niedrige TH+ Zelldichte zu allen Zeitpunkten. Sie war sowohl im Vergleich zu arthritischen Mäusen als auch zu Kontrollmäusen ohne Sympathektomie erniedrigt (Abb. 4).

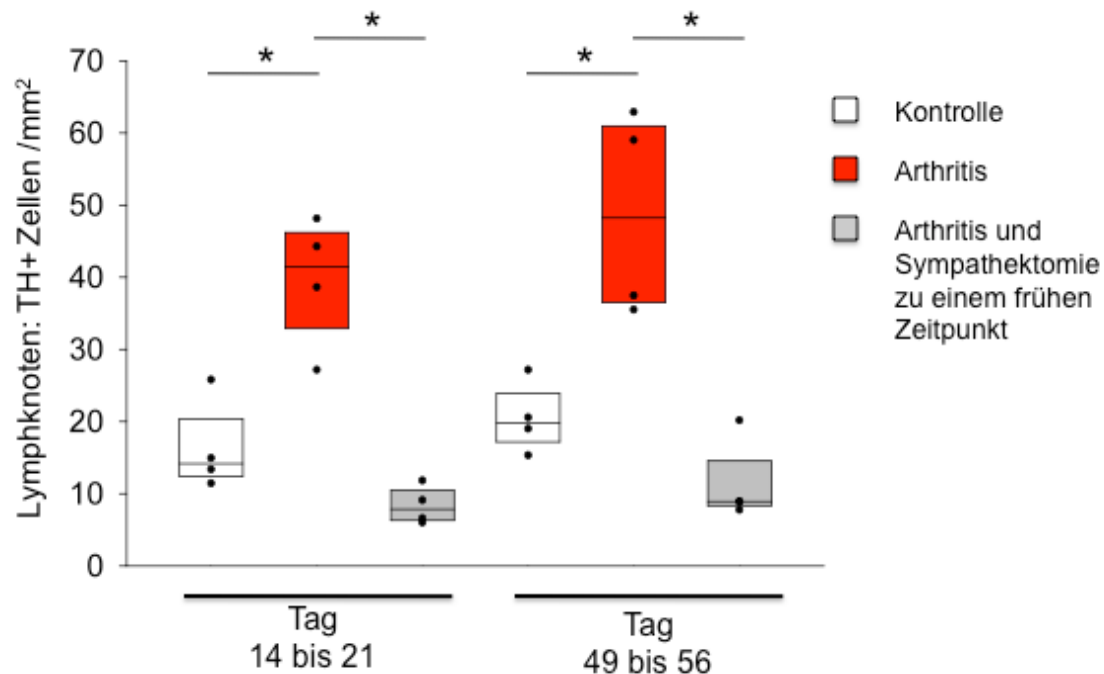


Abb. 4: Mittlere Dichte Tyrosinhydroxylase-positiver (TH+) Zellen in Lymphknoten von Mäusen mit induzierter Arthritis (rot) im Vergleich zu früh sympathektomierten arthritischen Mäusen (grau), und im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiß). Die X-Achse zeigt die Tage nach Arthritisinduktion. Die Boxplots zeigen den Median, sowie die 25. und 75. Perzentile. Die Scatterplots zeigen die einzeln erfassten Mittelwerte (n=4 Mäuse pro Gruppe). * = p<0,05.

Bei den Milzen gab es ab Tag 14-21 statistisch signifikante Unterschiede der Dichte TH+ Zellen in Organen von Arthritismäusen im Vergleich zu den Organen der Kontrollmäuse (Abb. 5). Milzen, von früh sympathektomierten Mäusen, zeigten eine deutlich niedrigere TH+ Zelldichte als die von arthritischen Mäusen ohne Sympathektomie (Abb. 5).

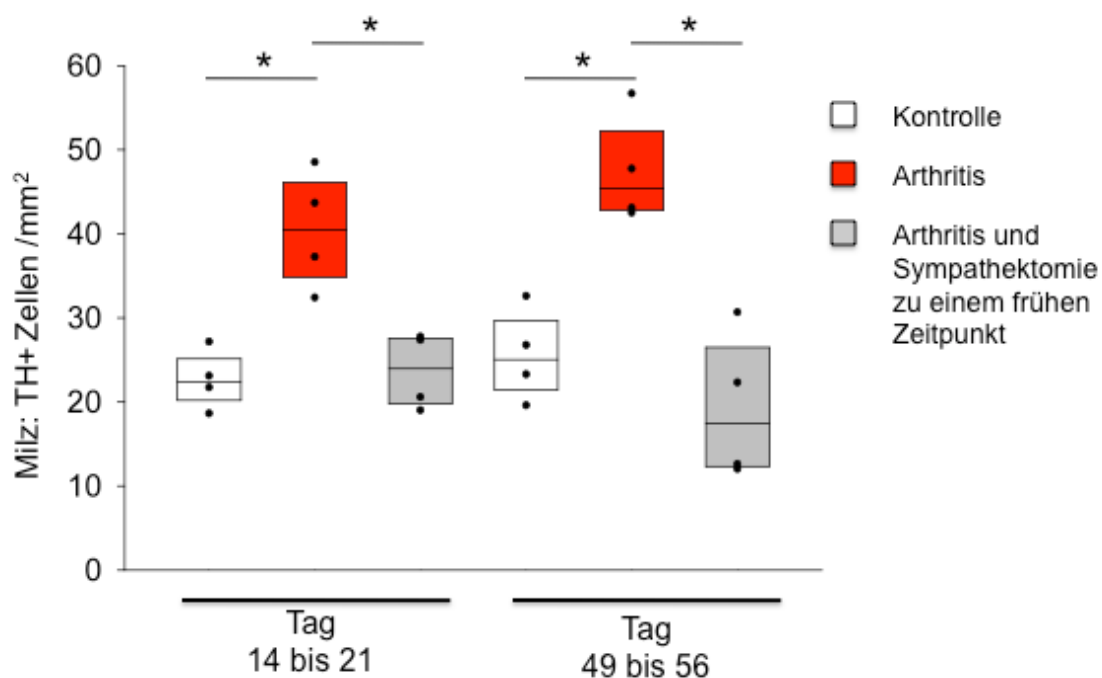


Abb. 5: Mittlere Dichte Tyrosinhydroxylase-positiver (TH+) Zellen in der Milz von Mäusen mit induzierter Arthritis (rot) im Vergleich zu früh sympathektomierten arthritischen Mäusen (grau), und im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiß). Die X-Achse zeigt die Tage nach Arthritisinduktion. Die Boxplots zeigen den Median, sowie die 25. und 75. Perzentile. Die Scatterplots zeigen die einzeln erfassten Mittelwerte (n=4 Mäuse pro Gruppe). * = p<0,05.

3.2 Dichte Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen in der Spätphase der Arthritis

In den Gelenken wurde die höchste Dichte an TH+ Zellen bei arthritischen Mäusen an Tag 56-60 erreicht. Die Dichte TH+ Zellen der sympathektomierten Mäuse lag zu jedem Zeitpunkt deutlich unter der Dichte von arthritischen Mäusen (Abb. 6,7).

