

Aus der Hautklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf

Direktorin: Frau Prof. Dr. I. Moll

**Charakterisierung des  $\beta_2$ -Adrenozeptorsystems und dessen  
dynamisches Regulationsverhalten auf humanen, epidermalen  
Keratinocyten in vitro**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Andrea Böhme  
aus Geesthacht

Hamburg, 1999

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 9. November 1999

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. H. Mensing

Korreferent: Prof. Dr. I. Moll

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Die Haut als strukturelle und funktionelle Einheit	1
1.2. Epidermale Signaltransduktionssysteme	3
1.2.1. Rezeptorsysteme	3
1.3. Das adrenerge Signaltransduktionssystem	4
1.3.1. Biochemische, physiologische und klinische Charakterisierung des Adrenozeptorsystems	4
1.3.2. Die $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion auf molekularer Ebene	8
1.3.3. Dynamische Regulation der $\beta$ -adrenergen Zellantwort	10
1.4. Vorkommen und Bedeutung des $\beta$ -Adrenozeptorsystems in der Epidermis	12
1.4.1. Die Erforschung des $\beta$ -Adrenozeptorsystems in der Epidermis	12
1.4.2. Physiologische Funktion des epidermalen $\beta$ -Adrenozeptorsystems	13
1.5. Klinische Bedeutung des epidermalen $\beta$ -Adrenozeptorsystems	15
1.6. Fragestellung und Ziele	20
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1. Zellkultur	21
2.1.1. Herkunft der humanen Keratinozyten	21
2.1.2. Isolierung humaner Keratinozyten aus Vorhautgewebe	21
2.1.2.1. Allgemeine Versuchsbedingungen	22
2.1.2.2. Präparation der Vorhäute	22
2.1.3. Anlegen der Primärkultur	23
2.1.4. Passagierung der humanen Keratinozyten	23
2.2. Inkubationsversuche an humanen Keratinozyten	24
2.3. Radioligandenbindungsstudie - Sättigungsexperiment	25

2.3.1.	Theoretische Grundlagen	25
2.3.2.	Versuchsaufbau des Sättigungsexperimentes	27
2.3.3.	Auswertung der experimentellen Daten	28
2.3.3.1.	Kinetik der spezifischen [ <sup>3</sup> H]-CGP-12177-Rezeptor-Bindung	28
2.3.3.2.	Berechnung der Bindungsstellen ( $B_{\max}$ ) und der Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) nach Scatchard und Hofstee	30
2.4.	Statistik	32
2.5.	Tabellarische Auflistung der verwendeten Substanzen, Geräte und Hilfsmittel	33
2.5.1.	Lösungen und Reagenzien	33
2.5.2.	Großgeräte	34
2.5.3.	Kleingeräte und Hilfsmittel	34
3.	ERGEBNISSE	36
3.1.	Morphologie und Wachstumsverhalten der normalen, humanen Keratinocytenkultur	36
3.2.	Exemplarische Darstellung der Ergebnisse eines Radioliganden (RL)- Sättigungsexperimentes	38
3.3.	$\beta_2$ -Adrenozeptordichte und -affinität in unbehandelten Keratinocyten- kulturen	41
3.4.	$\beta_2$ -Adrenozeptordichte und -affinität auf unbehandelten Keratinocyten im Passagenverlauf	43
3.5.	Inkubationsversuche	44
3.5.1.	Inkubation mit dem $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten Isoprenalin	45
3.5.1.1.	Ermittlung der Dosis-Wirkungskurve	45
3.5.1.2.	Ermittlung der Zeit-Wirkungskurve	47
3.5.2.	Inkubation mit den $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten Propranolol und Alprenolol	49
3.5.3.	Inkubation mit Hydrokortison	51

3.5.4.	Inkubation mit Dexamethason	53
3.5.4.1.	Ermittlung der Dosis-Wirkungskurve	53
3.5.4.2.	Ermittlung der Zeit-Wirkungskurve	55
3.5.5.	Koinkubation mit Dexamethason und Isoprenalin	57
3.5.6.	Inkubation mit all-trans-Retinsäure	59
3.5.7.	Inkubation mit Calciumchlorid	61
3.6.	Tabellarische Auflistung der Datengesamtheit	63
4.	DISKUSSION	75
4.1.	Charakterisierung epidermaler Modell- und Zellkultursysteme unter besonderer Berücksichtigung der Kultivierung normaler, humaner Keratinozyten (NHK)	75
4.2.	Exprimierte $\beta_2$ -Adrenozeptordichte und -affinität auf unbehandelten Keratinozyten	81
4.3.	Dynamische Regulation der exprimierten $\beta_2$ -Adrenozeptordichte und -affinität	88
4.3.1.	Inkubation mit dem $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten Isoprenalin	88
4.3.2.	Inkubation mit den $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten Propranolol und Alprenolol	97
4.3.3.	Inkubation mit den Glukokortikoiden Hydrokortison und Dexamethason	105
4.3.4.	Koinkubation mit Dexamethason und dem $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten Isoprenalin	114
4.3.5.	Inkubation mit all-trans-Retinsäure	117
4.3.6.	Inkubation mit Calciumchlorid	126
4.4.	Klinische und therapeutische Schlußfolgerungen	134
5.	ZUSAMMENFASSUNG	143
6.	LITERATURVERZEICHNIS	145

7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	195
8.	DANKSAGUNG	198
9.	LEBENS LAUF	199
10.	ERKLÄRUNG	200

„Vor langer Zeit wurde klar, daß der Schlüssel zu jedem biologischen Problem schließlich in der Zelle gesucht werden muß, denn jeder lebende Organismus ist oder war zu irgendeiner Zeit eine Zelle.“

Edmund B. Wilson  
Die Zelle in Entwicklung und Vererbung  
3. Auflage, 1925, Macmillan

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Die Haut als strukturelle und funktionelle Einheit

Die Hautdecke (*Integumentum commune*) stellt die äußere Begrenzung des Menschen zu seiner Umwelt dar. Sie ist aus Haut (*Cutis*) und angrenzender Unterhaut (*Subcutis*) zusammengesetzt. Die *Cutis*, mit 1,5 bis 2 m<sup>2</sup> das größte Einzelorgan des Körpers, gliedert sich in die Oberhaut (*Epidermis*) und die Lederhaut (*Dermis*). Die gefäßlose, durch Diffusion versorgte *Epidermis* ist ektodermaler Herkunft und mit der gefäß- und nervenführenden *Dermis*, die vom Mesoderm abstammt, dreidimensional verzapft [299, 367].

Die *Epidermis* wird von verhornenden Epithelzellen, den Keratinozyten, schichtweise aufgebaut (sog. mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel). Sie gliedert sich in die Keimschicht (*Stratum basale*), Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*), Körnerschicht (*Stratum granulosum*), Glanzschicht (*Stratum lucidum*) und die nach außen hin abschließende Hornschicht (*Stratum corneum*) [299, 354, 367].

Die Zellteilung erfolgt in den untersten Zellagen. Während die eine postmitotische Tochterzelle als Stammzelle in der Keimschicht verbleibt und sich erneut teilt, erfolgt die Ausdifferenzierung der anderen Tochterzelle auf ihrem Weg durch die epidermalen Schichten, bis sie letztlich nach ca. 30 Tagen als kernloser Korneozyt abgestoßen wird (sog. terminale, epidermale Differenzierung) [299, 354]. Die Zellteilung im basalen Kompartiment und die Desquamation der differenzierten Zellen befinden sich in einem dynamischen Gleichgewicht [348].

Die Keratinozyten, die etwa 90 bis 95% der epidermalen Zellpopulation ausmachen und somit das eigentliche Parenchym der Epidermis darstellen [214, 569], wandeln im Verlauf der terminalen Differenzierung ihre Gestalt und durchlaufen ein klassisches Differenzierungsmuster. Aus den hochprismatischen Basalzellen mit großen Kernen und relativ wenig Zytoplasma, die vorwiegend Keratin 5 und 14 synthetisieren, werden im Verlauf größere, polygonale Stachelzellen, die sich in den höheren Zellagen abflachen. In der Differenzierungsschicht des Stratum granulosum erscheinen die Zellen bereits deutlich abgeflacht, synthetisieren vorwiegend Keratin 1, 10 und 11 und enthalten Keratohyalin granula [147, 351, 566]. Am Ende des Differenzierungsprozesses werden die Zellen als platte, fest gepackte, dicht mit Tonofilamenten angefüllte, kernlose Hornzellen abgestoßen.

Neben den Keratinozyten sind melaninbildende Melanozyten, T-Lymphozyten, die dem Monozyten-Makrophagen-System zugehörigen Langerhanszellen sowie die der Neuralleiste entstammenden Merkelzellen in der dermoepidermalen Grenzzone und der Basalschicht vorhanden [299, 354, 367].

Die komplexe Struktur der Epidermis spiegelt ihre Multifunktionalität wider: Protektion vor mechanischen, chemischen und thermischen Einflüssen, immunologische Abwehr, Regulation des Temperatur- und Wasserhaushaltes, Sinneswahrnehmung und Kommunikation [355].

Die Keratinozyten haben die Aufgabe, die biochemische und physikalische Integrität der Haut zu erhalten und an den vielfältigen Funktionen der Haut mitzuwirken [349]. Zu diesem Zweck synthetisieren sie u.a. spezifische Strukturproteine (z.B. Keratine, Filaggrin, Involucrin), Lipide (z.B. Ceramide) und Enzyme (z.B. Transglutaminase, Ornithindecaboxylase). Zahlreiche Substanzen, wie z.B. Zytokine (u.a. Interleukin 1, 3, 6, 7, 8, 10, FGF, G-CSF, GM-CSF, NGF, PDGF, TNF  $\alpha$ , TGF  $\alpha$  und  $\beta$ ) und Hormone (u.a. Adrenalin, Acetylcholin, Prolaktin, Proopiomelanocortin), werden sezerniert. Daneben sind sie in der Lage, eine Vielzahl von Hormonzwischenstufen zu konvertieren (u.a.  $T_4 \rightarrow T_3$ , Progesteron  $\rightarrow$  5- $\alpha$ -Dihydroxyprogesteron, Östron  $\rightarrow$  17- $\beta$ -Östradiol, Testosteron  $\rightarrow$  5- $\alpha$ -Dihydrotestosteron, 7-Dehydrocholesterol  $\rightarrow$  Provitamin  $D_3 \rightarrow$  Vitamin  $D_3$ , Deoxycorticosteron  $\rightarrow$  5- $\alpha$ -Dihydrodeoxycorticosteron, all-trans-Retinol  $\rightarrow$  all-trans-Retinsäure) [37, 78, 172, 173, 209, 255, 311, 351, 395, 429, 439, 458, 540, 566].



## 1.2. Epidermale Signaltransduktionssysteme

Zur Koordinierung der vielfältigen funktionellen Aktivitäten untereinander und innerhalb des Gesamtorganismus unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen müssen die Keratinozyten über ein Kommunikationssystem verfügen, das eine distinkte Signalübermittlung erlaubt. Zahlreiche Botenstoffe, die auf autokrinem, parakrinem, juxtakrinem oder, per diffusionem, endokrinem Weg die Keratinozyten erreichen, wirken auf sie ein [307]. Die zelluläre Signalübermittlung erfolgt über die transmembranäre Diffusion lipophiler, kleiner Moleküle, Endo- und Exozytose sowie über Transportproteine, die Kanäle zwischen den benachbarten Zellen ausbilden. Eine Sonderform der Transportproteine stellen die „gap junctions“ dar, die dem Stofftransport von Zelle zu Zelle (Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von ca. 1000 Da) sowie der Übertragung elektrischer Signale dienen. Sie koordinieren nicht nur die Aktivitäten benachbarter Zellen, sondern schließen sie auch zu größeren Funktionseinheiten zusammen [298].

Ferner exprimieren Keratinozyten membranintegrierte und intrazytoplasmatisch bzw. nukleär lokalisierte Rezeptoren, die spezifische Bindungsstellen für Hormone und andere Mediatoren besitzen. Während die membranintegrierten Rezeptoren für den bindenden Liganden direkt zugänglich sind, können die intrazytoplasmatischen Rezeptoren erst nach aktiver oder passiver Überwindung der Zellmembran erreicht werden [100, 172, 305].

### 1.2.1. Rezeptorsysteme

Ein Rezeptor wird definitionsgemäß durch spezifische Kriterien charakterisiert [225, 280, 289, 445]:

1. Verdrängung des bindenden Liganden durch Agonisten und Antagonisten verschiedener chemischer und pharmakologischer Substanzklassen
2. Korrelation zwischen Ligandenaffinität in vitro und pharmakologischer Wirksamkeit in vivo

3. Regionale Verteilung oder Gewebespezifität
4. Subzelluläre Verteilung
5. Stereospezifität der Rezeptor-Ligandenbindung
6. Sättigbarkeit der Rezeptor-Ligandenbindung
7. Reversibilität der Rezeptor-Ligandenbindung
8. Hohe Ligandenaffinität

Motulsky und Insel diskutierten anhand o.g. Kriterien die Eigenschaften des membranintegrierten  $\beta$ -Adrenozeptorsystems, das im Mittelpunkt der hier vorliegenden Arbeit steht. In ihren zahlreichen experimentellen Studien konnten sie nachweisen, daß das Adrenozeptorsystem die spezifischen Rezeptorkriterien in vollem Umfang erfüllt [247, 359, 360].

### 1.3. Das adrenerge Signaltransduktionssystem

#### 1.3.1. Biochemische, physiologische und klinische Charakterisierung des Adrenozeptorsystems

Das adrenerge Signaltransduktionssystem (Adrenozeptorsystem) gehört mit zu den am ausführlichsten untersuchten Signaltransduktionssystemen und steht stellvertretend für die Vielzahl der G-Protein gekoppelten Rezeptorsysteme (s. 1.3.2, S. 8). In zahlreichen Übersichtsarbeiten [47, 74, 81, 117, 118, 143, 148, 165, 200, 289, 291, 292, 294, 359, 465, 487, 498, 538] sind Klassifikation, Vorkommen, Funktion, physiologische und therapeutische Bedeutung der prä- und postsynaptischen Adrenozeptoren besprochen worden.

Nachdem Langley erstmals 1905 [287] die hemmenden und stimulierenden Wirkungen adrenerger Substanzen beschrieben hatte, plädierte Dale 1906 [79] für das Vorkommen adrenerger Rezeptoren mit z.T. konträren Eigenschaften. Ahlquist konnte in seinen grundlegenden Arbeiten 1948 die Existenz von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren nachweisen [9], die 1967 von Lands in  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ - Rezeptoren und 1974 von Langer in  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -

Rezeptoren unterteilt wurden [284, 286]. Erst 1989 konnte ein dritter  $\beta$ -Adrenozeptor ( $\beta_3$ -AR) identifiziert werden [116], der mit dem atypischen  $\beta$ -Adrenozeptor des braunen Fettgewebes identisch ist [568].

Einen ersten Erfolg bei der Aufklärung der intrazellulären Signaltransduktion erzielte Rall 1957. Er wies nach, daß  $\beta$ -adrenerge Agonisten die Produktion eines bis dahin noch unbekanntem intrazytoplasmatischen Faktors induzieren können, der die Aktivität intrazellulärer Enzyme des Glykogenmetabolismus stimuliert [409]. Dieser Faktor, das cyclische AMP (cAMP), wird durch eine membrangebundene Adenylatcyclase (AC) aus ATP synthetisiert [410, 499]. 1971 wurde die sog. „second messenger“-Hypothese postuliert [424]: Das Signal einer extrazellulär auf die Zielzelle einwirkenden Substanz („first messenger“ =  $\beta$ -adenerger Agonist) wird über einen intrazellulären Botenstoff („second messenger“ = cAMP) an das Zellinnere weitergeleitet.

In zahlreichen pharmakologischen Arbeiten wurden die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Adrenozeptoren näher charakterisiert. Diese unterscheiden sich u.a. durch eine unterschiedliche Affinität gegenüber einer Reihe von Agonisten, spezifische Hemmbarkeit durch bestimmte Inhibitoren, spezifische Organverteilung und biologische Wirkung (s. Tabelle 1 und 2):

Tabelle 1: Pharmakologische Eigenschaften der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren

---

$\beta_1$ -Adrenozeptoren:

Rangfolge der Stimulation:	Isoprenalin > Adrenalin = Noradrenalin > Phenylephrin
Spezifische Agonisten:	Noradrenalin, Prenalterol, Dobutamin, Tazolol, Xamoterol
Spezifische Antagonisten:	Metoprolol, Atenolol, Betaxolol, Bisoprolol, Practolol

$\beta_2$ -Adrenozeptoren:

Rangfolge der Stimulation:	Isoprenalin > Adrenalin > Noradrenalin > Phenylephrin
Spezifische Agonisten:	Salbutamol, Terbutalin, Hexoprenalin, Fenoterol, Procaterol, Soterenol
Spezifische Antagonisten:	ICI 118,551, IPS 339, H 35/25, Butoxamin

---

[modifiziert nach 47, 90, 165, 200, 291, 350, 494]

Tabelle 2: Vorkommen und Funktion von peripheren, postsynaptischen  $\beta$ -Adrenozeptoren

Organ (-system)	$\beta_1$ -Rezeptor	$\beta_2$ -Rezeptor
Herz	Steigerung von Frequenz, Kontraktilität, Überleitungs- geschwindigkeit und Erregbarkeit	Steigerung der Frequenz (und Kontraktilität?)
Glatte Muskulatur		
Gefäße (Arterien)	----	Erschlaffung
Uterus	----	Erschlaffung
Harnblase	----	Erschlaffung
Bronchien	----	Erschlaffung
Magen-Darm-Trakt	Erschlaffung	----
Gallenblase	----	Erschlaffung
Fettgewebe	Lipolyse (zusammen mit $\beta_3$ -AR)	----
Leber	----	Glykogenolyse, Gluconeogenese
Pankreas	----	Insulinsekretion
Niere	Reninsekretion	----
Speicheldrüse	Speichelsekretion	----
Haut (Epidermis)	----	Zelldifferenzierung, Proliferations- hemmung (Keratinocyten)
Mastzellen	----	Hemmung der Histaminfreisetzung

[modifiziert nach 47, 90, 100, 165, 200, 292, 308, 407, 498]

Seitdem die  $\beta$ -Adrenozeptoren als wichtige Modulatoren des kardio-pulmonalen Systems identifiziert wurden, stehen sie im Mittelpunkt pathophysiologischer Grundlagenforschung und pharmakologischer Studien. Im Hinblick auf neue Therapiekonzepte kam es dank neuester molekularbiologischer Methoden zu einem rasanten Wissenszuwachs bzgl. der Rezeptorstruktur und der damit verbundenen Signaltransduktion [Übersichtsartikel: 117, 118, 143, 296, 372, 430].

Die inzwischen vollständig aufgeklärte Gensequenz des humanen  $\beta_2$ -Adrenozeptors ist auf dem Chromosom 5 (q31-q32) lokalisiert [69, 94, 115, 273]. Der  $\beta_2$ -AR mit einem

Molekulargewicht von 64 kDa [94, 273] besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette (413 Aminosäuren), die sich spezifisch in die Membran einfügt (s. Abb. 1). An das extrazellulär lokalisierte, glykosylierte N-terminale Ende schließt sich ein Segment an, das sich siebenmal girlandenförmig durch die Zellmembran windet. Zwischen diese sieben transmembranär gelegenen,  $\alpha$ -helical gewundenen, hydrophoben Regionen (je 24 AS), die einen intramembranären Zylinder für die Ligandenanlagerung bilden [53, 60, 95, 96, 97, 489, 518], sind je drei intra- und extrazellulär gelegene Schleifen geschaltet [94, 97, 143, 561]. Die 2. und 3. intrazytoplasmatische Schleife sowie das intrazelluläre C-terminale Ende enthalten zahlreiche Tyrosin-, Serin- und Threoninreste, die durch verschiedene Proteinkinasen phosphoryliert werden können [195, 221, 295, 296, 498]. Der  $\beta$ -AR wird über diese Strukturen an das nachgeschaltete Transduktionssystem gekoppelt [63, 98, 361, 488].

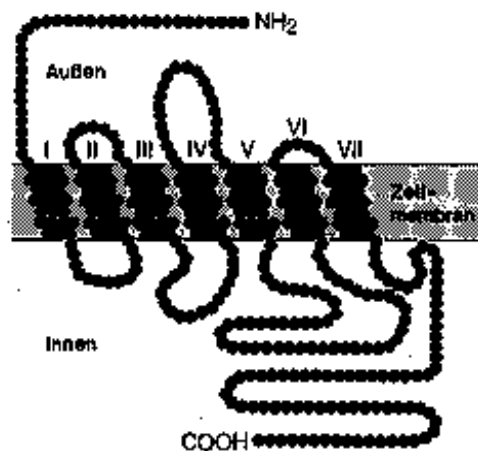
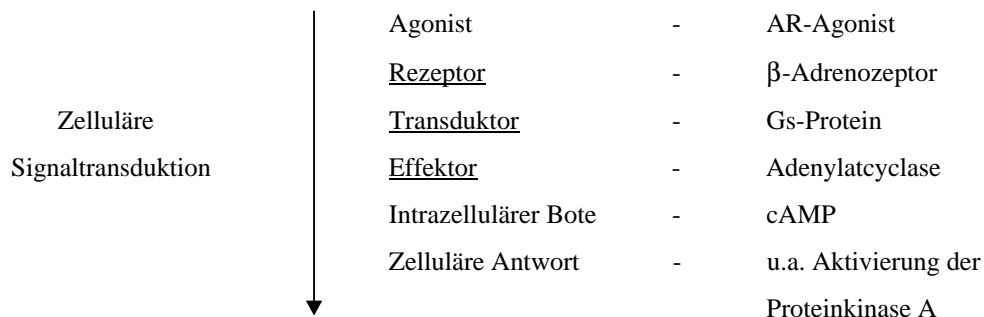


Abb. 1: Intramembranäre Topographie des humanen  $\beta_2$ -Adrenozeptors (modifiziert nach [273])

Der  $\beta_2$ -Adrenozeptor besitzt zahlreiche Homologien mit dem mACh-Rezeptor [69, 273, 277, 386, 518] und Rhodopsin [16, 96, 97]. Des weiteren weist er eine Stereospezifität für l-Enantiomere auf, die mit ca. 100-fach höherer Affinität als r-Enantiomere gebunden werden [9, 304, 461, 469].

### 1.3.2. Die $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion auf molekularer Ebene

Der im Mittelpunkt dieser Arbeit stehende  $\beta_2$ -Adrenozeptor wird zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren gezählt. Dieses Signaltransduktionssystem besteht aus drei Komponenten: Der an der Außenseite der Plasmamembran lokalisierte Membranrezeptor ist über ein an der Innenseite der Plasmamembran liegendes Guaninnucleotid bindendes Protein (G-Protein; Signaltransduktor) an ein Effektorenzym (katalytische Einheit) gekoppelt, das über einen intrazellulären Botenstoff die zelluläre Antwort bewirkt [30, 156, 200, 293, 297, 307, 487, 498]:



Das Effektorenzym, die Adenylatcyclase (AC), kann über ein stimulierendes oder inhibierendes G-Protein dual kontrolliert werden. Während der  $\beta_2$ -Adrenozeptor über ein stimulierendes G-Protein (Gs) eine Aktivitätssteigerung erzielt, wird in anderen Rezeptorsystemen, wie z.B. dem des  $\alpha_2$ -Adrenozeptors, über ein inhibierendes G-Protein (Gi) eine Aktivitätsminderung bewirkt:

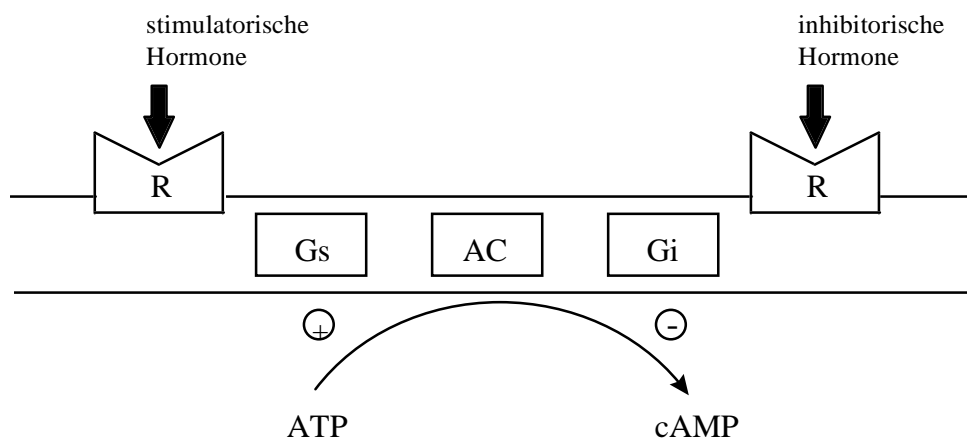


Abb. 2: Schematisches Modell der Hormon-sensitiven Adenylatcyclase (modifiziert nach [487])

Die Bindung eines  $\beta$ -adrenergen Agonisten an die spezifische Bindungsstelle des Rezeptors bewirkt eine Konformationsänderung des extrazellulär lokalisierten  $\beta_2$ -Adrenozeptoranteils und initiiert eine Kettenreaktion auf molekularer Ebene.

Das an der Innenseite der Plasmamembran gelegene Gs-Protein, ein heterotrimeres Protein, bestehend aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Untereinheit [30, 162, 375], erfährt konsekutiv ebenfalls eine Konformationsänderung. Daraufhin dissoziiert ein zuvor an die  $\alpha$ -Untereinheit gebundenes GDP-Molekül. Diese vakante Bindungsstelle wird durch ein GTP-Molekül besetzt, woraufhin sich der Gs-GTP-Komplex vom Rezeptor ablöst. Infolgedessen wird der Rezeptor in einen Zustand niedriger Agonisten-Affinität versetzt und die Dissoziation des Liganden-Rezeptorkomplexes initiiert [270, 290, 292, 430, 465, 492, 519]. Gleichzeitig kommt es zu einer Dissoziation der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit von der GTP- $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins. Der freie Gs $\alpha$ -GTP-Komplex aktiviert die an der Innenseite der Plasmamembran lokalisierte Adenylatcyclase, die die Konversion von intrazytoplasmatischem ATP in cAMP in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  katalysiert [427]. Die Adenylatcyclase bleibt solange aktiviert, bis die intrinsische GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit das GTP zu GDP hydrolysiert [54, 369, 465, 494, 519].

Anschließend assoziieren die drei G-Protein-Untereinheiten, und der inaktive Gs-GDP-Komplex lagert sich dem Rezeptor erneut an, versetzt ihn in einen hohen Affinitätszustand und kann erst durch eine erneute Rezeptor-Agonist-Interaktion aktiviert werden (s.o.) [200, 291].

Während des Bestehens eines einzigen G $\alpha$ -GTP-Komplexes werden einige hundert cAMP-Moleküle synthetisiert. Die Syntheseleistung der Adenylatcyclase liegt bei ca. 1000 cAMP-Molekülen pro Minute. Das cAMP hat eine kurze Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden bis Minuten und wird durch ein spezifisches Enzym, die Phosphodiesterase (PDE), aufgespalten und inaktiviert [64, 337].

Das wasserlösliche cAMP ist der eigentliche Botenstoff („second messenger“), der die Rezeptorstimulation in das Zellinnere weiterleitet. Die cAMP-Erhöhung führt über die Aktivierung der Proteinkinase A zur Phosphorylierung spezifischer, intrazytoplasmatischer, regulatorischer, struktureller und enzymatischer Proteine [285, 307].

Daneben beeinflusst die intrazelluläre cAMP-Konzentration über ein „cAMP-responsive element“ (CRE) in der Promotorregion zahlreicher Gene deren Transkriptionsrate (z.B. für den  $\alpha_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenozeptor, Somatostatin, Parathormon, Phosphoenolpyruvatcarboxykinase, vasoaktives intestinales Peptid) [74, 117, 307, 358, 425].

Über die Aktivierung von membrangebundenen Ionenkanälen ( $\text{Ca}^{2+}$ -Influx) durch  $\text{Gs}\alpha$  [538], cAMP [160, 333] oder die Proteinkinase A [390, 392] und einen positiven „crosstalk“ [358] zum  $\alpha_1$ -Adrenozeptorsystem ( $\alpha_1$ -gekoppelter extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle [188],  $\text{IP}_3$ -vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung aus intrazellulären Speichern [28]), ist das cAMP-2<sup>nd</sup>-messenger System eng mit dem zweiten biologisch wichtigen Transduktionssystem, dem intrazellulären  $\text{IP}_3/\text{DAG}/\text{Ca}^{2+}/\text{PKC}$ -System [126, 307], verwoben.

Die Aktivierung des  $\beta$ -adrenergen Systems führt letztendlich über o.g. Prozesse zu einer spezifischen, physiologischen Antwort innerhalb des Zielgewebes (s. Tab. 2, S. 6) [200, 285].

### 1.3.3. Dynamische Regulation der $\beta$ -adrenergen Zellantwort

Die Aktivität des  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktionssystems kann anhand der extramembranär exprimierten Adrenozeptordichte, der Rezeptoraffinität und der funktionellen Koppelung der beteiligten 3 Transduktionskomponenten reguliert werden [74, 292].

Es ist bekannt, daß diese Rezeptoreigenschaften keine starre Größe darstellen, sondern einer dynamischen Regulation unterliegen [487]. Zahlreiche Hormone, Pharmaka, physiologische und pathologische Zustände können sie, und damit die Ansprechbarkeit des Gewebes auf adrenerge Stimuli, beeinflussen (s. Tab. 3, S. 11) [Übersichtsartikel: 47, 74, 90, 100, 200, 289, 292, 359, 372, 465, 487, 538]:



Tabelle 3: Dynamische Regulation der  $\beta$ -adrenergen Zellantwort

Substanz bzw. Zustand	Änderung der $\beta$ -adrenergen Zellantwort
Agonisten	Abnahme („down-regulation“)
Antagonisten ohne „PAA“	Zunahme („up-regulation“)
Antagonisten mit „PAA“	Abnahme
Denervation	Zunahme
Glukokortikoide	Zunahme
Schilddrüsenhormone, Hyperthyreose	Zunahme
Hypothyreose	Abnahme
Herzinsuffizienz	Abnahme
Phäochromozytom	Abnahme
Antidepressiva	Abnahme
Alterung	Abnahme
Streß	Abnahme

Des weiteren wird über tageszeitliche Schwankungen der exprimierten AR-Dichte berichtet, die eng mit der zirkadianen Rhythmik endogener Hormone assoziiert sind [145, 183].

Zahlreiche Veränderungen auf molekularer und zellulärer Ebene haben Einfluß auf die exprimierte AR-Konzentration, wie z.B. Transkriptions- und Translationsrate, mRNA-Stabilität (Halbwertszeit), posttranslationale Modifikation, Membranintegration und Rezeptordegradation [74]. Eine variable AR-Affinität sowie Störungen in der Signalweiterleitung verändern die Effektivität der Signalübermittlung. Dazu gehören z.B. die Rezeptor/G-Protein- und G-Protein/Adenylatcyclase-Interaktion, die Aktivität der Adenylatcyclase und ihres Gegenspielers, der Phosphodiesterase. Eine Vielzahl von Modifikationen können somit die intrazelluläre cAMP-Konzentration bei gleicher Agonistenexposition verändern und die biologische Antwort der Zielzelle modulieren [74, 372].

Eine Störung des adrenergen Signaltransduktionssystems kann für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Krankheiten oder ihrer Symptome eine wesentliche pathogenetische Bedeutung besitzen. So werden z.B. bei der Hypo- und Hyperthyreose Veränderungen in der Zahl der postsynaptischen Adrenozeptoren für die begleitenden

kardiovaskulären Störungen mitverantwortlich gemacht [20, 520, 555]. Beim Asthma bronchiale werden bei ca. 30% der Patienten  $\beta$ -AR-Antikörper ohne intrinsische Aktivität sowie eine erniedrigte  $\beta$ -AR-Dichte bzw. AR-Sensitivität gefunden, die die mangelhafte Bronchialrelaxation erklären dürften [142, 264, 502, 527].

Des Weiteren konnte bei Patienten mit atopischem Ekzem eine Punktmutation im Gen des  $\beta_2$ -Adrenozeptors aufgeklärt werden, die zu einer veränderten Rezeptorstruktur und -funktion auf Keratinozyten und Lymphozyten führt [442].

#### 1.4. Vorkommen und Bedeutung des $\beta$ -Adrenozeptorsystems in der Epidermis

##### 1.4.1. Die Erforschung des $\beta$ -Adrenozeptorsystems in der Epidermis

Erste Berichte über Vorkommen, Funktionalität und potentielle physiologische Bedeutung des  $\beta$ -adrenergen Systems in der Epidermis erfolgten Anfang der 70er Jahre. Da zunächst nur die Existenz einer funktionellen, mittels Isoprenalin stimulierbaren Adenylatcyclase in der Epidermis nachgewiesen wurde [49, 103, 220, 312, 330, 404, 530], konnte vorerst nur das Vorkommen spezifischer, durch  $\beta$ -Blocker hemmbarer  $\beta$ -Adrenozeptoren postuliert werden [5, 312, 564]. Die Präsenz  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren auf epidermalen Keratinozyten wurde jedoch im Verlauf sowohl für epidermale Nager- und Schweinezellen [7, 104, 461] als auch für humane, epidermale Keratinozyten in vitro und in vivo belegt [153, 154, 380, 478, 480]. Das epidermale  $\beta$ -Adrenozeptorsystem repräsentiert eine homogene Rezeptorpopulation, die ausschließlich dem  $\beta_2$ -Subtyp zugeordnet werden kann [87, 104, 154, 380, 476, 478, 480, 485], effektiv an das Adenylatcyclase-cAMP-System koppelt [55, 56, 380, 475, 564] und eine Stereoselektivität für l-Enantiomere besitzt [153, 154]. Innerhalb der Epidermis zeigt sich ein heterogenes  $\beta_2$ -AR-Verteilungsmuster: Die hohe AR-Dichte und Adenylatcyclaseaktivität im Bereich der unteren, germinativen und undifferenzierten Zellagen nimmt mit zunehmender Differenzierung der Zellen im Stratum spinosum rapide ab [6, 169, 249, 312, 440, 441, 443, 506]. Vereinzelt wurde auch über eine homogene  $\beta_2$ -Adrenozeptorexpression in allen epidermalen Schichten berichtet [485]. Außer den

Keratinocyten exprimieren auch ekkrine Schweißdrüsen, dermale Blutgefäße und perivaskuläre Infiltratzellen  $\beta$ -Adrenozeptoren [485].

Auf der Zellmembran humaner Keratinocyten konnten neben dem  $\beta_2$ -Adrenozeptor noch drei weitere Membranrezeptoren identifiziert werden, die über ein stimulierendes G-Protein an die Adenylatcyclase koppeln: Der Histamin ( $H_2$ )- [7, 227], der Adenosin ( $A_2$ )- [7, 105, 228] und der Prostaglandin ( $PGE_1$ ,  $PGE_2$ )- Rezeptor [5].

Ein inhibierendes AC-cAMP-System, wie z.B. das  $\alpha_2$ -AR-System, das als Gegenspieler zum  $\beta$ -adrenergen System fungieren kann, wurde bislang nicht nachgewiesen, obwohl die Existenz eines inhibierenden G-Proteins in der Epidermis belegt ist [380, 522].

Die Adenylatcyclaseaktivität humaner, epidermaler Keratinocyten kann maximal mittels adrenerger Agonisten (z.B. Isoprenalin) stimuliert werden. Die zelluläre Antwort nach Stimulation der  $H_2$ - und  $A_2$ -Rezeptoren mit den physiologischen Agonisten Histamin und Adenosin fällt im Vergleich deutlich geringer aus [55, 235, 380, 503, 553]. Im Gegensatz dazu kann in der Epidermis des Schweins die AC über  $H_2$ - und  $A_2$ -Rezeptoren zu Höchstwerten stimuliert werden [227, 228, 235]. Die Effektivität des  $\beta$ -adrenergen Systems ist hier deutlich reduziert.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß große, speziesabhängige Unterschiede hinsichtlich der Ansprechbarkeit der verschiedenen, AC-gekoppelten Rezeptorsysteme existieren. Für den Menschen scheint von diesen vier epidermalen Rezeptortypen das adrenerge Adenylatcyclase-cAMP-System von übergeordneter Wichtigkeit zu sein.

#### 1.4.2. Physiologische Funktion des epidermalen $\beta$ -Adrenozeptorsystems

Humane, epidermale Keratinocyten exprimieren eine beträchtliche Anzahl von Katecholamin-sensitiven  $\beta_2$ -Adrenozeptoren. In Abhängigkeit von den jeweiligen Versuchsprotokollen (Zellkultur vs. Gewebepräparat, intakte Zellen vs. Membranpräparation, physikochemische Eigenschaften des Radioliganden etc.) liegt die durch Radioliganden-Bindungsstudien ermittelte Dichte zwischen 80 und 280 fmol/mg Membranprotein bzw. 7000 Adrenozeptoren pro Zelle [57, 153, 154, 155, 478, 480, 482]. Hingegen wird für die Schweineepidermis, in der das adrenerge System nur eine

untergeordnete Rolle zu spielen scheint, eine AR-Dichte von ca. 400 AR/Zelle angegeben [7].

Aufgrund der hohen  $\beta$ -AR-Dichte in der humanen Epidermis, die bei bzw. weit über der Dichte von anderen, Katecholamin-sensitiven Geweben liegt, ist hier ein biologisch bedeutsames Rezeptorsystem zu erwarten (Herz: 5000 AR/Zelle [39, 40, 44, 217, 402]; Lunge: Embryonale Zellen 5000 bis 6700 AR/Zelle [141], A.pulmonalis/Endothel 16000 AR/Zelle [10]; Gehirn: 8500 AR/Zelle [217]; Präadipozyt: 1800 AR/Zelle [281]; Adipozyt: 3100 AR/Zelle [281]; periphere, mononukleäre Leukozyten, Granulozyten, Lymphozyten: 1000 bis 2000 AR/Zelle [43, 45, 106, 183, 223, 247, 359]; Erythrozyten (Frosch): 3240 AR/Zelle [457]).

Die physiologische und pathophysiologische Bedeutung des epidermalen  $\beta$ -Adrenozeptorsystems wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, daß über den 2<sup>nd</sup>-messenger cAMP bzw. die cAMP-abhängige Proteinkinase A wesentliche Zellfunktionen in vivo beeinflusst werden, die die epidermale Homöostase und Barrierefunktion aufrechterhalten, wie z.B. Zunahme der Zelldifferenzierung [66, 89], Hemmung der Proliferation und Reduzierung der Mitoserate ( $G_2$ -Blockade) [66, 138, 193, 236, 324, 329, 385, 404, 531, 532, 534]. Andere Untersuchungen, insbesondere an in vitro Zellkultursystemen, wiesen teilweise gegenteilige Effekte nach [70, 175, 323, 324, 377]. Es wurde postuliert, daß der 2<sup>nd</sup>-messenger cAMP in Abhängigkeit von den jeweiligen Untersuchungsbedingungen (cAMP-Konzentration, in vitro oder in vivo Untersuchung, Spenderalter und -spezies, Zelltyp (transformiert vs. normal), Zelldichte, Zellzyklusphase, umgebende dermale Strukturen) eine duale Rolle in der Koordinierung von Zellproliferation und -differenzierung übernehmen kann [70, 140, 145, 236, 323, 324, 377, 379, 535, 536]. Nach Berücksichtigung der unterschiedlichen Studienprotokolle scheint der zelluläre cAMP-Effekt in vivo mit einer Proliferationshemmung und Zelldifferenzierung, die die gleiche zirkadiane Rhythmik wie die endogene Katecholaminproduktion aufweisen [4, 328], assoziiert zu sein.

Anfang der 90er Jahre wurde nachgewiesen, daß über die Stimulation keratinozytärer  $\beta$ -Adrenozeptoren die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Ionenkonzentration erhöht werden kann [274, 382, 562], was für myokardiale Zellen schon seit langem bekannt war [40].  $Ca^{2+}$ -Ionen zählen zu den wichtigen intrazellulären Botenstoffen (2<sup>nd</sup>-messenger) und sind an der

Koordinierung keratinozytärer Proliferations- und Differenzierungsprozesse beteiligt [124, 127, 204, 395]. Mit einer Erhöhung der extrazellulären Calciumionenkonzentration, der konsekutiv eine intrazelluläre Calciumionenakkumulation folgt [125, 207, 451, 452], sind in vitro eine Reduzierung der epidermalen Proliferationsrate [204, 566], eine Aktivierung von Differenzierungsvorgängen (z.B. Formation von Desmosomen [378, 541], Veränderung des Zytoskeletts [246], Exprimierung der endständigen Differenzierungsmarker Involucrin, Filaggrin, Keratin 1 und 10 [78, 395, 540, 566]) sowie die epidermale Stratifikation [35, 204] assoziiert.

Der biologische Effekt einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation und die Assoziation des  $\beta$ -Adrenozeptorsystems mit der intrazellulären Calciumionenkonzentration lassen vermuten, daß epidermale  $\beta$ -Adrenozeptoren bei der Koordinierung der diffizilen Differenzierungs- und Proliferationsvorgänge zur Aufrechterhaltung der epidermalen Homöostase beteiligt sind.

### 1.5. Klinische Bedeutung des epidermalen $\beta$ -Adrenozeptorsystems

Die Beteiligung eines dysfunktionellen  $\beta$ -Adrenozeptorsystems an der Entstehung und Aufrechterhaltung zahlreicher dermatologischer Erkrankungen, wie z.B. Psoriasis vulgaris, Vitiligo, Erkrankungen des atopischen Formenkreises (atopisches Ekzem, allergisches Asthma bronchiale, allergische Rhinokonjunktivitis), M. Darier und der benignen, symmetrischen Lipomatose, wird seit langem diskutiert [169, 185, 220, 229, 231, 235, 266, 312, 407, 420, 440, 442, 482, 484, 502, 530, 533, 536, 558, 563]. Die epidermale  $\beta$ -adrenerge Dysfunktion im engeren Sinne, nämlich der Keratinozyten, wurde bislang vorwiegend an dem Krankheitsbild der Psoriasis vulgaris ausführlich studiert.

Die Psoriasis vulgaris (Schuppenflechte) ist eine klassische und häufig vertretene Dermatose, die mit einer Hyperproliferation (12-fache Zellteilungsgeschwindigkeit), verzögerten Differenzierung (Parakeratose), erniedrigten epidermalen Phosphorylaseaktivität und konsekutiv vermehrten Glykogenspeicherung der Keratinozyten einhergeht [38, 82, 184, 185, 530, 532, 533, 543]. In erkrankter psoriatischer Haut kann neben zahlreichen immunologischen Veränderungen [18, 171, 346] eine reduzierte

$\beta$ -AR-Dichte [482, 484] sowie eine defiziente und defekte  $\beta$ -adrenerge Antwort nach spezifischer adrenerger Stimulation beobachtet werden, während unbefallene Areale und die Haut gesunder Probanden eine nur gering reduzierte bzw. normale  $\beta$ -adrenerge Stimulierbarkeit aufweisen [169, 220, 229, 231, 312, 322, 533, 536, 558, 563]. Entsprechende Befunde konnten in experimentell induzierten, hyperproliferativen Dermatosen, die als Modell für psoriasiforme Erkrankungen verwendet werden, erhoben werden [175, 177, 193]. Da zugleich in psoriatischer Haut die Aktivität der Adenylatcyclase und Phosphodiesterase unverändert ist [80, 229, 362, 563], läßt sich die Störung im Transduktionssystem in der Ebene des Adrenozeptors bzw. seiner Koppelung an den nachgeschalteten Transduktor (Gs-Protein) lokalisieren.

Eine systemische Therapie mit  $\beta$ -Adrenozeptorantagonisten ( $\beta$ -Blocker), die auch die epidermale adrenerge Signaltransduktion unterbinden, kann bei hautgesunden Patienten die Eruption psoriasiformer Arzneimittellexantheme hervorrufen und bei Psoriatikern ein Rezidiv oder eine Aggravation der bestehenden Veränderungen bewirken [71, 166, 202, 211, 253, 462, 477, 479, 481]. Ferner wurde bei Psoriatikern überdurchschnittlich häufig eine Störung des systemischen Calcium-Metabolismus diagnostiziert. In diesen dokumentierten Fällen konnte die Schwere des Befalls mit dem Vitamin D-Spiegel und der Calciumionenkonzentration im Serum negativ korreliert werden [357]. Des weiteren konnte beobachtet werden, daß eine bestehende Psoriasis durch eine begleitende Hypercalcämie im Rahmen einer hochdosierten Vitamin D-Therapie gebessert [356, 460] und durch eine Hypocalcämie infolge eines Hypoparathyroidismus verschlechtert bzw. therapieresistent werden kann [422, 486].

Zusammengefaßt lassen diese Befunde erkennen, daß eine Dysfunktion des  $\beta$ -adrenergen Systems, das als wichtiger physiologischer Regulator epidermaler Differenzierungs- und Proliferationsvorgänge angesehen wird und eng mit der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und den  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Differenzierungsvorgängen assoziiert ist, ursächlich für das abnorme Differenzierungs- und Proliferationsverhalten psoriatischer Keratinozyten sein kann.

Unter der Prämisse, daß epidermale  $\beta_2$ -Adrenozeptoren ursächlich an der Pathogenese der Psoriasis beteiligt sind und möglicherweise einer dynamischen Regulation wie in anderen Gewebearten unterliegen (s. Tab. 3, S. 11), eröffnen sich neue therapeutische

Perspektiven in der Behandlung hyperproliferativer, dedifferenzierter Hauterkrankungen. Therapiestrategien, die sich einen Eingriff in Signaltransduktionswege zunutze machen, sind bei einer Vielzahl von Erkrankungen einsetzbar, bei denen Fehlsteuerungen auf Ebenen der intra- und interzellulären Kommunikation bestehen [156, 300]. Dieser Eingriff setzt allerdings voraus, daß die zellspezifischen Signaltransduktionswege, ihre mechanischen Abläufe, physiologische Regulation und Bedeutung unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen bekannt sind. Während diese  $\beta$ -adrenergen Vorgänge für nicht epidermale Zellarten weitgehend geklärt sind [195, 200, 292, 294, 487], ist der Kenntnisstand über das humane, epidermale  $\beta$ -Adrenozeptorsystem noch lückenhaft. In zahlreichen Studien konnte die Existenz und funktionelle Koppelung der  $\beta_2$ -Adrenozeptoren in der Epidermis nachgewiesen werden (s. 1.4.1., S.12). Da bislang keine grundlegenden Untersuchungen über die dynamische Regulation  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren an humanen Keratinozyten durchgeführt wurden, sollte in der hier vorliegenden Arbeit das System auf sein physiologisches Regulationsverhalten untersucht werden. Es sollte geklärt werden, ob humane Keratinozyten, entsprechend anderen Zellarten (z.B. Herz- und Lungenzellen), den Prozessen der Agonisten-induzierten Desensibilisierung und Antagonisten-induzierten Hypersensibilisierung unterliegen (s. Tab. 3, S. 11) und ob es sich hierbei um konzentrations- und zeitabhängige Prozesse handelt. Anschließend sollte der Einfluß unterschiedlicher Antipsoriaktika [271, 314] sowie der Einfluß der in vitro antiproliferativ wirksamen und differenzierungsfördernden extrazellulären Calciumionenkonzentration auf die  $\beta$ -adrenerge Rezeptordichte und -affinität geprüft werden. Die Bestimmung der adrenergen Bindungscharakteristika sollte anhand von Radioliganden-Sättigungsexperimenten erfolgen, mit denen quantitative Veränderungen in der Adrenozeptordichte und -affinität gegenüber dem spezifisch bindenden Radioliganden erfaßt werden können [47, 350, 359, 414, 465].

Es ist bekannt, daß antipsoriatische Agenzien, wie z.B. Glukokortikoide, Retinoide, Vitamin D-Derivate, Cyclosporin A, UVB- und PUVA-Phototherapie, die Aktivität des adrenergen Rezeptorsystems in der Schweineepidermis, in der jedoch das Adrenozeptorsystem nur eine untergeordnete Rolle spielt [7], in vitro erhöhen können [230, 234, 236, 238, 239, 240, 241, 242, 260, 261, 267, 376]. Dabei bleibt weitgehend ungeklärt, ob dieser Effekt einheitlich über eine Änderung der exprimierten

$\beta_2$ -Adrenozeptordichte, Rezeptoraffinität, Koppelung an das G-Protein oder Adenylatcyclase- bzw. Phosphodiesteraseaktivität erreicht wird.

Derzeit ist lediglich bekannt, daß eine Glukokortikoidinkubation permanenter, fötaler Nagerkeratinozyten (FRSK) in vitro zu einem Anstieg der  $\beta_2$ -Adrenozeptor-mRNA [504] sowie zu einer erfolgreichen Translation und Membranintegration des biologisch aktiven  $\beta_2$ -Adrenozeptors führt [245]. Da es sowohl erhebliche speziesabhängige wie auch zelllinienabhängige Unterschiede in der AR-Dichte und dem  $\beta$ -adrenergen Regulationsverhalten gibt [7, 210, 245, 487, 503], ist weiterhin unklar, ob eine Glukokortikoid-induzierte Zunahme der exprimierten  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte auch in der humanen Epidermis erzielt werden kann. In einer einzigen Studie konnte an humanen Hautbiopsien semiquantitativ mittels Autoradiographie eine Zunahme der epidermalen  $\beta$ -Adrenozeptordichte nach topischer Glukokortikoidtherapie nachgewiesen werden [485]. Dabei bleiben grundlegende Fragen, wie z.B. die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der AR-Erhöhung und eine mögliche Veränderung der Rezeptoraffinität, ungeklärt. Hingegen existieren für Retinoid-induzierte Änderungen im Adrenozeptorsystem nur einzelne und zudem widersprüchliche Publikationen. Während an Schweinehautpräparationen und Meerschweinchenkeratinozyten eine Retinoid-induzierte Steigerung der  $\beta$ -adrenergen Adenylatcyclase-Antwort nachgewiesen werden konnte [240, 241, 554], zeigten humane Keratinozyten keine Änderung des Antwortverhaltens [554]. Ferner konnte an Nagerkeratinozyten (FRSK) eine Retinoid-induzierte Abnahme der  $\beta$ -adrenergen AC-Antwort beobachtet werden [505]. Wie sich eine Retinoidinkubation auf die exprimierte  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte im hier verwendeten humanen Keratinozytenmodell auswirkt, ist derzeit noch unerforscht.

Auch der Einfluß der extrazellulären Calciumionenkonzentration auf die exprimierte  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte ist weitgehend ungeklärt. Innerhalb der Epidermis existiert ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient mit einer niedrigen extra- und intrazellulären Konzentration in den basalen Schichten, die mit zunehmendem Differenzierungsstatus der Zellen in den oberen Zellagen ansteigt [341, 342]. Die exprimierte  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte, die basale Adenylatcyclaseaktivität und der korrespondierende cAMP-Gehalt wiederum weisen mit einer hohen Konzentration in den basalen und niedrigen Konzentration in den differenzierten Schichten eine genau gegensätzliche Verteilung auf [6, 169, 249, 312,



440, 441, 443, 506] und scheinen mit dem epidermalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten negativ korreliert zu sein. Zellen höheren Differenzierungsgrades scheinen als Ausdruck ihres stattgefundenen Differenzierungsprozesses nunmehr eine geringere AR-Dichte zu exprimieren. Ob dies nur Ausdruck ihres hohen Differenzierungsstatus oder Folge eines regulatorischen „feedback“-Mechanismus ist, bleibt offen. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob eine Veränderung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die  $\beta_2$ -AR-Dichte im Sinne einer kompensatorischen „feed-back“-Hemmung erniedrigt oder über eine initiale Erhöhung der  $\beta_2$ -AR-Dichte, und somit im Sinne einer synergistischen Effektverstärkung, den Differenzierungsprozeß positiv unterstützt [204, 566] und erst im Verlauf aufgrund des induzierten Differenzierungsvorganges eine Abnahme bewirkt.

In der vorliegenden Arbeit sollten die  $\beta$ -adrenergen Regulationsvorgänge an einem epidermalen Modellsystem studiert werden, das über eine volle epidermale Differenzierungskapazität verfügt und repräsentativen Charakter für die normale, humane Epidermis hat. Gleichzeitig sollte es standardisierte und reproduzierbare Versuchsbedingungen ermöglichen, da bekanntlich die diffizilen Regulationsvorgänge durch zahlreiche Faktoren, wie z.B. Streß, Ischämie, Begleiterkrankungen, die zirkadiane, endogene Hormonsekretion, Kontaminationen mit Blut und sekretorisch aktiven Zellen sowie Interaktionen mit dem dermalen Kompartiment etc., beeinflußt werden [86, 91, 200, 244]. Diese Anforderungen können weder von Gewebepräparationen ex vivo noch von transformierten, in ihrem Proliferations- und Differenzierungspotential veränderten, epidermalen Zelllinien erfüllt werden. Zellen tierischen Ursprungs wurden ausgeschlossen, da die verschiedenen Spezies bekanntlich über sehr unterschiedlich ausgebildete und funktionell aktive, epidermale Adrenozeptorsysteme verfügen [7, 372, 487]. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurden als Modellsystem normale, humane Keratinozyten (NHK) gewählt, die unter standardisierten Bedingungen in einem serumfreien, chemisch definierten Medium kultiviert wurden.

## 1.6. Fragestellung und Ziele

Ziel der experimentellen Arbeit war

1. Die Etablierung eines Verfahrens zur Kultivierung normaler, humaner Keratinozyten (NHK) unter standardisierten, serumfreien Bedingungen.
2. Die Bestimmung der exprimierten  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte und Rezeptoraffinität unter den standardisierten Kulturbedingungen mittels Radioligandenbindungsstudien an intakten NHK.
3. Die Bestimmung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte und -affinität nach Inkubation mit
  - Isoprenalin, einem potenten  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten, in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit ...
  - Propranolol, einem nicht selektiven  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten ohne PAA, in aufsteigender Konzentration ...
  - Alprenolol, einem nicht selektiven  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten mit PAA, in aufsteigender Konzentration ...
  - Hydrokortison, einem niedrig potenten Glukokortikoid, in aufsteigender Konzentration ...
  - Dexamethason, einem potenten Glukokortikoid, in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit ...
  - Isoprenalin und Dexamethason in unterschiedlicher zeitlicher Abfolge und Kombination ...
  - All-trans-Retinsäure, einem potenten, biologisch aktiven Vitamin A-Derivat, in aufsteigender Konzentration ...
  - Calciumchlorid in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit ...

... zur Charakterisierung des  $\beta$ -adrenergen Regulationsverhaltens und im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapiekonzepte in der Behandlung hyperproliferativer, dedifferenzierter Dermatosen.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### 2.1. Zellkultur

#### 2.1.1. Herkunft der humanen Keratinozyten

Die von Dezember 1992 bis Juni 1994 durchgeführten Versuchsreihen erfolgten an kultivierten, normalen, humanen Keratinozyten, die aus Vorhautgewebe isoliert wurden. Das Vorhautgewebe wurde freundlicherweise von einer kinderchirurgischen Praxis zur Verfügung gestellt, in der an gesunden Knaben im Alter von 0 bis 15 Jahren Zirkumzisionen in Allgemeinanästhesie durchgeführt wurden.

Die einzelnen Vorhäute wurden im weiteren Verlauf getrennt verarbeitet und die Kulturen mit fortlaufenden Nummern versehen (PC 1 = primary culture 1), so daß jede Kultur exakt einem Spender zugeordnet werden kann.

Das unter sterilen Operationsbedingungen gewonnene Hautmaterial wurde unmittelbar postoperativ in +4°C kalte Transportlösung (HBSS mit Zusatz von 5 µg/ml Gentamycin) überführt, für den Transport in einer Kühlbox und anschließend bei +4°C im Kühlschrank gelagert. Unter diesen Bedingungen war das Gewebe bis zu 3 Tage ohne signifikanten Vitalitätsverlust lagerungsfähig. Die weitere Verarbeitung des Gewebes erfolgte innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme.

#### 2.1.2. Isolierung humaner Keratinozyten aus Vorhautgewebe

Die Kultivierung der Keratinozyten erfolgte leicht modifiziert nach einem von Boyce und Ham publizierten Verfahren [36].

### 2.1.2.1. Allgemeine Versuchsbedingungen

Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer keimarmen Arbeitsbank. Alle Medien wurden vor Verwendung 1 h im Wasserbad bei +37°C erwärmt.

