

Medizinische Fakultät
der
Universität Essen

Aus dem Institut für Pharmakologie

Die chemotaktische Antwort neutrophiler
Granulozyten ist genetisch determiniert

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät der
Universität Essen

Vorgelegt von
Nikolaus Daniel Thomas Ansorge
aus Bonn-Bad Godesberg
2000

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. H. Grosse-Wilde
1. Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. W. Siffert
2. Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. H. Grosse-Wilde
3. Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. T.F. Wienker, Bonn
Tag der mündlichen Prüfung:	6. Juni 2002

Veröffentlichungen

Abstracts

Virchow, S., Ansorge, N., Siffert, W.:

A splice variant of the G protein $\beta 3$ subunit enhances the chemotactic activity of human neutrophils in response to fMLP and interleukin-8.

2nd Joint Meeting Signal Transduction: Receptors, Mediators and Genes; 1998 Nov 19-21; Langen, Germany.

Virchow, S., Ansorge, N., Siffert, W.:

The splice variant G $\beta 3$ -s of the G protein $\beta 3$ subunit causes enhanced chemotaxis of human leukocytes.

40. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie; 1999 Mar 9-11; Mainz, Germany.

In: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol 1999; 201: R54.

Publikationen

Virchow, S., Ansorge, N., Rübber, H., Siffert, G., Siffert, W. (1998):

Enhanced fMLP-stimulated chemotaxis in human neutrophils from individuals carrying the G protein $\beta 3$ subunit 825T-allele.

FEBS. Lett. 436, 155-158.

Virchow, S., Ansorge, N., Roszkopf, D., Rübber, H., Siffert, W. (1999):

The G-protein $\beta 3$ subunit splice variant G $\beta 3$ -s causes enhanced chemotaxis of human neutrophils in response to interleukin-8.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 360, 27-32.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Hormone, Rezeptoren und G-Proteine	1
1.2.	Eine neue Variante der G β 3-Untereinheit der G-Proteine	3
1.3.	Funktionen der $\beta\gamma$ -Untereinheit	5
1.4.	Chemotaxis, Chemokinesis und neutrophile Granulozyten	5
1.5.	Struktur und Funktion von Chemokinen	6
1.6.	Chemokinrezeptoren	7
1.7.	Interleukin-8 (IL-8) und N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP)	8
1.8.	Die Rolle von Chemokinen und Chemokinrezeptoren bei der Leukozytenmigration	9
1.9.	Die Rolle der Chemokine bei Entzündungskrankheiten	10
1.10.	Fragestellung	11
2.	Material und Methoden	12
2.1.	Auswahl der Probanden	12
2.2.	Präparation humaner neutrophiler Granulozyten	12
2.3.	Messung der intrazellulären Ca ²⁺ - Konzentration	13
2.4.	Messung der O ²⁻ - Freisetzung	15
2.5.	Messung der Zellmigration	15
2.6.	Bestimmung des GNB3-C825T-Polymorphismus	16
2.7.	RT-PCR	18
2.8.	Datenpräsentation und Datenanalyse	18

3.	Ergebnisse	20
3.1.	Nachweis von für G β 3 und G β 3-s kodierender mRNS in menschlichen neutrophilen Granulozyten	20
3.2.	Durch fMLP stimulierte Chemotaxis menschlicher neutrophiler Granulozyten	21
3.3.	Durch IL-8 stimulierte Chemotaxis menschlicher neutrophiler Granulozyten	24
3.4.	Der Effekt von fMLP auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in menschlichen neutrophilen Granulozyten	27
3.5.	Der Effekt von IL-8 auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in menschlichen neutrophilen Granulozyten	32
3.6.	Durch fMLP evozierte O ²⁻ - Generation	37
3.7.	Durch IL-8 evozierte O ²⁻ - Generation	38
4.	Diskussion	39
4.1.	Chemotaxis	41
4.2.	Kalzium	42
4.3.	O ²⁻ - Generation	44
4.4.	Evolutionäre Aspekte der weltweiten Verteilung des 825T-Allels	44
4.5.	Mögliche Krankheitsassoziationen	45
5.	Zusammenfassung	48
6.	Literatur	49
	Danksagung	61
	Lebenslauf	62

1. Einleitung

1.1. Hormone, Rezeptoren und G- Proteine

Hormone sind Botenstoffe, welche Aktivitäten verschiedener Zellen in vielzelligen Organismen koordinieren. Der Ausdruck Hormon (vom griechischen Wort für „anregen“) wurde erstmals im Jahre 1904 von William Bayliss und Ernest Starling gebraucht. Sie beschrieben, daß Hormone von spezifischen Geweben (Hormondrüsen) synthetisiert und ins Blut abgegeben werden, welches die Hormone zu ihren Zielzellen bringt. Die Hormone binden an Rezeptoren, die sich entweder auf der Zelloberfläche, in der Plasmamembran, oder im Zellinneren, dem Zyto- oder Karyoplasma, befinden. Die Plasmamembran selbst stellt dabei eine Barriere dar, die durch einige lipophile Substanzen passiert werden kann, zum Beispiel durch Steroidhormone, die an ihre Rezeptoren im Zytoplasma beziehungsweise Zellkern binden. Andere Substanzen binden an Rezeptoren der Plasmamembran, die ganz unterschiedliche Funktionen haben. Eine Gruppe von Rezeptoren dient als Transportprotein und bringt Substanzen ins Zellinnere (zum Beispiel der LDL-Rezeptor), eine andere Gruppe kontrolliert Ionenkanäle (zum Beispiel der nikotinische Acetylcholin- und der GABA_A-Rezeptor). Schließlich gibt es Rezeptoren, die Signale nach Aktivierung durch ihren Liganden über sogenannte intrazelluläre sekundäre Botenstoffe, "second messenger", vermitteln. Zu diesen Rezeptoren gehören einerseits Rezeptoren mit intrinsischer Enzymaktivität, wie die Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren (TKR), zum Beispiel der Insulin- oder Platelet-derived growth factor (PDGF)-Rezeptor, andererseits die große Gruppe der Rezeptoren, die Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) aktivieren.

Bislang sind über 1000 verschiedene solcher Rezeptoren bekannt, die an G-Proteine koppeln (Sprang, 1997 und Hamm, 1998). Sie finden sich in einer Vielzahl von Organismen und vermitteln Signale über die Plasmamembran ins Zytoplasma durch Interaktion mit G-Proteinen. Die Liganden dieser Rezeptoren stammen dabei aus den unterschiedlichsten Stoffgruppen und umfassen Lipide, Lipidanaloga, Amine, Aminosäurederivate, kleinere Peptide (Oligopeptide), Proteine und spezielle Stimuli, wie Photonen und Odorantien. Gekennzeichnet sind diese Rezeptoren durch sieben hydrophobe Domänen, die die transmembranspannenden Regionen darstellen, die für diese Rezeptoren charakteristisch sind. Die Kopplung an G-Proteine erfolgt über zytoplasmatische Rezeptordomänen der

zweiten und dritten Schleife, die eine Länge von 10-26 Aminosäuren aufweisen und durch von Rezeptoren abgeleitete, synthetische Oligopeptide identifiziert werden konnten (Okamoto und Nishimoto, 1991; Ostrowski et al., 1992). Nach Ligandenbindung und Aktivierung werden die Rezeptoren schnell durch homologe, spezifische Rezeptorkinasen, wie β_1 -Adrenorezeptorkinase (β ARK), und heterologe, unspezifische Proteinkinasen, wie Proteinkinase C (PKC) oder A (PKA) inaktiviert.

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten: α (Molekulargewicht (MW): 39-52 kilo-Dalton (kDa)), β (MW: 35-36 kDa) und γ (MW: 5-10 kDa). Bisher sind 22 verschiedene α -Untereinheiten, einige davon Spleißvarianten, sechs β - und mehr als zwölf γ -Untereinheiten bekannt. Im inaktiven, heterotrimeren Zustand ist Guanosindiphosphat (GDP) an die Nukleotidbindungsstelle der α -Untereinheit gebunden, das nach Rezeptor-G-Protein-Kopplung freigesetzt und durch Guanosintriphosphat (GTP) ersetzt wird. Die α -Untereinheit dissoziiert in der aktivierten, GTP-gebundenen Form vom $\beta\gamma$ -Dimer ab, das in nicht kovalent gebundener Form eine eigenständige funktionelle Einheit bildet. Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit kommt es zur Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP, und somit zur Inaktivierung der α -Untereinheit. Diese tritt anschließend wieder mit einem $\beta\gamma$ -Dimer zum inaktiven, heterotrimeren G-Protein zusammen (Gilman, 1987; Birnbaumer und Birnbaumer, 1995; Watson, und Arkininstall, 1994).

Die Einteilung der heterotrimeren G-Proteine erfolgt nach der α -Untereinheit, beziehungsweise nach dem durch diese regulierten Effektor in mehrere Familien: α_s , α_i , α_q und α_{12} . Die α -Untereinheit und das $\beta\gamma$ -Dimer aktivieren beziehungsweise inhibieren unabhängig voneinander spezifische "second messenger"-Systeme und dienen, neben deren Regulation, auch der primären Signalverstärkung. Zu den "second messenger"-Systemen, die durch heterotrimere G-Proteine reguliert werden, gehören unter anderem die Adenylylcyclase, die Phospholipasen C und D (PLC/PLD), Ionenkanäle (K^+ - und Ca^{2+} -Kanäle), sowie die cyclische Guanosinmonophosphat (cGMP) -spezifische Phosphodiesterase (Gilman, 1987; Birnbaumer und Birnbaumer, 1995; Watson und Arkininstall, 1994). Die Adenylylcyclase wird durch α_s in ihrer Aktivität stimuliert beziehungsweise durch α_i inhibiert, wodurch es zu entsprechend erhöhter beziehungsweise verminderter Bildung des intrazellulären "second messengers" cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) kommt, das seine zellulären Wirkungen im wesentlichen durch Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA ausübt. Die membrangebundenen Isoformen der PLC β , die

durch α_a , α_7 , α_{11} , α_{12} und auch $\beta\gamma$ -Dimere aktiviert werden, katalysieren die hydrolytische Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu 1,2-Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). Beide Produkte, DAG und IP₃, nehmen, wie cAMP, in der Zelle die Funktion sekundärer Botenstoffe wahr (Berridge, 1987): DAG als ein Aktivator der PKC, einem Ca²⁺-abhängigen Enzym, das an Regulationsvorgängen wie Zellwachstum und Differenzierung beteiligt ist (Nishizuka, 1984), und IP₃, das über IP₃-Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i) erhöht. Das freigesetzte Ca²⁺ beeinflusst als tertiärer Botenstoff eine Vielzahl Ca²⁺-abhängiger, intrazellulärer Vorgänge.

G-Proteine können spezifisch durch bestimmte Bakterientoxine beeinflusst werden. Wichtige Toxine in diesem Zusammenhang sind das Cholera toxin (CTX), gebildet von den Erregern der Cholera (*Vibrio cholerae*), und das Pertussis toxin (PTX), gebildet von den Erregern des Keuchhustens (*Bordetella pertussis*). Beide Toxine verändern die α -Untereinheit von G-Proteinen an spezifischen Aminosäureresten durch Transfer und kovalente Bindung eines ADP-Riboserestes. Durch diese Modifikation werden G-Proteine vom Typ α_s durch CTX permanent aktiviert oder G-Proteine vom Typ α_i durch PTX inhibiert (Gilman, 1987; Birnbaumer und Birnbaumer, 1995). PTX katalysiert die ADP-Ribosylierung eines C-terminalen Cysteinrestes an G-Proteinen vom Typ α_i und hemmt somit den Guaninnukleotidaustausch, das heißt die Rezeptor-Kopplung und die Signaltransduktion von Rezeptoren, die ganz oder teilweise über G-Proteine vom Typ α_i wirken (Carty, 1994).

1.2. Eine neue Variante der G β 3-Untereinheit der G-Proteine

Studien an Lymphoblasten von Patienten mit essentieller Hypertonie zeigten, daß bei bis zu 50 % dieser Zellen eine gesteigerte Aktivität eines Ionentransportsystems, des sogenannten Na⁺/H⁺-Austauschers vorliegt (Roskopf et al., 1993; Siffert et al., 1995). Dieser Transporter ist Teil der Regulation des zellulären Säure- und Na⁺-Haushalts und der Ausscheidung von NaCl über die Niere. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Lymphoblasten der Hypertoniker in Vergleich zu Normotonikern auf humorale Reize stärker reagierten, so zum Beispiel mit gesteigertem intrazellulären Ca²⁺-Anstieg, einem vermehrten Zellwachstum und einer gesteigerten DNA-Synthese. Diese Effekte

waren auf PTX-sensitive G-Proteinen zurückzuführen, da sie durch PTX-Vorbehandlung blockiert wurden.

Die unmittelbare G-Protein Beteiligung konnte dadurch gezeigt werden, daß Stimulation von immortalisierten Lymphoblasten mit Mastoparan-7 (MAS-7), einem Peptid, welches, ohne über einen Rezeptor zu wirken, G-Proteine direkt aktiviert, folgenden Unterschied aufwies: In immortalisierten Lymphoblasten von Hypertonikern konnte eine stärkere Stimulation der [³⁵S]GTPγS (Guanosin 5'-(γ-thio) trisphosphat)-Bindung als Maß für die G-Protein-Aktivierung gemessen werden, als in denen von Normotonikern.

Die Suche nach Veränderungen/Mutationen dieser PTX-sensitiven G-Proteine vom Typ α_i bei Normo- und Hypertonikern zeigte, daß keine der α_i -Untereinheiten eine Mutation aufwies. Ebenso konnten keine Mutationen in den β_1 - und β_2 -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine gefunden werden (Pietruck et al., 1996). In GNB3 hingegen, dem Gen, welches für die β_3 -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine kodiert, wurde in Exon 10 ein Polymorphismus an Position 825 identifiziert, der aus einer Thymin- oder Cytosinbase an dieser Nukleotidposition besteht (Siffert et al., 1998). Das betroffene Basentriplett kodiert für die Aminosäure Serin, die durch den Polymorphismus nicht verändert wird. Allerdings führt der Polymorphismus dazu, daß die prä-mRNS alternativ gespleißt werden kann. Dabei geht ein Teil des Exon 9 beim Spleißen verloren. Es entsteht eine neue, um 123 bp verkürzte mRNS, so daß ein um 41 Aminosäuren verkürztes Protein gebildet wird, die Spleißvariante β_3 -s. Die Expression dieser Spleißvariante zusammen mit α_2 und γ_5 in Sf9-Insektenzellen zeigte eine signifikante Erhöhung der durch MAS-7 stimulierten [³⁵S]GTPγS-Bindung und beweist, daß β_3 -s biologisch aktiv ist. In einer Untersuchung mit 427 Normotonikern und 426 Hypertoniepatienten konnte die Assoziation des 825T Allels mit der essentiellen Hypertonie gezeigt werden und damit als genetischer Risikofaktor identifiziert werden.

1.3. Funktionen der $\beta\gamma$ -Untereinheit

Die Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors führt zur Dissoziation der α -Untereinheit vom $\beta\gamma$ -Komplex. Die α - und die $\beta\gamma$ - Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine

regulieren unabhängig voneinander unterschiedliche Effektoren (Ford et al., 1998), die an der Regulation verschiedener Zellaktivitäten beteiligt sind (Dhanasekaran und Prasad, 1998).

Als eigenständige Regulatoren beeinflussen die $\beta\gamma$ -Dimere die Aktivität von Ca^{2+} - und K^+ -Kanälen, verschiedener Isoformen der Adenylatcyclase (Bayewitch et al., 1998), die der Phospholipase C- β 2 und die der β ARK (β -Adrenozeptorkinase). Die molekularen Grundlagen für diese Interaktionen konnten anhand der Analyse von Mutationen charakterisiert werden (Ford et al., 1998; Krapivinsky et al., 1998; Chen et al., 1997). Darüber hinaus sind sie an komplexen Signaltransduktionskaskaden wie Stimulation von Zellwachstum und -differenzierung (Dhanasekaran und Prasad, 1998), sowie der gerichteten Zellbewegung (Chemotaxis) beteiligt (Neptune und Bourne, 1997; Arai et al., 1997):

Wie Versuche mit Fragmenten der β ARK (β -Adrenozeptorkinase) und der α -Untereinheit des retinalen Transducins zeigten, ist die $\beta\gamma$ -Untereinheit der entscheidende Mediator für chemotaktische Migration. Durch diese Fragmente wurden entweder $\beta\gamma$ -Untereinheit der G-Proteine strukturell und funktionell getrennt oder die G_i -Signalübermittlung durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit blockiert (Neptune und Bourne, 1997; Arai et al., 1997).

1.4. Chemotaxis, Chemokinesis und neutrophile Granulozyten

Chemotaktische Migration wurde zuerst von dem Botaniker Wilhelm Pfeffer beschrieben. Er zeigte, daß sich bewegliche Bakterien an der Öffnung eines Kapillarrohres ansammeln, das einen „Lockstoff“, zum Beispiel Glukose, enthält (Stryer, 1991). In diesem Zusammenhang unterscheidet man zwei unterschiedliche Arten der Zellbewegung: Gerichtete Bewegung von Zellen auf bestimmte Substanzen zu wird als Chemotaxis bezeichnet, ungerichtete, zufällige, aber durch ein Stimulanz induzierte Bewegung als Chemokinese.

Diese Begriffe gelten unter anderem für die Bewegung humaner neutrophiler Granulozyten, deren Migration im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde.

Leukozyten, weiße Blutzellen, sind keine einheitliche Zellpopulation. Man unterteilt sie in Monozyten (beim Gesunden etwa 4–7 % der Leukozyten), Lymphozyten (20–40 %) und Granulozyten (60–70 %). Aufgrund lichtmikroskopisch-färberischer Eigenschaften der Granula werden letztere in neutrophile, eosinophile (2–4 %) und basophile (0,5–2 %) Granulozyten unterteilt.

Neutrophile (55-65 % der im Blut zirkulierenden Leukozyten) stehen in vorderster Linie der unspezifischen Abwehr gegen die Invasion von Mikroorganismen. 1901 zeigte Elias Metschnikoff, daß Leukozyten Bakterien phagozytieren und unschädlich machen können, und beschrieb Leukozytendiapedese als einen fundamentalen Mechanismus der Immunabwehr.

