

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MARTINA MÜLLER-SCHILLING
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*EINFLUSS VON TUMORNEKROSEFAKTOR AUF TYROSINHYDROXYLASE-POSITIVE
ZELLEN BEI PATIENTEN MIT RHEUMATOIDER ARTHRITIS*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Markus Herrmann

im Jahr 2018

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MARTINA MÜLLER-SCHILLING
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*EINFLUSS VON TUMORNEKROSEFAKTOR AUF TYROSINHYDROXYLASE-POSITIVE
ZELLEN BEI PATIENTEN MIT RHEUMATOIDER ARTHRITIS*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Markus Herrmann

im Jahr 2018

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Rainer H. Straub
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Joachim Grifka
Tag der mündlichen Prüfung:	10.10.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis
Abkürzungsverzeichnis

1.	Einleitung.....	4
2.	Hypothese und Zielsetzung der Studie	7
3.	Patienten, Material und Methoden	8
3.1	Patienten	8
3.2	Isolation und Klassifizierung von adipösen mesenchymalen Stammzellen aus Synovialgewebe.....	9
3.3	Herstellung induzierter Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen	12
3.4	Zellkultur gemischter Synovialzellen	13
3.5	Immunfluoreszenz	14
3.6	Quantifizierung von Noradrenalin mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	16
3.7	LDH-Assay zur Evaluation der Zellviabilität	16
3.8	Datenauswertung und Statistik	17
4.	Ergebnisse.....	18
4.1	Effekt von TNF auf die Zellmorphologie katecholaminerg differenzierter Zellen	18
4.2	Wirkung von Tumornekrosefaktor auf katecholaminerge Differenzierungsmarker induzierter Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen.....	21
4.3	Einfluss von TNF auf die Noradrenalinsekretion während der katecholaminergen Differenzierung	25
4.4	Effekt von Synovialflüssigkeit auf die Katecholaminfreisetzung während der Differenzierung Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen	25
4.5	Wirkung von TNF auf die Katecholamin-Freisetzung gemischter Synovialzellen	26
4.6	Auswirkung von TNF und Synovialflüssigkeit auf die Zellviabilität.....	28
5.	Diskussion	30
6.	Zusammenfassung	34
7.	Literaturverzeichnis.....	35

8.	Danksagung	41
9.	Lebenslauf	42
10.	Originalarbeit	44

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AR	Adrenozeptor
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPS	idiopathisches Parkinson-Syndrom
iTH+ Zellen	induzierte Tyrosinhydroxylase-positive Zellen
KAT	Katecholamine
LDH	Laktatdehydrogenase
MSC	mesenchymale Stammzellen
NA	Noradrenalin
NURR1	<i>nuclear receptor related-1 protein</i>
OA	Osteoarthritis
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
RA	Rheumatoide Arthritis
sASC	synoviale adipöse mesenchymale Stammzellen
SF	Synovialflüssigkeit
SNS	sympathisches Nervensystem
TH+	Tyrosinhydroxylase-positiv
TNF	Tumornekrosefaktor
VMAT2	vesikulärer Monoamintransporter 2

1. Einleitung

Neben der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse wirkt das sympathische Nervensystem (SNS) verschiedenartig auf das Immunsystem, dessen Adrenozeptoren (AR)-tragende Zellen, inflammatorische Mediatoren, primäre und sekundäre lymphatische Organe und damit auch auf die rheumatoide Arthritis (RA) ein (1,2). Je nach Art und Zeitpunkt der Immunantwort, beteiligten Zell- und AR-Typen und untersuchtem Krankheitsmodell zeigen sich hierbei unterschiedliche, teils gegensätzliche Befunde zur Wirkungsweise des SNS (2,3). Die durch das SNS sezernierten Katecholamine (KAT) – insbesondere Noradrenalin (NA) – wirken je nach Konzentration und gebundenem AR-Typ pro- oder antiinflammatorisch (2,4). Hinzu kommt, dass diese KAT auch durch periphere Zellen wie Leukozyten oder sich differenzierende Tyrosinhydroxylase-positive (TH⁺) Zellen (3) ausgeschüttet werden können, wodurch die Aktivität des zellulären Umfelds auto- und parakrin beeinflusst wird (5). Voraussetzung zur Katecholaminbiosynthese ist dabei u.a. die Enzymausstattung mit TH, welche den geschwindigkeitslimitierenden Schritt der Synthese – Hydroxylierung von L-Tyrosin zu L-DOPA – katalysiert.

In der asymptomatischen Frühphase der RA werden durch sympathische Nervenfasern proinflammatorische Vorgänge wie Vasodilatation, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Chemotaxis von Leukozyten, Leukodiapedese und Verschiebung des Zytokinprofils in drainierenden Lymphknoten stimuliert (6). Des Weiteren zeigten sich eine verstärkte Th1- und Th17-Lymphozyten-Immunantwort in der frühen adjuvanten Arthritis (7) sowie erhöhte CD4⁺- und CD25⁺-Zellaktivität in der Kollagen-induzierten Arthritis (8) als frühe sympathisch vermittelte proinflammatorische Einflüsse. Aufgrund der höheren Affinität von α -AR zu KAT bindet NA bereits in geringen Konzentrationen von 10^{-7} bis 10^{-9} M bevorzugt an jene α -AR und wirkt so proinflammatorisch (2).

Im weiteren Verlauf der RA und deren Übergang in ein symptomatisches chronisch-inflammatorisches Stadium erfolgt über den lokalen selektiven Untergang sympathischer Nervenfasern in entzündeter Synovia eine Entkopplung des zentralen SNS von der Inflammation und damit eine Entstehung von Zonen „tolerierter Inflammation“ (9). Möglicherweise zur Kompensation des resultierenden lokalen Mangels an KAT wurde eine Ansammlung TH⁺ Zellen im Synovialgewebe von Osteoarthritis (OA)- und RA-Patienten sowie bei Mäusen mit Kollagen II-induzierter Arthritis beobachtet (3,10,11). Innerhalb der Population dieser TH⁺ Zellen in RA- und OA-Synovialgewebe wurden verschiedene Zelltypen wie B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Fibroblasten identifiziert (10). In einer Zellkultur dieser gemischten Synovialzellen aus RA-Patienten lag der Anteil der TH⁺ Zellen in einer früheren Studie bei ca. 10-20 % (10). Es besteht jedoch ebenfalls die Möglichkeit, dass sich aus in Synovialflüssigkeit und -membran vorhandenen mesenchymalen Stammzellen (12,13) katecholaminerge TH⁺

Zellen differenzieren. Hierfür spricht die Tatsache, dass im chronisch-entzündlichen Gelenkmilieu das Neurotrophin *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) nachgewiesen wurde, welches die Differenzierung zum neuronalen katecholaminergen Phänotyp antreibt (14,15). Auch *in vitro* wurden bereits aus synovialen adipösen mesenchymalen Stammzellen (sASC) Sympathikusneuronen-ähnliche TH⁺ Zellen (iTH⁺ Zellen) differenziert (11,16–18).

In der symptomatischen Spätphase der RA kann das von TH⁺ Zellen sezernierte NA in höheren Konzentrationen um 10^{-5} M über β -AR und zytosolische cAMP-Erhöhung entzündungshemmende Wirkung vermitteln (2,4). Der antiinflammatorische Charakter neu entstehender TH⁺ Zellen in OA- und RA-Patienten konnte *in vivo* durch Transfer von generierten TH⁺ Zellen in Kollagen II-induzierte Arthritis im Mausmodell demonstriert werden (11). Hypothetisch ist durch diese dichotome, durch α - und β -AR auf Immunzellen gesteuerte Modulation der Immunantwort eine Isolierung von Zonen tolerierter Inflammation (Untergang sympathischer Nervenfasern) bei gleichzeitiger örtlicher Begrenzung der Entzündungsaktivität (TH⁺ Zellen) möglich (2,4). Ungeklärt ist bislang, inwiefern das entzündliche Gelenkmilieu eines RA-Patienten die neu entstehenden TH⁺ Zellen in ihrer antiinflammatorischen Wirkung beeinträchtigt.

Für den in RA und vielen weiteren chronisch-inflammatorischen Erkrankungen grundlegenden Entzündungsmediator Tumornekrosefaktor (TNF) ist eine Beteiligung an verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen bekannt. So zeigte sich nach Deletion des Gens für den TNF-Rezeptor Typ1 im transgenen Mausmodell eine reduzierte Amyloid- β -Bildung und verringerte Amyloid- β -Plaques-Formation, was auf eine Schlüsselrolle des TNF-Rezeptors Typ1 für die Neurodegeneration bei Alzheimer-Demenz hindeutet (19). Patienten mit einer Depression in der Vorgeschichte zeigen höhere Plasmakonzentrationen des löslichen p55- sowie p75-TNF-Rezeptors, bei Vorliegen einer akuten depressiven Episode des Weiteren erhöhte TNF-Plasmakonzentrationen (20).

Eine besondere Relevanz für das vorliegende Krankheitsmodell der RA hat das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS), da es hierbei durch chronische neuroinflammatorische Vorgänge zum Untergang dopaminerger, TH⁺ Neurone in der *Substantia Nigra* und im *Locus coeruleus* kommt. Hierbei führt die Neutralisation von löslichem TNF mittels einer dominant-negativen Mutation zu einer deutlichen Reduktion der durch 6-Hydroxydopamin und Lipopolysaccharid induzierten TNF-abhängigen striatonigralen Degeneration dopaminerger Neurone in einem Rattenmodell des IPS (21). In einem Tiermodell des IPS zeichneten sich transgene Mäuse, welche zentral TNF- α überexprimierten durch eine verminderte TH-Immunfluoreszenzfärbung im Striatum und dorsomedialen Hypothalamus aus (22). Weiterhin konnte in einem Rattenmodell des IPS ein zeitabhängiger Wirkeffekt des TNF bei striataler Schädigung gefunden werden: In den frühen Phasen dopaminerger Läsionen wirkte TNF neuroprotektiv, bei späterer und anhaltender Sekretion dagegen toxisch auf katecholaminerge Neurone (23). Diese verschiedenartigen Effekte von TNF auf TH⁺ Neurone wurden ebenfalls *in vitro* bestätigt (24–27).

Entsprechend stellte sich für die vorliegende Studie die Frage, inwiefern TNF-Hemmung die TH-Aktivität und KAT-Produktion der neu entstehenden TH⁺ Zellen im rheumatoid veränderten Synovium beeinflusst. Wenn TNF die TH-Expression und -Aktivität hemmt, wäre das aufgrund der antiinflammatorischen Wirkung von Noradrenalin in hohen Konzentrationen via β -AR ein klinisch relevantes proinflammatorisches Signal in RA.

Die Hemmung der TNF-Wirkung vor allem mittels rekombinanter TNF-Rezeptorproteine ist eine bereits länger etablierte Therapieoption für Patienten mit chronisch-inflammatorischen Erkrankungen wie RA, ankylosierende Spondylitis, Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa sowie Psoriasis (28,29). Zu den zahlreichen in den letzten 10 Jahren entwickelten TNF-Blockern zählt auch Etanercept, welches ein gentechnisch hergestelltes Fusionsprotein aus zwei identischen TNF-Rezeptor Typ2 Extrazellulärdomänen sowie dem Fc-Fragment eines menschlichen IgG1-Antikörpers darstellt und neben Lymphotoxin α auch TNF-Homotrimer zweizählig im Verhältnis 1:1 bindet (30,31).

Ein dem Etanercept verwandter TNF-Blocker mit der Fähigkeit zur Überwindung der Blut-Hirnschranke zeigte in einem 6-Hydroxydopamin-induzierten IPS-Modell in Mäusen neuroprotektive Eigenschaften mit Steigerung der striatalen TH-Aktivität (32). Da TNF ein entscheidender proinflammatorischer Stimulus ab der Frühphase der RA ist, bewirken TNF-Blocker in der Kollagen-II-induzierten Arthritis bei Gabe vor klinischem Erkrankungsbeginn eine reduzierte Gelenkschwellung und einen histologisch milderen Krankheitsverlauf sowie bei Gabe nach Symptombeginn geringere Arthritis-Scores (33–35).

Auch bei der Behandlung der RA des Menschen verringert Etanercept die Krankheitsaktivität, verbessert die Gelenkbeweglichkeit und reduziert die Mortalität (36). Da TNF *in vivo* unidirektional IL-1 (insbesondere IL-1 β) sowie IL-6/8 induziert und IL-1 wiederum die Sekretion von IL-6 sowie IL-8 steigert, ist die klinische Wirksamkeit von TNF-Hemmern durch mehr als eine isolierte TNF-Neutralisation zu erklären (37,38). Eine Betrachtung des Effekts von Etanercept und wirkähnlichen Substanzen auf antiinflammatorische, TH⁺, KAT-produzierende Zellen in der RA ist bisher jedoch noch nicht erfolgt.

Eine weitere Variable für den Einfluss katecholaminerger Zellen in der RA ist der lokale Sauerstoff-Partialdruck, da die TH bei Hypoxie vermehrt exprimiert wird (11). Der Großteil der bisher zu TNF-Inhibitoren und TH-Aktivität durchgeführten Studien war dabei auf normoxische Bedingungen beschränkt. In lediglich einer Studie zur Interaktion zwischen Signalwegen der Inflammation und der Hypoxie konnte eine Suppression Hypoxie-induzierter-Faktor 1-abhängiger Gene wie Tyrosinhydroxylase durch TNF in PC12-Zellen aus Ratten festgestellt werden (39). Angesichts dieser Interaktionen und der Tatsache, dass das inflammatorische synoviale Milieu bei RA von Hypoxie begleitet ist (39,40), ergab sich für die vorliegende Studie die Notwendigkeit, hypoxische Zellkulturbedingungen (1 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C) einzusetzen.

2. Hypothese und Zielsetzung der Studie

In Zusammenschau der oben genannten Punkte stellen wir die Hypothese auf, dass TNF ebenfalls die Funktion neu auftretender katecholaminerger TH⁺ Zellen in der chronisch-entzündlich veränderten Synovialmembran und -flüssigkeit von RA-Patienten hemmt. Die klinische Wirksamkeit von TNF-Blockern wie Etanercept könnte so durch einen weiteren Wirkmechanismus, nämlich Normalisierung der TH-Expression sowie -Aktivität und dadurch gesteigerte Noradrenalinsynthese mit vermehrter Aktivierung von β -AR erklärt werden. Ferner könnten - bei Nachweis einer erfolgreichen katecholaminergen Differenzierung von sASC – die gewonnenen iTH⁺ Zellen unter Kenntnis wirkungslimitierender Faktoren zur lokalen antiinflammatorischen Zelltherapie bei RA eingesetzt werden.

Das Ziel der Studie bestand darin, mittels aus sASC differenzierter iTH⁺ Zellen und gemischter Synoviozyten TH-inhibitorische Effekte von TNF und die Reversibilität dieser TNF-Wirkung durch Etanercept zu untersuchen.

3. Patienten, Material und Methoden

3.1 Patienten

Bei Patienten mit OA und RA wurde während einer Kniegelenkersatz-Operation Synovialgewebe und -flüssigkeit entnommen (Patientendaten siehe Tab. 1). Die Diagnosestellung der RA erfolgte nach den überarbeiteten Kriterien des *American College of Rheumatology* (41). Teilnehmende Patienten wurden über den Zweck der Studie aufgeklärt und gaben eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Das Projekt erhielt die Zustimmung der Ethikkommission der Universität Regensburg (Antragsnummer 13-101-0135).

Tabelle 1 Klinische Parameter der Studienpatienten. Die Daten sind als arithmetischer Mittelwert \pm SEM angegeben. Prozentwerte sind in runden Klammern, die Spannweite der Werte in eckigen Klammern dargestellt.

	Osteoarthritis	Rheumatoide Arthritis
Patientenzahl	24	16
Alter in Jahren	70,5 \pm 9,1 [44-81]	65,1 \pm 8,8 [51-82]
Frauen / Männer, n (%)	15 / 9 (62,5 / 37,5)	10 / 6 (62,5 / 37,5)
C-reaktives Protein in mg/l	1,8 \pm 1,8	5,9 \pm 6,1
Medikation		
Tägliche Prednisolondosis in mg	0 (0)	6,05 \pm 4,8
Patienten mit Prednisolon, n (%)	n.a.	11 (68,8)
Methotrexat, n (%)	n.a.	6 (37,5)
Leflunomid, n (%)	n.a.	2 (12,5)
Sulfasalazin, n (%)	n.a.	0 (0)
Hydroxychloroquin, n (%)	n.a.	0 (0)
Nichtsteroidale Antirheumatika, n (%)	24 (100)	16 (100)
Opioidanalgetika, n (%)	2 (8,3)	4 (25)
Biologika, n (%)	n.a.	1 (6,1)

Abkürzung: n.a., nicht anwendbar.

3.2 Isolation und Klassifizierung von adipösen mesenchymalen Stammzellen aus Synovialgewebe

Während einer Kniegelenkersatz-Operation wurde menschliches synoviales Fettgewebe von Patienten mit OA und RA entnommen. In Anlehnung an Estes et al. (42) sowie Skalska et al. (43) wurden adipöse mesenchymale Stammzellen aus Synovialgewebe (sASC) isoliert. Die isolierten sASCs wurden anschließend in sASC-Expansionsmedium (Tab. 2) bei Normoxie (21 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C) inkubiert.

Tabelle 2 Zusammensetzung des sASC-Expansionsmediums.

Komponente	Bezugsquelle	Volumenanteil/Konzentration im Medium
DMEM/ F12 100 %	Thermo Fisher Scientific, USA	89 %
MSC fetal bovine serum 100 %	Thermo Fisher Scientific, USA	10 %
Human epidermal growth factor 50 µg/ml	PeproTech, England	5 ng/ ml
Basic human fibroblast growth factor 10µg/ml	PeproTech, England	1 ng/ ml
Transforming growth factor β1 10 µg/ml	R&D Systems, USA	0,25 ng/ml
Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin B 100x	Thermo Fisher Scientific, USA	100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin 250 ng/ml Amphotericin B

Abkürzungen: DMEM/ F12, *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*

MSC, *mesenchymal stem cells*

Die isolierten Zellen wurden nach den von Dominici et al. postulierten Minimal Kriterien für die Identifizierung multipotenter mesenchymaler Stromazellen beurteilt. Zu den geforderten Charakteristika zählen neben der Adhärenz an Plastikoberflächen in Zellkulturgefäßen und möglicher *in vitro* Differenzierung zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten auch ein spezielles Profil von Oberflächenmarkern (CD, *cluster of differentiation*) (44). Wie vorgeschrieben waren bei den RA und OA sASCs CD105, CD90 und CD73 vorhanden; CD45, CD34, CD11b, CD19 und HLA-DR dagegen negativ. Zur Beurteilung mittels *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) wurden die kultivierten sASCs mittels Accutase abgelöst, mit 5 ml kaltem

phosphate buffered saline (PBS) gewaschen, 8 min bei 1500 U/min abzentrifugiert und anschließend pro Gruppe 10^6 Zellen (in 100 μ l PBS) in ein FACS-geeignetes Polystyrolröhrchen gegeben. Schließlich erfolgte die Inkubation mit den in Tabelle 3 aufgeführten Antikörpern.

Tabelle 3 Zur sASC-Klassifikation mittels FACS verwendete Antikörper. Angegeben sind die Katalognummer und die Klonnummer der zur Herstellung verwendeten monoklonalen Zelllinie der Bezugsquelle Affymetrix/ e-bioscience, USA sowie das konjugierte Fluorochrom, die Antikörper-Konzentration in der gemessenen Lösung und der entsprechende Isotyp-Kontrollantikörper.

Antikörper	Katalognummer	Fluorochrom	Konzentration	Isotyp
CD11b Klon: ICRF44	11-0118-41	FITC	0,5 μ g/100 μ l	Mouse IgG1 κ FITC
CD19 Klon: HIB19	12-0199-41	PE	0,25 μ g/100 μ l	Mouse IgG1 κ PE
CD34 Klon: 4H11	12-0349-41	PE	0,5 μ g/ 100 μ l	Mouse IgG1 κ PE
CD45 Klon: HI30	11-0459-41	FITC	0,25 μ g/100 μ l	Mouse IgG1 κ FITC
CD73 Klon: AD2	11-0739-41	FITC	0,25 μ g/100 μ l	Mouse IgG1 κ FITC
CD90 Klon: eBio5E10	12-0909-41	PE	0,25 μ g/100 μ l	Mouse IgG1 κ PE
CD105 Klon: SN6	12-1057-41	PE	1 μ g/100 μ l	Mouse IgG1 κ PE
HLA-DR Klon: L243	11-9952-41	FITC	0,06 μ g/100 μ l	Mouse IgG1 κ FITC
Mouse IgG1 κ Klon: P3.6.2.8.1	11-4714-41	FITC	1 μ g/100 μ l	n.a.
Mouse IgG1 κ Klon: P3.6.2.8.1	12-4714-41	PE	0,5 μ g/100 μ l	n.a.
Mouse IgG2a κ Klon: eBM2a	11-4724-41	FITC	1 μ g/100 μ l	n.a.

Abkürzungen: n.a., nicht anwendbar

CD, *cluster of differentiation*

FITC, Fluoresceinisothiocyanat

PE, Phycoerythrin

Auf die Antikörper-Inkubation (30 Minuten auf Eis bei Dunkelheit) folgte zweimaliges Waschen mit jeweils 1 ml kaltem 1 x PBS und die Aufnahme in 300 µl 1 x PBS zur Bestimmung am Durchflusszytometer. Zur Auswertung siehe Abbildung 1.