Das für die Zellkultur verwendete Keratinozyten-SFM<sup>®</sup> (serumfreies Medium) ist ein chemisch definiertes, serumfreies Basalmedium zur Kultivierung primärer und passagierter, humaner Keratinozyten. Die niedrige Calciumionenkonzentration (ca. 0,09 mM) begünstigt die Zellproliferation, verhindert die Zelldifferenzierung und unterdrückt Fibroblastenwucherungen. Dadurch wird die Kultivierung reiner Keratinozytenkulturen unterstützt. Das Basalmedium (pH zwischen 7,2 und 7,4; Osmolarität zwischen 290 und 310 mOsm/kg) wurde vor Verwendung mit 5 ng/ml rekombinanten, epidermalem Wachstumsfaktor (rEGF) und 50 µg/ml Rinderhypophysenextrakt (BPE) der gleichen Charge supplementiert (sog. Kompletmedium; Haltbarkeit bei +4°C ca. 2 Wochen) [157]. Als Kontaminationsschutz wurde 5 µg/ml Gentamycin (Wirkspektrum: Gram (+) und gram (-) Bakterien, Mykoplasmen) zugesetzt.

### 2.1.2.2. Präparation der Vorhäute

Die bei +4°C in HBSS gelagerten Vorhäute wurden einmal in Äthanol 70% geschwenkt, anschließend dreimal mit PBS gespült und in eine mit PBS gefüllte Petrischale überführt. Mittels einer Schere wurde das Fett- und Bindegewebe weitestgehend abpräpariert und das verbleibende Gewebe in 2 bis 3 mm große Stücke zerteilt. Anschließend wurden die Gewebestücke mit 5 ml Trypsin 0,05% / EDTA 0,02% in PBS über Nacht (ca. 18 h) bei +4°C inkubiert (Kältetrypsinierung), wodurch eine maximale Durchdringung des Gewebes und enzymatische Disaggregation bei niedriger Trypsinaktivität gewährleistet wurde. Nach der Inkubation wurde die Epidermis mechanisch mittels einer Pinzette von der Dermis getrennt und in sterile 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 13 ml Kompletmedium überführt. Durch Zugabe von 1 ml FKS 10% wurde die Enzymaktivität des Trypsins gestoppt und anschließend die Keratinozyten durch mehrmaliges Schütteln aus dem

Zellverband gelöst. Nach Rückbildung der entstandenen Schaumkrone wurde die Zellsuspension in eine mit PBS benetzte 10 ml Plastikpipette aufgezogen und in waagerechter Position der Pipette wieder abgelassen. Durch diesen Arbeitsschritt wurden größere Gewebepartikel zurückgehalten. Anschließend wurde die Zellsuspension für 10 min bei Raumtemperatur mit 500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet vorsichtig in ca. 5 ml Komplettmedium resuspendiert (mehrmalige Aspiration durch eine 0,9 x 70 mm Kanüle) und die Zelldichte nach 1:1 Verdünnung mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer bei 100-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop bestimmt (Auszählung von 4 x 16 kleinen Feldern; gezählte Zellzahl ÷ Fläche (4 mm<sup>2</sup>) ÷ Kammertiefe (0,1 mm) ÷ Verdünnung (0,5) × 1000 = Zellzahl/ml) [406]. Die Vitalität der Zellen konnte anhand der Anfärbung mit Trypanblau beurteilt werden. Der Anteil der toten Zellen betrug stets weniger als 5%. Diese Zellen wurden in der Auszählung quantitativ nicht berücksichtigt.

### 2.1.3. Anlegen der Primärkultur

Die Primärzellen wurden in einer Zelldichte von 1-2 x 10<sup>6</sup> Zellen mit 10 ml Komplettmedium in eine T-Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) ausgesät und bei +37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Begasung und 100% Luftfeuchtigkeit in der Dunkelheit inkubiert.

Täglich wurden die Zelldichte und Mediumqualität optisch kontrolliert und alle 3 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach Absaugen des alten Mediums wurde der Zellrasen behutsam mit PBS gespült, um nicht adhärente Zellen abzulösen, und anschließend erneut mit 10 ml Komplettmedium beschichtet.

### 2.1.4. Passagierung der humanen Keratinozyten

Sobald die Keratinozytenkultur eine 60 bis 75%ige Konfluenz erreicht hatte und noch zahlreiche Zellen in Mitose sichtbar waren, wurde das Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen behutsam mit 10 ml PBS gespült. Nach

Absaugen dieser Lösung wurde der Boden mit 3 ml Trypsin 0,05% / EDTA 0,02% in PBS für ca. 3 min bei +37°C inkubiert. Durch vorsichtiges Schwenken wurde der Ablösungsvorgang beschleunigt und anschließend durch Zugabe von 10 ml Komplettmedium und 1 ml FKS 10% gestoppt. Die Zellen wurden in ein steriles, verschließbares 50 ml Reagenzröhrchen überführt und bei Raumtemperatur 10 min mit 500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 5 ml Komplettmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mehrmals durch eine Eppendorfpipette aspiriert, um die Zellen zu dissoziieren.

Die Keratinozytendichte wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen in einer Dichte von  $1-2 \times 10^6$  Zellen mit 10 ml Komplettmedium in eine T-Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) überführt. Die Zellkulturen wurden bei +37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit in der Dunkelheit inkubiert. Alle 3 Tage fand ein Mediumwechsel statt.

Da primäre Keratinozyten je nach Spender ein unterschiedliches Wachstumsverhalten zeigen, dauerte es 10 bis 14 Tage, bis die Primärzellen die zur weiteren Passagierung erforderliche Konfluenz von 60 bis 75% erreichten (100% Konfluenz = lückenlos deckender Zellrasen auf dem Boden der Zellkulturflasche). Alle weiteren Passagen benötigten bis zur 70%igen Konfluenz im Durchschnitt 7 bis 10 Tage. Ab der 5. Passage nahm die Vitalität der Zellen deutlich ab. Dies konnte an der Zellmorphologie (Kernpyknose (Chromatinverdichtung und Kernschrumpfung), Zellvergrößerung und -abflachung), Zunahme der Zellzahlverdoppelungszeit und Zellablösung vom Flaschenboden erkannt werden. In der Regel kam es in der 5. bis 6. Passage zum Untergang der Zellkultur.

## 2.2. Inkubationsversuche an humanen Keratinozyten

Für die Inkubations- und Bindungsversuche wurden Zellen der 2. und 3. Passagen verwendet. Nach Erreichen einer 60 bis 75%igen Zellkonfluenz wurde das Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen zur Entfernung von nicht adhärenen Keratinozyten und Mediumresten behutsam mit 10 ml PBS gewaschen. Nach Absaugen der Spüllösung wurde der Grund mit 10 ml Medium sowie einer definierten

Chemikalienkonzentration über eine definierte Zeitspanne beschichtet. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Kulturen bei +37°C und 5% CO<sub>2</sub> in der Dunkelheit inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das mit den spezifischen Reagenzien versetzte Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit 10 ml PBS gespült. Anschließend erfolgte eine Trypsinierung mit 3 ml Trypsin 0,05% / EDTA 0,02% in PBS über 2 bis 3 min bei +37°C. Unter leichtem Schwenken wurde die Zellablösung beschleunigt. Der Erfolg wurde mikroskopisch kontrolliert und der Trypsinierungsvorgang mit 10 ml Basalmedium und 1 ml FKS 10% gestoppt. Ein enzymatischer Einfluß des Trypsins auf die  $\beta$ -Adrenozeptorstruktur und das Rezeptorbindungsverhalten ist unter Einhaltung dieser Versuchsbedingungen nicht zu erwarten [476]. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein verschließbares 50 ml Reagenzröhrchen überführt und die Zellkulturflasche zweimal mit je 5 ml Basalmedium gespült. Diese Spüllösung wurde der Zellsuspension zugeführt und die Zellkulturflaschen abschließend mikroskopisch auf vollständige Zellablösung kontrolliert.

Im Anschluß wurde die Zellsuspension bei Raumtemperatur für 10 min mit 500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 5 ml Basalmedium resuspendiert. Dabei wurden die Zellen fünfmal durch eine Einmalkanüle (0,9 x 70 mm) aspiriert, um eine homogene Zellsuspension zu gewinnen. Die Zellzahlbestimmung erfolgte in der Neubauer-Zählkammer. Dabei wurde gleichzeitig die Homogenität der Zellsuspension kontrolliert. Die Zellsuspension wurde anschließend mit Basalmedium auf eine Zelldichte von ca. 10<sup>6</sup> Zellen / ml eingestellt. Das benötigte Gesamtvolumen lag bei 5-10 ml je nach Versuchsansatz.

### 2.3. Radioligandenbindungsstudie - Sättigungsexperiment

#### 2.3.1. Theoretische Grundlagen

Die Radioliganden (RL)-Bindungsstudien wurden nach einer von Repke und Liebmann 1987 beschriebenen und von Hulme 1990 modifizierten Methode durchgeführt [225, 414]. Hierzu wird eine konstante Keratinozytenmenge (konstante Rezeptor-

konzentration) mit einer steigenden Konzentration des spezifisch an den Rezeptor bindenden Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]-CGP-12177, einem  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten, inkubiert. Die im Anschluß gemessene und graphisch dargestellte radioaktive Gesamtaktivität steigt im niedrigen Konzentrationsbereich steil an und geht mit steigender Konzentration des RL in eine Gerade über. Ein derartiger Kurvenverlauf erlaubt es, eine Zerlegung in zwei Komponenten vorzunehmen: Der lineare Teil entspricht einer konzentrationsproportionalen, nichtsättigbaren Bindung (unspezifische Bindung), welcher im niedrigen Konzentrationsbereich von einer exponentiellen, asymptotisch verlaufenden Kurve überlagert wird, die eine sättigbare Bindung (begrenzte Anzahl an Bindungsstellen) mit hoher spezifischer Affinität repräsentiert. Letztere Kurve steigt solange an, bis die Besetzung aller Rezeptoren vollständig ist (Plateauphase). Die spezifische Bindung kann durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung berechnet werden:

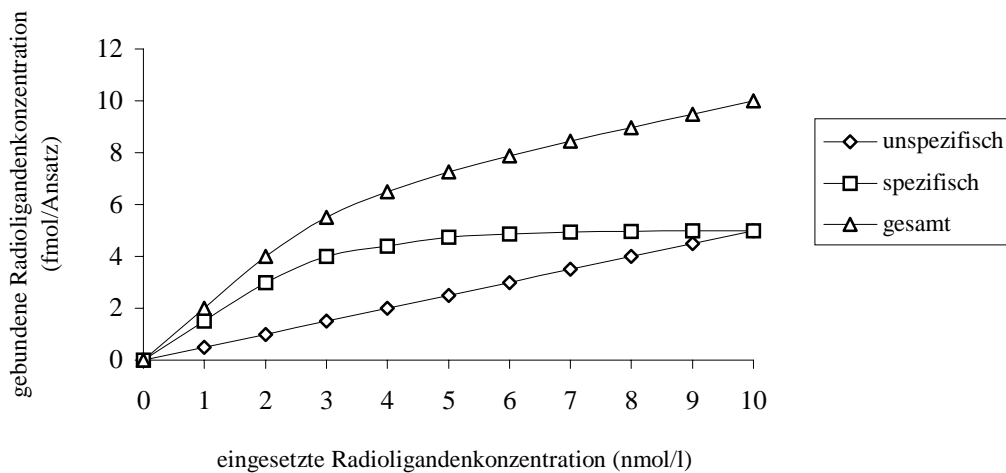


Abb. 3: Gesamtbindung des Radioliganden (in fmol/Ansatz; Ordinate) an eine Gewebepräparation in Abhängigkeit von der Radioligandenkonzentration (in nmol/l; Abszisse) und die Zerlegung in zwei Komponenten

Die im durchgeführten Experiment primär ermittelte, gebundene Radioaktivität entspricht der Gesamtbindung des RL. In einem Parallelansatz erfolgt gleichzeitig die Ermittlung der unspezifischen Bindung des Radioliganden, indem zeitgleich zu dem RL ein im Überschuß vorliegender, den RL vom Rezeptor vollständig verdrängender,



unmarkierter Ligand (Kompetitor) hinzugegeben wird [200, 359, 414, 514]. Um eine vollständige Verdrängung des Radioliganden von der Rezeptor-spezifischen Bindungsstelle zu erzielen, muß die Konzentration des unmarkierten, kompetitiven Liganden das 100- bis 1000-fache von dessen Dissoziationskonstante betragen. Eine zu hohe Konzentration bewirkt nicht nur die Verdrängung des RL von spezifischen, sondern auch von unspezifischen Bindungsstellen und suggeriert somit eine zu hohe Zahl von Rezeptor-spezifischen Bindungsstellen. Eine zu niedrige Konzentration des unmarkierten Liganden läßt einen Teil der spezifischen Rezeptoren unentdeckt [414, 445, 465]. Die Dissoziationskonstante des hier verwendeten Kompetitors Propranolol liegt bei ca. 20 nM und wurde in der vorliegenden Arbeit in einer 250-fachen Konzentration (5 µM) eingesetzt [548].

### 2.3.2. Versuchsaufbau des Sättigungsexperimentes

Das Versuchsprotokoll wurde in Anlehnung an eine von Steinkraus beschriebene Vorgehensweise durchgeführt [474, 476].

In einer Mikrotiterplatte wurden im Doppelansatz Aliquots von 150 µl Zellsuspension (ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml) mit 50 µl Radioligand in aufsteigender Konzentration ( $[^3\text{H}]$ -CGP-12177-Stammlösung mit 46 Ci/mmol = 102 dpm/fmol; 9 Konzentrationen von 0,025 bis 8,0 nM Endkonzentration) und 50 µl Basalmedium für 60 min bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. In einem Parallelansatz wurden gleichfalls in einem Doppelansatz 150 µl Zellsuspension mit 50 µl Radioligand und 50 µl einer 25 µM Propranolollösung (entsprechend einer Endkonzentration von 5 µM Propranolol im Ansatz) inkubiert. Propranolol, ein nicht-selektiver  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonist ohne partiell agonistische Aktivität (PAA), verdrängt in dieser Konzentration aufgrund seiner hohen Rezeptoraffinität den bindenden Radioliganden komplett aus seiner Rezeptorbindung, so daß durch diesen Versuchsaufbau die unspezifische Bindung ermittelt werden kann (s.o.). Bei Einhaltung der o.g. Versuchsbedingungen wird eine vollständige Gleichgewichtseinstellung zwischen dem Radioliganden und den spezifischen Bindungsstellen bereits

nach 10 min erreicht [8, 440], d.h. Radioliganden-Rezeptor-Assoziation und -Dissoziation liegen dann im Äquilibrium vor.

Nach 60 min wurde die Inkubation mittels einer schnellen Vakuumfiltration (Brandel Cell Harvester) durch angefeuchtete Whatman GF/C Filter unterbrochen. Zellen und Zellfragmente wurden auf dem Filterpapier aufgefangen, während der ungebundene RL zusammen mit den nicht korpuskulären Anteilen und der Spüllösung (ca. fünf 400 µl Spülungen mit kaltem, bidestilliertem Wasser) abgesogen wurde. Die Gesamtzeit der Waschprozedur lag unter 15 s, um eine Dissoziation des spezifisch an den Rezeptor gebundenen Radioliganden gering zu halten. Bei einer zu erwartenden Dissoziationskonstanten im Bereich von  $10^{-10}$  mol/l liegt die Dissoziationshalbwertszeit bei ca. 17 min [24, 225].

Das Filterpapier wurde im feuchten Zustand weiterverarbeitet, da der hier verwendete RL nach Filtertrocknung aufgrund seiner extremen Hydrophilie nicht in der Szintillationsflüssigkeit resolviert werden kann [469]. Die vorgestanzten Papierscheiben, auf denen sich das Zellmaterial angesammelt hat, wurden mit einer Pinzette abgelöst, mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit in je ein Szintillationsröhrchen gegeben und sorgfältig auf dem Vortex geschüttelt. Anschließend wurde die Radioaktivität der einzelnen Proben durch flüssige Szintillations-Spektrometrie im Beta-Counter bestimmt und als Zählwert pro Minute (cpm = counts per minute) registriert. Die Werte der Doppelansätze wurden bei fehlenden groben Abweichungen gemittelt.

### 2.3.3. Auswertung der experimentellen Daten

#### 2.3.3.1. Kinetik der spezifischen [<sup>3</sup>H]-CGP-12177-Rezeptor-Bindung

Die Wechselwirkungen zwischen einem Rezeptor und seinem Liganden folgen dem Massenwirkungsgesetz [24, 360, 407, 415, 445, 514]. Dies gilt auch für die Bindung des Antagonisten [<sup>3</sup>H]-CGP-12177 an den β<sub>2</sub>-Adrenozeptor [8, 469]:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[L] \times [R]}{[LR]} \quad (\text{Gleichung 1})$$

$$\rightarrow [L] \times [R] \times k_{+1} = [LR] \times k_{-1} \quad (\text{Gleichung 2})$$

Im Sättigungsexperiment wird die Meßgröße des Radioliganden-Rezeptorkomplexes [LR] bei konstanter Rezeptorkonzentration [R] als Funktion von [L] ermittelt.



[L] = Molare Ligandenkonzentration

[R] = Molare Rezeptorkonzentration

[LR] = Molare Konzentration des Liganden-Rezeptor-Komplexes

$k_{+1}$  = Assoziationsgeschwindigkeitskonstante

$k_{-1}$  = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

$K_D$  = Dissoziationskonstante des Liganden-Rezeptor-Komplexes

Aus Gleichung 2 folgt, daß die Anzahl der von dem Liganden besetzten Rezeptoren von den Konzentrationen an Ligand und Rezeptor sowie den jeweiligen Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten abhängt. Im Äquilibrium bleibt die Zahl der Liganden-Rezeptor-Komplexe konstant, da pro Zeiteinheit ebensoviele LR-Komplexe gebildet werden wie wieder zerfallen.

Aus Gleichung 1 wird ersichtlich, daß die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) des LR-Komplexes als reziprokes Maß für die Affinität des Rezeptors zu seinem Liganden gelten kann: Je kleiner die Dissoziationskonstante, desto größer die Affinität des Rezeptors zu seinem Liganden.

Berücksichtigt man in Gleichung (1), daß sich die totale Rezeptorkonzentration [TR] aus der freien Rezeptorkonzentration [R] und der im Komplex [LR] gebundenen Rezeptorkonzentration zusammensetzt ( $[TR] = [R] + [LR]$ ), so ergibt sich

$$[LR] \times K_D = [TR] \times [L] - [LR] \times [L] \quad (\text{Gleichung 4})$$

Durch Auflösen nach [LR] kommt man zum Ausdruck

$$[\text{LR}] = \frac{[\text{TR}] \times [\text{L}]}{K_D + [\text{L}]} \quad (\text{Gleichung 5})$$

Diese Gleichung ist der Michaelis-Menten-Gleichung der Enzymkinetik äquivalent [24].

Bei  $[\text{L}] = K_D$  ergibt sich

$$[\text{LR}] = \frac{[\text{TR}] \times [\text{L}]}{[\text{L}] + [\text{L}]} = \frac{1}{2} [\text{TR}] \quad (\text{Gleichung 6})$$

Demnach erscheint  $K_D$  gleich der freien Ligandenkonzentration, bei der die Hälfte der vorhandenen Rezeptoren besetzt ist. Eine niedrige  $K_D$  charakterisiert Agonisten mit einer hohen Affinität zum Rezeptor [24, 200, 359, 415].

Bei der Berechnung der Rezeptordichte wird im Verlauf davon ausgegangen, daß die Menge des spezifisch gebundenen RL sämtliche Bindungsstellen detektiert und die totale Rezeptoranzahl repräsentiert [415].

### 2.3.3.2. Berechnung der Bindungsstellen ( $B_{\max}$ ) und Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) nach Scatchard und Hofstee

Damit die Ermittlung von  $K_D$  und  $[\text{TR}]$  unter Einbeziehung aller Meßpunkte auf der Basis der linearen Regression möglich ist, muß die spezifische Bindungskurve in eine lineare Form gebracht werden. Zu den gebräuchlichsten Transformationsverfahren für Bindungsdaten von Sättigungsexperimenten gehören der *Scatchard-Plot* und der mathematisch äquivalente *Hofstee-Plot* [212, 438].

Die Scatchard-Gleichung läßt sich aus Gleichung (1) und (4) ableiten:

$$\frac{[\text{LR}]}{[\text{L}]} = \frac{[\text{R}]}{K_D} = - \frac{[\text{LR}]}{K_D} + \frac{[\text{TR}]}{K_D} \quad (\text{Gleichung 7})$$

In der Literatur hat sich dafür eine andere Nomenklatur eingebürgert:

$[\text{LR}] = B$  (bound ligand)

$[\text{L}] = F$  (free ligand)

$[\text{TR}] = B_{\max}$  (maximal number of binding sites)

Aus der obigen Gleichung ergibt sich so

$$\frac{B}{F} = -\frac{1}{K_D} \times B + \frac{1}{K_D} \times B_{\max} \quad (\text{Gleichung 8})$$

Den Scatchard-Plot erhält man durch die Auftragung der Konzentration des gebundenen Radioliganden (B) gegen den Quotienten der Konzentrationen von gebundenem und freiem Radioliganden (B/F).

Die Neigung (y/-x) der Geraden ergibt den negativen, reziproken Wert der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten ( $-1/K_D$ ;  $\rightarrow K_D = -1/\text{Steigung}$ ), ihr Schnittpunkt mit der Abszisse (bei  $B/F = 0$ ) die Menge der Bindungsstellen ( $B_{\max}$ ).

Im hier verwendeten, mathematisch äquivalenten Hofstee-Plot, der mit Hilfe des Computerprogrammes Graph-PAD Inplot (GraphPAD Software, San Diego, California, USA) erstellt wurde, wird (B/F) gegen (B) aufgetragen, wie dies in Abb. 8 (S. 40) dargestellt ist.  $K_D$  wird analog zum Scatchard-Plot ermittelt ( $K_D = -\text{Steigung}$ ) und  $B_{\max}$  ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate (bei  $B/F = 0$ ) [415].

Mit Gleichung (8) ist der einfache Fall einer homogenen Rezeptorpopulation mit nicht interagierenden Bindungsstellen beschrieben (sog. linearer Scatchard-Plot). Trifft dies nicht zu, so wird die Verbindung der einzelnen Meßpunkte von einer linearen Gerade abweichen.

Die Zahl der über den Radioliganden detektierten Rezeptorbindungsstellen pro  $10^7$  Zellen kann aus o.g. Daten berechnet werden:

$$\text{Rezeptoren} / 10^7 \text{ Zellen} = \frac{B_{\max} [\text{mol}] \times 10^7}{\text{Zellzahl} / \text{Ansatz}} \quad (\text{Gleichung 9})$$

Die Berechnung der Rezeptorbindungsstellen pro Zelle erfolgt analog:

$$\text{Rezeptoren} / \text{Zelle} = \frac{B_{\max} [\text{mol}] \times \text{Avogadro-Zahl}}{\text{Zellzahl} / \text{Ansatz}} \quad (\text{Gleichung 10})$$

Avogadro-Zahl = Zahl der Moleküle/mol =  $6,023 \times 10^{23}$  Moleküle [405].

## 2.4. Statistik

Die Ergebnisse wurden, wenn nicht anders bezeichnet, als arithmetische Mittelwerte ( $\bar{x}$ )  $\pm$  Standardabweichung (SD / standard deviation) angegeben. Das arithmetische Mittel ist ein Lagemaß zur Lokalisation des durchschnittlichen Wertes einer Reihe von Beobachtungen. Die Standardabweichung (SD) gilt als Maßzahl für die Streuung eines Merkmals. Sie zeigt Schwankungen der Einzelwerte um den Mittelwert an: Zwischen  $\bar{x} - SD$  und  $\bar{x} + SD$  liegen 68,27% aller Werte der Verteilung sowie zwischen  $\bar{x} - 2SD$  und  $\bar{x} + 2SD$  94,45% aller Werte [431].

Die ermittelten AR-Dichten auf unbehandelten NHK wurden mit dem Kolmogoroff-Smirnoff-Test auf Normalverteilung geprüft. Dieser Test berechnet die maximale Distanz (D) zwischen den erhobenen Daten und der idealen, kumulierten Häufigkeit einer Normalverteilung. Der p-Wert als Signifikanzwert dieser Abweichung entspricht der Wahrscheinlichkeit des Auftretens dieses Wertes. Ein hoher p-Wert und gleichzeitig niedriger D-Wert sprechen für eine Normalverteilung, während ein kleiner p-Wert, der unterhalb einer festgesetzten Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $p < 0,05$ ) liegt, eine signifikante Abweichung anzeigt [433].

Des Weiteren wurden die Daten unbehandelter und behandelter NHK zur Beurteilung etwaiger Unterschiede zwischen den Gruppen dem Student-t-Test für unabhängige (unverbundene, unpaarige) Stichproben unterzogen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% ( $p < 0,05$ ), d.h. daß sich der Meßwert des Kollektivs A mit mehr als 95%iger Wahrscheinlichkeit vom Meßwert des Kollektivs B unterscheidet, wurde als signifikant bewertet [432].

Mittelwert, Standardabweichung, Kolmogoroff-Smirnoff-Test und Student-t-Test wurden mit Hilfe des Computerprogrammes WinSTAT<sup>®</sup> 3.1 berechnet.

## 2.5. Tabellarische Auflistung der verwendeten Substanzen, Geräte und Hilfsmittel

### 2.5.1. Lösungen und Reagenzien

Keratinocyten-SFM<sup>®</sup> (Gibco Life Technologies, Berlin, FRG)

Basalmedium I, serumfrei, Ca<sup>2+</sup> ca. 0,09 mmol/l; firmeneigene, nicht publizierte Rezeptur

Basalmedium II, serumfrei, Ca<sup>2+</sup> ca. 0,09 mmol/l, ohne Hydrokortison, Insulin, T<sub>3</sub>

Basalmedium III, serumfrei, ohne Calciumchlorid

Komplettmedium I, II, III (Basalmedium mit Zusatz von 5 ng/ml rekombinantes, epidermales Wachstumsfaktor (rEGF), 50 µg/ml Rinderhypophysenextrakt (BPE), 5 µg/ml Gentamycin)

Gentamycinsulfat 50 mg/ml (Gibco Life Technologies, Berlin, FRG)

Fötale Kälberserum / FKS (Seromed Biochrom, Berlin, FRG)

Phosphate-buffered saline / PBS (Gibco Life Technologies, Berlin, FRG)

Hanks' balanced salts solution / HBSS (Gibco Life Technologies, Berlin, FRG)

Trypsin 2,5% in PBS ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> (Seromed Biochrom, Berlin, FRG)

Ethylendiamintetraacetat / EDTA (Sigma, Deisenhofen, FRG)

Gebrauchsfertige Lösung: Trypsin 0,05% / EDTA 0,02% in PBS

(-)-[<sup>3</sup>H]-CGP-12177 / 4-(3-tertiarybutylamino-2-hydroxypropoxy) - [5,7-<sup>3</sup>H]-

benzimidazol-2-on in Ethanol; spezifische Aktivität 46 Ci/mM, 164 mCi/mg,

1,0 mCi/ml, 102 dpm/fmol (Amersham Buchler, Braunschweig, FRG)

(-)-Isoprenalin - Hydrochlorid (Sigma, Deisenhofen, FRG)

(±)-Propranolol - Hydrochlorid (Sigma, Deisenhofen, FRG)

(±)-Alprenolol - Hydrochlorid (Sigma, Deisenhofen, FRG)

Hydrokortison / 17-Hydroxykortikosteron (Sigma, Deisenhofen, FRG)

Dexamethason / 9α-Fluoro-16α-methylprednisolon (Sigma, Deisenhofen, FRG)

All-trans-Retinsäure / Tretinoin (Sigma, Deisenhofen, FRG)

Calciumchlorid (Sigma, Deisenhofen, FRG)

Trypanblau 0,5% in physiologischer Kochsalzlösung (Seromed Biochrom, Berlin, FRG)

Ready Safe<sup>™</sup> Liquid Scintillation Cocktail (Beckman, Fullerton, USA)

Ethanol 70% vergällt mit Ethylmethylketon (UKE Apotheke, Hamburg, FRG)

Bidestilliertes Wasser (UKE Apotheke, Hamburg, FRG)

### 2.5.2. Großgeräte

Sterile Arbeitsbank Laminar-Air-Flow (Heraeus, Hanau, FRG)

Brutschrank B 5060 (Heraeus, Hanau, FRG)

Lichtmikroskop Leitz Diavert (Leitz, Wetzlar, FRG) mit Fotoaufsatz Vario Orthomat

Zentrifuge Labofuge 400 e (Heraeus, Hanau, FRG)

Schüttelwasserbad (Köttermann, FRG)

Probenmischer Reax 2000 (Heidolph, FRG)

Analysenwaage Mettler Toledo (Spoerhase AG, Gießen, FRG)

Wasserstrahlpumpe (Greifenberger Antriebstechnik, Marktredewitz, FRG)

Zellerntegerät M-24 R (Brandel, Gaithersburg, USA)

Flüssigkeitsszintillationszähler ( $\beta$ -Counter) 1500 Tri Carb, Modell A 201005 SN 86549  
(Canberra Packard, Dreieich, FRG)

Drucker Epson LX-86 (Canberra Packard, Dreieich, FRG)

### 2.5.3. Kleingeräte und Hilfsmittel

Zellkulturflaschen T-75 (75 cm<sup>2</sup>) aus Polystyrol (Nunc, Wiesbaden, FRG)

50 ml konische Reagenzröhrchen mit Verschuß (Nunc, Wiesbaden, FRG)

15 ml konische Reagenzröhrchen mit Verschuß (Nunc, Wiesbaden, FRG)

Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen und Deckel; Nunclon<sup>TM</sup> (Nunc, Wiesbaden, FRG)

Szintillationszählgläschen Glasvial<sup>TM</sup>, 20 ml (Canberra Packard, Dreieich, FRG)

Sterile Einmalspritzen á 5 ml und 10 ml Volumen (Braun Melsungen, Melsungen, FRG)

Sterile Einmalkanülen 0,9 x 70 mm (Becton Dickinson, Fraga, E)

Whatman GF/C-Filter / Glasfiber-Filterpapier, Porengröße 1,2  $\mu$ m (Bippy Dunn Labor-  
technik, Asbach, FRG)



Eppendorf Varipetten (Netheler-Hinz, Hamburg, FRG)  
Pipettenspitzen (gelb, blau) für Eppendorf Varipetten (Netheler-Hinz, Hamburg, FRG)  
Eppendorf Multipetten (Netheler-Hinz, Hamburg, FRG)  
Eppendorf Combitips á 2,5 ml, 5 ml und 12,5 ml (Netheler-Hinz, Hamburg, FRG)  
Sterile Einmalpipetten á 5 ml, 10 ml, 25 ml und 50 ml (Greiner Labortechnik,  
Frickenhausen, FRG)  
Sterile Pasteurpipetten, lang  
Sterile Glaspetrischalen  
Sterile Glaszylindergläser  
Sterile Glasflaschen  
Steriles Präparierbesteck (Skalpell, Pinzette)  
Neubauer-Zählkammer  
Zählhilfe  
Stoppuhr  
Taschenrechner  
Autoklav  
Kühltransportbox  
Kühlschrank (+4°C)  
Gefrierschrank (-20°C)

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Morphologie und Wachstumsverhalten der normalen, humanen Keratinozytenkultur

Direkt nach Aussaat der isolierten, epidermalen Keratinozyten in die Zellkulturflasche (Komplettmedium;  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ca. 0,09 mM) sind die Zellen kugelig geschwollen und zeigen eine abgerundete Oberfläche (Abb. 4). Bereits nach wenigen Stunden bilden die ersten Zellen eine Adhärenz zur Bodenoberfläche aus.

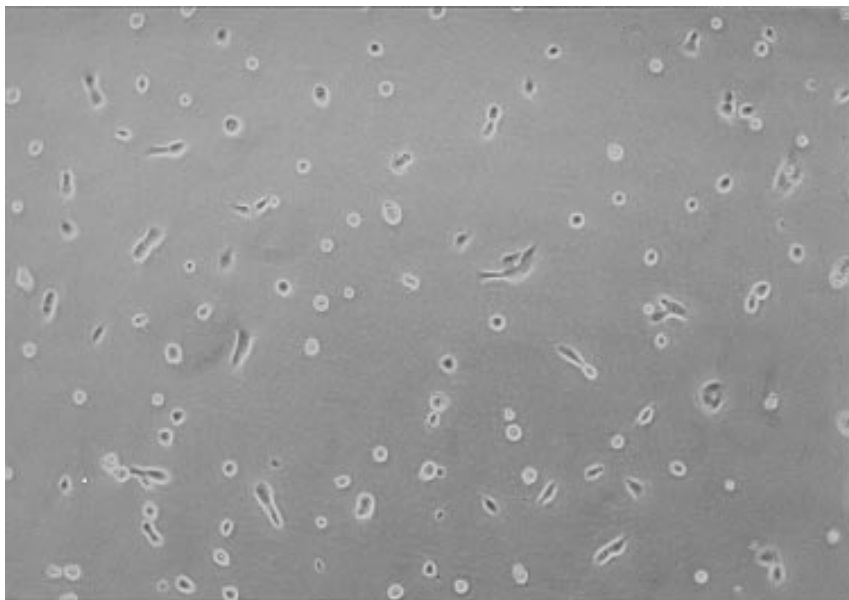


Abb. 4: NHK am Tag der Aussaat. Die meisten Zellen weisen ein kugeliges Erscheinungsbild auf. Nur wenige Zellen sind bereits adhärenz und bilden eine flache, leicht polygonale Morphologie aus (vergrößert von 320 x)

Nach ca. 24 h ist dieser Vorgang weitestgehend abgeschlossen. Die relativ kleinen Zellen flachen sich deutlich ab, werden oval bis polygonal und zeigen eine leicht spreitende Morphologie. Sobald die Zellteilung einsetzt, bilden die Zellen Kolonien aus (Abb. 5), die im Verlauf zu einem nicht stratifizierenden Monolayer konfluieren (Abb. 6). Die einzelnen Zellen sind aufgrund minimaler Zell-Zell-Kontakte nur locker aneinandergelagert und weisen weite Interzellularräume auf. Zu keinem Zeitpunkt sind Differenzierungsanzeichen (z.B. Keratohyalin granula, Organellenverlust) oder eine Stratifizierung erkennbar. Die Zahl der kontaminierenden Fibroblasten nimmt im Verlauf ab. Bereits vor der ersten Passagierung sind diese optisch nicht mehr nachweisbar. Zu Kulturbeginn sind zahlreiche Mitosefiguren erkennbar, die mit zunehmender Konfluenz der Zellen (ab ca. 60 bis 70%) abnehmen. Nur durch täglichen Medienwechsel kann eine vollständige Konfluenz der Kultur erreicht werden.

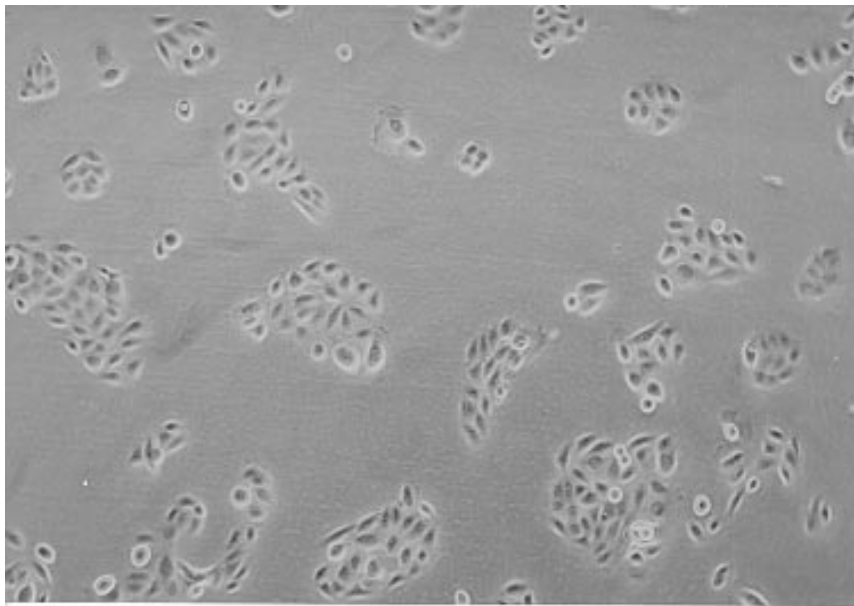


Abb. 5: NHK am 4. Tag nach Aussaat. Die adhärenenten Zellen bilden Kolonien aus. Die überwiegend polygonalen Zellen zeigen eine spreitende Morphologie. Aufgrund minimaler Zellkontakte sind weite Interzellularräume erkennbar. Die Zellen besitzen große Nuclei mit prominenten Nucleoli. Es sind zahlreiche Mitosen und postmitotische Zellen erkennbar (vergrößert von 320 x)

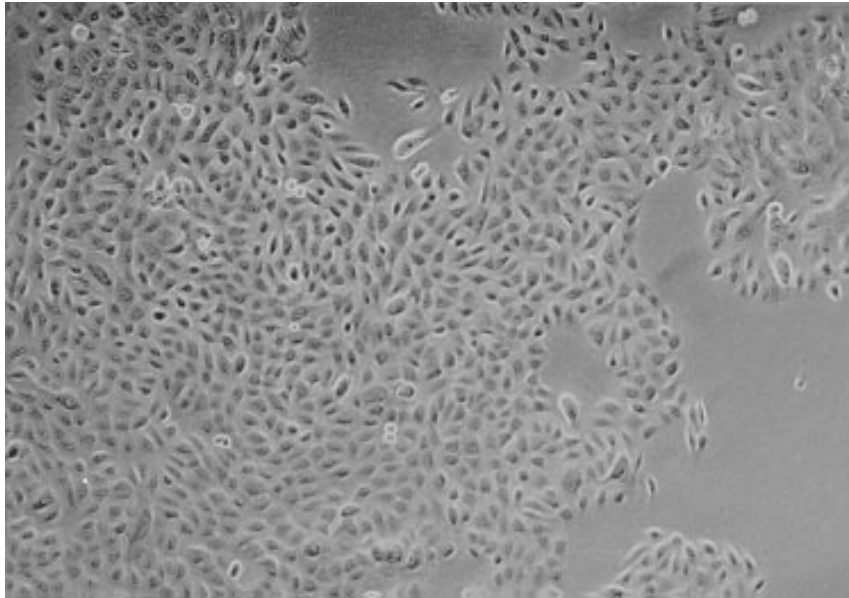


Abb. 6: NHK am 9. Tag nach Aussaat. Die einzelnen Kolonien sind zu einem Monolayer verschmolzen. Die Zellkonfluenz beträgt ca. 70%. Die Morphologie der Zellen erscheint unverändert. Auch hier sind weite Interzellularräume erkennbar. Erste Zellen lösen sich bereits vom Flaschenboden ab. Mitosefiguren sind nur noch vereinzelt erkennbar (vergrößert von 320 x)

### 3.2. Exemplarische Darstellung der Ergebnisse eines Radioliganden (RL)-Sättigungsexperimentes

Die  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte und Rezeptoraffinität intakter, normaler, humaner Keratinozyten (NHK) epidermalen Ursprungs wurde anhand von Radioliganden-Bindungsstudien bestimmt.

Die Ergebnisse eines Sättigungsexperimentes (PC 46 / Passage 2; Kontrolle) wurden hier exemplarisch und stellvertretend für sämtliche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien zur Verdeutlichung des analytischen Vorganges dargestellt.

Nach computerunterstützter Auswertung der im Szintillationszähler ermittelten Zerfälle pro Minute (cpm) konnte für jedes im Duplikat durchgeführte Experiment eine RL-Bindungskurve für die gesamte, unspezifische und spezifische Bindung im jeweiligen Versuchsansatz ermittelt werden. Die erhobenen Daten wurden anschließend auf  $\beta_2$ -Adrenozeptoren/ $10^7$  Zellen und  $\beta_2$ -Adrenozeptoren/Zelle umgerechnet (s. 2.3.3.2., S. 30):

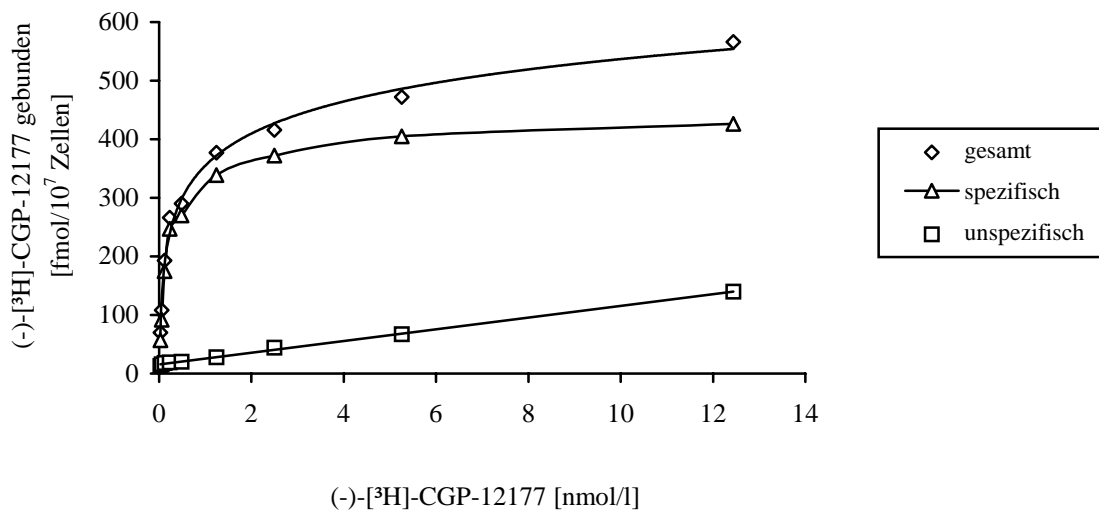


Abb. 7: Gesamte, spezifische und unspezifische Bindung des Radioliganden (-)-[<sup>3</sup>H]-CGP-12177 an NHK der PC 46/2 als Funktion einer ansteigenden Radioligandenkonzentration. Die Datenpunkte stellen die gemittelten Werte des Doppelansatzes dar. Auf eine Darstellung der Standardabweichung wurde aus graphischen Gründen verzichtet

Die Kinetik der spezifischen Bindung von [<sup>3</sup>H]-CGP-12177 an NHK der PC 46/2 war schnell und sättigbar. Die unspezifische Bindung des RL im einfachen  $K_D$ -Bereich lag bei 7% der Gesamtbindung und im 5-fachen  $K_D$  Bereich, bei dem theoretisch 83% der Rezeptoren vom RL gebunden werden [469], bei 14% der Gesamtbindung.

Die Daten der spezifischen Bindungskurve wurden anschließend nach Hofstee linearisiert und durch die Datenpunkte eine Regressionsgerade gelegt. Anhand des Geraden-schnittpunktes mit der Ordinate wurde die  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte/ $10^7$  Zellen, die der spezifisch gebundenen Radioligandenkonzentration/ $10^7$  Zellen entspricht, und anhand der Achsensteigung die Rezeptoraffinität ermittelt:

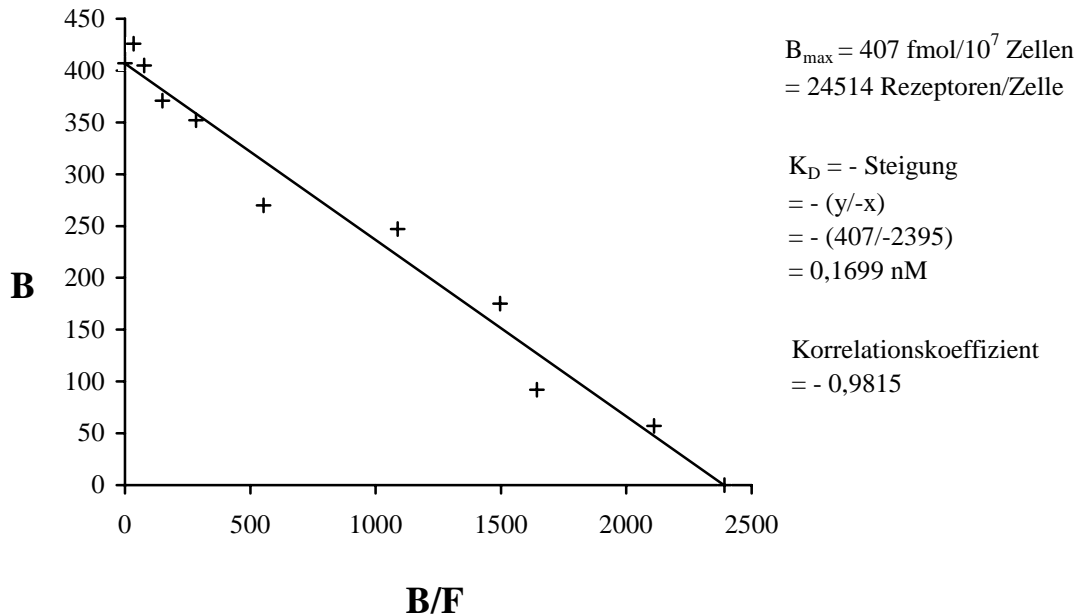


Abb. 8: Linearisierung der spezifischen Bindungskurve nach Hofstee.  $B$  = gebundenes (-)-[ $^3\text{H}$ ]-CGP-12177 in  $\text{fmol}/10^7$  Zellen.  $B/F$  = Quotient aus gebundenem (-)-[ $^3\text{H}$ ]-CGP-12177 in  $\text{fmol}/10^7$  Zellen und freiem (-)-[ $^3\text{H}$ ]-CGP-12177 in nM. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate repräsentiert  $B_{\max}$  [ $\text{fmol}/10^7$  Zellen], die negative Geradensteigung die Dissoziationskonstante  $K_D$  [nM]

Die linearisierte Bindungskurve verläuft relativ flach und monophasisch. Dies weist darauf hin, daß der RL mit hoher Affinität an eine homogene Rezeptorpopulation bindet [415].

Sämtliche in der hier vorliegenden Arbeit erhobenen Daten basieren, wie oben exemplarisch dargestellt, auf der Durchführung von Radioliganden-Sättigungsexperimenten. In allen RL-Bindungsstudien erfolgte die Berechnung der AR-Dichte ( $B_{\max}$ ) und der  $K_D$  bei gleicher Kinetik der RL-Bindung analog zu dem oben erörterten Experiment. Die unspezifische RL-Bindung im  $K_D$ -Bereich lag stets unter 10% der Gesamtbindung und der Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden durch die linearisierten Datenpunkte (Hofstee-Plot) zwischen -0,9 und -1,0, was einer hohen linearen Abhängigkeit entspricht.

### 3.3. $\beta_2$ -Adrenozeptordichte und -affinität in unbehandelten Keratinozytenkulturen

62 verschiedene Kulturen der 2. Passage und 24 verschiedene Kulturen der 3. Passage wurden hinsichtlich ihrer auf der Zelloberfläche exprimierten  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte und entsprechenden Rezeptoraffinität untersucht. Jede Kultur wurde aus Vorhautgewebe eines einzigen Spenders angelegt, so daß jede Kultur einen Spender repräsentiert.

Die ermittelten Daten (AR-Dichte und Dissoziationskonstante) sind für die einzelnen Kulturen und Inkubationsansätze tabellarisch unter 3.6. ab S. 63 aufgelistet.

Die graphische Darstellung der auf der Zelloberfläche exprimierten AR-Dichten aller Kulturen zeigt folgende Verteilung:

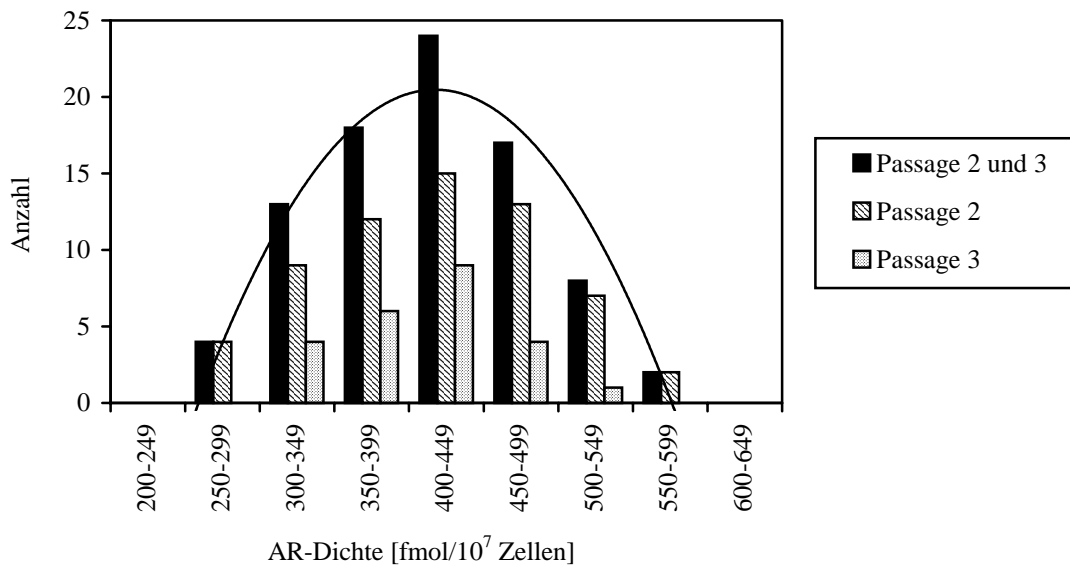


Abb. 9: Exprimierte  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte auf normalen, humanen Keratinozyten der 2. und 3. Passage mit angepaßter Normalkurve (Gauss-Verteilung)

Die ermittelten Werte wurden mit dem Kolmogoroff-Smirnoff-Test auf Normalverteilung geprüft:

D = Distanz der erhobenen Daten zur idealen Normalverteilung

p = Irrtumswahrscheinlichkeit

	D	p
Passage 2:	6%	0,9708
Passage 3:	13%	0,7592
Passage 2 und 3:	5%	0,9919

Für die gemeinsamen Daten der 2. und 3. Passage erhält man mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p = 0,9919$  eine maximale Abweichung  $D$  von 5% von der idealen Normalverteilung. Dies stellt einen hohen Wert dar und erlaubt die Annahme einer normalverteilten Grundgesamtheit.

Nach Berechnung der statistischen Werte aus der Datengesamtheit (s. 3.6., S. 63) erhält man für die einzelnen Passagen folgende  $\beta_2$ -Adrenozeptordichten:

Passage 2:  $\bar{x} = 417 \text{ fmol}/10^7 \text{ Zellen}$  (25116 AR/Zelle); SD  $\pm 74,8$ ; n = 62

Passage 3:  $\bar{x} = 405 \text{ fmol}/10^7 \text{ Zellen}$  (24393 AR/Zelle); SD  $\pm 52,1$ ; n = 24

Passage 2 und 3:  $\bar{x} = 414 \text{ fmol}/10^7 \text{ Zellen}$  (24935 AR/Zelle); SD  $\pm 69,1$ ; n = 86

Für die Dissoziationskonstanten der einzelnen Passagen wurden folgende Werte ermittelt (s. 3.6., S. 63):

Passage 2:  $\bar{x} = 0,1266 \text{ nM}$ ; SD  $\pm 0,0594$ ; n = 62

Passage 3:  $\bar{x} = 0,1289 \text{ nM}$ ; SD  $\pm 0,0398$ ; n = 24

Passage 2 und 3:  $\bar{x} = 0,1272 \text{ nM}$ ; SD  $\pm 0,0544$ ; n = 86

Um die Reproduzierbarkeit der Werte für Zellen der gleichen Kultur und Passage zu verifizieren und zufällige Fehler, z.B. durch technische Einflüsse, weitestgehend auszuschließen, wurden 5 Kulturen im Parallelansatz untersucht. Je zwei Kulturflaschen der gleichen Kultur und Passage wurden nach dem Zufallsprinzip in 2 Gruppen aufgeteilt, getrennt geerntet, gezählt und nach Durchführung der RL-Bindungsstudie analysiert:

	<u>Ansatz 1</u>	<u>Ansatz 2</u>
	AR-Dichte - $K_D$	AR-Dichte - $K_D$ [fmol/ $10^7$ Zellen bzw. nM]
PC 70/3	452 - 0,1729	441 - 0,0839
PC 74/3	400 - 0,2211	446 - 0,1027
PC 101/2	370 - 0,0797	388 - 0,1164
PC 106/3	315 - 0,1054	305 - 0,1884
PC 143/3	374 - 0,1147	378 - 0,1846
AR-Dichte:	$\bar{x} = 382$ ; SD = $\pm 49,8$	$\bar{x} = 392$ ; SD = $\pm 57,2$
$K_D$ :	$\bar{x} = 0,1388$ ; SD = $\pm 0,0573$	$\bar{x} = 0,1352$ ; SD = $\pm 0,0483$



Werden beide Ansätze miteinander verglichen, so ergibt der Student-t-Test für die AR-Dichten einen p-Wert von 0,7887 und für die Dissoziationskonstanten einen p-Wert von 0,9180. Somit kann ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen Zellen der gleichen Kultur und Passage unter gleichen Versuchsbedingungen weitgehend ausgeschlossen werden.

### 3.4. $\beta_2$ -Adrenozeptordichte und -affinität auf unbehandelten Keratinozyten im Passagenverlauf

Unterzieht man die gesamten Daten der 2. und 3. Passage (s. 3.6., S. 63) dem Student-t-Test, so läßt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kollektiven im Hinblick auf AR-Dichte und Dissoziationskonstante ermitteln (AR-Dichte:  $p = 0,4667$ ;  $K_D$ :  $p = 0,8585$ ).

Dieses Ergebnis wird auch durch die Untersuchung einzelner Primärkulturen im Passagenverlauf bestätigt:

	<u>Passage 2</u>	<u>Passage 3</u>
	AR-Dichte - $K_D$	AR-Dichte - $K_D$ [fmol/ $10^7$ Zellen bzw. nM]
PC 11	471 - 0,1065	434 - 0,0864
PC 53	411 - 0,1266	401 - 0,1216
PC 55	376 - 0,1502	358 - 0,1229
PC 70	413 - 0,0716	441 - 0,0839
PC 71	349 - 0,1288	382 - 0,1093
AR-Dichte:	$\bar{x} = 404$ ; SD = $\pm 45,9$	$\bar{x} = 403$ ; SD = $\pm 34,9$
$K_D$ :	$\bar{x} = 0,1167$ ; SD = $\pm 0,0296$	$\bar{x} = 0,1048$ ; SD = $\pm 0,0188$

Der Student-t-Test ergibt für den Vergleich der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichten einen p-Wert von 0,9760 und für den Vergleich der Dissoziationskonstanten einen p-Wert von 0,4686. Somit kann auch im direkten Passagenverlauf einzelner Kulturen ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) ausgeschlossen werden.

### 3.5. Inkubationsversuche

Aufgrund der individuellen Rezeptordichten verschiedener Kulturen wurden für die einzelnen Inkubationsreihen nur Zellen der gleichen Kultur und Passage verwendet, von denen bekannt ist, daß sie mit einer annähernd gleichen  $\beta_2$ -AR-Dichte ausgestattet sind (s. 3.3., S. 41). Dadurch wird gewährleistet, daß die beobachtete AR-Veränderung tatsächlich eine Inkubationsfolge und nicht das Resultat einer interindividuellen AR-Schwankung von unbehandelten NHK verschiedener Kulturen ist. Da u.a. der Einfluß von Glukokortikoiden auf das  $\beta_2$ -AR-System untersucht werden sollte, wurde zuvor die Wirkung des Hydrokortison-haltigen Basalmediums I (BM I) auf die  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte und Rezeptoraffinität untersucht. Da es sich bei dem verwendeten Basalmedium um eine patentierte, firmeneigene Rezeptur des Konzerns handelt, kann die genaue Hydrokortisonkonzentration, trotz direkter Firmenanfrage, hier nicht angegeben werden. Zur Überprüfung einer möglichen Relevanz wurden Zellen der gleichen Kultur und Passage ab dem 3. Tag nach Passagierung über 5 Tage (Mediumwechsel alle 2 Tage) entweder mit dem Hydrokortison-haltigen BM I oder mit BM II (ohne Hydrokortison, Insulin,  $T_3$ ) inkubiert. Da in diesen Vorversuchen (Ergebnisse nicht dargestellt) kein signifikanter Unterschied bzgl. der exprimierten AR-Dichte und Rezeptoraffinität ermittelt werden konnte, wurde der Einfluß des enthaltenen Hydrokortisons als irrelevant eingestuft. Die Durchführung der Versuchsreihen erfolgte somit auf der Grundlage von BM I. Für die Calciuminkubationsversuche wurde als Medium das auf eine definierte Calciumionenkonzentration eingestellte BM III verwendet. Jede Versuchseinheit bestand aus Kontrolle und Inkubationsansätzen der gleichen Kultur und Passage. Die Bestimmung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte und -affinität erfolgte analog zu dem unter 2.3., S. 25 beschriebenen Sättigungsexperiment. Die ermittelten AR-Dichten der Inkubationsansätze wurden in Absolutwerten (in  $\text{fmol}/10^7$  Zellen bzw. AR/Zelle) oder als relative Veränderung zu der entsprechenden Kontrolle (gleiche Kultur und Passage) angegeben und graphisch dargestellt. Im Rahmen der Datenauswertung ergibt die Betrachtung der relativen AR-Veränderung eine exaktere Auskunft über das Regulationsverhalten als die Betrachtung der Absolutwerte, da die individuell schwankenden Ausgangswerte der Kontrollen unberücksichtigt bleiben.