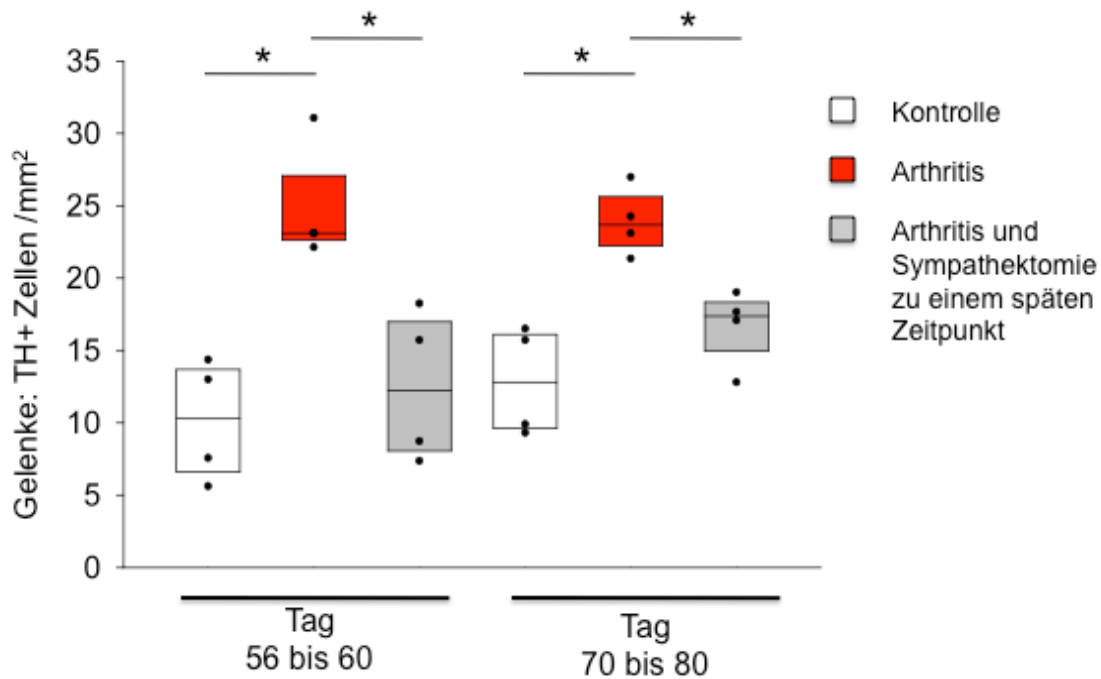


Abb. 6: Mittlere Dichte Tyrosinhydroxylase-positiver (TH+) Zellen in Gelenken von Mäusen mit induzierter Arthritis (rot) im Vergleich zu spät sympathektomierten arthritischen Mäusen (grau), und im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiß). Die X-Achse zeigt die Tage nach Arthritisinduktion. Die Boxplots zeigen den Median, sowie die 25. und 75. Perzentile. Die Scatterplots zeigen die einzeln erfassten Mittelwerte (n=4 Mäuse pro Gruppe). * = p<0,05.

Gelenke

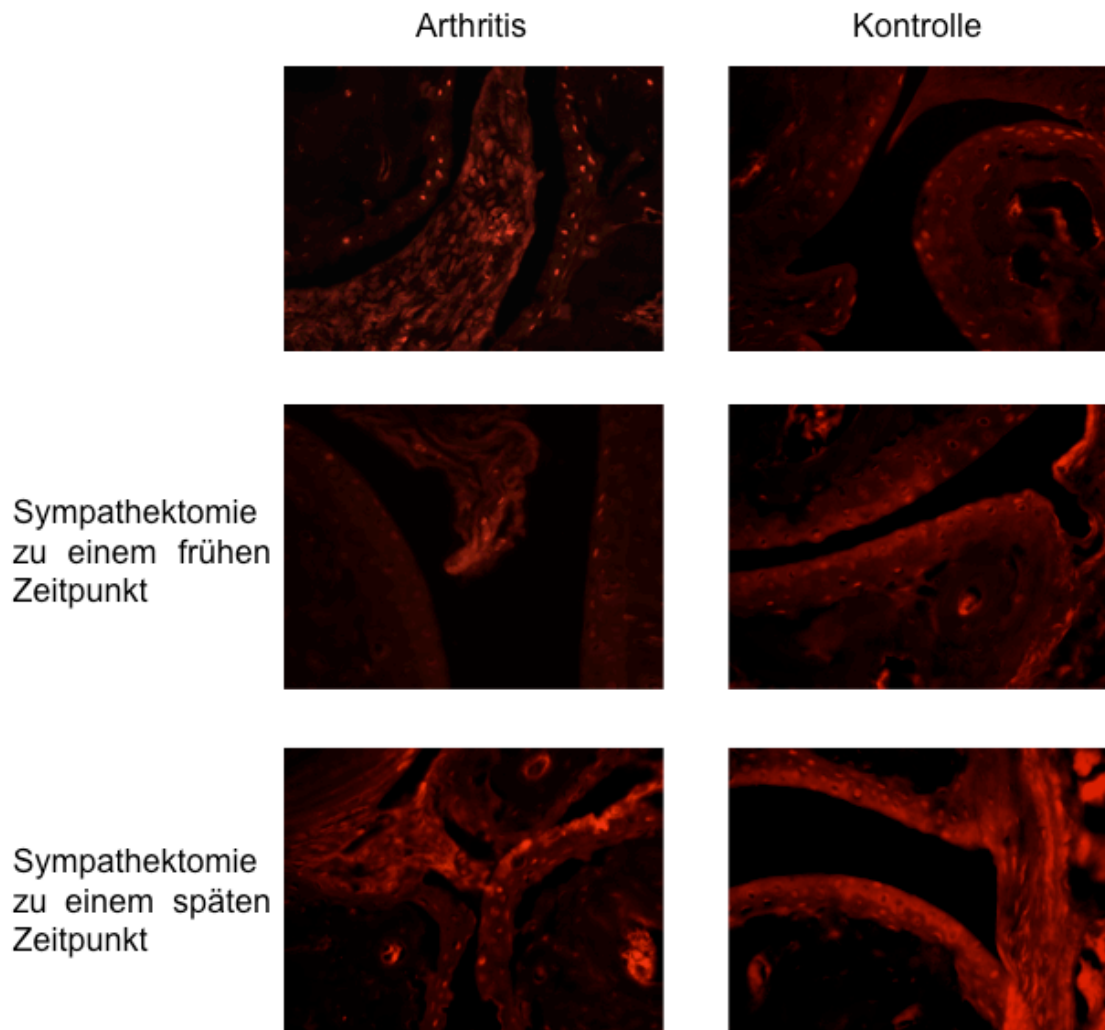


Abb. 7: Repräsentative Fluoreszenzfärbungen Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen in Gelenken von Mäusepfoten. Jeweils links von arthritischen Mäusen, rechts von Kontrollmäusen, mit und ohne Sympathektomie. 400-fache Vergrößerung.

Lymphknoten sympathektomierter Tiere zeigten im Vergleich zu denen nicht sympathektomierter arthritischer Mäuse erniedrigte Dichten an TH+ Zellen (Abb. 8,9). Dies wird besonders an Tag 70 - 80 deutlich, wo sich eine besonders hohe Dichte an TH+ Zellen bei arthritischen Mäusen ohne Sympathektomie zeigte (Abb. 8).