Gerichtete Bewegung von Leukozyten ist essentiell für Entzündungsreaktionen. Dieser Prozeß wird kontrolliert durch Chemokine (chemotaktische Zytokine).

1.5. Struktur und Funktion von Chemokinen

Bis zum heutigen Tag sind über vierzig Chemokine identifiziert (Luster, 1998). Zu Beginn konnte ihnen keine bestimmte biologische Aktivität zugeordnet werden, sie wurden jedoch mit Entzündungsreaktionen in Verbindung gebracht. Erst nachdem Interleukin-8 (IL-8), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) und macrophage inflammatory protein 1 α und 1 β (MIP 1 α und 1 β) als chemotaktische Faktoren für Leukozyten identifiziert worden waren (Yoshimura et al., 1987 und 1989; Matsushima et al., 1989), wurde klar, daß diese Proteine wichtige strukturelle Eigenschaften und die Fähigkeit gemein haben, Leukozyten anzuziehen. Chemokine sind basische, 8-10 kd große Proteine mit 20-70 % Homologie ihrer Aminosäuresequenz. Sie haben eine kurze, aminoternale Domäne, die einem Cysteinrest, einem β -Strang-Rückgrat und einer Verbindungsschleife zwischen zwei weiteren Cysteinresten voransteht, und eine carboxyterminale α -Helix, die aus 20-30 Aminosäuren besteht. Anhand der Position ihrer Cystein-Reste sind sie in Familien unterteilt (Baggiolini et al., 1994 und 1997). Es scheint mindestens vier verschiedene Familien von Chemokinen zu geben, von denen allerdings nur zwei genau beschrieben sind: α - und β - Chemokine enthalten vier Cysteinreste, bei den α - Chemokinen werden die ersten beiden Cysteine durch eine beliebige Aminosäure getrennt (Cystein - beliebige Aminosäure - Cystein, sogenanntes CXC-Motiv), bei den β - Chemokinen hängen die ersten beiden Cysteine zusammen (Cystein-Cystein, sogenanntes CC-Motiv). Zwei weitere bekannte Chemokine, die von dieser Klassifikation nicht erfaßt werden, sind Lymphotactin (nur zwei Cystein-Reste) und Fraktalkin (CXXXXC-Motiv) (Kelner et al., 1994; Bazan et al., 1997). Die α - Chemokine können weiter unterteilt werden in die Chemokine, die die AS-Sequenz Glutamat-Leucin-Arginin in der Nähe des N-terminalen Endes aufweisen - sie wirken chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten -, und die,

die diese AS-Sequenz nicht haben - diese wirken chemotaktisch auf Lymphozyten (Loetscher et al., 1996; Bleul et al., 1996). CXC-Chemokine vermitteln eine Vielzahl von Immun- und Entzündungsreaktionen (Baggiolini et al., 1994; Mukaida et al., 1998). β - Chemokine wirken generell nicht auf Neutrophile, ziehen aber Monozyten, eosinophile und basophile Granulozyten und teilweise auch Lymphozyten an. Bezüglich der Struktur können sie in zwei Familien unterteilt werden: In die „monozyte-chemoattractant-protein-eotaxin“ - Familie, welche die fünf MCP's und Eotaxin beinhaltet (mit Homologien von ca. 65 %) und alle anderen β - Chemokine (Luster und Rothenberg, 1997). Wie bei den α -Chemokinen sind auch bei den β -Chemokinen die N-terminalen Aminosäuren, die den Cysteinresten vorangehen, maßgeblich an der chemotaktischen Wirkung beteiligt.

1.6. Chemokinrezeptoren

Chemokine induzieren die Zellmigration und -aktivierung durch Bindung an spezifische, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf ihren Zielzellen (Premack und Schall, 1996; Murphy, 1994). Bislang wurden fünf humane CXC-Chemokinrezeptoren (CXCR1 – CXCR5), acht humane CC-Chemokinrezeptoren (CCR1- CCR8) und ein humaner CXXXC-Rezeptor (CX₃CR1) beschrieben (Murphy, 1996). CC-Rezeptoren binden ausschließlich CC-Chemokine, ähnliches gilt für die CXC-Rezeptoren. Das Vorkommen einiger Rezeptoren beschränkt sich auf bestimmte Zelltypen, so wird der CXCR1 vorwiegend auf Neutrophilen exprimiert. Andere Rezeptoren sind weiter verbreitet. Chemokinrezeptoren werden zum Teil konstitutiv exprimiert, zum Teil müssen sie erst induziert werden. Darüber hinaus ist die Expression von Chemokinrezeptoren nicht auf das hämatopoetische System beschränkt, sie werden auch auf Epithel- und Endothelzellen oder Astrozyten gefunden.

Der Rezeptor erkennt zunächst die Schleifenregion der Chemokine, daraufhin wird die N-terminale Region präsentiert, die die Triggerfunktion übernimmt (Clark-Lewis et al., 1995).

Die Stimulation von Chemokinrezeptoren führt über Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen, überwiegend vom Typ $G\alpha_i$ (Taub, 1996), zur Hemmung der Adenylylcyclase über die α -Untereinheit und über $\beta\gamma$ -Dimere via PLC β 1 unter anderem zur Produktion von Inositol-Trisphosphat. Hierdurch kommt es zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und zur Aktivierung der Proteinkinase C. Weiterhin aktivieren sie Guanosin-triphosphat-bindende Proteine der Ras und Rho Familien. Diese

sind an der Regulation Aktin-abhängiger Prozesse, der Zellmotilität (Laudanna et al., 1996) und der Aktivierung der NADPH-Oxidase beteiligt, die zur Bildung und Freisetzung von Superoxid führt (Liang et al., 1990).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Stimulation von Chemokinrezeptoren und zur Messung der G-Protein-abhängigen Aktivierung von Zellmechanismen Interleukin-8 und N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin verwendet.

1.7. Interleukin-8 (IL-8) und N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP)

Interleukin-8 (IL-8) gehört zur Familie der CXC-Chemokine und wird von einer Reihe verschiedener Zellen produziert, wie zum Beispiel von Monozyten, Alveolarmakrophagen, Endothel-/Epithelzellen und Fibroblasten. Es ist ein potentes Chemokin für humane neutrophile Granulozyten (Loetscher et al., 1994; Baggiolini et al., 1997; Ludwig et al., 1997). Je nach Zelltyp, von dem es produziert wird, besteht es aus 72 bis 77 Aminosäuren. IL-8 bindet an die beiden CXC-Rezeptoren IL8R_A (CXCR1) und IL8R_B (CXCR2), die eine Homologie von ca. 77 % aufweisen. Sie werden in hoher Dichte auf Neutrophilen, Monozyten, Basophilen, Melanomzellen und verwandten Zelllinien exprimiert. CXCR1 ist spezifisch für IL-8, wohingegen CXCR2 auch andere Chemokine bindet. Die zellulären Veränderungen, die IL-8 bewirkt, werden über PTX-sensitive G-Proteine vom Typ G_i vermittelt (Damaj et al., 1996).

N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP) ist ein synthetisches Tripeptid. Es ist strukturell verwandt mit natürlichen Bakterienprodukten, die Chemotaxis und Leukozytenmigration zum Ort der Bakterieninvasion induzieren (Niedel et al., 1979). fMLP stimuliert die Sekretion von Granula, die Superoxid-Generation und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Zellen des Immunsystems. Bislang sind die drei fMLP-Rezeptoren FPR₁, FPR₂ und FPR₃ identifiziert, wobei fMLP selektiv FPR₁ und FPR₂ aktiviert. Die Wirkung auf FPR₃ ist noch unbekannt. Die Rezeptoren bestehen aus 350, beziehungsweise 351 und 353 Aminosäuren und haben ein Molekulargewicht von 55-70 kD. Der FPR₁-Rezeptor findet sich zum Beispiel auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Der FPR₂-Rezeptor, ebenfalls exprimiert auf neutrophilen Granulozyten, weist eine Homologität von etwa 69 % zum FPR₁-Rezeptor auf und scheint eine 1000-fach höhere Affinität zu fMLP zu besitzen. Nach

Aktivierung des entsprechenden fMLP-Rezeptors werden PTX-sensitive G-Proteine vom Typ α_i aktiviert (Watson und Arkininstall, 1994).

1.8. Die Rolle von Chemokinen und Chemokinrezeptoren bei der Leukozytenmigration

Die Extravasation von Leukozyten aus dem Blut in das Gewebe, zum Beispiel bei Entzündungsreaktionen, ist ein komplexer, bislang nur unvollständig verstandener Prozeß, der eine Reihe von Interaktionen zwischen Endothelzellen und den von diesen freigesetzten Chemokinen und Leukozyten erfordert. Chemokine interagieren mit ihren Zielzellen durch Bindung an G-Proteingekoppelte Rezeptoren, die auf der Oberfläche der Zielzellen exprimiert werden. Diese Rezeptoren initiieren das Erkennen und Interpretieren des Chemokingradienten, induzieren die Umwandlung des Zytoskeletts und schließlich die gerichtete Migration. Innerhalb von Sekunden nach der Zugabe eines chemotaktischen Zytokins zu einer Leukozyten-Zellsuspension kann eine deutliche Strukturänderung der Zellen beobachtet werden. Polymerisation und Zusammenbruch von Aktinfilamenten führen zu Formation und Retraktion von Lamellipodien/Pseudopodien. Verschiedene Familien molekularer Regulatoren, wie Selektine, Integrine und Chemokine kontrollieren unterschiedliche Aspekte dieses Vorganges. Selektine erleichtern die Leukozytenbewegung entlang der Endothelzellschicht (rolling), Chemokine regeln die Umwandlung der Selektin-kontrollierten Interaktion mit geringer Affinität der Leukozyten zu den Endothelzellen zur Integrin-kontrollierten Interaktion mit hoher Affinität der Leukozyten zu den Endothelzellen, die schließlich zur Extravasation der weißen Blutzellen führt (Springer, 1994).

1.9. Die Rolle der Chemokine bei Entzündungskrankheiten

Chemokine verursachen in entzündeten Geweben die Akkumulation und Aktivierung von Leukozyten, zum Beispiel ist die Konzentration von IL-8 in der Bronchoalveolarflüssigkeit bei bakterieller Pneumonie und beim „adult respiratory distress syndrom“ erhöht (Chollet-Martin et al., 1993).

Eine weitere Folge der Stimulation von Leukozyten durch Chemokine ist der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$). Nach durch $G\alpha$ sowie durch $G\beta\gamma$ stimulierter Aktivierung verschiedener Isoformen der Phospholipase C wird Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) hydrolytisch in Diacylglycerol (DAG) und 1,4,5-Inositoltrisphosphat ($1,4,5-IP_3$) gespalten. $1,4,5-IP_3$ setzt nach Bindung an IP_3 -Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern frei. Intrazelluläres Kalzium reguliert als tertiärer Botenstoff die Aktivität intrazellulärer Enzyme, Ionenkanäle und Transportproteine.

Die Freisetzung von Sauerstoffradikalen ist für die mikrobielle Abwehrfunktion der Neutrophilen nötig, ebenso die Freisetzung aktiver Fettsäuren und die Ausschüttung von im Zytoplasma gespeicherter Granula (zum Beispiel Proteasen aus Neutrophilen, Histamin aus Basophilen). Neutrophile generieren Wasserstoffsuperoxid durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase (Liang et al., 1990).

1.10. Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Da die $\beta\gamma$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine der entscheidende Mediator der chemotaktischen Migration ist (Neptune und Bourne, 1997; Arai et al., 1997), stellte sich die Frage, inwiefern strukturell unterschiedliche G-Proteine, nämlich G-Proteine mit der β -Untereinheit $G\beta 3$ und G-Proteine mit der Spleißvariante $G\beta 3$ -s, zu unterschiedlich starken chemotaktischen Antworten führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch fMLP und durch IL-8 stimulierte Antworten, die durch PTX-sensitive G-Proteine vermittelt werden, von neutrophilen Granulozyten quantifiziert und in Abhängigkeit vom GNB3 C825T-Allelstatus (CC-, TC-, TT-Genotyp) betrachtet.
2. Wie unterscheidet sich in Abhängigkeit vom Genotyp der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bei Stimulation mit fMLP und IL-8 ?
3. Wie unterscheidet sich in Abhängigkeit vom Genotyp der Anstieg der Generation von O_2^- bei Stimulation mit fMLP und IL-8 ?

2. Material und Methoden

2.1. Auswahl der Probanden

Menschliche neutrophile Granulozyten wurden aus venösem Vollblut von gesunden, männlichen Nichtrauchern gewonnen, bei diesen handelte es sich entweder um Angehörige des Instituts für Pharmakologie oder um Medizinstudenten der Universität Essen.

Weibliche Spender wurden nicht einbezogen, da nicht gewiß ist, ob die Funktion und Aktivität von neutrophilen Granulozyten unter dem Einfluß von hormonellem Zyklus oder der Einnahme von Hormonpräparaten verändert wird.

Nikotinabusus induziert eine Leukozytose. Um auch eine eventuelle Änderung der Leukozytenfunktion zu umgehen, wurden Raucher als Spender ausgeschlossen.

Ebenso wurden Patienten ausgeschlossen, die an einer akuten Infektionskrankheit oder einer chronischen Erkrankung litten, weiterhin Spender, die Medikamente einnahmen.

Infekte bewirken eine Aktivierung der weißen Blutkörperchen, viele chronische Erkrankungen, zum Beispiel aus dem rheumatischen Formenkreis, gehen mit einer veränderten Aktivität der Leukozyten einher.

Auch Pharmaka, wie zum Beispiel Kortikosteroide, sind in der Lage, die Funktion und Aktivität des Immunsystems und immunkompetenter Zellen zu verändern.

2.2. Präparation humaner neutrophiler Granulozyten

15 ml Blut wurden in Blutröhrchen mit 5 ml steril filtriertem ACD (2,23 g Glucoseanhydrat, 0,868 g Citrat und 2,47 g Natriumcitrat-2-hydrat ad 100 ml Aqua bidest, pH = 6,5) abgenommen. 1,5 ml des Blutes wurden zur Genotypisierung in sterile Kryoröhrchen abgefüllt und im Kühlschrank gelagert. Das verbleibende Blut wurde in 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und auf 40 ml mit auf 37° C vorgewärmtem RPMI 1640-Medium aufgefüllt. Nach Zugabe von 4,5 ml 10 %igem Dextran (1 g Dextran in 10 ml RPMI 1640) wurde die Probe vorsichtig geschüttelt. Nach einer Sedimentationszeit

von 45 Minuten wurden 24 ml des Überstandes über 16 ml Ficoll Paque geschichtet und zentrifugiert (444 x g; 20 Minuten). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet zur Lyse der verbliebenen Erythrozyten in 1 ml Aqua bidest resuspendiert. Nach 45 bis 60 Sekunden wurde 1 ml zweifach konzentriertes PBS zugegeben (Boyum, 1968). Nach Auffüllen des Probenröhrchens mit 10 ml RPMI 1640 folgte eine erneute Zentrifugation (174 x g; 6 Minuten). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet je nach Versuch entweder in RPMI 1640 oder in HBSS-Medium (Hank's balanced salt solution, beinhaltend 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ und 5 mM D-Glucose, gepuffert mit 20 mM HEPES, pH = 7,4) resuspendiert. Die Anzahl der so präparierten Granulozyten wurde im Zellcounter bestimmt, die Präparation bestand aus mindestens 95 % neutrophilen Granulozyten, wie sofortige Fixierung und Färbung mit Diff-Quick[®] eines Teils der Suspension zeigten.

Für einige Versuche wurden die neutrophilen Granulozyten mit PTX vorbehandelt. Die Vorbehandlung erfolgte 2 Stunden vor den Experimenten mit 100 ng/ml PTX aus einer 10 µg/ml Stammlösung.

2.3. Messung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration

Die Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) wurde in Zellsuspensionen bei 37°C nach der Methode von Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985) mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 durchgeführt. Dieser Indikator wird als membranpermeabler, hydrophober Pentaacetomethoxyester (Fura-2/AM) bei Inkubation in die intakten Zellen geschleust und dort intrazellulär angereichert. Die Esterverbindung wird dort durch unspezifische Esterasen gespalten und der polare, membranimpermeable Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 freigesetzt. Da der Fluoreszenzfarbstoff in der Ca²⁺-gebundenen Form ein anderes Anregungsmaximum (Wellenlänge: $\lambda = 340$ nm) besitzt als in der Ca²⁺-freien Form ($\lambda = 380$ nm), und dieser Unterschied besonders bei einer Emissionswellenlänge von 495-510 nm ausgeprägt ist, lassen sich Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ mit Hilfe der Fluoreszenzmessung und des Exzitationsshifts quantifizieren.

Isolierte, humane neutrophile Granulozyten wurden zentrifugiert (210 x g; 10 Minuten) und das Pellet in 10 ml RPMI 1640 + 0,1 % BSA, beinhaltend 2,5 µM Indikator Fura-2/AM, resuspendiert. Die

Beladung erfolgte durch Inkubation bei 37° C für 45 Minuten im Brutschrank. Es folgten eine weitere Zentrifugation (210 x g; 10 Minuten) und das Aufnehmen der Zellen in HBSS bei einer Dichte von 0,5-1 x 10⁵ Zellen/ml.