### 3.5.1. Inkubation mit dem $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten Isoprenalin

#### 3.5.1.1. Ermittlung der Dosis-Wirkungskurve

Humane Keratinozyten wurden über 24 Stunden mit (-)-Isoprenalin, dem physiologisch potentesten und rein  $\beta$ -mimetischen Adrenozeptor-Agonisten [278], inkubiert und die Veränderung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte sowie der -affinität in Abhängigkeit von der Agonistenkonzentration bestimmt.

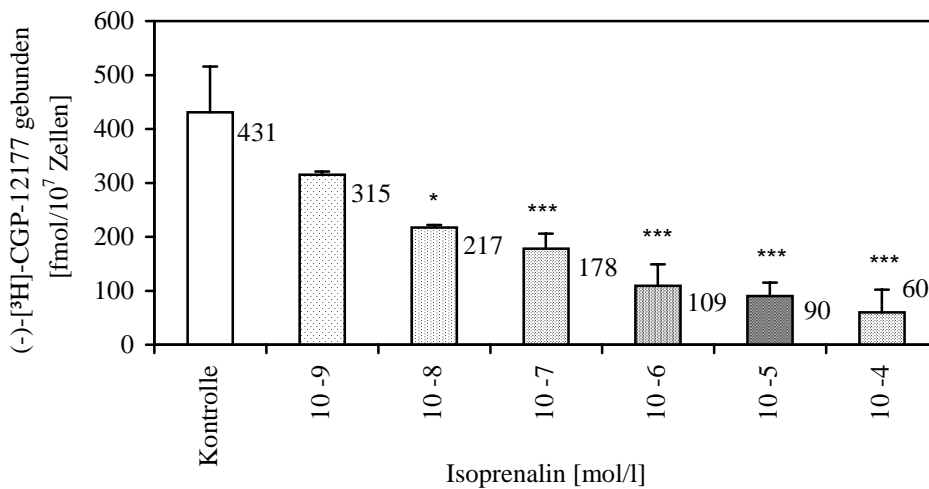


Abb. 10: Bindung des Radioliganden (-)-[<sup>3</sup>H]-CGP-12177 an NHK nach 24-stündiger Inkubation mit Isoprenalin in aufsteigender Konzentration (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ )

Die gemittelte Anzahl der auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren pro Zelle lässt sich nach Gleichung 10 (2.3.3.2., S. 30) berechnen:

Kontrolle		25959 AR/Zelle; SD $\pm$ 5114; n = 12
Isoprenalin	10 <sup>-9</sup> M	18973 AR/Zelle; SD $\pm$ 343; n = 2
	10 <sup>-8</sup> M	13070 AR/Zelle; SD $\pm$ 301; n = 2
	10 <sup>-7</sup> M	10721 AR/Zelle; SD $\pm$ 1698; n = 3
	10 <sup>-6</sup> M	6565 AR/Zelle; SD $\pm$ 2379; n = 12
	10 <sup>-5</sup> M	5421 AR/Zelle; SD $\pm$ 1518; n = 6
	10 <sup>-4</sup> M	3614 AR/Zelle; SD $\pm$ 2512; n = 2

Bereits bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  mol/l läßt sich eine signifikante Abnahme der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte nachweisen.

Werden die AR-Dichten als prozentuale Veränderung zu der entsprechenden Kontrolle ( $\pm 0\%$ ) dargestellt, so ergibt sich folgende graphische Verteilung:

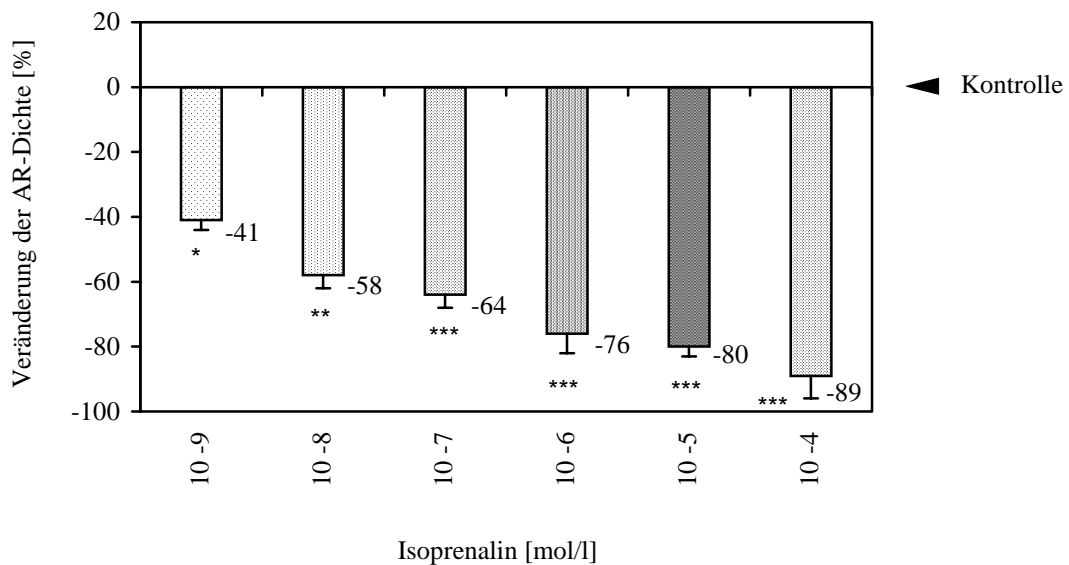


Abb. 11: Relative Veränderung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte nach 24-stündiger Inkubation mit Isoprenalin in aufsteigender Konzentration (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ )

Nach 24-stündiger Inkubation weisen alle Versuchsgruppen eine signifikante, konzentrationsabhängige Verminderung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte auf. Die aufsteigende Konzentrationsreihe führt zu einer Erniedrigung um 41% (SD  $\pm 2,8$ ;  $n = 2$ ) bei  $10^{-9}$  mol/l, 58% (SD  $\pm 4,2$ ;  $n = 2$ ) bei  $10^{-8}$  mol/l, 64% (SD  $\pm 4,4$ ;  $n = 3$ ) bei  $10^{-7}$  mol/l, 76% (SD  $\pm 5,7$ ;  $n = 12$ ) bei  $10^{-6}$  mol/l, 80% (SD  $\pm 2,9$ ;  $n = 6$ ) bei  $10^{-5}$  mol/l und um 89% (SD  $\pm 7,1$ ;  $n = 2$ ) bei  $10^{-4}$  mol/l.

Die gemittelten Dissoziationskonstanten der Versuchsgruppen weisen keine signifikante ( $p > 0,05$ ), konzentrationsabhängige Abweichung von dem Wert der Kontrolle auf:

Kontrolle		$K_D = 0,1302 \text{ nM}; SD \pm 0,0527$	
Isoprenalin	$10^{-9} \text{ M}$	$K_D = 0,1526 \text{ nM}; SD \pm 0,0233$	$p = 0,5744$
	$10^{-8} \text{ M}$	$K_D = 0,1134 \text{ nM}; SD \pm 0,0319$	$p = 0,6749$
	$10^{-7} \text{ M}$	$K_D = 0,1239 \text{ nM}; SD \pm 0,0709$	$p = 0,8645$
	$10^{-6} \text{ M}$	$K_D = 0,1331 \text{ nM}; SD \pm 0,0741$	$p = 0,9113$
	$10^{-5} \text{ M}$	$K_D = 0,1200 \text{ nM}; SD \pm 0,0723$	$p = 0,7367$
	$10^{-4} \text{ M}$	$K_D = 0,1323 \text{ nM}; SD \pm 0,0179$	$p = 0,9571$

### 3.5.1.2. Ermittlung der Zeit-Wirkungskurve

Humane, epidermale Keratinozyten wurden mit Isoprenalin  $10^{-6} \text{ mol/l}$  über eine definierte Zeitspanne inkubiert und die zeitabhängige Veränderung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte sowie der -affinität untersucht. Die Bestimmung erfolgte in 2 Versuchsreihen nach 10 min ( $n = 1$ ), 30 min ( $n = 2$ ), 60 min ( $n = 2$ ), 90 min ( $n = 1$ ), 2 h ( $n = 2$ ), 2,5 h ( $n = 1$ ), 3 h ( $n = 2$ ), 6 h ( $n = 2$ ), 12 h ( $n = 2$ ) und 24 h ( $n = 2$ ):

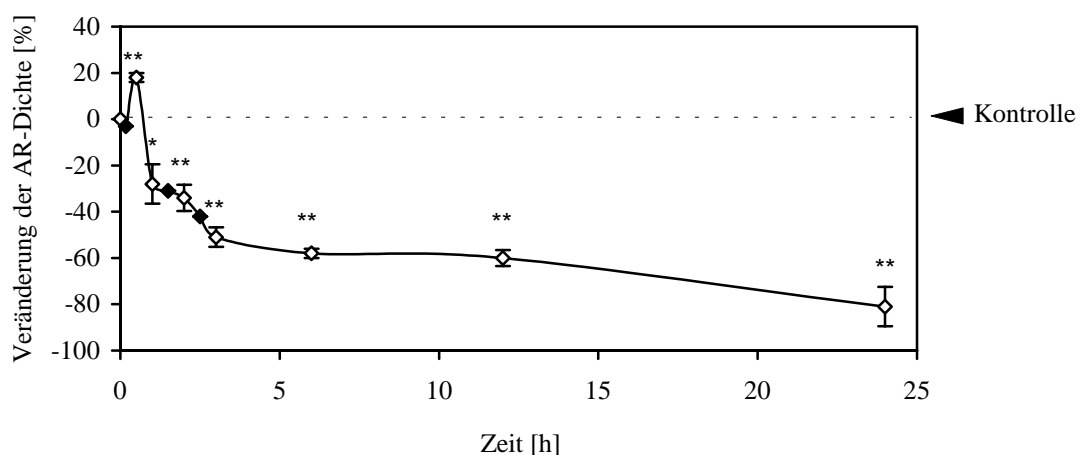


Abb. 12: Zeitabhängiger Einfluß von Isoprenalin  $10^{-6} \text{ mol/l}$  auf die  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte, dargestellt als relative Veränderung zur entsprechenden Kontrolle (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ;  $\blacklozenge$  =  $p$  aufgrund ungenügender Datenpunkte nicht zu errechnen)

Nach Inkubation mit Isoprenalin  $10^{-6}$  mol/l kommt es nach einem initialen, kurzfristigen, aber signifikanten Anstieg um 18% (nach 30 Minuten) zu einem raschen, zeitabhängigen Abfall der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte. Bereits nach 60 Minuten ist eine signifikante Erniedrigung der Adrenozeptordichte nachweisbar, die nach 24 Stunden mit einer Verminderung um 81% (SD  $\pm$  8,5) ein Minimum erreicht. Betrachtet man die Absolutwerte (graphisch hier nicht dargestellt), so wird ausgehend von einer Rezeptordichte von  $513 \pm 53$  fmol/ $10^7$  Zellen (30898 Rezeptoren/Zelle) nach 24 Stunden eine Dichte von  $101 \pm 53$  fmol/ $10^7$  Zellen (6083 Rezeptoren/Zelle) erreicht.

Während die AR-Dichte innerhalb der ersten 3 Stunden sehr rasch abfällt, verlangsamt sich der Prozeß im Verlauf. Die Kurve nähert sich über einen Beobachtungszeitraum von 24 Stunden asymptotisch einem Minimumwert von ca. 20% des Kontrollwertes an.

Die Dissoziationskonstante weist im Zeitverlauf keine signifikante Änderung ( $p > 0,05$ ) auf:

Kontrolle		0,0858 nM; SD $\pm$ 0,0049	
Isoprenalin $10^{-6}$ M	10 min	0,1205 nM	
	30 min	0,1047 nM; SD $\pm$ 0,0488	p = 0,6064
	60 min	0,0905 nM; SD $\pm$ 0,0355	p = 0,8686
	90 min	0,0735 nM	
	2 h	0,1015 nM; SD $\pm$ 0,0212	p = 0,4138
	2,5 h	0,1317 nM	
	3 h	0,0582 nM; SD $\pm$ 0,0263	p = 0,2826
	6 h	0,1016 nM; SD $\pm$ 0,0269	p = 0,5656
	12 h	0,0729 nM; SD $\pm$ 0,0467	p = 0,7353
	24 h	0,1058 nM; SD $\pm$ 0,0750	p = 0,7429

### 3.5.2. Inkubation mit den $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten Propranolol und Alprenolol

Humane Keratinozyten wurden über 24 Stunden mit den  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten ( $\pm$ )-Propranolol und ( $\pm$ )-Alprenolol in aufsteigender Konzentration inkubiert. Die Beeinflussung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte und -affinität durch Propranolol, einen nicht selektiven  $\beta$ -AR-Antagonist ohne PAA, wurde in den Konzentrationen  $10^{-5}$  mol/l (n = 2),  $10^{-6}$  mol/l (n = 3) und  $10^{-7}$  mol/l (n = 3) untersucht. Alprenolol, ein nicht selektiver  $\beta$ -AR-Antagonist mit PAA, wurde ebenfalls in den Konzentrationen  $10^{-5}$  mol/l (n = 2),  $10^{-6}$  mol/l (n = 3) und  $10^{-7}$  mol/l (n = 3) eingesetzt.

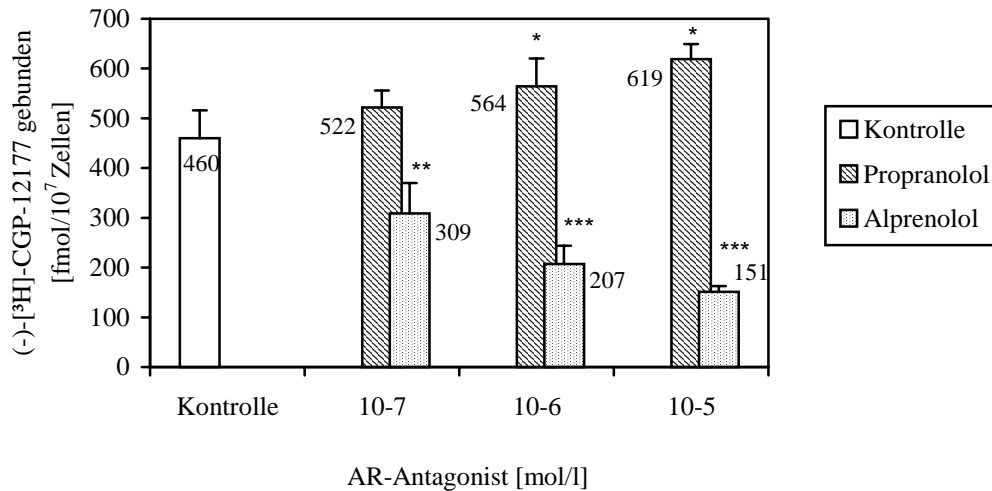


Abb. 13: Bindung des Radioliganden (-)-[<sup>3</sup>H]-CGP-12177 an NHK nach 24-stündiger Inkubation mit den  $\beta$ -AR-Antagonisten Propranolol und Alprenolol (\* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001)

Umgerechnet auf die Rezeptoranzahl pro Zelle erhält man folgende Werte:

Kontrolle (n = 6)	27706		
Propranolol	10 <sup>-7</sup> M: 31440	10 <sup>-6</sup> M: 33970	10 <sup>-5</sup> M: 37282
Alprenolol	10 <sup>-7</sup> M: 18611	10 <sup>-6</sup> M: 12468	10 <sup>-5</sup> M: 9095

Werden die  $\beta_2$ -Adrenozeptordichten als prozentuale Änderung zu der entsprechenden Kontrolle ( $\pm$  0%) angegeben, so ergibt sich folgende Verteilung:

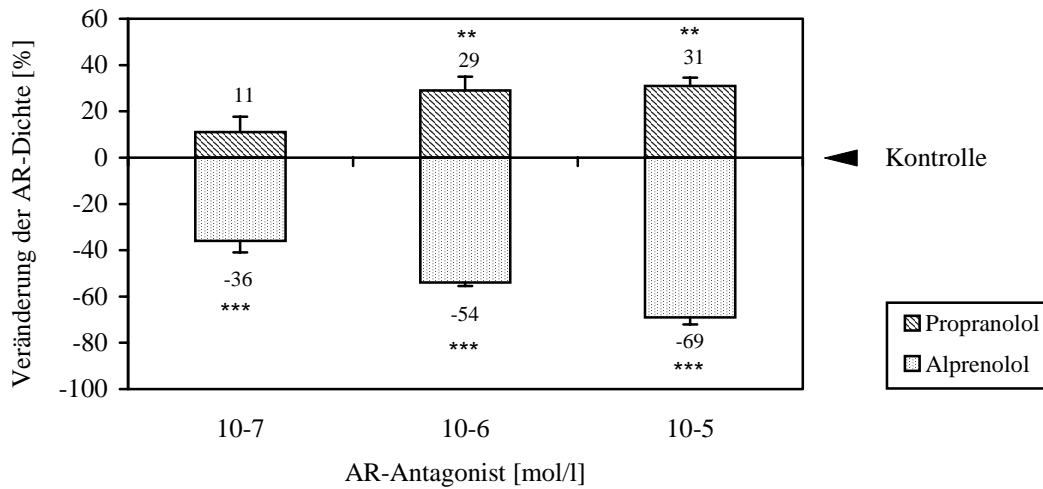


Abb. 14: Relative Veränderung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte nach 24-stündiger Inkubation mit Propranolol oder Alprenolol in aufsteigender Konzentration (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ )

Wie in Abb. 13 und 14 graphisch dargestellt, kommt es nach 24-stündiger Propranolol- bzw. Alprenololinkubation zu einer konzentrationsabhängigen, signifikanten, jedoch konträren Veränderung der AR-Dichte. Während im untersuchten Konzentrationsbereich nach Propranololinkubation eine mäßige AR-Erhöhung um bis zu 31% zu verzeichnen ist, zeigt sich nach Alprenololinkubation eine deutliche Erniedrigung um bis zu 69%.

Die gemittelten Dissoziationskonstanten der Propranololkonzentrationsgruppen weisen keine signifikante ( $p > 0,05$ ), konzentrationsabhängige Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe auf:

Kontrolle		$K_D = 0,1915 \text{ nM}; SD \pm 0,1360$	
Propranolol	$10^{-7} \text{ M}$	$K_D = 0,1218 \text{ nM}; SD \pm 0,0423$	$p = 0,4277$
	$10^{-6} \text{ M}$	$K_D = 0,1174 \text{ nM}; SD \pm 0,0014$	$p = 0,3919$
	$10^{-5} \text{ M}$	$K_D = 0,1522 \text{ nM}; SD \pm 0,0003$	$p = 0,7115$

Nach Inkubation mit Alprenolol kommt es in allen Konzentrationsgruppen zu einer signifikanten Erhöhung der Dissoziationskonstanten, d.h. die Rezeptoraffinität gegenüber dem bindenden Radioliganden nimmt im Vergleich zur Kontrollgruppe ab:

Alprenolol	$10^{-7} \text{ M}$	$K_D = 0,5025 \text{ nM}; SD \pm 0,1021$	$p = 0,0106 (*)$
	$10^{-6} \text{ M}$	$K_D = 0,5180 \text{ nM}; SD \pm 0,1741$	$p = 0,0168 (*)$
	$10^{-5} \text{ M}$	$K_D = 0,7074 \text{ nM}; SD \pm 0,0341$	$p = 0,0023 (**)$



### 3.5.3. Inkubation mit Hydrokortison

Humane Keratinozyten wurden über 24 Stunden mit Hydrokortison in aufsteigender Konzentration von  $10^{-8}$  bis  $10^{-3}$  mol/l inkubiert und die konzentrationsabhängige Veränderung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte sowie der Rezeptoraffinität bestimmt.

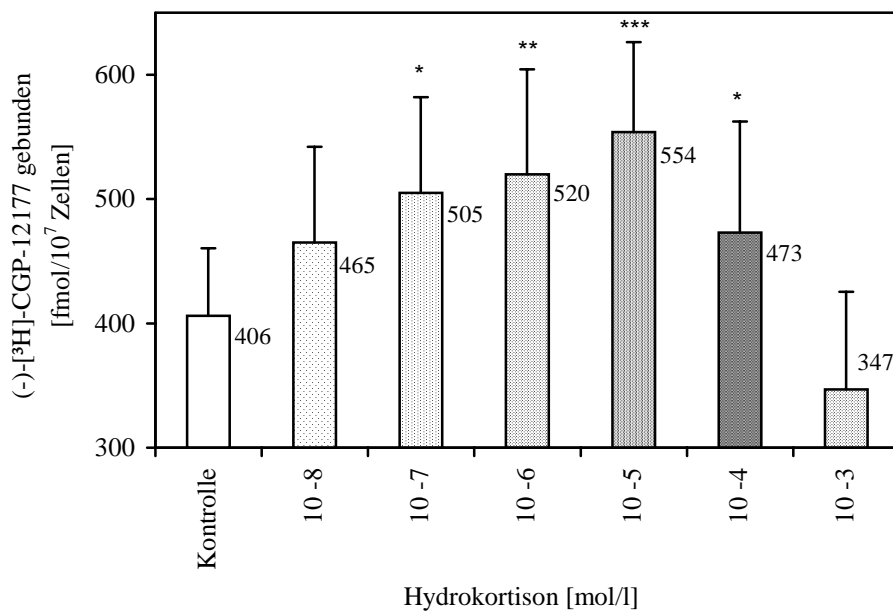


Abb. 15: Bindung des RL (-)-[<sup>3</sup>H]-CGP-12177 an NHK nach 24-stündiger Inkubation mit Hydrokortison in aufsteigender Konzentration (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ )

Umgerechnet auf die Rezeptoranzahl pro Zelle erhält man folgende Werte:

Kontrolle	24453 AR/Zelle; SD $\pm$ 3252; n = 16
Hydrokortison $10^{-8}$ M	28007 AR/Zelle; SD $\pm$ 4638; n = 2
$10^{-7}$ M	30416 AR/Zelle; SD $\pm$ 4638; n = 2
$10^{-6}$ M	31320 AR/Zelle; SD $\pm$ 5120; n = 3
$10^{-5}$ M	33367 AR/Zelle; SD $\pm$ 4337; n = 9
$10^{-4}$ M	28489 AR/Zelle; SD $\pm$ 5421; n = 6
$10^{-3}$ M	20900 AR/Zelle; SD $\pm$ 4728; n = 2

Nach 24-stündiger Hydrokortisoninkubation zeigt sich ab einer Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l ein konzentrationsabhängiger, signifikanter Anstieg der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte bis zu einer Konzentration von  $10^{-5}$  mol/l. Obwohl im Konzentrationsbereich von  $10^{-4}$  mol/l immer noch eine signifikante Erhöhung der AR-Dichte im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar ist, kann dennoch eine Abnahme im Vergleich zum Höchstwert bei  $10^{-5}$  mol/l verzeichnet werden. Bei einer Konzentration von  $10^{-3}$  mol/l Hydrokortison ist eine deutliche, wenn auch nicht signifikante Abnahme der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte unter den Kontrollwert zu beobachten. Aus dieser Entwicklung läßt sich ein annähernd glockenförmiger Kurvenverlauf konstruieren.

Wird das Ausmaß der AR-Änderungen in Relation zu der entsprechenden Kontrolle ( $\pm 0\%$ ) der gleichen Kultur und Passage angegeben, so ergibt sich folgende Verteilung:

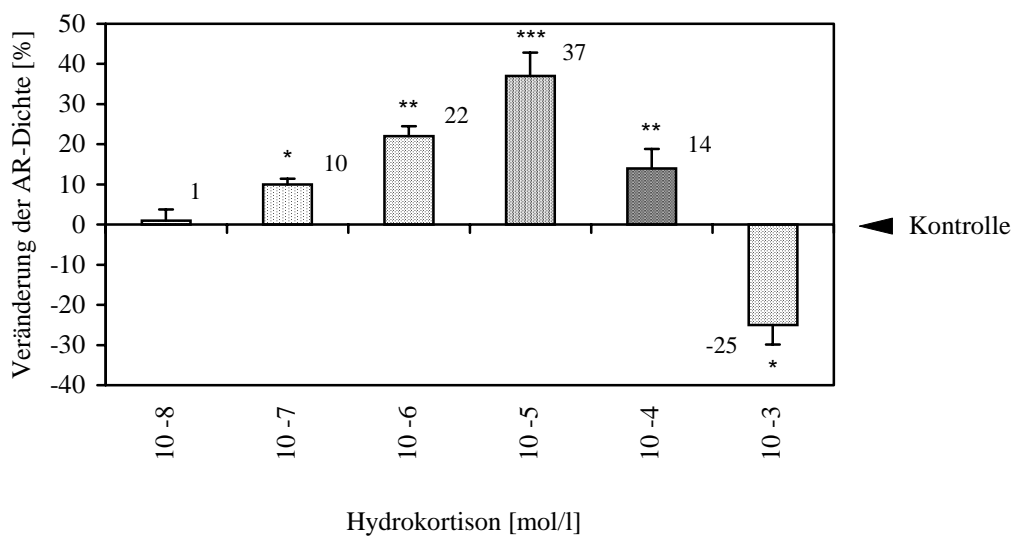


Abb. 16: Relative Veränderung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte nach 24-stündiger Inkubation mit Hydrokortison in aufsteigender Konzentration (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ )

Da bei Betrachtung der relativen Werte die individuell schwankenden Ausgangswerte der Kontrollen unberücksichtigt bleiben, erkennt man in dieser Darstellung exakter das Ausmaß der Veränderung. Dabei wird deutlich, daß im Konzentrationsbereich von  $10^{-3}$  mol/l Hydrokortison eine signifikante Erniedrigung um 25% des Ausgangswertes zu verzeichnen ist.

Für die Dissoziationskonstanten der einzelnen Gruppen wurden folgende Werte ermittelt:

Kontrolle	$K_D = 0,1329 \text{ nM}; SD \pm 0,0424; n = 16$	
Hydrokortison $10^{-8} \text{ M}$	$K_D = 0,1320 \text{ nM}; SD \pm 0,0023; n = 2$	$p = 0,9769$
$10^{-7} \text{ M}$	$K_D = 0,1044 \text{ nM}; SD \pm 0,0170; n = 2$	$p = 0,3701$
$10^{-6} \text{ M}$	$K_D = 0,1027 \text{ nM}; SD \pm 0,0097; n = 3$	$p = 0,2467$
$10^{-5} \text{ M}$	$K_D = 0,1115 \text{ nM}; SD \pm 0,0371; n = 9$	$p = 0,2192$
$10^{-4} \text{ M}$	$K_D = 0,1456 \text{ nM}; SD \pm 0,0200; n = 6$	$p = 0,4936$
$10^{-3} \text{ M}$	$K_D = 0,1276 \text{ nM}; SD \pm 0,0019; n = 2$	$p = 0,9935$

In keinem Konzentrationsbereich konnte eine signifikante Änderung ( $p < 0,05$ ) der Dissoziationskonstanten nachgewiesen werden.

### 3.5.4. Inkubation mit Dexamethason

#### 3.5.4.1. Ermittlung der Dosis-Wirkungskurve

Nach 24-stündiger Inkubation mit Dexamethason in aufsteigender Konzentration von  $10^{-7}$  bis  $10^{-4}$  mol/l wurde die konzentrationsabhängige Veränderung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte und -affinität bestimmt.

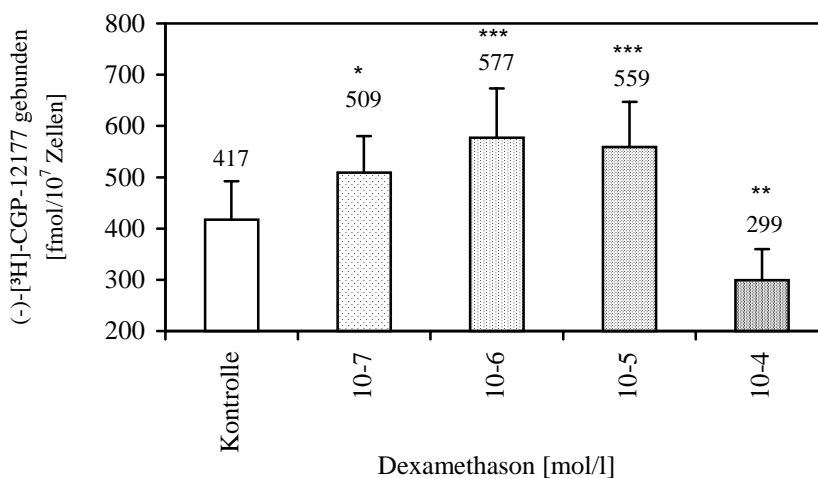


Abb. 17: Bindung des Radioliganden (-)-[<sup>3</sup>H]-CGP-12177 an NHK nach 24-stündiger Inkubation mit Dexamethason in aufsteigender Konzentration (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ )

Die Zahl der auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren pro Zelle lässt sich nach Gleichung 10 (s. 2.3.3.2., S. 30) berechnen:

Kontrolle	25116 AR/Zelle; SD $\pm$ 4535; n = 25
Dexamethason $10^{-7}$ M	30657 AR/Zelle; SD $\pm$ 4264; n = 5
$10^{-6}$ M	34753 AR/Zelle; SD $\pm$ 5752; n = 18
$10^{-5}$ M	33669 AR/Zelle; SD $\pm$ 5282; n = 8
$10^{-4}$ M	18009 AR/Zelle; SD $\pm$ 3692; n = 5

Unter Berücksichtigung der relativen Abweichung zur entsprechenden Kontrolle ( $\pm$  0%), ergibt sich folgende prozentuale Änderung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte:

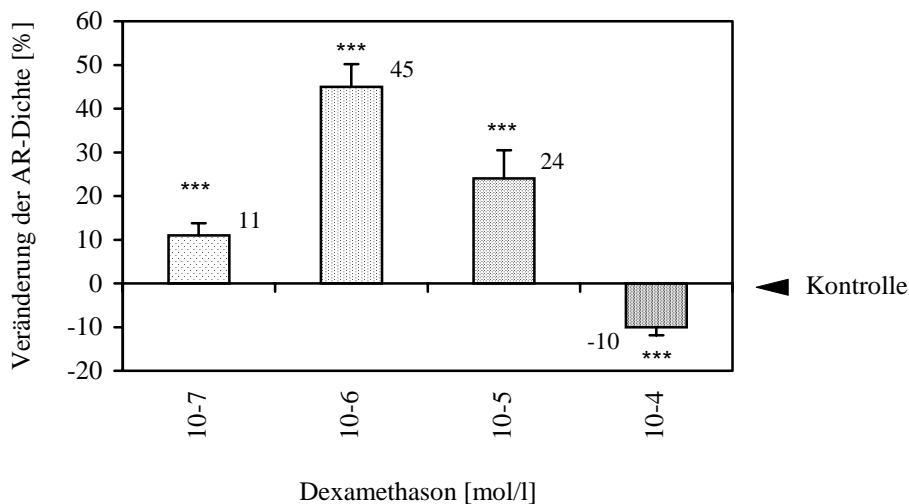


Abb. 18: Relative Veränderung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte nach 24-stündiger Inkubation mit Dexamethason in aufsteigender Konzentration (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ )

Eine signifikante Zunahme der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte ist über einen Konzentrationsbereich von  $10^{-7}$  bis  $10^{-5}$  mol/l Dexamethason zu beobachten. Das Maximum der AR-Erhöhung zeigt sich bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l. Hingegen kann eine signifikante Abnahme der Rezeptordichte um 10% des Ausgangswertes bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  mol/l Dexamethason gefunden werden.

Für die Dissoziationskonstanten der einzelnen Konzentrationsbereiche wurden folgende Werte ermittelt:

Kontrolle	$K_D = 0,1252 \text{ nM}; SD \pm 0,0447; n = 25$	
Dexamethason $10^{-7} \text{ M}$	$K_D = 0,1133 \text{ nM}; SD \pm 0,0453; n = 5$	$p = 0,5943$
$10^{-6} \text{ M}$	$K_D = 0,1159 \text{ nM}; SD \pm 0,0247; n = 18$	$p = 0,4302$
$10^{-5} \text{ M}$	$K_D = 0,1284 \text{ nM}; SD \pm 0,0280; n = 8$	$p = 0,8495$
$10^{-4} \text{ M}$	$K_D = 0,0857 \text{ nM}; SD \pm 0,0191; n = 5$	$p = 0,0654$

In keinem Konzentrationsbereich konnte eine signifikante Änderung ( $p < 0,05$ ) der Dissoziationskonstanten nachgewiesen werden.

### 3.5.4.2. Ermittlung der Zeit-Wirkungskurve

Humane Keratinozyten wurden mit  $10^{-6}$  bzw.  $10^{-5}$  mol/l Dexamethason (D6 bzw. D5) über eine definierte Zeitspanne inkubiert und die dosis- und zeitabhängige Veränderung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte sowie der Rezeptoraffinität ermittelt. Die Messung erfolgte nach 30 min (D6:  $n = 3$ ; D5:  $n = 0$ ), 1 h (D6:  $n = 6$ ; D5:  $n = 2$ ), 3 h (D6:  $n = 5$ ; D5:  $n = 0$ ), 6 h (D6:  $n = 9$ ; D5:  $n = 4$ ), 12 h (D6:  $n = 9$ ; D5:  $n = 6$ ), 24 h (D6:  $n = 8$ ; D5:  $n = 4$ ), 36 h (D6:  $n = 5$ ; D5:  $n = 0$ ) und 48 h (D6:  $n = 7$ ; D5:  $n = 2$ ):

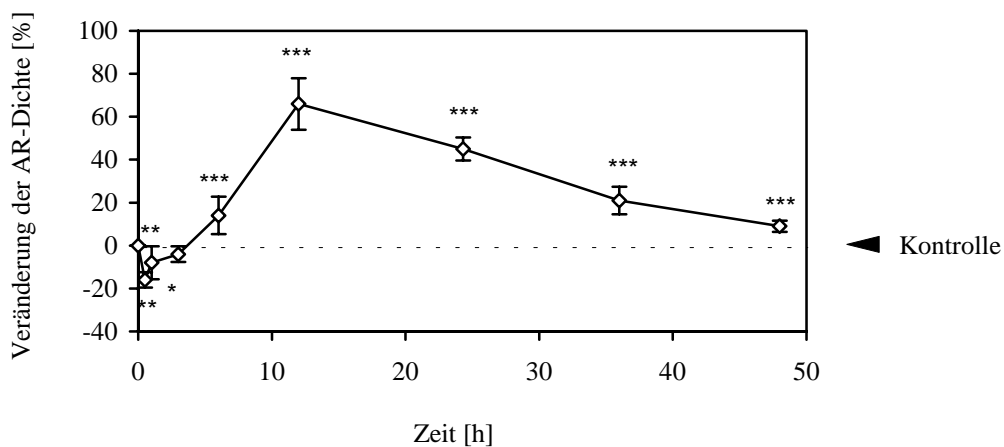


Abb. 19: Zeitabhängiger Einfluß von  $10^{-6}$  mol/l Dexamethason auf die  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte

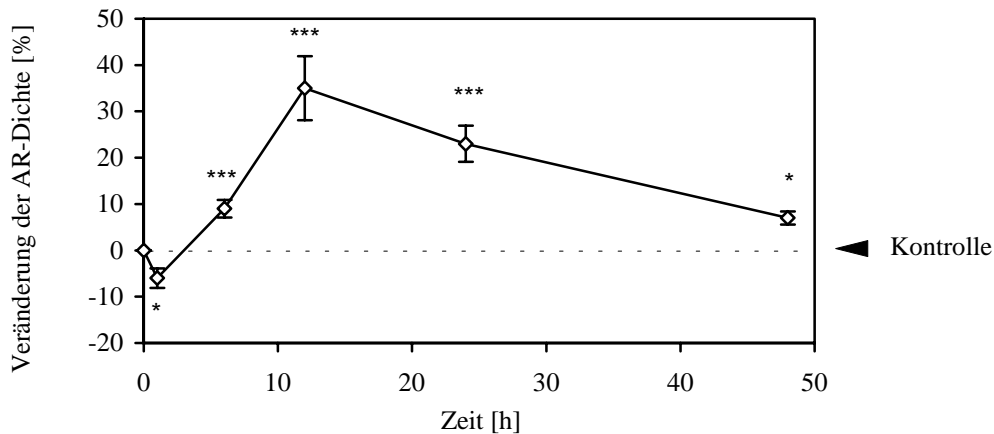


Abb. 20: Zeitabhängiger Einfluß von  $10^{-5}$  mol/l Dexamethason auf die  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte

Nach Inkubation mit Dexamethason kommt es in beiden Konzentrationsbereichen innerhalb der ersten 3 Stunden zu einem transienten, signifikanten Abfall der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte. Diese erreicht nach 30 bzw. 60 Minuten ein Minimum von bis zu  $-16\% \pm 3,6$  (D6/30 min). Nach ca. 5 Stunden wird das Ausgangsniveau wieder erreicht. Im Verlauf kommt es zu einem steilen Anstieg der Adrenozeptordichte auf ein Maximum von  $66\% \pm 12,0$  (D6) bzw.  $35\% \pm 6,9$  (D5) nach 12 Stunden. Es folgt ein stetiger, sanfter Abfall der AR-Dichte, die nach ca. 48 Stunden das Ausgangsniveau annähernd wieder erreicht hat ( $9\% \pm 2,6$  (D6) bzw.  $7\% \pm 1,4$  (D5)).

Werden beide Verlaufskurven übereinander projiziert, so zeigt sich ein analoger Kurvenverlauf, bei dem lediglich die Maxima und Minima unterschiedliche Höhen bzw. Tiefen erreichen.

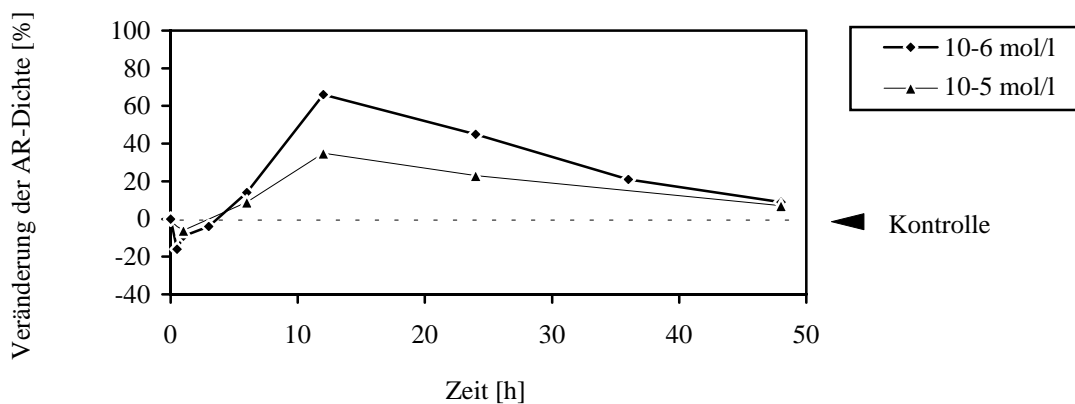


Abb. 21: Zeitabhängiger Einfluß von  $10^{-6}$  bzw.  $10^{-5}$  mol/l Dexamethason auf die  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte

Für die mit Dexamethason  $10^{-6}$  M behandelten NHK wurden die Dissoziationskonstanten während des Beobachtungszeitraumes von 48 Stunden bestimmt. Für die einzelnen Gruppen ergeben sich folgende Dissoziationskonstanten und Signifikanzniveaus (p) im Vergleich zum Kontrollkollektiv:

Kontrolle		0,1085 nM; SD $\pm$ 0,0232	
Dexamethason $10^{-6}$ M	30 min	0,0909 nM; SD $\pm$ 0,0229	p = 0,2522
	1 h	0,1084 nM; SD $\pm$ 0,0214	p = 0,1084
	3 h	0,0878 nM; SD $\pm$ 0,0336	p = 0,1459
	6 h	0,0935 nM; SD $\pm$ 0,0240	p = 0,1522
	12 h	0,0980 nM; SD $\pm$ 0,0283	p = 0,3436
	24 h	0,1194 nM; SD $\pm$ 0,0297	p = 0,3467
	36 h	0,1116 nM; SD $\pm$ 0,0167	p = 0,7863
	48 h	0,0912 nM; SD $\pm$ 0,0228	p = 0,1225

Die Rezeptoraffinität weist während des Beobachtungszeitraumes von 48 Stunden keine signifikante Veränderung (p > 0,05) auf.

### 3.5.5. Koinkubation mit Dexamethason und Isoprenalin

Humane Keratinozyten wurden über eine definierte Zeitspanne mit Isoprenalin  $10^{-6}$  mol/l und Dexamethason  $10^{-6}$  mol/l inkubiert. Dabei kamen folgende Inkubationsprotokolle zur Anwendung:

0 - Kontrolle - Kompletmedium über 24 h; n = 5

1 - Dexamethason  $10^{-6}$  M über 24 h; n = 5

2 - Isoprenalin  $10^{-6}$  M über 24 h; n = 5

3 - Isoprenalin  $10^{-6}$  M über 24 h; anschließend Kompletmedium über 24 h; n = 5

4 - Dexamethason  $10^{-6}$  M und Isoprenalin  $10^{-6}$  M gleichzeitig über 24 h; n = 3

5 - Isoprenalin  $10^{-6}$  M über 24 h; anschließend Dexamethason  $10^{-6}$  M über 24 h; n = 3

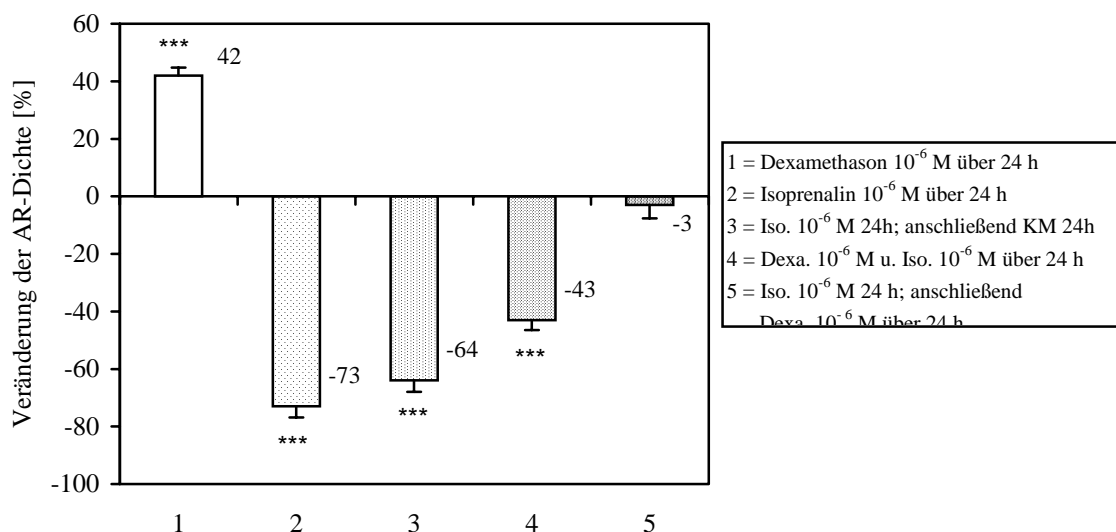


Abb. 22: Relative Veränderung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte gegenüber der Kontrolle nach Koinkubation mit Dexamethason  $10^{-6}$  mol/l und Isoprenalin  $10^{-6}$  mol/l (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ )

Nach Einzelinkubation mit Isoprenalin  $10^{-6}$  mol/l bzw. Dexamethason  $10^{-6}$  mol/l werden Veränderungen der AR-Dichte beobachtet, die denen aus den vorherigen Experimenten (s. 3.5.1.1. und 3.5.4.1.) entsprechen. Bei gleichzeitiger Inkubation mit Dexamethason  $10^{-6}$  mol/l und Isoprenalin  $10^{-6}$  mol/l über 24 Stunden (Ansatz Nr. 4) kommt es im Vergleich zur reinen Isoprenalininkubation (Ansatz Nr. 2) zu einer deutlichen Zunahme der AR-Dichte, die jedoch im Vergleich zur Kontrolle immer noch eine deutliche Erniedrigung (-43%) aufweist.

Werden NHK über 24 Stunden mit Isoprenalin und anschließend über 24 Stunden in reinem Kompletmedium kultiviert (Ansatz Nr. 3), so zeigt sich im Vergleich zur direkten Messung nach 24-stündiger Isoprenalininkubation eine geringfügige Zunahme der AR-Dichte. Die AR-Dichte liegt mit einer Verminderung um 64% aber immer noch deutlich unter dem Kontrollniveau.

Eine 24-stündige Dexamethasoninkubation im Anschluß an eine 24-stündige Isoprenalininkubation läßt keine signifikante Änderung der AR-Dichte im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr erkennen.



Die Analyse der Dissoziationskonstanten der einzelnen Versuchsgruppen ergab keine signifikante Änderung der Rezeptoraffinität ( $p > 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe:

Ansatz 0:	0,1194 nM; SD $\pm$ 0,0505	
Ansatz 1:	0,1191 nM; SD $\pm$ 0,0091	$p = 0,9892$
Ansatz 2:	0,1200 nM; SD $\pm$ 0,0646	$p = 0,9869$
Ansatz 3:	0,1504 nM; SD $\pm$ 0,0626	$p = 0,4137$
Ansatz 4:	0,1007 nM; SD $\pm$ 0,0316	$p = 0,5903$
Ansatz 5:	0,1533 nM; SD $\pm$ 0,0613	$p = 0,4265$

### 3.5.6. Inkubation mit all-trans-Retinsäure

Humane Keratinozyten wurden mit all-trans-Retinsäure, einem biologisch aktiven Vitamin A-Derivat, über 24 Stunden in ansteigender Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l bis  $10^{-4}$  mol/l inkubiert und die konzentrationsabhängige Veränderung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte sowie -affinität bestimmt.

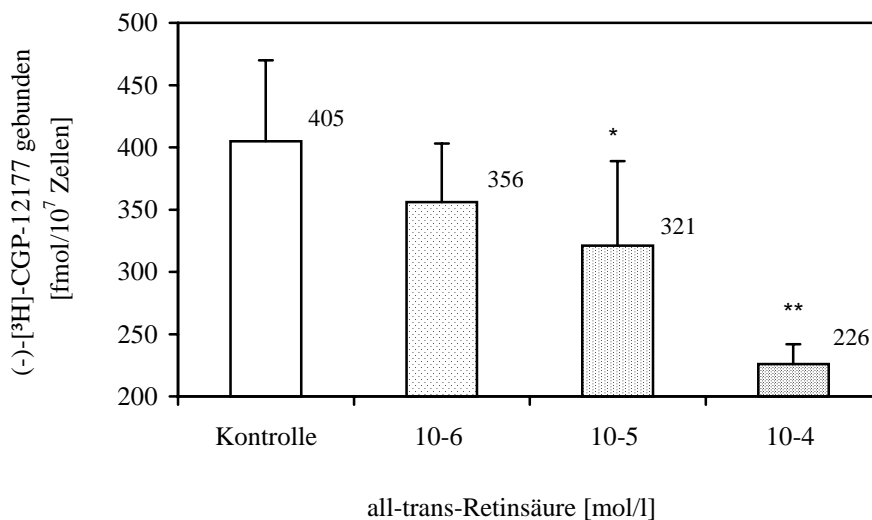


Abb. 23: Bindung des Radioliganden (-)-[<sup>3</sup>H]-CGP-12177 an NHK nach 24-stündiger Inkubation mit all-trans-Retinsäure in aufsteigender Konzentration (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ )

Die Umrechnung auf die Rezeptoranzahl pro Zelle ergibt folgende Werte:

Kontrolle		24393 AR/Zelle; SD = $\pm$ 3915; n = 8
all-trans-Retinsäure	$10^{-6}$ M	21442 AR/Zelle; SD = $\pm$ 2831; n = 3
	$10^{-5}$ M	19334 AR/Zelle; SD = $\pm$ 4096; n = 6
	$10^{-4}$ M	13612 AR/Zelle; SD = $\pm$ 964 ; n = 2

Unter Berücksichtigung der relativen Abweichung gegenüber der entsprechenden Kontrolle ( $\pm$  0%), ergibt sich folgende prozentuale Änderung der AR-Dichte:

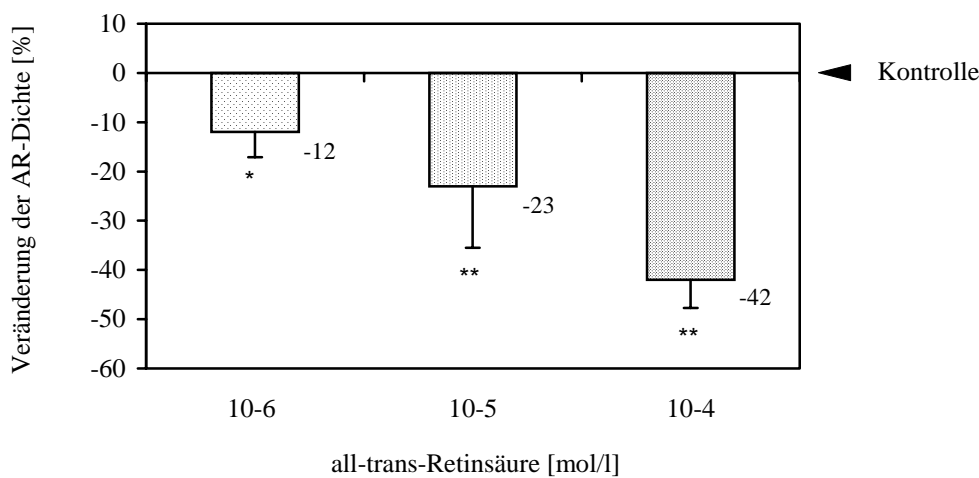


Abb. 24: Relative Änderung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte nach 24-stündiger Inkubation mit all-trans-Retinsäure in aufsteigender Konzentration (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ )

Nach 24-stündiger Inkubation mit all-trans-Retinsäure ist ab einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l eine konzentrationsabhängige, signifikante, relative Erniedrigung der  $\beta_2$ -AR-Dichte nachweisbar.

Die gemittelten Dissoziationskonstanten der einzelnen Konzentrationsbereiche weisen keine signifikante ( $p > 0,05$ ), konzentrationsabhängige Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe auf:

Kontrolle	$K_D = 0,1139$ ; SD = $\pm$ 0,0308; n = 8	
all-trans-Retinsäure	$10^{-6}$ M $K_D = 0,0983$ ; SD = $\pm$ 0,0306; n = 3	$p = 0,4727$
	$10^{-5}$ M $K_D = 0,1043$ ; SD = $\pm$ 0,0145; n = 6	$p = 0,4970$
	$10^{-4}$ M $K_D = 0,0851$ ; SD = $\pm$ 0,0217; n = 2	$p = 0,2554$

### 3.5.7. Inkubation mit Calciumchlorid

NHK wurden über 24, 48 oder 72 Stunden in aufsteigender Konzentration mit 0,01 mmol/l (24 h: n = 4; 48 h: n = 1; 72 h: n = 0), 0,5 mmol/l (n = 3, 1, 2), 1 mmol/l (n = 6, 4, 3) oder 2 mmol/l (n = 4, 4, 3) Calciumchlorid inkubiert und die konzentrations- und zeitabhängige Veränderung der  $\beta_2$ -AR-Dichte sowie der Rezeptoraffinität bestimmt. NHK, die über 72 Stunden in 0,01 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ -haltigem Medium inkubiert wurden, wiesen stets deutliche Zeichen des Vitalitätsverlustes auf und wurden nicht in die Studie aufgenommen. Die Einstellung der Calciumionenkonzentration in den jeweiligen Inkubationslösungen erfolgte in Calcium-freiem KM III. Als Kontrolle (n = 6, 4, 3) diente eine auf 0,1 mmol/l  $\text{CaCl}_2$  eingestellte Inkubationslösung. Diese Calciumionenkonzentration entspricht in etwa der mit ca. 0,09 mmol/l angegebenen Konzentration im Medium I.

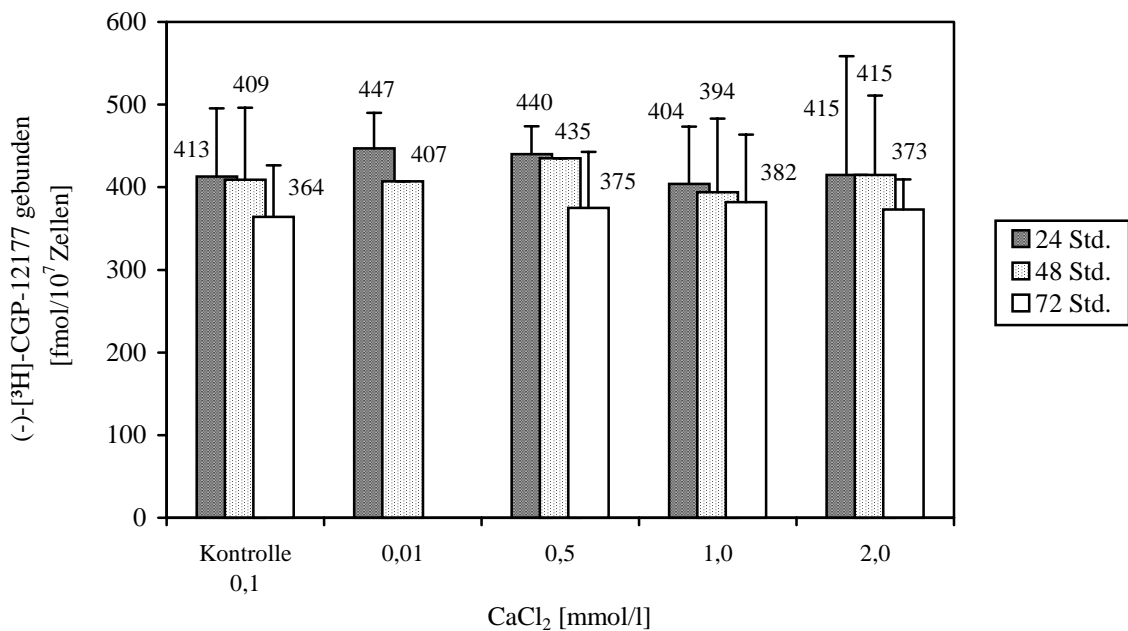


Abb. 25: Bindung des RL (-)-[<sup>3</sup>H]-CGP-12177 an NHK nach Inkubation mit Calciumchlorid in Abhängigkeit von der Calciumionenkonzentration und der Inkubationszeit

Die Analyse der Daten (s. Abb. 25) konnte keine signifikante, konzentrations- bzw. zeitabhängige Veränderung der AR-Dichte nach Inkubation mit  $\text{CaCl}_2$  nachweisen.

Die relative AR-Veränderung, bezogen auf die entsprechende Kontrolle, lag stets unter  $\pm 8\%$  (Mittelwerte) und ließ gleichfalls keine signifikante Abweichung erkennen:

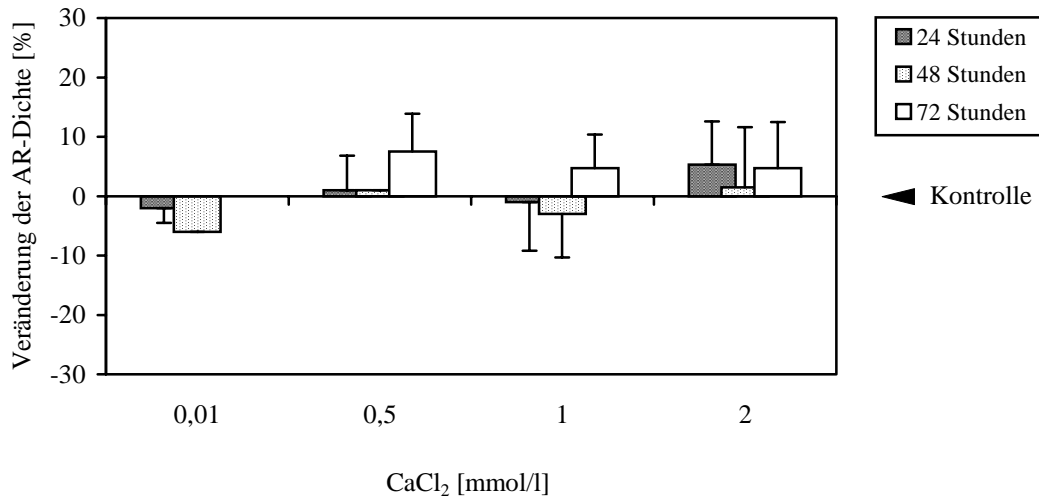


Abb. 26: Konzentrations- und zeitabhängige, relative Veränderung der  $\beta_2$ -AR-Dichte nach Inkubation mit Calciumchlorid

Die gemittelten Dissoziationskonstanten der 3 Kontrollgruppen lagen bei

0,1119 nM; SD  $\pm$  0,0512 - 24 h

0,1029 nM; SD  $\pm$  0,0209 - 48 h

0,0990 nM; SD  $\pm$  0,0177 - 72 h

Für die Dissoziationskonstanten der einzelnen Gruppen wurden folgende Werte ermittelt:

CaCl <sub>2</sub> -Konzentration \ Inkubationszeit	0,01 mM	0,5 mM	1,0 mM	2,0 mM
24 h	0,0806 nM	0,1048 nM	0,0910 nM	0,0866 nM
48 h	0,0801 nM	0,0504 nM	0,0930 nM	0,0906 nM
72 h		0,0876 nM	0,0844 nM	0,0922 nM

Nach Inkubation mit Calciumchlorid konnte weder eine konzentrations- noch zeitabhängige, signifikante Veränderung ( $p > 0,05$ ) der Dissoziationskonstanten ermittelt werden.