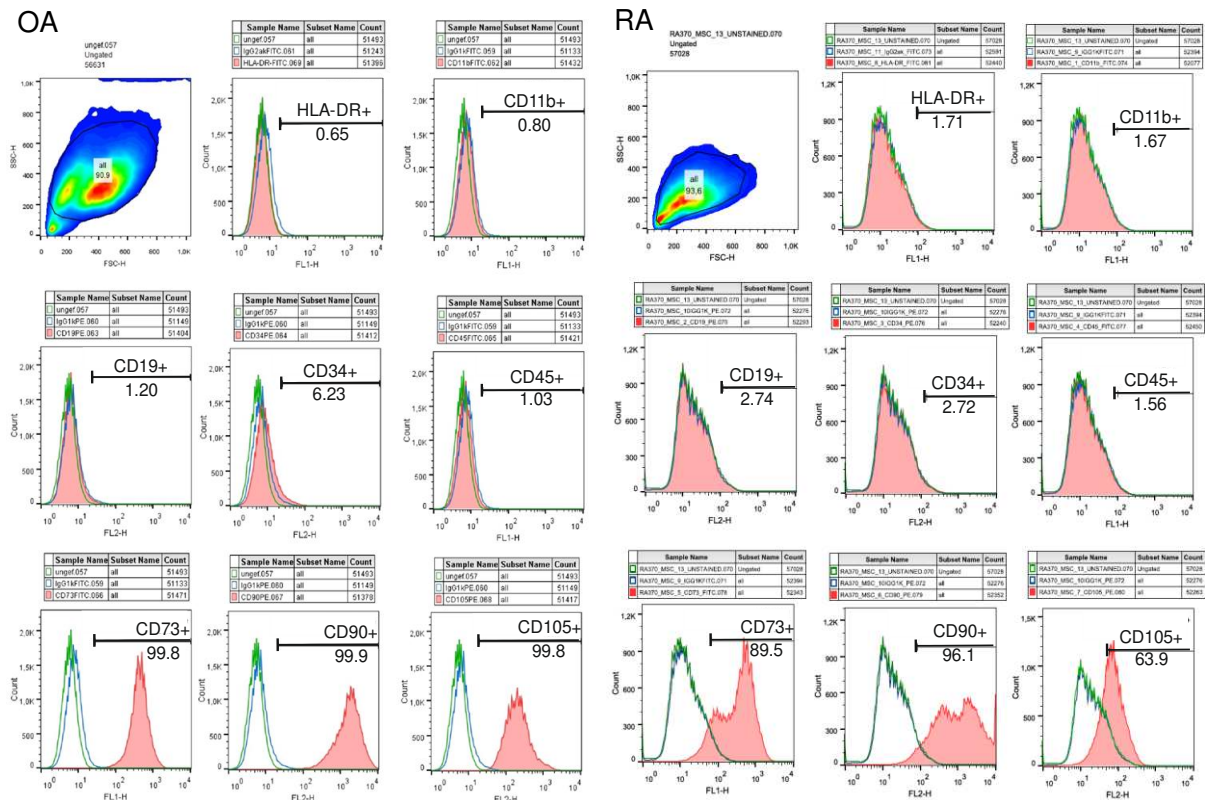


Abbildung 1 Nachweis spezifischer Oberflächenantigene der aus OA- und RA-Patienten isolierten sASCs. Exemplarisch sind die FACS-Daten einer OA- und einer RA-Stichprobe dargestellt. Die rote Kurve gibt die kumulative Zellzahl der für den angegebenen Zieloberflächenmarker positiven Zellen an. Die grüne Kurve zeigt die ungefärbte Negativkontrolle, die blaue Kurve den Antikörper-Isotyp. Entsprechend Dominici et al. waren CD73, CD90 und CD105 positiv, die Oberflächenmarker HLA-DR, CD11b, CD19, CD34 und CD45 waren negativ (44). In der ersten Abbildung links oben für OA und RA jeweils der aufgrund definierter Charakteristika in die FACS-Vermessung eingeschlossene prozentuale Zellanteil aller eingegebenen Zellen.

Die derartig charakterisierten sASCs wurden zum Zeitpunkt der dritten bis vierten Passage für die Herstellung der iT_H+ Zellen eingesetzt (siehe Punkt 3.3).

3.3 Herstellung induzierter Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen

Zur Differenzierung der iTH+ Zellen wurden nach Isolation, Expansion und Charakterisierung (siehe Punkt 3.2) jeweils 20.000 sASC-Zellen/cm² in Poly-D-Lysin-beschichteten T75-Zellkulturflaschen und Kammerobjektträgern wie von Trzaska et al. vorbeschrieben ausgesät (16). An Tag 1 wurde die catecholaminerge Differenzierung zu iTH+ Zellen mit einem spezifischen neurogenen Medium basierend auf (16) begonnen (Tab. 4):

Tabelle 4 Zusammensetzung des neurogenen Mediums: Zusätze zu Neurobasal® Medium (1x) [-] L-Glutamine [-] Phenol Red von Thermo Fisher Scientific, USA.

Komponente	Bezugsquelle	Konzentration im Medium
B27® Supplement XenoFree CTS™	Thermo Fisher Scientific, USA	1:500-Verdünnung des 50x Stock
Human sonic hedgehog 50 µg/ml	PeproTech GmbH, Hamburg, Germany	250 ng/ml
Human fibroblast growth factor 8 25 µg/ml	PeproTech GmbH, Hamburg, Germany	100 ng/ml
Basic human fibroblast growth factor 25 µg/ml	PeproTech GmbH, Hamburg, Germany	50 ng/ml
Brain-derived neurotrophic factor 100 µg/ml (ab Tag 9)	PeproTech GmbH, Hamburg, Germany	50 ng/ml

Brain-derived neurotrophic factor wurde ab Tag 9 zugegeben, um eine funktionelle Reifung der neuronartigen Zellen bis hin zur Dopaminfreisetzung durch Zelldepolarisation zu erreichen (18). Die isolierten sASCs jedes Patienten wurden als individuelle Zelllinie behandelt (Abbildung 2 modifiziert nach (16)).

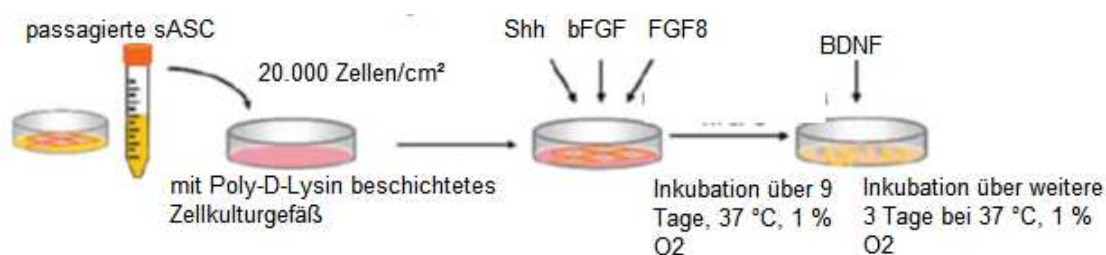


Abbildung 2 Versuchsablauf der zwölf-tägigen catecholaminergen Differenzierung

Während der katecholaminergen Differenzierung über 12 Tage wurden die sASCs mit 1 ng/ml sowie 10 ng/ml TNF entsprechend einer unterschiedlich starken Ausprägung der Inflammation inkubiert. Zum Nachweis eines TNF-spezifischen Effekts der Synovialflüssigkeit (SF) auf die iTH-Zelldifferenzierung wurden OA und RA sASCs ausserdem mit der dem jeweiligen Patienten entnommenen SF (1 ml SF/10 ml Zellkulturmedium) versetzt. Um TNF-vermittelte Effekte auszuschalten, wurde der kompetitive TNF-Blocker Etanercept in niedriger und hoher Konzentration (1 µg/ml und 10 µg/ml) zugesetzt. Die katecholaminerge Differenzierung wurde unter Hypoxie (1 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C) durchgeführt, da im entzündeten Synovialgewebe in RA ein stark hypoxisches Milieu vorbeschrieben ist (40). An Tag 12 wurden die iTH+ Zellen zunächst mittels Phasenkontrastmikroskopie, anschließend durch Immunfluoreszenzfärbung auf neuronale Differenzierungsmarker wie TH, β-III-Tubulin (neuronales Zytoskelett-Protein), VMAT-2 (vesikulärer Monoamintransporter 2) und Nurr1 (*Nuclear receptor related 1 protein*) untersucht (11,16–18).

Ebenfalls an Tag 12 wurden iTH-Zellkulturüberstände zur Bestimmung der KAT-Konzentration mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) abgenommen, mit 20 µl 0,1 M Perchlorsäure angesäuert und bis zur Vermessung bei – 80 °C eingefroren (siehe Punkt 2.6).

3.4 Zellkultur gemischter Synovialzellen

Zur Isolation gemischter Synovialzellen wurde während Kniegelenkersatz-Operationen von RA- und OA-Patienten Synovialgewebe mit einer maximalen Exzisionsgröße von bis zu 9 cm² entnommen und wie von Miller et al. vorbeschrieben behandelt (45). Die synovialen Gewebeproben wurden zerkleinert und mit Dispase I (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) über einen Zeitraum von mindestens 1 h bei 37 °C auf einem Plattformschüttler verdaut. Anschließend wurde die Zellsuspension filtriert (Porengröße 70 µm) und bei 300 x g über 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde über 5 Minuten mit Erythrozyten-Lysepuffer (Qiagen, Deutschland) behandelt und anschließend erneut bei 300 x g 10 Minuten zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) mit 10 % *fetal calf serum* (FCS) resuspendiert. Für die folgende Inkubation wurden 50.000 gemischte Synovialzellen /ml RPMI 1640-Medium (letzteres mit 10 % FCS versetzt) in T75-Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) ausgesät. Die isolierten Zellen wurden als individuelle Zelllinien behandelt, es fand kein Zellpooling statt. Die gemischten Synovialzellen, welche Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten und dendritische Zellen enthalten (10) wurden unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C) inkubiert. Die Inkubation erfolgte über 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen von TNF und Etanercept analog zu Punkt 3.3. Die Probenpräparation an Tag 2 zur Vermessung der

KAT-Konzentration sowie LDH-Aktivität in Zellkulturüberständen erfolgte wie für die iTH⁺-Zellkultur beschrieben.

3.5 Immunfluoreszenz

iTH⁺ Zellen in Kammerobjektträgern (Punkt 3.3) wurden an Tag 12 mit 3,7 % Paraformaldehyd fixiert, getrocknet und bei – 20 °C bis zur Mikroskopie eingefroren. Für die Immunfluoreszenz-Analyse wurden die Zellen über 10 Minuten in 1 x PBS mit 0,3 % Triton rehydriert und permeabilisiert. Nach Behandlung mit Blocking-Puffer (10 % bovines Serumalbumin, 10 % FCS, 10 % *chicken serum*, 10 % *goat serum*) wurden die iTH⁺ Zellen über mindestens 3 Stunden mit 100 µl Primärantikörper-Verdünnung gegen TH, β-III-Tubulin, VMAT-2, Nurr1 sowie mit entsprechenden Isotyp-Kontrollantikörpern bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurde nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS 100 µl Sekundärantikörper-Verdünnung in 1 x PBS (mit 10 % bovinem Serumalbumin) zugegeben und die Zellen im Dunkeln 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Tab. 5).

Tabelle 5 Für die Immunfluoreszenz-Färbung der iTH+ Zellen verwendete Primär-, zugehörige Sekundär- sowie Isotypen-Antikörper (AK). Angegeben ist ferner die jeweilige Bezugsquelle, Katalognummer und Verdünnung der gelieferten AK-Stammlösung.

Primär-AK	Bezugs- quelle, Katalognum- mer, AK-Ver- dünnung	Sekundär-AK	Bezugs- quelle, Katalognum- mer, AK-Verdün- nung	Isotyp	Bezugs- quelle, Katalognum- mer, AK-Verdün- nung
Rabbit Anti-TH-AK	Millipore (Darmstadt, Deutschland), AB152, 1:100	Alexa Fluor 594 F(ab') ₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen (USA), A11072, 1:500	Rabbit polyclonal IgG	R&D (USA), AB-105-C 1:20.000
Rabbit Anti-VMAT-2-AK	Abcam (England), ab81855, 1:100	Alexa Fluor 488 F(ab') ₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen (USA), A11070, 1:500	Rabbit polyclonal IgG	R&D (USA), AB-105-C 1:20.000
Mouse Anti-Nurr1-AK	R&D (USA), PP-N1404-00, 1:100	Alexa Fluor 594 F(ab') ₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen (USA), A11020, 1:500	Mouse monoclonal IgG2A	R&D (USA), MAB003, 1:50
Rabbit Anti-β-III-Tubulin-AK	Abcam (England), ab18207, 1:300	Alexa Fluor 488 F(ab') ₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen (USA), A11070, 1:500	Rabbit polyclonal IgG	R&D (USA), AB-105-C 1:20.000

Abkürzungen: AK, Antikörper

TH, Tyrosinhydroxylase

VMAT-2, vesikulärer Monoamintransporter 2

Nurr1, Nuclear receptor related-1-protein

Abschließend wurden die Zellkerne mit 100 µl 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in 1 x PBS gefärbt und die gefärbten Zellen an einem Axiovision Fluoreszenz-Mikroskop (Axiovision Software Version 4.8) fotografiert.

3.6 Quantifizierung von Noradrenalin mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

NA-Konzentrationen im Zellkulturmedium von iTH+ Zellen und gemischten Synovialzellen wurden durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit elektrochemischer Detektion nach einem von Kees et al. etablierten Protokoll bestimmt (46). Von den Zellkulturüberständen (gelagert bei – 80 °C) wurden jeweils 1,4 – 1,8 ml eingesetzt und mittels Probenvorbereitungssäulchen (RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, München, Deutschland) aufgereinigt. Zu jeder Probe wurden dabei 25 µl 590 M Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure/ Glutathion zur Stabilisierung der KAT und 50 µl interner Standard (3,4-Dihydroxybenzylamin, RECIPE Chemicals + Instruments GmbH) mit definierter Retentionszeit gegeben. Nach dreimaligem Waschen wurden die KAT mit 120 µl Elutionsreagenz (wie Waschlösung von RECIPE Chemicals + Instruments GmbH) von den Probenaufbereitungssäulchen eluiert. Anschließend wurden je nach vorgefundenen Konzentrationen 1 bis 50 µl der eluierten Proben injiziert und mittels HPLC vermessen. Zur Berechnung der KAT-Konzentration wurden die Chromatogramm-Kurvengipfel nach Gipfel-Höhe integriert.

3.7 LDH-Assay zur Evaluation der Zellviabilität

Zur Evaluation TNF-vermittelter zytotoxischer Effekte und des Anteils lebender Zellen in den Zellkulturen nach den durchgeführten Stimulationsversuchen aus Punkt 3.3 und 3.4 wurde die Laktatdehydrogenase (LDH) -Aktivität bestimmt. Für das LDH-Assay mittels *LDH Cytotoxicity Detection Kit* (Takara Bio Company, Kusatsu, Japan) wurden Zellkulturüberstände von iTH+ Zellen (Tag 12) sowie von gemischten Synovialzellen (Tag 2) entnommen und entsprechend Herstellerprotokoll bearbeitet.

3.8 Datenauswertung und Statistik

Die Anzahl der untersuchten Stichproben ist im Ergebnisteil jeweils in der Abbildungslegende aufgeführt. Der Zustand der primären Zellkulturen unterliegt natürlichen Schwankungen, welche durch klinischen Zustand, Alter und Medikation der Patienten bedingt sind. Dementsprechend werden die erhobenen Daten als Boxplot mit Median und 10., 25., 75. und 90. Perzentile angegeben, wobei die einzelnen Messwerte prozentual auf die jeweilige unbehandelte Kontrollgruppe bezogen dargestellt werden. Der statistische Vergleich zweier experimenteller Gruppen erfolgte mittels des Mann-Whitney-U-Tests. Zum Vergleich der Lageparameter zwischen mehr als zwei Gruppen wurde für normalverteilte Daten eine Anova-Varianzanalyse, bei Nicht-Normalverteilung die Kruskal-Wallis Varianzanalyse (ANOVA an Rängen) angewendet. Post-hoc-Tests wurden nach der Bonferroni-Methode durchgeführt. P-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

Die Datenauswertung erfolgte mittels SigmaPlot V.11 (Systat Software, Erkrath, Deutschland).

4. Ergebnisse

4.1 Effekt von TNF auf die Zellmorphologie katecholaminerg differenzierter Zellen

Die morphologische Untersuchung der katecholaminerg differenzierten iTH⁺ Zellen mittels Phasenkontrastmikroskopie an Tag 12 zeigte, dass iTH⁺ Zellen eine Neuronen-ähnliche Zellgestalt mit aussprossenden Zellfortsätzen entwickelten. Im direkten Vergleich zu den Fibroblasten-artigen sASC bildeten iTH⁺ Zellen nach zwölf-tägiger Differenzierung mehr Zell-Zell-Kontakte aus (Abbildung 3).

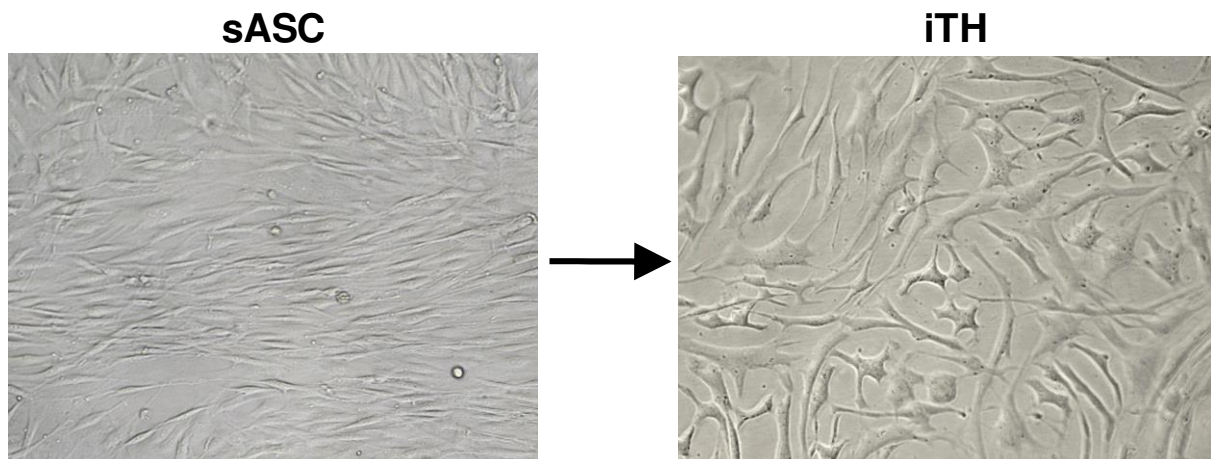


Abbildung 3 Phasenkontrastmikroskopie zur Darstellung der Morphologie induzierter Tyrosinhydroxylase-positiver (iTH⁺) Zellen (200 x Vergrößerung). Erkennbar ist nach 12 Tagen der katecholaminergen Differenzierung ein Wandel der Fibroblasten-artigen Morphologie der synovialen adipösen mesenchymalen Stammzellen (sASC) zu einer Neuronen-artigen Morphologie der iTH⁺ Zellen (repräsentative Photographie von OA-Patientenzellen).

Bezüglich der iTH⁺ Zellmorphologie zeigten sich des Weiteren qualitative Unterschiede zwischen OA und RA: Unbehandelte iTH⁺ Zellen von RA-Patienten bildeten im Vergleich zu OA iTH⁺ Zellen länglichere Perikariya und geringere Zellfortsatz-Aussprossung aus, interzelluläre Kontakte waren jedoch noch vorhanden (Abbildung 4A, 4B: unbehandelt). Bei OA iTH⁺ Zellen verursachte die TNF-Behandlung (10 ng/ml) dünnere und zahlreichere Zellfortsätze (Abbildung 4B: TNF). Dieses Phänomen wurde in RA iTH⁺ Zellen nicht im gleichem Ausmaß beobachtet, möglicherweise durch ein proinflammatorisches *priming* dieser Zellen im rheumatischen Gelenk (Abbildung 4B: TNF). Etanercept in niedriger (1 µg/ml) und hoher (10 µg/ml)

Konzentration sowie Kombinationen von TNF und Etanercept führten weder bei OA noch bei RA iTH+ Zellen zu augenscheinlichen Veränderungen der Zellmorphologie (Abbildungen 4A und 4B: ETA 1, ETA 10, TNF + ETA 1, TNF + ETA 10). Ein zusätzliches Beispiel für die Morphologie der iTH+ Zellen nach zwölf-tägiger katecholaminerner Differenzierung ist für jeweils einen weiteren OA- und RA-Patienten in Abbildung 5 dargestellt.