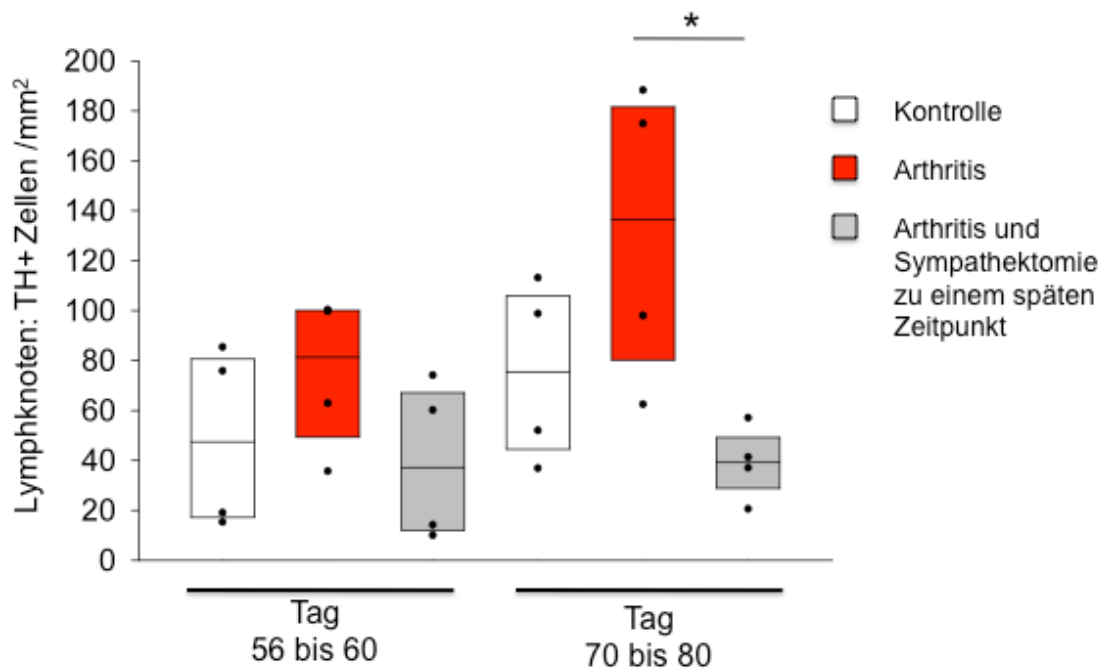


Abb. 8: Mittlere Dichte Tyrosinhydroxylase-positiver (TH+) Zellen in Lymphknoten von Mäusen mit induzierter Arthritis (rot) im Vergleich zu spät sympathektomierten arthritischen Mäusen (grau), und im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiß). Die X-Achse zeigt die Tage nach Arthritisinduktion. Die Boxplots zeigen den Median, sowie die 25. und 75. Perzentile. Die Scatterplots zeigen die einzeln erfassten Mittelwerte (n=4 Mäuse pro Gruppe). * = p<0,05.

Lymphknoten

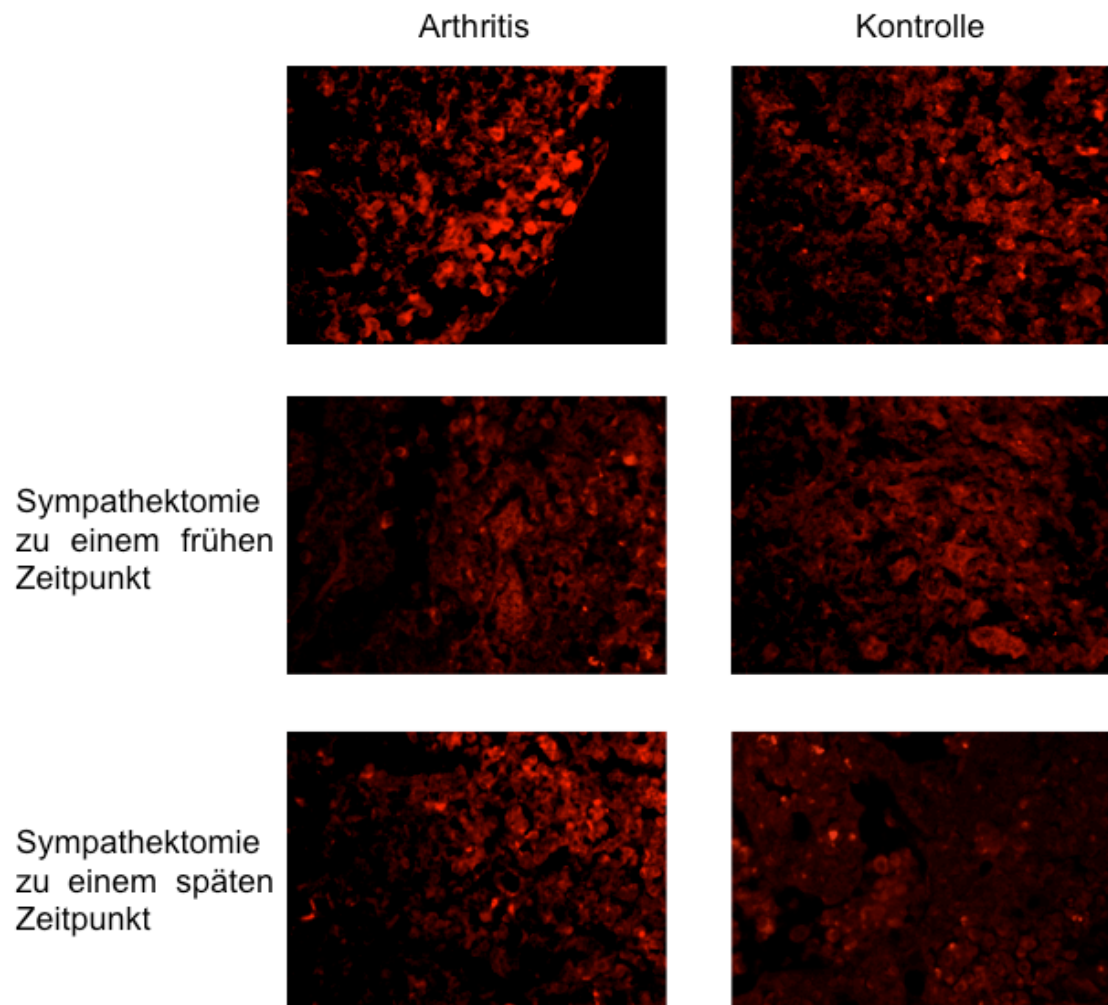


Abb. 9: Repräsentative Fluoreszenzfärbungen Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen in Lymphknoten von Mäusen mit und ohne Sympathektomie. Jeweils links von arthritischen Mäusen, rechts von Kontrollmäusen. 400-fache Vergrößerung.

Die Milzen zeigten bei der Färbung mit dem fluoreszierenden Antikörper sehr viel Autofluoreszenz. Selbst Negativkontrollen, die ohne Färbung mit Antikörpern unter dem Mikroskop betrachtet wurden, leuchteten sehr stark. Deshalb wurde mit dem HRP markierten Sekundärantikörper und dem DAB Substrase Kit gefärbt (Abb. 11). Die höchste Dichte an TH+ Zellen arthritischer Mäuse konnte man bei den Milzen am Tag 60 beobachten (Abb. 10). Milzen sympathektomierter arthritischer Tiere zeigten zu allen Zeitpunkten eine statistisch signifikant erniedrigte TH+ Zelldichte im Vergleich zu Arthritismäusen ohne Sympathektomie (Abb. 10). Die TH+ Zelldichte in Milzen sympathektomierter Arthritismäuse lag im Bereich der Kontrollen ohne Sympathektomie (Abb. 10).