Die Fluoreszenzmessung wurde in einem Perkin-Elmer LS 50 B Fluoro-Spectrometer bei 37°C durchgeführt. Die Fura-2-Emission wurde kontinuierlich bei einer Wellenlänge von $\lambda = 495$ nm aufgezeichnet, während alternierend mit Wellenlängen von $\lambda = 340$ nm und $\lambda = 380$ nm angeregt wurde. Die mit Fura-2 beladenen Zellen wurden bis zur Messung lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt und innerhalb von 2 Stunden verbraucht. Die Beladung mit Fura-2 wurde während einer Versuchsreihe kontinuierlich am Ende einer Messung überprüft und war über 2 Stunden nahezu konstant. Unmittelbar vor Beginn einer Messung wurde 1 ml der Zellsuspension in Ca²⁺-haltiger Hank's balancierter Salzlösung 1 : 1 in eine Plastikkuvette verdünnt. Um den Anteil der intrazellulären Ca²⁺-Freisetzung zu bestimmen, wurden die Zellen in einer nominal Ca²⁺-freien HBSS resuspendiert und verbleibende extrazelluläre Ca²⁺-Ionen durch Zugabe von EGTA (1 mM final) 30 Sekunden vor Agoniststimulation komplexiert. Zunächst wurde jeweils für 30 bis 40 Sekunden die basale [Ca²⁺]_i gemessen, bevor 20 µl Agonistlösung zugefügt wurde. Nach jeder Messung wurden die Zellen mit Digitonin (0,01 %) permeabilisiert und die maximale Fluoreszenz (F_{340/380}) bei 1 mM Ca²⁺ beziehungsweise die minimale Fluoreszenz (F_{340/380}) nach Komplexierung von Ca²⁺ mit EGTA (5 mM) bestimmt.

Die [Ca²⁺]_i wurde computerunterstützt aus den Werten der Fluoreszenzmessung nach der von Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985) beschriebenen Ratio-Methode nach folgender Gleichung berechnet:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times (R_t - R_{\min}) / (R_{\max} - R_t) \times F_{\min 380} / F_{\max 380}$$

[Ca²⁺]_i = intrazelluläre [Ca²⁺] zum Zeitpunkt t

K_d = Dissoziationskonstante Fura-2/Ca²⁺ bei 37°C (224 nM)

R_t = F₃₄₀/F₃₈₀ zum Zeitpunkt t

R_{max} = F_{340max}/F_{380max} nach Permeabilisierung und Zugabe von 1 mM Ca²⁺

R_{min} = F_{340min}/F_{380min} nach Permeabilisierung und Zugabe von 4 mM EGTA

- $F_{\max 380}$ = Intensität der Emission bei $\lambda = 380$ nm nach Permeabilisierung und Zugabe von 1 mM Ca^{2+}
- $F_{\min 380}$ = Intensität der Emission bei $\lambda = 380$ nm nach Permeabilisierung und Ca^{2+} -Komplexierung durch 4 mM EGTA

2.4. Messung der O^{2-} -Freisetzung

Die O^{2-} -Bildung wurde mit dem Lucigenin-Assay in einem Luminometer gemessen (Bhakdi und Martin, 1991). Neutrophile Granulozyten wurden in HBSS resuspendiert und bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 360 μl Aliquots in Luminometer-Küvetten pipettiert. Unter kontinuierlichem Rühren (Magnetrührer: 300 rpm) wurden 20 μl Lucigenin in einer Konzentration von 0.1 mg/ml zugegeben. Es folgte eine 2 minütige Äquilibrierungsphase. Anschließend wurden die Zellen mit 20 μl des Rezeptoragonist in den angegebenen Konzentrationen oder mit 100 nM PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) stimuliert und die Änderung der Chemolumineszenz als Maß für die O^{2-} -Freisetzung aufgezeichnet. Die Stimulation mit 100 nM PMA zeigte die maximale, Rezeptor- und G-Protein-unabhängige O^{2-} -Bildung. Diese wurde für alle Zellen als 100 % Referenzwert (Maximalwert) definiert und als Positivkontrolle verwendet.

2.5. Messung der Zellmigration

Die unteren Brunnen einer 48-Brunnen Mikrochemotaxis-Kammer (Neuroprobe, Cabin John, MD, USA) wurden mit 25 μl RPMI 1640 gefüllt, welches den entsprechenden Rezeptoragonist enthielt. Die befüllten Brunnen wurden mit einer Polyvinylpyrrolidon-freien Polycarbonat-Filtermembran (eingelegt in 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Collagen Typ I für 2 Stunden) mit einer Porengröße von 3 μm bedeckt. Nach Befestigung des oberen Kammeraufsatzes wurden je 50 μl Zellsuspension mit einer Zelldichte von 0.5×10^6 Zellen/ml in die oberen Löcher pipettiert. Nach einstündiger Inkubation der Kammer in einem Brutschrank bei 5 % CO_2 und 37 °C wurde die Kammer auseinandergeschraubt und die Filtermembran mit zwei Klammern aufgenommen. Zellen, die nicht durch die Membran migriert waren, wurden von der

Membranoberseite durch vorsichtiges Ziehen der Filtermembran über eine Gummikante entfernt und die Zellen auf der Membranunterseite mit Diff Quick® -Färbelösung gefärbt. Die noch feuchte Membran wurde abschließend auf einem Objektträger angetrocknet und mit Entelan eingedeckt.

Die Zellen, die durch die Membran hindurch auf die Membranunterseite gewandert waren, wurden für jeden Ansatz in drei stark vergrößerten Feldern (400 x) im Lichtmikroskop gezählt (Tilly et al., 1990; Bornfeldt et al., 1995).

In einigen Experimenten wurde der entsprechende Agonist auch in die oberen Löcher zu den Zellen hinzupipettiert, um Aufschluß darüber zu erhalten, ob es sich in erster Linie um chemotaktisches oder chemokinetisches Migrationsverhalten handelte.

2.6. Bestimmung des GNB3-C825T-Polymorphismus

Zur Bestimmung der GNB3-Genotypen wurde eine Polymerasekettenreaktion mit anschließender Restriktionsanalyse durchgeführt. Für die Amplifizierung der DNA wurde eine rekombinante, hitzestabile *Thermus aquaticus*-DNA-Polymerase (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) sowie GNB3-spezifische Primer (5' – TGACCCACTTGCCACCCGTGC – 3' (sense) und 5' – GCAGCAGCCAGGGCTGGC – 3' (antisense), Eurogentec, Belgien) verwendet.

Die Reaktion erfolgte in 50 µl-Ansätzen, wie folgt:

Sense	2 µl (20 pM)
Antisense	2 µl (20 pM)
Desoxyribonucleosidtriphosphate	1 µl (10 pM)
10 x Puffer	5,5 µl (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0,8 % Nonidet P40)
DNA-Polymerase	1,1 µl (1U/µl)
MgCl ₂	3,1 µl (25 mM)
Aqua dest.	35,3 µl

Für die nachfolgende Amplifikation in einem Thermozykler wurde folgendes Temperaturprofil programmiert:

94°C	5 min.	initiale DNA-Denaturierung	1 x
94°C	1 min.	DNA-Denaturierung	
60°C	45 sec.	Primeranlagerung	35 x
72°C	1 min.	DNA-Extension	
72°C	7 min.	abschließende Extension	1 x

Die nachfolgende Reaktion wurde durchgeführt mit Hilfe des Restriktionsenzym BseDI (MBI Fermentas), welches spezifisch die DNA-Sequenz CCNNGG erkennt. Die Restriktion erfolgte in 10 µl-Ansätzen, bestehend aus:

BseDI	1 µl (10 U/µl)
10 x Puffer	1,5 µl (33 mM Tris-Acetat, 10 mM Mg-Acetat, 66 mM K-Acetat)
BSA (Albumin)	0,75 µl (0,1 mg/ml)
Aqua dest.	6,75 µl

Bei einer Temperatur von 60°C wurden die Ansätze zwei Stunden inkubiert. Die Restriktionsprodukte wurden auf 2,5 % Agarosegele, welche 0,5 % Ethidiumbromid enthielten, aufgetragen, mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Der Wildtyp (CC-Genotyp) ergab komplett geschnittene PCR-Produkte in der Größe von 116 und 152 Basenpaaren. Für den TT-Genotyp ergaben sich ungeschnittene PCR-Produkte in einer Größe von 268 bp.

2.7. RT-PCR

RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Kit von Qiagen entsprechend den Herstellerinstruktionen präpariert. Die reverse Transkription wurde mit Hilfe von Superscript® (Gibco/BRL) durchgeführt. Verwendet wurden Oligo-dT-Primer. Es folgte die PCR mit den Gβ3-spezifischen Primern 5' - CGGGAGCTTTCTGCTCACAC - 3' (sense) und 5' - TGTTCACTGCCTTCCACTTCC - 3' (anti-sense). Die RT-PCR Produkte mit einer Größe von 528 bp, die für Cβ3-s kodieren, sind 123 bp kürzer als die, die für den Gβ3 Wildtyp kodieren und 651 bp lang sind (Siffert et al., 1998). Es wurden die Neutrophilen von jeweils drei homozygoten C825-Allelträgern und von heterozygoten 825T-Allelträgern untersucht.

2.8. Datenpräsentation und Datenanalyse

Es wurden die Zellantworten von Personen mit dem homozygoten CC Genotyp mit denen von hetero- oder homozygoten 825T-Allelträgern (TC/-TT-Genotyp) verglichen. Keine Unterscheidung wurde zwischen homo- und heterozygoten T-Allelträgern unternommen: Mit einer Häufigkeit von 10 % ist der TT-Genotyp relativ selten (45 % der kaukasischen Bevölkerung sind homozygot für das C-Allel, weitere 45 % heterozygot). Bei blind ausgewählten Spendern wurde davon abgesehen, eine derart große Probandenmenge zu erheben, die statistische Unterscheidungen zwischen homo- und heterozygoten T-Allelträgern zuließ. Weiterhin zeigten vorausgehende Untersuchungen, daß das Vorhandensein eines T-Allels ausreichend ist, um eine gesteigerte G-Protein-Aktivierung zu bewirken (Siffert et al., 1998).

Alle Experimente wurden als Blindstudie durchgeführt, das heißt der Genotyp der in Untersuchung befindlichen Probe war den Untersuchern nicht bekannt. Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mit Hilfe des Softwareprogramms GraphPAD Prism2 (GraphPAD Software, San Diego, CA, USA) berechnet. Die vergleichende Analyse der Versuchsergebnisse erfolgte mittels student's t-test. p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte dargestellt, in Balkendiagrammen als Mittelwerte + SEM, in den Liniendiagrammen als Mittelwerte \pm SEM.

Einige Abbildungen zeigen „Repräsentative Originalregistrierungen“ oder „Repräsentative Ergebnisse“, hier wurden zur Veranschaulichung einzelne Meßaufzeichnungen ausgewählt, die Mittelwerte \pm SEM sind im entsprechenden Textabschnitt erwähnt.

3. Ergebnisse

3.1. Nachweis von für **G β 3** und **G β 3-s** kodierender mRNS in menschlichen neutrophilen Granulozyten

Mit Hilfe der RT-PCR war es möglich, mRNS in menschlichen neutrophilen Granulozyten nachzuweisen, die für G β 3 und für G β 3-s kodiert. Es wurden G β 3-spezifische Primer verwendet. In neutrophilen Granulozyten von Individuen, die homozygot für das Allel 825C sind, konnte nur ein RT-PCR-Produkt mit der erwarteten Größe von 651 bp nachgewiesen werden. In neutrophilen Granulozyten von Individuen, die heterozygot für das 825T Allel sind, wurde eine zusätzliche, kleinere Bande von annähernd 528 bp gesehen. Diese zeigt das Vorhandensein einer alternativen Spleißvariante von G β 3, die Spleißvariante G β 3-s (Abb. 1).

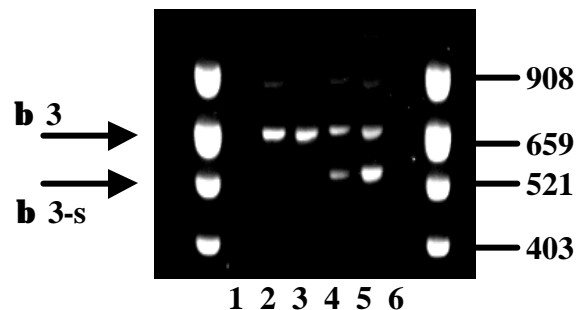


Abb. 1: Genotypabhängige Expression von **b3 und **b3-s** in humanen Neutrophilen.**

Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis einer RT-PCR mit β 3-spezifischen Primern, die an mRNS von humanen Neutrophilen verschiedener Genotypen durchgeführt wurde (siehe Material und Methoden). Es zeigt sich das quantitative Verhältnis der Expression von β 3 und β 3-s in humanen neutrophilen Granulozyten. Auf Spuren 2 und 3 CC-Genotypen; Spuren 4 und 5 TC-Genotypen; Spuren 1 und 6 Negativkontrollen, die den kompletten PCR-Ansatz ohne cDNA enthielten.

3.2. Durch fMLP stimulierte Chemotaxis menschlicher neutrophiler Granulozyten

Eine Vorbehandlung mit PTX (100 ng/ml für zwei Stunden) inhibiert die durch fMLP stimulierte Chemotaxis von menschlichen neutrophilen Granulozyten ungeachtet des GNB3-Genotyp vollständig, womit die Beteiligung von G-Proteinen des G_i-Typs gezeigt wird (Abb. 2).

Eine signifikant gesteigerte Zellmigration wurde bei Neutrophilen von Individuen mit dem GNB3-TC- oder -TT- Genotyp bei Stimulation mit fMLP gefunden (Konzentrationen von 0.1 bis 100 nM): Stimulation mit 0.1 nM fMLP bewirkte eine Migration von 15.26 ± 6.59 Zellen (TC/TT) versus 1.58 ± 0.6 Zellen (CC) pro Gesichtsfeld, Stimulation mit 1 nM fMLP 65.1 ± 12.5 Zellen (TC/TT) versus 24.7 ± 4.6 Zellen (CC). Damit zeigte sich für den CC-Genotyp bei Stimulation mit diesen niedrigen Konzentrationen von fMLP eine chemotaktische Antwort, die mit der basalen Migration, das heißt mit der Migration ohne Stimulation vergleichbar ist. Im Gegensatz war die chemotaktische Antwort der Granulozyten von T-Allelträgern schon deutlich über die basale Migration erhöht (siehe unten). Stimulation mit 10 nM fMLP bewirkte eine Migration von 95.14 ± 10.7 Zellen (TC/TT) versus 66.4 ± 7.1 Zellen (CC), Stimulation mit 100 nM fMLP 147.1 ± 11.94 Zellen (TC/TT) versus 103.7 ± 9.1 Zellen (CC). Verglichen mit Neutrophilen von Individuen mit dem CC-Genotyp war die Potenz von fMLP bei Neutrophilen von Individuen mit dem TC-/TT-Genotyp signifikant erhöht ($EC_{50} = 5.9 \pm 1.5$ nM versus $EC_{50} = 1.5 \pm 1.3$ nM). Maximale chemotaktische Antwort wurde bei einer Stimulation mit 1 μ M fMLP erreicht. Diese war bei Neutrophilen aller Genotypen ähnlich und lag im Durchschnitt bei 133.0 ± 12.4 (TC/TT) versus 110.7 ± 11.7 (CC) Zellen pro Gesichtsfeld (Abb. 3).

Um sicherzustellen, daß es sich bei der durch fMLP stimulierten Antwort um Chemotaxis handelte, wurde fMLP zu den Zellen in die oberen Brunnen der Kammern gegeben. Verglichen mit der basalen Migration von 30.2 ± 6.1 (CC, n = 10) versus 37.8 ± 3.9 (TC, n = 7; TT, n = 3) Zellen pro Gesichtsfeld ohne fMLP, wurde keine zufällige Migration (Chemokinesis) induziert. Bei gleichen Konzentrationen von fMLP in den oberen und unteren Brunnen führte eine Stimulation mit 1 nM fMLP zu einer Migration von 35.9 ± 3.8 (CC) versus 42.6 ± 8.8 (TC/TT) Zellen pro Gesichtsfeld, Stimulation mit 30 nM fMLP zu 46.2 ± 4.0 (CC) versus 42.6 ± 8.8 (TC/TT) Zellen pro Gesichtsfeld. Eine Konzentration von 1 μ M fMLP in den oberen und unteren Brunnen führte zu einer Migration von 33.6 ± 4.6 (CC) versus 37.7 ± 5.3 (TC/TT) Zellen pro Gesichtsfeld. Erhöhte man die fMLP-Konzentration in

den oberen Brunnen über die in den unteren Brunnen war die Migration der neutrophilen Granulozyten im Vergleich zur basalen Migration leicht vermindert. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit von den Genotypen gezeigt werden. Diese Resultate zeigen, daß die gesteigerte Migration der humanen neutrophilen Granulozyten als Antwort auf eine Stimulation mit fMLP gerichtet (chemotaktisch) und nicht zufällig (chemokinetisch) ist.

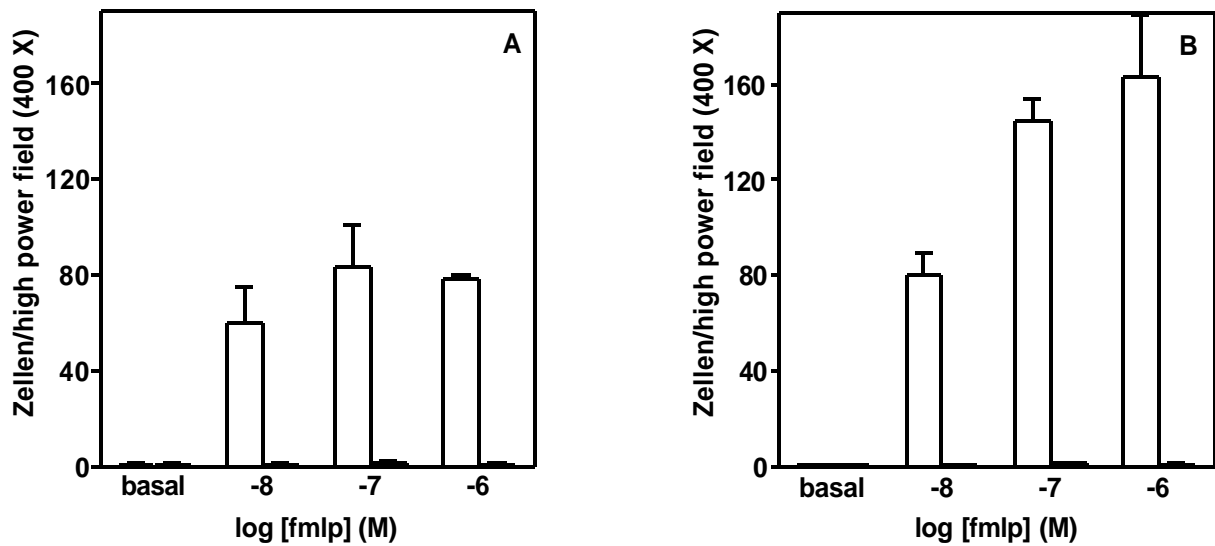


Abb. 2: Einfluß von PTX auf die durch fMLP stimulierte Chemotaxis Neutrophiler.