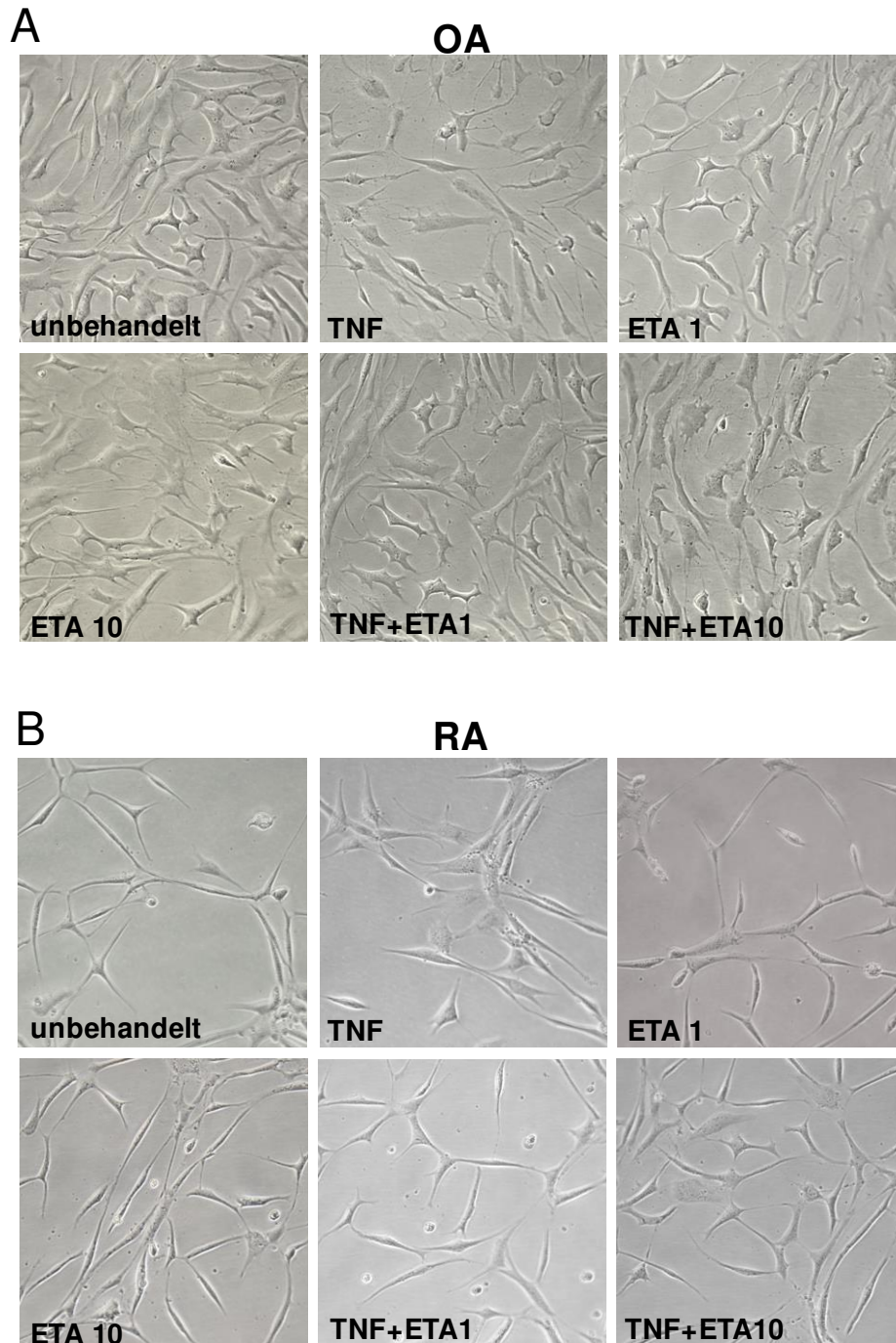


Abbildung 4 A) Phasenkontrastmikroskopische Darstellung von iTH+ Zellen von Osteoarthritis (OA)-Patienten an Tag 12, unbehandelt sowie mit verschiedenen

Kombinationen von 10 ng/ml Tumornekrosefaktor (TNF) und 1 µg/ml oder 10 µg/ml Etanercept (ETA 1/10).

B) Phasenkontrastmikroskopische Darstellung von iTH+ Zellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), unbehandelt sowie mit verschiedenen Kombinationen von 10 ng/ml Tumornekrosefaktor (TNF) und 1 µg/ml oder 10 µg/ml Etanercept (ETA 1/10).

A) als auch B) bei 200 x Vergrößerung aufgenommen.

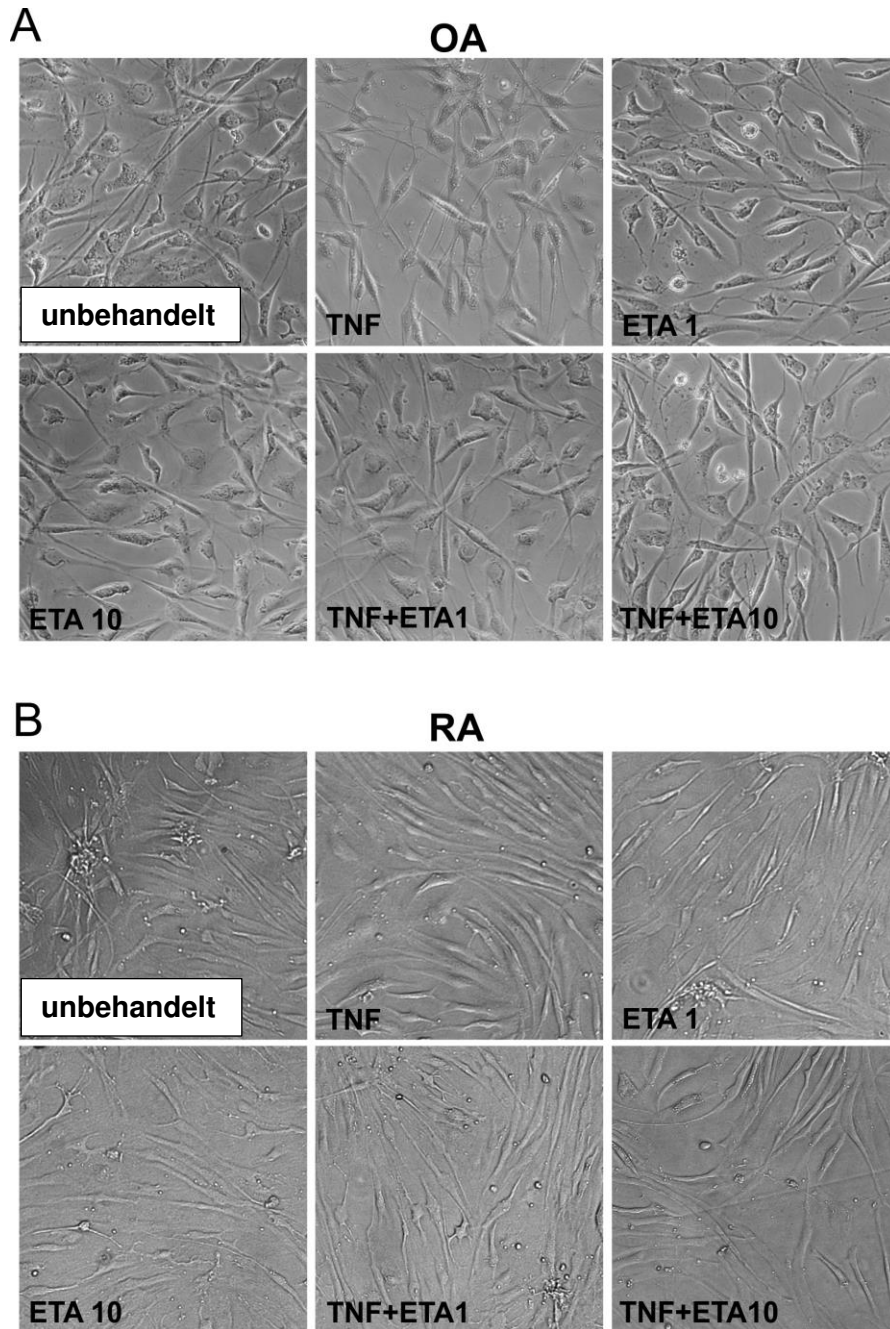


Abbildung 5 A) Phasenkontrastmikroskopische Darstellung von iTH⁺ Zellen von Osteoarthritis (OA)-Patienten an Tag 12, unbehandelt sowie mit verschiedenen Kombinationen von 10 ng/ml Tumornekrosefaktor (TNF) und 1 µg/ml oder 10 µg/ml Etanercept (ETA 1/10).

B) Phasenkontrastmikroskopische Darstellung von iTH⁺ Zellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) an Tag 12, unbehandelt sowie mit verschiedenen Kombinationen von 10 ng/ml Tumornekrosefaktor (TNF) und 1 µg/ml oder 10 µg/ml Etanercept (ETA 1/10).

A) als auch B) bei 200 x Vergrößerung aufgenommen.

4.2 Wirkung von Tumornekrosefaktor auf katecholaminerge Differenzierungsmarker induzierter Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen

Die unbehandelten Gruppen der iTH⁺ Zellen aus OA- und RA-Patienten zeigten in der Immunfluoreszenzfärbung eine ausgeprägte Expression katecholaminerger Markerproteine wie TH, VMAT-2, Nurr1 sowie β -III-Tubulin (Abbildung 6, OA/RA unbehandelt). Nach TNF-Behandlung (10 ng/ml) zeigte sich anhand einer deutlich reduzierten Immunfluoreszenz-Markierung eine geringere Expression dieser Proteine (Abbildung 6, OA/RA TNF). Die alleinige Zugabe des kompetitiven TNF-Inhibitors Etanercept in niedrigen und hohen Konzentrationen führte weder in OA noch in RA iTH⁺ Zellen zu augenscheinlichen Effekten auf die Markerexpression (Abbildung 6, OA/RA ETA1, ETA 10). Gleichzeitig war die TNF-vermittelte Supprimierung von TH, VMAT-2, Nurr1 und β -III-Tubulin sowohl durch niedrige als auch hohe Etanercept-Konzentrationen sichtbar reversibel (Abbildung 6, OA/RA TNF + ETA 1, TNF + ETA 10). Repräsentative Kontroll-Immunfluoreszenz-Bilder von OA und RA iTH⁺ Zellen mit einem IgG-Isotyp-Antikörper sind in Abbildung 7 dargestellt. Ein weiteres Beispiel der Antikörperbindung katecholaminerger Differenzierungsmarker jeweils eines OA- und RA-Patienten findet sich in Abbildung 8.

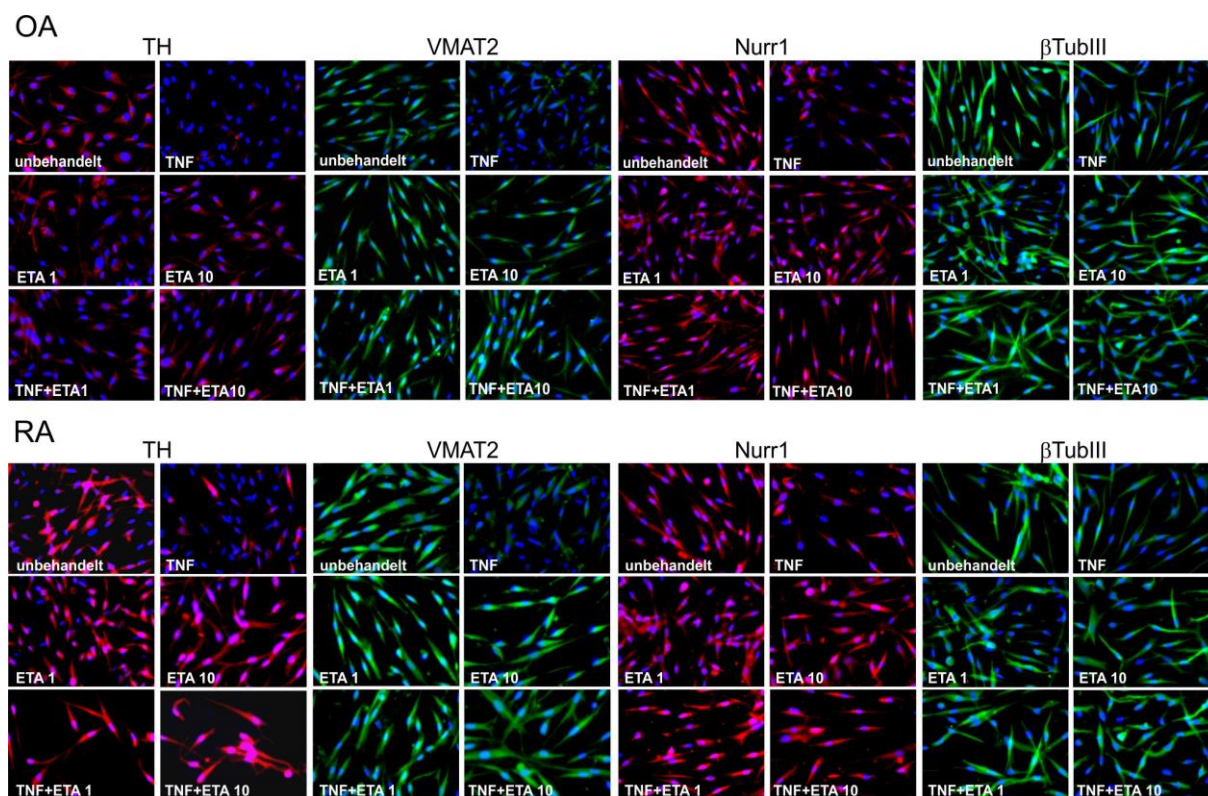


Abbildung 6 Auswirkung der Tumornekrosefaktor (TNF)-Behandlung auf die Expression katecholaminerger Differenzierungsmarker.

Dargestellt ist die Immunfluoreszenzfärbung von Tyrosinhydroxylase (TH), vesikulärem Monoamintransporter 2 (VMAT2), *nuclear receptor related-1 protein* (Nurr1) sowie β -III-Tubulin (β TubIII) in iTH+ Zellen von Patienten mit Osteoarthritis (OA) und rheumatoider Arthritis (RA) nach zwölf-tägiger katecholaminerger Differenzierung. Neben einer unbehandelten Gruppe finden sich auch Koinkubationen der iTH+ Zellen mit 10 ng/ml TNF (TNF) sowie variierenden Konzentrationen von Etanercept (ETA 1/ ETA 10 μ g/ml). Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt, 200 x Vergrößerung.

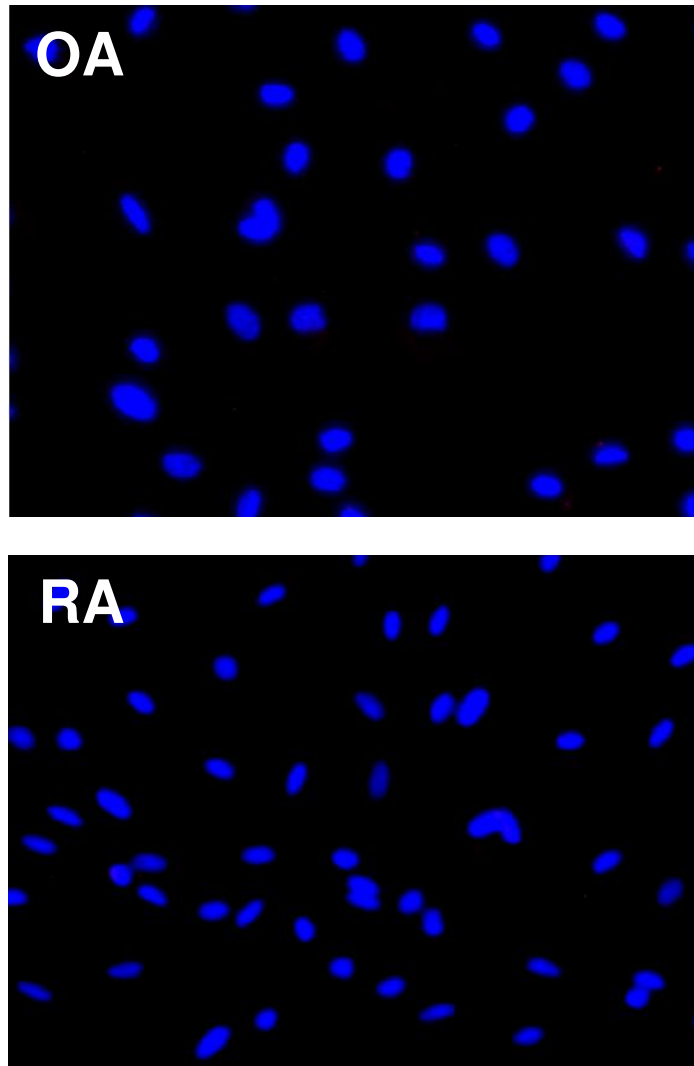


Abbildung 7 IgG-Isotyp-Kontrollantikörper (*rabbit*) zur Immunfluoreszenzfärbung von iTH+ Zellen eines Osteoarthritis (OA)-Patienten sowie eines Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) an Tag 12. Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt, 200 x Vergrößerung.

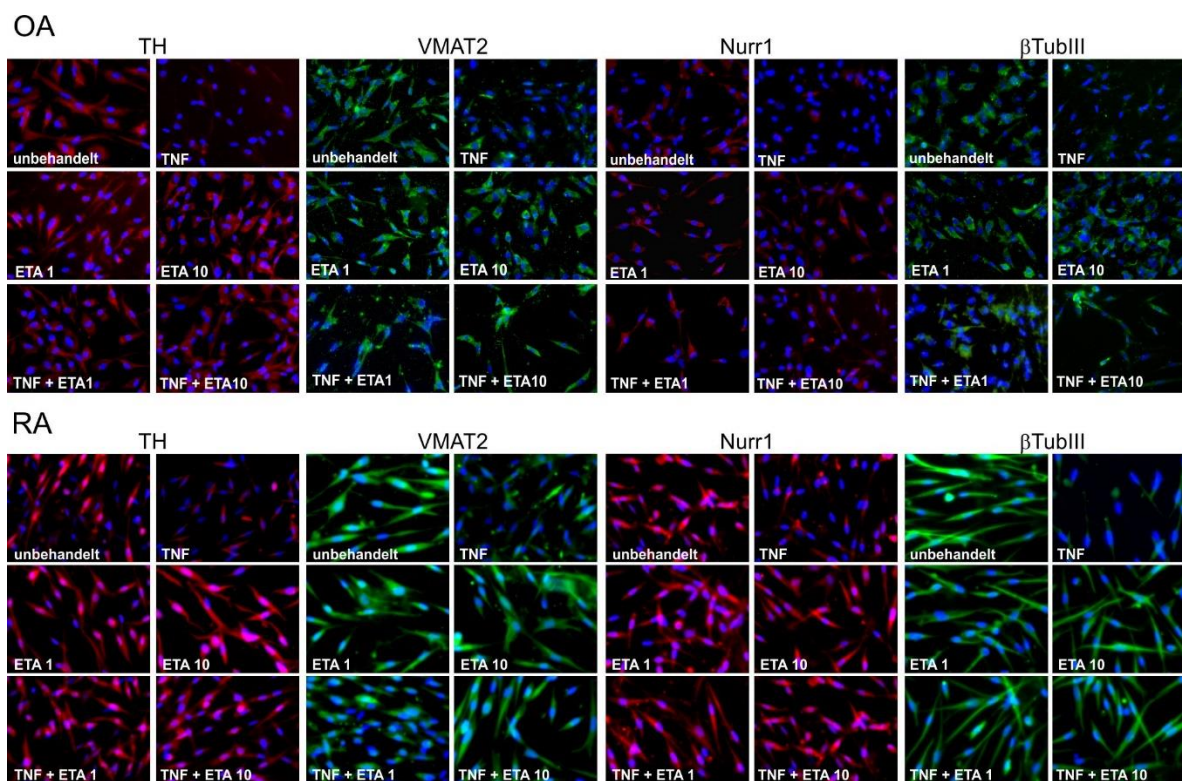


Abbildung 8 Weitere Immunfluoreszenz-Aufnahme zur Auswirkung der Tumornekrosefaktor (TNF)-Behandlung auf die Expression katecholaminerger Differenzierungsmarker.

Dargestellt ist die Immunfluoreszenzfärbung von Tyrosinhydroxylase (TH), vesikulärem Monoamintransporter 2 (VMAT2), *nuclear receptor related-1 protein* (Nurr1) sowie β -III-Tubulin (β TubIII) in iTH+ Zellen von Patienten mit Osteoarthritis (OA) und rheumatoider Arthritis (RA) nach zwölf-tägiger katecholaminerger Differenzierung. Neben einer unbehandelten Gruppe finden sich auch Koinkubationen der iTH+ Zellen mit 10 ng/ml TNF (TNF) sowie variierenden Konzentrationen von Etanercept (ETA 1/ ETA 10 μ g/ml). Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt, 200 x Vergrößerung.

4.3 Einfluss von TNF auf die Noradrenalinsekretion während der katecholaminergen Differenzierung

In Überständen von unbehandelten iTH⁺ Zellen war mittels HPLC NA nachweisbar. So betrug die NA-Konzentration im Zellkulturmedium bei unbehandelten katecholaminerg differenzierten Zellen von OA-Patienten im Median $1,38 \pm 2,55$ ng/ml, von RA-Patienten $1,30 \pm 3,00$ ng/ml (in Abbildung 9 Medianwert jeweils als 100 % definiert und als gestrichelte Linie dargestellt). Undifferenzierte sASCs sowohl von OA- als auch von RA-Patienten synthetisierten sehr geringe Mengen NA (OA: $27,6 \pm 69,4$ pg/ml; RA: $59,3 \pm 127,0$ pg/ml) und lagen bei ca. 2 % (OA) respektive 4,5 % (RA) der sezernierten KAT-Konzentration der unbehandelten iTH⁺-Kontrollzellen (Abbildung 9, sASC). Die TNF-Koinkubation (10 ng/ml bzw. 1 ng/ml) führte zu einer signifikant reduzierten messbaren NA-Konzentration in den Zellkulturüberständen von RA und OA iTH⁺ Zellen (Abbildung 9, TNF 10, TNF 1). Die alleinige Behandlung mit Etanercept in hoher (10 µg/ml) und niedriger (1 µg/ml) Dosis beeinflusste weder bei RA noch bei OA iTH⁺ Zellen die Noradrenalin-Freisetzung (Abbildung 9, ETA 10, ETA 1). Gegenüber der alleinig mit TNF behandelten Gruppe bewirkte eine Kombination mit Etanercept in hoher und niedriger Dosis sowohl in OA- als auch RA-Zellen eine Normalisierung der TNF-induzierten reduzierten Sekretion von NA und eine Annäherung an die gemessenen Konzentrationen der unbehandelten iTH⁺-Zellgruppen (Abbildung 9, TNF 10 + ETA 10, TNF 10 + ETA 1).