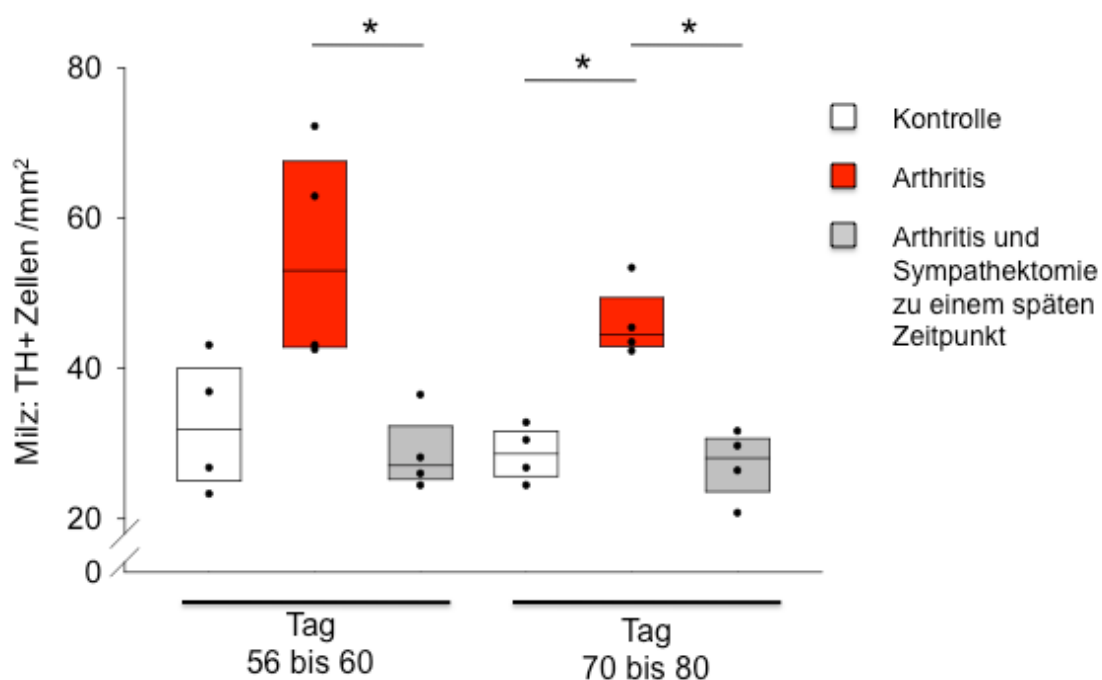
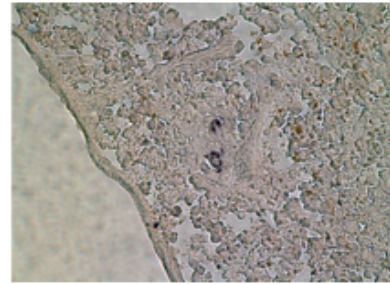
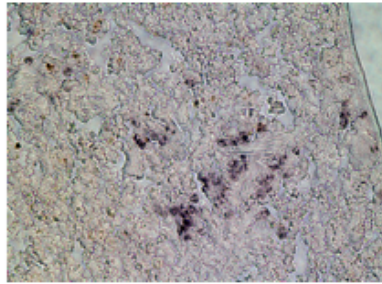


Abb. 10: Mittlere Dichte Tyrosinhydroxylase-positiver (TH+) Zellen in der Milz von Mäusen mit induzierter Arthritis (rot) im Vergleich zu spät sympathektomierten arthritischen Mäusen (grau), und im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiß). Die X-Achse zeigt die Tage nach Arthritisinduktion. Die Boxplots zeigen den Median, sowie die 25. und 75. Perzentile. Die Scatterplots zeigen die einzeln erfassten Mittelwerte (n=4 Mäuse pro Gruppe). * = p<0,05.

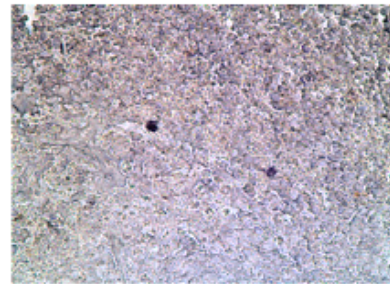
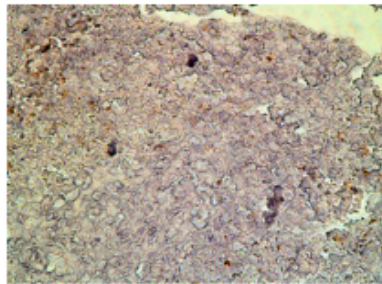
Milz

Arthritis

Kontrolle



Sympathektomie
zu einem frühen
Zeitpunkt



Sympathektomie
zu einem späten
Zeitpunkt

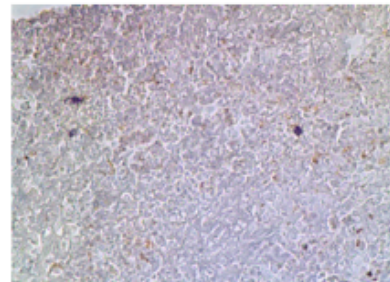


Abb. 11: Repräsentative immunhistochemische Färbungen Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen in der Milz von Mäusen mit und ohne Sympathektomie. Jeweils links von arthritischen Mäusen, rechts von Kontrollmäusen. 400-fache Vergrößerung.

4 Diskussion

In dieser Studie konnte an einem Arthritismodell gezeigt werden, dass die Sympathektomie mit 6-OHDA zu einer Reduktion catecholaminproduzierender Zellen in allen Phasen der Arthritis führte (Abb. 12, 13). Da die Dichte dieser Zellen im Verlauf der Arthritis deutlich zunahm wurde dies zu den späteren Zeitpunkten besonders deutlich (Abb. 13).

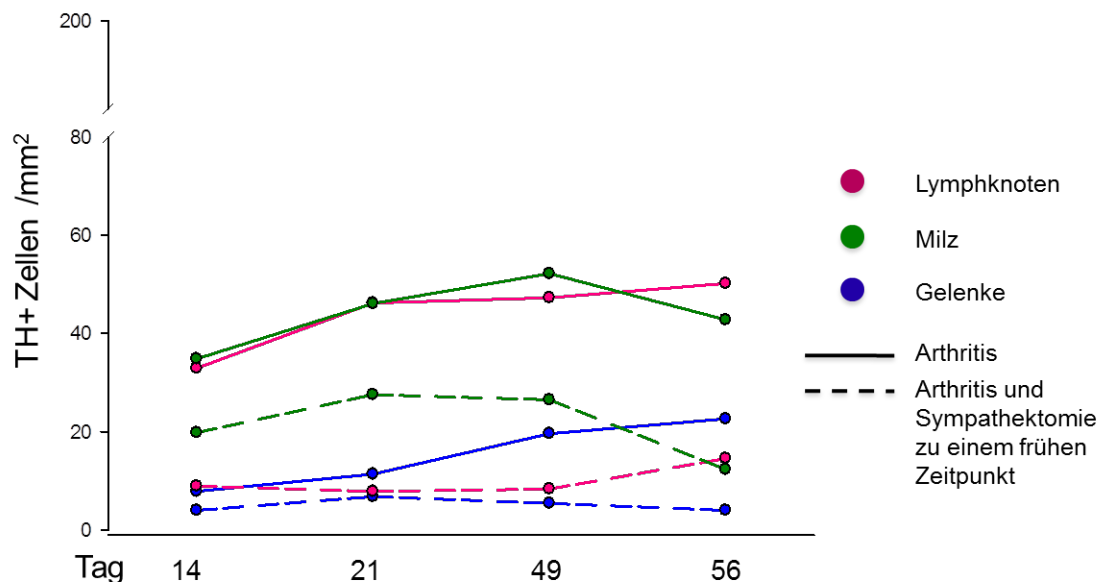


Abb. 12: Mittlere Dichte Tyrosinhydroxylase-positiver (TH+) Zellen in Organen arthritischer Mäuse. Für jeden Zeitpunkt wurden 2 arthritische Mäuse ohne (durchgezogene Linien) und 2 arthritische Mäuse mit Sympathektomie (gestrichelte Linien) ausgewertet. Die X-Achse zeigt den Tag nach Immunisierung.