## 3.6. Tabellarische Auflistung der Datengesamtheit

## 1. NHK-Kontrollen; 2. Passage

PC	Datum	$B_{\max}$ [fmol/ $10^7$ Zellen]	$K_D$ [nmol/l]
10/2	06.04.92	357	0,1621
11/2	07.04.92	471	0,1065
43/2	18.12.92	548	0,1263
46/2	22.12.92	407	0,1699
47/2	23.12.92	466	0,1694
51/2	29.12.92	302	0,1933
52/2	29.12.92	286	0,1655
34/2	30.12.92	465	0,0965
35/2	28.12.92	512	0,1856
53/2	06.01.93	411	0,1266
54/2	08.01.93	355	0,1622
55/2	06.01.93	376	0,1502
57/2	19.01.93	432	0,0594
61/2	19.01.93	457	0,0638
70/2	16.02.93	413	0,0716
11.12.89/2	28.12.92	310	0,1521
59/2	21.01.93	365	0,1314
59/2	28.01.93	418	0,1759
60/2	29.01.93	334	0,2103
71/2	19.02.93	349	0,1288
78/2	08.04.93	521	0,1126
86/2	23.04.93	509	0,1411
91/2	23.04.93	407	0,1383
84/2	28.04.93	377	0,0929
92/2	28.04.93	331	0,1269
85/2	30.04.93	353	0,0613
87/2	02.05.93	334	0,0898
96/2	07.05.93	396	0,0836
98/2	11.05.93	439	0,0791
99/2	11.05.93	345	0,0958
102/2	06.06.93	432	0,1018
102/2	06.06.93	411	0,1009
103/2	06.06.93	272	0,0967
101/2	11.06.93	370	0,0797
101/2	11.06.93	388	0,1164
101/2	11.06.93	445	0,1061
101/2	11.06.93	339	0,1321
110/2	30.06.93	518	0,0967
121/2	05.08.93	562	0,1213
123/2	05.08.93	495	0,1716
126/2	03.08.93	332	0,0643
133/2	08.09.93	472	0,2177
134/2	16.09.93	490	0,1883
142/2	23.12.93	404	0,1523

145/2	03.01.94	368	0,0544
146/2	14.01.94	470	0,2146
148/2	02.02.94	482	0,1185
147/2	08.02.94	541	0,1329
152/2	15.02.94	466	0,1109
156/2	15.02.94	427	0,4575
149/2	16.02.94	547	0,1097
158/2	24.02.94	389	0,0872
150/2	25.02.94	452	0,1303
154/2	08.03.94	474	0,1365
169/2	28.03.94	411	0,0823
167/2	01.04.94	432	0,1299
172/2	04.04.04	293	0,0983
175/2	16.04.94	475	0,0892
176/2	20.04.94	449	0,0928
183/2	17.05.94	268	0,0961
184/2	17.05.94	385	0,0489
186/2	18.05.94	550	0,0823

## 2. NHK-Kontrollen; 3. Passage

11/3	08.04.92	434	0,0864
11/3	08.04.92	429	0,0686
19.05.86/3	30.12.92	452	0,1176
53/3	11.01.93	401	0,1216
55/3	11.01.93	358	0,1229
45/3	09.02.93	412	0,1757
24/3	12.02.93	379	0,1155
70/3	23.02.93	441	0,0839
71/3	26.02.93	382	0,1093
74/3	01.03.93	400	0,2211
70/3	01.03.93	452	0,1729
72/3	03.03.93	504	0,1087
73/3	16.03.93	338	0,1759
74/3	16.03.93	446	0,1027
88/3	30.04.93	470	0,0980
83/3	01.05.93	435	0,1278
90/3	06.05.93	447	0,1537
89/3	07.05.93	344	0,1105
97/3	19.05.93	462	0,1496
100/3	24.05.93	358	0,0785
106/3	22.06.93	305	0,1884
106/3	23.06.93	315	0,1054
143/3	03.01.94	378	0,1846
143/3	07.01.94	374	0,1147

## 3. Inkubationsversuche:

3.1. Isoprenalin (Ko = Kontrolle; I6 = Isoprenalin  $10^{-6}$  mol/l)

71/2	19.02.93	Ko	349		0,1288
		24h I6	63	-82%	0,0217
70/3Ü	01.03.93	Ko	452		0,1729
		24h I6	147	-75%	0,1360
		I7	174	-61%	0,0668
74/3	01.03.93	Ko	400		0,2211
		24h I6	91	-77%	0,2297
70/4	04.03.93	Ko	494		0,0824
		24h I5	114	-77%	0,1336
		I6	168	-66%	0,1479
134/2	16.09.93	Ko	490		0,1883
		24h I4	30	-94%	0,1450
		I5	102	-79%	0,1157
		I6	107	-78%	0,2506
		I7	152	-69%	0,1617
		I8	220	-55%	0,0908
142/2	23.12.93	Ko	404		0,1523
		24h I5	73	-82	0,0258
		I6	117	-71%	0,1082
143/3	03.01.94	Ko	378		0,1846
		24h I5	56	-85%	0,2320
		I6	79	-79%	0,0820
145/2	03.01.94	Ko	368		0,0544
		24h I5	77	-79%	0,0610
		I6	98	-73%	0,0684
149/2	16.02.94	Ko	547		0,1097
		24h I4	89	-84%	0,1196
		I5	119	-78%	0,1519
		I6	172	-69%	0,2311
		I7	208	-62%	0,2032
		I8	213	-61%	0,1359
		I9	311	-43%	0,1691

175/2	16.04.94	Ko	475		0,0892	
		I6	½ h	558	18%	0,1081
			1h	313	-34%	0,0654
			3h	248	-48%	0,0396
			6h	203	-57%	0,1035
			12h	201	-57%	0,1059
			24h	63	-87%	0,1588
183/2	17.05.94	Ko	268		0,0961	
		2h I6	188	-30%	0,1165	
		24h I6	67	-75%	0,1105	
186/2	18.05.94	Ko	550		0,0823	
		I6	10'	532	-3%	0,1205
			30'	641	17%	0,1012
			60'	433	-22%	0,1156
			90'	330	-31%	0,0735
			2h	341	-38%	0,0865
			2,5h	317	-42%	0,1317
			3h	253	-54%	0,0768
			6h	231	-58%	0,0997
			12h	209	-62%	0,0398
			24h	138	-75%	0,0527

### 3.2. AR-Antagonisten (Alp 6 = Alprenolol $10^{-6}$ mol/l; Pro 6 = Propranolol $10^{-6}$ mol/l)

143/3	07.01.94	Ko	374		0,1147	
		24h	Alp6	173	-54%	0,5030
			Pro6	504	35%	0,1176
146/2	14.01.94	Ko	470		0,2146	
		24h	Alp7	306	-35%	0,6068
			Pro7	555	18%	0,1672
148/2	02.02.94	Ko	482		0,1185	
		24h	Pro5	640	33%	0,1524
			Pro6	615	28%	0,1159
			Pro7	525	9%	0,1147
147/2	08.02.94	Ko	541		0,1329	
		24h	Alp5	159	-71%	0,7315
			Alp6	246	-54%	0,6991
			Alp7	371	-31%	0,4981
152/2	15.02.94	Ko	466		0,1109	
		24h	Pro5	597	28%	0,1520
			Pro6	574	23%	0,1186
			Pro7	487	5%	0,0835



156/2	15.02.94	Ko	427			0,4575
		24h	Alp5	142	-67%	0,6832
			Alp6	202	-53%	0,3519
			Alp7	250	-41%	0,4027

### 3.3. Glukokortikoide

#### 3.3.1. Hydrokortison (H6 = Hydrokortison $10^{-6}$ mol/l)

61/2	19.01.93	Ko	457			0,0638
		24h	H5	595	30%	0,1220
59/2	21.01.93	Ko	365			0,1314
		24h	H6	453	24%	0,1132
59/2	28.01.93	Ko	418			0,1759
		24h	H5	569	36%	0,0878
60/2	29.01.93	Ko	334			0,2103
		24h	H5	488	46%	0,0685
45/3	09.02.93	Ko	412			0,1757
		24h	H5	556	35%	0,1853
38/4	10.02.93	Ko	342			0,0728
		24h	H5	455	33%	0,1146
24/3	12.02.93	Ko	379			0,1155
		24h	H5	540	43%	0,0966
70/2	16.02.93	Ko	413			0,0716
		24h	H5	533	29%	0,0695
			H6	492	19%	0,1009
			H7	450	9%	0,0923
			H8	410	-1%	0,1304
38/5	17.02.93	Ko	428			0,1700
		24h	H4	483	13%	0,1251
38/5	17.02.93	Ko	392			0,1390
		24h	H5	537	37%	0,1438
72/3	03.03.93	Ko	504			0,1087
		24h	H5	711	41%	0,1155
			H6	615	22%	0,0941
			H7	559	11%	0,1164
			H8	519	3%	0,1336

71/4	12.03.93	Ko	353			0,1338
		24h H4	402	14%		0,1369
73/3	16.03.93	Ko	338			0,1759
		24h H4	364	8%		0,1386
74/3	16.03.93	Ko	446			0,1027
		24h H4	531	19%		0,1347
86/2	23.04.93	Ko	509			0,1411
		24h H3	402	-21%		0,1363
		H4	611	20%		0,1799
91/2	23.04.93	Ko	407			0,1383
		24h H3	291	-28%		0,1290
		H4	449	10%		0,1585

### 3.3.2. Dexamethason (D6 = Dexamethason $10^{-6}$ mol/l)

71/2	19.02.93	Ko	349			0,1288
		24h D4	316	-9%		0,1045
70/3	23.02.93	Ko	441			0,0839
		24h D4	391	-11%		0,0701
		D7	495	12%		0,0667
71/3	26.02.93	Ko	382			0,1093
		24h D6	578	51%		0,0851
74/3	01.03.93	Ko	400			0,2211
		24h D6	605	51%		0,1674
70/3Ü	01.03.93	Ko	452			0,1729
		24h D5	547	21%		0,1253
		D6	kontaminiert			
		D7	512	13%		0,1889
70/4	04.03.93	Ko	494			0,0824
		24h D5	583	18%		0,1065
		D6	726	47%		0,1049
71/4	12.03.93	Ko	486			0,1338
		24h D7	529	9%		0,1029
78/2	08.04.93	Ko	521			0,1126
		1h D5	485	-7%		0,1082

84/2	28.04.93	Ko	377			0,0929	
		48h	D5	406	8%		0,0847
			D6	417	11%		0,0837
92/2	28.04.93	Ko	331			0,1269	
		24h	D6	487	47%		0,1700
		12h	D6	564	70%		0,1115
85/2	30.04.93	Ko	353			0,0613	
		24h	D6	512	45%		0,1015
			D7	407	15%		0,1078
88/3	30.04.93	Ko	470			0,0980	
		12h	D5	614	31%		0,1303
			D5	639	36%		0,1048
			D6	818	74%		0,0912
83/3	01.05.93	Ko	435			0,1278	
		D6	6h	518	19%		0,1244
			12h	748	72%		0,1306
			24h	631	45%		0,1342
			48h	494	14%		0,1195
87/2	02.05.93	Ko	334			0,0898	
		12h	D5	439	31%		0,0801
90/3	06.05.93	Ko	447			0,1537	
		D6	48h	476	7%		0,1197
			24h	666	49%		0,0996
			12h	817	83%		0,1049
		D5	48h	473	6%		0,1011
			24h	572	28%		0,1342
			12h	663	48%		0,0914
			6h	479	7%		0,1031
			1h	426	-5%		0,1139
89/3	07.05.93	Ko	344			0,1105	
		36h	D6	423	23%		0,1333
			D6	430	25%		0,1212
98/2	11.05.93	Ko	439			0,0791	
		D6	6h	520	19%		0,0827
			½ h	349	20%		0,0885
99/2	11.05.93	Ko	345			0,0958	
		D6	6h	434	26%		0,1157
			1h	325	-6%		0,0951

97/3	19.05.93	Ko	462		0,1496	
		D6	48h	498	8%	0,0783
			24h	619	34%	0,1263
			12h	707	53%	0,0863
			6h	480	4%	0,0969
			3h	424	-8%	0,0885
			1h	410	-11%	0,0566
100/3	24.05.93	Ko	358		0,0785	
		D6	6h	392	10%	0,1028
			3h	351	-2%	0,0763
			1h	339	-5%	0,0722
102/2	06.06.93	Ko-1	432		0,1018	
		Ko-2	411		0,1009	
		D6	48h-1	476	10%	0,0812
			48h-2	445	8%	0,0577
			36h-1	482	12%	0,0973
			36h-2	476	16%	0,0931
			24h-1	613	42%	0,0970
			24h-2	596	45%	0,1138
			12h-1	658	52%	0,1208
			12h-2	615	50%	0,0656
			6h-1	435	1%	0,0690
			6h-2	434	6%	0,0708
			3h-1	401	-7%	0,0979
			3h-2	395	-4%	0,0420
			1h-1	384	-11%	0,1061
			1h-2	360	-12%	0,1133
			½ h-1	367	-15%	0,1149
½ h-2	357	-13%	0,0694			
103/2	06.06.93	Ko	272		0,0967	
		6h	D5	302	11%	0,1015
			D5	296	9%	0,0708
			D6	332	22%	0,0598
		12h	D5	367	35%	0,1052
			D5	351	29%	0,0962
			D6	439	61%	0,0465
		24h	D4	236	-13%	0,1059
			D4	251	-8%	0,0833
			D5	338	24%	0,1047
			D6	413	52%	0,0736
101/2	11.06.93	Ko	445		0,1061	
		D6	48h	476	7%	0,0984
			36h	564	27%	0,1130
			24h	636	43%	0,1165
			12h	781	76%	0,1246
			6h	511	15%	0,1198

			3h	449	1%	0,1344
			1h	422	-1%	0,0952
		D5	24h	536	21%	0,0952
126/2	03.08.93	Ko		332		0,0643
		24h	D4	299	-10%	0,0647
			D6	517	56%	0,1003
121/2	05.08.93	Ko		562		0,1213
		24h	D5	684	22%	0,0985
			D7	604	8%	0,1004
123/2	05.08.93	Ko		495		0,1716
		24h	D5	613	24%	0,1527
133/2	08.09.93	Ko		472		0,2177
		D5	24h	562	19%	0,1821
			6h	505	7%	0,1594
142/2	23.12.93	Ko		404		0,1523
		24h	D6	578	43%	0,1246
143/3	03.01.94	Ko		378		0,1846
		24h	D6	532	41%	0,1127
145/2	03.01.94	Ko		368		0,0544
		24h	D6	529	44%	0,1066
149/2	16.02.94	Ko		547		0,1097
		24h	D6	755	38%	0,1285
183/2	17.05.94	Ko		268		0,0961
		24h	D6	389	45%	0,1231

### 3.4. Isoprenalin und Dexamethason; Koinkubation

142/2	23.12.93	Ko		404		0,1523
		24h	D6	578	43%	0,1246
			I5	73	-82%	0,0258
			I6	117	-71%	0,1082
			I6/D6-24h	230	-43%	0,0679
			I6-24 h; KM-24h	153	-62%	0,2512
			I6-24h; D6-24h	409	1%	0,1983
143/3	03.01.94	Ko		378		0,1846
		24h	D6	532	41%	0,1127
			I5	56	-85%	0,2320
			I6	79	-79%	0,0820
			I6-24 h; KM-24h	124	-67%	0,0930

145/2	03.01.94	Ko	368		0,0544
		24h D6	529	44%	0,1066
		I5	77	-79%	0,0610
		I6	98	-73%	0,0684
		I6-24 h; KM-24	132	-64%	0,1593
149/2	16.02.94	Ko	547		0,1097
		24h D6	755	38%	0,1285
		I6	172	-69%	0,2311
		I7	208	-62	0,2032
		I6/D6-24h	328	-40%	0,1310
		I6-24h; KM-24h	224	-59%	0,1048
		I6-24h; D6-24h	501	-8%	0,1781
183/2	17.05.94	Ko	268		0,0961
		D6	389	45%	0,1231
		2h I6	188	-30%	0,1165
		24h I6	67	-75%	0,1105
		I6/D6-24h	142	-47%	0,1032
		I6-24h; KM-24h	83	-69%	0,1438
		I6-24h; D6-24h	265	-1%	0,0834

### 3.5. All-trans-Retinsäure (A6 = all-trans-Retinsäure $10^{-6}$ mol/l)

71/2	19.02.93	Ko	349		0,1288
		24h A6	311	-11%	0,1336
71/3	26.02.93	Ko	382		0,1093
		24h A6	351	-8%	0,0794
		A4	237	-38%	0,0697
87/2	02.05.93	Ko	334		0,0898
		24h A5	244	-27%	0,0985
96/2	07.05.93	Ko	396		0,0836
		24h A4	214	-46%	0,1004
		A5	242	-39%	0,1189
70/3Ü	01.03.93	Ko	452		0,1729
		24h A5	393	-13%	0,1203
89/3	07.05.93	Ko	344		0,1105
		24h A5	323	-6%	0,0987
70/4	04.03.93	Ko	494		0,0824
		24h A5	332	-33%	0,0817
		A6	405	-18%	0,0819

71/4	12.03.93	Ko	486			0,1338
		24h A5	394	-19%		0,1078

### 3.6. Calciumchlorid (1 = CaCl<sub>2</sub> 1 mmol/l)

101/2	06.06.93	24h Ko	339			0,1321
		1	335	-1%		0,0882
		2	296	-13%		0,1076
		48h Ko	370			0,0797
		1	361	-2%		0,0932
		2	408	10%		0,0900
		72h Ko	388			0,1164
		1	398	3%		0,1195
		2	344	-11%		0,1046
106/3	22.06.93	24h Ko	305			0,1884
		1	316	4%		0,0788
		2	294	-4%		0,0542
	23.06.93	48h Ko	315			0,1054
		1	338	7%		0,1096
		2	325	3%		0,0967
110/2	30.06.93	48h Ko	518			0,0967
		24h 0,01	495	-4%		0,0714
		1	505	-2%		0,0783
		2	581	12%		0,1068
		48h 1	527	2%		0,1193
		2	549	6%		0,0973
158/2	24.02.94	Ko	389			0,0872
		24h 0,01	391	1%		0,0720
		0,5	404	4%		0,0914
		1,0	433	11%		0,0812
		2,0	488	26%		0,0856
150/2	25.02.94	Ko	452			0,1303
		24h 0,01	449	-1%		0,0721
		0,5	471	4%		0,0962
		1,0	423	-6%		0,0988
154/2	08.03.94	Ko	474			0,1365
		24h 0,01	456	-4%		0,1069
		0,5	446	-6%		0,1269
		1,0	414	-13%		0,1206
169/2	28.03.94	72h Ko	411			0,0823
		0,5	423	3%		0,0784
		1,0	455	11%		0,0768
		2,0	414	1%		0,0695

167/2	01.04.94	48h	Ko	432		0,1299
			0,01	407	-6%	0,0801
			0,5	435	1%	0,0504
			1,0	351	-19%	0,0498
			2,0	377	-13%	0,0783
172/2	04.04.94	72h	Ko	293		0,0983
			0,5	327	12%	0,0968
			1,0	294	0%	0,0568
			2,0	362	24%	0,1026



## 4. DISKUSSION

### 4.1. Charakterisierung epidermaler Modell- und Zellkultursysteme unter besonderer Berücksichtigung der Kultivierung normaler, humaner Keratinozyten (NHK)

Fortschritte in der Erforschung und Therapie epidermaler Erkrankungen erforderten die Entwicklung leicht verfügbarer und repräsentativer Modellsysteme. Dies führte zur Etablierung zahlreicher *in vitro* Modelle menschlicher und tierischer Herkunft.

Untersuchungen an Spalthautpräparaten oder punch-Biopsien, die aufgrund ihrer erhaltenen Integrität einen hohen repräsentativen Charakter hinsichtlich der komplexen, interzellulären Kommunikations- und Interaktionsfähigkeit besitzen, reflektieren am ehesten die Situation der Epidermis *in vivo*. Je nach Tiefe der Biopsie kann zudem das Zusammenspiel zwischen epidermalem und dermalem Kompartiment studiert werden. Allerdings sind diese Präparate quantitativ nur eingeschränkt verfügbar, lassen aufgrund ihrer begrenzten Vitalität keine Langzeitbeobachtungen *in vitro* zu, weisen ein heterogenes Zellmuster auf (kontaminierende Zellen aus dem dermalen Kompartiment) und erschweren aufgrund ihrer Komplexität und Variabilität sowohl die Durchführung standardisierter Untersuchungen als auch die Interpretation der Daten [140, 215]. Zudem können Veränderungen im Gesamtorganismus über dermal-epidermale Diffusionsvorgänge Einfluß auf das epidermale Kompartiment nehmen. Es ist bekannt, daß z.B. die endogene Katecholamin- und Steroidsekretion einer zirkadianen Rhythmik unterliegt, die konsekutiv die Adrenozeptordichte beeinflussen kann [145, 183]. Des Weiteren haben Begleiterkrankungen und Streß Einfluß auf das adrenerge System [183, 359, 372, 465].

Mit Hilfe von epidermalen *in vitro* Zellkultursystemen tierischer (z.B. Schaf, Nager) [302, 398] und humaner Herkunft [36, 196, 418] können durch die Elimination endogener Mediatoren und dermaler Komponenten die Inkubationsbedingungen weitgehend standardisiert und die biologischen Effekte von Hormonen, Wachstumsfaktoren, Nährstoffen etc. exakter studiert werden [140, 169].

Epidermale Keratinozyten bilden in zahlreichen Kultursystemen Monolayer aus. Die *in vivo* bestehende Diffusionsbarriere der geschichteten und verhornten Epidermis wird

somit umgangen, und zelluläre Effekte sind in der Regel rascher als in in vivo Systemen zu beobachten [169].

Der Einsatz tierischer Zellen und Gewebepräparate wird jedoch aufgrund speziesspezifischer Eigenschaften, einer häufig nicht äquivalenten zellulären Antwort im Vergleich zu humanen Keratinozyten und somit eingeschränkter Repräsentanz kontrovers diskutiert [210, 215, 245, 343, 487, 503]. Es ist seit langem bekannt, daß z.B. die Schweineepidermis, verglichen mit der humanen Epidermis, nur mit einem rudimentär ausgebildeten  $\beta$ -Adrenozeptorsystem ausgestattet ist [7]. Ferner sind zahlreiche epidermale Erkrankungen des Menschen nicht im Tierreich vertreten bzw. auslösbar, so daß diese am Tiermodell nicht studiert werden können [36, 343, 448].

Aufgrund ihrer leichten Subkultivierung und Expansion wurden zahlreiche tierische und humane, permanente Keratinozytenkulturen etabliert, die von maligne transformierten, epidermalen Zellen abstammen, wie z.B. die Zelllinien A431, SCC4, HEL, FRSK und SV40-transformierte humane Keratinozyten [87, 149, 158, 213, 471, 503, 504, 505]. Im Unterschied zu normalen Keratinozyten zeichnen sich diese durch Immortalisierung aus, d.h. sie unterliegen nicht den physiologischen Steuerungsprozessen, die in Abhängigkeit vom Milieu eine terminale Differenzierung und letztlich nach Durchschreiten von Alterungsprozessen den programmierten Zelltod vorsehen [35, 159, 197, 419]. Aufgrund ihrer eingeschränkten Differenzierungspotenz, ihres mangelhaften Ansprechens auf Differenzierungsstimuli (z.B. Calciumionen) und ihrer veränderten Stoffwechselprozesse, die die zellulären Proliferations- und Differenzierungsvorgänge beeinflussen (z.B. 2- bis 3-fach erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, kontinuierlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx), sind sie für Studien, die die Erforschung epidermaler Differenzierungsvorgänge zum Ziel haben, nur eingeschränkt verwendbar [149, 158, 336, 393, 397, 419, 452, 503, 512].

Eine Ausnahme stellt die von histologisch unauffälliger Haut abstammende, spontan immortalisierte, humane Keratinozytenlinie HaCaT (Akronym: human keratinocytes, adult skin epidermis, calcium reduced level, temperature elevated cells) dar, die sich durch ein hohes Differenzierungspotential auszeichnet [32, 215]. In vitro Untersuchungen zeigen, daß Verhalten und Reaktion der HaCaT-Zellen im Verlauf der Keratinisierung denen von autologen, humanen Keratinozyten weitgehend entsprechen. Im Unterschied zu kultivierten, normalen Keratinozyten sind HaCaT-Zellen jedoch in ihren

Wachstumseigenschaften von der extrazellulären Calciumionenkonzentration und Temperatur, wichtigen Differenzierungsinduktoren, weitgehend unabhängig [32]. Ferner weisen sie einen aneuploiden, strukturell stark veränderten Karyotyp auf [32]. U.a. ist das Chromosom 5, auf dem das Gen des humanen  $\beta_2$ -Adrenozeptors lokalisiert ist [69, 94, 115, 273], 4-fach angelegt. Inwieweit diese Aberration Einfluß auf dessen Expression und das zelluläre Differenzierungsverhalten einschließlich der beobachteten Calciumunabhängigkeit hat, ist derzeit noch ungeklärt.

Erst Mitte der 70er Jahre gelang die Subkultivierung und Expansion normaler, humaner Keratinozyten (NHK) [418], die ebenso wie frische Keratinozyten ex vivo mit einem funktionellen  $\beta_2$ -Adrenozeptorsystem ausgestattet sind [56, 153]. Dieses Kulturverfahren wie auch die Mehrzahl anderer etablierter Protokolle [204, 254] benötigen zur Unterstützung der Proliferation sekretorisch kompetente Kokulturzellen (z.B. 3T3-Beschichtung; sog. „feeder layer“) und/oder den Zusatz zahlreicher Supplemente, wie z.B. Hydrokortison, Cholera toxin und chemisch undefiniertes, je nach Charge variables, fötales Kälberserum (FKS). Von diesen Additiven ist bekannt, daß sie das  $\beta$ -adrenerge System erheblich beeinflussen können. Glukokortikoide erhöhen die Dichte bzw. Stimulierbarkeit der  $\beta$ -Adrenozeptoren [141, 234, 261, 376, 483, 504] und Cholera toxin führt aufgrund einer anhaltenden Stimulation des Gs-Proteins zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes [54, 161], der im Rahmen der physiologischen AR-Regulation die Konzentration und Affinität des Rezeptorsystems beeinflussen kann [25, 307, 487]. Durch die Supplementierung mit Standardserum erfolgt eine signifikante Zugabe von zahlreichen Zusatzstoffen. Zu dem Problem der komplexen Zusammensetzung kommen Chargenschwankungen und der Gehalt an undefinierten Agenzien. Man muß davon ausgehen, daß Serum über 1000 unterschiedliche Komponenten, einschließlich der Proteine, Elektrolyte, Lipide, Kohlenhydrate, Anheftungsfaktoren, Hormone, Bindungs- und Trägerproteine, Enzyme und verschiedenen, noch nicht identifizierten Komponenten, enthält, die Wachstum, Migration und Differenzierung in unbekanntem Ausmaß modulieren können [140]. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hormone, einschließlich ihrer biologisch aktiven Vorläufermoleküle und Abbauprodukte, sind physiologischerweise im Serum enthalten. Der humane Plasmaspiegel von Kortisol (Hydrokortison) liegt in Abhängigkeit von der zirkadianen

Rhythmik zwischen  $< 0,14 \mu\text{mol/l}$  bzw.  $0,5 \mu\text{g/ml}$  (24 Uhr) und  $0,69 \mu\text{mol/l}$  bzw.  $2 \mu\text{g/ml}$  (Basalwert 8 Uhr). Die physiologische Konzentration der endogenen Katecholamine liegt bei  $1 \text{ nmol/l}$  bzw.  $0,2 \text{ ng/ml}$  Noradrenalin und  $0,2 \text{ nmol/l}$  bzw.  $0,05 \text{ ng/ml}$  Adrenalin [308, 391, 513] und somit im gleichen Größenordnungsbereich wie im fötalen Kälberserum [91]. Bereits in diesem Konzentrationsbereich ist eine Beeinflussung des epidermalen Adrenozeptorsystems zu erwarten, wie die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen: Hydrokortison führt nach 24-stündiger Inkubationsdauer im Konzentrationsbereich von  $0,1 \mu\text{mol/l}$  zu einer 10%igen und im Bereich von  $1 \mu\text{mol/l}$  zu einer 22%igen signifikanten  $\beta_2$ -AR-Erhöhung (Abb. 16, S. 52), während Isoprenalin bereits im nanomolaren Bereich die  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte signifikant um 41% erniedrigt (Abb. 11, S. 46). Des Weiteren ist bekannt, daß die  $\beta$ -Adrenozeptordichte durch Östrogene um bis zu 50% erniedrigt und durch Testosteron um bis zu 100% erhöht werden kann [487]. Wie die komplexe Mischung solcher interagierender Hormone letztlich die Adrenozeptordichte und -affinität beeinflusst, kann nur schwer vorhergesagt werden. In einer Studie an C6 Gliomzellen führte die Inkubation in 5% FKS-haltigem Medium zu einer 30 bis 50%igen Reduzierung der exprimierten  $\beta$ -Adrenozeptordichte im Vergleich zu einer Inkubation in serumfreiem Medium [91].

Da die zu untersuchende Zielgröße ( $\beta_2$ -AR-Dichte) durch die Supplementierung mit den o.g. Kulturadditiven bereits vor Inkubation in einem deutlichen, nicht exakt einkalkulierbaren Ausmaß verändert wird, ist die Beurteilung der  $\beta$ -adrenergen Bindungscharakteristika in solchen Zellkultursystemen nur begrenzt möglich.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte deshalb die Keratinozytenkultivierung in einem chemisch definierten, serumfreien Medium (SFM) [36, 454]. Das Keratinozyten-SFM<sup>®</sup> besteht aus isoosmotischen, pH-gepufferten Salzmischungen, Aminosäuren, Zuckern, Vitaminen und essentiellen Spurenelementen [35, 454]. Trotz der komplexen Formulierung des Basalmediums ist aber nur ein kurzfristiges Überleben der kultivierten Zellen erreichbar. Erst nach Supplementierung von rEGF (verlängert die Lebensdauer der Kultur; erhöht die Zahl der Zellgenerationen von ca. 50 auf 140; beschleunigt die Proliferation in konfluenten Kulturen; verhindert Stratifizierung und Differenzierung) und Hypophysenextrakt (unterstützt die Zellanheftung an den Untergrund; verzögert die Zellalterung) ist eine erfolgreiche Kultivierung möglich [35, 61, 159, 451, 454]. Durch

den Einsatz serumfreier Medien (SFM) kann die Zellkultur nach Eliminierung interagierender Komponenten unter standardisierten Kulturbedingungen durchgeführt und die Reproduzierbarkeit der zellulären Antwort erhöht werden [35, 36, 61, 91, 215]. Dies stellt eine Grundvoraussetzung für das Studium der empfindlichen, adrenergen Regulationsvorgänge dar.

Die bisherigen Arbeiten über das epidermale  $\beta$ -Adrenozeptorsystem wurden an Keratinozyten humaner oder tierischer Herkunft durchgeführt. Zum Einsatz kamen homogenisierte Biopsiepräparate, permanente Zelllinien (z.B. HaCaT, A 431, HEL, FRSK) und Keratinozytenkulturen, die mit beeinflussenden Additiva (FKS, Choleratoxin, Glukokortikoide) sowie Kokulturzellen kultiviert wurden [7, 87, 153, 154, 155, 213, 245, 461, 473, 475, 476, 478, 480, 485, 504]. Während die Übertragbarkeit der Ergebnisse von Tier auf Mensch generell in Frage gestellt werden muß, wird durch die komplexen u./o. variablen Versuchsbedingungen die Interpretation der Daten erheblich erschwert, da das Adrenozeptorsystem bereits durch geringfügige Veränderungen erheblich beeinflußt werden kann [91, 372, 487]. In der hier vorliegenden Arbeit wird erstmalig an normalen, humanen, epidermalen Keratinozyten unter definierten, reproduzierbaren, serumfreien Kulturbedingungen die basale Adrenozeptordichte und ihr dynamisches Regulationsverhalten nach Inkubation mit definierten Substanzen untersucht. Die Kultivierung der NHK erfolgte in der vorliegenden Arbeit nach einem von Boyce und Ham [35] etablierten, serumfreien Verfahren. In ihrer Morphologie, Zellkinetik, Passagenzahl und endlichen Lebensdauer entsprechen die hier verwendeten NHK (s. 2.1.4., S. 23; s. 3.1., S. 36) den von Boyce und Ham beschriebenen Keratinozytenkulturen. Durch den niedrigen Calciumgehalt des Mediums (ca. 0,09 mM) wird die keratinozytäre Proliferationsrate erhöht, ihre Differenzierung verzögert sowie das Wachstum kontaminierender Fibroblastenwucherungen unterdrückt. Die Zellen ähneln basalen bis suprabasalen Zellen [36, 454] und reagieren auf Differenzierungsstimuli, wie z.B. den Calciumgehalt des Mediums, was sie deutlich von permanenten Zelllinien unterscheidet und ihren repräsentativen, epidermalen Charakter unterstreicht. In Kultur sind distinkte, klare Zellgrenzen und weite Interzellularräume (Abb. 5, S. 37) erkennbar, die aufgrund der geringen Desmosomendichte basaler, undifferenzierter Zellen entstehen [246, 325, 378, 541]. In ihrer Morphologie, ihrem Proliferations- und

Differenzierungsverhalten ähnelt das unter diesen Kulturbedingungen etablierte Zellsystem hyperproliferativen, kaum bzw. nicht differenzierten Keratinozyten. Es wird vielfach als Modellsystem für die germinative Schicht (Stratum basale) oder hyperproliferative Hauterkrankungen, wie z.B. die Psoriasis vulgaris, verwendet [36, 454, 524, 549]. Im Gegensatz zu permanenten Zelllinien setzen sich primäre Keratinozytenkulturen jedoch aus einer heterogenen Zellpopulation zusammen. Wie die Analyse der unter 3.3., S. 41 dargestellten AR-Dichten und ihrer Standardabweichung belegt, weisen die Basalwerte Schwankungen auf, die auf diese Zellheterogenität zurückgeführt werden können.

Die Isolierung, Kultivierung und Expansion der NHK erfordert einen hohen technischen und zeitlichen Aufwand. Dieser erscheint jedoch gerechtfertigt, da NHK optimale Rahmenbedingungen für die Erfordernisse der Arbeit und die zu untersuchende Fragestellung bieten. Sie besitzen einen hohen repräsentativen Charakter für die Differenzierungs- und Proliferationskapazität der humanen Epidermis und erlauben unter definierten Kulturbedingungen und nach präziser Manipulation der Umgebung das Studium der dynamischen Adrenozeptorregulation. Dennoch stellen auch sie nur ein Modellsystem dar, in dem die epidermalen und dermalen Interaktionen auf ein Minimum reduziert und standardisiert wurden. Die komplexe Struktur der Epidermis, die eng mit der Dermis interagiert und neben den Keratinozyten auch Melanozyten, Langerhanszellen, T-Lymphozyten und Merkelzellen umfaßt, besitzt *in vivo* ein kompliziertes, in seinen Einzelheiten weitgehend ungeklärtes Geflecht aus interzellulärer Kommunikation und Interaktion. Dieses kann derzeit *in vitro* nicht annähernd imitiert werden, so daß alle, auch noch so an die Realität angelehnten Modelle, rudimentär bleiben müssen. Die Ergebnisse dieser Arbeit können deshalb nicht direkt auf die *in vivo*-Situation übertragen werden. Sie gewähren jedoch Einblick in die grundlegenden,  $\beta$ -adrenergen Regulationsvorgänge der Epidermis, tragen zum Verstehen der komplexen, epidermalen Differenzierungsvorgänge sowie ihrer Störungen bei und eröffnen möglicherweise neue therapeutische Optionen.

#### 4.2. Exprimierte $\beta_2$ -Adrenozeptordichte und -affinität auf unbehandelten Keratinozyten

Durch die Entwicklung von Radioliganden-Bindungstechniken in den 70er Jahren konnten adrenerge Rezeptoren erstmals direkt an einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden [414]. RL-Bindungstechniken erlauben es, Adrenozeptoren unter variierenden Konditionen, die von physiologischem und pathophysiologischem Interesse sind, zu quantifizieren, charakterisieren, lokalisieren und hinsichtlich ihrer dynamischen Regulation zu studieren. Sie gewähren Einblick in die Mechanismen, über die endogene Katecholamine und andere Hormone die Zahl der Adrenozeptoren und die adrenerge Gewebesensitivität kontrollieren [47, 90, 289, 350, 359, 465].

Die Radioliganden-Bindungsstudien wurden in der vorliegenden Arbeit nicht, wie sonst üblich, an Membranpräparationen [113, 318], sondern an intakten Keratinozyten durchgeführt, da an der Regulation der exprimierten Adrenozeptordichte zelluläre Vorgänge beteiligt sind (z.B. Rezeptortranslokation; s. 4.3.1., S.88), die auf eine erhaltene Zellintegrität und ein ungestörtes intrazelluläres Milieu angewiesen sind [47, 113, 352, 359]. Bei der Membranpräparation können durch den Aufbruch der Zellhülle intrazellulär lokalisierte, biologisch inaktive Adrenozeptoren freigesetzt und über den Radioliganden detektiert werden. Daneben kann das unphysiologische Vorgehen während der Membranpräparation die Rezeptordichte und -konfiguration, einschließlich der Ligandenbindungsstelle, und somit die spezifische RL-Bindung verändern [113, 280, 359, 445]. Bindungsstudien an intakten Zellen sind durch eine hohe unspezifische Bindung belastet, weshalb üblicherweise Membranpräparationen vorgezogen werden [Übersichtsartikel: 106, 113, 280, 318, 350, 445]. Zu den unspezifischen Bindungen werden sämtliche Bindungsstellen des Radioliganden gerechnet, die nicht an den spezifischen Rezeptor, sondern z.B. an Proteine, Lipide, Glykane, Zellmembranbestandteile und Versuchsmaterialien (u.a. Filterpapier, Glasflächen) binden sowie die Menge des freien, nicht effektiv ausgewaschenen RL [24, 414]. Ursächlich für die hohe unspezifische Bindung an intakten Zellen ist jedoch die unspezifische Anreicherung lipophiler Radioliganden im Zytosol oder in intrazellulären Kompartimenten (sog. „non-receptor-related ligand trapping“), von wo ein spezifisch an den Rezeptor bindender

Kompetitor, mit dessen Hilfe die unspezifische Bindung ermittelt werden kann (s. 2.3.1., S. 25), den RL nicht wie sonst üblich verdrängen kann [280, 318].

Dieses Problem konnte durch die Verwendung des hydrophilen Radioliganden (-)-[<sup>3</sup>H]-CGP-12177 überwunden werden. Aufgrund seiner Hydrophilie kann dieser nicht in das Zellinnere diffundieren, wo er akkumulieren und zu falsch hohen Meßwerten führen kann [8, 469]. Die in der vorliegenden Arbeit niedrige unspezifische Bindung, die im einfachen  $K_D$ -Bereich stets unter 10% der Gesamtbindung lag und mit Werten anderer Studien vergleichbar ist [8, 304, 465, 469, 476], bestätigt diese Arbeitshypothese.

Ferner bindet [<sup>3</sup>H]-CGP-12177 selektiv nur die auf der Zelloberfläche exprimierten und damit biologisch aktiven Adrenozeptoren, während lipophile RL auch internalisierte Adrenozeptoren spezifisch binden und die Zahl biologisch aktiver AR fälschlicherweise erhöhen [8, 87, 113, 265, 469].

[<sup>3</sup>H]-CGP-12177 ist ein nicht-selektiver, reversibel-kompetitiv bindender Adrenozeptor-Antagonist, der im verwendeten Konzentrationsbereich, im Unterschied zu radioaktiv markierten Agonisten, keine merkliche partial agonistische Aktivität besitzt [469]. Er beeinflusst während der Inkubationszeit nicht die exprimierte Adrenozeptordichte, wie das für Experimente mit radioaktiv markierten Agonisten beschrieben wurde [359, 538].

Die spezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]-CGP-12177 an die  $\beta$ -Adrenozeptoren verläuft unter den gegebenen Versuchsbedingungen schnell, reversibel, sättigbar, hoch affin sowie zeit- und temperaturabhängig [8, 360, 440, 469, 476]. Die Dissoziationskonstante, als Maß für die Affinität des RL [<sup>3</sup>H]-CGP-12177 zum Adrenozeptor, wird in der Literatur mit ca. 0,04 bis 0,6 nM angegeben [8, 23, 75, 213, 331, 469, 473, 476]. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Dissoziationskonstante liegt mit 0,1272 nM  $\pm$  0,0544 (3.3., S. 41) im gleichen Größenordnungsbereich und kann als interne Kontrolle für die durchgeführten Sättigungsexperimente gewertet werden.

Die Inkubation der Keratinozyten mit dem Radioliganden in aufsteigender Konzentration wurde bis zu einer Konzentration von 8,0 nM, die dem ca. 60-fachen Wert der Dissoziationskonstanten entspricht, durchgeführt. Erst eine RL-Konzentration vom 10-fachen der Dissoziationskonstanten (hier ca. 1,2 nM), bei der über 90% der Rezeptoren spezifisch gebunden werden, erlaubt eine aussagekräftige Extrapolation auf



den theoretisch nicht erreichbaren 100%igen Sättigungswert, der die Adrenozeptorzahl ( $B_{\max}$ ) repräsentiert [415, 445].

Nach Transformation der Daten in den Hofstee-Plot erhält man einen linearen Verlauf der Datenpunkte, der für eine homogene Rezeptorpopulation charakteristisch ist [47, 200, 350, 352, 415]. Dieses Ergebnis stimmt mit zahlreichen anderen Studien an epidermalen Keratinozyten überein, die über eine homogene  $\beta_2$ -Adrenozeptorpopulation berichten [87, 104, 154, 380, 476, 478, 480, 485]. Im Gegensatz dazu exprimieren andere Gewebearten, wie z.B. Lunge und Herz, ein heterogenes  $\beta_1/\beta_2$ -Verteilungsmuster [81, 165, 372, 487]. Die physiologische Bedeutung dieses homogenen, epidermalen Rezeptormusters ist derzeit noch nicht geklärt.

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Sättigungsexperimenten kann die aktuelle Adrenozeptordichte und -affinität erfaßt werden. Die Analyse von 86 Kulturen der 2. ( $n = 62$ ) und 3. Passage ( $n = 24$ ) ergab eine durchschnittliche, spezifische RL-Bindung von  $414 \pm 69,1 \text{ fmol}/10^7$  Zellen, entsprechend  $24935 \pm 4162$  exprimierten Adrenozeptoren/Zelle und eine Dissoziationskonstante von  $0,1272 \pm 0,0544 \text{ nM}$  (s. 3.3., S. 41). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der 2. und 3. Passage ermittelt werden. In diesen frühen Passagen, in denen sich die Zellen hinsichtlich ihrer Vitalitätsparameter und Morphologie kaum unterscheiden [35, 36], scheint auch die exprimierte Adrenozeptordichte und -affinität unverändert zu sein.

NHK in Kultur reflektieren das Alter und die Vitalität des Spenders und durchlaufen in ihrer begrenzten Passagenzahl im Zeitraffer dessen gesamten Alterungsprozeß, wobei NHK alter Spender bereits in den Anfangspassagen einen progressiven Verlust der proliferativen Kapazität und Vitalität sowie eine deutlich verringerte Gesamtpassagenzahl aufweisen [12, 159].

Es ist bekannt, daß der senile Mensch eine erniedrigte Adrenozeptordichte exprimiert [444, 528]. Ob NHK junger Spender in höheren, seneszenten Passagen bzw. NHK seniler Spender bereits in frühen Passagen eine erniedrigte Adrenozeptordichte aufweisen, bleibt zu klären. Da auch die physiologische Regulation des adrenergen Systems im Alter verändert sein kann, wurde in der vorliegenden Arbeit nur Haut von Knaben im Alter von 0 bis 15 Jahren verwendet. Diese Selektion gewährleistet ein relativ homogenes Spendermaterial. Dieses wurde im Verlauf einzeln kultiviert, um Aussagen

über einen möglichen Zusammenhang zwischen Spender und  $\beta$ -adrenergen Bindungscharakteristika machen zu können. Während die Analyse von Kulturen eines Spenders der gleichen Passage sehr ähnliche Werte ergab, wiesen die Kulturen verschiedener Spender Wertschwankungen auf (s. 3.3., S. 41). Aus der Literatur ist bekannt, daß verschiedene Populationen kultivierter Keratinozyten eine morphologische und biochemische Heterogenität aufweisen [13]. Die Standardabweichung, die die Variabilität zwischen den verschiedenen Spendern reflektiert [404], liegt hier mit  $\pm 4162$  AR/Zelle bei 17% des Mittelwertes (24935 AR/Zelle (s. 3.3., S. 41)) und somit im gleichen Größenordnungsbereich wie in anderen Studien an humanen NHK oder Hautpräparationen [57, 480, 482]. Permanente Zelllinien, die in ihrer Zusammensetzung im Vergleich zu NHK homogener strukturiert sind [179, 503], liefern meist reproduzierbarere Werte, was an einer deutlich geringeren Standardabweichung (ca. 7%) ersichtlich ist [265, 473, 476].

Aufgrund der interindividuell schwankenden AR-Ausgangswerte der hier verwendeten NHK, die die zu beobachtende Inkubationsveränderung verschleiern könnten, wurden die einzelnen Inkubationsversuche nur an Zellen der gleichen Kultur und Passage durchgeführt und hinsichtlich ihrer AR-Veränderung miteinander verglichen. Ausgehend von den variablen Basiswerten der einzelnen Kulturen wurde die relative Veränderung der AR-Dichte nach Inkubation berechnet, die exakter als die absolute Veränderung die dynamische Regulation charakterisiert.

Die variable, individuelle Adrenozeptordichte und adrenerge Geweberesponsivität, die den adrenergen Status des jeweiligen Spenders reflektiert, wurde auch von anderen Autoren an epidermalen sowie nicht epidermalen Gewebepräparaten und kultivierten Zellen humaner oder tierischer Spender beobachtet [169, 359, 362, 376, 404, 446, 503, 558]. Insbesondere homogenisierte Gewebepräparationen ex vivo weisen deutlich schwankende Werte auf, wobei die adrenerge Sensitivität von Gewebepräparationen eines einzigen Spenders sowohl vom Zeitpunkt als auch den Entnahmeumständen bestimmt wird [233, 243, 362, 503]. Dies ist vermutlich auf die aktuelle Beeinflussung des Adrenozeptorsystems durch physikalische und emotionale Stimuli, wie z.B. Erregung, körperliche Anstrengung, Kälte und lokale Ischämie, sowie die tageszeitliche Fluktuation endogener Hormone zurückzuführen [93, 243, 376, 446, 564]. Die

exprimierte Adrenozeptordichte unterliegt innerhalb weniger Sekunden bis Minuten deutlichen Schwankungen [296, 303, 565] und kann somit den durch Streß veränderten, aktuellen adrenergen Status des Spenders reflektieren.

Eine direkte, quantitative Charakterisierung der  $\beta$ -Adrenozeptordichte auf humanen, epidermalen Keratinozyten erfolgte bisher nur in wenigen Studien [57, 153, 154, 480]. Mit durchschnittlich 24935 exprimierten Adrenozeptoren pro Zelle (s. 3.3., S. 41) liegt die in dieser Arbeit ermittelte Adrenozeptordichte über den bisher nachgewiesenen Konzentrationen: In Membranpräparationen von Keratinozyten, deren Kultivierung in Fibroblasten-Kokultursystemen unter Zusatz von Hydrokortison und Choleratoxin erfolgte, wurden Radioligandenbindungen, die die exprimierte AR-Konzentration repräsentieren, von 280 fmol/mg Membranprotein (entsprechend 7000 AR/Zelle) beschrieben. Hingegen wurde in Präparationen von Keratinozyten, die unter serumfreien Bedingungen kultiviert wurden, 94 fmol/mg Membranprotein und in Gewebehomogenisaten 80 fmol/mg Membranprotein detektiert [57, 153, 154, 155, 480].

Die Adrenozeptorkonzentration auf Schweinekeratinozyten wird in der Literatur mit ca. 400 AR/Zelle angegeben [7] und liegt deutlich unter den bisher nachgewiesenen Adrenozeptordichten auf humanen Keratinozyten. Bekanntlich ist in der Schweineepidermis das epidermale  $\beta$ -Adrenozeptorsystem im Vergleich zum histaminergen System schwach ausgebildet und spielt nur eine untergeordnete Rolle in der Signaltransduktion [227, 235]. Dies scheint sich in der exprimierten AR-Dichte widerzuspiegeln und stellt die Übertragbarkeit von Untersuchungsergebnissen an tierischen Modellsystemen auf den Menschen in Frage.

Die Adrenozeptordichte in permanenten, epidermalen Zelllinien weist mit Werten zwischen ca. 7000 AR/Zelle (HaCaT), 40000 AR/Zelle (HEL) und 30000 bis 50000 AR/Zelle (A431) die größte Spannbreite auf [87, 213, 265, 476]. Diese erheblich voneinander abweichenden Werte können Ausdruck der unterschiedlich veränderten Differenzierungskapazität permanenter Zelllinien sein, da Adrenozeptoren als wichtige Regulatoren der epidermalen Proliferation und Differenzierung gelten [66, 89, 140].

In weiteren Studien an Mensch- oder Nagerepidermis konnte zwar die Existenz epidermaler  $\beta$ -Adrenozeptoren nachgewiesen werden, eine quantitative Auswertung war aber in diesen Studien aufgrund des methodischen Ansatzes oder technischer

Schwierigkeiten (z.B. hohe unspezifische Bindung) nicht oder nur semiquantitativ möglich [104, 245, 380, 440, 461, 504].

Ein direkter Vergleich der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichten aus den hier dargestellten Studien kann aufgrund der unterschiedlichen Modellsysteme (Gewebepräparat *ex vivo* vs. kultivierte Keratinozyten *in vitro*), Zellarten (Mensch vs. Tier; normal vs. immortalisiert), Kulturbedingungen (Additiva, Kokultursystem) sowie der Präparations- und Nachweistechniken im experimentellen Ansatz (intakte Zellen vs. Membranpräparation; physikochemische Eigenschaften des Radioliganden) nur eingeschränkt durchgeführt werden. Desweiteren erweist sich die Umrechnung von fmol RL/mg Membranprotein auf AR/Zelle als problematisch, da die Konzentration pro mg Membranprotein in direkter Korrelation zur Zelloberfläche steht [217] und über Sekundärphänomene verändert werden kann [445].

Die hohe Adrenozeptordichte in der hier vorliegenden Arbeit ergibt sich möglicherweise aus dem methodischen Ansatz der Arbeit. Keratinozyten, die in einer niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kultiviert wurden, ähneln morphologisch und im exprimierten Keratinmuster basalen bis suprabasalen Zellen [36, 454]. Von diesen unreifen Zellen ist bekannt, daß sie im Vergleich zu differenzierten Zellen höherer Epidermislagen über ein funktionell aktiveres  $\beta$ -Adrenozeptorsystem verfügen (erhöhte Adrenozeptordichte, Adenylatcyclaseaktivität und korrespondierender cAMP-Gehalt) [6, 169, 249, 312, 440, 441, 443, 506], mit dessen Hilfe sie die komplizierten und fein abgestimmten Vorgänge der Proliferation und Differenzierung regulieren können. Im Vergleich zu einem Epidermishomogenisat, in dem Keratinozyten aller Epidermisschichten in unterschiedlichem Ausmaß vorkommen, sind in dem hier verwendeten Kulturmodell die basalen, mit einer hohen AR-Dichte ausgestatteten Keratinozyten überrepräsentiert und spiegeln nicht die durchschnittliche Adrenozeptordichte der gesamten Epidermis wider.

Ferner verfügt die intakte Epidermis über ein sekretorisches Potential [172, 349] und synthetisiert endogene Katecholamine, deren Konzentration im Größenordnungsbereich von ca. 40 bis 300 fmol/mg Protein liegt [439, 441, 443]. Keratinozyten *in vivo* werden auf autokrinen, parakrinen und endokrinen Weg in ihrem adrenergen Status beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit wurden die NHK jedoch unter artefiziellen Bedingungen kultiviert, die ihnen zwar optimale Wachstumsbedingungen bieten, aber nur

eingeschränkt das interstitielle Milieu der Epidermis imitieren. Da dem Medium keine Katecholamine zugesetzt sind, befinden sich die NHK in einem Zustand der Supersensitivität, der u.a. zu einer Erhöhung der exprimierten Adrenozeptordichte führt [200, 292, 350, 359, 487]. Dies erklärt die hier nachgewiesene hohe  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte gegenüber Studien an ex vivo Gewebepräparationen oder Keratinozyten, die in serumhaltigem und somit auch katecholaminhaltigem Medium kultiviert wurden. Insbesondere letztere unterliegen aufgrund einer evtl. unphysiologisch hohen Katecholaminkonzentration einer partiellen Desensibilisierung und exprimieren infolgedessen eine reduzierte Adrenozeptordichte [91].

Unter der Annahme, daß kultivierte Keratinozyten den Zustand des Spenders und damit auch seinen adrenergen Status widerspiegeln, kann in der hier vorliegenden Arbeit auch das durchweg jugendliche Alter der Spender Einfluß auf die nachgewiesene hohe Adrenozeptordichte haben [12, 159, 444, 528].

Ebenso dürfte auch das technische Vorgehen die höhere AR-Dichte im Vergleich zu anderen Untersuchungen an humanen Keratinozyten bzw. Epidermispräparaten [57, 153, 154, 155, 480] erklären. Es ist bekannt, daß in Membran- und Gewebepräparationen einerseits aufgrund der aggressiven Prozedur, andererseits aufgrund von Kontaminationen mit nicht keratinozytären,  $\beta$ -AR-armen Zellen und dermalen Fasern, die Adrenozeptordichte erniedrigt werden kann [113, 280, 359, 445, 480].

Letztendlich dürfte aber die hier nachgewiesene exprimierte Adrenozeptordichte von 24935 AR/Zelle nicht die tatsächliche in vivo-Situation repräsentieren. Leider existieren, soweit bekannt, noch keine Studien, in denen an Epidermispräparaten ex vivo die genaue Adrenozeptordichte pro Zelle bestimmt wurde. In den bisherigen Studien wurde die AR-Konzentration in fmol RL/mg Membranprotein angegeben [476, 480]. Diese Konzentrationsangabe erlaubt jedoch, wie zuvor erläutert (s. S. 86), keine direkte Umrechnung auf die exprimierte Adrenozeptordichte pro Zelle und erschwert somit einen direkten Vergleich. Auch ein Vergleich mit den bekannten AR-Konzentrationen in anderen Geweben, wie z.B. Herz, Lunge, Gehirn, Fettzellen und Leukozyten (s. 1.4.2., S. 13), kann aufgrund der unterschiedlichen Modellsysteme und technischen Verfahren nur unter Vorbehalt erfolgen. Ein Rückschluß von der Höhe der exprimierten AR-Dichte auf den relativen Bedeutungsgrad des Adrenozeptorsystems ist zwar nicht

uneingeschränkt zulässig. Dennoch ist erkennbar, daß kultivierte NHK  $\beta_2$ -Adrenozeptoren in einer Dichte exprimieren, die unter bestimmten Konditionen, möglicherweise durch Aktivierung von Regulationsmechanismen, dermaßen erhöht ist, daß sie die bisher nachgewiesenen Werte anderer Gewebearten, wie z.B. Herz, Lunge und Fettgewebe etc., deutlich überschreitet [39, 106, 141, 183, 217, 281, 402].