(A = CC, n = 5), (B = TC, n = 2).

Weißer Balken: Ohne PTX-Vorbehandlung, schwarzer Balken: PTX-Vorbehandlung.

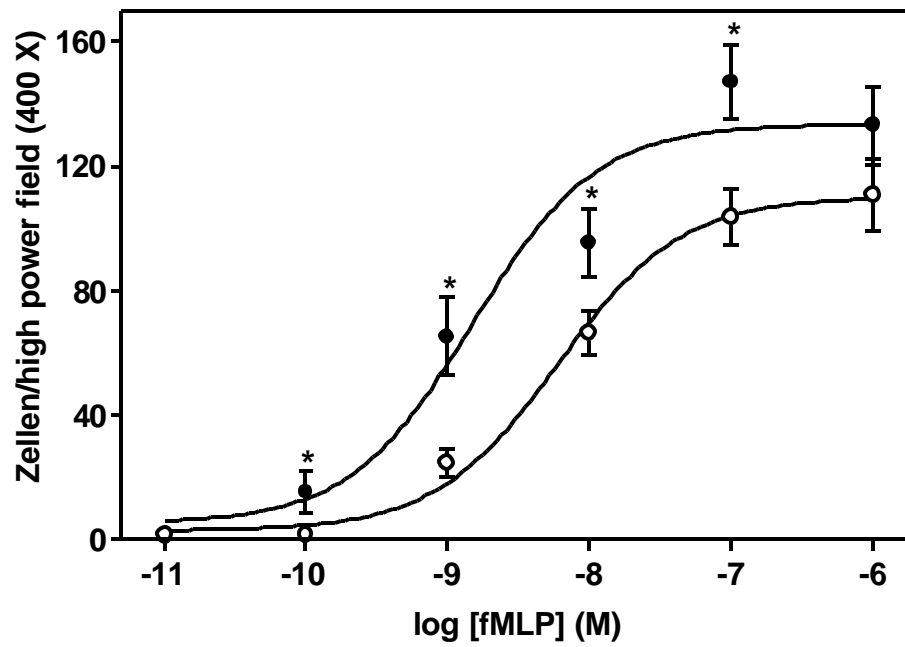


Abb. 3: Durch fMLP stimulierte Chemotaxis in humanen Neutrophilen.

CC (n = 12, weiße Kreise), TC (n = 8) und TT (n = 2) (schwarze Kreise),
*: p < 0.05.

3.3. Durch IL-8 stimulierte Chemotaxis menschlicher neutrophiler Granulozyten

Die durch IL-8 induzierte chemotaktische Antwort von menschlichen neutrophilen Granulozyten konnte unabhängig vom Genotyp am GNB3-Locus vollständig durch die Vorbehandlung mit PTX blockiert werden (100 ng/ml für zwei Stunden; Abb. 4). Eine signifikant gesteigerte Chemotaxis von humanen neutrophilen Granulozyten von 825T-Allelträgern im Vergleich zu homozygoten C825-Allelträgern konnte bei IL-8-Konzentrationen zwischen 0.1 und 10 nM beobachtet werden (Abb. 5). Stimulation mit IL-8 bei Konzentrationen von 0.1 bis 1 nM führten zu einer annähernd 2.5-fach höheren chemotaktischen Antwort von Neutrophilen von 825T-Allelträgern verglichen mit homozygoten 825C-Allelträgern. Die stärkste Antwort von Neutrophilen mit den TC/TT-Genotypen wurde bei Stimulation mit 10 nM IL-8 beobachtet und betrug im Mittel 110.1 ± 8.5 gegenüber 80.3 ± 11.7 Zellen pro Gesichtsfeld (CC-Genotyp; $p < 0.05$). Die chemotaktische Antwort war bei einer Konzentration von 100 nM IL-8 gegenüber der bei 10 nM IL-8 leicht reduziert, hierbei ließen sich keine genotypabhängigen Unterschiede nachweisen. Während bei Neutrophilen von Personen mit CC-Genotyp keine die spontane Migration übersteigende Chemotaxis bei 10^{-11} und 10^{-10} M IL-8 beobachtet wurde, fand sich bei Neutrophilen von Personen mit TC/TT-Genotyp bereits bei 10^{-10} M IL-8 eine deutliche chemotaktische Antwort. Im Vergleich der Genotypen TC und TT fand sich bezüglich gesteigerter Chemotaxis kein weiterer Unterschied. Da der TT-Genotyp mit einer Häufigkeit von ca. 10 % in der kaukasischen Bevölkerung relativ selten ist, wurde kein Versuch unternommen weitere homozygote T-Allelträger zu finden, um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen. Schließlich wurde auch bei IL-8-abhängiger Migration ausgeschlossen, daß sie auf gesteigerter Chemokinese beruht, was durch die Zugabe von IL-8 zu den Zellen im oberen Brunnen bei Abwesenheit der Chemokine im unteren Brunnen der Mikrochemotaxis-Kammern bewiesen wurde: Unter diesen Bedingungen zeigte sich keine über die Basalwerte gesteigerte Zellmigration.

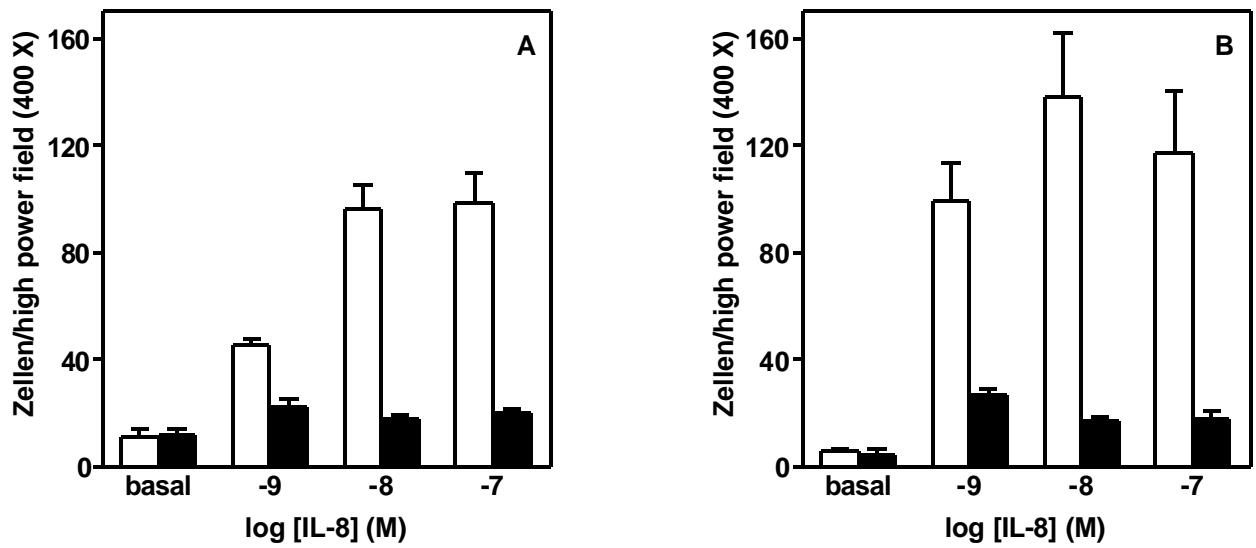


Abb. 4: Einfluß von PTX auf die durch IL-8 stimulierte Chemotaxis.

(A = CC, n = 3), (B = TC, n = 6).

Weißer Balken: Ohne PTX-Vorbehandlung, schwarzer Balken: PTX-Vorbehandlung.

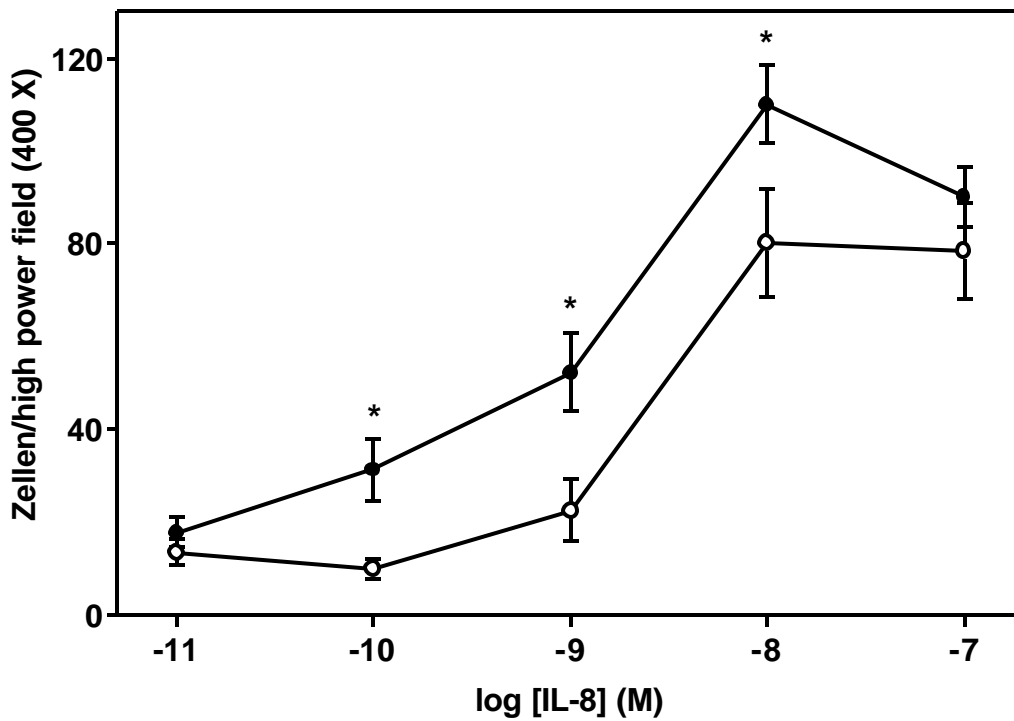


Abb. 5: Durch IL-8 stimulierte Chemotaxis in humanen Neutrophilen.

CC (n = 13, weiße Kreise), TC (n = 14) und TT (n = 5) (schwarze Kreise),
*: p < 0.05.

3.4. Der Effekt von fMLP auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in menschlichen neutrophilen Granulozyten

Um festzustellen, ob der genotypspezifische Unterschied der Chemotaxis von Neutrophilen durch Änderung vorgeschalteter Signaltransduktionswege hervorgerufen wird, wurden durch fMLP und IL-8 stimulierte Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) quantifiziert. Die Basalwerte von $[Ca^{2+}]_i$ in menschlichen neutrophilen Granulozyten vom CC- oder TC-Genotyp unterschieden sich nicht signifikant (58 ± 4.5 nM und 88 ± 15 nM). Nach einer Vorbehandlung mit PTX (100 ng/ml für zwei Stunden) konnten unabhängig vom GNB3-Genotyp keine durch fMLP evozierten $[Ca^{2+}]_i$ -Signale registriert werden (Abb. 6). Die Potenz von fMLP, die intrazelluläre Kalziumkonzentration zu steigern, war leicht erhöht bei Neutrophilen vom TC-/TT-Genotyp im Vergleich zum CC-Typus ($EC_{50} = 0.33 \pm 0.04$ nM versus $EC_{50} = 0.52 \pm 0.05$ nM). Überraschenderweise war der durch fMLP hervorgerufene Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ bei Konzentrationen von 1 nM bis 1 μ M bei Individuen, die Träger des 825T Allels sind, signifikant niedriger als beim CC-Genotyp (212.9 ± 10.1 nM beim CC-Genotyp und 146.4 ± 24.2 nM beim TC-Genotyp bei 1 μ M fMLP, Abb. 8). Das Plateau von erhöhtem $[Ca^{2+}]_i$, das dem initialen Peak folgt und einem kontinuierlichen Kalziumeinstrom in die Zelle entspricht, zeigte keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Genotyp (130.0 ± 11.1 nM beim CC-Genotyp versus 109.3 ± 8.1 nM bei T-Allelträgern, Abb. 7). Um den Beitrag der extrazellulären Kalziumkonzentration und damit des Kalziumeinstroms auf den Gesamtanstieg von $[Ca^{2+}]_i$ abzuschätzen, wurden Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ in Kalzium-freiem Medium (mit 5 mM EGTA) nach Stimulation mit 1 μ M fMLP durchgeführt (Abb. 9). EGTA, Ethylenglycolyl-bis(β -aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraacetat, ist ein Kalzium-Chelator. In Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium waren die $[Ca^{2+}]_i$ - Anstiege genotypunabhängig ähnlich (Abb. 7B, 7D; Abb. 9). Damit scheint bei neutrophilen Granulozyten von 825T-Allelträgern keine gesteigerte Aktivierung der Phospholipase C mit nachfolgend vermehrter Bildung von IP3 vorzuliegen.

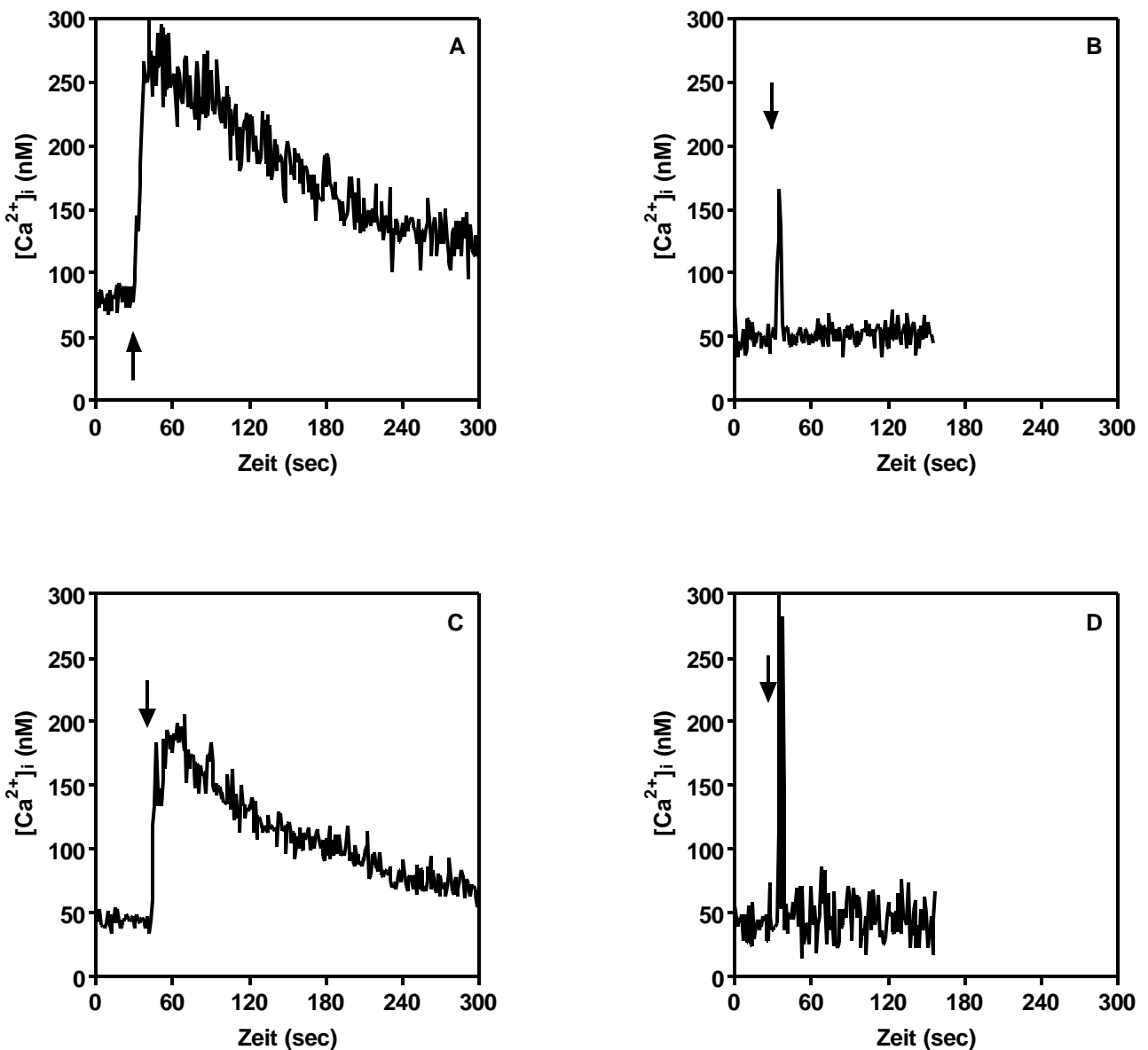


Abb. 6: Einfluß von PTX auf die durch fMLP stimulierte $[Ca^{2+}]_i$ in humanen Neutrophilen.

Repräsentative Originalregistrierung.

Die Zellen wurden mit 1 μ M fMLP in Anwesenheit von 1 mM extrazellulärem Kalzium stimuliert (Pfeile), Abb. 6B und 6D zeigen Registrierungen von Zellen, die vor der Messung zwei Stunden mit 100 ng/ml PTX vorbehandelt worden waren.

A = CC-Genotyp ohne PTX, B = CC-Genotyp/Vorbehandlung mit PTX; C = TC-Genotyp ohne PTX, D = TC-Genotyp/Vorbehandlung mit PTX.