In allen untersuchten Organen, sowohl in Arthritisproben, als auch in Proben von Kontrollmäusen wurden TH+ Zellen gefunden. Während bei Kontrollmäusen die Anzahl TH+ Zellen in allen Organen relativ konstant blieb, konnte bereits ab Tag 14 eine Zunahme an positiven Zellen in Organen arthritischer Mäuse beobachtet werden (Abb. 12) . Sympathektomie mit 6-OHDA an den Tagen 7, 6 und 5 vor

Arthritisinduktion führte zu einer deutlichen Reduktion der Dichte TH+ Zellen zu allen beobachteten Zeitpunkten (Abb. 12). Nach erfolgter Sympathektomie befand sich die Dichte TH+ Zellen meist nur noch im Bereich der Dichte TH+ Zellen von Kontrollmäusen oder noch niedriger. Sympathektomie bei Kontrollmäusen hatte keinen signifikanten Effekt auf die Dichte TH+ Zellen (nicht gezeigt).

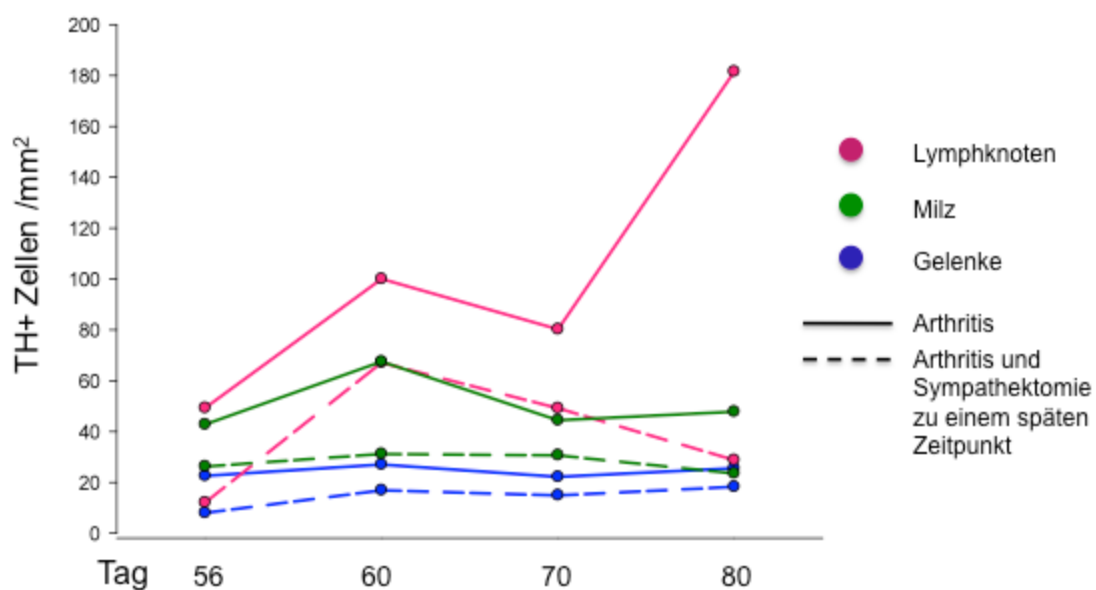


Abb. 13: Mittlere Dichte Tyrosinhydroxylase-positiver (TH+) Zellen in Organen arthritischer Mäuse. Für jeden Zeitpunkt wurden 2 arthritische Mäuse ohne (durchgezogene Linien) und 2 arthritische Mäuse mit Sympathektomie (gestrichelte Linien) ausgewertet. Die X-Achse zeigt den Tag nach Immunisierung.

In der Spätphase der Arthritis wurde die Zunahme an TH+ Zellen noch deutlicher. Eine Sympathektomie, die in dieser Phase stattfand, also an Tag 56, 57 und 58 nach Arthritisinduktion, führte auch hier eindeutig zu einer Abnahme der TH+ Zelldichte (Abb. 13).

Betrachtet man die Ergebnisse der Studie von Härle und Kollegen 2005, nach dessen Beschreibung die Arthritisinduktion und Sympathektomie in der vorliegen-

den Studie durchgeführt wurde, wurden dort durch Zerstörung des sympathischen Nervensystems mit 6-OHDA in der Frühphase verminderte, in der Spätphase der CIA deutlich verstärkte Entzündungsreaktionen beobachtet [49]. Es wurde folglich eine duale Rolle des sympathischen Nervensystems mit proinflammatorischer Wirkung in der Frühphase, sowie antiinflammatorischer Wirkung in der Spätphase der experimentellen Arthritis vermutet. Auch viele andere Studien untersuchten bereits den Einfluss des sympathischen Nervensystems auf das Immunsystem. Zum Teil wurde eine proentzündliche und zum Teil ein antientzündliche Wirkung beschrieben. Gründe für diese gegensätzlichen Ergebnisse gibt es viele, denn zahlreiche Faktoren spielen bei der Betrachtung der Interaktion zwischen Sympathikus und Immunsystem eine Rolle. So kommt es auf den Ort des sympathischen Einflusses, etwa Lymphknoten oder Gelenke [48], an. Außerdem ist der Zeitpunkt im Abstand zur Immunisierung, der betrachtet oder für die Sympathektomie gewählt wird, relevant [49, 67, 68]. Die Krankheitsmodelle, die für Studien verwendet werden, variieren ebenfalls. Da das Immunsystem aus vielen verschiedenen Komponenten besteht, kann die Immunantwort auch sehr vielfältig sein, je nachdem, ob das angeborene oder adaptive Immunsystem [69], Typ 1, Typ 2 oder Typ 17 T-Helfer-Zellen, B-Zellen, oder noch andere Zellen mit unterschiedlicher Rezeptorexpression beteiligt sind [40, 70, 71]. Erschwerend kommt hinzu, dass auch periphere Zellen mit Hilfe von Neurotransmittern das Immunsystem beeinflussen können. So können Zellen des Immunsystems, darunter Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und Phagozyten, Neurotransmitter, zum Beispiel Katecholamine, aufnehmen, speichern und auch produzieren, wodurch Immunreaktionen sowohl über autokrine als auch parakrine Mechanismen beeinflusst werden [63, 64, 72-

74]. Die Rolle solcher Zellen in der Immunantwort ist Gegenstand aktueller medizinischer Forschung [75].