#### 4.3. Dynamische Regulation der exprimierten $\beta_2$ -Adrenozeptordichte und -affinität

##### 4.3.1. Inkubation mit dem $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten Isoprenalin

Aus Untersuchungen am kardiopulmonalen System ist seit langem bekannt, daß ein inverses Verhältnis zwischen der aktuellen Katecholaminkonzentration und der exprimierten Adrenozeptordichte bzw. Stimulierbarkeit des Adenylatcyclase-cAMP-Systems besteht: Ein Anstieg des Katecholaminspiegels führt zu einer konsekutiven Abnahme der Adrenozeptordichte bzw. zu einer Reduktion der Gewebesensitivität (Desensibilisierung), während ein sinkender Katecholaminspiegel eine Zunahme der Adrenozeptordichte bzw. erhöhte Sensitivität (Hypersensitivität) bewirkt (sog. regulatorisches „feedback“-System) [164, 165, 192, 292, 350, 372, 511].

Die Desensibilisierung, in der Pharmakologie auch Tachyphylaxie oder Toleranz genannt, ist ein allgemeines biologisches Phänomen, welches der Signaltransduktionsregulation dient [292, 359]. Trotz fortbestehenden oder wiederholten Stimulus wird die ausgelöste Zellantwort mit dem Ziel der Adaptation an die veränderten Umstände kontinuierlich reduziert. In der Pharmakologie stellt dies ein häufig unerwünschtes Problem in der Langzeittherapie zahlreicher Erkrankungen dar, welches die therapeutische Effizienz der Katecholamine erheblich limitiert [151, 278, 544].

Bei der Desensibilisierung AC-gekoppelter  $\beta$ -Adrenozeptoren sind 2 verschiedene Formen beteiligt, die homologe und die heterologe Desensibilisierung. Im Rahmen der homologen (Agonist-spezifischen) Desensibilisierung wird die adrenerge Gewebesensitivität über spezifisch bindende Agonisten oder Antagonisten reguliert, während sie bei der heterologen (Agonist-unspezifischen) Desensibilisierung über Substanzen

gesteuert wird, die nicht direkt an den  $\beta$ -Adrenozeptor binden, sondern Rezeptorsystem übergreifend agieren, d. h. diese Substanzen, wie z.B. Forskolin, Fluorid-Ionen und Prostaglandine, vermögen verschiedene Rezeptorsysteme in ihrer Funktion zu beeinflussen, obwohl sie nicht spezifisch an diese Rezeptoren binden [47, 289, 291, 292, 296, 372, 388, 456, 457, 487, 495, 496].

Am Desensibilisierungsprozeß des  $\beta$ -Adrenozeptorsystems, der insbesondere an Lungen- und Blutzellen intensiv untersucht wurde, sind 3 verschiedene Prozesse beteiligt [208, 296, 303, 387]:

1. Durch eine Phosphorylierung des Adrenozeptors wird die Entkopplung des G-Proteins vom Rezeptor eingeleitet. Diese setzt innerhalb weniger Sekunden bis Minuten ein (sog. „short-term desensitization“) und ist mit einer Abnahme der Rezeptoraffinität und AC-Stimulierbarkeit verbunden [25, 26, 192, 296, 303, 463, 491, 495, 496, 565]. Verantwortlich für die Phosphorylierung von Threonin-, Tyrosin- und Serinresten im Bereich des intrazellulär gelegenen C-terminalen Endes sind die c-AMP-abhängige Proteinkinase A, die auch im Rahmen der heterologen Desensibilisierung aktiv werden kann, und eine c-AMP-unabhängige  $\beta$ -Adrenozeptor-Kinase ( $\beta$ ARK), welche über eine Konformationsänderung des AR aktiviert wird (sog. Substratmodifikation), lediglich Agonist-besetzte AR phosphoryliert und somit nur in die homologe Desensibilisierung involviert ist. Während die Proteinkinase A bereits bei einer geringen Agonistenkonzentration im nanomolaren Bereich stimuliert wird und bei einer Rezeptorbelegung von nur 10% bereits maximal aktiviert ist (Halbwertszeit (TH  $\frac{1}{2}$ ) der AR-Phosphorylierung ca. 2 min), benötigt die  $\beta$ ARK hohe Agonistenkonzentrationen im mikromolaren Bereich, was mit einer Belegung nahezu aller Rezeptoren einhergeht (TH  $\frac{1}{2}$  der AR-Phosphorylierung < 20 s) [27, 195, 295, 296, 303, 428, 456, 457, 492]. Der Prozeß der AR-Phosphorylierung ist innerhalb von Minuten reversibel (TH  $\frac{1}{2}$  3 min) [565].
2. Es schließt sich eine Sequestration des phosphorylierten und somit entkoppelten Adrenozeptors an, die ebenfalls innerhalb von Sekunden bis Minuten einsetzt, ihr Maximum nach ca. 15 Minuten erreicht und nach 30 Minuten abgeschlossen ist (TH  $\frac{1}{2}$  10 min) [195, 303, 428, 565]. Dies führt zu einer Verlagerung des Adrenozeptors in intrazelluläre Kompartimente (sog. Internalisierung), in denen er

weder durch Agonisten aktiviert noch an das G-Protein gekoppelt werden kann. Der mittels Endozytose internalisierte Rezeptor besitzt eine spezifische Phosphataseaktivität und wird nach der Dephosphorylierung rasch in die Zellmembran integriert und resensibilisiert (TH  $\frac{1}{2}$  3 min). Eine de-novo-Synthese des Adrenozeptors findet während des Resensibilisierungsprozesses nicht statt [67, 68, 191, 192, 291, 296, 303, 304, 331, 344, 363, 364, 455, 464, 492, 496, 565].

3. Zum Schluß folgt eine „down-regulation“, die erst nach Stunden einsetzt ( $> 1$  h; sog. „long-term-desensitization“) und zu einem Verlust an Bindungsstellen führt. Dies kann durch eine Degradation (z.B. irreversibler, proteolytischer Abbau des Adrenozeptors) oder verminderte Genexpression bzw. Verkürzung der m-RNA-Halbwertszeit erfolgen [34, 74, 180, 296, 331, 345, 363, 364]. Eine Rückkehr zur ursprünglichen Rezeptorkonzentration ist mit einer Steigerung der Proteinsynthese verbunden und benötigt mehrere Tage [195, 216, 453, 496].

In der hier vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß normale, humane Keratinozyten, entsprechend anderen Zell- bzw. Gewebearten, dem Desensibilisierungsprozeß unterliegen. Dazu wurden die Keratinozyten mit (-)-Isoprenalin, dem physiologisch potentesten, rein  $\beta$ -mimetischen Adrenozeptor-Agonisten [278, 380], inkubiert und die konzentrations- bzw. zeitabhängige Veränderung der Adrenozeptordichte und -affinität studiert (s. 3.5.1., S. 45). Die Bestimmung der Dosis-Wirkungskurve erfolgte über einen Konzentrationsbereich von  $10^{-9}$  bis  $10^{-4}$  mol/l Isoprenalin. Zur Bestimmung der Zeit-Wirkungskurve wurde Isoprenalin in einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l verwendet. Bei dieser auch physiologisch vorkommenden, hohen Katecholamin-konzentration [303, 404, 530] kommt es zu einer optimalen Aktivierung der Adenylatcyclase und Signaltransduktion [233, 380, 402, 564].

Der initiale Schritt im Rahmen der Desensibilisierung, die Rezeptorkoppelung, ist in den bisher untersuchten Zellsystemen (vorwiegend Blut- und Herzzellen) innerhalb der ersten Minuten nach Inkubationsbeginn an einer Abnahme der Rezeptoraffinität gegenüber Agonisten zu erkennen und nach 30 Minuten abgeschlossen [88, 129, 144, 217, 270, 291, 331, 359, 399, 400, 463, 464, 487]. Die Wandlung des „high-affinity“-Rezeptorstatus zum „low-affinity“-Status ( $K_D$  im nanomolaren bzw. mikromolaren



Konzentrationsbereich [270, 292, 331]) ist nach Meinung einiger Autoren ein Agonist-spezifisches Phänomen und kann gegenüber Antagonisten nicht beobachtet werden. Diese werden trotz erfolgter Phosphorylierung und Desensibilisierung des Adrenozeptorsystems mit gleichbleibender Affinität ( $K_D$  im nanomolaren Konzentrationsbereich) gebunden [219, 270, 292, 304, 331, 492, 496]. Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen anderer Autoren, die eine Änderung des Affinitätszustandes auch Antagonisten gegenüber verzeichnen konnten [213, 525].

Da in der hier vorliegenden Arbeit ein Antagonist als Radioligand verwendet wurde, ist fraglich, ob die Entkoppelung, der erste Schritt des Desensibilisierungsprozesses, erfaßt werden kann. Die Beobachtung, daß während des 24-stündigen Desensibilisierungsprozesses, und insbesondere während der ersten 30 Minuten der Isoprenalininkubation, keine Affinitätsabnahme gegenüber dem verwendeten Radioliganden zu verzeichnen war (s. 3.5.1.2., S. 47), läßt nicht den Schluß zu, daß auch gegenüber Agonisten keine Affinitätsänderung eintritt. Hier können weiterführende Untersuchungen, wie z.B. kompetitive Verdrängungsexperimente mit Agonisten, zur Klärung beitragen [331, 359]. Die weiteren Schritte im Desensibilisierungsprozeß, die Rezeptorinternalisierung und „down-regulation“, werden beide durch eine erniedrigte, exprimierte AR-Dichte charakterisiert und unterscheiden sich nur durch das Vorhandensein bzw. den Verlust internalisierter Rezeptoren. Beide Vorgänge lassen sich in der hier vorliegenden Arbeit aufgrund des verwendeten, hydrophilen Radioliganden, der nur die exprimierten Adrenozeptoren erfaßt, nicht unterscheiden.

Überraschenderweise ist in der hier vorliegenden Arbeit während der Isoprenalininkubation nach 10 bis 30 Minuten nicht eine unveränderte Adrenozeptordichte oder gar Rezeptorverminderung um 30 bis 50% (z.T. bis maximal 85%), wie sie von zahlreichen Untersuchern beschrieben wurde [144, 265, 304, 428, 492], sondern eine transiente, signifikante Erhöhung der Adrenozeptordichte um 18% nachzuweisen (s. 3.5.1.2., S. 47). Erst nach 30 bis 60 Minuten fällt diese auf das Ausgangsniveau und während des 24-stündigen Zeitverlaufes auf 19% des Kontrollwertes ab. Eine ähnliche, biphasische Veränderung der Adrenozeptordichte wurde auch an Leukozyten beobachtet. Sowohl eine kurzfristige Exposition mit physiologisch hohen Dosen  $\beta$ -adrenerger Agonisten als auch körperliche Arbeit, die mit einer 4- bis 6-fachen Erhöhung der endogenen

Katecholaminkonzentration einhergeht, führten innerhalb von 15 bis 30 Minuten zu einer transienten Erhöhung der exprimierten Adrenozeptordichte um 55 bis 100%, der nach 30 bis 120 Minuten eine AR-Erniedrigung unter den Ausgangswert folgte [41, 50, 283, 288, 315, 515]. Die genauen Mechanismen auf molekularer Ebene sind unklar. Einerseits wird angenommen, daß die Veränderung der AR-Dichte lediglich eine Rekrutierung von Leukozyten mit hoher Adrenozeptordichte in den zirkulierenden Zellpool reflektiert [288], andererseits wird vermutet, daß die ansteigende Katecholaminkonzentration eine enzymatische Methylierung von Phospholipiden induziert, die wiederum kryptische Adrenozeptoren demaskieren [41, 493]. Erst kürzlich konnte nachgewiesen werden, daß eine adrenerge Stimulation die Transkription des  $\beta_2$ -Adrenozeptorgens in Muskelzellen initial steigern kann [73, 74]. Über ein „cAMP responsive element“ (CRE; Sequenz: GTACGTCA [74, 117, 118]) in der 5'-flanking Promotorregion des Gens wird innerhalb weniger Minuten der  $\beta_2$ -AR-mRNA-Spiegel um das 3- bis 5-fache erhöht. Dieser Anstieg resultiert aus einer direkten transkriptionalen Stimulation des  $\beta_2$ -AR-Gens und nicht aus einer Beeinflussung der mRNA-Halbwertszeit. Des weiteren konnte nachgewiesen werden, daß die neu synthetisierten Transkripte effizient translatiert werden. Die Erhöhung des mRNA-Spiegels, die zu einer positiven Wirkungsverstärkung führt, ist nur vorübergehender Natur und wird nach einer prolongierten Agonistenexposition von einem „down-regulation“-Muster abgelöst, das durch eine Verkürzung der mRNA-Halbwertszeit und konsekutiven Reduktion der Adrenozeptordichte charakterisiert wird. Welcher Mechanismus letztlich für die in der vorliegenden Arbeit beobachtete initiale Erhöhung der Adrenozeptordichte verantwortlich ist, bleibt offen. Hier können weiterführende Studien auf molekularer Ebene zur Klärung des Sachverhaltes beitragen.

Der 2. Schritt der Desensibilisierung, die Rezeptorinternalisierung, läßt sich hier, wie bereits zuvor erläutert, aufgrund der physikochemischen Eigenschaften des verwendeten Radioliganden nicht vom Prozeß der „down-regulation“ unterscheiden, da in beiden Fällen die Zahl der exprimierten und somit nachweisbaren, biologisch aktiven  $\beta$ -Adrenozeptoren erniedrigt ist.

Der Verlauf der Zeit-Wirkungskurve (s. 3.5.1.2., S. 47) mit einem raschen Abfall der Adrenozeptordichte um 28% innerhalb der ersten Stunde, einem kurzfristigen Plateau

nach 1 bis 2 Stunden und einem anschließenden, erneuten, aber langsameren Abfall nach ca. 3 Stunden, setzt sich vermutlich aus 2 Komponenten zusammen: Die rasch einsetzende Rezeptorinternalisierung scheint innerhalb von ca. 60 Minuten abgeschlossen zu sein und wird nach ca. 2 bis 3 Stunden von dem „down-regulation“-Prozeß abgelöst, der zu einer weiteren AR-Abnahme auf 19% des Kontrollwertes führt. Der „down-regulation“-Prozeß verlangsamt sich im Verlauf und die AR-Dichte scheint sich, unter Berücksichtigung der Daten aus den 24-stündigen Isoprenalininkubationsversuchen (s. 3.5.1.1., S. 45 und 3.5.5., S. 57), einem Plateau von ca. 20 bis 30% des Ausgangsniveaus zu nähern. Selbst nach langfristiger Agonistenexposition (> 24 h) scheint noch eine basale AR-Konzentration aufrechterhalten zu werden.

Diese biphasische Abfolge stimmt mit den bisher bekannten Daten aus Studien an Herz-, Hirn- und Blutzellen weitgehend überein: Während der Internalisierungsprozeß innerhalb weniger Minuten einsetzt, nach 30 bis 60 Minuten abgeschlossen ist (Halbwertszeit ca. 10 Minuten) und zu einer Erniedrigung der Adrenozeptordichte um 30 bis 50% führt [303, 331, 428, 468, 469, 492, 565], setzt die „down-regulation“ erst nach mehrstündiger (> 1 h) Agonistenexposition ein und kann nach 24 Stunden zu einer 40 bis 80 %igen Erniedrigung der AR-Dichte in vitro führen [144, 303, 331, 344, 551].

Die „down-regulation“ ist Folge verschiedener Prozesse auf molekularer Ebene, die nicht zu einer Rezeptorverlagerung, sondern -verminderung führen. Neben einer herabgesetzten Translationsrate, die bei unveränderter Gentranskription aus einer Destabilisierung der mRNA (Verkürzung der Halbwertszeit von 12 h auf 5 h) mit konsekutiver, zeit- und dosisabhängiger Erniedrigung der mRNA um ca. 50% resultiert [180, 182] und zu einer verminderten AR-Syntheserate führt [73, 74, 180, 182, 317], müssen aufgrund des frühen Beginns auch aktive Abbauvorgänge beteiligt sein, die eine proteolytischen Degradation des Adrenozeptors bewirken, da die natürliche Halbwertszeit des exprimierten  $\beta$ -Adrenozeptors bei 24 bis 30 Stunden liegt [141].

Die in der hier vorliegenden Arbeit ermittelten Werte der Zeit-Wirkungskurve stimmen mit den bisher bekannten, zuvor zitierten Ergebnissen weitgehend überein, wobei hier der initiale Internalisierungsprozeß durch die transiente AR-Erhöhung zunächst maskiert bzw. verzögert wird. Die in allen Studien leicht variierenden, prozentualen

AR-Änderungen und Zeitverläufe dürften Folge der unterschiedlichen Zellsysteme und methodischen Ansätzen sein.

Aus Studien an nicht epidermalen Zellsystemen ist bekannt, daß das  $\beta$ -adrenerge System nach Entfernung des desensibilisierenden Agens zur Rekonstitution befähigt ist. Nach kurzfristiger Agonistenexposition ( $< 1$  h; sog. „short-term desensitization“ = Entkoppelung und Internalisierung [195]) kehrt der Rezeptorpool innerhalb der nächsten 30 bis 60 Minuten zu einem Status zurück, in dem, eingeleitet durch eine Dephosphorylierung und konsekutive Membranreintegration der internalisierten Adrenozeptoren, eine vollständige Resensibilisierung, effektive Koppelung und Signaltransduktion erfolgen können [144, 195, 304, 331, 492]. Nach längerer Agonistenexposition ( $> 1$  h; sog. „long-term desensitization“ = „down-regulation“ [195]) setzt die Resensibilisierung, die mit einer Normalisierung des  $\beta$ -AR-mRNA-Spiegels und de-novo-Synthese der  $\beta$ -Adrenozeptoren einhergeht, ca. 24 Stunden nach Agonistenentzug ein und ist nach ca. 72 Stunden abgeschlossen [23, 144, 331, 389]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Teilaspekt des Resensibilisierungsprozesses untersucht. Nach 24-stündiger Inkubation mit Isoprenalin  $10^{-6}$  mol/l, die mit einer Erniedrigung der Adrenozeptordichte auf 22% des Kontrollwertes einhergeht und per definitionem der „long-term desensitization“ entspricht, kommt es nach weiteren 24 Stunden ohne Isoprenalinexposition zu einer Erhöhung der AR-Dichte auf 36% des Kontrollwertes (s. 3.5.5., S. 57). Es ist ersichtlich, daß NHK, entsprechend nicht epidermalen Zellsystemen, 24 Stunden nach Agonistenentzug eine beginnende, aber noch sehr unvollständige Rekonstitution des Adrenozeptorsystems aufweisen. Weitere Untersuchungen an intakten Keratinozyten sind erforderlich, um den zeitlichen Verlauf der kompletten Rekonstitution, insbesondere auch nach einer „short-term desensitization“, zu klären.

Der in vitro ermittelte Zeitverlauf der De- und Resensibilisierung an verschiedenen Zellsystemen ähnelt den Ergebnissen klinischer in vivo-Studien. Nach intravenöser Applikation von  $\beta$ -adrenergen Agonisten, wie z.B. Isoprenalin, Terbutalin und Ephedrin, nimmt die AR-Dichte innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 1 bis 10 Tagen um 30 bis 85% auf Erythrozyten, Leukozyten und Herzzellen ab und steigt nach Medikamentenkarenz innerhalb von 4 bis 7 Tagen wieder auf den Ausgangswert an [3, 150, 437, 521, 551].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die Erniedrigung der epidermalen  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte im Rahmen des Desensibilisierungsprozesses nach 24 Stunden weitgehend abgeschlossen zu sein scheint (s. 3.5.1.2., S. 47). Aus diesem Grunde sollte untersucht werden, ob die AR-Endkonzentration nach 24 Stunden zusätzlich noch einer Dosisabhängigkeit unterliegt.

Die 24-stündige Inkubation („long-term desensitization“ [195]) mit Isoprenalin in aufsteigender Konzentration von  $10^{-9}$  bis  $10^{-4}$  mol/l zeigt eine konzentrationsabhängige Erniedrigung der AR-Dichte (s. 3.5.1.1., S. 45). Eine Isoprenalinkonzentration im nanomolaren Bereich, die der Plasma-Katecholaminkonzentration entspricht [195, 303, 308], bewirkt im hier verwendeten, katecholaminfreien, hypersensibilisierten Zellkultursystem bereits eine signifikante Erniedrigung um 41%. Aber selbst eine Inkubation mit unphysiologisch hohen Isoprenalindosen ( $10^{-4}$  mol/l), die sogar im synaptischen Spalt nicht entstehen [303], führt nicht zu einer 100%igen, sondern nur 89%igen Erniedrigung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte. Die Kurve weist einen annähernd sigmoidalen Verlauf mit Sättigungscharakter auf, der sich asymptotisch einem Plateau von 11% des Ausgangswertes zu nähern scheint. Auch hier zeigt sich, daß ein basaler AR-Wert aufrechterhalten wird, über den möglicherweise lebenswichtige zelluläre Prozesse, wie z.B. der Energiebereitstellung [307], reguliert werden können.

Die Dissoziationskonstante  $K_D$ , als Maß für die Affinität des Rezeptors zum bindenden Radioliganden, weist nach 24-stündiger Isoprenalininkubation in keinem Konzentrationsbereich ( $10^{-9}$  bis  $10^{-4}$  mol/l) eine signifikante Änderung auf (s. S. 47). Dies schließt jedoch nicht eine Affinitätsänderung gegenüber bindenden Agonisten aus (s. S. 90/91).

Die hier ermittelten Werte stehen im Einklang mit Beobachtungen an Herzzellen, die frühestens bei einer Konzentration von  $10^{-9}$  mol/l Isoprenalin mit einer geringfügigen AR-Erniedrigung (<15%) reagierten. Bei einer Endkonzentration von  $10^{-6}$  mol/l bzw.  $10^{-5}$  mol/l Isoprenalin konnte an ihnen eine AR-Erniedrigung von bis zu 55% bzw. 65% nachgewiesen werden. Wie in der hier vorliegenden Arbeit konnte auch in diesen Studien keine signifikante Änderung der Dissoziationskonstanten ermittelt werden [304, 331].

Die an den Herzzellen beobachtete prozentual geringere Verminderung der AR-Dichte von 55% bzw. 65% resultiert möglicherweise daraus, daß die Zellen einerseits artspezifische Unterschiede im adrenergen Regulationsverhalten aufweisen (Herz- vs.

Hautzellen), andererseits unter Bedingungen kultiviert bzw. gewonnen wurden, die einen normalen bis desensibilisierten, adrenergen Status begünstigen (frische Zellpräparation, Zusatz von FKS). Im Vergleich zu den hier verwendeten, hypersensibilisierten NHK scheinen sie gegenüber adrenergen Stimuli unempfindlicher zu reagieren.

Hingegen konnte in einer Studie an undifferenzierten, in serumfreiem Medium kultivierten und hypersensibilisierten Keratinozyten, die unter ähnlichen Versuchsbedingungen wie in der hier vorliegenden Arbeit kultiviert wurden, eine vergleichbare, Isoprenalin-induzierte AR-Abnahme nachgewiesen werden: In Abhängigkeit von der Isoprenalinkonzentration erfolgte eine sukzessive  $\beta_2$ -Adrenozeptor-erniedrigung um 60% ( $5 \times 10^{-8}$  mol/l Isoprenalin) bis 80% ( $2 \times 10^{-7}$  mol/l Isoprenalin). Auch hier zeigte der Verlauf der Dosis-Wirkungskurve eine asymptotische Annäherung an einen scheinbaren Basalwert von  $< 20\%$  des Ausgangswertes [441].

Der Abfall und die Rekonstitution der in der Plasmamembran exprimierten AR-Dichte spiegelt sehr genau die Aktivität der  $\beta$ -adrenerg stimulierbaren Adenylatcyclase und die Effektivität der adrenergen Signaltransduktion wider [39, 363, 492]. Folge des Desensibilisierungsprozesses ist eine Reduktion des intrazellulären cAMP-Gehaltes und konsekutiv der zellulären Antwort, um einer überschießenden Reaktion entgegenzuwirken [262]. Der Inkubation mit spezifischen Agonisten in physiologischer Konzentration folgt eine initiale Aktivierung des Adenylatcyclase-cAMP-Systems mit einer maximalen Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes in Abhängigkeit vom Zellsystem und der Katecholaminkonzentration um das 3- bis 400-fache innerhalb der ersten 5 Minuten [55, 169, 195, 233, 304, 402, 404, 490, 564]. Eine Aktivierung der AC in vitro gelingt frühestens in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-10}$  bis  $10^{-8}$  mol/l Isoprenalin bzw. Adrenalin [233, 380, 402]. Nach Aktivierung schließen sich in zeitlich enger Abfolge die Rezeptorkoppelung und die Reduktion der exprimierten Adrenozeptordichte an. Infolgedessen sinkt trotz anhaltenden Stimulus die Adenylatcyclaseaktivität innerhalb der nächsten 10 bis 30 Minuten um 25 bis 75% im Vergleich zur Kontrolle und der intrazelluläre cAMP-Gehalt innerhalb von 60 Minuten auf das Ausgangsniveau ab [233, 265, 388, 404, 457, 564].

Die Aktivierung des  $\beta$ -adrenergen Systems wirkt sich zeitverzögert auf die zellulären Prozesse epidermaler Zellen aus. Bereits 2 bis 5 Stunden nach Agonistenexposition ist

eine epidermale Mitoseinhibition von ca. 60% zu verzeichnen, die nach 24 Stunden auf 74% ansteigt und nach 96 Stunden ein Maximum von 93% erreicht [66, 70, 404]. Inwiefern der Desensibilisierungsprozeß Einfluß auf die adrenergen Zelleffekte hat, z.B. im Sinne einer kompensatorischen „feed-back“-Hemmung, ist derzeit ungeklärt.

#### 4.3.2. Inkubation mit den $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten Propranolol und Alprenolol

Während der Desensibilisierungsprozeß an dem hier verwendeten Zellsystem ausführlich studiert werden kann, sind Untersuchungen zur Hypersensibilisierung des epidermalen  $\beta$ -Adrenozeptorsystems (Supersensitivität) nur eingeschränkt durchführbar. Aufgrund des katecholaminfreien Mediums und der regelmäßigen Mediumwechsel, die die Konzentration der endogen sezernierten Katecholamine reduzieren, befinden sich die NHK bereits in einem hypersensibilisierten Ausgangszustand.

Der Prozeß der Hypersensibilisierung kann in vivo durch eine Denervierung oder Adrenalektomie induziert werden und in vitro entweder durch eine Katecholamin-depletion des Mediums oder durch die Blockierung der Signaltransduktion, die zu einer Erniedrigung des intrazellulären cAMP-Gehaltes führt und somit dem Zellsystem eine Agonistenverarmung vortäuscht [359, 487].

$\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten ( $\beta$ -Blocker) unterdrücken die biologische Wirkung der endogenen Katecholamine, indem sie mit höherer Affinität als die biologischen Agonisten an den Rezeptor binden (kompetitive Antagonisten) [75, 219, 547], ihn aber nicht aktivieren und somit eine adrenerge Signaltransduktion verhindern können [75, 211, 278, 547]. Demzufolge werden sie vorwiegend in der Therapie von Krankheiten eingesetzt, denen übermäßige sympathikotone Einflüsse zugrunde liegen (u.a. arterielle Hypertonie, hyperkinetische kardiale Störungen, koronare Herzkrankheit). Darüber hinaus stellen sie auch wirksame Therapeutika in der Behandlung der Migräne, des essentiellen Tremors und ophthalmologischer Erkrankungen dar. Sie weisen ein großes Spektrum an kutanen Nebenwirkungen auf. Diese sind außerordentlich polymorph und können zahlreiche, klassische Dermatosen imitieren. Im Vordergrund stehen psoriasiforme, Lichen planus-artige und „ekzematoide“ Exantheme, die mit schwerwiegenden, z.T. lebensbedrohlichen

Nebenwirkungen an anderen Organen Syndromkomplexe bilden können (okulomukokutanen Syndrom, Pseudo-Lupus-erythematodes-Syndrom, fibrinöse Peritonitis) [Übersichtsartikel: 211, 407].  $\beta$ -Blocker können sowohl psoriasiforme Läsionen auslösen als auch zur Exazerbation bzw. Therapieresistenz einer bestehenden Psoriasis führen [71, 131, 166, 211, 253, 462, 477, 479, 481]. In diesem Zusammenhang wird insbesondere über 4 kardioselektive (Practolol, Cematolol, Atenolol, Metoprolol) sowie 6 nicht-kardioselektive  $\beta$ -Blocker (Propranolol, Oxprenolol, Nadolol, Pindolol, Sotalol, Metipranolol) mit oder ohne partial agonistische Aktivität berichtet [Übersichtsartikel: 211, 477, 479]. Charakteristischerweise treten die kutanen Nebenwirkungen meist erst nach einer Monate bis Jahre dauernden Induktionsphase auf, heilen jedoch einige Wochen nach Absetzen der  $\beta$ -Blockertherapie vollständig ab [166, 477]. Der pathogenetische Mechanismus, der diesen Nebenwirkungen zugrunde liegt, wird derzeit kontrovers diskutiert. Neben immunologischen Vorgängen, die insbesondere für die komplexen Syndrombilder nach Practololtherapie verantwortlich gemacht werden [17, 77, 130, 186, 187, 258, 408], wird für das Entstehen der psoriasiformen Hautläsionen vor allem ihr eigentlicher pharmakologischer Wirkmechanismus, die  $\beta$ -adrenerge Blockade, als ursächlich angesehen [71, 131, 166, 211, 253, 462, 477, 479, 481]. Da die epidermalen Adrenozeptoren ähnliche Bindungscharakteristika ( $\beta$ -Adrenozeptordichte und -affinität) aufweisen wie kardiale  $\beta$ -Adrenozeptoren und somit  $\beta$ -Blocker mit der gleichen Affinität ( $K_D$ ) binden [2, 201, 304, 331, 472, 478, 480, 482], unterdrücken die systemisch wirksamen  $\beta$ -Blocker nicht nur die biologische Wirkung der endogenen Katecholamine am eigentlichen Zielorgan, z.B. dem Herzen, sondern auch in der Epidermis. An der Haut kommt es bei bestehender Prädisposition konsekutiv zu einer Abnahme des intrazellulären cAMP-Gehaltes mit einer daraus resultierenden Störung der epidermalen Homöostase zugunsten einer gesteigerten Proliferation und verminderten Zelldifferenzierung. Experimentell konnte nachgewiesen werden, daß Propranolol in vitro die epidermale AC-Aktivität suprimiert [379]. Des weiteren kann in vivo durch eine intrakutane Propranololinjektion in unbefallene, psoriatische Haut die epidermale Mitoserate gesteigert und somit die Entstehung einer psoriasiformen Läsion provoziert werden [552].



Von  $\beta$ -Blockern ist bekannt, daß sie am Herzen zu einer Hypersensibilisierung des kardialen Gewebes führen. Alderman berichtete erstmals 1974 über ein sog. Entzugssyndrom („propranolol-withdrawal-syndrom“) [14], das nach plötzlicher Unterbrechung einer systemischen Propranololtherapie auftritt und sich 24 bis 48 Stunden nach Therapieende als instabile Angina, in seltenen Fällen auch als Myokardinfarkt manifestiert und bis zu 14 Tage anhalten kann. Ursächlich wird die Hypersensitivität nach Propranololtherapie auf eine erhöhte postsynaptische Adrenozeptordichte und konsekutiv gesteigerte Gewebesensitivität zurückgeführt [31, 368, 542]. Eine gleichzeitige Erhöhung der präsynaptischen Adrenozeptoren begünstigt zudem die Noradrenalinfreisetzung und verstärkt darüber hinaus die klinischen Symptome [2]. Für die postsynaptische Adrenozeptorsteigerung scheint eine kompensatorische Gegenregulation verantwortlich zu sein [31]. Dieses kompensatorische Regulationsverhalten ist jedoch von den speziellen Eigenschaften des verwendeten  $\beta$ -Blockers abhängig.  $\beta$ -Blocker mit bzw. ohne partiell agonistische Aktivität (PAA) wirken trotz gleicher biologischer Hauptwirkung, der  $\beta$ -adrenergen Blockade, entgegengesetzt auf die Anzahl der  $\beta_2$ -AR-Bindungsstellen ein: Nach Applikation von AR-Antagonisten ohne PAA kommt es zu einer Zunahme der Bindungsstellen („up-regulation“) [2], während AR-Antagonisten mit PAA zu einer Abnahme der  $\beta_2$ -AR-Bindungsstellen im Sinne einer „down-regulation“ führen. Diese gegensätzliche Veränderung resultiert daraus, daß die partiell agonistische Aktivität, unabhängig von der  $\beta_1$ - oder  $\beta_2$ -Selektivität des Antagonisten, eine gewebeartabhängige  $\beta_1$ - oder  $\beta_2$ -mimetische Wirkung ausübt und der kompensatorischen AR-Erhöhung entgegenwirkt [45].

Diesbezügliche Studien an epidermalen Zellen oder Epidermispräparaten wurden bislang, soweit bekannt, nicht durchgeführt, so daß unklar ist, ob humane Keratinozyten ein ähnliches Regulationsverhalten aufweisen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden NHK mit Propranolol, einem nicht selektiven  $\beta$ -Blocker ohne PAA, bzw. Alprenolol, einem nicht-selektiven  $\beta$ -Blocker mit PAA, über 24 Stunden in aufsteigender Konzentration von  $10^{-7}$  bis  $10^{-5}$  mol/l inkubiert. Nach Propranololinkubation kann eine konzentrationsabhängige Erhöhung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte verzeichnet werden, die jedoch erst in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-6}$  mol/l zu einer signifikanten Steigerung führt (s. 3.5.2., Abb. 14, S. 50). Bei einer Konzentration von  $10^{-5}$  mol/l scheint bereits ein

Sättigungsplateau (ca. +30%) erreicht zu sein. Nach der Inkubation mit Alprenolol resultiert hingegen erwartungsgemäß ein gegensätzliches Regulationsverhalten. Bereits bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l ist die  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte signifikant um 36% erniedrigt. In Abhängigkeit von der Alprenololkonzentration fällt diese um 54% ( $10^{-6}$  M) bzw. 69% ( $10^{-5}$  M) ab (s. Abb. 14, S. 50). Die Erniedrigung fällt jedoch, verglichen mit der Isoprenalininkubation gleicher Konzentration (Abb. 11, S. 46;  $10^{-7}$  M: -64%,  $10^{-6}$  M: -76%,  $10^{-5}$  M: -80%), deutlich geringer aus. Vergleichbare Werte finden sich bei einer Isoprenalininkonzentration, die ca. 2 Zehnerpotenzen unter der jeweiligen Alprenololkonzentration liegt.

Die hier ermittelten Daten entsprechen weitgehend den bisher bekannten Ergebnissen aus der Literatur. Diese Studien wurden zumeist an nicht epidermalen Zellen bzw. Geweben (Lymphozyten, Herz-, Hirn- und Lungenzellen) *in vivo* durchgeführt [1, 2, 19, 43, 99, 163, 164, 371, 550, 557, 571]. Nur einzelne Studien erfolgten an Zellkulturen [23, 223]. Die Bedingungen in *in vivo*- und *in vitro*-Systemen unterscheiden sich erheblich und erschweren somit einen direkten Vergleich der Daten. Da die *in vivo* intravenös oder per os applizierten  $\beta$ -Blocker, im Gegensatz zu *in vitro*-Zellkultursystemen, beträchtlichen Metabolisierungsvorgängen unterliegen können (Bioverfügbarkeit: Propranolol 30%, Alprenolol 10% [547]), wurde die Bestimmung der Adrenozeptordichte in *in vivo*-Systemen erst nach mehreren Tagen durchgeführt, während sie in Zellkultursystemen innerhalb eines Zeitraumes von 24 Stunden erfolgte. Ferner kann von der *in vivo* applizierten Dosis nicht auf die tatsächlich erreichte Gewebekonzentration geschlossen werden, die einen bestimmten therapeutischen Bereich (z.B. 100-130 ng/ml Propranolol-Plasmakonzentration) erreichen muß, um zu einer Beeinflussung des Adrenozeptorsystems im jeweiligen Gewebe zu führen. Hingegen kann *in vitro* die applizierte Dosis gut mit der erzielten Wirkung korreliert werden.

Nach Propranololapplikation berichtet die überwiegende Anzahl der Studien über eine Erhöhung der  $\beta$ -Adrenozeptordichte [1, 2, 43, 99, 164, 371, 550, 557], während nur einzelne Autoren keine Veränderung bzw. eine Erniedrigung der Adrenozeptordichte verzeichneten [19, 23, 163, 223, 571], was möglicherweise auf nicht sachgerechte Protokolle zurückzuführen ist. So konnte z.B. Aarons nachweisen [2], daß das in einer Studie verwendete Propranolol-Einnahmeschema zu keinen meßbaren Plasma-

Propranololspiegeln führte [19], was die unveränderte Adrenozeptordichte erklären dürfte. Auch eine diskontinuierliche Applikation mit 1 bis 2 Dosen täglich kann Ursache des ausbleibenden Effektes sein [163], da aufgrund der raschen Metabolisierung (Halbwertszeit nach einmaliger Injektion ca. 60 bis 80 Minuten [2]) keine konstante  $\beta$ -Blockade aufrechterhalten wird. Ferner wurde in einer dieser Studien die AR-Dichte erst nach 22 Tagen anstatt, wie sonst üblich, nach durchschnittlich 7 bis 10 Tagen bestimmt [163]. Es wird angenommen, daß die AR-Veränderung einer biphasischen Kinetik unterliegt. Da einer initialen AR-Erhöhung im Verlauf eine Adaptation und Erniedrigung der AR-Dichte auf den Ausgangswert folgt [43], wurde evtl. in der zuvor erwähnten Studie nur die 2. Phase der Adrenozeptorveränderung erfaßt. Die in einer einzigen Studie beobachtete Verminderung der AR-Dichte nach Propranololinkubation konnte auch von den Autoren ursächlich nicht erklärt werden und beruht möglicherweise auf methodischen Mängeln [223].

Sämtliche Studien, die eine kontinuierliche Propranololapplikation über Minipumpen durchführten bzw. gesicherte Plasmaspiegel im therapeutischen Bereich erzielten [1, 2, 164], verzeichneten nach 2-tägiger Propranololtherapie in vivo einen Anstieg der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte um 25% auf humanen Lymphozyten [43], nach 7-tägiger Therapie um ca. 40% auf humanen Lymphozyten [1], nach 7-tägiger Therapie um 28% auf Herzzellen, 32% auf Lungenzellen und 34% auf Lymphozyten der Ratte [2] und nach 14 Tagen um 100% auf Herzzellen der Ratte [164]. Nach Unterbrechung der Therapie kehrten die Werte, obwohl bereits nach 24 Stunden keine meßbaren Propranololspiegel nachweisbar waren (Halbwertszeit 60 bis 80 Minuten [2]), erst nach ca. 4 Tagen auf den Ausgangswert zurück, was an der langen Halbwertszeit von 24 bis 30 Stunden der natürlichen AR-Degradation liegen dürfte [141]. In diesen Studien wurde zudem beobachtet, daß aus der erhöhten  $\beta$ -Adrenozeptordichte nach Beendigung der  $\beta$ -AR-Blockade eine vorübergehend erhöhte Gewebesensitivität in vivo resultiert, deren Anzeichen (Anstieg von Herzfrequenz und Blutdruck) mit den bekannten Symptomen des „propranolol-withdrawal-syndroms“ übereinstimmen.

Über die Auswirkung einer Alprenololinkubation auf die  $\beta$ -Adrenozeptordichte gibt es nur vereinzelte Berichte in der Literatur.  $\beta$ -Blocker mit PAA führen in Abhängigkeit von ihrer PAA-Potenz und konsekutiven AC-Aktivierung zu einer Erniedrigung der

$\beta_2$ -AR-Bindungsstellen. Während in vivo  $\beta$ -Blocker mit hoher PAA (z.B. Pindolol, Bopindolol, Mepindolol) zu einer erheblichen AR-Reduktion von bis zu 50% nach 7 Tagen führen, die auch nach Therapieende noch mindestens 3 bis 4 Tage bestehen bleibt [43, 163, 353], zeigt Alprenolol mit schwacher PAA nur eine mäßige, nicht signifikante Erniedrigung [43]. Hingegen kann in vitro an S 49 Lymphomzellen bzw. BC3H-1 Muskelzellen nach 24-stündiger Alprenololinkubation eine konzentrationsabhängige Erniedrigung der AR-Dichte beobachtet werden, wobei bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l Alprenolol eine Erniedrigung von bis zu 30 bis 60% erzielt wird [178, 223]. Die in der hier vorliegenden Studie hohe AR-Reduktion (Alprenolol  $10^{-5}$  mol/l: -69%) liegt deutlich über den Beobachtungen der in vivo Untersuchungen, aber im gleichen Größenordnungsbereich wie die der in vitro Studien. Dieser Unterschied entsteht möglicherweise aus den verschiedenen Studienansätzen, da die Inkubation in vitro eine kontinuierlich hohe Alprenololkonzentration gewährleistet. Metabolisierende, ggfs. gegenregulatorische Prozesse sowie unbekannte Störfaktoren können weitestgehend ausgeschlossen werden.

Tendenziell liegen die in der hier vorliegenden Studie ermittelten Werte nach Propranololinkubation niedriger und nach Alprenololinkubation teils höher, teils im gleichen Größenordnungsbereich wie die bisher aus der Literatur bekannten Daten. Dieser Umstand ist möglicherweise Folge des bereits hypersensibilisierten Ausgangszustandes der NHK-Kultur. Die Zellen reagieren unempfindlicher auf einen weiteren Agonistenentzug ( $\beta$ -Blocker ohne PAA) und empfindlicher auf eine partielle Agonistenexposition ( $\beta$ -Blocker mit PAA). Ferner ist nicht ausgeschlossen, daß epidermale Zellen in einem anderen Ausmaß auf  $\beta$ -Blocker reagieren als die bisher untersuchten Zell- und Gewebearten menschlicher oder tierischer Herkunft.

Die verantwortlichen Mechanismen für die AR-Erniedrigung nach Alprenololinkubation dürften die gleichen sein wie nach Agonistenexposition (s. 4.3.1., S. 88). Die genauen Vorgänge, die z.B. nach Propranololinkubation zu einer AR-Erhöhung führen, sind derzeit noch weitgehend ungeklärt. Es wird angenommen, daß die  $\beta$ -Adrenozeptormobilisierung zweiphasig verläuft. Der raschen Mobilisierung kryptischer  $\beta$ -Adrenozeptoren folgt eine langsamere de novo-Synthese [164, 487], um die chronische Abnahme der Agonistenbelegung und reduzierte adrenerge Signaltransduktion

aufgrund der persistierenden Blockade zu kompensieren. Des Weiteren wird diskutiert, ob gleichzeitig eine verminderte Degradation der Antagonisten-belegten Adrenozeptoren bzw. der  $\beta$ -Adrenozeptor-mRNA oder eine Umkehr des desensibilisierenden Effektes endogener Katecholamine eine Rolle spielen [31, 164, 487].

Um die Genese zu klären, sind weitere Untersuchungen wie z.B. die Unterbindung der Proteinsynthese mit Cycloheximid, die Störung zellulärer Transportmechanismen, die der Umverteilung internalisierter Adrenozeptoren dienen, oder mRNA-Analysen erforderlich. Die Dissoziationskonstante, als Maß für die Rezeptoraffinität zum bindenden Radioliganden, ist nach Propranololtherapie nicht signifikant verändert. Nach Alprenololtherapie resultiert jedoch eine signifikante Erhöhung von 0,1915 nM (Kontrolle) auf maximal 0,7074 nM bei einer Konzentration von  $10^{-5}$  mol/l Alprenolol. Während die Mehrzahl der bekannten Studien weder über eine  $K_D$ -Erhöhung nach Propranolol- [1, 43, 164, 223] noch Alprenololapplikation [43] berichten, wird nur vereinzelt eine Erhöhung gegenüber beiden Antagonisten verzeichnet [2, 223]. Im Allgemeinen wird diese als technisches Artefakt infolge eines Antagonistenrückstandes im Gewebe, der während des Sättigungsexperimentes mit dem Radioliganden um die AR-Bindungsstellen kompetiert, interpretiert. Da dieses Phänomen in der hier vorliegenden Studie nur nach Alprenolol- und nicht nach Propranololinkubation auftritt, ist ein technisches Problem weitgehend ausgeschlossen. Die hier beobachtete  $K_D$ -Erhöhung gegenüber dem Radioliganden, einem Antagonisten, kann auf eine Konformationsänderung des Rezeptors hinweisen. Zur Ergänzung sind weitere Studien zur Klärung des Bindungsverhaltens gegenüber spezifisch bindenden Agonisten nötig.

Um die in der Literatur bestehenden Diskrepanzen über Art und Höhe der AR-Veränderung zu klären, könnten in Ergänzung der bisherigen Untersuchungen noch kinetische Studien durchgeführt werden, über die eine möglicherweise biphasische AR-Veränderung erfaßt werden könnte. Sollte sich z.B. die  $\beta$ -Adrenozeptordichte nach langfristiger Therapie wieder auf den Ausgangswert einstellen [43], so wären die hier beobachteten Veränderung nur transient und hätten langfristig keinen Einfluß auf den adrenergen Zellstatus. Allerdings stehen dieser Hypothese die Beobachtungen des „propranolol-withdrawal-syndroms“ entgegen, dessen klinische Symptome insbesondere erst nach einer längerfristigen  $\beta$ -Blockertherapie auftreten [14].

Die klinische Bedeutung der gegenläufigen AR-Veränderung nach  $\beta$ -Blockertherapie ist aus kardiologischer Sicht hinreichend bekannt. Während  $\beta$ -Blocker ohne PAA die Entwicklung eines „propranolol withdrawal syndrome“ begünstigen (s.o.), werden nach Beendigung einer Therapie mit  $\beta$ -Blockern mit PAA (z.B. Pindolol) weder eine gesteigerte Herzfrequenz und erhöhter systolischer Blutdruck noch die klinischen Symptome des „propranolol withdrawal syndrome“ beobachtet [501, 537]. Demzufolge wird empfohlen, vorwiegend letztere bei der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen einzusetzen, wenn Patienten über sympathikotone Beschwerden klagen [383].

Im Hinblick auf die Entwicklung dermatologischer Nebenwirkungen gibt es bislang keine klinischen Dokumentationen, daß  $\beta$ -Blocker ohne PAA, die eine Erhöhung der AR-Dichte begünstigen, vorteilhafter wären. In der Literatur wird über beide  $\beta$ -Blockergruppen im Zusammenhang mit der Entwicklung psoriasiformer Effloreszenzen berichtet [477, 479], wobei zahlenmäßig sogar diejenigen  $\beta$ -Blocker ohne PAA überwiegen.

Dieser Umstand beruht darauf, daß  $\beta$ -Blocker während der Therapie, unabhängig von ihrer partiell agonistischen Aktivität sowie ihrem Einfluß auf die Veränderung der AR-Dichte, die adrenerge Signaltransduktion unterbrechen, die Mobilisierung freier, intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen unterbinden und somit die epidermale Homöostase stören. Bei bestehender Prädisposition, die eine Kompensation dieser kutanen Interaktion über andere Calcium-„uptake“-Mechanismen nicht ermöglicht, resultiert daraus eine gesteigerte Proliferation bei gleichzeitig reduzierter Differenzierungskapazität [479].

Hingegen könnte der positive Effekt der  $\beta$ -Blocker ohne PAA, die zu einer Erhöhung der  $\beta$ -Adrenozeptoren führen, in einem rascheren Abheilen der psoriasiformen Effloreszenzen nach Therapieende liegen. Diesbezügliche Publikationen existieren, soweit bekannt, nicht, so daß diese Überlegung rein spekulativ ist und weiterer klinischer Untersuchungen bedarf.

#### 4.3.3. Inkubation mit den Glukokortikoiden Hydrokortison und Dexamethason

Aus klinisch-pharmakologischen Anwendungsbeobachtungen ist seit langem bekannt, daß Glukokortikoide die Wirkung therapeutisch verabreichter AR-Agonisten, z.B. im Rahmen obstruktiver Lungenerkrankungen, unterstützen [384, 545]. Zahlreiche in vivo und in vitro Studien an nicht epidermalen Zellsystemen zeigen, daß Glukokortikoide die  $\beta$ -Adrenozeptordichte, die Effizienz der Koppelung an das Gs-Protein und die AC-Aktivität im Sinne einer heterologen Regulation erhöhen können [72, 84, 85, 86, 139, 141, 152, 268, 282, 292, 316, 321, 374, 421, 434, 487, 572].

Die Präsenz des Glukokortikoidrezeptors (GR) in kultivierten, normalen, humanen Keratinozyten und der Epidermis ist dokumentiert [119, 222, 401]. Ebenso wie die  $\beta_2$ -Adrenozeptoren sind epidermale Glukokortikoidrezeptoren heterogen in der intakten Epidermis verteilt. Proliferierende, basale Zellen weisen eine deutlich höhere Dichte als mitotisch ruhende, sich differenzierende Zellen auf [119, 450]. Von den Glukokortikoiden (GC) ist bekannt, daß sie durch die Zellmembran der epidermalen Zielzelle diffundieren und an den zytoplasmatischen Glukokortikoidrezeptor, der zur Großfamilie der Steroidrezeptoren gehört [121], mit unterschiedlicher Affinität und entsprechender klinischer Effizienz binden [401]. Der inaktivierte Rezeptor bildet mit den Hitzeschockproteinen Hsp 90 und 70 einen Komplex. Die Anlagerung des Liganden führt zur Abdissoziation der gebundenen Hitzeschockproteine, was mit einer Freilegung der DNA-bindenden Domäne sowie einer Dimerisierung des hormonbeladenen Rezeptors verbunden ist. Dieser wird in den Zellkern transportiert und wirkt dort je nach Zielgen als Transaktivator oder Repressor, indem er an eine Enhancer- bzw. Silencer-Region auf der DNA bindet [307, 391]. Im Falle des  $\beta_2$ -AR-Gens kommt es zu einer Bindung an eine Enhancer-Region, dem „GC-responsive element“ (GRE) mit der Sequenz TGGTACAAATGTTCT, von der mindestens 4 übereinstimmende Sequenzen oberhalb der Promotorregion am 5' Ende und dem 3' Ende lokalisiert sind [69, 115, 117, 118, 273, 305, 316]. Konsekutiv wird die Ausbildung des Transkriptionsinitiationskomplexes begünstigt, woraus eine gesteigerte Gentranskription und  $\beta_2$ -AR-mRNA-Zunahme resultieren. Nach erfolgter posttranskriptionaler Modifikation wird die mRNA aus dem Kern ausgeschleust. Am rauhen endoplasmatischen Retikulum erfolgt die

Translation der mRNA und die Modifikation der Aminosäuresequenz. Das neusynthetisierte Protein erfährt anschließend im Golgi-Apparat eine posttranslationale Modifikation, Faltung und Adressierung bevor es als funktionsfähiger Rezeptor in die Zellmembran integriert wird [305]. Obwohl der erhöhte mRNA-Gehalt sowohl Folge einer vermehrten Transkription als auch gesteigerten mRNA-Stabilität sein kann, gilt für die meisten Steroidhormongene, daß ihre Expression überwiegend durch eine Änderung der Transkriptionsrate reguliert wird [72, 181, 316].

Es ist bekannt, daß GC in nicht epidermalen Zellsystemen über eine gesteigerte Transkriptionsrate die Zahl der  $\beta_2$ -Adrenozeptoren pro Zelle und somit die Stimulierbarkeit des  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktionssystems steigern können [42, 72, 74, 84, 86, 141, 181, 316, 374, 421].

Am Schweinehautmodell und permanenten, fötalen Rattenkeratinozyten (FRSK) unterstützen GC den Adrenalin-induzierten c-AMP-Anstieg [230, 234, 239, 245, 248, 261, 332, 376, 504]. Da es nach GC-Inkubation weder zu einer Steigerung der durch Histamin oder Adenosin gekoppelten AC-Aktivität kommt [234, 261, 504], ist ein  $\beta$ -Adrenozeptor-spezifischer Prozeß zu erwarten. Der GC-Effekt auf das epidermale  $\beta$ -adrenerge System kann durch Progesteron (hemmt die Bindung des GC an seinen spezifischen Rezeptor), Actinomycin D (mRNA-Synthesehemmer; Transkriptionsblock) und Cycloheximid (Proteinsynthesehemmer; Translationsblock) inhibiert werden [239, 504]. Diese Befunde lassen vermuten, daß die Ansprechbarkeit des Adrenozeptorsystems, genauso wie in nicht epidermalen Zellsystem, über die Synthese spezifischer, Steroid-induzierter Proteine gesteigert wird. In der Tat gelang kürzlich der Nachweis, daß in einer permanenten, fötalen, epidermalen Rattenzelllinie (FRSK), die im Gegensatz zu normalen Keratinozyten eine außerordentlich hohe Anzahl an  $\beta_2$ -AR-mRNA exprimiert, nach GC-Inkubation ein  $\beta_2$ -AR-mRNA-Anstieg erfolgt [504]. Mittels der verwendeten Techniken konnte zwar nach Dexamethasoninkubation eine zeit- und konzentrationsabhängige Steigerung der AC-Aktivität um das 1,5-fache nachgewiesen werden, die GC-induzierte Erhöhung der  $\beta_2$ -AR-mRNA und der exprimierten Adrenozeptoren wurde hingegen nur semiquantitativ ermittelt. Untersuchungen über eine zeit- bzw. konzentrationsabhängige Steigerung der  $\beta_2$ -Adrenozeptorexpression wurden nicht durchgeführt. Eine ergänzende Studie der gleichen Arbeitsgruppe dokumentierte



1 Jahr später an FRSK-Zellen eine konzentrationsabhängige 1,5- bis 3-fache Steigerung der exprimierten  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte nach Dexamethasoninkubation [245]. Entsprechende Studien an humanen Keratinozyten über eine GC-induzierte, konzentrations- und ggfs. zeitabhängige Änderung der exprimierten  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte existieren, soweit bekannt, nicht. Es gibt lediglich einzelne, autoradiographische Untersuchungen an gesunden bzw. atopischen, humanen Hautproben ex vivo vor und nach mehrtägiger GC-Applikation (mittelpotentes Steroid; 5-tägige, okklusive, topische Applikation), in denen ebenfalls nur eine semiquantitative Erhöhung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte und keine zeit- oder konzentrationsabhängige Veränderung erfaßt wurde [483, 485].

In der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß kultivierte, humane, epidermale Keratinozyten nach Inkubation mit Hydrokortison bzw. Dexamethason mit einer sättigbaren, konzentrations- und zeitabhängigen, signifikanten Erhöhung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte in vitro reagieren (s. 3.5.3., S. 51 und 3.5.4., S. 53): Nach 24-stündiger Hydrokortisoninkubation über einen Konzentrationsbereich von  $10^{-8}$  bis  $10^{-5}$  mol/l konnte erstmals bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l eine signifikante Erhöhung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte um 10% nachgewiesen werden. Mit ansteigender Hydrokortisonkonzentration nimmt die  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte um bis zu 37% bei einer Konzentration von  $10^{-5}$  mol/l Hydrokortison zu, um dann trotz steigender Hydrokortisonkonzentration wieder abzufallen. Während bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  mol/l immerhin noch eine Erhöhung um 14% im Vergleich zum Kontrollkollektiv zu verzeichnen ist, zeigt sich bei einer Konzentration von  $10^{-3}$  mol/l eine signifikante Verminderung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte um 25% (s. Abb. 16, S. 52).

Um den Einfluß der Glukokortikoidpotenz verschiedener Steroide auf die  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte zu prüfen, wurden NHK mit Dexamethason, einem im Vergleich zu Hydrokortison 25- bis 30-fach potenteren Glukokortikoid mit deutlich höherer Affinität zum Rezeptor [279, 391, 545], in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-7}$  bis  $10^{-4}$  mol/l über 24 Stunden inkubiert. Bereits bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l wird eine maximale AR-Erhöhung um 45% erreicht (s. Abb. 18, S. 54). Nicht nur die maximale AR-Steigerung liegt somit mit 8% über der der Hydrokortisonreihe, sondern diese wird zudem bei einer 10-fach niedrigeren Konzentration erreicht, was die höhere

Glukokortikoidpotenz des Dexamethasons widerspiegelt. Ähnlich wie nach Hydrokortisoninkubation nimmt die  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte bei weiter ansteigender Dexamethasonkonzentration wieder ab und liegt im Konzentrationsbereich von  $10^{-4}$  mol/l mit -10% unter dem Niveau des entsprechenden Kontrollkollektivs. Bei einer 10-fach geringeren Konzentration als nach Hydrokortisoninkubation kann somit auch hier eine signifikante Verminderung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte verzeichnet werden.

