

DISS.ETH NO: 18085

Peripheral mediatory mechanisms of behaviorally conditioned immunosuppression by cyclosporin A

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

CARSTEN RIETHER

Master of Science.; École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg (ESBS)

Born May 4th, 1980

citizen of Germany

accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Joram Feldon, examiner

Prof. Dr. Manfred Schedlowski, co-examiner

Prof. Dr. Rainer H. Straub, co-examiner

2008

Summary

The experiments in this research project are based on data demonstrating the intense communication between the central nervous system (CNS) and the immune system when applying the paradigm of conditioned immunosuppression (CIS) by the immunosuppressive agent cyclosporin A (CsA). Even though progress has been made in elucidating the central mechanisms of behavioural conditioning during the last two decades, little is known about the peripheral mechanisms behind this phenomenon. CIS was shown to be mediated via the splenic nerve and the sympathetic nervous system (SNS) predominately via β -adrenergic mechanisms. However, the peripheral mediatory mechanisms of CIS are largely unknown to date.

The research described in the present thesis aimed at identifying and evaluating distinct fundamental peripheral mechanisms of CIS with particular focus on the cellular and intracellular pathways, in order to provide a clinical framework for CIS and to further contribute to a better understanding of the principles of behavioural interaction in individuals with different neurological and immune histories. To this end, a rat model of CIS was employed to explore (i) the detection of the unconditioned stimulus (US), i.e. CsA at acquisition time by the CNS; (ii) the issue of peripheral specificity of CIS; and (iii) potential cellular and intracellular mechanisms in T lymphocytes mediating CIS.

The first series of experiments revealed that after injection of the immunosuppressive drug CsA at acquisition time and subsequent reduction in pro-inflammatory cytokine expression in the spleen 120min after injection, IL-1 β mRNA was concomitantly synthesized *de novo* in the amygdala (Am; Chapter 2). This suggests that a more physiological immuno-sensory process is implicated, and that the key brain structures involved in the acquisition of CIS not only detect peripheral cytokine increases but also “sense” a reduction in cytokine levels in the periphery, as occurred after the administration of CsA.

The next series of experiments shows the peripheral specificity and identifies calcineurin (CaN) as the target molecule of CIS (Chapter 3). Analysis of T lymphocyte proliferation and Th₁-cytokine production after conditioning identified T lymphocytes as the target cell population of CIS. In addition, CaN activity in splenic homogenates was reduced in conditioned animals. Importantly, the behavioral conditioned effects on CaN activity, cytokine production and cell proliferation were comparable in magnitude and direction to the effects elicited by administration of CsA alone, demonstrating the peripheral specificity of CIS. Therefore, these data clearly illustrate that the conditioned

response is specifically mediated on a cellular level via the inhibition of CaN and identify for the first time CaN as the target molecule of CIS.

It has also been demonstrated that CIS suppresses T lymphocyte proliferation and Th₁-cytokine secretion and is mediated via the splenic nerve and β -adrenergic mechanisms (Exton, Gierse et al. 2002; Xie, Frede et al. 2002; Pacheco-Lopez, Riether et al. 2009). Since CaN activity was shown to be reduced in spleens of conditioned rats (Pacheco-Lopez, Riether et al. 2009), we modelled the β -adrenergic-T lymphocyte interaction *ex vivo* in order to investigate the efferent intracellular mechanism mediating conditioned CIS (Chapter 4). The current data demonstrate that CaN activity in enriched T lymphocytes is transiently reduced after specific β -adrenergic agonist stimulation with terbutaline, with these effects being mediated via protein kinase A (PKA) and most likely the endogenous CaN inhibitor, A-kinase anchoring protein-150 (AKAP-150; (Liu 2003)). These suppressive effects were antagonized by the β -adrenergic antagonist nadolol. These data clearly suggest that CIS is mediated in the periphery exclusively via β -adrenergic activation of T lymphocytes and subsequent inhibition of CaN.

Together, the experimental investigations presented in this thesis are clear illustrations of (i) how the US is detected by the CNS at acquisition time and (ii) how CIS is mediated in the periphery on an intracellular level. The results thus support the peripheral specificity of CIS and identify for the first time an intracellular mechanism mediating the conditioned response, thus providing a clinical framework for the better understanding of neuro-immune interactions. This lends support to the relevance and feasibility of employing behavioural conditioning as a to supplement to standard pharmacological regimens in animals as well as in humans, and it highlights the validity of the model in psychoneuroimmunological research for investigating bi-directional brain-immune communication.