Regulatorische T-Zellen (Tregs) aus humanem Gewebe können Katecholamine produzieren und speichern [76]. Die Behandlung dieser Tregs mit Reserpin, welches das Speichern von Katecholaminen in Vesikeln verhindert und zu einer kurzfristigen Erhöhung der intrazellulären Katecholaminkonzentration führt [77], hatte eine verminderte Produktion von anti-entzündlichem IL 10 und TGF- β zur Folge. Außerdem führte dies zu einer Proliferation der Effektor-T-Zellen, deren Inhibition ebenfalls von Tregs abhängig ist [76]. Demzufolge agieren Katecholamine in einer autokrinen/parakrinen Schleife [76]. Phagozyten sind in der Lage über die Produktion von Katecholaminen Entzündungsreaktionen zu fördern, was erst kürzlich an einem Modell akuten Lungenversagens gezeigt wurde [74]. Diese beiden Studien zeigen immunstimulierende Effekte von katecholaminproduzierenden Zellen. Doch solche Zellen können auch anti-entzündlich wirken. Im Synovialgewebe von RA-Patienten fand man in verschiedenen Studien katecholaminproduzierende TH+ Makrophagen und Fibroblasten [36, 43, 66]. Eine Behandlung solcher synovialer Zellen mit Reserpin bewirkte eine verminderte TNF-Ausschüttung [43]. In CIA-Mäusen, die ebenfalls katecholaminspeichernde synoviale Zellen besaßen, führte die lokale Behandlung mit Reserpin sogar zu einer längerfristigen Verbesserung der *Arthritis Scores* [43]. Dies zeigt, dass diese TH+ synovialen Zellen die Kapazität besitzen, eine entzündungshemmende Wirkung zu entfalten.

In der vorliegenden Studie konnten sowohl in Gelenken von Pfoten als auch in sekundären Lymphorganen arthritischer Mäuse TH+ katecholaminproduzierende Zellen gefunden werden. Diese Zellen waren zum Zeitpunkt der Immunisierung bereits in geringer Dichte vorhanden und nahmen mit Fortschreiten der Erkrän-

kung zu. Die höchste Dichte wurde in der symptomatischen Phase der Arthritis um Tag 60 erreicht. Die Dichte dieser Zellen wurde durch Sympathektomie mit Hilfe von 6-OHDA massiv reduziert. Diese Art der Sympathektomie hat demnach nicht nur eine Zerstörung sympathischer Nervenfasern zur Konsequenz [49], sondern auch die Zerstörung von TH+ Zellen. Aus dieser Erkenntnis und der Tatsache, dass diese Zellen in arthritischem Gewebe, insbesondere auch bei CIA-Mäusen, offenbar antiinflammatorisch wirken können, ergibt sich eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die duale Rolle des sympathischen Nervensystems, wie sie in der Studie von Härle und Kollegen 2005 beschrieben wurde [49]. Sympathektomie in der Frühphase experimenteller Arthritis führte zu einer Abschwächung der Arthritis [49, 51]. In dieser Phase sind noch sympathische Nervenfasern vorhanden, jedoch noch keine besonders hohe Dichte an TH+ Zellen. Die Sympathektomie wirkt dementsprechend hauptsächlich auf die Nervenfasern. Dies lässt eine proinflammatorische Wirkung des Sympathikus in der Frühphase der Arthritis vermuten, wie sie bereits in verschiedenen Studien beschrieben wurde [50, 51]. Sympathektomie in der symptomatischen Spätphase führte zu verstärkten Entzündungsreaktionen [49]. In dieser Phase gibt es jedoch praktisch keine sympathischen Nervenfasern mehr, die zerstört werden könnten, denn diese gehen bei der CIA verloren und erreichen ihr Minimum um Tag 30 - 35 [78]. Während sympathische Nervenfasern verloren gehen, kommt es gleichzeitig zu einem starken Anstieg der Dichte an TH+ Zellen. Man könnte vermuten, dass Nervenfasern durch diese Zellen ersetzt werden, um die lokale Regulation durch Katecholamine zu gewährleisten und dadurch eine Unabhängigkeit der arthritischen Gewebe von zentralen Einflüssen entsteht. Sympathektomie mit 6-OHDA zerstört TH+ Zellen. Man könnte die Erhöhung der *Arthritis Scores* bei Sympathektomie in der Spätphase [49] mit

der Zerstörung dieser Zellen begründen. Dies wäre ein weiterer Hinweis für die antiinflammatorische Wirkung von TH+ Zellen im Arthritisgeschehen.

Es wurden in dieser Studie zwar viele Zeitpunkte in der Früh- und Spätphase der Arthritis betrachtet, aber immer nur 2 Mäuse pro Zeitpunkt und Kategorie verwendet. Je zwei Zeitpunkte wurden anschließend zusammengefasst. Zu allen Zeitpunkten zeigte sich jedoch die gleiche Tendenz und es ergaben sich durchaus signifikante Ergebnisse. In Zukunft werden weitere Studien in vitro und in vivo, am Tiermodell sowie am Menschen notwendig sein, um die antiinflammatorische Wirkung dieser katecholaminproduzierenden Zellen weiter zu untersuchen. Durch Beeinflussung dieser Zellen könnten sich neue Ansätze in der durchaus schwierigen Arthritistherapie ergeben.

5 Zusammenfassung

Die rheumatoide Arthritis ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Gelenke, die relativ viele Menschen betrifft und bisher nicht heilbar ist. Die Pathogenese ist sehr komplex, aber man weiß, dass die Interaktion zwischen Immunsystem und autonomem Nervensystem Bedeutung hat. Diese Interaktion wurde bereits vielfach untersucht und man musste feststellen, dass das sympathische Nervensystem sowohl einen entzündungsfördernden als auch entzündungshemmenden Einfluss nehmen kann. Es wurden außerdem Zellen entdeckt, die Katecholamine produzieren und ebenfalls Einfluss auf das Entzündungsgeschehen in chronisch entzündlichen Erkrankungen nehmen können.

In der vorliegenden Arbeit wurde in sekundären Lymphorganen sowie Gelenken von Mäusen mit Kollagen Typ II-induzierter Arthritis, welche teilweise entweder zu einem frühen oder zu einem späten Zeitpunkt sympathektomiert wurden, die Dichte katecholaminproduzierender TH+ Zellen ermittelt. Es wurde festgestellt, dass die Dichte an TH+ Zellen in allen Organen im Verlauf der Arthritis zunahm, Organe von Kontrollmäusen hatten stets deutlich weniger TH+ Zellen. Durch Sympathektomie wurde die TH+ Zelldichte massiv reduziert, was zu den späten Zeitpunkten noch deutlicher wurde. TH+ Zellen wurden demnach durch Sympathektomie zerstört.