Insgesamt resultiert nach Inkubation mit Hydrokortison bzw. Dexamethason eine ähnliche, konzentrationsabhängige AR-Veränderung. Diese vollzieht sich jedoch nach Dexamethasoninkubation in einem ca. 10-fach geringeren und zudem engeren Konzentrationsbereich und führt zu einer höheren AR-Steigerung.

Um die Zeitabhängigkeit der AR-Vermehrung zu klären, wurden NHK mit dem potenteren Dexamethason in einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l bzw.  $10^{-5}$  mol/l, die, wie zuvor ermittelt, zu einer effektiven AR-Erhöhung führt, über eine definierte Zeitspanne inkubiert und die relative Veränderung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte untersucht (s. 3.5.4.2., S. 55). Nach einem initialen, signifikanten Abfall der Adrenozeptordichte um bis zu 16% (Dexamethason  $10^{-6}$  M, 30 min) kommt es bereits nach 6 Stunden in beiden Konzentrationsgruppen zu einem raschen, signifikanten Anstieg der Adrenozeptordichte. Dieser erreicht sein Maximum in beiden Gruppen nach 12 Stunden (Dexa  $10^{-6}$  M: 66%; Dexa  $10^{-5}$  M: 35%), um dann im Verlauf wieder langsam abzufallen. Nach 48 Stunden zeigt sich in beiden Gruppen nur noch eine geringe, signifikante Erhöhung (9% bzw. 7%) gegenüber der Kontrollgruppe. Aus dem zeitlichen Kurvenverlauf (Abb. 21, S. 56) ist ersichtlich, daß in beiden Konzentrationsgruppen nach kurzfristigem, äquivalentem Abfall der AR-Dichte eine unterschiedlich intensive AR-Steigerung folgt, die ihr Maximum jeweils nach 12 Stunden erreicht. Im Verlauf kommt es zu einer langsamen Annäherung der Kurven, die nach 36 Stunden nahezu auf gleichem Niveau verlaufen. Nach Inkubation mit  $10^{-6}$  mol/l Dexamethason verläuft der gesamte Kurvenverlauf sowohl im Anstieg als auch im Abfall steiler. Aus dem Verlauf beider Kurven läßt sich folgern, daß nicht nur die Glukokortikoidkonzentration und -potenz, sondern auch die Inkubationszeit für die relative AR-Steigerung entscheidend ist. So läßt sich z.B. bereits nach 48 Stunden kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den beiden Konzentrationsgruppen nachweisen.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den bisher aus der Literatur bekannten Daten an nicht epidermalen und vereinzelt auch epidermalen Zellkultursystemen. Übereinstimmend wird berichtet, daß der zelluläre  $\beta_2$ -AR-mRNA-Gehalt, die exprimierte Adrenozeptordichte und die Adenylatcyclaseaktivität, die mit der exprimierten AR-Dichte gut korreliert [39, 363, 492], einem konzentrations- und zeitabhängigen GC-Einfluß unterliegen.

Während ein Anstieg der AR-Dichte bzw. der AC-Aktivität in epidermalen und nicht epidermalen Zellkultursystemen bereits in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-8}$  bis  $10^{-7}$  mol/l Hydrokortison bzw. Dexamethason nach 24-stündiger Inkubation beobachtet wurde [141, 245, 504], konnte über entsprechende Effekte an Schweineepidermispräparaten erst bei einer Konzentration von  $10^{-5}$  bis  $10^{-4}$  mol/l und einer Inkubationszeit von 48 Stunden berichtet werden [230, 234, 243]. Dieses Phänomen wird auf die bestehende Diffusionsbarriere und metabolisierende Effekte der intakten Epidermis ex vivo [234, 376], ein gegenüber adrenergen Stimuli unempfindlicheres Adrenozeptor-Adenylatcyclase-System in der Schweineepidermis [7] sowie eine erhöhte Glukokortikoidrezeptordichte in proliferierenden in vitro Zellen und die dadurch bedingte höhere GC-Empfindlichkeit [450] zurückgeführt.

Eine maximale Erhöhung der Adrenozeptordichte um 50 bis 200% bzw. der AC-Aktivität um 50 bis 300 % wird in epidermalen und nicht epidermalen Zellkultursystemen in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-7}$  bis  $10^{-6}$  mol/l und einer Inkubationszeit von 24 bis 48 Stunden verzeichnet, die bei weiter ansteigender GC-Konzentration wieder abfällt [76, 139, 141, 245, 376, 504]. Der in der hier vorliegenden Arbeit ermittelte Konzentrationsbereich, der zu einer maximalen Adrenozeptorerhöhung führt, stimmt mit diesen Ergebnissen gut überein. Allerdings schwankt die Höhe der Adrenozeptorsteigerung in den verschiedenen Studien in Abhängigkeit von Zellart, Kulturbedingungen und Nachweisverfahren erheblich, wobei die hier ermittelte maximale AR-Erhöhung im unteren Bereich liegt (Hydrokortison  $10^{-5}$  M / 24 h: 37%; Dexamethason  $10^{-6}$  M / 24 h: 45%; Dexamethason  $10^{-6}$  M / 12 h: 66%). Wie bereits in den vorherigen Kapiteln erwähnt, befinden sich die hier verwendeten Keratinozyten bereits in einem hypersensibilisierten Zustand, wodurch möglicherweise auch heterologe Regulationsmechanismen nur noch eingeschränkt wirksam werden und nur zu einer geringfügigen Steigerung führen.

Hingegen konnte in intakten Schweineepidermispräparaten *ex vivo* eine maximale Steigerung der AC-Aktivität um ein 1,5- bis 5-faches erst bei entsprechend höherer Hydrokortisonkonzentration von  $10^{-4}$  mol/l bei gleichzeitig unveränderter PDE-Aktivität beobachtet werden [230, 234, 243, 332].

Eine 24-stündige, topische Therapie mit Glukokortikoiden *in vivo* führt in der Schweineepidermis zu einer 1,5- bis 3-fachen Erhöhung der AC-Aktivität [261], während die  $\beta_2$ -AR-Dichte nach 5-tägiger, okklusiver Therapie um ca. das 2-fache in atopischer und um das 3-fache in gesunder, humaner Haut ansteigt [485].

Die in der hier vorliegenden Arbeit beobachtete Abnahme der maximal erreichbaren AR-Steigerung bzw. der AC-Aktivität bei weiter ansteigender GC-Konzentration wurde auch in anderen Studien an epidermalen Zellen dokumentiert [230, 245, 376, 504]. Diese konnten jedoch keine Verminderung der Adrenozeptordichte unter das Ausgangsniveau der Kontrolle nachweisen, was hier in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-4}$  mol/l Dexamethason bzw.  $10^{-3}$  mol/l Hydrokortison beobachtet wurde. Da die zuvor zitierten *in vitro*-Studien maximal bis zu einer Konzentration von  $10^{-5}$  mol/l Dexamethason bzw.  $10^{-4}$  mol/l Hydrokortison durchgeführt wurden, existieren derzeit keine vergleichbaren Daten für den hier untersuchten Konzentrationsbereich. Möglicherweise beruht der inhibitorische Effekt auf toxischen Einflüssen dieser unphysiologisch hohen Steroidkonzentration, die ca. 1000 bis 10000-fach höher als die Plasmakortisolkonzentration liegt (0,14 bis 0,69  $\mu$ mol/l [391]).

*In vivo* konnte 4 Stunden nach oraler Steroidapplikation sowohl eine Erniedrigung der Adrenozeptordichte um 40 bis 60% auf Lymphozyten als auch eine Erhöhung um bis zu 40% auf Leukozyten verzeichnet werden, während 24 Stunden nach Steroidapplikation eine Erhöhung der Adrenozeptordichte um bis zu 20% auf beiden Zellarten nachgewiesen wurde [84]. Die initiale Adrenozeptorverminderung wurde auch in dem hier verwendeten Versuchssystem beobachtet (s. Abb. 21, S. 56; Erniedrigung um bis zu 16%). Diese ist möglicherweise Folge eines transienten Degradationsprozesses, eines gestörten Zellklimas oder artefizieller Einflüsse und bedarf weiterer Abklärung.

Eine GC-Therapie trächtiger Kaninchen führt beim Föten zu einer Erhöhung der pulmonalen  $\beta$ -Adrenozeptoren um 77% [62]. Werden Ratten mit systemischen Glukokortikoiden behandelt, so bewirkt eine ein- bis mehrtägige Applikation eine

ca. 70%ige Erhöhung der pulmonalen Adrenozeptoren, die sich nach Adrenalektomie konsekutiv um 20 bis 30% unter den Ausgangswert vermindern [321, 434]. Auch Adipozyten reagieren mit einer Erhöhung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte um 70% nach 7-tägiger oraler Glukokortikoidtherapie der Testpersonen [48].

Auch der zeitliche Verlauf der hier beschriebenen AR-Expression stimmt mit den bisher publizierten Daten überein. Die Steigerung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte und AC-Aktivität folgt mit entsprechender zeitlicher Verzögerung dem der  $\beta_2$ -AR-mRNA-Erhöhung: Nach einem ca. 3- bis 4-fachen Anstieg der mRNA innerhalb der ersten 0,5 bis 3 Stunden bleibt der mRNA-Spiegel über 12 Stunden auf relativ hohem Niveau erhalten und fällt nach 24 Stunden auf den Ausgangswert zurück [72, 73, 74, 181, 316, 504]. Da die Umsetzung der mRNA in den funktionellen Adrenozeptor translationale und posttranslationale Schritte erfordert, ist eine zeitliche Verzögerung der  $\beta_2$ -Adrenozeptor-expression von 3 bis 6 Stunden wahrscheinlich. Eine Zunahme der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte bzw. der AC-Aktivität in in vitro-Systemen wurde frühestens nach 6 Stunden registriert, erreichte zwischen 12 und 24 Stunden ein Maximum und fiel anschließend ab, um z.T. nach ca. 48 Stunden bereits wieder das Ausgangsniveau zu erreichen [141, 230, 234, 245, 504]. An kultivierten Lungenzellen gelang der Nachweis, daß ausgehend von der initialen AR-Konzentration die physiologische Inkorporation neusynthetisierter Adrenozeptoren bei ca. 2% pro Stunde und damit im Gleichgewicht mit der physiologischen AR-Degradation liegt. Nach GC-Inkubation steigt die Inkorporationsrate auf ca. 3 bis 4% an, wodurch die Expression der neusynthetisierten Adrenozeptoren um das Doppelte zunimmt [141]. Membranproteine unterliegen einem kontinuierlichen „turn-over“ ( $\beta_2$ -Adrenozeptor-Halbwertszeit ca. 24 bis 30 h [141]). Die Zunahme der AR-Dichte wird im Verlauf gegenregulatorisch begrenzt. Infolge der AR-Steigerung nimmt die „turn-over“-Rate zu, d.h. über die Erhöhung der AR-Degradationsrate wird langfristig wieder ein „steady-state“ zwischen Synthese und Degradation erreicht, der zu einer Rückkehr zu der ursprünglichen AR-Dichte führt [141]. Diese auch als Gewöhnungseffekt bezeichnete Entwicklung wird auch in der hier vorliegenden Arbeit beobachtet (Abb. 21, S. 56) und erklärt das klinisch seit langem bekannte Phänomen der Tachyphylaxie gegenüber topisch applizierten Steroiden in vivo [529]. Auch in vitro wurde an Mäusekeratinozyten beobachtet, daß eine Triamcinoloninkubation innerhalb

von 5 Tagen zu einer 60%igen Reduktion der Proliferationsrate führt, diese jedoch zwischen dem 8. und dem 10. Inkubationstag nicht mehr nachweisbar ist [324, 325].

Es ist bekannt, daß die Zahl der epidermalen Glukokortikoidrezeptoren einer Fluktuation infolge zahlreicher Manipulationen unterliegen kann [83]. Möglicherweise wird der Gewöhnungseffekt durch eine gleichzeitig eintretende, GC-induzierte, kompensatorische „down-regulation“ der Glukokortikoidrezeptoren verstärkt [48].

Die sich *in vitro* sehr schnell vollziehende AR-Veränderung (Maximum bei ca. 12 bis 24 Stunden) läßt sich nicht in gleichem Ausmaß auf die *in vivo* Situation übertragen, da die *in vivo*-Prozesse aufgrund der komplexen Interaktionen (z.B. Diffusionsbarriere, Metabolisierung etc.) oft protrahiert ablaufen. Hier können langfristige *in vivo*-Studien zur Klärung der genauen AR-Kinetik beitragen.

Untersuchungen über eine Änderung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte in Abhängigkeit von der Potenz des applizierten Glukokortikoids sind, soweit bekannt, bisher nicht erfolgt. Die in der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesene Steigerung der AR-Dichte in Abhängigkeit von der glukokortikoiden Potenz stimmt jedoch mit den Ergebnissen einzelner Studien an epidermalen Modellsystemen überein, die die potenzabhängige Aktivierung der epidermalen Adenylatcyclase bzw. die GC-induzierte Proliferationshemmung untersuchten [234, 248, 261, 324, 376]. Dabei wurde übereinstimmend festgestellt, daß sich die Höhe der AC-Aktivierung bzw. der Proliferationshemmung an der klinisch dokumentierten Potenz des Glukokortikoids [198, 259], die aus einer unterschiedlichen Affinität der Glukokortikoide zum Glukokortikoidrezeptor resultiert [401], orientiert. Im wesentlichen wird durch die potenteren GC in einem 10- bis 100-fach geringeren Konzentrationsbereich eine maximale AC-Aktivierung bzw. Proliferationshemmung erzielt.

Die Frage, ob die unterschiedliche GC-Potenz auch Einfluß auf die Höhe der maximal erreichbaren AR-Steigerung hat oder ob diese durch eine entsprechende Konzentrationserhöhung des schwächeren Glukokortikoids kompensiert werden kann, wird durch die bisherigen Studien nur unzureichend beantwortet. Die Ergebnisse einer Studie lassen erkennen, daß möglicherweise auch die maximal erzielbare Zellantwort von der GC-Potenz abhängt. So konnte nach 24-stündiger, topischer Applikation von 0,12% Betamethason-17-valerat (GC-Potenz der Klasse III) eine ca. 1,5-fache und nach

Applikation von 0,05% Clobetasol-17-propionat (GC-Potenz der Klasse IV) eine ca. 3-fache Steigerung der AC-Aktivität nachgewiesen werden [261]. Allerdings wurde vorher nicht geklärt, ob in der Studie die optimalen Konzentrationen des jeweiligen Glukokortikoids eingesetzt wurden.

Aus der hier vorliegenden Arbeit wird ersichtlich, daß bei der jeweils optimalen Konzentration nach 24-stündiger Inkubation durch Hydrokortison (GC-Potenz der Klasse I) eine AR-Steigerung um 37% und durch Dexamethason (GC-Potenz der Klasse 2) um 45% erzielt werden kann (s. Abb. 16, S. 52 und Abb. 18, S. 54). Dieser geringfügige, aber deutliche Unterschied legt den Rückschluß nahe, daß die maximal erreichbare AR-Steigerung auch von der Potenz des applizierten Steroids abhängt und nicht durch eine entsprechende Konzentrationserhöhung des schwächeren Glukokortikoids kompensiert werden kann. Durch Untersuchungen mit Glukokortikoiden aller 4 Potenzklassen würde ein etwaiger Unterschied, insbesondere zwischen den Klassen I und IV, deutlicher hervortreten.

Neben der GC-induzierten, quantitativen  $\beta_2$ -Adrenozeptorveränderung wurde auch die Änderung der Dissoziationskonstanten, als Maß für die Rezeptoraffinität zum bindenden Liganden, bestimmt. Wie in vergleichbaren Studien [48, 321] konnte dabei weder eine konzentrations- noch zeitabhängige, signifikante Veränderung der Dissoziationskonstanten erfaßt werden (s. 3.5.3., 3.5.4.1., 3.5.4.2.). Wie jedoch zuvor erwähnt, ist damit aber nicht eine Affinitätsänderung gegenüber den endogenen Agonisten ausgeschlossen (s. S. 90/91). So wurde nämlich in einigen Studien eine Zunahme der Rezeptoraffinität gegenüber Agonisten nachgewiesen [76, 84, 85, 423].

Glukokortikoide modulieren aber das  $\beta$ -adrenerge Signaltransduktionssystem nicht nur direkt über eine Steigerung der  $\beta_2$ -AR-Genexpression, sondern auch indirekt über eine intrazelluläre, transkriptionale Erhöhung von Lipokortinen. Lipokortine können in Anwesenheit von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, welche wiederum durch eine Stimulation des epidermalen  $\beta$ -Adrenozeptorsystems erhöht werden [274, 382, 562], die Phospholipase  $A_2$  hemmen (sog. Phospholipase  $A_2$ -Inhibitoren) [21, 243, 391]. Die membrangebundene Phospholipase  $A_2$  moduliert die  $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion: Phospholipaseinhibition bewirkt eine Erhöhung und Phospholipaseaktivierung eine Erniedrigung der  $\beta$ -AR-Dichte sowie der  $\beta$ -adrenergen Zellantwort [243, 372]. Ferner

fungiert die Phospholipase A<sub>2</sub> als ein Schlüsselenzym in der Synthese von Arachidonsäuren aus membranären Phospholipiden. Arachidonsäuren gelten als Vorläufer zahlreicher Entzündungsmediatoren und unterdrücken, indem sie die  $\beta$ -AR-Phosphorylierung begünstigen, ebenfalls die  $\beta$ -adrenerge Antwort [372]. Durch die gesteigerte Lipokortinsynthese wird über die Inhibition der Phospholipase A<sub>2</sub> und der Arachidonsäureproduktion sowohl die  $\beta$ -adrenerge Zellantwort begünstigt als auch der epidermale Entzündungsprozeß unterdrückt [21, 391].

Auch wenn zahlreiche Studien belegen konnten, daß die  $\beta$ -adrenerge Gewebeantwort durch Glukokortikoide gesteigert werden kann, so beruhen die GC-vermittelten Zelleffekte auf einer Vielzahl von Genaktivierungen und -supprimierungen (z.B. Tonofilamente, Aktin), die unabhängig von der gesteigerten  $\beta_2$ -AR-Genexpression, aber parallel und z.T. synergistisch, zu einer Hemmung der Proliferation und Steigerung der Zelldifferenzierung führen [15, 33, 136, 203, 243, 324, 325, 497, 535].

#### 4.3.4. Koinkubation mit Dexamethason und dem $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten Isoprenalin

Als „permissive“ Hormone, die die Wirkung endogener und therapeutisch verabreichter Katecholamine unterstützen, werden Glukokortikoide neben  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten seit langem in der Therapie bronchoobstruktiver Lungenerkrankungen eingesetzt [370, 372, 384, 487, 545]. Wie im vorherigen Abschnitt ausführlich besprochen, erhöhen Glukokortikoide die auf der Zelloberfläche exprimierte Adrenozeptordichte und steigern somit die Ansprechbarkeit des  $\beta$ -Adrenozeptorsystems. Unbeantwortet bleibt jedoch noch die therapeutisch interessante Frage, ob Glukokortikoide auch die Agonisten-induzierte Desensibilisierung des epidermalen  $\beta$ -Adrenozeptorsystems verhindern bzw. kompensieren können. Aus diesem Grunde wurden NHK gleichzeitig oder nacheinander mit Isoprenalin und Dexamethason in biologisch effizienter Konzentration ( $10^{-6}$  mol/l) über 24 Stunden inkubiert (s. 3.5.5., S. 57). Zum direkten Vergleich dienten NHK, die jeweils nur mit einem Agens inkubiert wurden. Diese als Anhaltswert dienenden AR-Veränderungen lagen mit +42% (Ansatz 1: Dexamethason  $10^{-6}$  mol/l) und -73% (Ansatz 2: Isoprenalin  $10^{-6}$  mol/l) gegenüber der Kontrollgruppe (Ansatz 0) im



gleichen Größenordnungsbereich wie die zuvor ermittelten Daten (s. 3.5.1.1., Abb. 11 und 3.5.4.1., Abb. 18). Bei gleichzeitiger Inkubation mit Isoprenalin und Dexamethason (Ansatz 4) wurde eine Verminderung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte um 43% ermittelt, die somit zwar geringer als nach reiner Isoprenalininkubation ausfiel, aber noch deutlich unter der AR-Dichte der Kontrollgruppe lag. Wurden die Zellen jedoch erst über 24 Stunden mit Isoprenalin und anschließend über weitere 24 Stunden mit Dexamethason inkubiert (Ansatz 5), lag die  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte mit einer Verminderung um 3% im Größenordnungsbereich der Kontrollgruppe. Um auszuschließen, daß diese Erhöhung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte nicht Folge der physiologisch stattfindenden Rekonstitution des Adrenozeptorsystems nach „long-term desensitization“ und anschließendem Agonistenentzug ist (s. 4.3.1., S. 94) [23, 144, 331, 389], wurde eine Gruppe nach 24-stündiger Isoprenalininkubation über weitere 24 Stunden in reinem Komplettmedium kultiviert (Ansatz 3). Dabei zeigte sich nur eine geringe Anhebung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte von -73% auf -64% im Vergleich zum Kontrollkollektiv und fiel somit deutlich geringer aus als nach anschließender 24-stündiger Dexamethasoninkubation (Ansatz 5: -3%). Die  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte lag bei gleichzeitiger Inkubation ebenfalls deutlich niedriger (Ansatz 4: -43%) als nach anschließender Dexamethasoninkubation (Ansatz 5: -3%). Dieser Umstand beruht möglicherweise darauf, daß einerseits bei gleichzeitiger Inkubation der Glukokortikoid-induzierte Effekt durch den Desensibilisierungsprozeß weitgehend neutralisiert wird, andererseits bei anschließender Inkubation sich die gleichzeitig ablaufende physiologische Rekonstitution und GC-induzierte Adrenozeptorsteigerung in ihrer Wirkung addieren, möglicherweise auch potenzieren.

Die zeitgleiche Erfassung der Dissoziationskonstanten, die die Rezeptoraffinität zum bindenden Radioliganden charakterisiert, wies auch hier in keiner Gruppe eine signifikante Veränderung auf.

Aus der Literatur sind vorwiegend klinische Studien an Asthmatikern oder in vivo-Experimente an Nagern bekannt, in denen die Auswirkung einer simultanen Glukokortikoid- und  $\beta$ -Agonistenexposition auf das  $\beta$ -adrenerge Signaltransduktionssystem untersucht wurde [42, 47, 224, 366, 435, 436, 508]. Diese in vivo-Studien sind aufgrund ihres methodischen Ansatzes sowie der doch sehr unterschiedlichen

Versuchsbedingungen und Steroidkonzentrationen nur schwer mit den hier vorliegenden Ergebnissen vergleichbar. Dennoch läßt sich übereinstimmend feststellen, daß Glukokortikoide eine protektive, permissive und rekonstitutive Wirkung auf das  $\beta$ -Adrenozeptorsystem haben.

Wie bereits zuvor erwähnt, erhöht eine 24-stündige Glukokortikoidtherapie die Zahl der Adrenozeptoren in der Rattenlunge (s. 4.3.3.) [434]. Ferner kann eine Begleittherapie mit Steroiden während einer  $\beta$ -Agonistentherapie mit Terbutalin die Ausbildung einer Desensibilisierung in der Meerschweinchenlunge in vivo verhindern [435]. Ebenso konnte gezeigt werden, daß der Agonisten-induzierte intrazelluläre cAMP-Anstieg im Lungengewebe höher ausfällt, wenn Ratten in vivo gleichzeitig mit Glukokortikoiden und  $\beta$ -Agonisten behandelt werden, anstatt wie die Kontrolltiere nur mit Isoprenalin [366]. Glukokortikoide können die Agonisten-induzierte Desensibilisierung der  $\beta_2$ -Adrenozeptoren auf Lymphozyten in vivo innerhalb kurzer Zeit umkehren [42, 47, 224, 436, 508]. Prednisolon stellt die  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte auf Lymphozyten und die zelluläre cAMP-Antwort nach Isoprenalinapplikation bei Asthmapatienten, die eine Langzeittherapie mit  $\beta$ -adrenergen Bronchodilatoren erhielten, wieder her. Gleichzeitig konnte klinisch eine Verbesserung der Lungenfunktion nachgewiesen werden [46].

Auf molekularer Ebene konnte an nicht epidermalen Zellen, die mit einer Kombination von  $\beta$ -Agonisten und Glukokortikoiden behandelt wurden, demonstriert werden, daß die  $\beta_2$ -AR-Genexpression im Hinblick auf eine Vielzahl möglicher Hormonsignale einer dynamischen Regulation und Adaptation unterliegt [182]. Die Agonist-induzierte „down-regulation“ des  $\beta_2$ -AR-mRNA-Spiegels und der  $\beta_2$ -Adrenozeptoren [73, 180] kann durch eine Dexamethasonbehandlung umgekehrt werden. Die gesteigerte  $\beta_2$ -AR-Gentranskriptionsrate nach Steroidapplikation führt zu einem Anstieg des mRNA-Spiegels und kann somit die „down-regulation“ überwinden [182]. Im umgekehrten Fall kann eine GC-induzierte AR-Erhöhung schrittweise durch die anschließende Hinzugabe eines Agonisten erniedrigt werden. Infolge einer mRNA-Destabilisierung wird die Desensibilisierung induziert [182].

Unter dem in der hier vorliegenden Arbeit angewendeten Zeit- und Konzentrationsprotokoll ist der protektive Schutz bei gleichzeitiger  $\beta$ -Agonisten- und Steroidapplikation nur mäßig ausgeprägt (-43% vs. -73%), während die supportive Wirkung im

Rahmen der Rekonstitution sehr deutlich hervortritt (-3% vs. -64%). Möglicherweise beruht der hier nachgewiesene, vergleichsweise schwache protektive Effekt auf einer zu kurzen Koinkubationszeit, einer zu hohen Isoprenalin- oder insuffizienten Dexamethasonkonzentration. Offen bleibt auch, ob eine vorausgehende, alleinige Glukokortikoidinkubation über 24 Stunden weitgehend vor dem desensibilisierenden Effekt der Katecholamine schützen könnte. Um einen hohen protektiven Schutz zu erzielen, müßten zur Festlegung der optimalen Versuchsbedingungen noch ergänzende Untersuchungen durchgeführt werden.

Zusammenfassend beweisen die publizierten sowie die eigenen Daten, daß GC in Abhängigkeit von Zellart und Versuchsprotokoll in einem sehr unterschiedlichen Ausmaß in der Lage sind, die exprimierte  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte zu steigern und vor desensibilisierenden Agenzien zu schützen.

Es konnte demonstriert werden, daß Glukokortikoide auf humane Keratinozyten in ähnlicher Weise wie auf pulmonale Zellen einwirken. Sie schützen vor der desensibilisierenden Wirkung von  $\beta$ -Agonisten, ermöglichen aber insbesondere eine schnellere Rekonstitution des desensibilisierten Adrenozeptorsystems.

#### 4.3.5. Inkubation mit all-trans-Retinsäure

Retinoide, Abkömmlinge des Vitamin A (Retinol), stellen ein sehr potentes Therapeutikum in der systemischen Therapie der Psoriasis und anderer Hauterkrankungen dar, die mit einer Hyperproliferation, mangel- oder fehlerhaften Zelldifferenzierung und Keratinisierungsstörungen assoziiert sind (z.B. Ichthyosen, M. Darier, hereditäre Keratosen, Pityriasis rubra pilaris) [Übersichtsartikel: 22, 146, 168]. Eine normale, bedarfsgerechte Verhornung der Epidermis ist u.a. vom Vorhandensein von Vitamin A und seinen Derivaten abhängig. Bei bestehendem Vitamin A-Mangel kommt es zum sog. Phrynoderm, einer exzessiven Verhornung der Haut mit follikulärer Betonung [22]. Es ist seit langem bekannt, daß Retinoide zahlreiche biologische Vorgänge beeinflussen können (u.a. Embryogenese, Organogenese, Morphogenese, Wachstum, Differenzierung und Fertilität) [168, 306]. Daneben werden

immunmodulatorische Wirkungen beobachtet, wie z.B. Migrationshemmung polymorphkerniger Granulozyten, Proliferationshemmung von Lymphozyten, Aktivierung von Monozyten, Makrophagen und Langerhanszellen sowie eine veränderte Antigenpräsentation [22, 107, 114].

Die physiologisch vorkommenden Derivate des Retinol und des Retinal, die all-trans-Retinsäure (RS), 13-cis-Retinsäure und 9-cis-Retinsäure sowie ihre Retinylester haben spezifische biologische Funktionen [168].

Retinoide werden intrazellulär von zytoplasmatischen Retinoidbindungsproteinen (CRBP, CRABP) gebunden und zum Zellkern transportiert. Die biologischen Effekte der Retinoide, in erster Linie der eigentlich aktiven, natürlichen Stereoisomere all-trans-RS und 9-cis-RS [459], werden über die nukleären Retinoidrezeptoren, die zur Großfamilie der Steroidhormonrezeptoren gehören, vermittelt [306]. Als Retinoid-Rezeptorkomplexe lagern sie sich an spezifische DNA-Sequenzen, sog. „retinoid acid responsive elements“ (RARE), in der Promotorregion der Zielgene und können deren Transkription sowohl positiv als auch negativ regulieren [168, 263].

Die Retinoid-Rezeptoren lassen sich in 2 Gruppen mit jeweils drei verschiedenen Isoformen einteilen [58, 306, 320]:

1. Der klassische Retinoid-Rezeptor (RAR = retinoic acid receptor) mit den Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Natürlicher Ligand: All-trans-RS.
2. Der Retinoid-X-Rezeptor (RXR) mit den Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Natürlicher Ligand: 9-cis-RS.

Während RARs sowohl all-trans-RS als auch 9-cis-RS mit hoher Affinität binden, assoziieren RXRs selektiv mit 9-cis-RS. Die Retinoidrezeptoren binden entweder als RXR-Homodimere oder als RAR/RXR Heterodimere an die regulatorischen Genabschnitte der Zielgene (RARE). Im allgemeinen funktionieren RARs als Heterodimere mit RXRs. Andere verwandte Kernrezeptoren, z.B. für Vitamin D<sub>3</sub> (VDR) und T<sub>3</sub> (TR), können aber ebenso Heterodimere mit RXRs bilden und diese aktivieren [Übersichtsartikel: 52, 168, 263]. Das Heterodimer RXR $\alpha$  / RAR $\gamma$  gilt als Hauptregulator retinoidsensibler Zielgene in der adulten, menschlichen Haut [111, 134, 559].

Die sog. „retinoid acid responsive elements“ (RAREs) sind komplex strukturiert. Sie bestehen aus 2 oder mehr Hexamerbindungsstellen (Basensequenz (A/G) G (G/T) T (C/G) A oder AGAACA), die als direkte und/oder invertierte Wiederholungen organisiert sind und durch eine spezifische Anzahl von sog. „spare base pairs“ unterbrochen werden. Im Falle des Vorliegens von Rezeptordimeren bindet jedes Rezeptormolekül an eine solche Nukleotidsequenz [Übersichtsartikel: 52, 58, 168, 263]. Neben dieser direkten Transkriptionsregulierung, von der angenommen wird, daß mit ihrer Hilfe die unterschiedlichen Differenzierungsschritte reguliert werden, vermag der aktivierte Retinoid-Rezeptor-Komplex auch indirekt über die Inhibierung von AP-1, einem effektiven Transkriptionsfaktor, die Transkription negativ zu beeinflussen [128] und nimmt damit überwiegend Einfluß auf Proliferation und Inflammation [59, 168].

Der biologische Wirkmechanismus der Retinoide ist komplex, z.T. gegensätzlich, und von Zellart, Proliferations- und Differenzierungsstatus des Gewebes, Zellsystem (in vivo vs. in vitro) und anderen methodischen Gegebenheiten (z.B. Zelldichte) abhängig. In normaler bzw. unebfälliger psoriatischer Epidermis induzieren Retinoide nach systemischer oder topischer Applikation eine Hyperproliferation und Desquamation, die histologisch von einer Hyperplasie, Akanthose, Hypergranulose und Corneolyse sowie ultrastrukturell von einer Verminderung der Desmosomenzahl begleitet werden. Gleichzeitig tritt eine metaplastische Veränderung in Richtung Schleimhaut auf. Hingegen kommt es in hyperplastischer, hyperkeratotischer oder neoplastischer Epidermis zu einem anti-keratotischen, anti-proliferativen, anti-hyperplastischen und sogar chemotherapeutischen Effekt [22, 59, 92, 110, 114, 146, 310, 313, 467, 510]. Die Ursache dieser gegensätzlichen Wirkung des gleichen Retinoids bei ein und demselben Patienten unter anderen Umständen ist derzeit unbekannt. In vitro werden an kultivierten Keratinozyten bzw. transformierten, epidermalen Zelllinien, in Abhängigkeit von Zellsystem und Methodik, ebenso entgegengesetzte Beeinflussungen des Proliferations- und Differenzierungsverhaltens beobachtet [65, 109, 146, 194, 255, 269, 276, 324, 325, 326, 327, 338, 347, 348, 466, 516, 560]. Derzeit werden diese anscheinend widersprüchlichen, Retinoid-induzierten Zelleffekte als Versuch interpretiert, die zelluläre Balance im Rahmen der Keratinisierung zu normalisieren. In Abhängigkeit vom Ausgangszustand der Zellen kann dies durch eine unterschiedliche Beeinflussung des

Proliferations- und Differenzierungsverhaltens erreicht werden, woraus diese scheinbar paradoxen Wirkungsrichtungen resultieren [167, 189, 255, 310, 327, 449, 517, 549].

Das hier eingesetzte keratinozytäre Zellkultursystem repräsentiert rasch proliferierende, undifferenzierte Keratinozyten wie sie im Bereich der basalen Epidermisschichten oder im Rahmen von hyperproliferativen Hauterkrankungen, z.B. der Psoriasis vulgaris, gefunden werden [36, 325, 447, 454, 524, 549]. Der zuvor aufgestellten Hypothese folgend, müßten diese Zellen durch Inkubation mit Retinoiden in ihrer Proliferation gehemmt und/oder ihr Differenzierungsvorgang gefördert werden. An einem vergleichbaren Zellkulturmodell gelang der Nachweis, daß rasch proliferierende, humane Keratinozyten, die in  $\text{Ca}^{2+}$ -armem Medium kultiviert werden, durch Retinoide in ihrer Proliferation gehemmt werden. Dies geschieht auch, wenn die Zellen, z.B. durch Erhöhung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, differenzieren, aber dennoch eine deutliche Proliferationstendenz aufweisen. Hingegen werden Keratinozyten, die durch einen Entzug der im Kompletmedium enthaltenen Wachstumsfaktoren in einen Ruhezustand versetzt werden [170], in ihrem Proliferationsverhalten stimuliert [209, 447, 517, 524]. Unabhängig vom ursprünglichen Proliferations- und Differenzierungsstatus der Zellen resultiert aus der Retinoidapplikation eine Reduzierung von synthetisierten und sezernierten Adhäsionsmolekülen, was u.a. zu einem beschleunigten Trypsinierungsvorgang in vitro führt [276, 347, 524] und sich klinisch als gesteigerte Desquamation manifestiert [22, 114, 510]. Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen konnte ebenfalls eine verminderte Zelladhäsion beobachtet werden. Die ansonsten übliche Trypsinierungszeit von ca. 3 Minuten verkürzte sich nach 24-stündiger Retinoidinkubation auf 30 bis 60 Sekunden (Beobachtung nicht im Ergebnisteil dargestellt).

Eine Vielzahl der Retinoideffekte, wie z.B. ein verändertes Differenzierungsverhalten, die veränderte Expression von Differenzierungsmarkern und eine veränderte Lipidsynthese [65, 109, 324, 325, 326, 338], sind über eine Geninduktion und/oder posttranslationale Modifikationen erklärbar. Hingegen ist derzeit noch relativ unklar, über welche zellulären Mechanismen der antiproliferative Retinoideffekt in vitro vermittelt wird und ob lediglich die zuvor dargestellte AP-1-Inhibition in diesen Prozeß der Transkriptionsregulation involviert ist oder komplexere Regulationsvorgänge aktiviert werden. Rein hypothetisch

könnte der antiproliferative Effekt auch über eine Beeinflussung des  $\beta$ -Adrenozeptorsystems bewirkt bzw. verstärkt werden. Zahlreiche Retinoid-vermittelte Zelleffekte erinnern an die  $\beta$ -adrenerg-vermittelte Zellantwort. Wie bereits zuvor ausführlich erläutert, führt eine Aktivierung des epidermalen  $\beta_2$ -Adrenozeptorsystems zu einer Zelldifferenzierung und Proliferationshemmung (s. 1.4.2, S. 13). Diese Aktivierung kann bekanntlich über eine entsprechende Beeinflussung auf den verschiedenen Signaltransduktionsebenen, wie z.B. Änderung der Adrenozeptordichte, Effizienz der Koppelung, AC- oder PDE-Aktivität etc., erreicht werden.

Bislang konnten nur wenige Gene identifiziert werden, die „retinoid acid responsive elements“ in ihrer Promotorregion enthalten und darüber in ihrer Transkriptionsrate direkt reguliert werden können. Dazu gehören u.a. die Gene für CRBP und CRABP II [112, 135]. Die vollständig aufgeklärte Gensequenz des humanen  $\beta_2$ -Adrenozeptors [69, 94, 115, 273] weist, soweit derzeit bekannt, kein „retinoid acid responsive element“ (RARE), jedoch „glucocorticoid-“ und „cAMP responsive elements“ (GRE, CRE) in der Promotorregion des Gens auf [69, 74, 115, 117, 118, 273, 316]. Ob über eine direkte Beeinflussung der  $\beta_2$ -AR-mRNA-Transkriptionsrate das adrenerge Signaltransduktionssystem und damit auch eine Modulation der zellulären Proliferation und Differenzierung beeinflusst werden kann, ist aufgrund der fehlenden RAREs fraglich.

Bezüglich einer möglichen, Retinoid-induzierten Beeinflussung des epidermalen  $\beta$ -Adrenozeptorsystems wurden bislang nur wenige, zudem kontroverse in vitro-Studien publiziert. An der intakten Schweineepidermis in vitro konnte nach 24-stündiger Retinoid-Inkubation (Retinol, all-trans-RS, Ro 10-1670, E-5166) eine Steigerung des  $\beta$ -adrenerg stimulierten, intrazellulären cAMP-Gehaltes um ein 2- bis 5-faches demonstriert werden. Diese trat frühestens nach einer 6-stündigen Inkubationsperiode und einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l Retinoid auf und zeigte ihr Maximum nach 24-stündiger Inkubation in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-5}$  bzw.  $10^{-4}$  mol/l Retinoid. Von den untersuchten Retinoiden wies all-trans-RS den stärksten und Retinol den schwächsten Effekt auf. Gleichzeitig konnte keine signifikante Änderung der PDE-Aktivität nachgewiesen werden. Während eine Koinkubation mit verschiedenen Retinoiden keinen synergistischen Effekt erkennen ließ, resultierte aus einer Koinkubation mit Hydrokortison und Retinoiden ein additiver Effekt, was auf einen

unterschiedlichen Wirkmechanismus dieser beiden Komponenten schließen läßt [240, 241, 332]. Über welche zellulären Mechanismen der Retinoid-Effekt zustande kommt, wird bislang rein hypothetisch diskutiert. Es ist bekannt, daß die Adenylatcyclase ein membrangebundener Enzymkomplex ist, der durch Lateralbewegungen des Adrenozeptors in Bezug zur katalytischen Enzymeinheit aktiviert werden kann. Die Aktivität der AC steigt mit zunehmender Membranfluidität [190]. Retinoide erhöhen die Membranfluidität [340] und unterstützen somit möglicherweise das  $\beta$ -adrenerge Antwortverhalten [240, 241].

Während an Meerschweinchenkeratinozyten *in vitro* gleichfalls nach 4 bzw. 7 Tagen, jedoch noch nicht nach 2 Tagen, ein positiver Retinoid-Effekt (verwendete Dosis im mikromolaren Konzentrationsbereich) auf das  $\beta$ -adrenerge Antwortverhalten nachgewiesen wurde, konnte in der gleichen Studie an humanen Keratinozyten selbst nach 7 Inkubationstagen keine Retinoid-induzierte Unterstützung der  $\beta$ -adrenergen Zellantwort demonstriert werden, was möglicherweise auf speziesbedingten Eigenarten beruht [554].

Ferner wurde an kultivierten FRSK-Zellen (permanente Zelllinie von fötalen Rattenkeratinozyten) eine Verminderung des Agonist-induzierten, adrenergen Antwortverhaltens *in vitro* nachgewiesen. Gleichzeitig ging dieser Effekt mit einer Steigerung der Proliferationsrate einher (erhöhte Thymidininkorporation), was im Zusammenhang mit der inhibierten  $\beta$ -adrenergen Zellantwort zu sehen ist [505].

Es ist erkennbar, daß ein direkter Vergleich dieser Studien kaum möglich ist, da neben speziesbedingten Eigenarten auch die unterschiedlichen Kulturbedingungen eine wesentliche Rolle zu spielen scheinen. Leider wurde nur in der zuletzt zitierten Studie eine zeitgleiche Untersuchung des Retinoideffektes auf das Adrenozeptorsystem und die Zellkinetik durchgeführt. Da das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Zellen erheblichen Einfluß auf die Wirkrichtung des Retinoids zu haben scheint, könnte dies die unterschiedlichen, ja kontroversen Ergebnisse erklären. In Zellkultursystemen mit hoher Proliferationsneigung wirken Retinoide antiproliferativ, indem sie möglicherweise das  $\beta$ -Adrenozeptorsystem stimulieren, während sie in eher ruhenden Kulturen die Proliferation fördern, was möglicherweise auf ein inhibiertes  $\beta$ -Adrenozeptorsystem zurückzuführen ist.



Ein sicherer Rückschluß aus den zuvor zitierten Publikationen auf das hier verwendete humane Keratinozytenmodell, das aufgrund seiner hohen Proliferationstendenz durch Retinoidinkubation in seiner Proliferation gehemmt wird (s. S. 120), und die Retinoid-induzierten Adrenozeptorveränderungen sind kaum möglich. Aufgrund der jedoch zuvor aufgestellten Hypothese wäre eine Aktivierung des adrenergen Signaltransduktionssystems denkbar.

Zur Evaluation des Retinoideffektes auf die exprimierte  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte rasch proliferierender, humaner Keratinozyten wurden in der hier vorliegenden Arbeit NHK mit all-trans-Retinsäure, einem sehr potenten, biologisch aktiven Vitamin A-Derivat inkubiert. Die Inkubation erfolgte über 24 Stunden in aufsteigender Konzentration von  $10^{-6}$  bis  $10^{-4}$  mol/l all-trans-Retinsäure (s. 3.5.6., S. 59). Der gewählte Konzentrationsbereich entspricht derjenigen Dosis, die üblicherweise in keratinozytären Modellsystemen in vitro verwendet wird [107, 194, 240, 241, 276, 324, 327, 449, 505, 524, 549, 554]. Während der physiologische Retinsäure-Serumspiegel bei 20 nmol/l liegt [458], können unter einer Retinoidtherapie in vivo Spiegel von  $10^{-6}$  mol/l erreicht werden [194]. Ein toxischer Einfluß der Retinoide ist in einem Konzentrationsbereich bis einschließlich  $10^{-5}$  mol/l nicht zu erwarten. Erst ab einer Konzentration von  $10^{-4}$  bis  $10^{-3}$  mol/l all-trans-Retinsäure nimmt die Lebensfähigkeit der Zellen in einem erheblichen Umfang ab [107, 240, 241, 276, 324]. In diesem Zusammenhang wird über eine abnehmende Mikroviskosität bzw. zunehmende Fluidität der Zellmembran berichtet [340]. Da die Membranfluidität einen entscheidenden Einfluß auf die intramembranäre Rezeptorintegration hat, sind die ermittelten AR-Dichten bei einer Inkubationskonzentration von  $10^{-4}$  mol/l all-trans-Retinsäure nur unter Vorbehalt zu betrachten, da sie möglicherweise durch toxische Faktoren beeinflusst werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß nach einer 24-stündigen Retinoidinkubation die exprimierte  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte konzentrationsabhängig abnimmt. Bereits bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l all-trans-Retinsäure ist eine signifikante Erniedrigung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte um 12% nachweisbar, die sich bei einer Konzentration von  $10^{-5}$  mol/l um 23% und bei  $10^{-4}$  mol/l um 42% im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle erniedrigt (s. Abb. 24, S. 60). Die Dissoziationskonstante weist in keinem Konzentrationsbereich eine signifikante Veränderung im Vergleich zur

Kontrolle auf, d.h. die Affinität des Adrenozeptors zum bindenden Radioliganden erscheint unverändert. Wie bereits zuvor ausführlich erörtert, schließt dieses Ergebnis jedoch keine Affinitätsänderung gegenüber den spezifisch bindenden, endogenen Agonisten aus (s. 4.3.1., S. 90/91).

Die hier verzeichnete, konzentrationsabhängige Erniedrigung der exprimierten  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte scheint im Widerspruch zu dem beobachteten biologischen Effekt zu stehen, den Retinoide in einem rasch proliferierenden Zellkultursystem hervorrufen. Würde die Retinoid-induzierte Proliferationshemmung über eine direkte Beeinflussung der exprimierten AR-Dichte vermittelt werden, so würde man eine Erhöhung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte erwarten, wie sie z.B. nach Glukokortikoidinkubation zu verzeichnen ist (s. 3.5.4.). Aber bereits Iizuka et al. vermuteten einen Wirkmechanismus, der unabhängig von dem der Glukokortikoide seine Wirkung auf das Adrenozeptorsystem sowie die Zellkinetik entfaltet [240, 241, 332].

Möglicherweise reflektiert die hier beobachtete, verminderte Adrenozeptordichte einen Zustand der Zelle, anstatt ihn zu bewirken. D.h., es kommt hier nicht über eine AR-Geninduktion zu einer Einleitung der biologischen Phänomene, sondern der durch die Retinoide induzierte Zellstatus, der mit einer verminderten Proliferationsrate und erhöhten Zelldifferenzierung einhergeht und somit die Morphologie höherer, epidermaler Zellagen widerspiegelt, führt zu einer verminderten Adrenozeptordichte. Es ist bekannt, daß die exprimierte  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte bzw. die Aktivität des adrenergen Signaltransduktionssystems mit dem Differenzierungsstatus der Zelle und ihrer Lage in der Epidermis korreliert: Basale Zellen weisen hohe und Stachelzellen eine erniedrigte AR-Dichte auf. Im Verlauf des Differenzierungsprozesses reduziert sich die exprimierte Adrenozeptordichte um ca. 50% [6, 169, 249, 312, 440, 441, 443, 506].

Aus der Literatur ist ein vergleichbares keratinozytäres Verhalten bzgl. der exprimierten  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte bekannt. Obwohl nach einer UVB-Phototherapie an Schweineepidermis in vitro eine erhöhte Adenylatcyclaseaktivität beobachtet wurde [238], konnte z.B. durch eine UVB-Phototherapie an NHK in vitro eine dosisabhängige  $\beta_2$ -Adrenozeptorabnahme um bis zu 62% induziert werden [57], die als Folge der UVB-induzierten Zelldifferenzierung gewertet wurde. Der molekulare Mechanismus dieser doch scheinbar gegensätzlichen Entwicklung ist derzeit ungeklärt. Möglicherweise

kommt es zu einer Retinoid-induzierten AC-Aktivierung, der konsekutiv, infolge einer intrazellulären cAMP-Akkumulation, eine Desensibilisierung des Adrenozeptorsystems im Sinne einer „down regulation“ folgt.

Des Weiteren ist bekannt, daß Retinoide die Bindung von cAMP an die Proteinkinase A und dadurch deren Aktivierung positiv beeinflussen können. In psoriatischen Zellen ist dieses Bindungsvermögen in einem erheblichen Umfang herabgesetzt [120] und kann durch eine Retinoidtherapie normalisiert werden [411, 412]. Auch aufgrund dieses Wirkmechanismus ist eine konsekutive, PKA-vermittelte Desensibilisierung des Adrenozeptorsystems denkbar (s. 4.3.1.).

Zusammengefaßt lassen die hier ermittelten Ergebnisse erkennen, daß Retinoide zwar Einfluß auf das Adrenozeptorsystem haben, dieser jedoch nicht auf der Ebene der  $\beta_2$ -Adrenozeptorgentranskription ansetzt. Dies erklärt sich u.a. aus einer fehlenden „retinoid acid responsive element“ (RARE)-Sequenz im  $\beta_2$ -Adrenozeptorgen [69, 74, 115, 117, 118, 273, 316]. Anders als z.B. bei den Glukokortikoiden wird nicht die exprimierte  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte gesteigert, sondern es kommt zu einer Interaktion mit den nachgeschalteten Transduktoren des Adrenozeptorsystems, über die der zelluläre Effekt (Proliferationshemmung, Zelldifferenzierung) induziert werden kann. Ein vom Wirkmechanismus der Glukokortikoide abweichender Retinoideffekt wurde bereits von Iizuka et al. vermutet (s. S. 121/122) [240, 241, 332]. Als mögliche Vermittler der Retinoidwirkung werden sowohl eine Aktivierung der Adenylatcyclase als auch der Proteinkinase A diskutiert [240, 241, 412]. Aus dieser Aktivierung erklärt sich die hier, wie auch nach UVB-Phototherapie [57], beobachtete Erniedrigung der exprimierten  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte, die möglicherweise Folge einer konsekutiven „down-regulation“ ist. Aber auch eine AR-Erniedrigung infolge eines veränderten Differenzierungsstatus, hervorgerufen durch adrenerge (AC- / PKA-Aktivierung) und Adrenozeptor-unabhängige Prozesse, ist denkbar und würde somit nur den Retinoid-induzierten, differenzierten Zellstatus reflektieren.

#### 4.3.6. Inkubation mit Calciumchlorid

Die freie, intrazelluläre Calciumionenkonzentration, die einen wesentlichen Einfluß auf zahlreiche Enzymaktivitäten, Gentranskriptionen und posttranslationale Proteinmodifikationen hat [158, 254, 302], gilt als Differenzierungsinitiator und Proliferationsregulator in der Epidermis [126, 127].

Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird über verschiedene, aktive Mechanismen, wie z.B. Calciumpumpen [160, 390] und Ionenkanäle [29, 160, 333, 336, 416, 417], konstant auf ca. 0,1  $\mu\text{M}$  eingestellt [124, 127, 254, 309] und liegt somit um den Faktor 10000 unter der extrazellulären Calciumionenkonzentration von ca. 1 mM [124, 127, 309]. Durch die rasche Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  auf 10  $\mu\text{M}$  [309] werden zahlreiche Veränderungen im Hinblick auf den epidermalen Proliferations- und Differenzierungsstatus eingeleitet [35, 124, 204, 206, 395, 567].

Es ist bekannt, daß auch über die extrazelluläre Calciumionenkonzentration die empfindliche Balance zwischen Proliferation und Differenzierung *in vivo* und *in vitro* kontrolliert werden kann. Mit einem niedrigen Serum-Calciumspiegel sind *in vivo* eine insuffiziente, epidermale Differenzierung und gesteigerte Proliferationsrate assoziiert, die als Hauptcharakteristika der Psoriasis vulgaris und psoriasiformer Hautläsionen gelten und sich unter einer Calciumsubstitutionstherapie normalisieren [356, 422, 460, 486]. *In vitro* kann über die extrazelluläre Calciumionenkonzentration der Differenzierungsgrad und das Proliferationsverhalten kultivierter, epidermaler Keratinozyten tierischer und menschlicher Herkunft gesteuert werden [35, 126, 204, 206, 541, 566, 567].

In Abhängigkeit von Zellart und Kultursystem zeigen die Keratinozyten innerhalb eines Konzentrationsbereiches von 0,01 bis 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Kulturmedium eine beschleunigte Proliferationsrate bei gleichzeitig fehlenden Differenzierungsmarkern. Sie ähneln in ihrem Phänotyp epidermalen Basalzellen und bilden einen Monolayer aus. Wird die Calciumionenkonzentration auf Werte  $> 0,1$  mM erhöht, bzw. auf physiologische Werte eingestellt (1,2 mM), sinkt die Proliferationsrate und die Differenzierung, Stratifizierung, Kornifizierung und Umstrukturierung des Zytoskeletts sowie die Formation junctionaler Verbindungen (Desmosomen, adhaerens junctions, gap junctions) werden im Verlauf mehrerer Tage induziert. Die Expressierung spezifischer, epidermaler

Proteinmarker (z.B. Involucrin, Filaggrin, Transglutaminase, Keratin 1 und 10) wird moduliert und der keratinozytäre Phänotyp ähnelt zunehmend suprabasalen Zellen. Die Induktion des Differenzierungsprozesses beginnt z.T. bereits innerhalb von Minuten (z.B. Desmosomenformation) bis wenigen Stunden (z.B. Filaggrinsynthese) und ist nach 48 bis 72 Stunden irreversibel, d.h. durch Austausch des Calcium-haltigen Mediums gegen Calcium-armes Medium kann der Vorgang nicht mehr umgekehrt werden. Innerhalb von 3 bis 4 Tagen tritt die terminale Differenzierung ein. Unterhalb einer Calciumionenkonzentration von  $< 0,01$  mM kann ein generalisierter Zelltod beobachtet werden, was die physiologische Bedeutung dieses Kations bestätigt [35, 78, 108, 126, 204, 205, 246, 254, 256, 301, 325, 378, 395, 426, 429, 454, 470, 526, 539, 540, 541, 566, 567].

Über die Öffnung von Ionenkanälen (extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx) [29, 334, 335, 336] und die Aktivierung der membranären Phospholipase C (IP<sub>3</sub>-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern [28]) [252, 507, 566, 570], kann die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration direkt Einfluß auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nehmen [123, 125, 207, 254, 275, 334, 341, 393, 394, 396, 413, 451, 452]. So führt z.B. die Erhöhung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0,05 mM auf 1,2 mM zu einer 10- bis 20-fachen Steigerung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes [566]. Dies macht den biologischen Effekt, den die Erhöhung der extrazellulären Ionenkonzentration hervorruft, verständlich. Die intrazelluläre Calciumionenkonzentration kann aber nicht nur über den extrazellulären Calciumgehalt gesteuert werden. Seit einigen Jahren ist bekannt, daß eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation epidermaler Keratinozyten zu einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt [274, 382, 562]. Soweit derzeit bekannt, kann dieser Effekt z.B. durch einen positiven „receptor crosstalk“ [358] zum  $\alpha_1$ -Adrenozeptorsystem ( $\alpha_1$ -gekoppelter extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle [188], IP<sub>3</sub>-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung aus intrazellulären Speichern [28]), dessen Existenz in der Epidermis belegt ist [102], bewirkt werden. Auch die Öffnung membrangebundener Ionenkanäle ( $\text{Ca}^{2+}$ -Influx), die durch Gs $\alpha$  [538], cAMP [160, 333] oder die PKA [390] aktiviert werden, kann eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration hervorrufen.

Aus dem „receptor crosstalk“ und der konsekutiven Aktivierung des  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-systems kann neben der  $IP_3$ -vermittelten  $Ca^{2+}$ -Freisetzung eine DAG vermittelte Aktivierung der Proteinkinase C resultieren [373]. Die Proteinkinase C kann wiederum eine Phosphorylierung der  $\beta$ -Adrenozeptoren bewirken, was, entsprechend der Proteinkinase A-vermittelten Phosphorylierung, zu einer Desensibilisierung und konsekutiven Erniedrigung der exprimierten AR-Dichte führen kann [137, 221, 272, 294, 498].

Ausgehend von dieser Kettenreaktion erklärt sich möglicherweise das inverse Verhältnis zwischen der aktuellen, intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration und der exprimierten Adrenozeptordichte in den einzelnen Schichten der Epidermis: Während basal die exprimierte Adrenozeptordichte und die  $\beta$ -adrenerge Aktivität hoch sind und mit fortschreitender Differenzierung der Zellen um bis zu 50% sinken [6, 169, 249, 312, 440, 441, 443, 506], ist für die intra-, aber auch extrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration ein ansteigender Gradient entsprechend dem Differenzierungsgrad der Zellen, mit einer maximalen  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Stratum granulosum, nachweisbar [341, 342]. Möglicherweise bewirkt die basal hohe Adrenozeptordichte einen intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Anstieg [274, 382, 562] und induziert infolgedessen eine zunehmende Zelldifferenzierung, verbunden mit einer sinkenden Proliferationsrate. Infolge der PKC-Aktivierung (über den „receptor crosstalk“) oder generell aufgrund der zunehmenden Zelldifferenzierung, kann es konsekutiv zu einer Abnahme der exprimierten Adrenozeptordichte kommen. Auch, wenn die beiden hier beteiligten Botenstoffe („2<sup>nd</sup>-messenger“) cAMP und  $Ca^{2+}$ -Ionen bzgl. ihres vermittelnden physiologischen Gesamteffektes (Zelldifferenzierung, Proliferationshemmung) synergistisch arbeiten [307], so scheinen sie doch im Verlauf des Differenzierungsprozesses nacheinander zu wirken.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob die exprimierte  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte direkt über die extrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration reguliert werden kann oder ob komplexere Vorgänge in der intakten Epidermis in vivo, wie z.B. ein allmählich ansteigender, dem jeweiligen Differenzierungsstatus der Zelle angepaßter  $Ca^{2+}$ -Gradient, dermal-epidermale Interaktionen, das Einwirken endogener Katecholamine, anderer Hormone (z.B. Acetylcholin) sowie verschiedenster

Wachstumsfaktoren, die in dem hier angewendeten Kulturmodell ganz oder teilweise fehlen, im Rahmen der dynamischen  $\beta$ -Adrenozeptorregulation vonnöten sind.