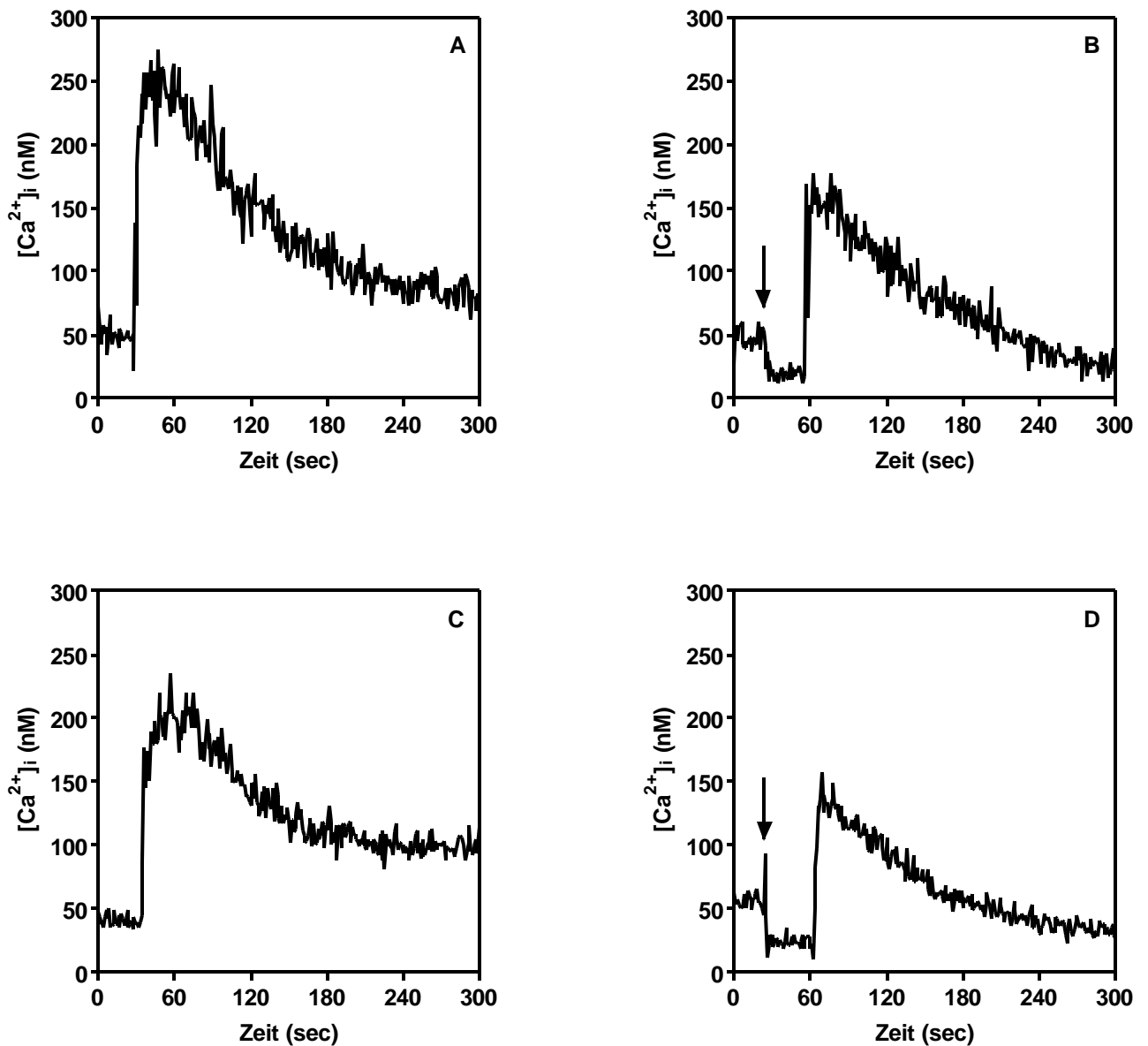


Abb. 7: Repräsentative Registrierungen der Anstiege von $[Ca^{2+}]_i$ in humanen Neutrophilen nach Stimulation mit fMLP.

Repräsentatives Ergebnis.

A = CC-Genotyp, B = CC-Genotyp, C = TC-Genotyp, D = TC-Genotyp, Pfeil: Zugabe von 5 mM EGTA.

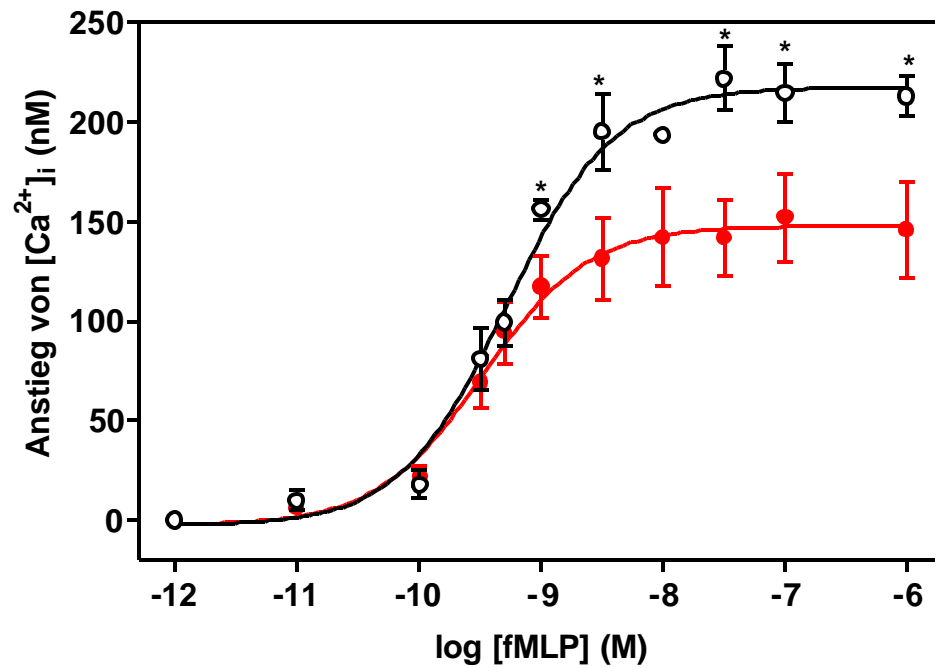


Abb. 8: Konzentrationsabhängige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in humanen Neutrophilen nach Stimulation mit fMLP.

Dargestellt ist der Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ über die basale Konzentration.

Weißer Kreise: CC-Genotyp (n=7), schwarze Kreise: TC-Genotyp (n=7), *: $p < 0.05$.

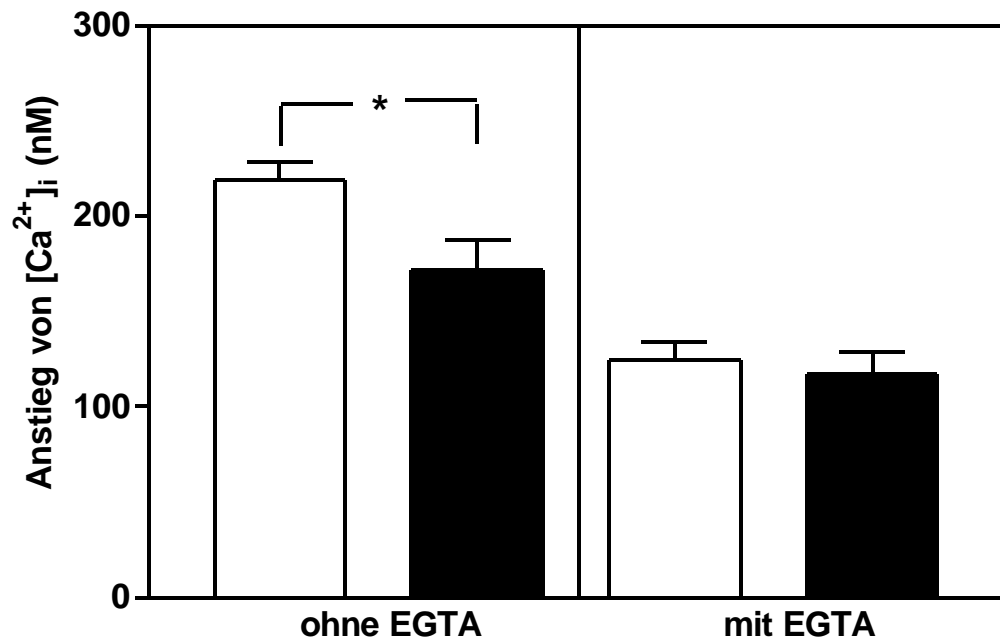


Abb. 9: Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in humanen Neutrophilen nach Stimulation mit fMLP, Einfluß von extrazellulärem Ca^{2+} .

Anstieg in „Anwesenheit“ von 1 mM Kalzium extrazellulär (ohne EGTA) und „Abwesenheit“ (mit 5 mM EGTA = $[Ca^{2+}]_e$ von 40 nM) nach Stimulation mit 1 μ M fMLP.

Weißer Balken (CC-Genotyp, n=21), schwarzer Balken (TC-Genotyp, n=14). *: p < 0.05.

3.5. Der Effekt von IL-8 auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in menschlichen neutrophilen Granulozyten

Der durch IL-8 stimulierte Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ war ebenfalls komplett PTX-sensitiv (Abb. 10). Basalwerte von $[Ca^{2+}]_i$ wurden bei 110.8 ± 10.8 nM in neutrophilen Granulozyten des CC-Genotyp gemessen, Werte von 99.2 ± 7.5 nM in Neutrophilen vom TC/TT Genotyp ($p > 0.2$). Stimulation mit 0.1 nM, 1 nM und 10 nM IL-8 induzierten die folgenden intrazellulären Kalziumkonzentrationen: 28.8 ± 12.4 nM (CC) versus 22.7 ± 6.0 nM (TC/TT), 118.8 ± 21.7 nM (CC) versus 105.5 ± 12.2 nM (TC/TT) und 159.1 ± 52.8 nM (CC) versus 147.3 ± 18.1 nM (TC/TT) (Abb 12). Zusätzlich untersuchten wir in Kalzium-freiem Medium den Beitrag von Ca^{2+} , das von intrazellulären Kompartimenten freigesetzt wurde, zum totalen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg (Abb. 11). Hier wurde der Kalzium-Chelator EGTA verwendet und der Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ in „Anwesenheit“ von 1 mM Kalzium extrazellulär (ohne EGTA) und „Abwesenheit“ (mit 5 mM EGTA = $[Ca^{2+}]_e$ von 40 nM) nach Stimulation mit 10 nM IL-8 gemessen.

Unter diesen Bedingungen wurde durch 10 nM IL-8 die intrazelluläre Kalziumkonzentration auf 104.1 ± 6.9 nM (CC) und auf 98.6 ± 10.2 nM (TC/TT) erhöht (Abb 13). Der Zeitverlauf des Kalziumanstieges war für die unterschiedlichen Genotypen gleich.

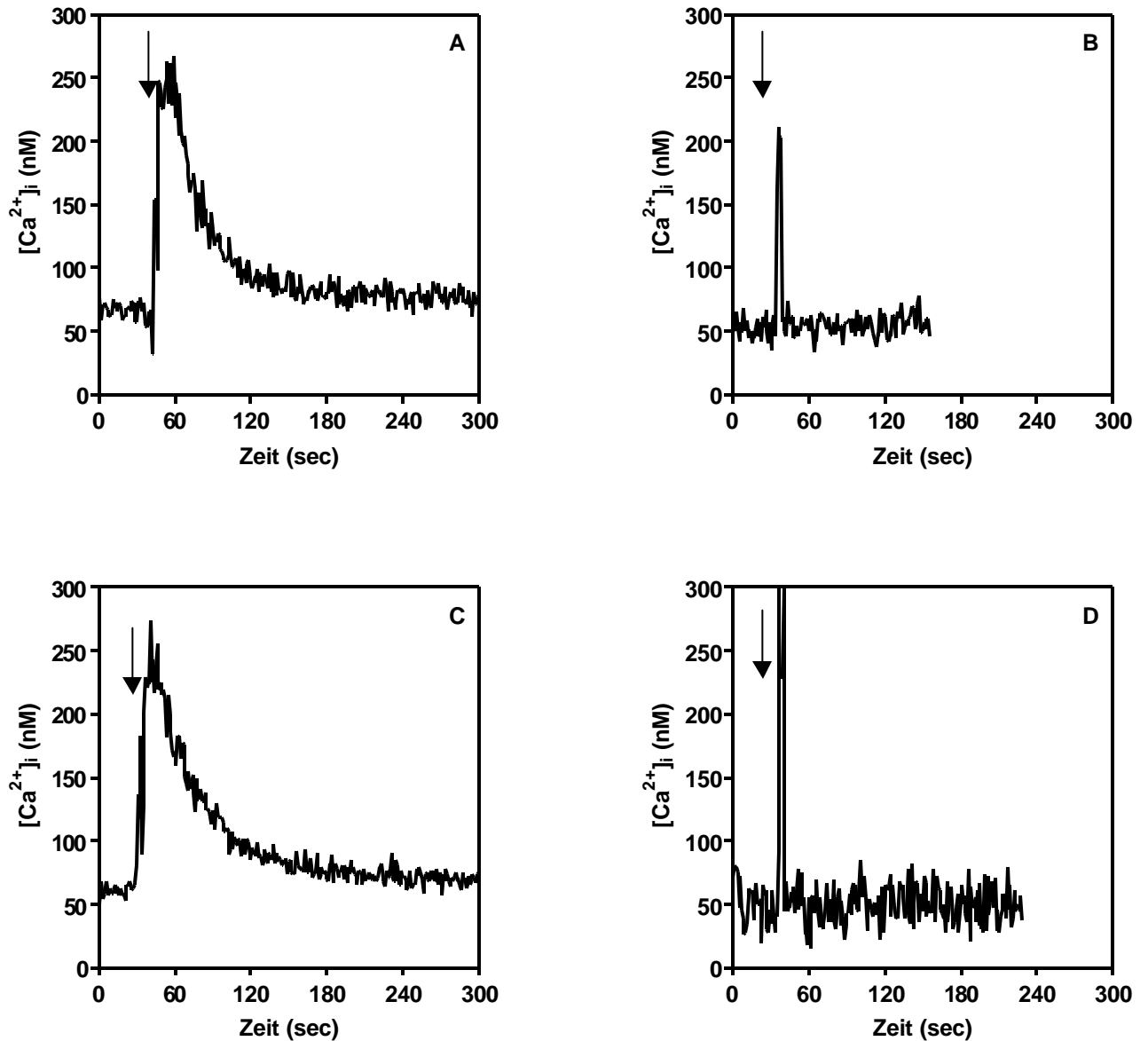


Abb. 10: Einfluß von PTX auf die durch IL-8 stimulierte $[Ca^{2+}]_i$ in humanen Neutrophilen.

Repräsentative Originalregistrierungen.

Die Zellen wurden mit 10 nM IL-8 in Anwesenheit von 1 mM extrazellulärem Kalzium stimuliert (Pfeile), Abb. 10B und 10D zeigen Registrierungen von Zellen, die vor der Messung zwei Stunden mit 100 ng/ml PTX vorbehandelt worden waren.

A = CC-Genotyp ohne PTX, B = CC-Genotyp/Vorbehandlung mit PTX, C = TC-Genotyp ohne PTX, D = TC-Genotyp/Vorbehandlung mit PTX.

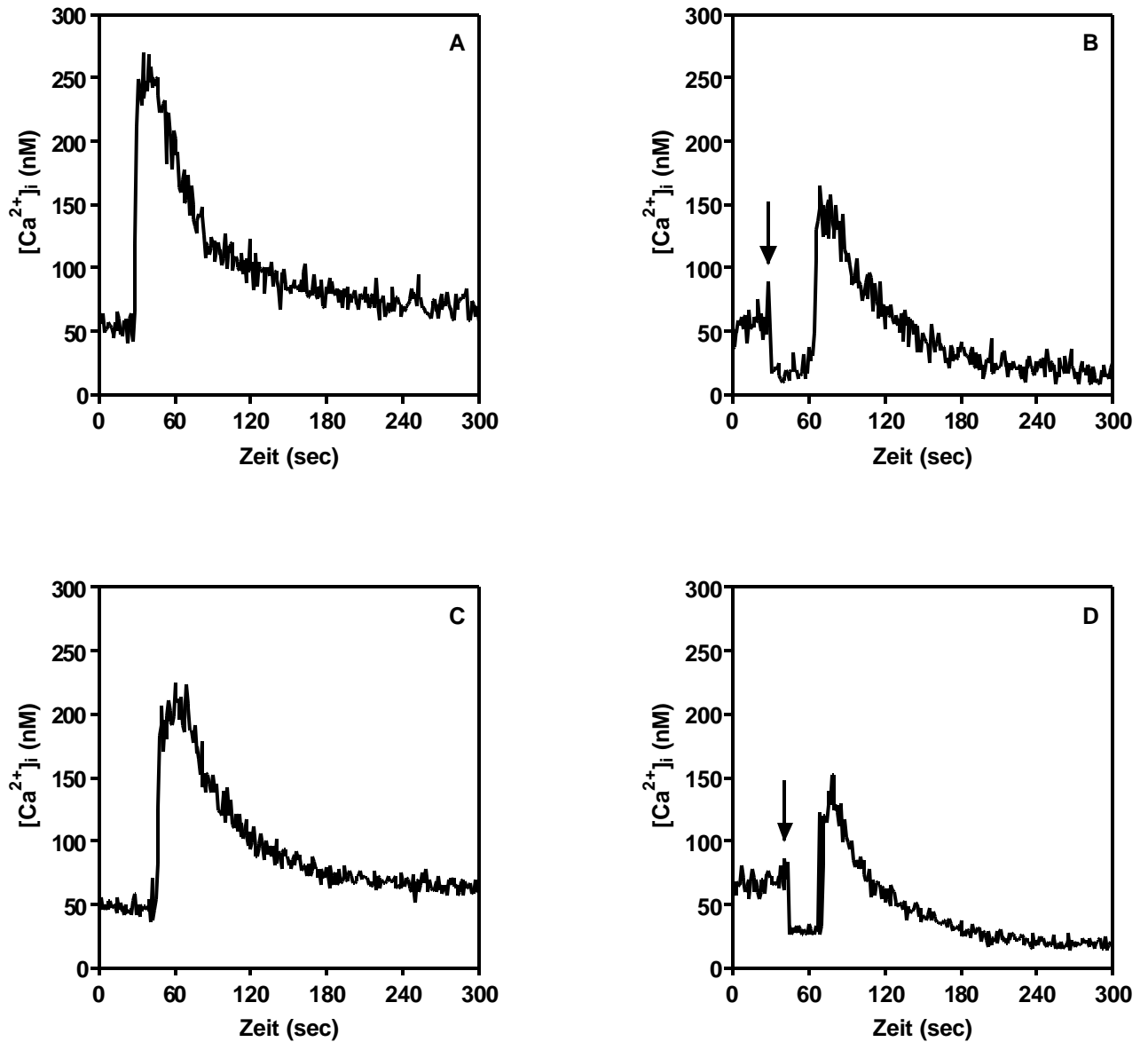


Abb. 11: Repräsentative Registrierung der Anstiege von $[Ca^{2+}]_i$ in humanen Neutrophilen nach Stimulation mit IL-8.

