



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Einfluss cholinergischer Substanzen auf die Megakaryopoese

Autor: Sophia Thornton
Institut / Klinik: Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie
Doktorvater: Prof. Dr. P. Bugert

Acetylcholin gilt als einer der wichtigsten Neurotransmitter des menschlichen Körpers. Neben der Fähigkeit zur chemischen Weiterleitung von Nervenimpulsen konnte für Acetylcholin auch die Funktion als parakrin und autokrin wirkender Signalstoff in extraneuronalen cholinergen Systemen (NNCS für engl. non-neuronal cholinergic systems) nachgewiesen werden. Auch in Zellen der Megakaryopoese und in Thrombozyten sind einzelne Komponenten eines solchen NNCS beschrieben worden. Untersuchungen der Megakaryopoese unter Hemmung der Acetylcholinesterase (AChE) und damit einhergehenden erhöhten AcetylcholinKonzentrationen resultierten in pathologischen Veränderungen der Thrombozytenbildung. Diese Beobachtungen legen eine Beteiligung des cholinergen Systems an der Regulation der Megakaryopoese nahe. In der Arbeitsgruppe am Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie konnten kürzlich erstmals Acetylcholinrezeptoren in humanen Thrombozyten nachgewiesen werden. Insbesondere der nikotinsche Acetylcholinrezeptor $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$) ist an der Funktion der Thrombozyten beteiligt.

Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen der nAChR in Zellen der megakaryozytären Zellreihe zu charakterisieren und potenzielle rezeptorvermittelte cholinerge Signalwege, die an dem regulatorischen Einfluss des NNCS auf die humane Megakaryopoese beteiligt sein könnten, näher zu untersuchen. Basierend auf einem In-vitro-Zellkulturmodell der humanen Megakaryoblasten-Zelllinie MEG-01 wurden megakaryozytäre Zellen mittels Genexpressionsanalysen (quantitative real-time PCR) und Proteinnachweisverfahren (Western Blotting) auf das Vorkommen nikotinscher Acetylcholinrezeptoren hin untersucht. Anhand rezeptorspezifischer cholinergischer Substanzen (Agonisten: Carbamoylcholin und Nikotin; Antagonist: Methyllycaconitin) wurde die Rolle der nachgewiesenen nAChR auf die Megakaryopoese in vitro analysiert. Hierzu wurde mittels eines Phorboldesters (TPA) in MEG-01-Zellen über einen Zeitraum von fünf Tagen megakaryozytäre Differenzierung jeweils mit und ohne Zugabe der jeweiligen cholinergen Substanz induziert. Als geeigneter Parameter zur Quantifizierung der megakaryozytären Differenzierung wurde die Koexpression der beiden Integrine $\alpha 11\beta$ (CD41) und $\beta 111$ (CD61) auf der Zelloberfläche herangezogen. Um der Frage nachzugehen, in wieweit diese cholinergen Substanzen auch Thrombozyten in ihrer Funktion beeinflussen, wurde mittels Impedanzaggregometrie die Thrombozytenfunktion in Vollblut unter dem Einfluss cholinergischer Substanzen getestet.

In der vorliegenden Arbeit konnten durch qRT-PCR die Gentranskripte für die nAChR-Subtypen $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\beta 1$ und $\beta 2$ in Megakaryoblasten (MEG-01), sowie in in vitro differenzierten megakaryozytären Zellen nachgewiesen werden. Western Blot-Experimente bestätigten die Proteinexpression der Untereinheiten $\alpha 4$, $\alpha 7$ und $\beta 2$ auf allen genannten Zellen. Beide α -Untereinheiten werden dabei im Verlauf der Megakaryopoese in zunehmendem Maße auf der Zelloberfläche exprimiert. In Anwesenheit der cholinergen Substanzen Carbamoylcholin, Nikotin oder Methyllycaconitin (MLA) konnte eine Beeinflussung der megakaryozytären Differenzierung beobachtet werden: Gemessen an der CD41/CD61-Oberflächen- (FACS-Analysen) und mRNA-Expression (qRT-PCR) konnte unter dem Einfluss dieser Substanzen eine signifikante Hemmung der megakaryozytären Reifung auf transkriptionaler sowie auf translationaler Ebene über einen fünftägigen Differenzierungszeitraum beobachtet werden. Die Thrombozytenfunktionsmessungen ergaben darüber hinaus Hinweise auf eine rezeptorvermittelte Wirkung cholinergischer Substanzen auf Blutplättchen: so konnte in Vollblutproben nach Vorinkubation mit cholinergen Substanzen die in vitro induzierte Plättchenaggregation signifikant vermindert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass dem cholinergen System eine funktionelle Rolle bei der Regulation der humanen Megakaryopoese zukommt und dass Acetylcholinrezeptoren, insbesondere nAChR $\alpha 7$, durch endogene Rezeptorliganden (Carbamoylcholin) wie auch durch exogene Substanzen (Nikotin, MLA) die regulatorischen Effekte vermitteln. Diese stellt ein bislang nicht beschriebenes Regulationssystem der Megakaryopoese dar.