Zur Ermittlung des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Effektes auf die exprimierte  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte wurden NHK über 24, 48 oder 72 Stunden mit Calciumchlorid in aufsteigender Konzentration von 0,01 mM bis 2,0 mM inkubiert. Keratinozyten, die über 72 Stunden in 0,01 mM  $\text{CaCl}_2$ -haltigem Medium inkubiert wurden, zeigten deutliche Zeichen des Vitalitätsverlustes (Ablösung vom Untergrund, Volumenzunahme, Chromatinverdichtung, Anfärbung mit Trypanblau). Dieses Verhalten steht in Einklang mit einer publizierten Beobachtung, in der bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen  $< 0,01$  mM ein generalisierter Zelltod festgestellt wurde [126]. Aufgrund dieser morphologischen Veränderungen wurden diese Zellen von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Die exprimierte  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte wies in keiner Versuchsgruppe eine signifikante, konzentrations- bzw. zeitabhängige Veränderung im Vergleich zur Kontrolle auf (s. Abb. 25 und 26, S. 61 und 62). Auch für die Dissoziationskonstante konnte keine Abweichung im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden (s. S. 62), was auf eine gleichbleibende Rezeptoraffinität zum bindenden Radioliganden hinweist.

Soweit bekannt, wurde bislang nur eine Studie an humanen Keratinozyten veröffentlicht, in der, ausgehend von ähnlichen Kulturbedingungen, der Einfluß der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf die exprimierte  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte untersucht wurde [440]. Diese Untersuchung, in der eine 30 bis 40%ige Abnahme der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Inkubation nachgewiesen wurde, scheint im Widerspruch zu den hier dargestellten Ergebnissen einer unverändert hohen  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte zu stehen. Allerdings ist anzumerken, daß in jener Studie NHK in „low“ (0,1 mM)  $\text{Ca}^{2+}$ -Medium und dem Zusatz von Wachstumsfaktoren (EGF, BPE) (entspricht undifferenzierten Zellen) mit NHK in „low“ (0,1 mM) und „high“ (1,5 mM)  $\text{Ca}^{2+}$ -Medium jeweils ohne Wachstumsfaktoren (entspricht differenzierenden bzw. differenzierten Zellen) verglichen wurden. Während die  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte nach Depletion der Wachstumsfaktoren in „low“  $\text{Ca}^{2+}$ -Medium signifikant abfiel, war durch die Erhöhung der Calciumionenkonzentration im Wachstumsfaktor-freien Medium keine deutlich weitere Verminderung nachweisbar, so daß hier der entscheidende Reduktionsfaktor im Entzug der Wachstumsfaktoren und nicht in der erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu sehen ist. Zudem geht aus dieser

Arbeit nicht hervor, über welche Zeitspanne die Calciuminkubation erfolgte, was einen direkten Vergleich mit den hier dargestellten Daten erschwert.

Aus anderen Publikationen ist bekannt, daß kultivierte Keratinozyten bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $> 1 \text{ mM}$  bereits nach 5 Minuten die Formation von Desmosomen initiieren und diesen Prozeß innerhalb von 2 bis 5 Stunden abschließen [206]. Nach 6 Stunden sind erste biochemische Veränderungen, wie z.B. die Synthese von Filaggrin und ein Anstieg der Transglutaminaseaktivität, zu verzeichnen [78, 395]. Die Zellproliferation sinkt nach 5 Stunden und erreicht ihr Minimum zwischen 24 und 36 Stunden [395]. Innerhalb von 48 bis 72 Stunden wird der Prozeß der terminalen Differenzierung eingeleitet [566].

Aufgrund dessen ist anzunehmen, daß nach einer Calciuminkubation von 48 bis 72 Stunden eine Reduktion der exprimierten Adrenozeptordichte erkennbar wäre, wenn diese Folge der erhöhten extrazellulären Calciumionenkonzentration oder des  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Differenzierungsvorganges wäre. Es ist jedoch zu erwähnen, daß im Rahmen der hier durchgeführten Studie kein direkter Nachweis bzgl. des stattgefundenen,  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Differenzierungsgrades erfolgte (z.B. Nachweis von Differenzierungsmarkern, Änderung der Zellmorphologie). Da humane Keratinozyten im Vergleich zu Nagerkeratinozyten, an denen der oben angeführte zeitliche Differenzierungsprozeß studiert wurde, sowohl in quantitativer als auch qualitativer Hinsicht unterschiedlich auf die extrazelluläre Calciumionenkonzentration reagieren (z.B. proliferieren humane Keratinozyten im Gegensatz zu Nagerkeratinozyten bei physiologischen Calciumkonzentrationen) [395], ist nicht ausgeschlossen, daß die hier ausgebliebene AR-Erniedrigung Folge eines nicht oder nur unvollständig vollzogenen Differenzierungsprozesses ist. Des weiteren ist denkbar, daß unter den hier eingesetzten Kulturbedingungen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Zelldifferenzierung bzw. AR-Verminderung zeitverzögert, d.h. erst nach Ablauf von z.B. 96 Stunden einsetzt, so daß in diesem Fall ein verlängerter Beobachtungszeitraum von 4 bis 7 Tagen evtl. Aufschluß hinsichtlich dieses Punktes erbringen könnte.

Das Ergebnis des hier durchgeführten konzentrations- und zeitabhängigen Inkubationsversuches widerlegt zumindest für das hier verwendete humane Keratinozytenmodell innerhalb eines Untersuchungszeitraumes von 72 Stunden die These



einer direkten Koppelung der exprimierten Adrenozeptordichte an die extra- bzw. intrazelluläre Calciumionenkonzentration. Die Simplifizierung „Zunahme der Calciumionenkonzentration gleich Zelldifferenzierung gleich Abnahme der exprimierten  $\beta$ -Adrenozeptordichte“ ist aufgrund der hier ermittelten Ergebnisse nicht uneingeschränkt vertretbar. Es erscheint wahrscheinlicher, daß die in vivo beobachtete abnehmende Adrenozeptordichte über komplexere Reaktionen im Verlauf des Differenzierungsprozesses reguliert wird.

Ausgehend vom derzeitigen Wissensstand ist am ehesten die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Phospholipase C-Aktivierung [252, 507, 566, 570] und der positive „receptor-crosstalk“ zum  $\alpha_1$ -Adrenozeptorsystem [358] sowie die daraus resultierende Proteinkinase C-Aktivierung für die in vivo beobachtete abnehmende Adrenozeptordichte denkbar, letztlich aber nicht bewiesen. Es konnte zwar nachgewiesen werden, daß über eine Erhöhung der extrazellulären Calciumionenkonzentration die Phospholipase C in Nagerkeratinozyten aktiviert werden kann und daraus ein konsekutiver Anstieg von  $\text{IP}_3$  resultiert [252, 507, 570]. Eine signifikante Proteinkinase C Aktivierung (u.a. Membrantranslokation vom Zytosol zur Zellmembran) konnte jedoch nicht dokumentiert werden, was möglicherweise auf eine gesteigerte DAG-Metabolisierung oder die speziellen Kulturbedingungen in vitro zurückgeführt werden kann [252]. Es ist bekannt, daß unter serumfreien Kulturbedingungen die Calcium-induzierte Phospholipase C-Aktivität herabgesetzt ist [566]. Während in serumhaltigem Medium nach Erhöhung der extrazellulären Calciumionenkonzentration eine 10- bis 20-fache Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration erzielt werden kann, ist in serumfreiem Medium, wie in der hier vorliegenden Arbeit, eine weniger als 5-fache Erhöhung zu verzeichnen [566]. Somit ist auch eine reduzierte DAG-Synthese und PKC-Aktivierung konsekutiv anzunehmen. Zudem ist bekannt, daß schnell proliferierende Keratinozyten in vitro, ebenso wie psoriatische Keratinozyten, einen 2- bis 6-fach erhöhten intrazellulären Calmodulingehalt aufweisen [122, 523, 556]. Calmodulin ist ein in allen Zellarten vertretenes Protein, das nach Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen einen Komplex mit verschiedenen Enzymen ausbildet und deren Aktivität moduliert. U.a. resultieren daraus in zahlreichen Gewebearten eine Steigerung der Proliferationsrate [176, 237, 500], Stimulation einer membranären ATPase, die zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux führt [51] sowie die Aktivierung der

cAMP-Phosphodiesterase [64, 232, 365, 407] und Inhibition der Proteinkinase C [11]. Unter der Voraussetzung, daß der durch die zuvor langfristige Erniedrigung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes im Kulturmedium erhöhte Calmodulingehalt auch nach der  $\text{Ca}^{2+}$ -Supplementierung noch über eine gewisse Zeitspanne überdurchschnittlich erhöht ist, ist anzunehmen, daß daraus eine Beeinflussung des Adrenozeptorsystems resultiert, die von der in vivo Situation gesunder Haut abweicht, jedoch vermutlich dem Zellverhalten psoriatischer Haut entspricht. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, daß die Proteinkinase C in läsionaler psoriatischer Epidermis, im Vergleich zu nichtläsionaler oder normaler Epidermis, signifikant erniedrigt ist [133, 199, 218].

Durch die Inhibition der Proteinkinase C wird eine Phosphorylierung des  $\beta_2$ -Adrenozeptors verhindert und durch die Aktivierung der PDE der intrazelluläre cAMP-Gehalt vermindert. Somit kann der Desensibilisierungsprozeß minimiert werden, was zwar die hier beobachtete konstante Adrenozeptordichte erklären würde, jedoch nicht die in der Literatur beschriebene AR-Erniedrigung in psoriatischer Epidermis [250, 482, 484]. Es muß davon ausgegangen werden, daß in psoriatischer Epidermis wesentlich komplexere Vorgänge, einschließlich zahlreicher noch ungeklärter pathogenetischer Faktoren, beteiligt sind.

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Differenzierungsprozeß in vitro ähnelt in mancherlei Aspekten dem physiologischen Verlauf in vivo, dennoch weicht er in einigen wesentlichen Punkten von der in vivo ablaufenden, sukzessiven Zelldifferenzierung ab: Zahlreiche Prozesse, wie z.B. die Steigerung der Transglutaminaseaktivität, erfolgen bereits innerhalb weniger Stunden, während dies in vivo erst mehrere Tage nach Ausschleusung der Tochterzelle aus dem Stratum basale in das Stratum granulosum geschieht. Ferner werden in vitro innerhalb der ersten 48 Stunden nach erfolgter  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung keine wesentlichen Änderungen in der Proteinsynthese verzeichnet [395]. Insbesondere die Synthese von Keratin-Polypeptiden, den Hauptdifferenzierungsprodukten in vivo, wird nicht durch die Calciumerhöhung verändert [78, 204]. In vitro läßt sich ein überstürzt ablaufender Differenzierungsprozeß beobachten, der sich anscheinend ungeordnet und unvollständig vollzieht und somit die ausbleibende Adrenozeptorerniedrigung erklären könnte.

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Differenzierungsprozeß in vivo ist an einen fein abgestimmten Calciumgradienten gebunden, der dem jeweiligen Differenzierungszustand der Zelle, die

je nach Differenzierungsgrad unterschiedlich sensibel auf die sie umgebende Calciumionenkonzentration reagiert, angepaßt ist [395, 451, 566]. Geringste Abweichungen von der Konzentration im Hinblick auf den jeweiligen Differenzierungsstatus führen zu gravierenden Störungen [341]. Hingegen erfolgt im Rahmen der Differenzierungsinduktion in vitro die Inkubation nach einem starren Konzentrationsschema, was das unterschiedliche Differenzierungsverhalten und die abweichende Adrenozeptorregulation in vitro im Vergleich zu der in vivo Situation erklären könnte.

Ferner wird seit kurzem angenommen, daß die extrazelluläre Calciumionenkonzentration nicht den alleinigen Regulationsfaktor der Zelldifferenzierung in vitro darstellt [101, 302, 403, 452]. Die Calciumionenkonzentration reguliert nicht im Sinne einer „alles oder nichts“ Reaktion die Zelldifferenzierung, sondern kontrolliert am ehesten das Ausmaß der Zelldifferenzierung [395]. Zahlreiche andere Faktoren, wie z.B. die aktuelle Zelldichte, Wachstumsfaktoren, Zelladhäsionsmoleküle und die Mediumzusammensetzung, scheinen auch eine wesentliche Rolle während der Induktion des Differenzierungsprozesses zu spielen [302, 395, 403, 516]. Diese These wird u.a. durch die Tatsache gestützt, daß die Differenzierungsinduktion in vivo bereits im Stratum spinosum einsetzt, der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient jedoch erst im Stratum granulosum deutlich ansteigt und somit koinzident mit der terminalen Differenzierung, aber nicht zwangsläufig mit der Induktion verläuft [126, 341].

Zusammengefaßt lassen die hier erhobenen Daten keinen Einfluß der extrazellulären Calciumionenkonzentration auf das  $\beta_2$ -Adrenozeptorsystem im untersuchten Konzentrations- und Zeitbereich erkennen. Ausgehend von der in vivo Beobachtung, daß die  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte mit zunehmendem Differenzierungsstatus der Zelle abnimmt [249, 440, 441, 443], und dieser wiederum durch die extrazelluläre Calciumionenkonzentration reguliert wird [35, 204, 206, 341, 566], erscheint diese Beobachtung widersprüchlich. Da die extrazelluläre Calciumionenkonzentration aber nur ein Faktor ist, über den die Zelldifferenzierung in vitro gesteuert werden kann, beruht die in vivo beobachtete Adrenozeptorniedrigung möglicherweise auf anderen, am Differenzierungsprozeß beteiligten und in vitro fehlenden Faktoren. Auch der besondere keratinozytäre Zellstatus im hier verwendeten serumfreien Kulturmodell (hyper-

proliferative, basaloide Zellen; hoher Calmodulinspiegel), der eher psoriatischen, denn gesunden Keratinozyten ähnelt, mag Ursache des hier beobachteten Effektes sein. Ferner ist eine zeitverzögerte Adrenozeptorveränderung, die außerhalb des hier dokumentierten Beobachtungszeitraumes liegt, denkbar.

Alle hier dargestellten Erklärungsversuche bleiben letztlich spekulativ, da die exakten Zusammenhänge zwischen dem epidermalen  $\beta_2$ -Adrenozeptorsystem, der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, dem  $\text{IP}_3/\text{DAG}/\text{Ca}^{2+}/\text{PKC}$ -System und dem keratinozytären Differenzierungsprozeß, insbesondere auf molekularer Ebene, nur unvollständig aufgeklärt sind.

Die Simplifizierung „Zunahme der extrazellulären Calciumionenkonzentration gleich Zelldifferenzierung gleich Abnahme der exprimierten  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte“ ist aufgrund der hier ermittelten Ergebnisse nicht uneingeschränkt vertretbar. Es erscheint wahrscheinlicher, daß die dynamische Regulation der epidermalen  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte in vivo über komplexere Reaktionen im Verlauf des Differenzierungsprozesses reguliert wird, die parallel und unabhängig von dem  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Differenzierungsvorgang ablaufen.

#### 4.4. Klinische und therapeutische Schlußfolgerungen

Das  $\beta$ -Adrenozeptor-cAMP-System gilt neben dem  $\text{IP}_3/\text{DAG}/\text{Ca}^{2+}/\text{PKC}$ -System als eines der Schlüsselsysteme in der Vermittlung, Koordinierung und Regulation der epidermalen Proliferation und Differenzierung [66, 89, 132, 138, 193, 236, 324, 329, 385, 404, 507, 531, 532, 534, 562]. Ein dysfunktionelles,  $\beta$ -adrenerges Signaltransduktionssystem wird als eine der pathogenetischen Ursachen der Psoriasis vulgaris diskutiert [169, 185, 220, 229, 231, 312, 322, 407, 482, 484, 530, 533, 536, 558, 563], deren komplexe, multifaktorielle Pathogenese bis heute nur unvollständig verstanden wird. Derzeit wird u.a. davon ausgegangen, daß ursächlich, neben einer verminderten Adenylatcyclaseaktivität, eine reduzierte exprimierte  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte für die Fehlregulation auf zellulärer Ebene und den daraus resultierenden hyperproliferativen, dedifferenzierten Status verantwortlich ist. Ferner wird ein dysfunktionelles,  $\beta$ -adrenerges Antwort-

verhalten auf unphysiologische Reize, u.a. im Rahmen regenerativer Prozesse (z.B. Wundheilung), mit einer überschießenden Proliferation und verminderten Differenzierung assoziiert (sog. Köbner-Phänomen bei bekannter Psoriasis vulgaris). Durch das Trauma wird ein bereits labiles, epidermales  $\beta$ -Adrenozeptorsystem derart manipuliert, daß die Zelle in ihrem physiologischen Antwortverhalten überschießend reagiert und gegenregulatorische Prozesse weitgehend unwirksam werden [312, 530].

Fortschritte im Verständnis von Ätiologie und Pathogenese eröffnen die Möglichkeit von innovativen, zielgerichteten, therapeutischen Optionen [381]. Ausgehend von der zuvor diskutierten pathophysiologischen Hypothese liegt es nahe, eine spezifische Psoriasis vulgaris-Therapie an der  $\beta$ -adrenergen Fehlregulation, bzw. ihren Folgen auf zellulärer Ebene, ansetzen zu lassen.

In einer publizierten Studie wurde über die Wirksamkeit einer topischen Isoprenalintherapie (0,1%) in der Behandlung der Psoriasis vulgaris berichtet [82]. Theoretische Grundlage dieses Therapieansatzes war die Annahme, daß über eine Aktivierung des epidermalen  $\beta$ -Adrenozeptorsystems der intrazelluläre cAMP-Gehalt erhöht würde und damit konsekutiv eine Zelldifferenzierung und Proliferationshemmung induziert werden könnte. Nach 10-tägiger Therapie wiesen alle 12 behandelten Patienten im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche, klinische Remission auf (Abnahme der Schuppung). Diese hielt in 9 Fällen über 6 Monate an, während 3 Patienten innerhalb von 2 Monaten ein Rezidiv erlitten. Leider gibt es, soweit derzeit bekannt, keine weiteren Studien, die diese Beobachtung bestätigen oder widerlegen könnten. Ausgehend von den in dieser Arbeit erhobenen Daten ist zu erwarten, daß nach kontinuierlicher Isoprenalinapplikation eine sukzessive Desensibilisierung des  $\beta$ -Adrenozeptorsystems eintritt, die sich klinisch als Tachyphylaxie manifestiert. Die Tachyphylaxie im Rahmen einer medikamentösen Therapie ist einer der Hauptfaktoren, der die Effizienz und Dauer vieler Therapeutika einschränkt. Auch wenn durch die topische Applikation und die spezifische in vivo-Situation der Desensibilisierungsprozeß zeitverzögert einsetzt, ist nach einer eventuellen, initialen Befundbesserung ein dauerhafter Therapieerfolg unwahrscheinlich und ein Rezidiv absehbar. Eine erfolgreiche, langfristige Therapie mit  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten ist nur denkbar, wenn der physiologisch eintretende Desensibilisierungsprozeß minimiert oder gar verhindert werden könnte. Aus den hier erhobenen Daten lassen sich

für die klinische Anwendung Behandlungsstrategien ableiten. So kann der Desensibilisierungsprozeß z.B. durch eine intermittierende Therapie mit möglichst geringen Dosen an  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten (s. 4.3.1., S. 88) oder durch eine Kombinationstherapie mit Glukokortikoiden, die sowohl permissiv wirken, indem sie die  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte erhöhen (s. 4.3.3., S. 105), als auch eine Protektion und Rekonstitution des Adrenozeptorsystems begünstigen (s. 4.3.4., S. 114), minimiert werden. Des weiteren ist bekannt, daß der  $\beta_3$ -Adrenozeptor aufgrund eines kurzen C-terminalen Endes nur an wenigen Aminosäuren phosphoryliert werden kann und aufgrund dessen nur in geringem Umfang einem Desensibilisierungsprozeß unterliegt [251]. Wäre es möglich, die Phosphorylierung des  $\beta_2$ -Adrenozeptors gezielt zu unterbinden, könnte die Therapie mit  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten eine erfolgversprechende Therapiealternative darstellen. Das Verstehen der zellulären und biochemischen Prozesse im Verlauf der  $\beta$ -adrenergen Desensibilisierung eröffnet neue Wege in der Entwicklung rationaler Strategien, um diesen Prozeß zu verhindern und somit die therapeutische Effizienz von  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten zu steigern.

Weitere Studien untersuchten die Wirksamkeit von topisch bzw. systemisch applizierten Phosphodiesteraseinhibitoren (Methylxanthine, z.B. Theophyllin) in der Psoriasisstherapie [226, 319, 412]. Diese führen in vitro zu einer 5- bis 6-fachen Steigerung des intrazellulären cAMP-Gehaltes [239] und üben einen inhibitorischen Effekt auf die epidermale Mitose ( $G_2$ -Phase) aus [66, 329]. Der Wirkmechanismus dieser Substanzgruppe ist bidirektional ausgerichtet: Über die Hemmung der PDE wird u.a. der intrazelluläre cAMP-Gehalt erhöht und somit eine Stimulation des  $\beta$ -Adrenozeptorsystems initiiert. Des weiteren antagonisieren PDE-Inhibitoren die Wirkung von Adenosin an den Adenosinrezeptoren ( $A_1$ -Rezeptoren) und beeinflussen darüber die  $Ca^{2+}$ -Ionenverteilung in der Zelle [546]. Durch topische Applikation von Aminophyllin 4% über 2 Monate wurde ein Ansprechen bei 85% der Psoriasispatienten erreicht. In 22% der Fälle wurde eine Abheilung erzielt. Über den weiteren Therapieverlauf einschließlich Rezidivquote wurde nicht berichtet [319]. Unter systemischer Therapie mit Theophyllinderivaten (Aminophyllin 1200 mg/d bzw. Dyphyllin 1600 mg/d bis 3200 mg/d) wurde nach 1- bis 6-monatiger Therapie bei annähernd 50% der Patienten eine Remission erzielt, wohingegen die anderen 50% keine Befundbesserung aufwiesen. Über die Dauer

des Therapieerfolges und Rezidivquoten wurden keine Angaben gemacht [226]. In einer weiteren Studie wurde Theophyllin (10 mg/kg täglich) in Kombination mit Retinoiden systemisch appliziert. Nach 1-monatiger Therapie trat bei allen Patienten (n = 4) im Vergleich zum Ausgangsbefund sowie im Vergleich zu einer Gruppe, die eine Retinoidmonotherapie erhielt, eine deutliche Verbesserung des klinischen Bildes ein, die über 2 Monate anhielt [412].

Ein therapeutischer Erfolg ist in allen Studien in unterschiedlichem Ausmaß zu erkennen. Hingegen wurde in den meisten Publikationen die Rezidivquote und das Rezidivintervall nicht dokumentiert. Ausgehend von der therapeutischen Überlegung, daß durch Hemmung der PDE der intrazelluläre cAMP-Gehalt erhöht und konsekutiv die damit verbundenen Zelleffekte gesteigert werden können, wird auch bei Psoriatikern der erniedrigte, epidermale cAMP-Spiegel angehoben und die gestörte Proliferation und Zelldifferenzierung normalisiert.

Aus der Asthmatherapie ist bekannt, daß Theophyllin auch dann noch eine therapeutische Wirksamkeit besitzt, wenn bereits gegenüber  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten eine Tachyphylaxie eingetreten ist [509]. Ob dieser Effekt auch an der Epidermis wirksam wird, ist derzeit noch ungeklärt. Aufgrund ihrer pharmakologischen Wirkung erhöhen PDE-Inhibitoren die intrazelluläre cAMP-Konzentration und aktivieren darüber die Proteinkinase A, die am Desensibilisierungsprozeß beteiligt ist (s. 4.3.1, S. 88). Da die PKA, im Gegensatz zur  $\beta$ -AR-Kinase, auch den nicht besetzten  $\beta$ -Adrenozeptor zu phosphorylieren vermag, kann darüber der Desensibilisierungsprozeß eingeleitet werden. Da allerdings die  $\beta$ -AR-Kinase, die nur Agonisten-besetzte Adrenozeptoren phosphoryliert, inaktiviert bleibt, tritt möglicherweise nur eine partielle Desensibilisierung ein und die Tachyphylaxie wird klinisch nur minimal oder gar nicht manifest. Zudem existiert auch nach vollständiger Desensibilisierung ein, wenn auch deutlich reduziertes, funktionelles  $\beta$ -Adrenozeptorsystem, das einen basalen cAMP-Spiegel gewährleistet (s. 4.3.1.). Wird dieses cAMP nicht, wie sonst üblich, innerhalb von Sekunden durch die PDE inaktiviert, resultiert möglicherweise trotz erniedrigter  $\beta$ -Adrenozeptordichte eine relativ hohe intrazelluläre cAMP-Konzentration, verbunden mit den daran gekoppelten zellulären Effekten. Zur Überprüfung dieser Hypothese müßte in einer weiterführenden

Studie der Einfluß von Theophyllin auf die in vitro exprimierte AR-Dichte von NHK sowie die intrazelluläre cAMP-Konzentration untersucht werden.

Um das dynamische Regulationsverhalten epidermaler Keratinozyten während einer  $\beta$ -Blockertherapie zu erforschen, wurden in der hier vorliegenden Arbeit NHK mit Propranolol bzw. Alprenolol inkubiert.  $\beta$ -Blocker inhibieren die physiologische,  $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion und begünstigen somit eine intrazelluläre cAMP-Verarmung sowie eine Störung der Calciumhomöostase. Bekanntermaßen können durch eine  $\beta$ -Blockertherapie, unabhängig von den physikochemischen Eigenschaften des applizierten  $\beta$ -Blockersubtyps (Selektivität, PAA, Lipophilie etc.) bei bestehender Prädisposition psoriasiforme Effloreszenzen provoziert werden [71, 166, 211, 253, 462, 477, 479, 481]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß epidermale Keratinozyten entsprechend anderen Zellarten (Lymphozyten, Herz- und Lungenzellen) über ein dynamisch regulierbares  $\beta$ -Adrenozeptorsystem verfügen: Nach Applikation von  $\beta$ -Blockern mit PAA resultiert eine Reduktion und nach Applikation von  $\beta$ -Blockern ohne PAA eine Erhöhung der exprimierten  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte (s. 3.5.2., S. 49).

Von Studien an Patienten, die mit  $\beta$ -Blockern therapiert wurden, ist bekannt, daß nach Absetzen von  $\beta$ -Blockern ohne PAA ein kompensatorischer „rebound“-Effekt induziert werden kann (sog. „propranolol withdrawal syndrome“), der sich klinisch als kardiale Hypersensitivität mit verstärkter adrenerger Symptomatik manifestiert [14]. Möglicherweise wird in der Epidermis nach Unterbrechung einer systemischen  $\beta$ -Blockertherapie ohne PAA ebenfalls ein hyperadrenerger Status induziert, der sich konsekutiv mit einer deutlich beschleunigten Abheilungsrate gegenüber psoriasiformen Effloreszenzen manifestiert, während nach  $\beta$ -Blockertherapie mit PAA aufgrund der reduzierten  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte eine verzögerte Abheilung resultieren könnte. Diese physikochemische Eigenart der verschiedenen  $\beta$ -Blocker hat somit möglicherweise Auswirkung auf die Abheilungsrate und -geschwindigkeit der provozierten, psoriasiformen Effloreszenzen nach Unterbrechung der  $\beta$ -Blockertherapie. Leider existieren derzeit, soweit bekannt, keine diesbezüglichen klinischen Studien. Berichte über die Eruption psoriasiformer Effloreszenzen während einer  $\beta$ -Blockertherapie



beschränken sich auf Untersuchungen bzgl. der  $\beta$ -Blockersubtypen (z.B. Selektivität), des erscheinungsfreien Intervalls bis zur Manifestation, der Schwere der Nebenwirkungen und der Assoziation mit anderen bekannten, dermatologischen Begleiterkrankungen. Zur Überprüfung eines möglichen Zusammenhanges zwischen  $\beta$ -Blockersubtyp und Abheilungsverlauf wären ergänzende, klinische Studien notwendig. Des weiteren konnte in der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, daß Glukokortikoide die exprimierte  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte auf rasch proliferierenden NHK erhöhen und somit die Effizienz der adrenergen Signaltransduktion steigern können. Dieses Ergebnis stimmt mit autoradiographischen Befunden an normaler und atopischer Epidermis überein, denzufolge die exprimierte AR-Dichte um ein 2- bis 3-faches nach topischer GC-Applikation gesteigert werden kann [485].

Glukokortikoide modulieren die Adrenozeptorexpression im Sinne einer heterologen Regulation vorwiegend über eine Beeinflussung der Transkriptionsrate und weniger über eine Modifikation translationaler oder posttranslationaler Prozesse [72, 181, 307, 316, 391]. Neben der Beeinflussung zahlreicher anderer Zielgene (z.B. Keratine, Interleukine etc. [257]), die gleichfalls zum Therapieerfolg einer Glukokortikoidmedikation beitragen, verbessert eine GC-Therapie über die Modulation der  $\beta_2$ -Adrenozeptorgentranskription die Effizienz der adrenergen Signaltransduktion und begünstigt darüber die Zelldifferenzierung und Proliferationsinhibition (sog. permissiver Effekt). Daneben sollen Glukokortikoide über die Induktion von Lipokortinen die Aktivität der Phospholipase  $A_2$  und die Synthese von Arachidonsäuren hemmen, die wiederum die  $\beta$ -adrenerge Antwort unterdrücken (s. S. 113/114) [21, 243, 391].

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß der Glukokortikoideffekt auf die exprimierte  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig verläuft (s. 3.5.3., 3.5.4.1. und 3.5.4.2.). Innerhalb von 48 Stunden kommt es in vitro zu einer Reduktion der GC-induzierten Adrenozeptorerhöhung. Dieser Befund erklärt möglicherweise die klinisch oftmals beobachtete Tachyphylaxie gegenüber applizierten Glukokortikoiden in der Psoriasisstherapie [529].

Retinoide bewirken in dem hier verwendeten Keratinozytenmodell eine dosisabhängige Veränderung der exprimierten  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte. Sie nehmen negativen Einfluß auf das dynamische Regulationsverhalten des epidermalen Adrenozeptorsystems. Die

genauen zellulären Vorgänge, die dazu führen, sind derzeit noch weitgehend ungeklärt. Die therapeutische Hauptwirkung der Retinoide scheint jedoch nicht über das adrenerge Signaltransduktionssystem vermittelt zu werden.

Hingegen führt die Inkubation mit Calciumionen zu keiner nachweisbaren Veränderung der exprimierten  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte in der hier vorliegenden Arbeit. Sie scheinen, obwohl das epidermale  $\beta_2$ -Adrenozeptorsystem eng mit dem  $IP_3/DAG/Ca^{2+}/PKC$ -System verbunden ist, unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen (Calciumionenkonzentration, Inkubationsdauer) keinen Einfluß im Sinne einer kompensatorischen „feedback“-Hemmung oder synergistischen Wirkungsverstärkung auf das  $\beta_2$ -Adrenozeptorsystem zu haben. Die Auswirkung der Calciumionenkonzentration auf die Regulation der epidermalen Differenzierung und Proliferation scheint unabhängig von Veränderungen bzgl. des  $\beta_2$ -Adrenozeptorsystems zu verlaufen.

Die hier durchgeführten Studien gewähren Einblick in das dynamische Regulationsverhalten des epidermalen  $\beta_2$ -Adrenozeptorsystems. Entsprechend anderen Zellarten verfügen Keratinozyten über ein sensibel und rasch reagierendes Regulationssystem, das auf verschiedene Reize sowohl im Sinne einer Desensibilisierung als auch Hypersensibilisierung reagieren kann.

Durch das Verstehen der physiologischen Regulationsmechanismen werden neue Wege in der Entwicklung rationaler Therapiestrategien eröffnet. So wird es evtl. möglich werden, unter Umgehung des Desensibilisierungsprozesses die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade zu aktivieren und den therapeutischen Effekt von Katecholaminen und anderen Pharmaka zu verlängern bzw. zu unterstützen. Dabei sind zahlreiche therapeutische Angriffspunkte denkbar, wie z.B. Phosphorylierungsschutz des  $\beta_2$ -Adrenozeptors oder Modulation der  $\beta$ -AR-Kinase sowie der Proteinkinase A. Auch über die Inaktivierung bekannter, das  $\beta$ -Adrenozeptorsystem inhibierender Substanzen, wie z.B. Phospholipase  $A_2$ , Arachidonsäuremetabolite oder reaktive Sauerstoffmetabolite [243, 372], kann die Effizienz der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion gesteigert werden. So kann z.B. die Synthese von Phospholipase  $A_2$ -Produkten durch Mepacrin und Tetracain, die Freisetzung von Arachidonsäuremetaboliten durch Indometacin und die Aktivität freier Sauerstoffradikale durch Radikalfänger minimiert und die Aktivität des  $\beta$ -Adrenozeptorsystems nachweislich erhöht werden [372]. Möglicherweise kann auch

der zelluläre Erfolg (Zelldifferenzierung, Proliferationsinhibition) über die Aktivierung anderer Rezeptorsysteme, die auch in die cAMP-Kaskade einmünden, erzielt werden. Zu diesen Rezeptorsystemen, deren Existenz auch für die Epidermis nachgewiesen wurde, gehören z.B. der Adenosin ( $A_2$ )-Rezeptor [7, 105, 228], der Prostaglandin ( $E_1$ ,  $E_2$ )-Rezeptor [5] und der Histamin ( $H_2$ )-Rezeptor [7, 227]. Ihre spezifischen Agonisten vermögen evtl. auch in Keratinozyten mit einem desensibilisierten  $\beta$ -Adrenozeptorsystem noch die AC zu aktivieren. In psoriatischer Epidermis, deren Adenylatcyclase durch spezifische  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten nur insuffizient aktiviert werden kann, ist z.B. eine deutliche Aktivitätssteigerung über Prostaglandin  $E_2$  und Adenosin möglich [5, 105, 185, 362], so daß hier über einen Ersatzweg das defekte, epidermale  $\beta_2$ -Adrenozeptorsystem umgangen und die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht werden kann. Auch über eine direkte Substitution von cAMP oder cAMP-Analoga (z.B. Dibutyryl-cAMP) kann in vitro ein entsprechender zellulärer Effekt, wie z.B. eine verlangsamte Zellteilung, erzielt werden [66, 329, 531, 532]. Ferner wäre eine Aktivierung der  $\beta$ -adrenergen Kaskade durch Pertussistoxin oder Cholera toxin möglich [262, 332, 377].

Hypothetisch sind therapeutische Interventionen an jedem Punkt des  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktionssystems denkbar, die eine Aktivierung der Kaskade und eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung zum Ziel haben.

Dennoch muß bedacht werden, daß alle an einem keratinozytären Kulturmodell in vitro durchgeführten Studien die Verhältnisse in vivo nur bedingt repräsentieren, und die Ergebnisse durch in vivo Studien bestätigt werden müßten. Die Haut ist komplex strukturiert und epidermale-dermale Interaktionen, Infiltratzellen sowie der Kontakt zur extrazellulären Matrix und diffundierenden Serumbestandteilen beeinflussen maßgeblich das Differenzierungs- und Proliferationsverhalten epidermaler Zellen [109, 269]. Auch der Differenzierungsstatus der einzelnen Zelle bei ihrer vertikalen Migration durch die Epidermis hat einen entscheidenden Einfluß auf das sekretorische Potential und das Antwortverhalten des jeweiligen Keratinozyten [126, 566]. In Abhängigkeit von ihrem Reifungszustand sezernieren Keratinozyten Katecholamine in unterschiedlichem Ausmaß [443] und weisen mit steigendem Differenzierungsgrad ein zunehmend inaktives  $\beta$ -Adrenozeptorsystem auf [6, 169, 249, 312, 440, 441, 443, 506]. Sie sind in der Lage, verschiedenartige biologische Prozesse zu kontrollieren, indem sie auf autokrinen Wege

Rezeptoren aktivieren. Über „feedback“-Schleifen schützen sie sich gegen einen hohen Agonistenspiegel und regulieren zelluläre Prozesse, wie z.B. Differenzierung und Proliferation [172, 174, 439, 443].

Aufgrund ihrer Variabilität vermag sich die Epidermis flexibel und rasch auf neue Gegebenheiten einzustellen. Z.B. reagiert sie auf Wundreize mit einer rasch einsetzenden, aber zeitlich limitierten Proliferation [126], so daß sich langfristig wieder das dynamische Gleichgewicht zwischen basaler Proliferation und superfizieller Desquamation einstellen kann [339]. Die psoriatische Epidermis reagiert hingegen auf Wundreize mit einer überschießenden Proliferation und reduzierten Differenzierung. Das fein abgestimmte Regulationsnetz ist gestört und kann der gesteigerten mitotischen Aktivität nicht entgegenwirken [312]. Die Pathogenese dieser Erkrankung ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Die alleinige Reduktion auf ein defektes, epidermales  $\beta_2$ -Adrenozeptorsystem, evtl. auch auf einen gestörten, epidermalen Katecholaminhaushalt [487], ist nicht möglich. Allein die Tatsache, daß zahlreiche, effektive Antipsoriatika keinen oder gar negativen Einfluß auf das epidermale  $\beta_2$ -Adrenozeptorsystem haben, weist darauf hin, daß auch andere zelluläre Mechanismen an der Pathogenese dieser Dermatose beteiligt sind.

Dennoch eröffnet sich über die Modulation des epidermalen  $\beta_2$ -Adrenozeptorsystems ein hoffnungsvoller, therapeutischer Ansatz, dessen Möglichkeiten jedoch an psoriatischer Epidermis in vitro und in vivo überprüft werden müssen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß normale, humane Keratinozyten (NHK), die in chemisch definiertem,  $\text{Ca}^{2+}$ -armem Medium kultiviert wurden und eine hohe Proliferationsrate bei gleichzeitig geringer Differenzierungstendenz aufweisen, eine hohe Dichte an  $\beta_2$ -Adrenozeptoren exprimieren. Anhand von Radioligandenbindungsstudien mit dem hydrophilen Radioliganden (-)-[ $^3\text{H}$ ]-CGP-12177 wurde eine durchschnittliche, exprimierte  $\beta_2$ -AR-Dichte von 414 fmol/ $10^7$  Zellen (24935 AR/Zelle);  $\text{SD} \pm 69,1$ ;  $n = 86$  und eine Dissoziationskonstante von 0,1272 nM;  $\text{SD} \pm 0,0544$  nachgewiesen. Die ermittelte  $\beta_2$ -AR-Dichte liegt aufgrund der speziellen Kulturbedingungen, des niedrigen Differenzierungsstatus und der hohen Proliferationstendenz der kultivierten Keratinozyten über der bisher bekannten  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte von ca. 7000 AR/Zelle auf humanen Keratinozyten. Hingegen exprimieren permanente, transformierte, epidermale Zelllinien (z.B. A431, HEL) eine z.T. weitaus höhere Dichte von bis zu 50000 AR/Zelle. Die ermittelte Dissoziationskonstante, als Maß für die Affinität des  $\beta_2$ -Adrenozeptors zum bindenden Liganden, liegt im Größenordnungsbereich vergleichbarer Studien.

Es konnte gezeigt werden, daß die exprimierte  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte keine starre Größe darstellt, sondern einer dynamischen Regulation unterliegt. Entsprechend anderen Gewebearten (Herz, Lunge, Blutzellen) reagiert das epidermale  $\beta$ -Adrenozeptorsystem auf eine kontinuierliche Agonistenexposition mit einer konzentrations- und zeitabhängigen Erniedrigung und auf einen Agonistenentzug (entspricht einer Inkubation mit einem  $\beta$ -Blocker ohne PAA) mit einer Erhöhung der exprimierten AR-Dichte (homologe Regulation).

Das  $\beta$ -Adrenozeptor-cAMP-System gilt neben dem  $\text{IP}_3/\text{DAG}/\text{Ca}^{2+}/\text{PKC}$ -System als eines der Schlüsselsysteme in der Vermittlung, Koordinierung und Regulation der epidermalen Proliferation und Differenzierung. Ein dysfunktionelles,  $\beta$ -adrenerges Signaltransduktionssystem wird als eine der pathogenetischen Ursachen der Psoriasis vulgaris, einer mit epidermaler Hyperproliferation und Dedifferenzierung einhergehenden Dermatose, diskutiert, deren komplexe, multifaktorielle Pathogenese bis heute nur unvollständig verstanden wird.

Die Inkubation mit verschiedenen Antipsoriatika zeigte einen sehr unterschiedlichen Einfluß der Agenzien auf die exprimierte  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte. Hingegen konnte in nahezu allen Gruppen keine signifikante Veränderung der Dissoziationskonstanten ermittelt werden (Ausnahme: Alprenololinkubation). Die Inkubation mit Hydrokortison und Dexamethason führte zu einer Erhöhung der  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte, die sowohl von der glukokortikoiden Potenz des Steroids als auch der Konzentration und der Inkubationsdauer abhängig war (heterologe Regulation). Koinkubationsversuche mit Isoprenalin, einem potenten  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten, zeigten, daß der Agonisten-induzierte Desensibilisierungsprozeß durch Glukokortikoide abgeschwächt und die Rekonstitution eines desensibilisierten  $\beta_2$ -Adrenozeptorsystems beschleunigt werden kann.

Hingegen führten Retinoide im hier verwendeten Keratinozytenmodell zu einer konzentrationsabhängigen Erniedrigung der exprimierten  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte, während  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die in vitro mit der Induktion einer epidermalen Zelldifferenzierung und Proliferationsinhibition assoziiert werden, keinen signifikanten Einfluß auf die exprimierte  $\beta_2$ -Adrenozeptordichte erkennen ließen. Der therapeutisch wirksame Mechanismus dieser beiden Agenzien scheint nicht direkt an das epidermale  $\beta_2$ -Adrenozeptorsystem gekoppelt zu sein. Dies impliziert, daß die von jeher als multifaktoriell angesehene Pathogenese der Psoriasis vulgaris nicht allein in einer defekten, epidermalen  $\beta$ -Adrenozeptor-cAMP-Kaskade begründet ist.

Das hier verwendete epidermale Keratinozytenmodell stellt ein in vitro-Kultursystem dar, in dem unter definierten Bedingungen das epidermale,  $\beta$ -adrenerge Regulationsverhalten studiert werden kann. Die Erkenntnisse aus den Inkubationsversuchen eröffnen neue Möglichkeiten in der Entwicklung von innovativen, zielgerichteten, therapeutischen Optionen.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aarons RD, Nies AS, Gal J, Hegstrand LR, Molinoff PB (1980) Elevation of  $\beta$ -adrenergic receptor density in human lymphocytes after propranolol administration. *J Clin Invest* 65: 949-957
2. Aarons RD, Molinoff PB (1982) Changes in the density of beta adrenergic receptors in rat lymphocytes, heart and lung after chronic treatment with propranolol. *J Pharmacol Exp Ther* 221: 439-443
3. Aarons RD, Nies AS, Gerber JG, Molinoff PB (1983) Decreased beta adrenergic receptor density on human lymphocytes after chronic treatment with agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 224: 1-6
4. Abell CW, Monahan TM (1973) The role of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate in the regulation of mammalian cell division. *J Cell Biol* 59: 549-558
5. Adachi K, Yoshikawa K, Halprin KM, Levine V (1975) Prostaglandins and cyclic AMP in epidermis. *Br J Dermatol* 92: 381-388
6. Adachi K, Iizuka H, Halprin KM, Levine V (1980) Epidermal cyclic AMP is not decreased in psoriasis lesions. *J Invest Dermatol* 74: 74-76
7. Adachi K, Halprin KM, Takeda J, Nemoto J, Aoyagi T, Iizuka H, Yoshikawa K, Levine V (1982) Epidermal surface receptors which link pharmacological mediators to the adenylate cyclase system. *Br J Dermatol* 107 (Suppl 23): 111-118
8. Affolter H, Hertel C, Jaeggi K, Portenier M, Staehelin M (1985) (-)-S-[<sup>3</sup>H]CGP-12177 and its use to determine the rate constants of unlabeled  $\beta$ -adrenergic antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 925-929
9. Ahlquist RP (1948) A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* 153: 586-600
10. Ahmad S, Chrétien P, Daniel EE, Shen SH (1990) Characterization of beta adrenoceptors on cultured endothelial cells by radioligand binding. *Life Sci* 47: 2365-2370
11. Albert KA, Wu WCS, Nairn A, Greengard P (1984) Inhibition by calmodulin of calcium/phospholipid-dependent protein phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3622-3625

12. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1987) Die Zellkultur. Eukaryonten-Zelllinien sind eine gute Quelle für homogene Zellpopulationen. In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (Hrsg) Molekularbiologie der Zelle. 1. Korrigierter Nachdruck 1987 der 1. Auflage 1986, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, S 176-177
13. Albers KM, Woodrow Setzer R, Taichman LB (1986) Heterogeneity in replicating population of cultured human epidermal keratinocytes. *Differentiation* 31: 134-140
14. Alderman EL, Coltart DJ, Wettach GF, Harrison DC (1974) Coronary artery syndromes after sudden propranolol withdrawal. *Ann Intern Med* 81: 625-627
15. Aoyagi T, Umeda K, Iizuka H, Miura Y (1981) Effect of hydrocortisone on the adenylate cyclase system of the skin - in vitro explant study. *Br J Dermatol* 105: 257-266
16. Applebury ML, Hargrave PA (1986) Molecular biology of the visual pigments. *Vision Res* 26: 1881-1895
17. Assem ESK, Banks RA (1973) Practolol induced drug eruptions. *Proc Roy Soc Med* 66: 179-180
18. Baker BS, Fry L (1992) The immunology of psoriasis. *Br J Dermatol* 126: 1-9
19. Baker SP, Potter LT (1980) Effect of propranolol on  $\beta$ -adrenoceptors in rat hearts. *Br J Pharmacol* 68: 8-10
20. Banerjee SP, Kung LS (1977)  $\beta$ -adrenergic receptors in the rat heart: effects of thyroidectomy. *Eur J Pharmacol* 43: 207-208
21. Bastian BC, Römisch J, Pâques EP, Burg G (1991) Lipokortine und Phospholipasen: neue Aspekte in der Physiologie der Glukokortikosteroidwirkung. *Hautarzt* 42: 417-423
22. Bauer R (1984) Der Stellenwert der Retinoide in der Dermatologie. In: Bauer R, Gollnick H (Hrsg) Retinoide in der Praxis. Grosse Verlag, Berlin, S 1-7
23. Becker C, Porzig H (1984) Recovery of  $\beta$ -adrenoceptors and cyclic AMP response after long term treatment of intact heart cells with  $\beta$ -blockers. *Br J Pharmacol* 82: 745-755
24. Bennet JP Yamamura HI (1985) Neurotransmitter, hormone, or drug receptor binding methods. In: Yamamura HI, Enna SJ, Kuhar MJ (eds) Neurotransmitter receptor binding. Raven Press, New York, pp 61-89



25. Benovic JL, Pike LJ, Cerione RA, Staniszewski C, Yoshimasa T, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1985) Phosphorylation of the mammalian  $\beta$ -adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 260: 7094-7101
26. Benovic JL, Strasser RH, Caron MG, Lefkowitz RJ (1986)  $\beta$ -Adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase which phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2797-2801
27. Benovic JL, Bouvier M, Caron MG, Lefkowitz RJ (1988) Regulation of adenylyl cyclase-coupled  $\beta$ -adrenergic receptors. *Annu Rev Cell Biol* 4: 405-428
28. Berridge MJ, Irvine RF (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341: 197-205
29. Bikle DD, Ratnam A, Mauro T, Harris J, Pillai S (1996) Changes in calcium responsiveness and handling during keratinocyte differentiation. Potential role of the calcium receptor. *J Clin Invest* 97: 1085-1093
30. Birnbaumer L (1990) Transduction of receptor signal into modulation of effector activity by G proteins: the first 20 years or so. *FASEB J* 4: 3068-3078
31. Boudoulas H, Lewis RP, Kates RE, Dalamangas G (1977) Hypersensitivity to adrenergic stimulation after propranolol withdrawal in normal subjects. *Ann Intern Med* 87: 433-436
32. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106: 761-771
33. Bourne HR, Coffino P, Melmon KL, Tomkins GM, Weinstein Y (1975) Genetic analysis of cyclic AMP (cAMP) in a mammalian cell. In: Drummond GI, Greengard P, Robison GA (eds) *Advances in cyclic nucleotide research*. Vol. 5, Raven press, New York, pp 771-786
34. Bouvier M, Collins S, O'Dowd BF, Campbell PT, de Blasi A, Kobilka BK, MacGregor C, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1989) Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 264: 16786-16792

35. Boyce ST, Ham RG (1983) Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol* 81 (Suppl 1): 33s-40s
36. Boyce ST, Ham RG (1985) Cultivation, frozen storage, and clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in serum-free media. *J Tiss Cult Meth* 9: 83-93
37. Boyce ST (1994) Epidermis as a secretory tissue. *J Invest Dermatol* 102: 8-10
38. Braun-Falco O (1958) The histochemistry of psoriasis. *Ann NY Acad Sci* 73: 936-977
39. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB (1982) Decreased catecholamine sensitivity and  $\beta$ -adrenergic receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307: 205-211
40. Bristow MR, Ray EH, Port JD, Gilbert EM, Sandoval A, Rasmussen R, Cates AE, Feldman AM (1990)  $\beta$ -Adrenergic pathway in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Circulation* 82 (Suppl 1): 12-25
41. Brodde OE, Daul A, O'Hara N (1984)  $\beta$ -Adrenoceptor changes in human lymphocytes, induced by dynamic exercise. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 325: 190-192
42. Brodde OE, Brinkmann M, Schemuth R, O'Hara N, Daul A (1985) Terbutaline-induced desensitization of human lymphocyte  $\beta_2$ -adrenoceptors. Accelerated restoration of  $\beta$ -adrenoceptor responsiveness by prednisone and ketotifen. *J Clin Invest* 76: 1096-1101
43. Brodde OE, Daul A, Stuka N, O'Hara N, Borchard U (1985) Effects of  $\beta$ -adrenoceptor antagonist administration on  $\beta_2$ -adrenoceptor density in human lymphocytes. The role of the „intrinsic sympathomimetic activity“. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 328: 417-422
44. Brodde OE, Kretsch R, Ikezono K, Zerkowski HR, Reidemeister JC (1986) Human  $\beta$ -adrenoceptors: relation of myocardial and lymphocyte  $\beta$ -adrenoceptor density. *Science* 231: 1584-1585

45. Brodde OE, Schemuth R, Brinkmann M, Wang XL, Daul A, Borchard U (1986)  $\beta$ -Adrenoceptor antagonists (non-selective as well as  $\beta_1$ -selective) with partial agonistic activity decrease  $\beta_2$ -adrenoceptor density in human lymphocytes. Evidence for a  $\beta_2$ -agonistic component of the partial agonistic activity. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 333: 130-138
46. Brodde OE, Howe U, Egerszegi S, Konietzko N, Michel MC (1988) Effect of prednisolone and ketotifen on  $\beta_2$ -adrenoceptors in asthmatic patients receiving  $\beta_2$ -bronchodilators. *Eur J Clin Pharmacol* 34: 145-150
47. Brodde OE (1989)  $\beta$  Adrenoceptors. In: Williams M, Glennon RA, Timmermans PBMWM (eds) *Receptor pharmacology and function*. Marcel Dekker, New York Basel, pp 207-255
48. Bronnegard M, Reynisdottir S, Marcus C, Stierna P, Arner P (1995) Effect of glucocorticosteroid treatment on glucocorticoid receptor expression in human adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 3608-3612
49. Brønstad GO, Elgjo K, Øye I (1971) Adrenaline increases cyclic 3'5'-AMP formation in hamster epidermis. *Nat New Biol* 233: 78-79
50. Butler J, Kelly JG, O'Malley K, Pidgeon F (1983)  $\beta$ -Adrenoceptor adaptation to acute exercise. *J Physiol Lond* 344: 113-117
51. Carafoli E (1988) Membrane transport of calcium: an overview. *Methods Enzymol* 157: 3-11
52. Carlberg C, Saurat JH (1996) Vitamin D-retinoid association: molecular basis and clinical applications. *JID Symposium Proceedings* 1: 82-86
53. Caron MG, Lefkowitz RJ (1991) Structure-function relationship. In: Perkins JP (ed) *The  $\beta$ -adrenergic receptors*. Humana Press, Clifton, pp 41-72
54. Cassel D, Levkovitz H, Selinger Z (1977) The regulatory GTPase cycle of turkey erythrocyte adenylate cyclase. *J Cyclic Nucleotide Res* 3: 393-398
55. Cavey MT, Gazith J, Cavey D, Shroot B, Reichert U (1984) Receptor mediated stimulation of adenylate cyclase in cultured human epidermal keratinocytes (abstract). *J Invest Dermatol* 82: 564-565

56. Cavey MT, Cavey D, Shroot B, Reichert U, Gazith J (1986) Receptor-linked adenylate cyclase in the membranes of cultured human epidermal keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 278: 293-297
57. Chai CY, Yu HS, Chang HR, Lin YR, Yu CL (1996) UVB irradiation induces decreased expression of  $\beta_2$ -adrenergic receptors in cultured keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 289: 55-56
58. Chambon P (1994) The retinoid signalling pathways: molecular and genetic analysis. *Semin Cell Biol* 5: 115-125
59. Chandraratna RAS (1996) Tazarotene - first of a new generation of receptor-selective retinoids. *Br J Dermatol* 135: 18-25
60. Chapot MP, Cervantes P, Kaveri S, Durieu-Trautmann O, Delavier-Klutchko C, Emorine L, Couraud PO, Strosberg AD (1987) Biochemical and immunochemical analysis of avian  $\beta_1$ - and mammalian  $\beta_2$ -adrenergic receptors. *J Rec Res*: 7: 1-15
61. Chen CSJ, Lavker RM, Rodeck U, Risse B, Jensen PJ (1995) Use of a serum-free epidermal culture model to show deleterious effects of epidermal growth factor on morphogenesis and differentiation. *J Invest Dermatol* 104: 107-112
62. Cheng JB, Goldfien A, Ballard PL, Roberts JM (1980) Glucocorticoids increase pulmonary  $\beta$ -adrenergic receptors in fetal rabbit. *Endocrinology* 107: 1646-1648
63. Cheung AH, Sigal IS, Dixon RAF, Strader CD (1989) Agonist-promoted sequestration of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor required regions involved in functional coupling with  $G_s$ . *Mol Pharmacol* 34: 132-138
64. Cheung WY (1970) Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of activation. *Biochem Biophys Res Commun* 38: 533-538
65. Chopra DP, Flaxman BA (1975) The effect of vitamin A on growth and differentiation of human keratinocytes in vitro. *J Invest Dermatol* 64: 19-22
66. Chopra DP (1977) Effects of theophylline and dibutyryl cyclic AMP on proliferation and keratinization of human keratinocytes. *Br J Dermatol* 96: 255-262
67. Chuang DM, Costa E (1979) Evidence for internalization of the recognition site of  $\beta$ -adrenergic receptors during receptor subsensitivity induced by (-)-isoproterenol. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 3024-3028