4.4 Effekt von Synovialflüssigkeit auf die Katecholaminfreisetzung während der Differenzierung Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen

Um zu evaluieren ob die beobachteten TNF-spezifischen Effekte auf die iTH⁺ Zelldifferenzierung im Sinne von reduzierter NA-Sekretion (Punkt 4.3) auch durch SF des inflammatorischen Gelenkmilieus verursacht werden, wurden OA und RA sASCs während der katecholaminergen Induktion mit patientenzugehöriger Synovialflüssigkeit inkubiert. Dabei resultierten im Vergleich zur unbehandelten iTH⁺-Kontrollgruppe niedrigere Messwerte für NA in den Zellkulturüberständen der OA und RA iTH⁺ Zellen (Abbildung 9, SF). Etanercept in hoher Dosis (10 µg/ml) hob diese negativen Effekte teilweise auf: die gemessenen NA-Konzentrationen stiegen an, ohne dabei jedoch das Niveau der unbehandelten Kontrollgruppe zu erreichen (Abbildung 9, SF + ETA 10).

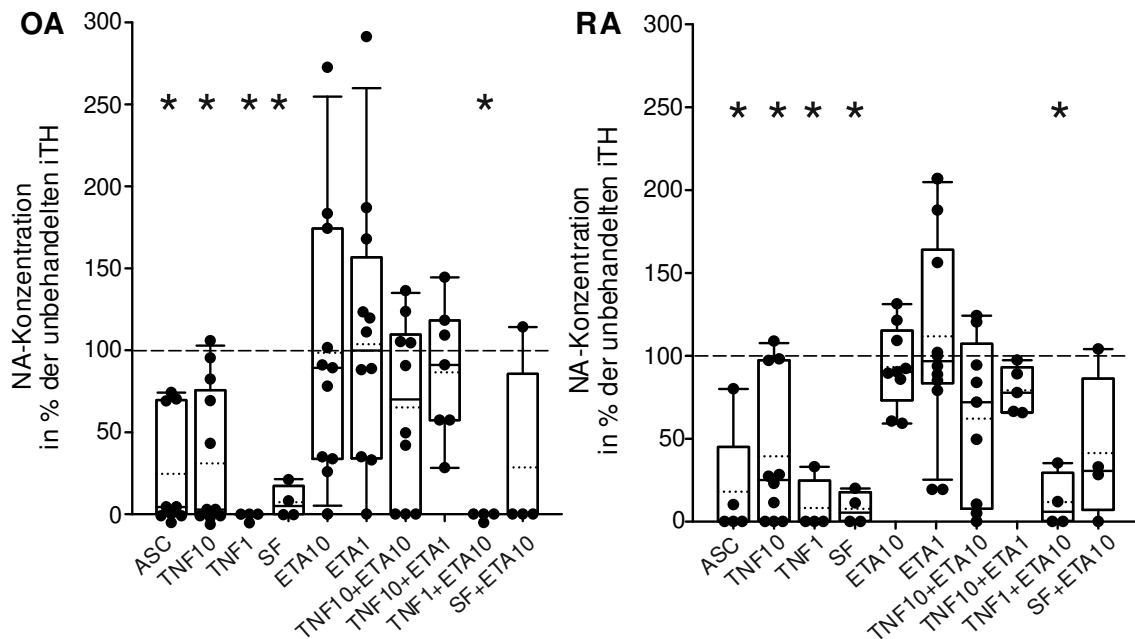


Abbildung 9 Effekt von Tumornekrosefaktor (TNF) auf die Noradrenalin (NA)-Freisetzung aus iTH+ Zellen.

Dargestellt ist die gemessene NA-Konzentration in Zellkulturüberständen von catecholaminerg differenzierten Zellen von Patienten mit Osteoarthritis (OA) und rheumatoider Arthritis (RA) an Versuchstag 12. Die iTH+ Zellen wurden mit verschiedenen Kombinationen von 10 µg/ml oder 1 µg/ml Tumornekrosefaktor (TNF 10/1), Synovialflüssigkeit (SF) sowie 10 µg/ml oder 1 µg/ml Etanercept (ETA 10/1) behandelt. In beiden Graphen sind die Daten als Boxplot mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile dargestellt. Die Messwerte sind prozentual auf die unbehandelte Kontrollgruppe bezogen, letztere wurde entsprechend als 100 % der NA-Konzentration definiert (dargestellt als gestrichelte Linie). n = 4 - 11, jeder Punkt repräsentiert eine Patienten-Zelllinie. Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05$) beim Vergleich der Messwerte einzelner Gruppen mit denjenigen der Kontrolle sind mit „*“ markiert. Absolutwerte der NA-Konzentrationen für die unbehandelte Kontrollgruppe siehe Punkt 4.3.

4.5 Wirkung von TNF auf die Katecholamin-Freisetzung gemischter Synovialzellen

In früheren Studien konnte die Anwesenheit KAT-produzierender Zellen in der Zellkultur der gemischten Synovialzellen nachgewiesen werden (3,10,11). Bei gemischten Synoviozyten von OA-Patienten inhibierte TNF (10 ng/ml) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant die NA-Freisetzung (Abbildung 10 OA, TNF). In Zellkulturüberständen der

unbehandelten Kontrollgruppe betrug die NA-Konzentration dabei $84,0 \pm 187,5$ ng/ml ($\approx 5 \times 10^{-7}$ M). Bei gemischten Synovialzellen von OA-Patienten beeinträchtigte die alleinige Koinkubation mit Etanercept die NA-Sekretion nicht (Abbildung 10 OA, ETA 1, ETA 10), führte aber sowohl in niedriger als auch hoher Dosis (1 μ g/ml respektive 10 μ g/ml) zu einer Normalisierung der TNF-vermittelten verminderten NA-Freisetzung (Abbildung 10 OA, TNF + ETA 1, TNF + ETA 10). Im Gegensatz dazu führte bei gemischten Synoviozyten von RA-Patienten die TNF- und/oder Etanercept-Zugabe im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen zu keiner Änderung der gemessenen NA-Ausschüttung (Abbildung 10 RA, TNF, ETA 1/10, TNF + ETA 1/10). Die NA-Konzentration betrug bei unbehandelten gemischten Synovialzellen von RA-Patienten $88,8 \pm 158,2$ ng/ml ($\approx 5 \times 10^{-7}$ M).

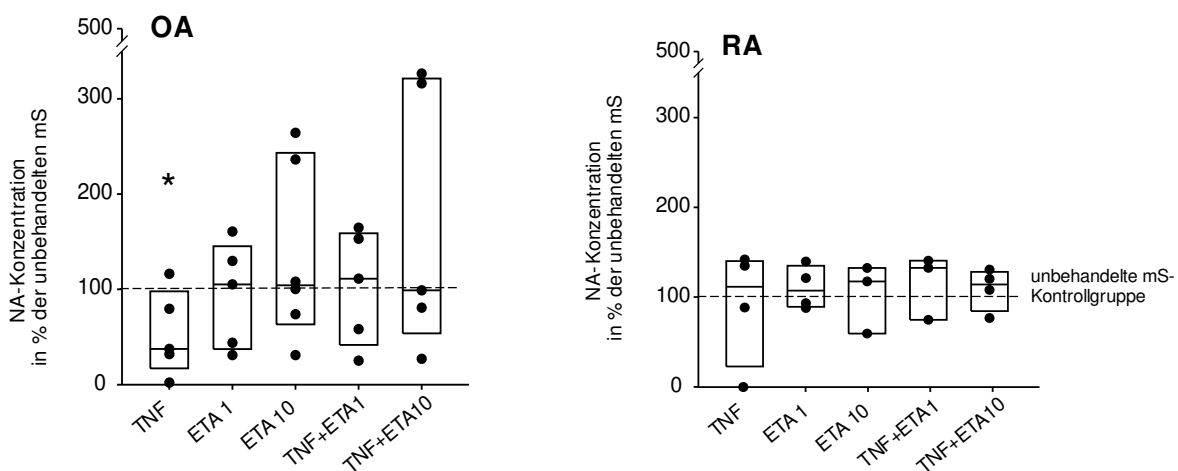


Abbildung 10 Wirkung von Tumornekrosefaktor (TNF) auf die Katecholamin-Freisetzung aus gemischten Synovialzellen.

Dargestellt ist die gemessene Noradrenalin (NA)-Konzentration in Zellkulturüberständen von gemischten Synoviozyten aus Patienten mit Osteoarthritis (OA) und rheumatoider Arthritis (RA) an Versuchstag 2. Die Synovialzellen wurden mit verschiedenen Kombinationen von 10 μ g/ml TNF und/oder Etanercept in hoher (10 μ g/ml, ETA 10) sowie niedriger Dosis (1 μ g/ml, ETA 1) behandelt. In beiden Graphen sind die Daten als Boxplot mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile dargestellt. Die Messwerte sind prozentual auf die unbehandelte Kontrollgruppe bezogen, letztere wurde entsprechend als 100 % der NA-Konzentration definiert (dargestellt als gestrichelte Linie). $n = 6 - 9$, jeder Punkt repräsentiert eine Patienten-Zelllinie. Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05$) beim Vergleich der Messwerte einzelner Gruppen mit denjenigen der Kontrolle sind mit „*“ markiert. Absolutwerte der NA-Konzentrationen für die unbehandelte Kontrollgruppe siehe 4.5.

4.6 Auswirkung von TNF und Synovialflüssigkeit auf die Zellviabilität

Weder in OA noch in RA iTH+ Zellkultur wurde das Zellüberleben durch TNF, Etanercept (in niedriger und hoher Konzentration) oder die Kombination beider Substanzen beeinträchtigt (Abbildung 11 A). Auch in der Zellkultur der Synovialzellen von OA- und RA-Patienten zeigte sich in den durchgeführten Laktatdehydrogenase (LDH)-Assays kein Hinweis auf eine Zytotoxizität von TNF oder Etanercept (11 B). Der Vergleich zytotoxischer Effekte zwischen mit SF und 10 ng/ml TNF inkubierten iTH+ Zellen aus OA- und RA-Patienten und der unbehandelten Kontrollgruppe zeigte keine signifikanten Unterschiede der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand (11 C). Dabei lag die gemessene optische Dichte der Positivkontrolle mit toten Zellen in sämtlichen durchgeführten LDH-Assays bei 1,8 bis 2 Einheiten. Aus diesem Grund sind die Messwerte für diese Positivkontrollen lediglich in Abbildung 11 C – prozentual auf die unbehandelte Kontrollgruppe bezogen – angegeben (Abbildung 11 C, Tot-Kontrolle). Die Negativkontrolle in Form des reinen Zellkulturmediums zeigte keine LDH-Aktivität und damit sehr niedrige Werte der optischen Dichte (Abbildung 11 C, Medium).

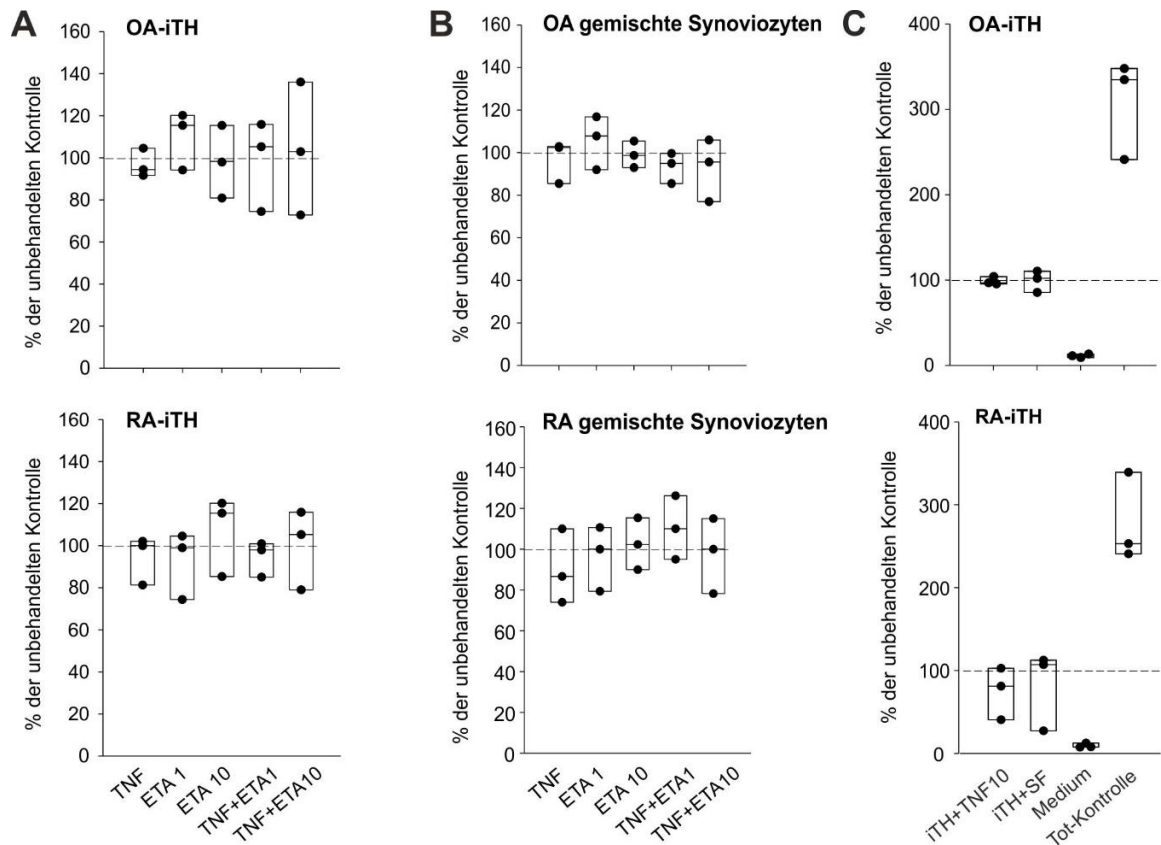


Abbildung 11 A) Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität induzierter Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen (iTH) von Patienten mit Osteoarthritis (OA) und rheumatoider Arthritis (RA). Die iTH wurden während der zwölf-tägigen katecholaminergen Differenzierung mit 10 ng/ml TNF (TNF) und 1 µg/ml oder 10 µg/ml Etanercept (ETA 1, ETA 10) in unterschiedlichen Kombinationen behandelt.

B) LDH-Aktivität gemischter Synoviozyten aus OA- und RA-Patienten, welche über 24 h mit 10 ng/ml TNF sowie Etanercept in niedriger und hoher Dosis (ETA 1, ETA 10) behandelt wurden.

C) LDH-Aktivität bei OA und RA iTH+ Zellen nach Behandlung mit 10 ng/ml TNF sowie Patienten-zugehöriger Synovialflüssigkeit (SF) über 12 Tage. Des Weiteren sind die vermessene LDH-Aktivität für Zellkulturmedium (Medium) sowie für eine Positivkontrolle toter Zellen (Tot-Kontrolle) dargestellt.

Für A), B) und C) gilt: Daten sind als Boxplot dargestellt. Die Messwerte sind prozentual auf die unbehandelte Kontrollgruppe bezogen, welche als 100 % der LDH-Aktivität definiert wurde (dargestellt als gestrichelte Linie). n = 3, jeder Punkt repräsentiert eine Patienten-Zelllinie. Absolutwerte der gemessenen optischen Dichte für die Kontrollgruppen siehe Punkt 4.6.

5. Diskussion

Die in Tieren und Pflanzen *in vivo* vorzufindenden KAT Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin wirken als Neurotransmitter des zentralen und peripheren Nervensystems sowie als Hormone, welche zahlreiche physiologische und pathologische Prozesse regulieren. Eine funktionelle Trennung der KAT-Wirkung als Neurotransmitter und Hormon erfolgt dabei auch über die Blut-Hirn-Schranke (47). Das die geschwindigkeitslimitierende Reaktion der KAT-Biosynthese katalysierende Enzym Tyrosin-3-Monooxygenase/ TH benötigt als Kofaktoren Tetrahydrobiopterin, O₂ und Eisen-II.

Neben der TH-Aktivität, die u.a. über negative Rückkopplung, Enzym-Phosphorylierung und Dopaminbindung reguliert wird spielt für die synthetisierte und sezernierte KAT-Menge auch die KAT-Wiederaufnahme und -Wirkung an präsynaptischen KAT-Rezeptoren eine Rolle (47,48). Ferner wird die TH-Expression u.a. durch Hypoxie, chronischen Stress, BDNF, *nerve growth factor* (NGF), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *basic fibroblast growth factor*, chemische Sympathektomie mittels 6-Hydroxydopamin sowie Transkriptionsfaktoren wie Nurr1 und CREB (cAMP-response element binding protein) induziert (39,47,49).

Da es auch während der Kollagen Typ II-induzierten Arthritis im Mausmodell und der Progression der RA beim Menschen zu einem Verlust von katecholaminergen TH⁺ sympathischen Nervenfasern in betroffenen Gelenken kommt, kann das Erscheinen von TH⁺ Einzelzellen als Kompensationsmechanismus für einen Mangel an KAT gedeutet werden (3,10,11,49). Da NA via β 2-AR zahlreiche antiinflammatorische Effekte vermitteln kann (2,4,50), wurde der in der Vergangenheit gefundene Verlust sympathischer Nervenfasern als proinflammatorisches Phänomen interpretiert, wohingegen TH⁺ Zellen bei ausreichender Zellzahl sowie KAT-Sekretion antiinflammatorisch gegenwirken können. Eine entsprechende Stimulation von β 2-AR erfolgt dabei bei höheren NA-Konzentrationen, ca. bei $\geq 10^{-7}$ M (2). NA-Bindung an β 2-AR vermittelt über die α -Untereinheit von Gs-Proteinen Adenylatcyclase-Aktivierung, dadurch cAMP-Erhöhung und über letztere Öffnung von Ionenkanälen sowie Proteinkinase-I- und -II-vermittelte Transkription (4). Dieser Wirkmechanismus über den *second messenger* cAMP wird seit 2015 durch den selektiven Phosphodiesterase-4-Hemmer Apremilast zur antiinflammatorischen Therapie bei Psoriasis-Arthritis genutzt (51).

Um in Zukunft bei RA-Patienten gegebenenfalls eine potentielle antiinflammatorische Therapie durch den Transfer autologer iTH⁺ Zellen zu ermöglichen, ist zunächst eine weitere Charakterisierung und Untersuchung der iTH⁺ Zellen notwendig. Für die autologe Zelltherapie ist das chronisch-inflammatorische Milieu in der Synovialmembran und -flüssigkeit eines der wesentlichen zu überwindenden Hindernisse. Das rheumatische Gelenk ist neben der Anwesenheit von zur Autoantikörperproduktion beitragenden Zytokinen wie IL-1 β , IL-10, TGF- β und IgG2bIF auch durch TNF-Einfluss gekennzeichnet (52). So finden sich in der

Synovialflüssigkeit von RA-Patienten TNF-Konzentrationen zwischen 0,1 und 5 ng/ml abhängig von der Entzündungsaktivität. Hierbei ist die TNF-Konzentration in der Synovialflüssigkeit mit der Anzahl der infiltrierten Leukozyten korreliert, die TNF-Konzentration im Serum mit der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (53). Bei OA-Patienten sind die gemessenen Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit mit ca. 1 – 10 pg/ml deutlich niedriger (54,55). Da für TNF bereits gezeigt werden konnte, dass es TH-hemmende Eigenschaften aufweist sowie zytotoxische Effekte auf TH+ Zellen in neurodegenerativen Erkrankungen wie dem IPS hat (56), ist ebenso von einer inhibitorischen Wirkung auf die katecholaminerge Differenzierung und KAT-Produktion von aus RA- und OA-sASC hergestellten iTH+ Zellen auszugehen.

Am Beginn der vorliegenden Studie stand die Charakterisierung von synovialen Stammzellen/sASC aus juxtaartikulärem synovialen Fettgewebe von RA- und OA-Patienten und die an für mesenchymale Stammzellen veröffentlichte Differenzierungsprotokolle angelehnte Herstellung von iTH + Zellen (16–18). Erstmals wurden menschliche synoviale sASCs zu neuronartigen katecholaminergen Zellen differenziert. Wir konnten zeigen, dass sich die an Fibroblasten erinnernde Morphologie der sASC deutlich zu einem neuronartigen Zelltyp mit rundlichem Perikaryon sowie charakteristischer Zellfortsatzaussprossung wandelte. In ergänzenden, noch unveröffentlichten Studien konnte durch Semaphorin 3 F – ein Sympathikus-Nervenfasern abstoßender Faktor – eine Axon-Abstoßung bei den generierten iTH+ Zellen erreicht werden und so deren Charakteristika und Ähnlichkeit zu Sympathikus-Neuronen weiter bestätigt werden.