Zusammenfassung

Die in diesem Forschungsprojekt aufgeführten Experimente basieren auf der intensiven Kommunikation zwischen dem zentralen Nervensystem (ZNS) und dem peripheren Immunsystem. Afferente und efferente Verbindungswege zwischen dem ZNS und dem Immunsystem bilden die neuroanatomischen und die biochemischen Grundlagen für das Phänomen der Klassischen Konditionierung von Immunfunktionen. Anhand eines Tiermodells zur konditionierten Immunsuppression, bei dem das immunsuppressive Medikament Cyclosporin A (CsA) als unkonditionierter Stimulus (US) und saccharinhaltige Trinklösung als konditionierter Stimulus (CS) eingesetzt werden, konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die konditionierte Immunsuppression auf dem efferenten Weg über den Milznerv unter Beteiligung des Neurotransmitters Noradrenalin und β -adrenerger Rezeptoren an immunkompetente Zellen übermittelt wird. Bisher war jedoch völlig unklar, wie das ZNS auf dem afferenten Weg die CsA-induzierte Immunsuppression wahrnimmt. Ebenso war auf dem efferenten Weg bisher ungeklärt, wie spezifisch der konditionierte suppressive Effekt auf die Immunantwort ausfällt und welche zellulären Mechanismen daran beteiligt sind.

Die ersten Experimente dieser Dissertation konzentrierten sich daher auf den afferenten Informationsweg, vom peripheren Immunsystem zum Gehirn. Die Ergebnisse zeigen, dass es 120 Minuten nach intraperitonealer Injektion von CsA einerseits zu einer verminderten mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine in der Milz, andererseits zur *de novo* Synthese von IL-1 β mRNA in der Amygdala (Am) kommt (Kapitel 2). Dies deutet darauf hin, dass das ZNS nicht nur in der Lage ist einen Anstieg, sondern auch eine durch CsA-induzierte Verminderung peripherer Zytokine wahrzunehmen. Welche afferenten Kommunikationswege an der Übermittlung des Signals von der Peripherie zum Gehirn beteiligt sind, muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

In einer zweiten Reihe von Experimenten wurde die Spezifität der konditionierten Immunsuppression im direkten Vergleich mit der CsA-induzierten Immunsuppression analysiert (Kapitel 3). Die Messung von T-Zellproliferation und Th₁-Zytokinproduktion nach der Konditionierung ergaben, dass T-Lymphozyten die hauptsächlichen Zielzellen der konditionierten Immunsuppression sind. Des Weiteren zeigte sich, dass die Aktivität der Protein-Phosphatase Calcineurin (CaN) in Milzhomogenisaten nicht nur durch das Medikament CsA, welches seine immunsuppressiven Eigenschaften durch Inhibition der Aktivität von CaN induziert, vermindert war, sondern im gleichen Maße auch durch die Konditionierung inhibiert war. Diese experimentellen Befunde dokumentieren zum ersten Mal, dass CaN ein wichtiges Zielmolekül bei der konditionierten

Immunsuppression ist.

Um die intrazellulären Mechanismen der konditionierten CaN-Inhibition aufzuklären, wurde im nächsten Schritt ein *ex vivo* Modell etabliert, mit dem die Rolle β -adrenerger Rezeptorstimulation und deren mögliche Auswirkungen auf die CaN-Inhibition in T-Zellen genauer untersucht werden konnten. Die Analysen mit diesem Modell zeigen, dass die Aktivität von CaN in isolierten T-Lymphozyten nach Stimulation mit dem β -adrenergen Agonisten Terbutalin vorübergehend vermindert ist. Dieser Effekt wird durch die Proteinkinase A (PKA) und den endogenen CaN-Inhibitor, A-Kinase-Anchoring Protein (AKAP)-150, herbeigeführt. Die terbutalininduzierte Suppression der CaN-Aktivität, der T-Zellproliferation und der Zytokinproduktion konnten durch den selektiven β -adrenergen Antagonisten Nadolol aufgehoben werden. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die mit dem oben beschriebenen Modell induzierte, konditionierte T-Zellsuppression in der Milz über die Aktivierung β -adrenerger Aktivierung von Rezeptoren auf T-Lymphozyten und die daraus resultierende Hemmung von CaN vermittelt wird.

Zusammengefaßt zeigen die in dieser Dissertation beschriebenen Untersuchungen zum einen, wie der unkonditionierte Stimulus CsA vom ZNS während der Assoziationsphase wahrgenommen wird und, zum anderen, wie die konditionierte Immunsuppression intrazellulär in peripheren T-Lymphozyten vermittelt wird. Die Resultate demonstrieren insbesondere die Spezifität der konditionierten Reaktion im Immunsystem und liefern damit einen wichtigen Baustein zu einem besseren Verständnis der funktionellen Interaktion zwischen dem Gehirn und dem peripheren Immunsystem. Die tierexperimentellen Befunde unterstreichen zudem die potentielle Relevanz solcher Konditionierungsprotokolle in klinischen Situationen bei Patienten, bei denen eine Unterdrückung der Immunantwort notwendig ist. Ziel wird es hier sein, durch den Einsatz solcher Verhaltensprotokolle die Menge an Medikamenten und damit unerwünschte pharmakologische Nebenwirkungen einzusparen bei einer gleichzeitigen Maximierung der therapeutischen Effekte.