Repräsentatives Ergebnis.

A = CC-Genotyp, B = CC-Genotyp, C = TC-Genotyp, D = TC-Genotyp, Pfeil: Zugabe von 5 mM EGTA.

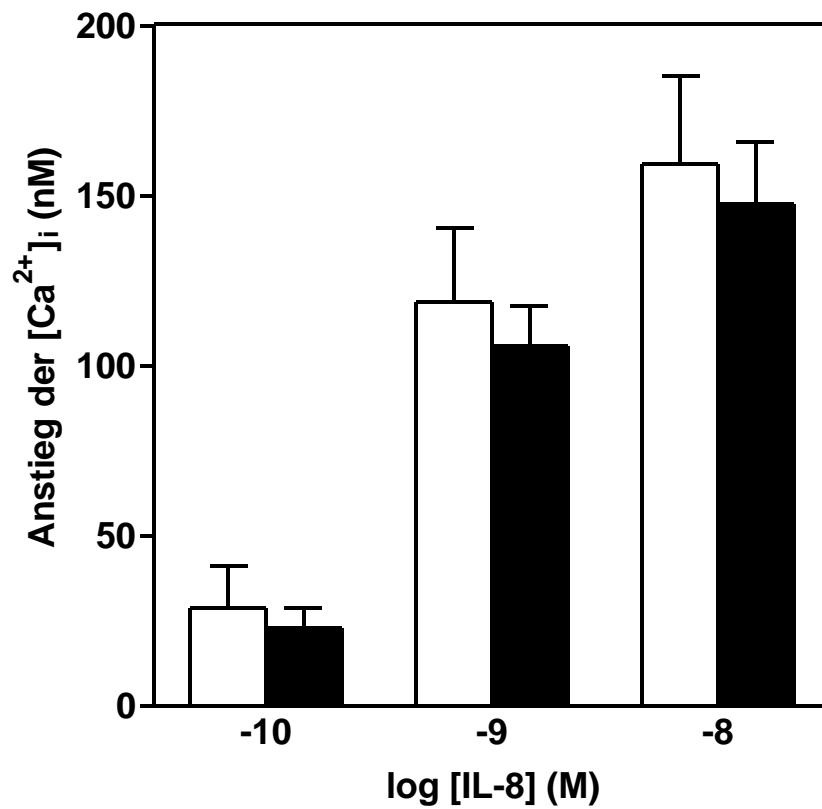


Abb. 12: Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit IL-8 in humanen Neutrophilen.

Dargestellt sind die Anstiege von $[Ca^{2+}]_i$ über die basale Konzentration.

Weißer Balken: CC-Genotyp (n=8), schwarzer Balken: TC-Genotyp (n=14).

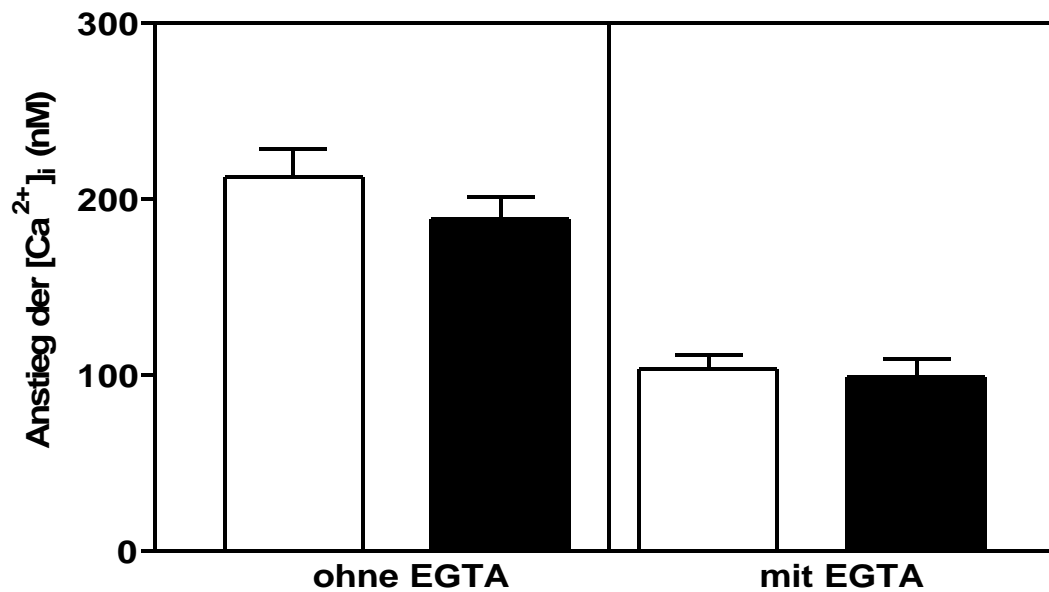


Abb. 13: Anstieg der [Ca²⁺]_i nach Stimulation mit IL-8 in humanen Neutrophilen, Einfluß der extrazellulären [Ca²⁺].

Anstieg in „Anwesenheit“ von 1 mM Kalzium extrazellulär (ohne EGTA) und „Abwesenheit“ (mit 5 mM EGTA = [Ca²⁺]_e von 40 nM) auf Stimulation mit 10 nM IL-8.

Weißer Balken (CC-Genotyp, n=14), schwarzer Balken (TC-Genotyp, n=7).

3.6. Durch fMLP evozierte O^2 -Generation

Die Vorbehandlung von neutrophilen Granulozyten mit PTX (100 ng/ml für zwei Stunden) inhibiert durch fMLP, nicht aber durch Phorbol ester stimulierte O^2 -Generation. Werte, die nach Stimulation mit 100 nM PMA gemessen wurden, wurden als Kontrolle definiert (100 %-Werte). Die O^2 -Generation als Antwort auf Stimulation mit ansteigenden fMLP-Konzentrationen war offenbar unabhängig vom GNB3-Genotyp und rangierte bei 68.9 ± 15.8 % (CC) und 69.6 ± 21.8 % (TC/TT) des Kontrollwertes nach maximaler Aktivierung der Proteinkinase C. Darüber hinaus waren auch die errechneten EC_{50} -Werte für durch fMLP stimulierte O^2 -Generation genotypunabhängig (58.4 ± 16.1 versus 54.6 ± 26.1 nM; CC- versus TC-/TT-Genotypen, Abb 14).

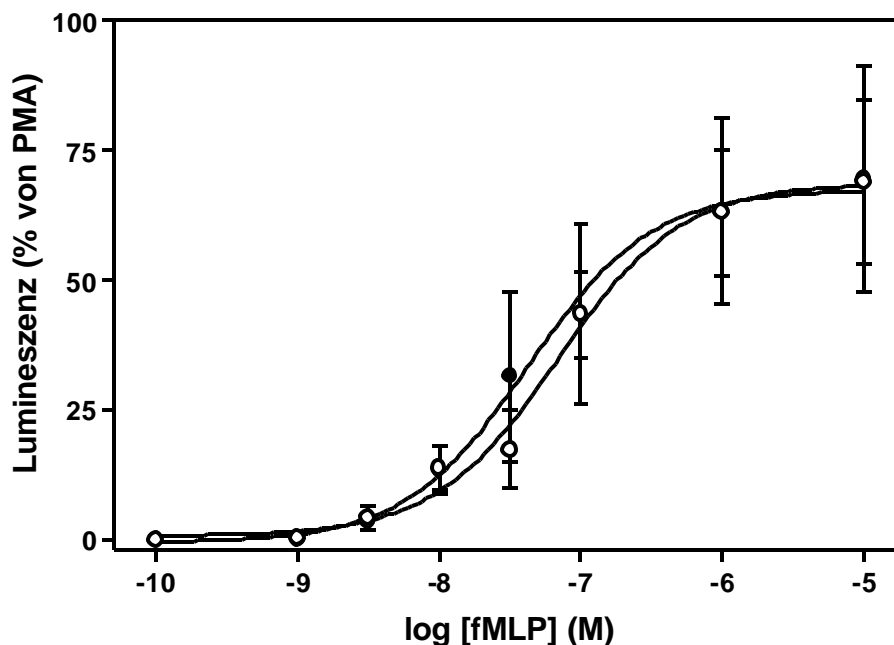


Abb.14: Dosisabhängiger Anstieg der O^2 -Bildung in Neutrophilen nach Stimulation mit fMLP.

Als Maß für die O^2 -Bildung wurde die Lumineszenzänderung nach Stimulation mit den angegebenen Konzentrationen von fMLP gemessen und der maximale Anstieg (Peak) nach Stimulation bestimmt. Diese sind auf die maximale Lumineszenzänderung nach Stimulation mit 100 nM PMA bezogen und in Prozentwerten (Mittelwert \pm SEM) ausgedrückt. Die Daten stammen aus je vier unabhängigen Messreihen je Genotyp (CC-Genotyp: weiße Kreise, n = 4, TC-Genotyp: schwarze Kreise, n = 4).

3.7. Durch IL-8 evozierte O^{2-} -Generation

Die O^{2-} -Generation wurde konzentrationsabhängig durch IL-8 gesteigert. Dabei wurde bei Stimulationen mit 0.01 bis 30 nM IL-8 keine Genotypabhängigkeit festgestellt. Die Stimulation mit 30 nM IL-8 hatte den stärksten Effekt und induzierte einen Anstieg der O^{2-} - Generation von $8.1 \pm 2.7 \%$ in Relation zu der von 100 nM PMA evozierten O^{2-} - Freisetzung (CC), dieser Wert betrug $9.1 \pm 0.6 \%$ bei TC-Genotypen. Errechnete EC_{50} -Werte waren 2.8 nM (CC) und 4.9 nM (TC) ($p > 0.2$) (Abb. 15).

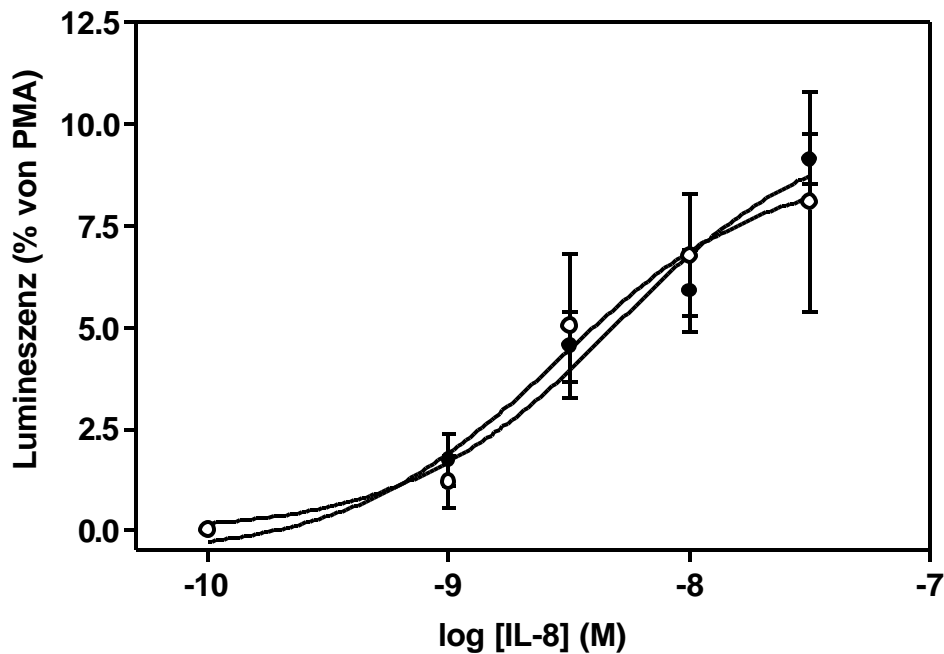


Abb.15: Dosisabhängiger Anstieg der O^{2-} -Bildung in humanen Neutrophilen nach Stimulation mit IL-8.

Als Maß für die O^{2-} -Bildung wurde die Lumineszenzänderung nach Stimulation mit den angegebenen Konzentrationen IL-8 gemessen und der maximale Anstieg (Peak) nach Stimulation bestimmt. Diese sind auf die maximale Lumineszenzänderung nach Stimulation mit 100 nM PMA bezogen und in Prozentwerten (Mittelwert \pm SEM) ausgedrückt. Die Daten stammen aus je sechs unabhängigen Messreihen je Genotyp (CC-Genotyp: weiße Kreise, $n = 6$, TC-Genotyp: schwarze Kreise, $n = 6$).

4. Diskussion

Das 825T-Allel des C825T-Polymorphismus im Gen GNB3, welches für die G-Protein-Untereinheit G β 3 kodiert, ist mit alternativem Spleißen des Gens assoziiert. Der molekulare Mechanismus ist nicht bekannt. In Zellen von 825T-Allelträgern wird dabei neben dem Genprodukt G β 3 (Wildtyp) eine um 41 Aminosäuren verkürzte Spleißvariante (G β 3-s) exprimiert. Obwohl diese Spleißvariante aus nur 6 anstatt 7 WD Repeats besteht, läßt sie sich in Zellen exprimieren und kann mit geeigneten α - und γ -Untereinheiten ein funktionell aktives G-Protein-Heterotrimer bilden (Siffert et al., 1998). Die Expression dieser Spleißvariante in COS-7-Zellen führt zu einer gesteigerten Chemotaxis dieser Zellen nach Stimulation von Rezeptoren, die heterotrimere G-Proteine aktivieren. Somit ergibt sich die Möglichkeit, über eine Genotypisierung des C825T-Polymorphismus zu erfahren, welche Menschen die Spleißvariante G β 3-s exprimieren und damit eine verstärkte Aktivierbarkeit von G-Proteinen aufweisen. Damit läßt sich zum erstenmal beim Menschen die Stärke der intrazellulären Signaltransduktion genetisch vorhersagen. Daß dies in der Tat gelingt, wurde in der vorliegenden Arbeit durch eine gesteigerte Chemotaxis von Neutrophilen von 825T-Allelträgern belegt.

Offensichtlich ist eine solche Vorhersage auch für die Situation *in vivo* möglich. So fand man bei 825T-Allelträgern gegenüber homozygoten C825-Allelträgern eine drastisch verstärkte Reduktion des koronaren Blutflusses nach Stimulation von α_2 -Adrenozeptoren, welche bekanntlich an PTX-sensitive G-Proteine koppeln (Baumgart et al., 1999). Zudem ist bekannt, daß α_2 -Adrenozeptoren heterotrimere G-Proteine unter Beteiligung von G β 3 aktivieren.

Daneben eröffnet die Genotypisierung die Möglichkeit, ganz neue Erkenntnisse darüber zu erlangen, welche menschlichen Rezeptoren heterotrimere G-Proteine aktivieren, deren $\beta\gamma$ -Dimere G β 3 beziehungsweise G β 3-s beinhalten.

Die große Menge der G α -, G β - und G γ -Isoformen erlaubt eine Vielzahl an Kombinationen unterschiedlicher G α -, G β - und G γ - Untereinheiten. Es ist allerdings davon auszugehen, daß die Zusammensetzung der Heterotrimere nachhaltig an der Ausbildung der Rezeptorspezifität derselben beteiligt ist. Bislang war die Aufklärung der Rezeptorspezifität bestimmter Heterotrimere nur dadurch zu bestimmen, daß in kultivierten Zellen mittels Antisense-Oligonukleotiden die Synthese bestimmter G β - oder G γ - Untereinheiten supprimiert wurde. Fällt nach Stimulation über einen spezifischen Rezeptor und

Ausschaltung einer spezifischen G-Protein-Untereinheit eine zelluläre Antwort beziehungsweise ein Signaltransduktionsweg aus oder wird dieser in seiner Stärke reduziert, so ist von einer funktionellen Beteiligung dieser Untereinheit bei der Rezeptor-G-Protein-Kopplung auszugehen. Selbstverständlich ist die Möglichkeit, solche Untersuchungen an menschlichen Zellen und Geweben durchzuführen, sehr eingeschränkt.

Hier eröffnet sich durch den Nachweis des C825T-Polymorphismus eine neue Möglichkeit, die Beteiligung der G β 3-Untereinheit beziehungsweise der Spleißvariante G β 3-s bei zellulären oder komplexen Reaktionen menschlicher Zellen und Gewebe nachzuweisen. Für den Fall, daß Antworten bei homozygoten C825-Allelträgern beziehungsweise 825T-Allelträgern signifikant unterschiedlich ausfallen, ist von einer Beteiligung von G β 3 an solchen Prozessen auszugehen. Verhalten sich die Reaktionen unabhängig vom Genotyp am GNB3-Locus, so ist eine Beteiligung von G β 3 eher unwahrscheinlich.

In dieser Arbeit wurden in Abhängigkeit vom Genotyp Chemotaxis, intrazellulärer Kalzium-Anstieg und Superoxid-Generation betrachtet, jeweils nach Stimulation mit IL-8 und fMLP.

Die chemotaktischen Antworten waren bei T-Allelträgern signifikant erhöht, was auf die Beteiligung der Spleißvariante zurückzuführen ist.

Bei der intrazellulären Kalzium-Freisetzung zeigte sich bei Stimulation mit fMLP ein stärkerer Anstieg bei den homozygoten C-Allelträgern. Auch dies spricht für eine Beteiligung der G-Protein-Untereinheit G β 3-s.

Sowohl die Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Stimulation mit IL-8, als auch die Messungen der Superoxid-Generation zeigten schließlich genotypabhängig keine Unterschiede, was eine Beteiligung von G β 3, beziehungsweise G β 3-s unwahrscheinlich macht.

4.1. Chemotaxis

Hypothetisch gibt es zwei Erklärungsansätze zum Verständnis der bei Expression der Spleißvariante G β 3-s verstärkten chemotaktischen Antwort menschlicher neutrophiler Granulozyten.

Nach der Bindung entsprechender Liganden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kommt es an der α -Untereinheit zum Ersatz von GDP durch GTP. Die α -Untereinheit dissoziiert in dieser aktivierten, GTP-gebundenen Form vom Rezeptor ab und setzt die $\beta\gamma$ -Dimere frei, die eine eigenständige funktionelle Einheit bilden.