Sympathektomie in der Spätphase der Arthritis hatte in einer vorigen Studie eine Verschlimmerung der Gelenkentzündung zur Folge. Die Sympathektomie erfolgte jedoch zu einem Zeitpunkt, an dem es kaum noch sympathische Nervenfasern gibt, da diese im Verlauf der Arthritis verloren gehen. In der vorliegenden Studie wurde beobachtet, dass katecholaminproduzierende Zellen im Verlauf der Arthritis

zunehmen und diese außerdem durch Sympathektomie zerstört werden. Aus anderen Studien ist bereits bekannt, dass catecholaminproduzierende Zellen bei Arthritis anitnflammatorisch wirken können. Wenn man annimmt, dass die Zerstörung dieser Zellen durch Sympathektomie die Verschlimmerung der Arthritis in der Spätphase bewirkte, wären die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ein weiterer Hinweis dafür, dass catecholaminproduzierende Zellen bei Arthritis antiinflammatorisch wirken.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Spector TD. Rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 1990;16:513-37.
- (2) Symmons DP. Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2002;16:707-22.
- (3) Whalley D, McKenna SP, de Jong Z, van der Heijde D. Quality of life in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1997;36:884-8.
- (4) Puszczewicz M, Iwaszkiewicz C. Role of anti-citrullinated protein antibodies in diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. *Arch Med Sci.* 2011;7:189-94.
- (5) Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62:2569-81.
- (6) Pieringer H, Studnicka-Benke A. What is causing my arthritis, doctor? A glimpse beyond the usual suspects in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *QJM.* 2013;106:219-28.
- (7) Costenbader KH, Feskanich D, Mandl LA, Karlson EW. Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women. *Am J Med.* 2006;119:503 e1-9.
- (8) Balandraud N, Roudier J, Roudier C. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2004;3:362-7.

- (9) Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1987;30:1205-13.
- (10) Michou L, Lasbleiz S, Rat AC, et al. Linkage proof for PTPN22, a rheumatoid arthritis susceptibility gene and a human autoimmunity gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:1649-54.
- (11) Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet.* 2010;42:508-14.
- (12) Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48:2741-9.
- (13) Karouzakis E, Neidhart M, Gay RE, Gay S. Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunol Lett.* 2006;106:8-13.
- (14) Müller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2005;1:102-10.
- (15) Pap T, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000;2:361-7.
- (16) Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2006.

- (17) Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B. Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1996;39:115-24.

- (18) Qu Z, Garcia CH, O'Rourke LM, Planck SR, Kohli M, Rosenbaum JT. Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. Results of proliferating cell nuclear antigen/cyclin, c-myc, and nucleolar organizer region staining. *Arthritis Rheum.* 1994;37:212-20.

- (19) Asahara H, Hasumuna T, Kobata T, et al. Expression of Fas antigen and Fas ligand in the rheumatoid synovial tissue. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996;81:27-34.

- (20) Baier A, Meineckel I, Gay S, Pap T. Apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2003;15:274-9.

- (21) Pap T, Meinecke I, Müller-Ladner U, Gay S. Are fibroblasts involved in joint destruction? *Ann Rheum Dis.* 2005;64 Suppl 4:iv52-4.

- (22) Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, et al. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol.* 1996;149:1607-15.

- (23) Lefevre S, Knedla A, Tennie C, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med.* 2009;15:1414-20.

- (24) Gabay C, Marinova-Mutafchieva L, Williams RO, et al. Increased production of intracellular interleukin-1 receptor antagonist type I in the synovium of mice with collagen-induced arthritis: a possible role in the resolution of arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001;44:451-62.

- (25) Miossec P. Pro- and antiinflammatory cytokine balance in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 1995;13 Suppl 12:S13-6.
- (26) Bingham CO, 3rd. Emerging therapeutics for rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2008;66:210-5.
- (27) Klareskog L, van der Heijde D, de Jager JP, et al. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet*. 2004;363:675-81.
- (28) Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, et al. Study of active controlled tocilizumab monotherapy for rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate (SATORI): significant reduction in disease activity and serum vascular endothelial growth factor by IL-6 receptor inhibition therapy. *Mod Rheumatol*. 2009;19:12-9.
- (29) Holmdahl R, Andersson ME, Goldschmidt TJ, et al. Collagen induced arthritis as an experimental model for rheumatoid arthritis. *Immunogenetics, pathogenesis and autoimmunity*. *APMIS*. 1989;97:575-84.
- (30) Bendele A. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2001;1:377-85.
- (31) Williams RO. Collagen-induced arthritis as a model for rheumatoid arthritis. *Methods Mol Med*. 2004;98:207-16.
- (32) Straub RH, Westermann J, Schölmerich J, Falk W. Dialogue between the CNS and the immune system in lymphoid organs. *Immunol Today*. 1998;19:409-13.

- (33) Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med.* 1995;332:1351-62.
- (34) Besedovsky HO, del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 1996;17:64-102.
- (35) Masi AT, Bijlsma JW, Chikanza IC, Pitzalis C, Cutolo M. Neuroendocrine, immunologic, and microvascular systems interactions in rheumatoid arthritis: physiopathogenetic and therapeutic perspectives. *Semin Arthritis Rheum.* 1999;29:65-81.
- (36) Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J.* 2000;14:2097-107.
- (37) Straub RH, Cutolo M. Involvement of the hypothalamic--pituitary--adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role. *Arthritis Rheum.* 2001;44:493-507.
- (38) Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev.* 2000;52:595-638.
- (39) Dahlström A. Sympathetic Nervous System. In: Larry RS ed. *Encyclopedia of Neuroscience.* Academic Press, Oxford 2009, S. 663-71.
- (40) Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress system - organization, physiology and immunoregulation. *Neuroimmunomodulation.* 2006;13:257-67.

- (41) Felten DL, Felten SY, Bellinger DL, et al. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol Rev.* 1987;100:225-60.
- (42) Kuhar MJ, Couceyro PJ, Lambert PD. Catecholamines. In: Siegel G, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD (Hrsg.). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* Lippincott-Raven, Philadelphia, 1999, S. 244-59.
- (43) Capellino S, Cosentino M, Wolff C, Schmidt M, Grifka J, Straub RH. Catecholamine-producing cells in the synovial tissue during arthritis: modulation of sympathetic neurotransmitters as new therapeutic target. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:1853-60.
- (44) Mahata SK, Mahata M, Fischer-Colbrie R, Winkler H. Vesicle monoamine transporters 1 and 2: differential distribution and regulation of their mRNAs in chromaffin and ganglion cells of rat adrenal medulla. *Neurosci Lett.* 1993;156:70-2.
- (45) Erickson JD, Schafer MK, Bonner TI, Eiden LE, Weihe E. Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:5166-71.
- (46) Selye H, Fortier C. Adaptive reactions to stress. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.* 1949;29:3-18.
- (47) Levine JD, Goetzl EJ, Basbaum AI. Contribution of the nervous system to the pathophysiology of rheumatoid arthritis and other polyarthritides. *Rheum Dis Clin North Am.* 1987;13:369-83.

- (48) Lorton D, Lubahn C, Klein N, Schaller J, Bellinger DL. Dual role for noradrenergic innervation of lymphoid tissue and arthritic joints in adjuvant-induced arthritis. *Brain Behav Immun.* 1999;13:315-34.
- (49) Härle P, Möbius D, Carr DJ, Schölmerich J, Straub RH. 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.* 2005;52:1305-13.
- (50) Levine JD, Dardick SJ, Roizen MF, Helms C, Basbaum AI. Contribution of sensory afferents and sympathetic efferents to joint injury in experimental arthritis. *J Neurosci.* 1986;6:3423-9.
- (51) Härle P, Pongratz G, Albrecht J, Turner IH, Straub RH. An early sympathetic nervous system influence exacerbates collagen-induced arthritis via CD4+CD25+ cells. *Arthritis Rheum.* 2008;58:2347-55.
- (52) Straub RH, Grum F, Strauch U, et al. Anti-inflammatory role of sympathetic nerves in chronic intestinal inflammation. *Gut.* 2008;57:911-21.
- (53) Rose FR, Hirschhorn R, Weissmann G, Cronstein BN. Adenosine promotes neutrophil chemotaxis. *J Exp Med.* 1988;167:1186-94.
- (54) Schedlowski M, Hosch W, Oberbeck R, et al. Catecholamines modulate human NK cell circulation and function via spleen-independent beta 2-adrenergic mechanisms. *J Immunol.* 1996;156:93-9.
- (55) Straub RH, Mayer M, Kreutz M, Leeb S, Schölmerich J, Falk W. Neurotransmitters of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractants for monocytes. *J Leukoc Biol.* 2000;67:553-8.