Zellmorphologisch verlief die Differenzierung zu iTH + Zellen bei sASC von OA- und RA-Patienten unvollständiger als bei Verwendung muriner, gesunder MSCs (11). So fehlte die für neuronale Differenzierung typische Formation von - der Struktur des frühen Neuralrohrs ähnelnden - Rosetten-artigen Zellverbänden mit interzellulären Kontakten (57). Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsansätze: Zunächst kann ein reduziertes Differenzierungspotential der Stammzellen von RA- und OA-Patienten u.a. das Resultat von Medikation und Alter der in die Studie eingeschlossenen Patienten sein. Insbesondere höheres Alter führt bei MSC zu einer Abnahme der Proliferationsrate sowie des Differenzierungspotentials, neben anderem wahrscheinlich durch eine Verkürzung der Telomere (58). Weiterhin stammen die von uns zu iTH+ Zellen differenzierten sASC aus entzündlich verändertem Gewebemilieu, welches über diverse Umgebungsfaktoren hemmend auf die Stammzellen einwirken könnte. Die basale Konzentration inflammatorischer Mediatoren – u.a. aus dem Monozyten-Makrophagen-Osteoklasten-System stammend - ist dabei aufgrund höheren Alters der Patienten zusätzlich gesteigert (59). Außerdem können Entzündungsprozesse die Signaltransduktion und epigenetische Signatur in sASC verändern, wodurch das Differenzierungspotential von RA-sASC stärker eingeschränkt sein könnte als das der OA-sASC (60,61). Nichtsdestotrotz konnte an Tag 12 der Induktion von iTH+ Zellen ein deutlicher Nachweis katecholaminerger Marker (mittels

Immunfluoreszenz) sowie der Noradrenalin-Sekretion erfolgen und somit katecholaminerge neuronentypische Differenzierung demonstriert werden.

In der morphologischen Untersuchung mit Phasenkontrastmikroskopie zeigten sich die Auswirkungen der Koinkubation mit TNF während der OA-iTH⁺-Zelldifferenzierung anhand von im Vergleich zu RA-iTH⁺ Zellen dünneren, zahlreicheren Zellaussprossungen. Diese Zellgestalt ist mögliche Konsequenz einer unvollständigen katecholaminergen Differenzierung der OA-Stammzellen. Da die Zellviabilität im LDH-Assay durch TNF weder bei OA-iTH⁺ Zellen noch bei RA-iTH⁺ Zellen beeinträchtigt war, ist nicht von einem präapoptischen Phänomen auszugehen. Dieser TNF-Effekt auf die Morphologie von OA-iTH⁺ Zellen wurde bei RA-Zellen nicht beobachtet, da möglicherweise RA-sASC gegenüber OA-sASC durch chronische höhere TNF-Exposition im rheumatischen Gelenk – 0,1 – 5 ng/ml gegenüber 1 – 10 pg/ml bei OA – stark beeinflusst werden (53–55). Eine homologe Desensibilisierung durch TNF wurde u. a. bereits für menschliche Fibroblasten (SV-80-Zelllinie) sowie menschliche Endothelzellen beschrieben und könnte in RA-iTH⁺ Zellen zur beobachteten Unterempfindlichkeit gegenüber TNF führen (62,63). Auch hier kann die bereits angesprochene, in RA-Patienten abweichende Medikation eine Rolle spielen. Insbesondere die bei 68,8 % der untersuchten RA-Patienten gegebene Immunsuppression in Form von Glukokortikoiden könnte das Differenzierungsverhalten von synovialen Stammzellen verändern (64).

In der Immunfluoreszenz-Färbung zeigte sich nach zwölf-tägiger neuronaler Differenzierung eine deutliche Expression der katecholaminergen Markerproteine TH, VMAT2, Nurr1 und β -III-Tubulin. Alle Marker wurden durch TNF-Behandlung deutlich vermindert exprimiert, hierbei war die Suppression katecholaminergener Proteine bei mit TNF koinkubierten OA-iTH⁺ Zellen ebenfalls ausgeprägter (in 4 unabhängigen Patientenproben nachgewiesen). Wie in der Einleitung aufgeführt, ist für TNF eine Hemmung der TH-Expression und -Aktivität in anderen Zelltypen und Krankheitsmodellen bekannt (22). Diese TH-Hemmung könnte indirekt durch Nurr1-Suppression erfolgen, da Nurr1 – ein nukleärer Rezeptor, der für die dopaminerge Zelldifferenzierung grundlegend ist – direkt den Promoter des TH-Gens aktiviert (65). Die durch TNF-Wirkung vermittelte Hemmung der VMAT2- und β -III-Tubulin-Expression wird hier erstmals beschrieben.

Eine TNF-Inhibition der katecholaminergen Differenzierung wurde ferner bei Messung der KAT-Konzentrationen in Zellkulturüberständen beobachtet. Die differenzierten iTH⁺ Zellen von OA- und RA-Patienten zeigten an Tag 12 in ähnlichem Ausmaß eine TNF-induzierte verminderte NA-Sekretion; dieser Effekt wurde durch Etanercept rückgängig gemacht. Demgegenüber war die NA-Sekretion zwar bei mit TNF behandelten gemischten Synoviozyten von OA-Patienten deutlich reduziert, bei denjenigen von RA-Patienten jedoch nicht. Auch hier waren die Effekte auf die gemessene KAT-Konzentration durch Etanercept-vermittelte TNF-Inhibition reversibel. Als Ursache der unterschiedlichen Wirkung von TNF auf gemischte

Synovialzellen von OA- und RA-Patienten steht auch hier die bereits oben angesprochene homologe Desensibilisierung von TNF-Rezeptoren durch TNF und weitere proinflammatorische Zytokine zur Debatte (62,63). Zum möglichen Einfluss der Patientenmedikation siehe oben.

Die gemessenen Unterschiede der NA-Konzentrationen in Zellkulturüberständen von iTH+ Zellen und gemischten Synovialzellen waren unabhängig vom Zellüberleben, wie durch den LDH-Assay gezeigt wurde.

Es kann der Einwand erhoben werden, dass die in unseren HPLC-Messungen nach *in vitro*-Behandlung von iTH+ Zellen und gemischten Synoviozyten nachgewiesenen NA-Konzentrationen zu niedrig waren, um *in vivo* antiinflammatorische Effekte zu vermitteln. Für eine entsprechende Bindung an β 2-AR wären wie bereits angesprochen NA-Konzentrationen von mindestens 10^{-7} M nötig. Die von uns gemessenen NA-Konzentrationen in Zellkulturüberständen betragen bei iTH+ Zellen ca. 10^{-8} M und bei gemischten Synovialzellen ca. $0,5 \times 10^{-6}$ M (bei letzteren gemischten Synoviozyten sind wie in der Einleitung angesprochen endogene TH+ Zellen enthalten (10)).

Demnach wäre die durch endogene gemischte Synoviozyten sezernierte NA-Menge bereits ausreichend, um *in vivo* potentiell in Abhängigkeit vom lokalen Gesamtflüssigkeitsvolumen und der Entfernung von der Katecholamin-Quelle antiinflammatorisch zu wirken. Für *in vitro* differenzierte iTH+ Zellen ist durch Einsatz einer größeren Stammzellzahl (potentiell auch bei der in Zukunft angestrebten Zelltherapie) eine höhere NA-Sekretion zu erwarten. Unsere Versuche wurden *in vitro* mit definierten Zellkulturbedingungen (siehe Punkt 3.3) durchgeführt, die die vorgestellten Ergebnisse erbrachten. Dennoch ist z.B. durch Differenzierung einer höheren sASC-Zellzahl, Verwendung anderer Zellkulturmedien oder Differenzierungsfaktoren eine gesteigerte und dadurch für antiinflammatorische Effekte ausreichende NA-Sekretion denkbar.

In Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich feststellen, dass wir zwar - als mögliche Basis für spätere autologe Zelltherapie bei RA-Patienten - iTH+ Zellen aus Adipozyten-Stammzellen generieren können, dass wie demonstriert jedoch gleichzeitig TNF und eventuell weitere proinflammatorische Zytokine in Synovialmembran und -flüssigkeit die intendierte antiinflammatorische Wirkung einschränken könnten. Ferner kann man vermuten, dass ein Teilaspekt der therapeutischen Wirkung von Etanercept in chronisch-entzündlichen Erkrankungen möglicherweise auf dem Schutz endogener TH+ Zellen und deren NA-Sekretion beruht. In weiteren Studien bleibt zu untersuchen, ob sich bereits differenzierte TH+ Zellen durch langfristige Exposition gegenüber TNF und anderen proinflammatorischen Zytokinen in ihrem Phänotyp auch umgekehrt zu nicht-katecholaminergen Zellen entdifferenzieren und so ihren vermittelten antiinflammatorischen Einfluss verlieren können.

6. Zusammenfassung

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass in der chronisch-symptomatischen Phase der RA im Synovium selektiv sympathische Nervenfasern untergehen, gleichzeitig jedoch TH⁺ Einzelzellen erscheinen (9,10). Ferner wurde gezeigt, dass das SNS in dieser Spätphase der RA über NA-Bindung an β 2-Adrenozeptoren antiinflammatorisch wirkt (2,6). Da die verbleibenden TH⁺ Zellen somit einen möglichen antiinflammatorischen Faktor in der RA darstellen, ist vor einer möglichen klinischen Anwendung z.B. im Sinne einer autologen Zelltherapie eine weitergehende Untersuchung dieser Zellpopulation notwendig.

So untersuchte die vorliegende Arbeit den Einfluss von TNF auf die katecholaminerge Differenzierung und die Noradrenalin-Sekretion von aus synovialen Adipozyten-Stammzellen induzierten TH⁺ Zellen sowie die Noradrenalin-Sekretion von gemischten Synoviozyten unter hypoxischen Bedingungen.

sASC sowie Synovialzellen wurden aus 24 Patienten mit Osteoarthritis und 16 Patienten mit rheumatoider Arthritis entnommen. Nach FACS-basierter Charakterisierung der sASC erfolgte erstmals deren zwölf-tägige Differenzierung zu neuronartigen iTH⁺ Zellen. Der Differenzierungserfolg wurde mittels Phasenkontrastmikroskopie, Immunfluoreszenz-Nachweis der katecholaminergen Marker TH, VMAT2, Nurr1 und β -III-Tubulin sowie Katecholamin-Detektion gezeigt. TNF und Synovialflüssigkeit führten bei OA- und RA iTH⁺ Zellen zu einer Hemmung der katecholaminergen Differenzierung und zu reduzierter NA-Sekretion, beide Effekte waren durch Etanercept-Zugabe reversibel.

Analog konnte eine TNF-vermittelte Inhibition der NA-Ausschüttung von gemischten Synoviozyten (welche 24 Stunden bei Hypoxie inkubiert wurden) von OA-Patienten demonstriert werden. Möglicherweise aufgrund einer homologen Desensibilisierung des TNF-Rezeptors war dieser Effekt bei Synoviozyten von RA-Patienten nicht nachzuvollziehen.

Zusammenfassend lässt sich also eine TNF-vermittelte Hemmung der katecholaminergen Differenzierung, der TH-Expression und -Aktivität sowie der NA-Sekretion in iTH⁺ Zellen und gemischten Synovialzellen konstatieren. Somit kann ein weiterer Wirkungsmechanismus der antiinflammatorischen Etanercept-Therapie bei RA-Patienten angenommen werden und eine mögliche Limitation einer zukünftigen autologen TH⁺ Zelltherapie bei RA diskutiert werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Nance DM, Sanders VM. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain, behavior, and immunity* 2007;21:736–45.
2. Pongratz G, Straub RH. The sympathetic nervous response in inflammation. *Arthritis Res Ther* 2014;16:135.
3. Capellino S, Weber K, Gelder M, Härle P, Straub RH. First appearance and location of catecholaminergic cells during experimental arthritis and elimination by chemical sympathectomy. *Arthritis and rheumatism* 2012;64:1110–18.
4. Lorton D, Bellinger DL. Molecular mechanisms underlying β -adrenergic receptor-mediated cross-talk between sympathetic neurons and immune cells. *International journal of molecular sciences* 2015;16:5635–65.
5. Franco R, Pacheco R, Lluís C, Ahern GP, O'Connell PJ. The emergence of neurotransmitters as immune modulators. *Trends in immunology* 2007;28:400–07.
6. Härle P, Möbius D, Carr DJJ, 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 & Rheumatism* 2005;52:1305–13.
7. Ebbinghaus M, Gajda M, Boettger MK, Schaible H-G, Bräuer R. The anti-inflammatory effects of sympathectomy in murine antigen-induced arthritis are associated with a reduction of Th1 and Th17 responses. *Ann Rheum Dis* 2012;71:253–61.
8. 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 & Rheumatism* 2008;58:2347–55.
9. 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.
10. 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.
11. Jenei-Lanzl Z, Capellino S, Kees F, Fleck M, Lowin T, Straub RH. Anti-inflammatory effects of cell-based therapy with tyrosine hydroxylase-positive catecholaminergic cells in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis* 2015;74:444–51.
12. Jiang Y, Tuan RS. Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis. *Nature reviews. Rheumatology* 2015;11:206–12.

13. Sousa EB de, Casado PL, Moura Neto V, Duarte MEL, Aguiar DP. Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: Latest discoveries and therapeutic perspectives. *Stem cell research & therapy* 2014;5:112.
14. Grimsholm O, Rantapää-Dahlqvist S, Dalén T, Forsgren S. BDNF in RA: Downregulated in plasma following anti-TNF treatment but no correlation with inflammatory parameters. *Clinical rheumatology* 2008;27:1289–97.
15. Weidler C, Holzer C, Harbuz M, Hofbauer R, Angele P, Schölmerich J, 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.
16. Trzaska KA, Rameshwar P. Dopaminergic neuronal differentiation protocol for human mesenchymal stem cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2011;698:295–303.
17. Trzaska KA, Kuzhikandathil EV, Rameshwar P. Specification of a dopaminergic phenotype from adult human mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2007;25:2797–808.
18. Trzaska KA, King CC, Li K-Y, Kuzhikandathil EV, Nowycky MC, Ye J-H, et al. Brain-derived neurotrophic factor facilitates maturation of mesenchymal stem cell-derived dopamine progenitors to functional neurons. *Journal of neurochemistry* 2009;110:1058–69.
19. He P, Zhong Z, Lindholm K, Berning L, Lee W, Lemere C, et al. Deletion of tumor necrosis factor death receptor inhibits amyloid beta generation and prevents learning and memory deficits in Alzheimer's mice. *The Journal of cell biology* 2007;178:829–41.
20. Himmerich H, Fulda S, Linseisen J, Seiler H, Wolfram G, Himmerich S, et al. Depression, comorbidities and the TNF-alpha system. *European psychiatry the journal of the Association of European Psychiatrists* 2008;23:421–29.
21. McCoy MK, Martinez TN, Ruhn KA, Szymkowski DE, Smith CG, Botterman BR, et al. Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience* 2006;26:9365–75.
22. Aloe L, Fiore M. TNF-alpha expressed in the brain of transgenic mice lowers central tyroxine hydroxylase immunoreactivity and alters grooming behavior. *Neuroscience letters* 1997;238:65–68.
23. Gemma C, Catlow B, Cole M, Hudson C, Samec A, Shah N, et al. Early inhibition of TNF-alpha increases 6-hydroxydopamine-induced striatal degeneration. *Brain research* 2007;1147:240–47.
24. Gayle DA, Ling Z, Tong C, Landers T, Lipton JW, Carvey PM. Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopamine cell loss in culture: Roles of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and nitric oxide. *Brain research. Developmental brain research* 2002;133:27–35.

25. McGuire TR, Bociek GR, Pavletic SZ, Hock L, Lynch J, Schneider J, et al. Organ dysfunction following stem cell transplantation: Relationship to plasma cytokine concentrations. *Bone marrow transplantation* 2001;28:889–93.
26. Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP. Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: Implications for Parkinson's disease. *FASEB J* 2002;16:1474–76.
27. Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP. Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: Role of TNF- α . *FASEB J* 2006;20:670–82.
28. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of pathology* 2008;214:149–60.
29. Feldmann M, Williams RO, Paleolog E. What have we learnt from targeted anti-TNF therapy? *Ann Rheum Dis* 2010;69 Suppl 1:i97-99.
30. Scallon B, Cai A, Solowski N, Rosenberg A, Song X-Y, Shealy D, et al. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2002;301:418–26.
31. Lim H, Lee SH, Lee HT, Lee JU, Son JY, Shin W, et al. Structural Biology of the TNF α Antagonists Used in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *International journal of molecular sciences* 2018;19.
32. Zhou Q-H, Sumbria R, Hui EK-W, Lu JZ, Boado RJ, Pardridge WM. Neuroprotection with a brain-penetrating biologic tumor necrosis factor inhibitor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2011;339:618–23.
33. Piguet PF, Grau GE, Vesin C, Loetscher H, Gentz R, Lesslauer W. Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumour necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor. *Immunology* 1992;77:510–14.
34. Thorbecke GJ, Shah R, Leu CH, Kuruvilla AP, Hardison AM, Palladino MA. Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:7375–79.
35. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:9784–88.
36. Zhao S, Mysler E, Moots RJ. Etanercept for the treatment of rheumatoid arthritis. *Immunotherapy* 2018.
37. Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet (London, England)* 1989;2:244–47.

38. Butler DM, Maini RN, Feldmann M, Brennan FM. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF- α antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. *European cytokine network* 1995;6:225–30.
39. Goryo K, Torii S, Yasumoto K-I, Sogawa K. Tumour necrosis factor- α suppresses the hypoxic response by NF- κ B-dependent induction of inhibitory PAS domain protein in PC12 cells. *Journal of biochemistry* 2011;150:311–18.
40. Biddlestone J, Bandarra D, Rocha S. The role of hypoxia in inflammatory disease (review). *International journal of molecular medicine* 2015;35:859–69.
41. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, Mcshane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 1988;31:315–24.
42. Estes BT, Diekman BO, Gimble JM, Guilak F. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nature protocols* 2010;5:1294–311.
43. Skalska U, Kontny E, Prochorec-Sobieszek M, Maśliński W. Intra-articular adipose-derived mesenchymal stem cells from rheumatoid arthritis patients maintain the function of chondrogenic differentiation. *Rheumatology (Oxford, England)* 2012;51:1757–64.
44. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–17.
45. Miller LE, Weidler C, Falk W, Angele P, Schaumburger J, Schölmerich J, et al. Increased prevalence of semaphorin 3C, a repellent of sympathetic nerve fibers, in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2004;50:1156–63.
46. Kees MG, Pongratz G, Kees F, Schölmerich J, Straub RH. Via beta-adrenoceptors, stimulation of extrasplenic sympathetic nerve fibers inhibits lipopolysaccharide-induced TNF secretion in perfused rat spleen. *Journal of Neuroimmunology* 2003;145:77–85.
47. Nagatsu T. The catecholamine system in health and disease -Relation to tyrosine 3-monoxygenase and other catecholamine-synthesizing enzymes. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 2007;82:388–415.
48. Lavery R. Catecholamines: Role in health and disease. *Drugs* 1978;16:418–40.
49. Mueller RA, Thoenen H, Axelrod J. Adrenal tyrosine hydroxylase: Compensatory increase in activity after chemical sympathectomy. *Science (New York, N.Y.)* 1969;163:468–69.
50. Pongratz G, Straub RH. Role of peripheral nerve fibres in acute and chronic inflammation in arthritis. *Nature reviews. Rheumatology* 2013;9:117–26.
51. Poole RM, Ballantyne AD. Apremilast: First global approval. *Drugs* 2014;74:825–37.

52. Lettesjö H, Nordström E, Ström H, Nilsson B, Glinghammar B, Dahlstedt L, et al. Synovial fluid cytokines in patients with rheumatoid arthritis or other arthritic lesions. *Scandinavian journal of immunology* 1998;48:286–92.
53. Tetta C, Camussi G, Modena V, Di Vittorio C, Baglioni C. Tumour necrosis factor in serum and synovial fluid of patients with active and severe rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1990;49:665–67.
54. Larsson S, Englund M, Struglics A, Lohmander LS. Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in synovial fluid are associated with progression of radiographic knee osteoarthritis in subjects with previous meniscectomy. *Osteoarthritis and cartilage* 2015;23:1906–14.
55. Orita S, Koshi T, Mitsuka T, Miyagi M, Inoue G, Arai G, et al. Associations between proinflammatory cytokines in the synovial fluid and radiographic grading and pain-related scores in 47 consecutive patients with osteoarthritis of the knee. *BMC musculoskeletal disorders* 2011;12:144.
56. Nagatsu T, Sawada M. Inflammatory process in Parkinson's disease: Role for cytokines. *Current pharmaceutical design* 2005;11:999–1016.
57. Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brüstle O, Thomson JA. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 2001;19:1129–33.
58. Fehrer C, Lepperdinger G. Mesenchymal stem cell aging. *Experimental gerontology* 2005;40:926–30.
59. Gibon E, Lu L, Goodman SB. Aging, inflammation, stem cells, and bone healing. *Stem cell research & therapy* 2016;7:44.
60. Ospelt C, Gay S, Klein K. Epigenetics in the pathogenesis of RA. *Seminars in immunopathology* 2017;39:409–19.
61. Klein K, Ospelt C, Gay S. Epigenetic contributions in the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2012;14:227.
62. Karmann K, Min W, Fanslow WC, Pober JS. Activation and homologous desensitization of human endothelial cells by CD40 ligand, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *The Journal of experimental medicine* 1996;184:173–82.
63. König M, Wallach D, Resch K, Holtmann H. Induction of hyporesponsiveness to an early post-binding effect of tumor necrosis factor by tumor necrosis factor itself and interleukin 1. *European journal of immunology* 1991;21:1741–45.
64. Chijimatsu R, Kobayashi M, Ebina K, Iwahashi T, Okuno Y, Hirao M, et al. Impact of dexamethasone concentration on cartilage tissue formation from human synovial derived stem cells in vitro. *Cytotechnology* 2018;70:819–29.

