



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Molekulares und funktionelles Profil des Acetylcholin-Rezeptor-Systems in klassisch und alternativ aktivierten humanen Makrophagen

Autor: Giovanni Frongia
Institut / Klinik: Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. H. Kurzen

Makrophagen (M Φ) sind eine vielseitige und dynamische Zellpopulation, die eine zentrale Rolle sowohl in der spezifischen, als auch in der unspezifischen Immunantwort spielen. Unterschiedliche Zytokine induzieren ein Kontinuum an unterschiedlichen M Φ -Polarisationen (Gordon 2003). Klassisch aktivierte Makrophagen (M Φ 1) entwickeln sich durch Einwirkung pro-inflammatorischer Stimuli wie Interferon- γ (IFN- γ) oder bakterieller Produkte wie Lipopolysaccharide (LPS) und sind charakterisiert durch die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1), IL-6 und IL-12 (Hamilton et al. 2002). Alternativ aktivierte Makrophagen (M Φ 2) dagegen entwickeln sich durch die Einwirkung von IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β und Dex aktiviert (Goerdts et al. 1999, Stein et al. 1992, Gratchev et al. 2001) und sind verstärkt anti-inflammatorische Zellen, die Debris phagozytieren, die Angiogenese fördern und die sich an der Geweberemodellierung und -reparatur beteiligen (Mantovani 2004). Der von M Φ 1 und, in geringerem Maße, auch von M Φ 2 produzierte TNF- α wird als Reaktion auf bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) oder IFN- γ sezerniert. Es fördert eine pro-inflammatorische Immunreaktion und ist bei einer Fehlregulation pathognomonisch für Krankheitsbilder wie Sepsis und verschiedenen chronisch-entzündliche Erkrankungen wie Rheumatoiden Arthritis, Psoriasis-Arthritis, dem Morbus Crohn, der Multiplen Sklerose und dem Asthma bronchiale (Kollias et al. 1999, Russo et al. 2005, Mease 2003). Eine strenge Kontrolle der TNF- α -Produktion ist dadurch von eminenter Bedeutung und findet in M Φ auf mehreren Ebenen statt (Beutler 1990). Das cholinerge System ist an dieser Regulation beteiligt und interagiert mit dem Immunsystem. Es wurde gezeigt, dass die cholinergen Agonisten Acetylcholin, Muskarin und Nikotin dosisabhängig die LPS-induzierte TNF- α -Produktion in M Φ hemmen können (Borovikova et al. 2000, Wang et al. 2003, De Simone 2005). Ob dabei Unterschiede der cholinergen Effekte in Abhängigkeit von der Polarisation der M Φ bestehen wurde bisher nicht untersucht. Wenn dies der Fall wäre, könnten verschiedene Modulationsvarianten, unterschiedliche Immunantworten induzieren. In dieser Arbeit wurden IFN- γ , IL-4, Dex, IFN- γ /IL-4, IL-4/Dex stimulierte M Φ 1 und M Φ 2 auf die Präsenz cholinergere Rezeptoren untersucht, ferner die Antwort dieser M Φ auf eine cholinerge Stimulation. Mittels RT-PCR wurde in n=9 Spender-M Φ gezeigt, dass eine Polarisation nicht zu einem definierten AChR-Expressionsmuster führt und dass die α 7-ACh-Untereinheit in allen Versuchsbedingungen und bei allen Donoren nachweisbar war. In Real-Time-RT-PCR-Untersuchungen von n=7 Spender-cDNAs konnte gezeigt werden, dass die α 7-AChR-mRNA-Expression in M Φ 1_{IFN- γ} und M Φ 2_{IL-4} signifikant erniedrigt ist, unter Dex hingegen nicht signifikant verändert wird. Die Kombination IL-4/Dex induziert indessen eine signifikant höhere Expression gegenüber M Φ 1_{IFN- γ} oder M Φ 1_{IL-4}. Diese Effekte konnten in funktionellen Analysen mittels FACS nicht weiter gezeigt werden, denn es ergaben sich dabei unter den unterschiedlichen Stimulationen keine Unterschiede in der α -BGT-Bindung. Durch die begrenzte Spezifität des α -BGT für die α 7-AChR-Untereinheit sind diese FACS-Daten jedoch von begrenzter Aussagekraft. Allerdings wurde durch diese FACS-Analysen bestätigt, dass intakte α 1-, α 7- und α 9-AChR auf der Zelloberfläche polarisierter M Φ vorhanden sind. In Zellkultur-Versuchen dieser Arbeit, konnte bestätigt werden, dass die cholinergen Agonisten Nikotin und Muskarin sowohl die LPS- als auch IFN- γ -induzierte TNF- α -Synthese um bis zu 36 % hemmen können. Somit konnten die Ergebnisse der Publikationen von Ouyang et al. 2000, De Simone et al. 2005 und Matsunaga et al. 2001, jedoch nicht die Ergebnisse von Borovikova et al. 2000, bezüglich der Nikotin-bedingten Hemmung der LPS-induzierten TNF- α -Sekretion reproduziert werden. Das publizierte Hemmungsmaß von 70 – 90 % bei Borovikova et al. 2000 übersteigt in hohem Maße die

gemessenen Werte in dieser Arbeit. Unterschiede in den Versuchsansätzen konnten nicht die Differenzen in den Wirkungsausmaßen erklären. Diese sind jedoch womöglich durch die Herkunft der M Φ erklärbar. In den Versuchen vorliegender Arbeit konnten auch keine polarisationsbedingten Effekte gesehen werden, denn die Nikotin- und Muskarin-bedingten Hemmungen der LPS-induzierten TNF- α -Synthese in M Φ unterschieden sich je nach Polarisation der M Φ nicht nennenswert. Die dadurch anfangs postulierte Möglichkeit der polarisationsbedingten unterschiedlichen Modulation der M Φ konnte nicht bestätigt werden und es sind weitere Versuche notwendig, möglicherweise in einem größeren Stichprobenumfang, um sich eine genauere Aussage bezüglich der cholinergbedingten Modulation der TNF- α -Sekretion in unterschiedlich polarisierten M Φ zu erlauben. Zur Zeit ist jedoch der Regulationsweg nicht komplett verstanden und das Versuchsansatzsystem noch nicht völlig ausgereift. Dementsprechend sind weiterhin breite Grundlagenforschung sowie weitere Untersuchungen auf dem Feld molekularbiologischer sowie funktionsanalytischer Untersuchungen notwendig. Ein profunderes Wissen, über die Funktionsweise dieser Interaktion vom autonomem cholinergen Nervensystem und Immunsystem könnte in Zukunft zur Entwicklung von neuen Therapiemöglichkeiten gegen Erkrankungen mit erhöhter TNF- α -Sekretion, wie z.B. chronisch-entzündlichen Leiden oder akuten Sepsis-Ereignissen, führen. Diese Therapieansätze könnten die Prognose betroffener Patienten verbessern und deren Lebensqualität maßgeblich steigern. Nur durch weitere Forschung auf diesem Gebiet können neue erfolgreiche Therapien entwickelt werden, die in Zukunft im klinischen Alltag von großem Nutzen sein können.