- (56) Kavelaars A, van de Pol M, Zijlstra J, Heijnen CJ. Beta 2-adrenergic activation enhances interleukin-8 production by human monocytes. *J Neuroimmunol.* 1997;77:211-6.
- (57) Spengler RN, Chensue SW, Giacherio DA, Blenk N, Kunkel SL. Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor-alpha production from macrophages in vitro. *J Immunol.* 1994;152:3024-31.
- (58) Malfait AM, Malik AS, Marinova-Mutafchieva L, Butler DM, Maini RN, Feldmann M. The beta2-adrenergic agonist salbutamol is a potent suppressor of established collagen-induced arthritis: mechanisms of action. *J Immunol.* 1999;162:6278-83.
- (59) Spengler RN, Allen RM, Remick DG, Strieter RM, Kunkel SL. Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1990;145:1430-4.
- (60) Heijnen CJ, Rouppe van der Voort C, Wulffraat N, van der Net J, Kuis W, Kavelaars A. Functional alpha 1-adrenergic receptors on leukocytes of patients with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *J Neuroimmunol.* 1996;71:223-6.
- (61) Koeck FX, Bobrik V, Fassold A, Grifka J, Kessler S, Straub RH. Marked loss of sympathetic nerve fibers in chronic Charcot foot of diabetic origin compared to ankle joint osteoarthritis. *J Orthop Res.* 2009;27:736-41.
- (62) Weidler C, Holzer C, Harbuz M, et al. Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:13-20.

- (63) Bergquist J, Tarkowski A, Ekman R, Ewing A. Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:12912-6.
- (64) Musso NR, Brenci S, Setti M, Indiveri F, Lotti G. Catecholamine content and in vitro catecholamine synthesis in peripheral human lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:3553-7.
- (65) Cosentino M, Zaffaroni M, Marino F, et al. Catecholamine production and tyrosine hydroxylase expression in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients: effect of cell stimulation and possible relevance for activation-induced apoptosis. *J Neuroimmunol.* 2002;133:233-40.
- (66) Miller LE, Grifka J, Schölmerich J, Straub RH. Norepinephrine from synovial tyrosine hydroxylase positive cells is a strong indicator of synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2002;29:427-35.
- (67) Lorton D, Bellinger D, Duclos M, Felten SY, Felten DL. Application of 6-hydroxydopamine into the fatpads surrounding the draining lymph nodes exacerbates adjuvant-induced arthritis. *J Neuroimmunol.* 1996;64:103-13.
- (68) Esquifino AI, Castrillon PO, Chacon F, Cutrera R, Cardinali DP. Effect of local sympathectomy on 24-h changes in mitogenic responses and lymphocyte subset populations in rat submaxillary lymph nodes during the preclinical phase of Freund's adjuvant arthritis. *Brain Res.* 2001;888:227-34.
- (69) Rice PA, Boehm GW, Moynihan JA, Bellinger DL, Stevens SY. Chemical sympathectomy increases the innate immune response and decreases the

specific immune response in the spleen to infection with *Listeria monocytogenes*. *J Neuroimmunol*. 2001;114:19-27.

- (70) McAlees JW, Smith LT, Erbe RS, Jarjoura D, Ponzio NM, Sanders VM. Epigenetic regulation of beta2-adrenergic receptor expression in T(H)1 and T(H)2 cells. *Brain Behav Immun*. 2011;25:408-15.
- (71) Ernst PB, Garrison JC, Thompson LF. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. *J Immunol*. 2010;185:1993-8.
- (72) Cosentino M, Marino F, Bombelli R, Ferrari M, Lecchini S, Frigo G. Endogenous catecholamine synthesis, metabolism, storage and uptake in human neutrophils. *Life Sci*. 1999;64:975-81.
- (73) Marino F, Cosentino M, Bombelli R, Ferrari M, Lecchini S, Frigo G. Endogenous catecholamine synthesis, metabolism storage, and uptake in human peripheral blood mononuclear cells. *Exp Hematol*. 1999;27:489-95.
- (74) Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, et al. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature*. 2007;449:721-5.
- (75) Franco R, Pacheco R, Lluís C, Ahern GP, O'Connell PJ. The emergence of neurotransmitters as immune modulators. *Trends Immunol*. 2007;28:400-7.
- (76) Cosentino M, Fietta AM, Ferrari M, et al. Human CD4+CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. *Blood*. 2007;109:632-42.

- (77) Lundborg P. Effect of reserpine on the subcellular distribution of 3H-alpha-methylnoradrenaline in the mouse heart. *Br J Pharmacol.* 1969;36:386-92.
- (78) Straub RH, Rauch L, Fassold A, Lowin T, Pongratz G. Neuronally released sympathetic neurotransmitters stimulate splenic interferon-gamma secretion from T cells in early type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58:3450-60.

7 Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rainer H. Straub für die Überlassung des interessanten Themas und die freundliche und ergiebige Unterstützung danken.

Frau Dr. Silvia Capellino, meiner Betreuerin, gebührt mein besonderer Dank für ihr Engagement, die freundschaftliche Zusammenarbeit, die großartige Vorbereitung und Einarbeitung, viele hilfreiche Anregungen und Ratschläge, sowie ihre Geduld und ihre Zeit.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeitern des Labors, die jederzeit bereit waren zu helfen und für eine angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten; insbesondere danke ich Frau Luise Rauch und Frau Dr. Christine Wolff.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. Kristina Weber für die freundliche Erlaubnis der Mitbenutzung ihrer Mäuseorgane danken, so dass nicht unnötig Tierexperimente stattfinden mussten.

Auch möchte ich meinen lieben Eltern danken, deren Unterstützung mein Studium und diese Arbeit erst ermöglichten.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meinem Freund Jerome, dessen Geduld, Motivation und aufmunternde Worte einen großen Beitrag zur Fertigstellung dieser Arbeit leisteten.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Magdalena Gelder
Geburtsdatum: 06. April 1987
Geburtsort: Wien
Familienstand: ledig

Schulbildung

09/1993 - 07/1998 Grundschule der Europäischen Schule München
09/1998 - 07/2005 Höhere Schule der Europäischen Schule München
07/2005 Abitur

Studium

10/2006 - 11/2012 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
09/2008 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2012 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12/2012 Approbation als Ärztin

Berufstätigkeit

seit 03/2013 Assistenzärztin für Neurologie an der Schön Klinik Bad Aibling

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Bad Aibling, März 2014

Magdalena Gelder

10 Publikation

First Appearance and Location of Catecholaminergic Cells during Experimental Arthritis and Elimination by Chemical Sympathectomy

Silvia Capellino*, Kristina Weber*, Magdalena Gelder*, Peter Härle, und Rainer H. Straub

*geteilte Erstautorenschaft

ARTHRITIS & RHEUMATISM, Bd. 64, Nr. 4, April 2012, S. 1110–1118