Da die $\beta\gamma$ -Untereinheiten maßgeblich an chemotaktischen Antworten beteiligt sind und chemotaktische Antworten unter Beteiligung von G β 3-s im Vergleich zu G β 3 verstärkt sind, liegt die Vermutung nahe, daß heterotrimere G-Proteine mit der β -Untereinheit G β 3, also $\alpha_x\text{-}\beta\text{-}\gamma_x$, stabiler sind, als eine Kombination mit G β 3-s, also $\alpha_x\text{-}\beta\text{-}\gamma_x$. Nach G-Protein-Aktivierung würde die Freisetzung der G β 3- γ_x -Dimere von der α -Untereinheit langsamer erfolgen als die von G β 3-s- γ_x . Folglich würde bei gegebener Rezeptorstimulation eine schnellere und vermehrte Freisetzung von G β 3-s- γ_x erfolgen, was eine gesteigerte Aktivierung solcher Signaltransduktionswege induzieren könnte, die der Chemotaxis vorgeschaltet sind.

Eine alternative Möglichkeit besteht darin, daß $\beta\gamma$ -Dimere mit der Spleißvariante G β 3-s aufgrund ihrer stark veränderten Proteinstruktur bestimmte Effektoren stärker aktivieren als $\beta\gamma$ -Dimere, die G β 3 beinhalten.

Chemotaktische Antworten beruhen auf einem Zusammenspiel von Erkennen und Interpretieren des Chemokingradienten und Strukturänderung des Zytoskeletts. Beteiligt sind verschiedene Familien molekularer Regulatoren. Selektine, Integrine und Chemokine kontrollieren unterschiedliche Aspekte dieses Vorganges (Springer et al., 1994). Bei welchem Schritt und auf welche Weise strukturell unterschiedliche G-Protein-Untereinheiten Einfluß auf unterschiedlich starke chemotaktische Antworten haben, ist zur Zeit aufgrund der Komplexität der Zusammenhänge noch nicht klar.

4.2. Kalzium

Der durch IL-8 und fMLP stimulierte intrazelluläre Kalziumanstieg wird durch PTX vollständig inhibiert, was die Beteiligung von PTX-sensitiven G_i -Proteinen an der Signaltransduktion belegt.

Nach Bindung des Agonisten an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor kommt es zur Dissoziation der α - von den $\beta\gamma$ -Untereinheiten und die $\beta\gamma$ -Dimere aktivieren eine PLC β . Diese katalysiert die hydrolytische Spaltung von PIP_2 zu DAG und IP_3 . IP_3 bindet über IP_3 -Rezeptoren an das endoplasmatische Retikulum. Durch diese Bindung kommt es zur Freisetzung von dort gespeichertem Kalzium.

Wie bereits beschrieben reguliert intrazelluläres Kalzium als tertiärer Botenstoff die Aktivität von intrazellulären Enzymen, Ionenkanälen und Transportproteinen.

Der intrazelluläre Kalziumanstieg menschlicher neutrophiler Granulozyten nach Stimulation mit IL-8 ist offensichtlich unabhängig vom C825T-Gen im GNB3-Locus. Jedoch bewirkt Stimulation mit fMLP bei T-Allelträgern im Vergleich zu den homozygoten C-Allelträgern überraschenderweise eine signifikant geringere Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration.

Zunächst scheint dieses Ergebnis im Widerspruch zu der bei 825T-Allelträgern gesteigerten Chemotaxis zu stehen. Allerdings sind chemotaktische Antworten nicht von einem starken intrazellulären Kalziumanstieg abhängig, und darüber hinaus gibt es noch weitere, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ bewirken, ohne Einfluß auf gerichtete oder ungerichtete Zellbewegungen zu nehmen (Neptune und Bourne, 1997; Arai et al., 1997; Lümmen et al., 1997).

Weiterhin zeigt der verminderte intrazelluläre Kalziumanstieg bei Zellen von 825T-Allelträgern, daß zelluläre Reaktionen, bei denen $G\beta 3-s$ beteiligt ist, nicht zwangsläufig verstärkt sein müssen. Fraglich ist, inwiefern die verminderte Freisetzung eines tertiären Botenstoffes, in diesem Falle ein verminderter intrazellulärer Kalziumanstieg, Ausdruck einer gesteigerten Zellaktivität sein kann.

Erklären ließe sich dieser Sachverhalt zum Beispiel über eine gleichzeitig gesteigerte Aktivität von Kalziumpumpen in Zellen von 825T-Allelträgern. Bei steigender Konzentration wird intrazelluläres Kalzium durch den Kalzium/Natrium-Antiport, die Kalziumsequestrierung ins endoplasmatische Retikulum und die Kalzium-ATPase aus dem Zytosol exportiert. Eine zyklische Folge von

Konformationsänderungen an der Kalzium-ATPase, betrieben durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung, transportiert zwei Kalziumionen für jedes ATP-Molekül aus dem Zytoplasma in das endoplasmatische Retikulum.

Zu hohe Konzentrationen an intrazellulärem Kalzium wirken toxisch auf die Zelle, wie in Untersuchungen zu zerebraler und kardialer Ischämie gezeigt werden konnte (Morley et al., 1994; Spitznagel et al., 2000). Im Falle einer intrazellulären Azidose, zum Beispiel bei Ischämie, kommt es zur Aktivierung des Natrium-Protonen-Austauschers. Dieser transportiert Protonen gegen Natrium-Ionen aus der Zelle. Es liegen Daten vor, die zeigen, daß die gesteigerte Aktivität dieses Ionentransporters mit der kurzen Variante der G β 3-Untereinheit korreliert werden kann. Dafür sprechen auch die Studien an Lymphoblasten von Patienten mit essentieller Hypertonie, die zeigten, daß bei bis zu 50 % dieser Zellen eine gesteigerte Aktivität des Na⁺/H⁺-Austauschers vorliegt (Roskopf et al., 1993; Siffert et al., 1995). Geht man also davon aus, daß T-Allelträger eine gesteigerte Aktivität des Na⁺/H⁺-Austauschers haben, so könnte man annehmen, daß sie auch eine gesteigerte Aktivität von Pumpsystemen besitzen, die dafür sorgen, daß das intrazelluläre Kalziumgleichgewicht aufrecht erhalten wird.

Der verminderte Anstieg der Kalziumkonzentration in neutrophilen Granulozyten von T-Allelträgern als Folge einer gesteigerten Aktivität von Kalziumpumpen könnte als eine Art Schutzmechanismus vor überhöhter intrazellulärer Kalziumkonzentration gedeutet werden.

Allerdings zeigten sich unter Stimulation mit IL-8 genotypabhängig keine Unterschiede bezüglich des Anstieges der intrazellulären Kalziumkonzentration.

Diese Beobachtungen könnten dadurch erklärt werden, daß durch IL-8 stimulierte Kalziumfreisetzung von neutrophilen Granulozyten zwar über die $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G_i-Proteinen vermittelt wird, jedoch nicht über Dimere, die, je nach Genotyp, unter anderem G β 3 oder G β 3-s beinhalten, sondern zum Beispiel G β 1, G β 2 oder G β 4.

Andererseits ist darauf hinzuweisen, daß die durch IL-8 induzierten Kalziumanstiege, unabhängig vom Genotyp, generell kleiner waren als die, die durch fMLP induziert wurden. Somit wäre es auch denkbar, daß eine "kritische" Schwellenkonzentration von Kalzium nicht überschritten wird, bei der in Zellen von 825T-Allelträgern eine vermehrte Aktivierung von Kalzium-Pumpen induziert wird.

Zukünftig sind weitere Untersuchungen dazu erforderlich, in welcher Weise die Expression der Spleißvariante G β 3-s die intrazelluläre Kalzium-Homöostase in Zellen von 825T-Allelträgern beeinflusst.

4.3. O²-Generation

Obwohl auch durch fMLP und durch IL-8 stimulierte O²-Generation vollständig durch PTX inhibiert werden kann, was wiederum die Beteiligung PTX-sensitiver G_i-Proteinen beweist, war die O²-Generation nicht vom Genotyp am GNB3-Locus abhängig. Dies deutet daraufhin, daß die O²-Generation über Aktivierung heterotrimerer G-Proteine ohne Beteiligung von G β 3, beziehungsweise G β 3-s erfolgt.

4.4. Evolutionäre Aspekte der weltweiten Verteilung des 825T-Allels

Die Genotypisierung von 5254 Individuen aus 55 unterschiedlichen Populationen gab Aufschluß über die weltweite Verteilung der Genotypen CC, TC und TT. So liegt die Frequenz für das 825T-Allel bei Schwarz-Afrikanern bei 79 %, bei Ostasiaten um 50 % und bei Europiden bei nur 33 %.

Siebzehn genotypisierte Affen unterschiedlicher Rassen waren zu 100 % homozygote C-Allelträger am GNB3-Locus, was die Stabilität dieser Position über die letzten 30 Millionen Jahre anzeigt. Dies weist darauf hin, daß es sich bei diesem C825-Allel um den "Ur-Zustand" dieses Gens handelt, und daß die Mutation von C825 zu 825T vor etwa 5 Millionen Jahren zur Zeit der Entwicklung der Menschen aus den Affen aufgetreten sein muß.

In der folgenden Zeit könnte das T-Allel als "Sparsamkeits-Gen", sogenanntes "Thrifty-Gene", seinen Trägern möglicherweise geholfen haben. Die einsparenden Effekte, zum Beispiel auf das Körpergewicht, sind beschrieben (Siffert, 1996; Siffert et al., 1999; Gutersohn et al., 2000). In diesem Zusammenhang ist dann möglicherweise auch die bei 825T-Allelträgern verstärkte Chemotaxis von Immunzellen zu sehen. Chemotaxis als ein wichtiger Mechanismus der unspezifischen Immunantwort könnte in Urzeiten ein wesentlicher Resistenzfaktor gewesen sein, ein Resistenzfaktor, dessen Potenz durch das Auftreten der Spleißvariante noch verstärkt wurde.

Während nachfolgender Wanderungsbewegungen und nicht bekannten Faktoren muß sich dann das Gen dem heutigen Stand entsprechend verbreitet, beziehungsweise ausgedünnt haben (Siffert et al., 1999).

4.5. Mögliche Krankheitsassoziationen

Abschließend stellt sich die Frage nach der möglichen klinischen Bedeutung der hier dargestellten Ergebnisse, beziehungsweise die Frage nach Zuständen oder Krankheiten des menschlichen Organismus, bei denen eine gesteigerte Chemotaxis von Zellen des Immunsystems pathogenetisch relevant sein könnte.

Eine vermehrte Sekretion von Chemokinen wurde bei einer Vielzahl von Krankheiten beschrieben (Baggiolini et al., 1994). Die Vermutung liegt nahe, daß hier freigesetzte Chemokine eine Akkumulation und Aktivierung von Leukozyten im Gewebe bewirken sollen.

Vor allem bei akuten entzündlichen Erkrankungen spielen die chemotaktischen Antworten von menschlichen neutrophilen Granulozyten auf Stimulation mit IL-8 eine Rolle. Zu nennen sind hier bakterielle Pneumonien und Meningitiden, das „adult respiratory distress syndrom“ (ARDS), sowie entzündliche Darmerkrankungen. Zudem könnte eine gesteigerte Chemotaxis bei rheumatoider Arthritis, Psoriasis und bei Erkrankungen des atopischen Formenkreises, zum Beispiel Rhinitis, Asthma und atopische Dermatitis eine Rolle spielen.

In der Bronchoalveolarflüssigkeit von Patienten mit bakterieller Pneumonie oder ARDS findet sich eine erhöhte Konzentration von IL-8 (Chollet-Martin et al., 1993), das Gleiche gilt für entzündliche Infiltrate bei bakterieller Meningitis.

Die Darmerkrankungen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn sind charakterisiert durch eine chronische Entzündung mit Phasen akuter Entzündungsexazerbationen. In diesen akuten Phasen verlassen neutrophile und eosinophile Granulozyten den Blutkreislauf und infiltrieren die Darmschleimhaut, in der auch unterschiedliche Chemokine nachgewiesen werden konnten (Reinecker et al., 1995; Grimm und Doe et al., 1996).

Bei der Psoriasis vulgaris, einer hyperkeratotischen Hauterkrankung, enthalten die Hautläsionen neutrophile Granulozyten und aktivierte T-Zellen, sowie IL-8, das in diesen hohen Konzentrationen in gesunder Haut nicht zu finden ist (Schroeder et al., 1996). In Läsionen psoriatischer Epidermis konnten

im Vergleich zu gesunder Haut zehnfach erhöhte Konzentrationen von CXCR1- und CXCR2-mRNS gezeigt werden (Schulz et al., 1993). Möglicherweise ist die Überexpression von IL-8-Rezeptoren für die epidermale Hyperplasie und die Leukozyteninfiltration verantwortlich. Tatsächlich bewirken Medikamente zur Behandlung der Psoriasis wie Calcitriol, Dithranol und Cyclosporin eine Down-Regulation von IL-8-Rezeptoren auf den Keratinozyten (Schulz et al., 1993; Lemster et al., 1995).

Für die Atherosklerose typisch ist die Entwicklung atherosklerotischer Plaques im Rahmen einer chronischen Entzündung (Ross, 1995). Entscheidende pathogenetische Faktoren sind die Rekrutierung von Monozyten und Migration, Wachstum und Aktivierung von Lipid-beladenen Makrophagen, T-Lymphozyten und glatten Gefäß-Muskelzellen. Auch hier konnte eine vermehrte Expression von Chemokinen in Makrophagen-reichen Arealen von atherosklerotischen Plaques gezeigt werden, die hierdurch zur Extravasation von Monozyten und der Bildung atherosklerotischer Läsionen führt (Nelken et al., 1991).

Bei den genannten Erkrankungen könnte die Chemotaxis von Immunzellen nach Stimulation mit chemotaktisch wirksamen Stoffen pathogenetisch oder für den Krankheitsverlauf bedeutsam sein.

Falls das in dieser Arbeit gezeigte unterschiedliche Verhalten der neutrophilen Granulozyten von Individuen mit den verschiedenen Genotypen am GNB3-Locus auch *in vivo* relevant ist, so sollte man auch *in vivo* bei 825T-Allelträgern gesteigerte chemotaktische Antworten erwarten. Allerdings ist derzeit noch keine Aussage über die Immunkompetenz dieser Zellen möglich, das heißt über die tatsächliche Fähigkeit dieser Zellen zum Beispiel Entzündungsverursacher zu bekämpfen. Ein Mittel der Granulozyten ist die Bekämpfung von Bakterien durch die Produktion und Freisetzung von Sauerstoffradikalen. Bezogen auf die O²-Bildung konnte auf Stimulation mit fMLP oder IL-8 genotypabhängig kein Unterschied gezeigt werden. Andererseits gibt es weitere Mechanismen, zum Beispiel die Phagozytose.

Ob neutrophile Granulozyten von 825T-Allelträgern neben einer gesteigerten Chemotaxis auch eine gesteigerte Phagozytoseaktivität aufweisen, wurde noch nicht untersucht. Zumindest könnte man die Hypothese aufstellen, daß neutrophile Granulozyten eingedrungene Bakterien wegen ihrer gesteigerten Chemotaxis früher erreichen und damit effektiver attackieren können.

Ob sich das *in vitro* gezeigte unterschiedliche Verhalten der Granulozyten von Individuen mit unterschiedlichen Genotypen am GNB3-Locus auch *in vivo* nachweisen läßt, könnte zum Beispiel im

Rahmen von klinischen Studien überprüft werden. Eine bereits durchgeführte Studie beschäftigte sich mit der Transplantatabstoßung: Hier wurde gezeigt, daß die Überlebenszeit von Nierentransplantaten homozygoter T-Allelträger signifikant herabgesetzt ist (Beige et al., 1999). Die Abstoßung von Transplantaten beruht u.a. auf einer übermäßigen Immunantwort des Empfängers. Das transplantierte Organ wird als fremd erkannt und vom Immunsystem abgestoßen.

Unter der Annahme, daß eine verstärkte - und auch schon bei niedrigen Konzentrationen eines Chemokins signifikant meßbare - Chemotaxis der Neutrophilen von 825T-Allelträgern gegenüber solchen von homozygoten C825-Allelträgern eine bessere zelluläre Immunkompetenz bedeutet, könnte die Genotypisierung am GNB3-Locus eine wertvolle diagnostische und auch prognostische Hilfe zur Einschätzung der individuellen Immunkompetenz darstellen. Aus therapeutischer Sicht wäre die Genotypisierung interessant, da man möglicherweise einen Hinweis darauf erhalten könnte, ob eine Therapie mit Zytokinen sinnvoll, beziehungsweise wie hoch die Ansprechwahrscheinlichkeit ist. Zu denken ist hier zum Beispiel an die Therapie der Hepatitis C mit α -Interferon oder an die Behandlung der Multiplen Sklerose mit β -Interferon. Weitere Untersuchungen müßten die Frage beantworten, ob auch andere Zelltypen des Immunsystems, zum Beispiel T-Lymphozyten von 825T-Allelträgern eine verstärkte Antwort auf Stimulation zeigen. In Assoziationsstudien kann die Wertigkeit der Genotypisierung für Prognose und Therapieentscheidung, zum Beispiel bei akuten oder chronischen Entzündungskrankheiten entschieden werden.

5. Zusammenfassung

Das 825T-Allel des C825T-Polymorphismus im Gen GNB3, welches für die β -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine kodiert, ist mit der Expression der kurzen Spleißvariante G β 3-s und verstärkter Signaltransduktion via Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine assoziiert. Da der $\beta\gamma$ -Untereinheit der G-Proteine eine entscheidende Rolle bei der gerichteten Zellbewegung (Chemotaxis) zukommt, stellte sich die Frage, ob strukturell unterschiedliche G-Proteine, nämlich G-Proteine mit der β -Untereinheit G β 3 und G-Proteine mit der Spleißvariante G β 3-s, unterschiedlich starke chemotaktische Antworten von menschlichen neutrophilen Granulozyten hervorrufen. Menschliche neutrophile Granulozyten bewegen sich gezielt auf Entzündungsherde zu und produzieren zur Bekämpfung von inflammatorischen Noxen Sauerstoffradikale.