65. Kim K-S, Kim C-H, Hwang D-Y, Seo H, Chung S, Hong SJ, et al. Orphan nuclear receptor Nurr1 directly transactivates the promoter activity of the tyrosine hydroxylase gene in a cell-specific manner. *Journal of neurochemistry* 2003;85:622–34.

8. Danksagung

Zunächst möchte ich mich recht herzlich bei Dr. Zsuzsa Jenei-Lanzl bedanken, die mich über den Verlauf des Projekts hervorragend betreut hat. Ihre durchdachte Planung und vorangegangene Etablierung von Methoden ermöglichte es mir, die Fragestellung zügig zu bearbeiten. Sie gab mir Freiraum zur eigenständigen Arbeit, stand aber dennoch stets und unmittelbar für Nachfragen zur Verfügung. Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Straub danken. Er ermöglichte es mir, meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und stand immer mit fachlichen und persönlichen Ratschlägen zur Seite.


Mein Dank gebührt ausserdem Herrn Prof. Kees vom Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Regensburg, ohne den die HPLC-Messungen nicht möglich gewesen wären. Auch Elena Underberg, Madlen Meltzer, Luise Rauch, Angelika Gräber, Dr. Hubert Stangl und Dr. Torsten Lowin möchte ich für die fachliche Unterstützung und die netten Gespräche meinen herzlichen Dank aussprechen.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und Brüdern für die wertvolle Unterstützung während des gesamten Medizinstudiums.

9. Lebenslauf

10. Originalarbeit

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

TNF inhibits catecholamine production from induced sympathetic neuron-like cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis *in vitro*

Markus Herrmann¹, Sven Anders², Rainer H. Straub¹ ¹ & Zsuzsa Jenei-Lanzl^{1,3}

Synovial adipose stem cells (sASC) can be differentiated into catecholamine-expressing sympathetic neuron-like cells to treat experimental arthritis. However, the pro-inflammatory tumor necrosis factor (TNF) is known to be toxic to catecholaminergic cells (see Parkinson disease), and this may prevent anti-inflammatory effects in inflamed tissue. We hypothesized that TNF exhibits inhibitory effects on human differentiated sympathetic tyrosine hydroxylase-positive (TH+) neuron-like cells. For the first time, iTH+ neuron-like sympathetic cells were generated from sASCs of rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) synovial tissue. Compared to untreated controls in both OA and RA, TNF-treated iTH+ cells demonstrated a weaker staining of catecholaminergic markers in cell cultures of RA/OA patients, and the amount of produced noradrenaline was markedly lower. These effects were reversed by etanercept. Exposure of iTH+ cells to synovial fluid of RA patients showed similar inhibitory effects. In mixed synovial cells, significant effects of TNF on catecholamine release were observed only in OA. This study shows that TNF inhibits iTH+ synovial cells leading to the decrease of secreted noradrenaline. This might be a reason why discovered newly appearing TH+ cells in the synovium are not able to develop their possible full anti-inflammatory role in arthritis.

In previous studies, newly appearing tyrosine hydroxylase-positive (TH+) catecholamine-producing cells have been detected in synovial tissue of rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) patients^{1,2}. Catecholamines, such as noradrenaline (NA) are able to mediate anti-inflammatory effects in RA depending on concentration and targeted receptor subtype (it is β 2-adrenergic)^{3,4}. The anti-inflammatory character of these TH+ cells has been demonstrated *in vivo* by adoptive transfer of generated TH+ cells in the collagen type II-induced arthritis model in mice⁵.

Generation of these TH+ cells might be possible using synovial adipose stem cells (sASC), because mesenchymal stem cells can differentiate into sympathetic neuron-like cells⁵⁻⁸. Different cell types, such as fibroblasts, macrophages or B cells have been identified among these spontaneously appearing TH+ cells in RA and OA synovial tissue¹. Moreover, resident synovial stem cells^{9,10} might differentiate to a catecholaminergic phenotype, given the fact that brain-derived neurotrophic factor, well known to drive differentiation of new catecholaminergic neurons, is present in inflamed joints^{11,12}. The question appears whether, or not, the inflammatory environment interferes with TH+ cells.

The cytokine TNF is a major mediator of inflammation, it often starts the chronological cascade of inflammation, and it has also been shown to play a role in neuroinflammatory brain disorders¹³⁻¹⁵. An early study in Parkinson disease showed a reduced TH expression in the CNS of TNF-overexpressing mice¹⁶. In a rat Parkinson

¹Laboratory of Experimental Rheumatology and Neuroendocrine Immunology, Department of Internal Medicine, University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany. ²Department of Orthopedic Surgery, University Hospital Regensburg, Asklepios Clinic Bad Abbach, Kaiser Karl IV Allee 3, 93077, Bad Abbach, Germany. ³Dr. Rolf M. Schwieter Research Unit for Osteoarthritis, Orthopedic University Hospital Friedrichsheim gGmbH, Frankfurt/Main, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to R.H.S. (email: rainer.straub@ukr.de)

	Osteoarthritis	Rheumatoid Arthritis
number	24	16
age, yr	70.5 ± 9.1 [44–81]	65.1 ± 8.8 [51–82]
women/men, n (%)	15/9 (37.5/62.5)	10/6 (62.5/37.5)
C-reactive protein, mg/l	1.8 ± 1.8	5.9 ± 6.1
Medication		
daily prednisolone, mg	0 (0)	6.05 ± 4.8
prednisolone, n (%)	n.a.	11 (68.8)
methotrexate, n (%)	n.a.	6 (37.5)
leflunomide, n (%)	n.a.	2 (12.5)
sulfasalazine, n (%)	n.a.	0 (0)
hydroxychloroquine, n (%)	n.a.	0 (0)
non-steroidal antiinflammatory drugs, n (%)	24 (100)	16 (100)
opioid analgesics, n (%)	2 (8.3)	4 (25)
biologicals, n (%)	n.a.	1 (6.1)

Table 1. Characteristics of patients under study. Data are given as means ± SEM, percentages in parentheses, and ranges in brackets. Abbreviation: n.a., not applicable.

disease model, TNF was toxic to catecholaminergic neurons¹⁷, which was also confirmed *in vitro*^{18–21}. Thus, inhibiting TNF might also influence catecholamine production of these cells.

Neutralizing TNF using anti-TNF strategies is an established therapy option in inflammatory diseases^{22,23}. During the last decade, numerous TNF-inhibitors were developed, e.g. etanercept (soluble TNF receptor 2), which has been shown to be neuroprotective in a mouse model of Parkinson disease²⁴. TNF inhibitors down-regulate a range of pro-inflammatory cytokines in synoviocytes of RA patients^{25,26}. They ameliorate joint disease in a murine collagen type II-induced arthritis model^{27–29}. However, the effect of TNF or/and anti-TNF on anti-inflammatory TH+ catecholamine-producing cells in chronic arthritis is not yet known. If TNF interferes with catecholamine production by inhibiting TH in synovial cells, this would be a proinflammatory signal due to the anti-inflammatory role of catecholamines at high concentrations through β 2-adrenergic receptors^{3,4}.

Since TH can be upregulated under hypoxic conditions in induced TH+ cells⁵, the phenomenon might be even more evident at low oxygen tension. Most of the studies on TNF inhibitors were limited only to normoxic conditions. Only one study analysing TNF effects on catecholaminergic PC12 cells was performed under hypoxia confirming an influence on TH expression³⁰. This is a very important point because inflammation is accompanied by hypoxia³⁰, and the milieu in the joint tissue is hypoxic³¹.

Taken all background information together, we hypothesized that we can differentiate sASC into iTH+ catecholamine-producing cells. We also hypothesized that TNF inhibits characteristic features of iTH+ catecholamine-producing cells, whether differentiated from sASC or derived from chronically inflamed synovium. It was further hypothesized that neutralization of TNF results in an enhanced TH expression and catecholamine secretion. Material of patients with RA and OA was in the focus.

Material and Methods

Patients. Synovial tissue and synovial fluid was obtained from patients with OA and RA during knee joint replacement surgery (characteristics of patients in Table 1). Diagnosis of RA was based on the established criteria according to the American College of Rheumatology (formerly, the American Rheumatism Association)³². Patients were informed about the purpose of the study and gave written consent. The project was approved by the Ethics Committee of the University of Regensburg (Number 13-101-0135). All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

Human synovial adipose tissue-derived stem cells (sASC). Human synovial adipose tissue was obtained from patients with OA and RA during knee joint replacement surgery (see above). sASCs were isolated as described elsewhere^{33,34}. After isolation, cells were expanded in monolayer cultures and stem cell markers were investigated by FACS analysis as suggested by *The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*³⁵. The mesenchymal stem cell characteristics of OA and RA sASCs was confirmed by FACS analysis: sASCs were positive for the surface markers CD73, CD90, and CD105 and were negative for HLA-DR, CD11b, CD19, CD34, and CD45 (Fig. 1)³⁵. Passage 3–4 cells were used for catecholaminergic differentiation experiments into the direction of human induced TH+ cells (see next section).

Generation of human induced TH+ cells (iTH+) and imaging of morphology. Human sASC were plated on poly-D-lysine in flasks and chamber slides (20,000 cells/cm²) as described elsewhere⁶. On day 1, catecholaminergic induction was initiated with a specific catecholaminergic medium containing B27 supplement (Life Technologies, Darmstadt, Germany), sonic hedgehog, fibroblast growth factor 8, basic fibroblast growth factor, and on day 9 with additional brain-derived neurotrophic factor (all from PeproTech GmbH, Hamburg, Germany)⁶. The obtained cells were handled as individual cell cultures of each patient.

During 12 days of differentiation, cells were treated with 1 ng/ml or 10 ng/ml TNF (representing a different degree of inflammation). In order to test, whether possible TNF-specific effects during iTH+ cell differentiation

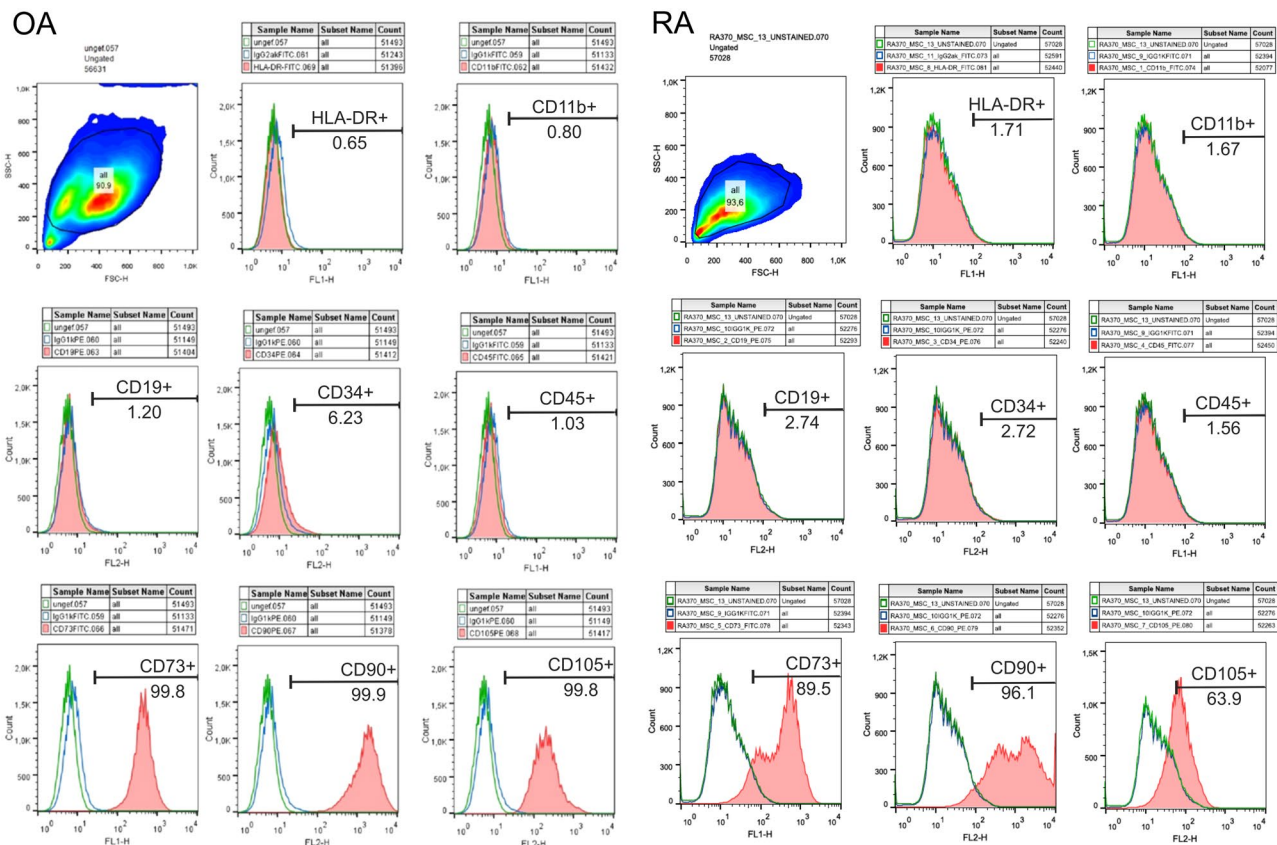


Figure 1. Characterization of MSC-specific surface markers of synovial adipose tissue-derived stem cells (sASCs) isolated from osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) donors. sASCs were positive for CD73, CD90, and CD105 and were negative for HLA-DR, CD11b, CD19, CD34, and CD45 as suggested by *The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*³⁵. The red line gives the target surface marker, the green line the unlabeled negative control, and the blue line demonstrates the isotype.

might be caused by synovial fluid, we treated OA and RA sASCs during catecholaminergic differentiation with the synovial fluid of the same patient (1 ml synovial fluid/10 ml cell culture medium).

To block TNF-specific effects, the soluble TNF receptor etanercept was used in low and high concentrations (1 µg/ml or 10 µg/ml). Differentiation was performed under hypoxic conditions. Hypoxia was defined as 1% oxygen tension, because inflamed synovial tissue is known to be strongly hypoxic³¹. After 12 days of differentiation, cells were investigated macroscopically and by immunofluorescent staining of differentiation markers such as TH, β-III-tubuline (a neuronal intracellular scaffold protein), vesicular monoamine transporter 2 (VMAT-2), and nuclear receptor related 1 (Nurr1)^{5–8}.

Cells with dendritic shape were counted manually by a blinded experimenter using phase contrast images of differentiated cultures ($n = 8$ RA slides, $n = 8$ OA slides) and the ratio of dendritic-shaped cells to total cell count was calculated.

For catecholamine determination by HPLC (see below), supernatant was acidified using 20 µl of 0.1 M perchloric acid, and samples were frozen at -80°C .

Human mixed synovial cell culture. Synovial tissue preparation and removal of synovial cells was performed as described earlier³⁶. Pieces of synovial tissue of up to 9 cm² were excised. One part of the synovial tissue specimen was minced and placed in Dispase I (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). Digestion was carried out for at least 1 hour at 37 °C on a shaking platform. The resulting suspension was filtered (70 µm) and spun at 300 g for 10 min. The pellet was then treated with erythrocyte lysis buffer for 5 min and centrifuged for 10 min at 300 g. The pellet was re-suspended in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) with 10% fetal calf serum.

For stimulation, 50,000 mixed synovial cells per ml were transferred into cell culture flasks. The obtained cells were handled as individual cell cultures of each patient (no pooling). Mixed synovial cells (containing fibroblasts, macrophages, lymphocytes, and dendritic cells as demonstrated in an earlier study, ref.¹) were incubated under hypoxic conditions in cell culture flasks. Synovial cells were incubated for 24 h with different concentrations and combinations of TNF and etanercept as described above. For catecholamine measurements samples were prepared as described above.

Immunofluorescence. Cells in chamber slides were fixed with 3.7% paraformaldehyde, underwent drying, and were stored at -20°C until analyses. For immunofluorescent analyses, cells in chamber slides were rehydrated with 1x phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min. After blocking (10% bovine serum albumine, 10% chicken serum, and 10% goat serum), chamber slides were incubated with primary antibodies to TH (AB152; Merck Millipore, Schwalbach, Germany), β -III-tubulin (Abcam, Cambridge, UK), VMAT-2 (Abcam, Cambridge, UK), and Nurr1 (Abcam, Cambridge, UK) at room temperature for 3 h. Primary staining was visualized using Alexa Fluor-labeled secondary antibodies (goat anti-rabbit Alexa Fluor 598 for TH and Nurr1; goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 for β -III-tubulin and VMAT-2). Cell nuclei were counterstained with DAPI. Numbers of fluorescently stained cells were counted manually by a blinded experimenter ($n = 8$ RA slides, $n = 8$ OA slides) and the ratio of stained cells to total cell count was calculated.

Noradrenaline quantification. NA in the cell culture medium was assayed by high pressure liquid chromatography with electrochemical detection as previously described by us³⁷.

LDH assay for cell viability. Cell viability was determined by measuring LDH (lactate dehydrogenase) activity in supernatants after stimulation experiments. The assay was performed according to manufacturer instructions (Takara Bio Company, Kusatsu, Japan). The positive toxic control was methanol.

Data analysis. Numbers of experimental samples investigated are given in the respective figure legends. Data are presented as box plots and as % of controls due to naturally occurring variation in primary cell cultures. Comparisons between two experimental groups were performed using Mann-Whitney-U test. Comparisons between more than two groups were carried out using ANOVA (when data were normally distributed) or ANOVA on ranks (when normal distribution was not given). We applied post-hoc analysis for multiple comparisons according to Bonferroni (SigmaPlot V.11, Systat Software, Erkrath, Germany). P values less than 0.05 were considered significant.

Results

TNF effect on cell morphology. Morphological analysis with phase contrast microscopy demonstrated that iTH+ cells exhibited a neuron-like morphology with branches. In contrast to original fibroblast-like sASC, iTH+ cells formed more intercellular connections after 12 days of differentiation (ref.⁵, Fig. 2A, representative picture).

Regarding iTH+ morphology, we observed qualitative differences between OA and RA: untreated RA iTH+ cells showed more elongated cell bodies and less branching compared to OA iTH+ cells, but cell-to-cell contacts were still visible (Fig. 2B,C untreated). The quantification of cells with dendritic shape confirmed this observation, however, the difference between OA and RA untreated groups was not significant (Fig. 2D untreated).

In OA iTHs and RA iTH+, TNF (10 ng/ml) treatment caused morphological changes, which result in thinning and decreased dendritic shape branching (Fig. 2B). This phenomenon was not observed to the same extent in RA iTH+ cells but was visible, too (Fig. 2C and D, not significant). The difference between OA and RA might be a consequence of the proinflammatory priming of these cells in the tissue before surgery.

Etanercept (in low or high dose) or combinations of TNF plus etanercept did not influence cell morphology in both OA and RA iTH+ cells compared to the respective OA and RA untreated iTH+ (Fig. 2B–D). In general, there was a somewhat higher level of dendritic-shaped cells in OA compared to RA (Fig. 2D), which indicates a better differentiation result in OA cells.

TNF effect on catecholaminergic differentiation markers in iTH+ cells. Untreated OA and RA iTH+ cells strongly expressed catecholaminergic markers such as TH, VMAT-2, Nurr1, and β III-tubulin (ref.⁵, Fig. 3). After TNF treatment (10 ng/ml), the expression of these markers was clearly suppressed demonstrated by weaker staining (Fig. 3). The TNF inhibitor etanercept (low and high concentration) alone had no effects on catecholaminergic markers, neither in OA nor in RA iTH+ cells (Fig. 3). However, TNF-mediated suppression of TH, VMAT-2, Nurr1, and β III-tubulin expression was visibly reversed by both low and high etanercept concentrations in OA and in RA iTH+ cells treated with TNF (Fig. 3).

All observations for all four catecholaminergic markers were confirmed by quantification of immunofluorescent stainings. In both, untreated OA and RA iTH+ cultures, the ratio of stained cells to total cell count was near 1.0, indicating successful differentiation of the whole cell culture (Fig. 4). In OA and RA iTH+ culture, TNF reduced the ratio of stained to total cells for each catecholaminergic marker (Fig. 4), which was reversed by both low and high etanercept concentrations (Fig. 4). In addition, there were no marked differences between OA and RA cells in a direct comparison (Fig. 5).

Representative control immunofluorescence images with a rabbit IgG isotype are given in Suppl. Fig. 1.

Effect of TNF and synovial fluid on noradrenaline release during iTH differentiation. In supernatants of untreated control cells, NA was detectable in proper amounts (OA: 1.38 ± 2.55 ng/ml; RA: 1.30 ± 3.00 ng/ml; dashed line in Fig. 6). In both OA and RA patients, undifferentiated sASCs synthesized very low amounts of NA (OA: 27.6 ± 69.4 pg/ml; RA: 59.3 ± 127.0 pg/ml), at a level of 10% of control iTH+ cells (Fig. 6). TNF treatment (10 ng/ml and 1 ng/ml) resulted in significantly reduced NA release in RA and OA iTH+ cells (Fig. 6). Etanercept alone did not influence NA release at low and high concentrations, neither in OA nor in RA iTH+ cells (Fig. 6). Etanercept at low and high concentrations normalized the TNF-induced decrease of NA in OA and RA iTH+ cells (Fig. 6).