In dieser Arbeit wurden in Abhängigkeit vom Genotyp am GNB3-Locus (CC-, TC- oder TT-Genotyp) Chemotaxis, intrazellulärer Kalziumanstieg und Superoxid-Generation von menschlichen neutrophilen Granulozyten betrachtet, jeweils nach Stimulation mit den chemotaktisch wirksamen Substanzen N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP) und Interleukin-8 (IL-8).

Bei Stimulation mit fMLP wurde eine signifikant gesteigerte Zellmigration bei Neutrophilen von Individuen mit dem TC/TT-Genotyp ($EC_{50} = 1.5 \pm 1.3$ nM) verglichen mit Neutrophilen von homozygoten C-Allelträgern ($EC_{50} = 5.9 \pm 1.5$ nM) bei Konzentrationen zwischen 0.1 und 100 nM gefunden. Stimulationen mit IL-8-Konzentrationen zwischen 0.1 und 10 nM zeigten eine bis zu 2.5-fach höhere Chemotaxis der Granulozyten von 825T-Allelträgern im Vergleich zu den homozygoten C-Allelträgern. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen erwiesen sich intrazellulärer Anstieg der Kalziumkonzentration nach Stimulation mit IL-8 und Freisetzung von Sauerstoffradikalen als unabhängig vom Genotyp. Stimulation mit fMLP bewirkte bei T-Allelträgern im Vergleich zu den homozygoten C-Allelträgern eine signifikant kleinere Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dies zeigt, daß zelluläre Reaktionen, bei denen G β 3-s beteiligt ist, nicht zwangsläufig erhöht sein müssen.

Unter der Annahme, daß eine verstärkte Chemotaxis der Neutrophilen von 825T-Allelträgern gegenüber solchen von homozygoten C825-Allelträgern eine bessere zelluläre Immunkompetenz bedeutet, könnte die Genotypisierung eine wertvolle diagnostische und prognostische Hilfe zur Einschätzung der individuellen Immunkompetenz darstellen.

6. Literatur

1. Arai, H., Tsou, C.-L., Charo, I.F. (1997):

Chemotaxis in a lymphocyte cell line transfected with the C-C chemokine receptor 2B: Evidence that directed migration is mediated by $\beta\gamma$ dimers released by activation of $G_{\alpha i}$ -coupled receptors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 14495-14499.

2. Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. (1994):

Interleukin-8 and related chemotactic cytokines -- CXC and CC chemokines.

Adv. Immunol. 55, 97-179.

3. Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. (1997):

Human chemokines: an update.

Annu. Rev. Immunol. 15, 675-705.

4. Baumgart, D., Naber, C., Haude, M., Oldenburg, O., Erbel, R., Heusch, G., Siffert, W. (1999):

G protein beta3 subunit 825T allele and enhanced coronary vasoconstriction on alpha(2)-adrenoceptor activation.

Circ. Res. 85, 965-969.

5. Bayewitch, M.L., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Pfeuffer, T., Nevo, I., Simmonds, W.F., Vogel, Z. (1998):

Differential modulation of adenylyl cyclases I and II by various G beta subunits.

J. Biol. Chem. 273, 2273-2276.

6. Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Graeves, D.R., Zlotnik, A., Schall, T.J. (1997):

A new class of membrane-bound chemokine with a CX₃C motif.

Nature. 385, 640-644.

7. Beige, J., Engeli, S., Ringel, J., Offermann, G., Distler, A., Sharma, A.M. (1999):
Donor G protein $\beta 3$ subunit 825TT genotype is associated with reduced kidney allograft survival.
J. Am. Soc. Nephrol. 10, 1717-1721.

8. Berridge, M.J. (1987):
Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers.
Ann. Rev. Biochem. 56, 159-193.

9. Bhakdi, S., Martin, E. (1991):
Superoxide generation by human neutrophils induced by low doses of escherichia coli hemolysin.
Infect. Immun. 59, 2955-2962.

10. Birnbaumer, L., Birnbaumer, M. (1995):
Signal transduction by G proteins: 1994 edition.
J. Recept. Signal. Transduct. Res. 15, 213-252.

11. Bleul, C.C., Fuhlbrigge, R.C., Casanovas, J.M., Aiuti, A., Springer, T.A. (1996):
A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1).
J. Exp. Med. 184, 1101-1109.

12. Bornfeldt, K.E., Graves, L.M., Raines, E.W., Igarashi, Y., Wayman, G., Yamamura, S., Yatomi, Y., Sidhu, J.S., Krebs, E.G. Hakomori, S., Ross, R. (1995):
Sphingosine-1-phosphate inhibits PDGF-induced chemotaxis of human arterial smooth muscle cells: Spatial and temporal modulation of PDGF chemotactic signal transduction.
J. Cell Biol. 130, 193-206.

13. Boyum, A. (1968):

Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g.

Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 97, 77-89.

14. Carty, D.J. (1994):

Pertussis toxin-catalyzed ADP- ribosylation of G proteins.

Methods Enzymol. 237, 63-71.

15. Chen Y., Weng, G., Li, J., Harry, A., Pieroni, J., Dingus, J., Hildebrandt, J.D., Guarnieri, F., Weinstein, H., Iyengar, R. (1997):

A surface on the G protein beta-subunit involved in interactions with adenylyl cyclases.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 94, 2711-2714.

16. Chollet-Martin, S., Montravers, P., Gibert, C., Elbim, C., Desmonts, J.M., Fagon, J.Y. (1993):

High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome.

Infect. Immun. 61, 4553-4559.

17. Clark-Lewis, I., Kim, K.S., Rajarathnam, K., Gong, J.H., Dewald, B., Moser, B., Baggiolini, M., Sykes, B.D. (1995):

Structure-activity relationships of chemokines.

J. Leucocyte Biol. 57, 703-711.

18. Damaj, B. B., McColl, S. R., Mahana, W., Crouch, M. F., Naccache, P. H. (1996):

Physical Association of G_{i2}α with Interleukin-8 Receptors.

J. Biol. Chem. 271, 12783-12789.

19. Dhanasekaran N., Prasad, M.V. (1998):

G protein subunits and cell proliferation.

Biol. Signals. Recept. 7, 109-117.

20. Ford, C.E., Skiba, N.P., Bae, H., Daaka, Y., Reuveny, E., Shekter, L.R., Rosal, R., Wenig, G., Yang, C.S., Iyengar, R., Miller, R.J., Jan, L.Y., Lefkowitz, R.J., Hamm, H.E. (1998):

Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors.

Science. 280, 1271-1274.

21. Gilman, A.G. (1987):

G proteins: transducers of receptor-generated signals.

Annu. Rev. Biochem. 56, 615-649.

22. Grimm, M.C., Doe, W.F. (1996):

Chemokines in inflammatory bowel disease mucosa: expression of RANTES, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-1 β , and γ -interferon-inducible protein-10 by macrophages, lymphocytes, endothelial cells, and granulomas.

Inflamm. Bowel. Dis. 2, 88-96.

23. Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y. (1985):

A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties.

J. Biol. Chem. 260, 3440-3450.

24. Gutersohn, A., Naber, C., Müller, N., Erbel, R., Siffert, W. (2000):

G protein β 3 subunit 825TT genotype and post-pregnancy weight retention.

The Lancet. 355, 1240-1241.

25. Hamm, H.E. (1998):

The many faces of G protein signaling.

J. Biol. Chem. 273, 669-672.

26. Kelner, G.S., Kennedy, J., Bacon, K.B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bazan, J.F., Moore, K.W., Schall, T.J. (1994):

Lymphotoxin: A cytokine that represents a new class of chemokine.

Science. 266, 1395-1399.

27. Krapivinsky, G., Kennedy, M.E., Nemec, J., Medina, I., Krapivinsky, L., Clapham, D.E. (1998):

Gbeta binding to GIRK4 subunit is critical for G protein-gated K⁺ channel activation.

J. Biol. Chem. 273, 16946-16952.

28. Laudanna, C., Campbell, J.J., Butcher, E.C. (1996):

Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins.

Science. 271, 981-983.

29. Lemster, B.H., Carroll, P.B., Rilo, H.R., Johnson, N., Nikaein, A. Thomson, A.W. (1995):

IL-8/IL-8 receptor expression in psoriasis and the response to systemic tacrolimus (FK506) therapy.

Clin. Exp. Immunol. 99, 148-154.

30. Liang, S.L., Woodlock, T.J., Within, J.C., Lichtman, M.A., Segel, G.B. (1990):

Signal transduction in N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine and concanavalin A stimulated human neutrophils: superoxide production without a rise in intracellular free calcium.

J. Cell. Physiol. 145, 295-302.

31. Loetscher, P., Seitz, M., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Moser, B. (1994):
Both interleukin-8 receptors independently mediate chemotaxis. Jurkat cells transfected with IL-8R1 or IL-8R2 migrate in response to IL-8, GRO alpha and NAP-2.
FEBS. Lett. 341, 187-192.
32. Loetscher, M., Gerber, B., Loetscher, P., Jones, S.A., Piali, L., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Moser, B. (1996):
Chemokine receptor specific for IP10 and Mig: Structure, function, and expression in activated T-lymphocytes.
J. Exp. Med. 184, 963-969.
33. Ludwig, F., Petersen, F., Zahn, S., Götze, O., Schröder, J.-M., Flad, H.-D., Brandt, E. (1997):
The CXC-chemokine neutrophil-activating peptide-2 induces two distinct optima of neutrophil chemotaxis by differential interaction with interleukin-8 receptors CXCR-1 and CXCR-2.
Blood. 90, 4588-4597.
34. Lümmen, G., Virchow, S., Rümmlenapp, U., Schmidt, M., Wieland, T., Otto, T., Rübber, H., Jakobs, K.H. (1997):
Identification of G protein-coupled receptors potently stimulating migration of human transitional-cell carcinoma cells.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 356, 769-776.
35. Luster, A.D., Rothenberg, M.E. (1997):
Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation.
J. Leukoc. Biol. 62, 620-633.

36. Luster, A.D. (1998):

Chemokines – Chemotactic cytokines that mediate inflammation

N. Engl. J. Med.. 338, s. bes. S. 437.

37. Matsushima, K., Larsen, C.G., Du Bois, G.C., Oppenheim, J.J. (1989):

Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line.

J. Exp. Med. 169, 1485-1490.

38. Morley, P., Hogan, M.J., Hakim, A.M. (1994):

Calcium-mediated mechanisms of ischemic injury and protection.

Brain. Pathol. 4, 37-47.

39. Mukaida, N., Harada, A., Matsushima, K. (1998):

Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions.

Cytokine Growth Factor Rev. 9, 9-23.

40. Murphy, P.M. (1994):

The molecular biology of leucocyte chemoattractant receptors.

Annu. Rev. Immunol. 12, 593-633.

41. Murphy, P.M., (1996):

Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis.

Cytokine Growth Fact. Rev. 7, 47-64.

42. Nelken, N.A., Coughlin S.R., Gordon, D., Wilcox, J.N. (1991):

Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques.

J. Clin. Invest. 88, 1121-1127.

43. Neptune, E.R. and Bourne, H.R. (1997):

Receptors induce chemotaxis by releasing the $\beta\gamma$ subunit of G_i , not by activating G_q or G_s .

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 14489-14494.

44. Niedel, J., Wilkinson, S. and Cuatrecasas, P. (1979):

Receptor-mediated uptake and degradation of ^{125}I -chemotactic peptide by human neutrophils.

J. Biol. Chem. 21, 10700-10706.

45. Nishizuka, Y. (1984):

The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion.

Nature. 308, 693-698.

46. Okamoto, T., Nishimoto, I. (1991):

Detection of G protein-activator regions in M_4 subtype muscarinic, cholinergic, and α_2 -adrenergic receptors based upon characteristics in primary structure.

J. Biol. Chem. 267, 8342-8346.

47. Ostrowski, J., Kjelsberg, M.A., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1992):

Mutagenesis of β_2 -adrenergic receptor: how structure elucidates function.

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32, 167-185.

48. Pietruck, F., Moritz, A., Montemurro, M., Sell, A., Busch, S., Roskopf, D., Virchow, S., Esche, H., Brockmeyer, N., Jakobs, K.H., Siffert, W. (1996):

Selective enhanced cellular signaling by G_i proteins in essential hypertension. $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\beta_1$ and $G\beta_2$ are not mutated.

Circ. Res. 79, 974-983.

49. Premack, B.A., Schall, T.J. (1996):

Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection.

Nat. Med. 2, 1174-1178.

50. Reinecker, H.-C., Loh, E.Y., Ringler, D.J., Mehta, A., Rombeau, J.L., MacDermott, R.P. (1995):

Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa.

Gastroenterology. 108, 40-50.

51. Ross, R. (1995):

Cell biology of atherosclerosis.

Ann. Rev. Physiol. 57, 791.

52. Roskopf, D., Düsing, R., Siffert, W. (1993):

Membrane sodium-proton exchange and primary hypertension.

Hypertension. 21, 607-617.

53. Schroeder, J.M., Noso, N., Sticherling, M., Christophers, E. (1996):

Role of eosinophil-chemotactic C-C chemokines in cutaneous inflammation.

J. Leukoc. Biol. 59, 1.

54. Schulz, B.S., Michel, G., Wagner, S., Suss, R., Beetz, A., Peter, R.U., Kemeny, L., Ruzicka, T.

(1993):

Increased expression of epidermal IL-8 receptor in psoriasis. Down-regulation by FK-506 in vitro.

J. Immunol. 151, 4399-4406.

55. Siffert, W., Roszkopf, D., Moritz, A., Wieland, T., Kaldenberg-Stasch, S., Kettler, N., Hartung, K., Beckmann, S., Jacobs, K.H. (1995):
Enhanced G protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension.
J. Clin. Invest. 96, 759-766.
56. Siffert, W., Roszkopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma, A.M., Ritz, E., Wichmann, H.E., Jacobs, K.H., Horsthemke, B. (1998):
Association of a human G-Protein $\beta 3$ subunit variant with hypertension.
Nat. Genet. 18, 45-48.
57. Siffert, W. (1996):
G proteins, hypertension, and coronary heart disease – Novel findings and hypotheses.
Kidney and Blood Press Res. 19, 71-80.
58. Siffert, W., Forster, P., Jöckel, K.-H., Mvere, D.A., Brinkmann, B., Naber, C., Crookes, R., Heyns, A.D.P., Epplen, J.T., Fridey, J., Freedman, B.I., Müller, N., Stolke, D., Sharma, A.M., Moutaery, K.A., Grosse-Wilde, H., Buerbaum, B., Ehrlich, T., Ahmad, H.R., Horsthemke, B., Toit, E.D.D., Tiilikainen, A., Ge, Junbo, Wang, Y., Yang, D., Hüsing, J., Roszkopf, D. (1999):
Worldwide ethnic distribution of the G protein $\beta 3$ subunit 825T allele and its association with obesity in Caucasian, Chinese, and black African individuals.
J. Am. Soc. Nephrol. 10, 1921-1930.
59. Spitznagel, H., Chung, O., Xia, Q., Rossius, B., Illner, S., Jahnichen, G., Sandmann, S., Reincke, A., Daemen, M.J., Unger, T. (2000):
Cardioprotective effects of the Na(+)/H(+)-exchanger inhibitor cariporide in infarct-induced heart failure.
Cardiovasc. Res. 46, 102-110.

60. Sprang, S.R. (1997):

G protein mechanisms: insights from structural analysis.

Annu. Rev. Biochem. 66, 639-678.

61. Springer, T.A. (1994):

Traffic signals fore lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell. 76, 301-314.

62. Stryer, L. (1991):

Biochemie. 4.Aufl.

Heidelberg, Berlin, New York: Spektrum/Akademischer Verlag GmbH; s. bes. S. 1042

63. Taub, D.D. (1996):

Chemokine-leukocyte interactions. The voodoo that they do so well.

Cytokine Growth Factor. Rev. 7, 355-376.

64. Tilly, B.C., Tertoolen, L.G.J., Remorie, R., Ladoux, A., Verlaan, I., de Laat, S.W., Molenaar, W.H. (1990):

Histamine as a growth factor and chemoattractant for human carcinoma and melanoma cells: action through Ca²⁺-mobilizing H₁ receptors.

J. Cell Biol. 110, 1211-1215.

65. Watson, S., Arkininstall, S. (1994):

The G-protein linked receptor.

London: Academic press Ltd.; s. bes. 19-31, 60-70, 117-121, 152-158, 272-274, 284-291.

66. Yoshimura, T., Matsushima, K., Tanaka, S., Robinson, E.A., Appella, E., Oppenheim, J.J., Leonard, E.J. (1987):

Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defence cytokines.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 84, 9233-9237.

67. Yoshimura, T., Robinson, E.A., Tanka, S., Appella, E., Kuratsu, J., Loenard, E.J. (1989):

Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants.

J. Exp. Med. 169, 1449-1459.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. W. Siffert für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit und die kritischen Diskussionen und Anregungen bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med S. Virchow, der mir während der Durchführung meiner Arbeit jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Lebenslauf

Nikolaus Daniel Thomas Ansorge

Persönliche Angaben

Geburtsdatum/-ort 09.07.1973 in Bonn
 Familienstand ledig
 Anschrift Rüttenscheider Str. 63, 45130 Essen

Ausbildung

Juli 1992 Abitur am Goethe-Gymnasium in Essen
 1992 – 1993 Zivildienst in der Krankenpflege, Innere Abteilung der St. Josef-Hospitale/Essen
 Oktober 1993 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der GH Universität Essen
 August 1995 Ärztliche Vorprüfung
 August 1996 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 1996 – 1999 Famulaturen in den Fächern Chirurgie, Innere Medizin, Orthopädie, Neurologie, Hämatologie/Onkologie und Pharmakologie
 Februar 1998 Beginn der Promotion am Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Essen
 April 1999 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 April 1999 Beginn des Praktischen Jahres
 Innere Medizin, Anästhesie (Klinikum Niederberg, Velbert), Chirurgie (C.H.Baragwanath-Hospital, Johannesburg, RSA)
 April 2000 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit

seit August 2000 Arzt im Praktikum am Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Essen