In order to test, whether TNF-specific effects on NA release during iTH+ cell differentiation might be related to components of synovial fluid such as TNF, we treated OA and RA sASCs during catecholaminergic

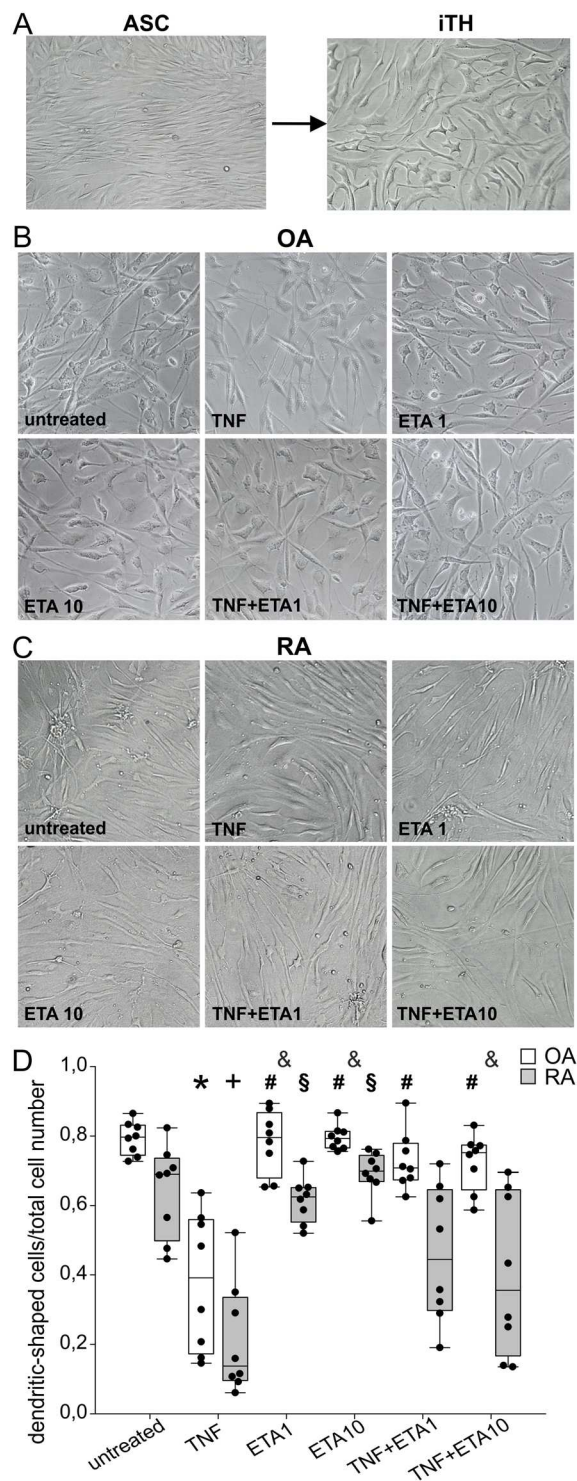


Figure 2. Morphology of generated iTH+ cells. **(A)** Change of fibroblast-like morphology of synovial adipose tissue-derived stem cells (sASC) to neuron-like morphology after 12 days of catecholaminergic differentiation (representative image of OA donor cells of one patient, magnification 200x). **(B)** Light microscopic appearance of OA iTHs after treatment with different concentrations and combinations of 10 ng/ml TNF and 1 or 10 µg/ml etanercept (ETA) (magnification 200x). **(C)** Light microscopic appearance of RA iTHs after treatment with same agents as in B (magnification 200x). **(D)** Number of fully differentiated dendritic-shaped cells after 12 days of catecholaminergic differentiation demonstrated as ratio of dendritic-shaped cells to total cell count (n = 8). Data are presented as box plots with the 10th, 25th, 50th (median), 75th, and 90th percentiles. Each black circle represents an individual patient sample. Significant p-values ($p \leq 0.05$) against OA control are presented as “*”; against OA TNF group as “#”; against RA control as “+”; against RA TNF group as “\$”; and differences between respective OA and RA groups as “&”. Abbreviations: TNF10 = TNF 10 ng/ml; TNF1 = TNF 1 ng/ml; ETA1 = Etanercept 1 µg/ml; ETA10 = Etanercept 10 µg/ml.

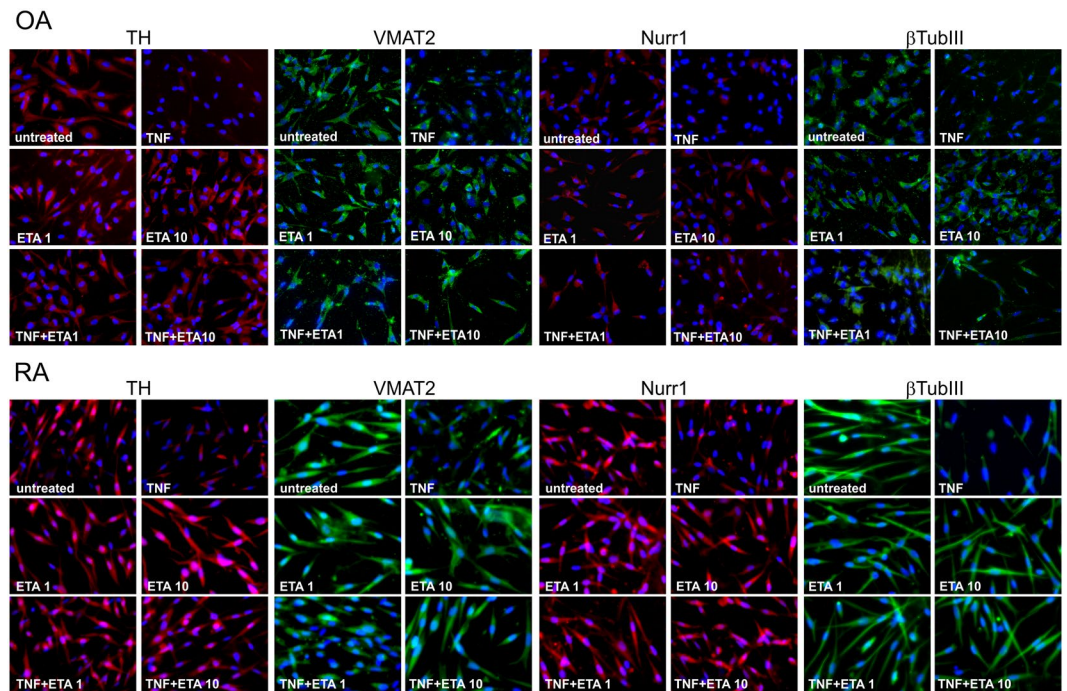


Figure 3. Effects of TNF on catecholaminergic differentiation marker expression. Immunofluorescent detection of tyrosine hydroxylase (TH, key enzyme of catecholamine synthesis), vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2), nuclear receptor related 1 protein (Nurr1), and β 3-tubulin in OA and RA adipose tissue-derived stem cells undergoing catecholaminergic differentiation treated with 10 ng/ml TNF and/or 1 or 10 μ g/ml etanercept (ETA) in different concentrations and combinations (magnification 200x).

differentiation with the patient-identical synovial fluid and neutralized TNF. The treatment of RA and OA iTH+ cells with synovial fluid drastically reduced NA release compared to untreated controls (Fig. 6). Etanercept at high concentrations partly reversed the negative effects mediated by synovial fluid, i.e., the measured NA concentrations rose but did not reach the control level (Fig. 6).

Effect of TNF on catecholamine release in mixed synovial cell culture. In earlier studies, we demonstrated the spontaneous presence of catecholamine-producing cells in synovial cell cultures^{1,2,5}. In OA mixed synovial cells, TNF (10 ng/ml) significantly inhibited NA release compared to untreated controls (Fig. 7, 84.0 ± 187.5 ng/ml = absolute levels in untreated controls [$\approx 5 \times 10^{-7}$ M]). In OA mixed synovial cells, etanercept alone did not affect NA release, but visibly reversed TNF-mediated inhibition of NA release when applied at low or high concentrations (Fig. 7). In contrast, TNF or/and etanercept treatment of RA mixed cell cultures did not influence NA release when compared to control cells (Fig. 7, 88.8 ± 158.2 ng/ml = absolute levels in untreated controls [$\approx 5 \times 10^{-7}$ M]).

Effect of TNF and synovial fluid on cell viability. In both, OA and RA iTH+ cell cultures, neither TNF nor etanercept (low or high concentration) or both substances in combination affected cell viability (Fig. 8A). Similarly, in mixed cell cultures of OA and RA patients, no toxic effect of TNF or etanercept was observed (Fig. 8B). Compared to untreated control, synovial fluid treatment similar to 10 ng/ml TNF treatment did not change cell viability in both OA and RA iTH+ cultures (Fig. 8C). In every test, measured optical density in dead control cells ranged between 1.8 and 2.0 units. For this reason, and because calculated relative data are always given as % of untreated control cells, values of dead control cells are only given in Fig. 8C (4th box plot from left). Similarly, cell culture media showed very low optical density values as shown once in Fig. 8C (3rd box plot from left).

Discussion

Catecholamines are major neurotransmitters of the sympathetic nervous system regulating numerous physiological or pathological processes in the body^{38,39}. During RA progression and in the collagen type II model of arthritis, the loss of catecholaminergic tyrosine hydroxylase-positive (TH+) sympathetic nerve fibers occurs and, concomitantly, TH+ single cells with anti-inflammatory character appear in inflamed synovium^{1,2,5}. Since NA can have many anti-inflammatory effects through binding to the β 2-adrenergic receptor^{3,4,40}, the loss of nerve fibers was deemed a proinflammatory phenomenon, while appearance of catecholaminergic TH+ cells can be anti-inflammatory when cell numbers and catecholamine secretion are abundant (high concentrations lead to β 2-adrenergic receptor binding; at approximately $\geq 10^{-7}$ M).

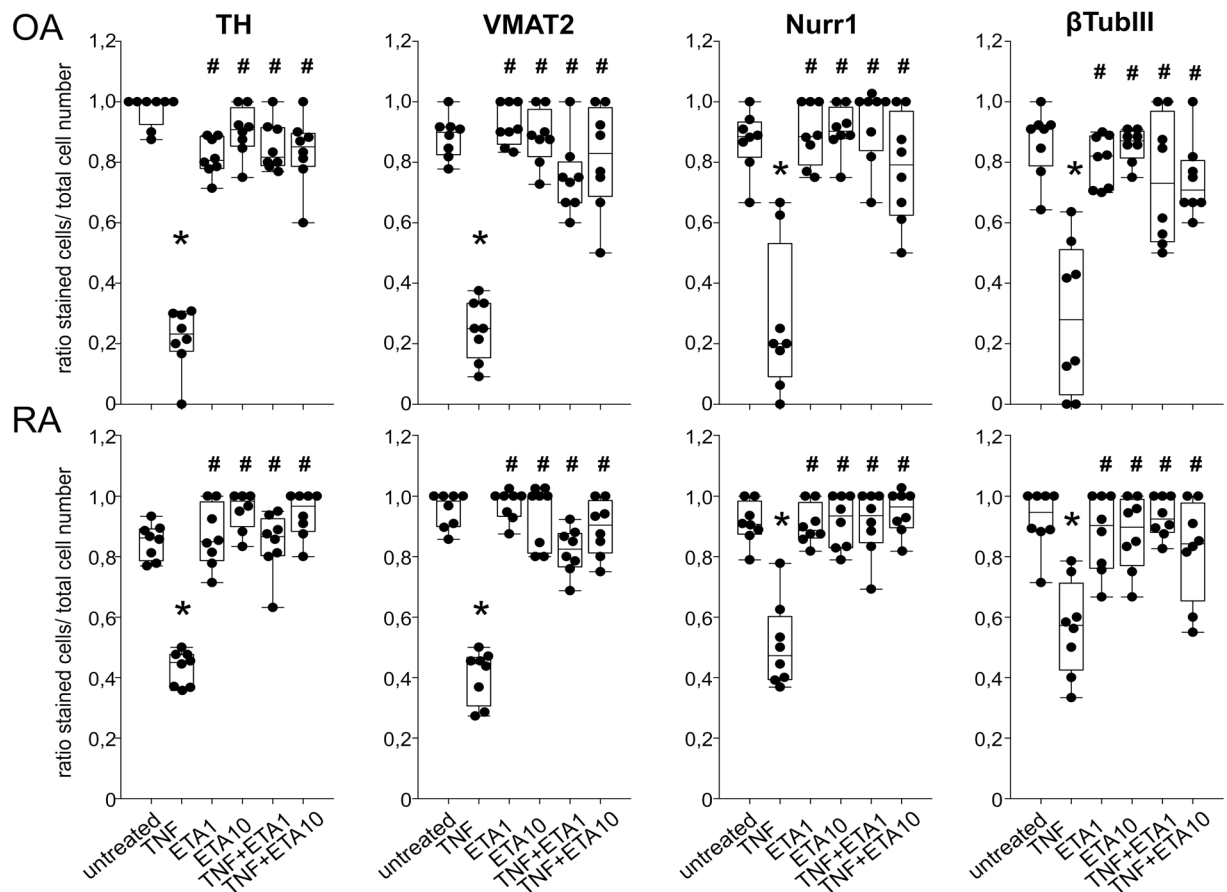


Figure 4. Quantification of catecholaminergic differentiation marker expression. Number of fully differentiated TH-, VMAT2-, Nurr1-, or β -tubulin-positive cells after 12 days of catecholaminergic differentiation demonstrated as ratio of stained cells to total cell count ($n = 8$). Data are presented as box plots with the 10th, 25th, 50th (median), 75th, and 90th percentiles. Each black circle represents a patient sample. Significant p-values ($p \leq 0.05$) against untreated control are presented as “*”; against TNF-treated group as “#”. Abbreviations: TNF10 = TNF 10 ng/ml; TNF1 = TNF 1 ng/ml; ETA1 = Etanercept 1 μ g/ml; ETA10 = Etanercept 10 μ g/ml.

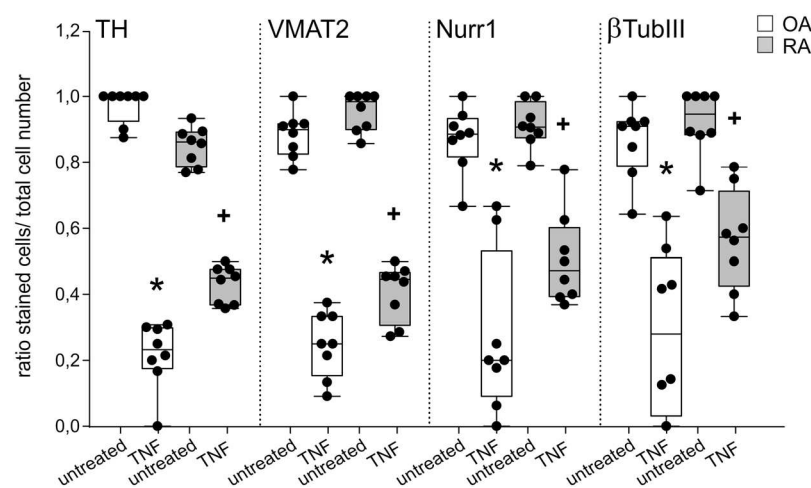


Figure 5. Differences between OA and RA in catecholaminergic differentiation marker expression. Number of fully differentiated TH-, VMAT2-, Nurr1-, or β -tubulin-positive cells after 12 days of catecholaminergic differentiation demonstrated as ratio of stained cells to total cell count ($n = 8$). Data are presented as box plots with the 10th, 25th, 50th (median), 75th, and 90th percentiles. Each black circle represents a patient sample. Significant p-values ($p \leq 0.05$) against OA control are presented as “*”; against RA control as “+”. Abbreviations: TNF10 = TNF 10 ng/ml; TNF1 = TNF 1 ng/ml; ETA1 = Etanercept 1 μ g/ml; ETA10 = Etanercept 10 μ g/ml.

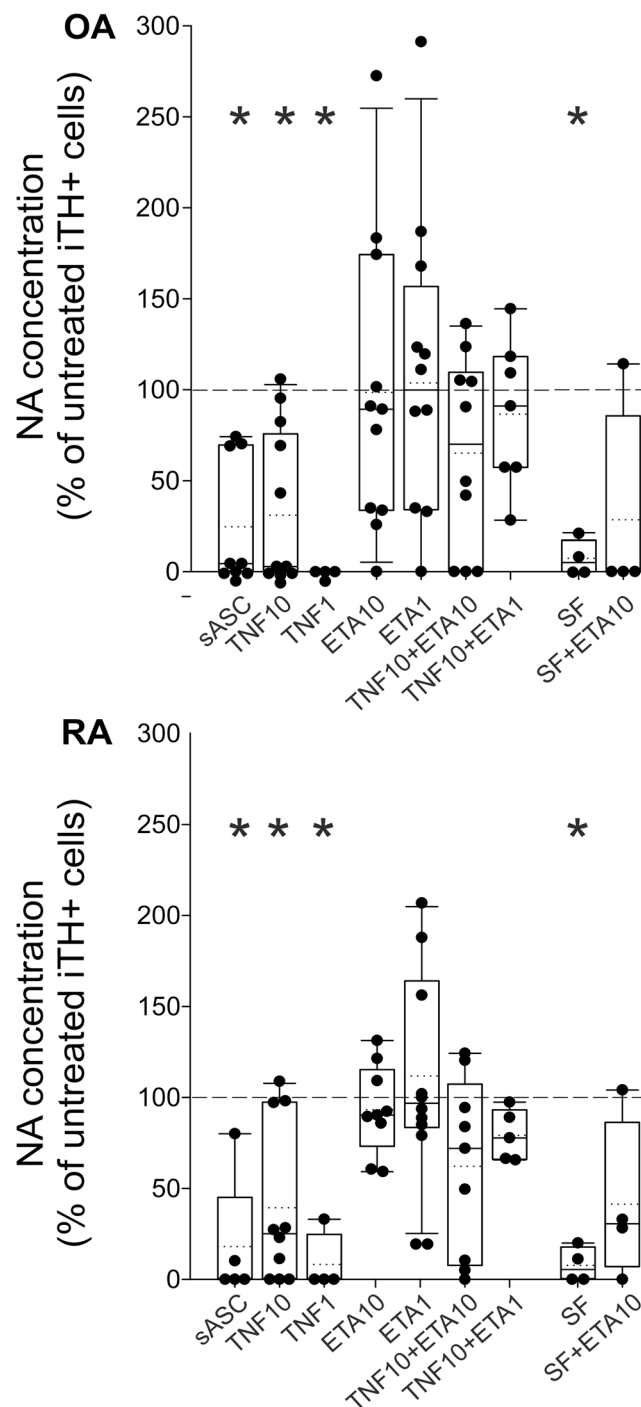


Figure 6. Effect of TNF on noradrenaline (NA) release from iTH+ cells. NA release from catecholaminergically differentiated OA and RA iTH+ cells treated with 10 ng/ml TNF or synovial fluid (SF) with/without 1 or 10 μ g/ml etanercept (ETA) in different concentrations and combinations. In all panels, data are presented as box plots with the 10th, 25th, 50th (median), 75th, and 90th percentiles. Values are demonstrated in percent of control (untreated control = 100%, dashed line; $n = 4-11$; absolute values for negative controls are given in the text). Each black circle represents a patient sample. Significant p-values ($p \leq 0.05$) against dashed line control are presented as asterisk. Abbreviations: TNF10 = TNF 10 ng/ml; TNF1 = TNF 1 ng/ml; ETA1 = Etanercept 1 μ g/ml; ETA10 = Etanercept 10 μ g/ml; SF = synovial fluid.

Since we and others discussed the use of autologous iTH+ cells as a future therapy in RA patients, further characterization of iTH+ cells is mandatory. One of the main problems in this context is the proinflammatory milieu in RA synovial tissue as exemplified by the presence of TNF^{41,42}. In the synovial fluid, TNF concentrations range between 0.1 and 5 ng/ml in RA, depending on infiltrated immune cell number^{43,44}. In OA synovial fluid,

mixed synovial cells with naturally occurring TH⁺ cells

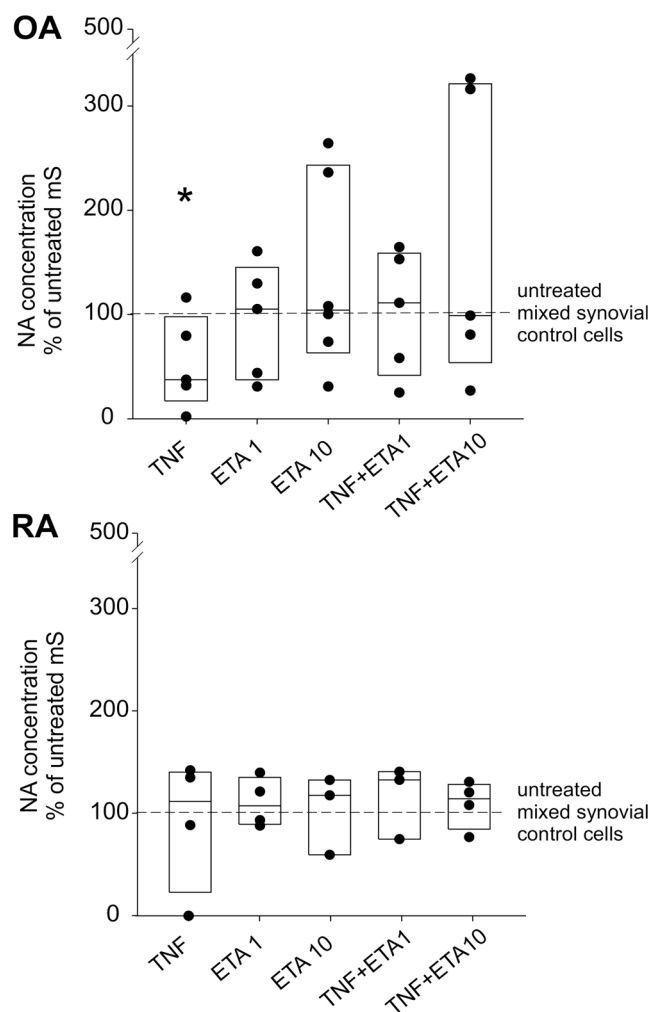


Figure 7. Effect of TNF on noradrenaline (NA) release in mixed synovial cells. NA release in OA and RA mixed synovial cell cultures treated with TNF with/without etanercept at different concentrations and combinations. In all panels, data are presented as box plots with the 10th, 25th, 50th (median), 75th, and 90th percentiles. Values are demonstrated in percent of the control (untreated control = 100%, dashed line; $n = 6-9$; absolute values for negative controls are given in the text [$\approx 5 \times 10^{-7}$ M]). Each black circle represents a patient sample. Significant p -values ($p \leq 0.05$) against control are presented as asterisk. Abbreviations: TNF = TNF 10 ng/ml; ETA1 = Etanercept 1 μ g/ml; ETA10 = Etanercept 10 μ g/ml.

TNF concentrations are lower (1–10 pg/ml, refs^{45,46}). Since TNF has been shown to mediate TH-inhibiting or cytotoxic effects on TH⁺ cells in brain diseases like Parkinson disease⁴⁷, TNF is an important cytokine that can interfere with catecholaminergic differentiation and catecholamine production. Thus, we aimed to analyze the effects of TNF on catecholaminergic differentiation of iTH⁺ cells of RA and OA patients and NA production.

The starting point of the present work was characterization of OA and RA synovial stem cells from juxtaarticular synovial adipose tissue and the generation of iTH⁺ cells according to published protocols for mesenchymal stem cells⁶⁻⁸. For the first time, human sASC were successfully differentiated into neuron-like catecholaminergic cells. It was shown that the usual fibroblast-like morphology of sASC clearly changed to a neurone-like type of cell with characteristic branches and dendritic shape. In further unpublished studies, we were able to induce axon repulsion of these sympathetic neuron-like cells by semaphorin 3F, a nerve repellent factor of sympathetic nerve fibers (unpublished results).

Morphologically, differentiation to neurone-like cells was not as perfect as known for healthy mesenchymal stem cells in mice recently performed by us⁴⁸, because these human cells did not form rosette-like structures (small three-dimensional neural tube-like structures in a rosette-shaped form)⁴⁹. There can be several reasons for this phenomenon: first, there might be a decreased potency of OA and RA stem cells to differentiate due to the age of our patients and due to medication⁵⁰. Second, the tissue stems from inflammatory lesions, which might

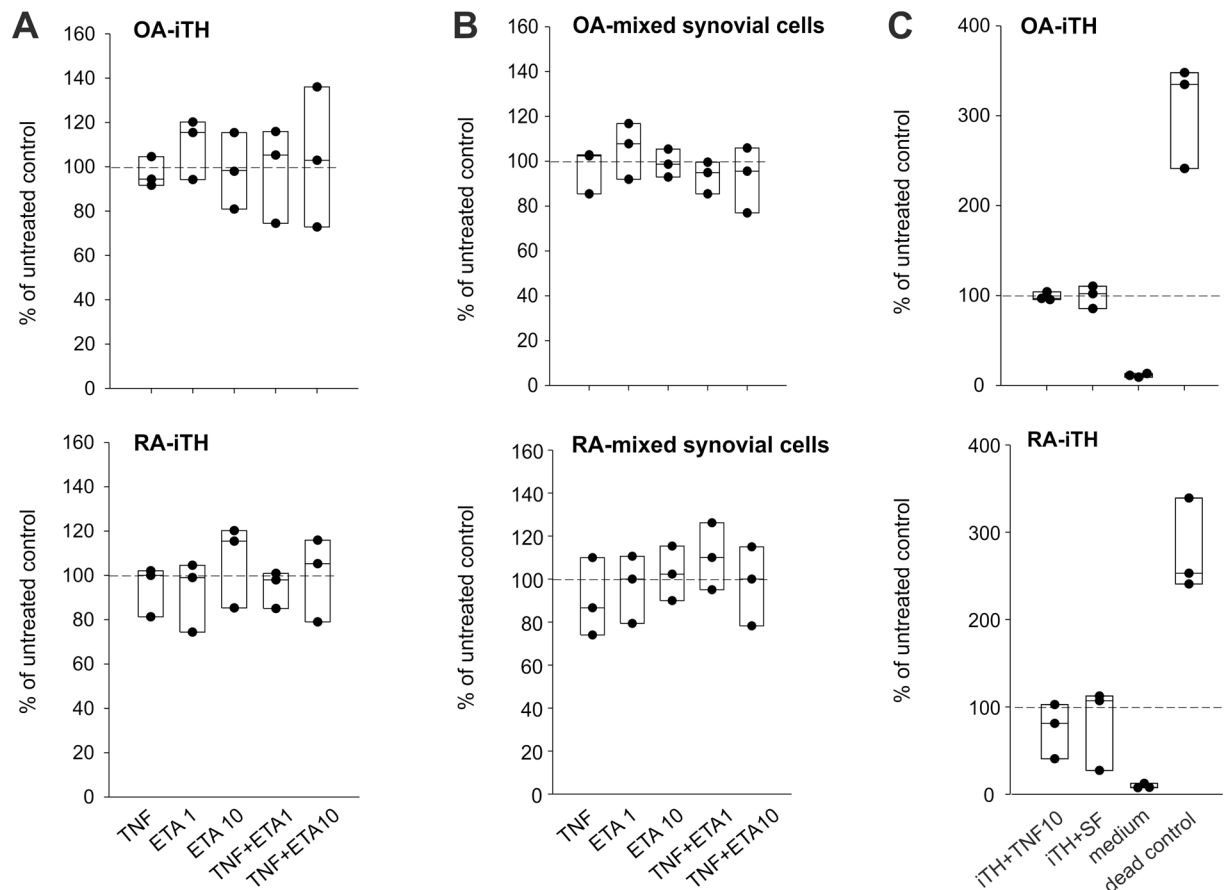


Figure 8. Effect of TNF and synovial fluid on cell viability. (A) Lactate dehydrogenase (LDH) release in osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) adipose tissue-derived stem cells after catecholaminergic differentiation and treated with 10 ng/ml TNF and/or 1 or 10 μ g/ml etanercept (ETA) in different combinations. (B) LDH release in OA and RA mixed synoviocytes treated with 10 ng/ml TNF and/or 1 or 10 μ g/ml etanercept in different combinations. (C) LDH release in OA and RA iTH+ cells after treatment with 10 ng/ml TNF or synovial fluid. In all panels, values are demonstrated in percent of the control (untreated control = 100%, dashed line; $n = 3$; absolute values for negative and positive controls are given in the text). Each black circle represents a patient sample.

obviate the differentiation process due to milieu factors⁵¹. Third, the inflammatory process can change signaling pathways and epigenetic signatures in sASC^{52,53}, which might be more severe in RA than OA. Nevertheless, the strong immunofluorescent staining of catecholaminergic markers and NA release confirmed catecholaminergic neuron-like differentiation.

In these morphological studies, we observed effects of TNF on OA iTH+ cells in the form of thinning and decreased dendritic shape branching, which was also observed in RA cells. The phenomenon seems to be due to unsuccessful catecholaminergic differentiation caused by TNF. We do not expect that this demonstrates pre-apoptotic effects because cell viability was not affected (LDH assay). This TNF-induced phenomenon was also observed in RA iTH+ cells, although untreated RA iTH+ cells did not show the same dendritic shape as OA cells, possibly because RA cells are already strongly primed by a higher TNF milieu within synovial tissue when compared to OA (RA: 0.1 and 5 ng/ml in RA, refs^{43,44}, versus OA: 1–10 pg/ml, refs^{45,46}).

One might expect that RA cells are desensitized towards TNF when compared to OA cells. This form of homologous desensitization towards TNF is well known and it can lead to hyporesponsiveness towards TNF^{54,55}. Another factor might be medication, which is different in RA versus OA patients. Particularly, glucocorticoids might change the behavior of investigated cells. Due to the numbers of patients that can be investigated in these studies, the influence of medication cannot be studied separately.

Prominent catecholaminergic markers, TH, VMAT2, Nurr1, and β III tubulin^{5–8} were strongly expressed after differentiation and all were clearly inhibited by TNF treatment. TNF is known to suppress TH expression¹⁶, which might be indirect through Nurr1 suppression, because Nurr1 directly activates the promoter of the tyrosine hydroxylase gene⁵⁶. At present, no studies exist regarding TNF effects on VMAT2 and β III tubulin expression so that the demonstrated findings concerning these markers are novel.

TNF-induced loss of catecholaminergic differentiation was particularly visible when looking on NA concentration in supernatants. In differentiated iTH+ cells, TNF-induced inhibition of NA was similar in OA and

RA cells, and etanercept reversed these effects. Similarly, patient-identical synovial fluid inhibited NA secretion, which was partly reversed by etanercept. Since reversal with etanercept was incomplete, one expects further inhibitor factors existing in synovial fluid.

In contrast, in mixed synovial cells, NA concentration was markedly reduced in supernatants of TNF-treated OA cells only but not of RA cells. Effects were reversed by etanercept. For different effects in OA and RA mixed synovial cells, homologous desensitization of TNF receptors by TNF and other proinflammatory cytokines might play a role^{54,55}. The possible role of medication was discussed above. All effects were independent of cell viability as tested with the LDH assay.

One might argue that concentrations of NA were too low to exert anti-inflammatory effects in our *in vitro* experiments, which are expected to start at equal or greater than 10^{-7} M. The measured concentrations were approximately 10^{-8} M in sASC-derived iTH+ and about 0.5×10^{-6} M in mixed synovial cells of patients, where these TH+ cells are already present. For the mixed synovial cells, NA levels would be high enough to exert anti-inflammatory effects. For iTH+ cells, a higher NA concentration can be expected with increased cell numbers in the culture dish. These experiments were carried out *in vitro* under certain culture conditions that yielded the demonstrated results. However, other conditions with higher cell numbers might have shown NA levels up to 10^{-6} M.

In conclusion, although we can generate iTH+ cells from ASCs, which can be a future platform for autologous cell therapy with these cells in RA, TNF and possibly other proinflammatory cytokines in synovial tissue and fluid might disturb the antiinflammatory role of these cells. The data also show that part of therapeutic etanercept effects possibly depend on the protection of naturally occurring iTH+ cells and their NA secretion. It needs to be studied whether once differentiated iTH+ cells can revert their phenotype into a non-catecholaminergic cell when long-term exposed to TNF and other cytokines.

References

1. Capellino, S. *et al.* Catecholamine-producing cells in the synovial tissue during arthritis: modulation of sympathetic neurotransmitters as new therapeutic target. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 1853–1860 (2010).
2. Capellino, S., Weber, K., Gelder, M., Härle, P. & Straub, R. H. First appearance and location of catecholaminergic cells during experimental arthritis and elimination by chemical sympathectomy. *Arthritis Rheum.* **64**, 1110–1118 (2012).
3. Pongratz, G. & Straub, R. H. The sympathetic nervous response in inflammation. *Arthritis Res. Ther.* **16**, 504 (2014).
4. Lorton, D. & Bellinger, D. L. Molecular mechanisms underlying beta-adrenergic receptor-mediated cross-talk between sympathetic neurons and immune cells. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 5635–5665 (2015).
5. Jenei-Lanzl, Z. *et al.* Anti-inflammatory effects of cell-based therapy with tyrosine hydroxylase-positive catecholaminergic cells in experimental arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 444–451 (2015).
6. Trzaska, K. A. & Rameshwar, P. Dopaminergic neuronal differentiation protocol for human mesenchymal stem cells. *Methods Mol. Biol.* **698**, 295–303 (2011).
7. Trzaska, K. A., Kuzhikandathil, E. V. & Rameshwar, P. Specification of a dopaminergic phenotype from adult human mesenchymal stem cells. *Stem cells* **25**, 2797–2808 (2007).
8. Trzaska, K. A. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor facilitates maturation of mesenchymal stem cell-derived dopamine progenitors to functional neurons. *J. Neurochem.* **110**, 1058–1069 (2009).
9. de Sousa, E. B., Casado, P. L., Moura Neto, V., Duarte, M. E. & Aguiar, D. P. Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives. *Stem Cell Res. Ther.* **5**, 112 (2014).
10. Jiang, Y. & Tuan, R. S. Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **11**, 206–212 (2015).
11. Grimsholm, O., Rantapaa-Dahlqvist, S., Dalen, T. & Forsgren, S. BDNF in RA: downregulated in plasma following anti-TNF treatment but no correlation with inflammatory parameters. *Clin. Rheumatol.* **27**, 1289–1297 (2008).
12. Weidler, C. *et al.* Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. *Ann. Rheum. Dis.* **64**, 13–20 (2005).
13. He, P. *et al.* Deletion of tumor necrosis factor death receptor inhibits amyloid beta generation and prevents learning and memory deficits in Alzheimer's mice. *J. Cell Biol.* **178**, 829–841 (2007).
14. Himmerich, H. *et al.* Depression, comorbidities and the TNF-alpha system. *Eur. Psychiatry* **23**, 421–429 (2008).
15. McCoy, M. K. *et al.* Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **26**, 9365–9375 (2006).
16. Aloe, L. & Fiore, M. TNF-alpha expressed in the brain of transgenic mice lowers central tyroxine hydroxylase immunoreactivity and alters grooming behavior. *Neurosci. Lett.* **238**, 65–68 (1997).
17. Gemma, C. *et al.* Early inhibition of TNFalpha increases 6-hydroxydopamine-induced striatal degeneration. *Brain Res.* **1147**, 240–247 (2007).
18. Gayle, D. A. *et al.* Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopamine cell loss in culture: roles of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and nitric oxide. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **133**, 27–35 (2002).
19. McGuire, T. R. *et al.* Organ dysfunction following stem cell transplantation: relationship to plasma cytokine concentrations. *Bone Marrow Transplant.* **28**, 889–893 (2001).
20. Sriram, K. *et al.* Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *Faseb J.* **16**, 1474–1476 (2002).
21. Sriram, K. *et al.* Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF-alpha. *Faseb J.* **20**, 670–682 (2006).
22. Bradley, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* **214**, 149–160 (2008).
23. Feldmann, M., Williams, R. O. & Paleolog, E. What have we learnt from targeted anti-TNF therapy? *Ann. Rheum. Dis.* **69**(Suppl.1), i97–i99 (2010).
24. Zhou, Q. H. *et al.* Neuroprotection with a brain-penetrating biologic tumor necrosis factor inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **339**, 618–623 (2011).
25. Brennan, F. M., Chantry, D., Jackson, A., Maini, R. & Feldmann, M. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* **2**(8657), 244–247 (1989).
26. Butler, D. M., Maini, R. N., Feldmann, M. & Brennan, F. M. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF-alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. *Eur. Cytokine Netw.* **6**, 225–230 (1995).
27. Piguat, P. F. *et al.* Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumour necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor. *Immunology* **77**, 510–514 (1992).

28. Thorbecke, G. J. *et al.* Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7375–7379 (1992).
29. Williams, R. O., Feldmann, M. & Maini, R. N. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9784–9788 (1992).
30. Goryo, K., Torii, S., Yasumoto, K. & Sogawa, K. Tumour necrosis factor-alpha suppresses the hypoxic response by NF-kappaB-dependent induction of inhibitory PAS domain protein in PC12 cells. *J. Biochem* **150**, 311–318 (2011).
31. Biddlestone, J., Bandarra, D. & Rocha, S. The role of hypoxia in inflammatory disease (review). *Int. J. Mol. Med.* **35**, 859–869 (2015).
32. Arnett, F. C. *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **31**, 315–324 (1988).
33. Estes, B. T., Diekman, B. O., Gimble, J. M. & Guilak, F. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat. Protoc.* **5**, 1294–1311 (2010).
34. Skalska, U., Kontny, E., Prochorec-Sobieszek, M. & Maslinski, W. Intra-articular adipose-derived mesenchymal stem cells from rheumatoid arthritis patients maintain the function of chondrogenic differentiation. *Rheumatology* **51**, 1757–1764 (2012).
35. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
36. Miller, L. E. *et al.* Increased prevalence of semaphorin 3C, a repellent of sympathetic nerve fibers, in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **50**, 1156–1163 (2004).
37. Kees, M. G., Pongratz, G., Kees, F., Schölmerich, J. & Straub, R. H. Via beta-adrenoceptors, stimulation of extrasplenic sympathetic nerve fibers inhibits lipopolysaccharide-induced TNF secretion in perfused rat spleen. *J. Neuroimmunol.* **145**, 77–85 (2003).
38. Laverty, R. Catecholamines: role in health and disease. *Drugs* **16**, 418–440 (1978).
39. Nagatsu, T. The catecholamine system in health and disease -Relation to tyrosine 3-monoxygenase and other catecholamine-synthesizing enzymes. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **82**, 388–415 (2007).
40. Pongratz, G. & Straub, R. H. Role of peripheral nerve fibres in acute and chronic inflammation in arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **9**, 117–126 (2013).
41. Firestein, G. S. & McInnes, I. B. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity* **46**, 183–196 (2017).
42. Mateen, S., Zafar, A., Moin, S., Khan, A. Q. & Zubair, S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin. Chim. Acta* **455**, 161–171 (2016).
43. Lettesjo, H. *et al.* Synovial fluid cytokines in patients with rheumatoid arthritis or other arthritic lesions. *Scand. J. Immunol.* **48**, 286–292 (1998).
44. Tetta, C., Camussi, G., Modena, V., Di Vittorio, C. & Baglioni, C. Tumour necrosis factor in serum and synovial fluid of patients with active and severe rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **49**, 665–667 (1990).
45. Larsson, S., Englund, M., Struglics, A. & Lohmander, L. S. Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in synovial fluid are associated with progression of radiographic knee osteoarthritis in subjects with previous meniscectomy. *Osteoarthritis Cartilage* **23**, 1906–1914 (2015).
46. Orita, S. *et al.* Associations between proinflammatory cytokines in the synovial fluid and radiographic grading and pain-related scores in 47 consecutive patients with osteoarthritis of the knee. *BMC Musculoskelet. Disord.* **12**, 144 (2011).
47. Nagatsu, T. & Sawada, M. Inflammatory process in Parkinson's disease: role of cytokines. *Curr. Pharm. Des.* **11**, 999–1016 (2005).
48. Jenei-Lanzl, Z. *et al.* Anti-inflammatory effects of cell-based therapy with tyrosine hydroxylase-positive catecholaminergic cells in experimental arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **74**, 444–451 (2015).
49. Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brustle, O. & Thomson, J. A. *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **19**, 1129–1133 (2001).
50. Fehrer, C. & Lepperding, G. Mesenchymal stem cell aging. *Exp. Gerontol.* **40**, 926–930 (2005).
51. Gibon, E., Lu, L. & Goodman, S. B. Aging, inflammation, stem cells, and bone healing. *Stem Cell Res. Ther.* **7**, 44 (2016).
52. Ospelt, C., Gay, S. & Klein, K. Epigenetics in the pathogenesis of RA. *Semin. Immunopathol.* **39**, 409–419 (2017).
53. Klein, K., Ospelt, C. & Gay, S. Epigenetic contributions in the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **14**, 227 (2012).
54. Karmann, K., Min, W., Fanslow, W. C. & Pober, J. S. Activation and homologous desensitization of human endothelial cells by CD40 ligand, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J. Exp. Med.* **184**, 173–182 (1996).
55. König, M., Wallach, D., Resch, K. & Holtmann, H. Induction of hyporesponsiveness to an early post-binding effect of tumor necrosis factor by tumor necrosis factor itself and interleukin 1. *Eur. J. Immunol.* **21**, 1741–1745 (1991).
56. Kim, K. S. *et al.* Orphan nuclear receptor Nurr1 directly transactivates the promoter activity of the tyrosine hydroxylase gene in a cell-specific manner. *J. Neurochem.* **85**, 622–634 (2003).

Acknowledgements

This study was supported by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft STR 511/32-1 (Laboratory of Experimental Rheumatology and Neuroendocrine Immunology, Department of Internal Medicine I, University Hospital Regensburg, Germany) and by JE 642/4-1 (Dr. Rolf M. Schwiete Research Unit for Osteoarthritis, Orthopedic University Hospital Friedrichsheim gGmbH, Frankfurt/Main, Germany). The authors thank Elena Underberg and Tanja Späth for excellent technical assistance and Prof. Dr. Frieder Kees (Department of Pharmacology and Toxicology, University Regensburg, Germany) for supporting HPLC measurements. This study was supported by grants of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (to R.H.S. STR 511/32-1 and to Z.J.-L. and R.H.S. JE 642/4-1).

Author Contributions

Markus Herrmann: generation of data, generating draft figures, drafting parts of the paper, final approval. Sven Anders: providing study tools and techniques, revising the draft paper, final approval. Rainer H. Straub: development of the concept, drafting parts of the paper, generating final figures, revision of the paper, final approval. Zsuzsa Jenei-Lanzl: development of the concept, generation of data, generating draft figures, drafting parts of the paper, revision of the paper, final approval.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27927-8>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018