68. Chuang DM, Kinnier WJ, Farber L, Costa E (1980) A biochemical study of receptor internalization during  $\beta$ -adrenergic receptor desensitization in frog erythrocytes. *Mol Pharmacol* 18: 348-355
69. Chung FZ, Lentz KU, Gocayne J, Fitzgerald M, Robinson D, Kerlavage AR, Fraser CM, Venter JC (1987) Cloning and sequence analysis of the human brain  $\beta$ -adrenergic receptor. Evolutionary relationship to rodent and avian  $\beta$ -receptors and porcine muscarinic receptors. *FEBS Lett* 211: 200-206
70. Clausen OPF, Thorud E, Iversen OH (1982) Adrenalin has differential effects on epidermal cell cycle progression in mice. *J Invest Dermatol* 78: 472-476
71. Cochran REI, Thomson J, McQueen A, Beevers DG (1976) Skin reactions associated with propranolol. *Arch Dermatol* 112: 1173-1174
72. Collins S, Caron MG, Lefkowitz RJ (1988)  $\beta_2$ -Adrenergic receptors in hamster smooth muscle cells are transcriptionally regulated by glucocorticoids. *J Biol Chem* 263: 9067-9070
73. Collins S, Bouvier M, Bolanowski MA, Caron MG, Lefkowitz RJ (1989) Cyclic AMP stimulates transcription of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor gene in response to short term agonist exposure. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4853-4857
74. Collins S, Caron MG, Lefkowitz RJ (1991) Regulation of adrenergic receptor responsiveness through modulation of receptor gene expression. *Annu Rev Physiol* 53: 497-508
75. Contreras ML, Wolfe BB, Molinoff PB (1986) Kinetic analysis of the interactions of agonists and antagonists with beta adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 239: 136-143
76. Cotecchia S, De Blasi A (1984) Glucocorticoids increase beta-adrenoceptors on human intact lymphocytes in vitro. *Life Sci* 35: 2359-2364
77. Czernielewski J, Schalla W, Desbas C, Brun P (1986) Beta-blockers induce class II MHC antigens on psoriatic keratinocytes (letter). *Lancet* 1: 808
78. Dale BA, Haugen Scofield JA, Hennings H, Stanley JR, Yuspa SH (1983) Identification of filaggrin in cultured mouse keratinocytes and its regulation by calcium. *J Invest Dermatol* 81: 90s-95s
79. Dale HH (1906) On some physiological actions of ergot. *J Physiol (Lond)* 34: 163-206

80. Daly JW (1984) Forskolin, adenylate cyclase, and cell physiology: an overview. In: Greengard P, Robison GA, Paoletti R, Nicosia S (eds) *Advances in cyclic nucleotide and protein phosphorylation research*. Vol 17, Raven press, New York, pp 81-89
81. Daly MJ, Levy GP (1979) The subclassification of  $\beta$ -adrenoceptors. In: Kalsner S (ed) *Trends in autonomic pharmacology*. Vol 1, Urban & Schwarzenberg, München, pp 347-385
82. Das NS, Chowdary TN, Sobhanadri C, Rao KV (1978) The effect of topical isoprenaline on psoriatic skin. *Br J Dermatol* 99: 197-200
83. Davidson KA, Slaga TJ (1982) Effects of phorbol ester tumor promoters and hyperplasiogenic agents on cytoplasmic glucocorticoid receptors in epidermis. *J Invest Dermatol* 79: 378-382
84. Davies AO, Lefkowitz RJ (1980) Corticosteroid-induced differential regulation of  $\beta$ -adrenergic receptors in circulating human polymorphonuclear leukocytes and mononuclear leukocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 51: 599-605
85. Davies AO, Lefkowitz RJ (1981) Agonist-promoted high affinity state of the  $\beta$ -adrenergic receptor in human neutrophils: modulation by corticosteroids. *J Clin Endocrinol Metab* 53: 703-708
86. Davies AO, Lefkowitz RJ (1981) Regulation of adrenergic receptors. In: Lefkowitz RJ (ed) *Receptor regulation*. Chapman & Hall, New York, pp 85-121
87. Delavier-Klutchko C, Hoebeke, J Strosberg AD (1984) The human carcinoma cell line A431 possesses large numbers of functional  $\beta$ -adrenergic receptors. *FEBS Lett* 169: 151-155
88. De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ (1980) A ternary complex model explains the agonist specific binding properties of the adenylate cyclase coupled  $\beta$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 255: 7108-7117
89. Delescluse C, Fukuyama K, Epstein WL (1976) Dibutyryl cyclic AMP-induced differentiation of epidermal cells in tissue culture. *J Invest Dermatol* 66: 8-13
90. *Der Arzneimittelbrief* (1984) Adrenozeptoren - Grundlagen und physiologische Bedeutung. Jahrgang 18, Nr. 8, August 1984, S 57-60
91. Dibner MD, Insel PA (1981) Serum catecholamines desensitize  $\beta$ -adrenergic receptors of cultured C6 glioma cells. *J Biol Chem* 256: 7343-7346

92. Dierlich E, Orfanos CE, Pullmann H, Steigleder GK (1979) Epidermale Zellproliferation unter oraler Retinoid-Therapie bei Psoriasis. *Arch Dermatol Res* 264: 169-177
93. Dimsdale JE, Moss J (1980) Plasma catecholamines in stress and exercise. *J Am Med Assoc* 243: 340-342
94. Dixon RAF, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE, Mumford RA, Slater EE, Sigal IS, Caron MG, Lefkowitz RJ, Strader CD (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian  $\beta$ -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321: 75-79
95. Dixon RAF, Sigal IS, Candelore MR, Register RB, Scattergood W, Rands E, Strader CD (1987) Structural features required for ligand binding to the  $\beta$ -adrenergic receptor. *EMBO J* 6: 3269-3275
96. Dixon RAF, Sigal IS, Rands E, Register RB, Candelore MR, Blake AD, Strader CD (1987) Ligand binding to the  $\beta$ -adrenergic receptor involves its rhodopsin-like core. *Nature* 326: 73-77
97. Dohlman HG, Bouvier M, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ (1987) The multiple membrane spanning topography of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 262: 14282-14288
98. Dohlman HG, Caron MG, Lefkowitz RJ (1987) A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* 26: 2657-2664
99. Dolphin A, Adrien J, Hamon M, Bockaert J (1979) Identity of [ $^3$ H]-dihydroalprenolol binding sites and  $\beta$ -adrenergic receptors coupled with adenylate cyclase in the central nervous system: pharmacological properties, distribution and adaptive responsiveness. *Mol Pharmacol* 15: 1-15
100. Dreyer M, Rüdiger HW (1986) Erworbene Rezeptordefekte. *Dtsch Med Wschr* 111: 427-433
101. Drozdoff V, Pledger WJ (1993) Commitment to differentiation and expression of early differentiation markers in murine keratinocytes in vitro are regulated independently of extracellular calcium concentrations. *J Cell Biol* 123: 909-919

102. Drummond PD, Skipworth S, Finch PM (1996) Alpha 1-adrenoceptors in normal and hyperalgesic human skin. *Clin Sci* 91: 73-77
103. Duell EA, Voorhees JJ, Kelsey WH, Hayes E (1971) Isoproterenol-sensitive adenylyl cyclase in a particulate fraction of epidermis. *Arch Dermatol* 104: 601-610
104. Duell EA (1980) Identification of a beta<sub>2</sub>-adrenergic receptor in mammalian epidermis. *Biochem Pharmacol* 29: 97-101
105. Duell EA (1980) Adenosine-induced alterations in the adenosine 3':5'-monophosphate levels in mammalian epidermis. *Mol Pharmacol* 18: 49-52
106. Dulis BH, Wilson IB (1980) The  $\beta$ -adrenergic receptor of live human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 255: 1043-1048
107. Dupuy P, Bagot M, Heslan M, Dubertret L (1989) Synthetic retinoids inhibit the antigen presenting properties of epidermal cells in vitro. *J Invest Dermatol* 93: 455-459
108. Durham AC, Walton JM (1982) Calcium ions and the control of proliferation in normal and cancer cells. *Biosci Rep* 2: 15-30
109. Eichner R (1986) Epidermal effects of retinoids: In vitro studies. *J Am Acad Dermatol* 15: 789-797
110. Eichner R, Gendimenico GJ, Kahn M, Mallon JP, Capetola RJ, Mezick JA (1996) Effects of long-term retinoic acid treatment on epidermal differentiation in vivo: specific modifications in the programme of terminal differentiation. *Br J Dermatol* 135: 687-695
111. Elder JT, Fisher GJ, Zhang QY, Eisen D, Krust P, Chambon P, Voorhees JJ (1991) Retinoic acid receptor gene expression in human skin. *J Invest Dermatol* 96: 425-433
112. Elder JT, Cromie MA, Griffiths CEM, Chambon P, Voorhees JJ (1993) Stimulus-selective induction of CRABP-II mRNA: a marker for retinoic acid action in human skin. *J Invest Dermatol* 100: 356-359
113. El-Fakahany EE (1989) Intact cells: a model for studying receptor binding and function. In: Williams M, Glennon RA, Timmermans PBMWM (eds) *Receptor pharmacology and function*. Marcel Dekker, New York Basel, pp 695-715
114. Ellis CN, Voorhees JJ (1987) Etretinate therapy. *J Am Acad Dermatol* 16: 267-291



115. Emorine LJ, Marullo S, Delavier-Klutchko C, Kaveri SV, Durieu-Trautman O, Strosberg AD (1987) Structure of the gene for human  $\beta_2$ -adrenergic receptor: expression and promoter characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6995-6999
116. Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD (1989) Molecular characterization of the human  $\beta_3$ -adrenergic receptor. *Science* 245: 1118-1121
117. Emorine LJ, Feve B, Pairault J, Briend-Sutren MM, Marullo S, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD (1991) Structural basis for functional diversity of  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - and  $\beta_3$ -adrenergic receptors. *Biochem Pharmacol* 41: 853-859
118. Emorine LJ, Strosberg AD (1991) Molecular analysis of the three human  $\beta$ -adrenergic receptors. In: *Adrenoceptors: structure, mechanisms, function. Advances in Pharmacological Sciences*, Birkhäuser Verlag, Basel, pp 79-89
119. Epstein EH, Bonifas JM (1982) Glucocorticoid receptors of normal human epidermis. *J Invest Dermatol* 78: 144-146
120. Evain-Brion D, Raynaud F, Plet A, Laurent P, Leduc B, Anderson WB (1986) Deficient cyclic AMP-dependent protein kinases in human psoriatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5272-5276
121. Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895
122. Fairley JA, Marcelo CL, Hogan VA, Voorhees JJ (1985) Increased calmodulin levels in psoriasis and low  $Ca^{++}$  regulated mouse epidermal keratinocyte cultures. *J Invest Dermatol* 84: 195-198
123. Fairley JA, Keng P (1986) Detection of changes in free intracellular  $Ca^{++}$  in keratinocytes using Indo 1 AM and flow cytometry (abstract). *Clin Res* 34: 748 A
124. Fairley JA (1988) Calcium and the skin. *Arch Dermatol* 124: 443-444
125. Fairley JA, Ewing NM, Keng PC (1988) Extracellular calcium-induced terminal differentiation of keratinocytes is accompanied by an increase in free intracellular calcium (abstract). *J Invest Dermatol* 90: 556
126. Fairley JA (1989) Calcium: a second messenger. *Adv Dermatol* 4: 95-112
127. Fairley JA (1991) Calcium metabolism and the pathogenesis of dermatologic disease. *Seminars Dermatol* 10: 225-231

128. Fanjul A, Dawson MI, Hobbs PD, Jong L, Cameron JF, Harlev E, Graupner G, Lu XP, Pfahl M (1994) A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. *Nature* 372: 107-110
129. Feldman RD, Limbird LE, Nadeau J, Robertson D, Wood AJJ (1984) Leukocyte  $\beta$ -receptor alterations in hypertensive subjects. *J Clin Invest* 73: 648-653
130. Felix RH, Comaish JS (1974) The value of patch and other skin tests in drug eruptions. *Lancet* 1: 1017-1019
131. Felix RH, Ive FA, Dahl MGC (1974) Cutaneous and ocular reactions to practolol. *Br Med J* 4: 321-324
132. Fisher GJ, Harris VA, Talwar H, Voorhees JJ (1988) Protein kinase C regulates terminal differentiation in cultured adult human keratinocytes (abstract). *J Invest Dermatol* 90: 559
133. Fisher GJ, Talwar HS, Tavakkol A, Esmann J, Baldassare JJ, Elder JT, Griffiths CEM, Baadsgaard O, Cooper KD, Voorhees JJ (1990) Phosphoinositide-mediated signal transduction in normal and psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol* 95: 15s-17s
134. Fisher GJ, Talwar HS, Xiao JH, Datta SC, Reddy AP, Gaub MP, Rochette-Egly C, Chambon P, Voorhees JJ (1994) Immunological identification and functional quantitation of retinoic acid and retinoid X receptor proteins in human skin. *J Biol Chem* 269: 20629-20635
135. Fisher GJ, Reddy AP, Datta SC, Kang S, Yi JY, Chambon P, Voorhees JJ (1995) All-trans retinoic acid induces cellular retinol-binding protein in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 105: 80-86
136. Fisher LB, Maibach HI (1971) The effect of corticosteroids on human epidermal mitotic activity. *Arch Dermatol* 103: 39-44
137. Fishman PH, Sullivan M, Patel J (1987) Down-regulation of protein kinase C in rat glioma C6 cells: effects on the beta-adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 144: 620-627
138. Flaxman BA, Harper RA (1975) In vitro analysis of the control of keratinocyte proliferation in human epidermis by physiologic and pharmacologic agents. *J Invest Dermatol* 65: 52-59

139. Foster SJ, Harden TK (1980) Dexamethasone increases  $\beta$ -adrenoceptor density in human astrocytoma cells. *Biochem Pharmacol* 29: 2151-2153
140. Fransson J, Hammar H (1988) Epidermal growth. *Int J Dermatol* 27: 281-290
141. Fraser CM, Venter JC (1980) The synthesis of  $\beta$ -adrenergic receptors in cultured human lung cells: induction by glucocorticoids. *Biochem Biophys Res Commun* 94: 390-397
142. Fraser CM, Venter JC, Kaliner M (1981) Autonomic abnormalities and autoantibodies to beta-adrenergic receptors. *N Engl J Med* 305: 1165-1170
143. Fraser CM (1991) Molecular biology of adrenergic receptors: model systems for the study of G-protein-mediated signal transduction. *Blood Vessels* 28: 93-103
144. Frederich RC, Waldo GL, Harden TK, Perkins JP (1983) Characterization of agonist-induced  $\beta$ -adrenergic receptor-specific desensitization in C62B-glioma cells. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 9: 103-118
145. Frenz G, Møller U, Hölmich P, Christensen IBJ (1991) On circadian rhythms in human epidermal cell proliferation. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 71: 85-87
146. Fritsch PO (1992) Retinoids in psoriasis and disorders of keratinization. *J Am Acad Dermatol* 27: S8-S14
147. Fuchs E, Green H (1980) Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 19: 1033-1042
148. Furchgott RF (1972) The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the standpoint of receptor theory. In: Blaschko H, Muscholl E (eds) *Handbook of experimental pharmacology*. Vol. 33, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 283-335
149. Fusenig NE, Breitzkreutz D, Dzarlieva RT, Boukamp P, Bohnert A, Tilgen W (1983) Growth and differentiation characteristics of transformed keratinocytes from mouse and human skin in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol* 81: 168s-175s
150. Galant SP, Duriseti L, Underwood S, Insel PA (1978) Decreased beta-adrenergic receptors on polymorphonuclear leukocytes after adrenergic therapy. *N Engl J Med* 299: 933-936

151. Galant SP, Duriseti L, Underwood S, Allred S, Insel PA (1980) Beta adrenergic receptors of polymorphonuclear particulates in bronchial asthma. *J Clin Invest* 65: 577-585
152. Garcia-Sainz JA, Huerta-Bahena ME, Malbon CC (1989) Hepatocyte  $\beta$ -adrenergic responsiveness and guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *Am J Physiol* 256: C384-C389
153. Gazith J, Reichert U (1982) High affinity membrane receptors in cultured human keratinocytes. I. The  $\beta$ -adrenergic receptors. *Br J Dermatol* 107 (suppl 23): 125-133
154. Gazith J, Cavey MT, Cavey D, Shroot B, Reichert U (1983) Characterization of the beta-adrenergic receptors of cultured human epidermal keratinocytes. *Biochem Pharmacol* 32: 3397-3403
155. Gazith J, Reichert U (1987) Adrenergic receptors in the skin. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF (eds) *Dermatology in general medicine*. 3<sup>rd</sup> edn., vol. I, McGraw-Hill, New York, pp 375-380
156. Geilen CC (1996) Neue therapeutische Ansätze in der Dermatologie durch Modulation von Signaltransduktionswegen. *Z Hautkr* 71: 427-432
157. Gibco Life Technologies (1992) Keratinozyten-SFM<sup>®</sup>; Produktbeschreibung und -eigenschaften. Packungsbeilage zum Originalprodukt
158. Gibson DFC, Ratnam AV, Bikle DD (1996) Evidence for separate control mechanisms at the message, protein, and enzyme activation levels for transglutaminase during calcium-induced differentiation of normal and transformed human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 106: 154-161
159. Gilchrest BA (1983) In vitro assessment of keratinocyte aging. *J Invest Dermatol* 81: 184s-189s
160. Gill DL (1985) Receptors coupled to calcium mobilization. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 19: 307-324
161. Gill DM, Meren R (1978) ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin; basis of the activation of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 3050-3054
162. Gilman AG (1984) Guanine nucleotide-binding regulatory proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* 36: 577-579

163. Giudicelli Y, Lacasa D, Agli B, Leneveu A (1984) Comparison of changes in the characteristics of  $\beta$ -adrenoceptors and responsiveness of human circulating lymphocytes during chronic and after chronic administration of pindolol and propranolol. *Eur J Clin Pharmacol* 26: 1-12
164. Glaubiger G, Lefkowitz RJ (1977) Elevated beta-adrenergic receptor number after chronic propranolol treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 78: 720-725
165. Göthert M (1986) Vorkommen, Funktion und Bedeutung prä- und postsynaptischer Adrenozeptoren. In: Schölmerich P, Holtmeier HJ (Hrsg) *Kardiovaskuläre Rezeptoren: Neue pharmakologische und klinische Aspekte*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, S 63-74
166. Gold MH, Holy AK, Roenigk HH (1988) Beta-blocking drugs and psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 19: 837-841
167. Gollnick H (1984) 13-cis-Retinsäure. In: Bauer R, Gollnick H (Hrsg) *Retinoide in der Praxis*. Grosse Verlag, Berlin, S 79-98
168. Gollnick H, Kirsten S (1996) Retinoide - wo stehen wir heute? Ein Überblick zu den Wirkungsmechanismen und Hauptindikationen. *Z Hautkr* 71: 442-452
169. Gommans JM, Bergers M, Erp van PEJ, Hurk van den JJMA, Kerkhof van de P, Mier PD, Roelfzema H (1979) Studies on the plasma membrane of normal and psoriatic keratinocytes. 2. Cyclic AMP and its response to hormonal stimulation. *Br J Dermatol* 101: 413-419
170. González-Castro U, Castells-Rodellas A, Krueger JG (1997) Identification of a novel keratinocyte mitogen derived from bovine pituitary glands. *Arch Dermatol Res* 289: 309-316
171. Gottlieb AB (1990) Immunologic mechanisms in psoriasis. *J Invest Dermatol* 95: 18S-19S
172. Grando SA (1993) Physiology of endocrine skin interrelations. *J Am Acad Dermatol* 28: 981-992
173. Grando SA, Kist DA, Qi M, Dahl MV (1993) Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. *J Invest Dermatol* 101: 32-36
174. Grando SA (1997) Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *JID Symposium Proceedings* 2: 41-48

175. Green H (1978) Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: a new view. *Cell* 15: 801-811
176. Greif F, Soroff HS, Albers KM, Taichman LB (1989) The effect of trifluoperazine, a calmodulin antagonist, on the growth of normal and malignant epidermal keratinocytes in culture. *Eur J Cancer Clin Oncol* 25: 19-26
177. Grimm W, Marks F (1974) Effects of tumor-promoting phorbol esters on the normal and the isoproterenol-elevated levels of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in mouse epidermis in vivo. *Cancer Res* 34: 3128-3134
178. Guillet JG, Kaveri SV, Durieu O, Delavier C, Hoebeke J, Strosberg AD (1985) Beta-adrenergic agonist activity of a monoclonal anti-idiotypic antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 1781-1784
179. Haase I, Liesegang C, Binting S, Henz BM, Rosenbach T (1997) Phospholipase C-mediated signaling is altered during HaCaT cell proliferation and differentiation. *J Invest Dermatol* 108: 748-752
180. Hadcock JR, Malbon CC (1988) Down-regulation of  $\beta$ -adrenergic receptors: agonist-induced reduction in receptor mRNA levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5021-5025
181. Hadcock JR, Malbon CC (1988) Regulation of  $\beta$ -adrenergic receptors by 'permissive' hormones: glucocorticoids increase steady-state levels of receptor mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8415-8419
182. Hadcock JR, Wang H, Malbon CC (1989) Agonist-induced destabilization of  $\beta$ -adrenergic receptor mRNA: attenuation of glucocorticoid-induced upregulation of  $\beta$ -adrenergic receptors. *J Biol Chem* 264: 19928-19933
183. Haen E, Hauck R, Emslander HP, Langenmayer I, Liebl B, Schopohl J, Remien J, Fruhmann G (1991) Nocturnal asthma.  $\beta_2$ -Adrenoceptors on peripheral mononuclear leukocytes, cAMP- and cortisol-plasma concentrations. *Chest* 100: 1239-1245
184. Halprin KM, Ohkawara A (1966) Carbohydrate metabolism in psoriasis: an enzymatic study. *J Invest Dermatol* 46: 51-68
185. Halprin KM, Adachi K, Yoshikawa K, Levine V, Mui MM, Hsia SL (1975) Cyclic AMP and psoriasis. *J Invest Dermatol* 65: 170-178

186. Halvey S, Grunwald MH, Sandbank M, Buimovice B, Joshua H, Livni E (1990) Macrophage migration inhibition factor (MIF) in drug eruption. *Arch Dermatol* 126: 48-51
187. Halvey S, Livni E (1991) Psoriasis and psoriasiform eruption associated with propranolol: the role of an immunological mechanism. *Arch Dermatol Res* 283: 472-473
188. Han C, Abel PW, Minneman KP (1987)  $\alpha_1$ -Adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in smooth muscle. *Nature* 329: 333-335
189. Haneke E, Bauer P (1984) Lokale und systemische Therapie mit all-trans-Retinsäure in der Dermatologie. In: Bauer R, Gollnick H (Hrsg) *Retinoide in der Praxis*. Grosse Verlag, Berlin, S 66-73
190. Hanski E, Rimon G, Levitzki A (1979) Adenylate cyclase activation by the beta adrenergic receptor as a diffusion-controlled process. *Biochemistry* 18: 846-853
191. Harden TK, Cotton CV, Waldo GL, Lutton JK, Perkins JP (1980) Catecholamine-induced alteration in sedimentation behavior of membrane bound  $\beta$ -adrenergic receptors. *Science* 210: 441-443
192. Harden TK (1983) Agonist-induced desensitization of the  $\beta$ -adrenergic receptor-linked adenylate cyclase. *Pharmacol Rev* 35: 5-32
193. Harris RR, Mackenzie IC (1981) The effects of  $\alpha$  and  $\beta$  adrenergic agonists and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate on epidermal metabolism. *J Invest Dermatol* 77: 337-340
194. Hashimoto T, Dykes PJ, Marks R (1985) Retinoid-induced inhibition of growth and reduction of spreading of human epidermal cells in culture. *Br J Dermatol* 112: 637-646
195. Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990) Turning off the signal: desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptor function. *FASEB J* 4: 2881-2889
196. Hawley-Nelson P, Sullivan JE, Kung M, Hennings H, Yuspa SH (1980) Optimized conditions for the growth of human epidermal cells in culture. *J Invest Dermatol* 75: 176-182
197. Hayflick L (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid strains. *Exp Cell Res* 37: 614-636

198. Haynes RC, Lerner J (1975) Adrenocorticotrophic hormone: adrenocortical steroids and their synthetic analogs. In: Goodman LS, Gilman A (eds) *The pharmacological basis of therapeutics*, 5. edn., MacMillan, New York, pp 1472-1506
199. Hegemann L, Mahrle G (1991) Proteinkinase C - Relevanz für die Pathogenese und Therapie der Psoriasis? *Z Hautkr* 66: 600-610
200. Heinsimer JA, Lefkowitz RJ (1982) Adrenergic receptors: biochemistry, regulation, molecular mechanism, and clinical implications. *J Lab Clin Med* 100: 641-658
201. Heitz A, Schwartz J, Velly J (1983)  $\beta$ -Adrenoceptors of the human myocardium: determination of  $\beta_1$  and  $\beta_2$  subtypes by radioligand binding. *Br J Pharmacol* 80: 711-717
202. Heng MCY, Heng MK (1988) Beta-adrenoceptor antagonist-induced psoriasiform eruption. Clinical and pathogenetic aspects. *Int J Dermatol* 27: 619-627
203. Hennings H, Elgjo K (1971) Hydrokortisone: inhibition of DNA synthesis and mitotic rate after local application to mouse epidermis. *Virchows Arch B Cell Pathol* 8: 42-49
204. Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K, Yuspa SH (1980) Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19: 245-254
205. Hennings H, Steinert P, Buxman MM (1981) Calcium induction of transglutaminase and the formation of epsilon (gamma-glutamyl) lysine cross-links in cultured mouse epidermal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 102: 739-745
206. Hennings H, Holbrook K (1983) Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. *Exp Cell Res* 143: 127-142
207. Hennings H, Kruszewski FH, Yuspa SH, Tucker RW (1989) Intracellular calcium alterations in response to increased external calcium in normal and neoplastic keratinocytes. *Carcinogenesis* 10: 777-780
208. Hertel C, Perkins JP (1984) Receptor-specific mechanisms of desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptor function. *Mol Cell Endocrinol* 37: 245-256
209. Hickok NJ, Uitto J (1992) Regulation of ornithine decarboxylase gene expression, polyamine levels, and DNA synthetic rates by all-trans-retinoic acid in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 98: 327-332



210. Hoebcke, J, Durieu O, Delavier C, Schmutz A, Strosberg AD (1984) Biochemical and immunological studies of  $\beta$ -adrenergic receptors on various cell types. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 17: 73-80
211. Hödl S (1985) Nebenwirkungen der Betarezeptorenblocker an der Haut. *Hautarzt* 36: 549-557
212. Hofstee BHJ (1952) On the evaluation of the constants  $V_m$  and  $K_m$  in enzyme reactions. *Science* 116: 329-331
213. Hohlmaier K, Marks F (1989) Quantitation of  $\beta$ -adrenergic binding sites in intact epidermal cells by  $^3\text{H}$ -CGP-binding: desensitization of cAMP-synthesis by low concentrations of  $\beta$ -agonists precedes decreases in  $\beta$ -adrenergic binding (abstract). *Arch Dermatol Res* 281: 140
214. Holbrook KA, Wolff K (1987) The structure and development of skin. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF (eds) *Dermatology in general medicine*. 3<sup>rd</sup> edn., vol. I, McGraw-Hill, New York, pp 93-131
215. Holzmann H, Kippenberger S, Ramirez-Bosca A, Bereiter-Hahn J, Bernd A (1994) Zell- und Gewebekulturmodelle in der Dermatologie. *Hautarzt* 45: 304-312
216. Homburger V, Lucas M, Cantau B, Perit J, Bockaert J (1980) Further evidence that desensitization of  $\beta$ -adrenergic sensitive adenylyl cyclase proceeds in two steps: modification of the coupling and loss of  $\beta$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 255: 10436-10444
217. Homcy CJ, Graham RM (1985) Molecular characterization of adrenergic receptors. *Circ Res* 56: 641-650
218. Horn F, Marks F, Fisher GJ, Marcelo CL, Voorhees JJ (1987) Decreased protein kinase C activity in psoriatic versus normal epidermis. *J Invest Dermatol* 88: 220-222
219. Hoyer D, Reynolds EE, Molinoff PB (1984) Agonist-induced changes in the properties of beta-adrenergic receptors on intact S49 lymphoma cells. *Mol Pharmacol* 25: 209-218
220. Hsia SL, Wright R, Mandy SH, Halprin KM (1972) Adenyl cyclase in normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 59: 109-113
221. Huganir RL, Greengard P (1987) Regulation of receptor function by protein phosphorylation. *Trends Pharmacol Sci* 8: 472-477

222. Hughes A, Yardley HJ (1982) Dexamethasone receptors in human epidermis. *Br J Dermatol* 106: 299-302
223. Hughes RJ, Mahan LC, Insel PA (1988) Certain  $\beta$ -blockers can decrease  $\beta$ -adrenergic receptor number: II. Down-regulation of receptor number by Alprenolol and Propranolol in cultured lymphoma and muscle cells. *Circ Res* 63: 279-285
224. Hui KKP, Conolly ME, Tashkin DP (1982) Reversal of human lymphocyte  $\beta$ -adrenoceptor desensitization by glucocorticoids. *Clin Pharmacol Ther* 32: 566-571
225. Hulme EC (1990) Receptor binding studies, a brief outline. In: Hulme EC (ed) *Receptor-effector coupling. A practical approach*. Oxford University Press, Oxford New York Tokyo, pp 203-215
226. Iancu L, Shneur A, Cohen H (1979) Trials with xanthine derivatives in systemic treatment of psoriasis. *Dermatologica* 159: 55-61
227. Iizuka H, Adachi K, Halprin KM, Levine V (1976) Histamine ( $H_2$ ) receptor-adenylate cyclase system in pig skin (epidermis). *Biochim Biophys Acta* 437: 150-157
228. Iizuka H, Adachi K, Halprin KM, Levine V (1976) Adenosine and adenine nucleotides stimulation of skin (epidermal) adenylylase. *Biochim Biophys Acta* 444: 685-693
229. Iizuka H, Adachi K, Halprin KM, Levine V (1978) Cyclic AMP accumulation in psoriatic skin: differential responses to histamine, AMP, and epinephrine by the uninvolved and involved epidermis. *J Invest Dermatol* 70: 250-253
230. Iizuka H, Kamigaki K, Nemoto O, Aoyagi T, Miura Y (1980) Effects of hydrocortisone on the adrenaline-adenylate cyclase system of the skin. *Br J Dermatol* 102: 703-710
231. Iizuka H, Umeda K, Koizumi H, Aoyagi T, Miura Y (1981) Epinephrine-induced cyclic AMP accumulation in the psoriatic epidermis. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 61: 391-395
232. Iizuka H, Ishizawa H, Koizumi H, Aoyagi T, Miura Y (1982) Pig skin epidermal calmodulin: effect on calmodulin deficient phosphodiesterase. *J Invest Dermatol* 78: 230-233

233. Iizuka H, Kishiyama K, Ohkawara A (1983) Regulation of beta-adrenergic adenylate cyclase responsiveness of pig skin epidermis by suboptimal concentrations of epinephrine. *J Invest Dermatol* 81: 549-552
234. Iizuka H, Ohkawara A (1983) Effects of glucocorticoids on the beta-adrenergic adenylate cyclase system of pig skin. *J Invest Dermatol* 80: 524-528
235. Iizuka H, Ohkawara A, Ishibashi Y (1983) Human skin epidermal adenylate cyclase systems: defective beta-adrenergic responsiveness in the involved epidermis of Darier's disease. In: Seiji M, Bernstein IA (eds) *Biochemistry of normal and abnormal epidermal differentiation*. University of Tokyo Press, Tokyo, pp 45-58
236. Iizuka H, Adachi R, Koizumi H, Aoyagi T, Ohkawara A, Miura Y (1984) Effects of adenosine and 2'-deoxyadenosine on epidermal keratinocyte proliferation: its relation to cyclic AMP formation. *J Invest Dermatol* 82: 608-612
237. Iizuka H, Hashimoto Y, Hirokawa M, Matsuo S, Mizumoto T, Ohkawara A (1985) Pig-skin epidermal calmodulin: effects of antagonists of calmodulin on DNA synthesis of pig-skin epidermis. *Arch Dermatol Res* 278: 133-137
238. Iizuka H, Kajita S, Ohkawara A (1985) Ultraviolet radiation augments epidermal beta-adrenergic adenylate cyclase response. *J Invest Dermatol* 84: 401-403
239. Iizuka H, Kishiyama K, Ohkuma N, Ohkawara A (1985) Modulation of pig epidermal adenylate-cyclase responses by protein-synthesis inhibitors: its relation to glucocorticoid and colchicine effects. *Arch Dermatol Res* 277: 466-472
240. Iizuka H, Ohkuma N, Ohkawara A (1985) Effects of retinoids on the cyclic AMP system of pig skin epidermis. *J Invest Dermatol* 85: 324-327
241. Iizuka H, Watanabe M, Ohkawara A (1985) A new synthetic retinoid, E-5166, augments epidermal beta-adrenergic adenylate cyclase response. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 65: 459-464
242. Iizuka H, Hirokawa M, Ara M, Kajita S, Watanabe M, Ohkawara A (1986) Antipsoriatic and antimetabolic agents as stimulators of the beta-adrenergic adenylate cyclase response of epidermis. *Clin Exp Dermatol* 11: 238-245
243. Iizuka H, Kajita S, Mizumoto T, Kawaguchi H (1986) Glucocorticoid-induced modulation of the beta-adrenergic adenylate cyclase response of epidermis: its relation to epidermal phospholipase A<sub>2</sub> activity. *J Invest Dermatol* 87: 577-581

244. Iizuka H, Ohkawara A (1986) „Ischemic“ rise of epidermal cyclic AMP is a beta-adrenergic adenylate cyclase-dependent process. *J Invest Dermatol* 86: 271-274
245. Iizuka H, Takahashi H (1992) Glucocorticoid-induced regulation of  $\beta_2$ -adrenergic receptors in keratinocytes. In: Ohkawara A, McGuire J (eds) *The biology of the epidermis*. Elsevier Science Publishers B.V., pp 97-105
246. Inohara S, Tatsumi Y, Cho H, Tanaka Y, Sagami S (1990) Actin filament and desmosome formation in cultured human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 282: 210-212
247. Insel PA, Stoolman LM (1978) Radioligand binding to beta adrenergic receptors of intact cultured S49 cells. *Mol Pharmacol* 14: 549-561
248. Ishizawa H, Iizuka H, Kajita S, Ohkawara A (1983) Effects of betamethasone-17-valerate on the cyclic AMP system of the pig skin epidermis. *J Dermatol* 10: 321-325
249. Itami S, Tsutsui M, Kino J, Koizumi H, Katayama H, Halprin KM, Adachi K (1986) Monoclonal antibodies to the  $\beta$ -adrenergic receptor: modulation of catecholamine-sensitive adenylate-cyclase by the antibody. *Arch Dermatol Res* 278: 377-381
250. Itami S, Kino J, Halprin KM, Adachi K (1987) Immunohistochemical study of  $\beta$ -adrenergic receptors in the psoriatic epidermis using an anti-alprenolol anti-idiotypic antibody. *Arch Dermatol Res* 279: 439-443
251. Jacobsson B, Vauquelin G, Wesslau C, Smith U, Strosberg AD (1981) Distinction between two subpopulations of  $\beta_1$ -adrenergic receptors in human adipose cells. *Eur J Biochem* 114: 349-354
252. Jaken S, Yuspa SH (1988) Early signals for keratinocyte differentiation: role of  $Ca^{2+}$ -mediated inositol lipid metabolism in normal and neoplastic epidermal cells. *Carcinogenesis* 9: 1033-1038
253. Jensen HAE, Mikkelsen HI, Wadskov S, Søndergaard J (1976) Cutaneous reactions to propranolol (Inderal®). *Acta Med Scand* 199: 363-367
254. Jensen PKA, Nørgård JOR, Knudsen C, Nielsen V, Bolund L (1990) Effects of extra- and intracellular calcium concentration on DNA replication, lateral growth, and differentiation of human epidermal cells in culture. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 59: 17-25

255. Jetten AM (1990) Multi-stage program of differentiation in human epidermal keratinocytes: regulation by retinoids. *J Invest Dermatol* 95: 44S-46S
256. Jones JCR, Goldman AE, Steinert PM, Yuspa SH, Goldman RD (1982) Dynamic aspects of the supramolecular organization of intermediate filament networks in cultured epidermal cells. *Cell Motil* 2: 197-213
257. Jong de EMGJ, Ferrier CM, Zwart de A, Wauben-Penris PJJ, Korstanje C, Kerkhof van de PCM (1995) Effects of topical treatment with budesonide on parameters for epidermal proliferation, keratinization and inflammation in psoriasis. *J Dermatol Sci* 9: 185-194
258. Joost van T, Smitt JHS (1981) Skin reactions to propranolol and cross sensitivity to  $\beta$ -adrenoceptor blocking agents. *Arch Dermatol* 117: 600-601
259. Jung EG (1989) Dermatologische Lokalbehandlung. In: Jung EG (Hrsg) *Dermatologie*. Hippokrates Verlag, Stuttgart, S 423-427
260. Kajita S, Iizuka H, Hashimoto Y, Ohkawara A (1986) Topical PUVA treatment increases epidermal beta-adrenergic adenylate cyclase responsiveness. *Br J Dermatol* 114: 413-418
261. Kajita S, Iizuka H, Hirokawa M, Tsutsui M, Mizumoto T (1986) Topical application of potent glucocorticoids augments epidermal beta-adrenergic adenylate cyclase response in vivo. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 66: 491-496
262. Kakiuchi S, Rall TW (1968) The influence of chemical agents on the accumulation of adenosine 3',5'-phosphate in slices of rabbit cerebellum. *Mol Pharmacol* 4: 367-378
263. Kang S, Li XY, Voorhees JJ (1996) Pharmacology and molecular action of retinoids and vitamin D in skin. *JID Symposium Proceedings* 1: 15-21
264. Kariman K (1980)  $\beta$ -Adrenergic receptor binding in lymphocytes from patients with asthma. *Lung* 158: 41-51
265. Kashles O, Levitzki A (1987) Characterization of the  $\beta_2$ -adrenoceptor-dependent adenylate cyclase of A431 epidermoid carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 36: 1531-1538
266. Kather H, Schröder F (1982) Adrenergic regulation of fatcell lipolysis in multiple symmetric lipomatosis. *Eur J Clin Invest* 12: 471-474

267. Kato N, Halprin KM, Taylor JR, Ohkawara A (1988) Cyclosporin A induced augmentation of the beta-adrenergic adenylate cyclase response of pig epidermis. *Arch Dermatol Res* 280: 89-92
268. Kaumann AJ (1972) Potentiation of the effects of isoprenaline and noradrenaline by hydrocortisone in cat heart muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 273: 134-153
269. Kautsky MB, Fleckman P, Dale BA (1995) Retinoic acid regulates oral epithelial differentiation by two mechanisms. *J Invest Dermatol* 104: 546-553
270. Kent RS, De Lean A, Lefkowitz RJ (1980) A quantitative analysis of beta-adrenergic receptor interactions: resolution of high and low affinity state of the receptor by computer modeling of ligand binding data. *Mol Pharmacol* 17: 14-23
271. Kerkhof van de PCM, Gerritsen MJP, Dooren-Greebe van RJ, Jong de EMGJ, Ueberhorst L (1995) Neue Antipsoriatika leuchten am Horizont. *Z Hautkr* 70: 791-796
272. Kinnier WJ (1989) Receptor-linked second messenger systems. In: Williams M, Glennon RA, Timmermans PBMWM (eds) *Receptor pharmacology and function*. Marcel Dekker, New York Basel, pp 85-104
273. Kobilka BK, Dixon RAF, Frielle T, Dohlman HG, Bolanowski MA, Sigal IS, Yang-Feng TL, Franke U, Caron MG, Lefkowitz RJ (1987) cDNA for the human  $\beta_2$ -adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 46-50
274. Koizumi H, Yasui C, Fukaya T, Ohkawara A, Ueda T (1991) Beta-adrenergic stimulation induces intracellular  $Ca^{++}$  increase in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 96: 234-237
275. Kruszewski FH, Hennings H, Yuspa SH, Tucker RW (1991) Regulation of intracellular free calcium in normal murine keratinocytes. *Am J Physiol* 261: C767-C773
276. Kubilus J (1983) Modulation of differentiation by retinoids. *J Invest Dermatol* 81: 55s-58s

277. Kubo T, Fukuda K, Mikami A, Maeda A, Takahashi H, Mishina M, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K, Kojima H, Matsuo H, Hirose T, Numa S (1986) Cloning, sequencing, and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 323: 411-416
278. Kuschinsky G, Lüllmann H (1984) Sympathisches System. In: Kuschinsky G, Lüllmann H (Hrsg) *Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 10. Überarbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, S 71-103
279. Kuschinsky G, Lüllmann H (1984) Nebennierenrinde und Gonaden. In: Kuschinsky G, Lüllmann H (Hrsg) *Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 10. Überarbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, S 330-349
280. Laduron PM (1984) Criteria for receptor sites in binding studies. *Biochem Pharmacol* 33: 833-839
281. Lai E, Rosen OM, Rubin CS (1981) Differentiation-dependent expression of catecholamine-stimulated adenylate cyclase: roles of  $\beta$ -receptor and G/F protein in differentiating 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 256: 12866-12874
282. Lai E, Rosen OM, Rubin CS (1982) Dexamethasone regulates the  $\beta$ -adrenergic receptor subtype expressed by 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes. *J Biol Chem* 257: 6691-6696
283. Landmann R, Portenier M, Staehelin M, Wesp M, Box R (1988) Changes in  $\beta$ -adrenoceptors and leucocyte subpopulations after physical exercise in normal subjects. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 337: 261-266
284. Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Brown TG (1967) Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 214: 597-598
285. Langan TA (1973) Protein kinases and protein kinase substrates. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 3: 99-153
286. Langer SZ (1974) Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem Pharmacol* 23: 1793-1800

287. Langley JN (1905) On the reaction of cells and nerve endings to certain poisons, chiefly as regards to the reaction of striated muscles to nicotine and to curare. *J Physiol (Lond)* 33: 374-413
288. Larsson PT, Martinsson A, Olsson G, Hjemdahl P (1989) Altered adrenoceptor responsiveness during adrenaline infusion but not during mental stress: differences between receptor subtypes and tissues. *Br J Clin Pharmacol* 28: 663-674
289. Lefkowitz RJ (1979) Direct binding studies of adrenergic receptors: biochemical, physiologic, and clinical implications. *Ann Intern Med* 91: 450-458
290. Lefkowitz RJ, Caron MG, Michel T, Stadel JM (1982) Mechanisms of hormone receptor-effector coupling: the  $\beta$ -adrenergic receptor and adenylate cyclase. *Fed Proc* 41: 2664-2670
291. Lefkowitz RJ, Stadel JM, Caron MG (1983) Adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptors: structure and mechanisms of activation and desensitization. *Ann Rev Biochem* 52: 159-186
292. Lefkowitz RJ, Caron MG, Stiles GL (1984) Mechanisms of membrane-receptor regulation. *N Engl J Med* 310: 1570-1579
293. Lefkowitz RJ, Cerione RA, Codina J, Birnbaumer L, Caron MG (1985) Reconstitution of the  $\beta$ -adrenergic receptor. *J Membrane Biol* 87: 1-12
294. Lefkowitz RJ, Caron MG (1987) Molecular and regulatory properties of adrenergic receptors. *Recent Prog Horm Res* 43: 469-497
295. Lefkowitz RJ, Caron MG (1988) Adrenergic receptors. Models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *J Biol Chem* 263: 4993-4996
296. Lefkowitz RJ, Hausdorff WP, Caron MG (1990) Role of phosphorylation in desensitization of the  $\beta$ -adrenoceptor. *Trends Pharmacol Sci* 11: 190-194
297. Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P, Costa T (1993) Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci* 14: 303-307
298. Leonhardt H (1985) Zelle. In: Leonhardt H (Hrsg) *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. 7. Überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, S 13-46



299. Leonhardt H (1985) Hautdecke und Hautanhangsgebilde. In: Leonhardt H (Hrsg) Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. 7. Überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, S 304-321
300. Levitzki A (1994) Signal-transduction therapy - a novel approach to disease management. Eur J Biochem 226: 1-13
301. Lewis JE, Jensen PJ, Wheelock MJ (1994) Cadherin function is required for human keratinocytes to assemble desmosomes and stratify in response to calcium. J Invest Dermatol 102: 870-877
302. Li L, Tennenbaum T, Yuspa SH (1996) Suspension-induced murine keratinocyte differentiation is mediated by calcium. J Invest Dermatol 106: 254-260
303. Liggett SB (1991) Desensitization of the  $\beta$ -adrenergic receptor: distinct molecular determinants of phosphorylation by specific kinases. Pharmacol Res 24 (Suppl 1): 29-41
304. Limas CJ, Limas C (1984) Rapid recovery of cardiac  $\beta$ -adrenergic receptors after isoproterenol-induced „down“-regulation. Circ Res 55: 524-531
305. Löffler G (1990) Transkription und posttranskriptionale Prozessierung. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg) Biochemie und Pathobiochemie. 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, S 240-261
306. Löffler G (1990) Vitamine. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg) Biochemie und Pathobiochemie. 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, S 647-678
307. Löffler G (1990) Endokrine Gewebe I: Grundlagen der endokrinen Regulation von Lebensvorgängen. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg) Biochemie und Pathobiochemie. 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, S 761-786
308. Löffler G (1990) Endokrine Gewebe II: Die schnelle Stoffwechselregulation. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg) Biochemie und Pathobiochemie. 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, S 787-812
309. Löffler G (1990) Endokrine Gewebe IV: Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg) Biochemie und Pathobiochemie. 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, S 857-878

310. Lotan R (1980) Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 605: 33-91
311. Lubjuhn I (1995) Immunmodulation von Keratinozyten durch Interferone. In vitro-Versuche zur dosisabhängigen Wirkung der verschiedenen Interferon-Typen auf die Produktion von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen. Med. Dissertation, Universität Hamburg
312. Mahrle G, Orfanos CE (1975)  $\beta$ -Adrenerge Stimulation membrangebundener Adenylcyclase in normaler Epidermis und mangelnde Stimulierbarkeit bei Psoriasis. *Arch Derm Res* 253: 195-202
313. Mahrle G (1984) Etreinat (Tigason<sup>®</sup>) bei Psoriasis. In: Bauer R, Gollnick H (Hrsg) *Retinoide in der Praxis*. Grosse Verlag, Berlin, S 25-34
314. Mahrle G (1996) Die systemische Therapie der Psoriasis. *Z Hautkr* 71: 455-464
315. Maki T (1989) Density and functioning of human lymphocytic  $\beta$ -adrenergic receptors during prolonged physical exercise. *Acta Physiol Scand* 136: 569-574
316. Malbon CC, Hadcock JR (1988) Evidence that glucocorticoid response elements in the 5'-noncoding region of the hamster  $\beta_2$ -adrenergic receptor gene are obligate for glucocorticoid regulation of receptor mRNA levels. *Biochem Biophys Res Commun* 154: 676-681
317. Malbon CC, Hadcock JR, Rapeijko PJ, Ros M, Wang HY, Watkins DC (1990) Regulation of transmembrane signalling elements: transcriptional, post-transcriptional and post-translational controls. *Biochem Soc Symp* 56: 155-164
318. Maloteaux JM, Gossuin A, Waterkeyn C, Laduron PM (1983) Trapping of labelled ligands in intact cells: a pitfall in binding studies. *Biochem Pharmacol* 32: 2543-2548
319. Man M, Wang F (1992) Treatment of psoriasis with aminophyllin. *Int J Dermatol* 31: 370-371
320. Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM (1994) The retinoid receptors. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (eds) *The retinoids: biology, chemistry, and medicine*. Raven Press, New York, pp 319-349
321. Mano K, Akbarzadeh A, Townley RG (1979) Effect of hydrocortisone on beta-adrenergic receptors in lung membranes. *Life Sci* 25: 1925-1930

322. Marcelo CL, Duell EA, Stawiski MA, Anderson TF, Voorhees JJ (1979) Cyclic nucleotide levels in psoriatic and normal keratinized epidermis. *J Invest Dermatol* 72: 20-24
323. Marcelo CL, Voorhees JJ (1980) Cyclic nucleotides and the control of psoriatic cell function. In: Hamet P, Sands H (eds) *Advances in cyclic nucleotide research*. Vol. 12, Raven Press, New York, pp 129-137
324. Marcelo CL, Tomich J (1983) Cyclic AMP, glucocorticoid, and retinoid modulation of in vitro keratinocyte growth. *J Invest Dermatol* 81: 64s-68s
325. Marcelo CL, Gold RC, Fairley JA (1984) Effect of 1.2 mmol/l calcium, triamcinolone acetonide, and retinoids on low-calcium regulated keratinocyte differentiation. *Br J Dermatol* 111 (Suppl 27): 64-72
326. Marcelo CL, Madison KC (1984) Regulation of the expression of epidermal keratinocyte proliferation and differentiation by vitamin A analogs. *Arch Dermatol Res* 276: 381-389
327. Marcelo CL, Dunham WR (1997) Retinoic acid stimulates essential fatty acid-supplemented human keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol* 108: 758-762
328. Marks F, Grimm W (1972) Diurnal fluctuation and  $\beta$ -adrenergic elevation of cyclic AMP in mouse epidermis in vivo. *Nat New Biol* 240: 178-179
329. Marks F, Rebien W (1972) Cyclic 3',5'-AMP and theophylline inhibit epidermal mitosis in G<sub>2</sub>-phase. *Naturwissenschaften* 59: 41-42
330. Marks F, Rebien W (1972) The second messenger system of mouse epidermis. I. Properties and  $\beta$ -adrenergic activation of adenylate cyclase in vitro. *Biochim Biophys Acta* 284: 556-567
331. Marsh JD, Lachance D, Kim D (1985) Mechanisms of  $\beta$ -adrenergic receptor regulation in cultured chick heart cells. *Circ Res* 57: 171-181
332. Matsuo S, Iizuka H (1990) Cholera toxin- and forskolin-induced cyclic AMP accumulation of pig skin (epidermis). *J Dermatol Sci* 1: 7-14
333. Matthews G (1991) Ion channels that are directly activated by cyclic nucleotides. *Trends Pharmacol Sci* 12: 245-247
334. Mauro TM, Pappone PA, Isseroff RR (1990) Extracellular calcium affects the membrane currents of cultured human keratinocytes. *J Cell Physiol* 143: 13-20

335. Mauro T, Isseroff RR, Lasarow R, Pappone PA (1993) Ion channels are linked to keratinocyte differentiation. *J Membr Biol* 132: 201-209
336. Mauro T, Dixon DB, Hanley K, Isseroff RR, Pappone PA (1995) Amiloride blocks a keratinocyte nonspecific cation channel and inhibits  $\text{Ca}^{++}$ -induced keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 105: 203-208
337. May DC, Ross EM, Gilman AG, Smigel MD (1985) Reconstitution of catecholamine-stimulated adenylate cyclase activity using three purified proteins. *J Biol Chem* 260: 15829-15833
338. McGuire J, Fedarko N, Johanssen E, La Vigne J, Lyons G, Milstone L, Osber M (1982) The influence of retinoids on cultivated human keratinocytes. *J Am Acad Dermatol* 6: 630-639
339. McKay IA, Leigh IM (1991) Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing. *Br J Dermatol* 124: 513-518
340. Meeks RG, Zaharevitz D, Chen RF (1981) Membrane effects of retinoids: possible correlation with toxicity. *Arch Biochem Biophys* 207: 141-147
341. Menon GK, Grayson S, Elias PM (1985) Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol* 84: 508-512
342. Menon GK, Elias PM (1991) Ultrastructural localization of calcium in psoriatic and normal human epidermis. *Arch Dermatol* 127: 57-63
343. Meyer W (1996) Bemerkungen zur Eignung der Schweinehaut als biologisches Modell für die Haut des Menschen. *Hautarzt* 47: 178-182
344. Mickey JV, Tate R, Lefkowitz RJ (1975) Subsensitivity of adenylate cyclase and decreased  $\beta$ -adrenergic receptor binding after chronic exposure to (-)-isoproterenol in vitro. *J Biol Chem* 250: 5727-5729
345. Mickey JV, Tate R, Mullikin D, Lefkowitz RJ (1976) Regulation of adenylate cyclase-coupled beta adrenergic receptor binding sites by beta adrenergic catecholamines in vitro. *Mol Pharmacol* 12: 409-419
346. Mier PD, Gommans JM, Roelfzema H (1980) On the aetiology of psoriasis. *Br J Dermatol* 103: 457-460

347. Milstone LM, McGuire J, La Vigne JF (1982) Retinoic acid causes premature desquamation of cells from confluent cultures of stratified squamous epithelia. *J Invest Dermatol* 79: 253-260
348. Milstone LM (1983) Population dynamics in cultures of stratified squamous epithelia. *J Invest Dermatol* 81: 69s-74s
349. Milstone LM (1988) Effector functions of epidermal keratinocytes. In: Milstone LM, Edelson RL (eds) *Endocrine, metabolic and immunologic functions of keratinocytes*. Ann NY Acad Sci, vol. 548, New York Academy of Sciences, New York, pp 1-3
350. Minneman KP, Pittman RN, Molinoff PB (1981)  $\beta$ -Adrenergic receptor subtypes: properties, distribution, and regulation. *Ann Rev Neurosci* 4: 419-461
351. Mischke D, Wild G (1987) Polymorphic keratins in human epidermis. *J Invest Dermatol* 88: 191-197
352. Molinoff PB, Wolfe BB, Weiland GA (1981) Quantitative analysis of drug-receptor interactions: II. Determination of the properties of receptor subtypes. *Life Sci* 29: 427-443
353. Molinoff PB, Aarons RD (1983) Effects of drugs on  $\beta$ -adrenergic receptors on human lymphocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 5 (Suppl 1): S63-S67
354. Moll I (1989) Mikroskopische Struktur und Differenzierung der Haut. In: Jung EG (Hrsg) *Dermatologie*. Hippokrates Verlag, Stuttgart, S 18-28
355. Moll I (1989) Funktionen der Haut. In: Jung EG (Hrsg) *Dermatologie*. Hippokrates Verlag, Stuttgart, S 28-29
356. Morimoto S, Kumahara Y (1985) A patient with psoriasis cured by  $1\alpha$ -hydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Med J Osaka Univ* 35: 51-54
357. Morimoto S, Yoshikawa K (1989) Psoriasis and vitamin D<sub>3</sub>. *Arch Dermatol* 125: 231-234
358. Morris GM, Hadcock JR, Malbon CC (1991) Cross-regulation between G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 266: 2233-2238
359. Motulsky HJ, Insel PA (1982) Adrenergic receptors in man. Direct identification, physiologic regulation, and clinical alterations. *N Engl J Med* 29: 18-29
360. Motulsky HJ, Mahan LC, Insel PA (1985) Radioligand, agonists and membrane receptors on intact cells: data analysis in a bind. *Trends Pharmacol Sci* 6: 317-319

361. Münch G, Dees C, Hekman M, Palm D (1991) Multisite contacts involved in coupling of the  $\beta$ -adrenergic receptor with the stimulatory guanine-nucleotide-binding regulatory protein. *Eur J Biochem* 198: 357-364
362. Mui MM, Hsia SL, Halprin KM (1975) Further studies on adenylyl cyclase in psoriasis. *Br J Dermatol* 92: 255- 262
363. Mukherjee C, Caron MG, Lefkowitz RJ (1975) Catecholamine-induced subsensitivity of adenylyl cyclase associated with loss of  $\beta$ -adrenergic receptor binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 1945-1949
364. Mukherjee C, Caron MG, Lefkowitz RJ (1976) Regulation of adenylyl cyclase coupled  $\beta$ -adrenergic receptors by  $\beta$ -adrenergic catecholamines. *Endocrinology* 99: 347-357
365. Murray AW, Rogers A (1978) Calcium-dependent protein modulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases from mouse epidermis. *Biochem J* 176: 727-732
366. Nabishah BM, Merican Z, Morat PB, Alias AK, Khalid BAK (1990) Effects of steroid hormones pretreatment on isoprenaline-induced cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in rat lung. *Gen Pharmacol* 21: 935-938
367. Nasemann T, Sauerbrey W (1987) Anatomie und Histologie der normalen Haut und der Anhangsgebilde sowie Immunfluoreszenztechnik. In: Nasemann T, Sauerbrey W (Hrsg) *Lehrbuch der Hautkrankheiten und venerischen Infektionen*. 5. Erweiterte und neubearbeitete Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo, S 8-12
368. Nattel S, Ragno RE, Loon van G (1979) Mechanism of propranolol withdrawal phenomenon. *Circulation* 59: 1158-1164
369. Neer EJ (1995) Heterotrimeric G proteins: organizer of transmembrane signals. *Cell* 80: 249-257
370. Nelson HS (1986) Adrenergic therapy of bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 77: 771-785
371. Nies AS, Aarons RD, Gal J, Brammell HL, Molinoff PB (1979) Increased density of beta-adrenergic receptors on lymphocytes following propranolol treatment (abstract). *Clin Res* 27: 445A

372. Nijkamp FP, Engels F, Henricks PAJ, Oosterhout van AJM (1992) Mechanisms of  $\beta$ -adrenergic receptor regulation in lungs and its implications for physiological responses. *Physiol Rev* 72: 323-367
373. Nishizuka Y (1984) Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* 225: 1365-1370
374. Norris JS, Brown P, Cohen J, Cornett LE, Kohler PO, MacLeod SL, Popovich K, Robey RB, Sifford M, Syms AJ, Smith RG (1987) Glucocorticoid induction of  $\beta$ -adrenergic receptors in DDT<sub>1</sub> MF-2 smooth muscle cell line involves synthesis of new receptor. *Mol Cell Biochem* 74: 21-27
375. Northup JK, Sternweis PC, Gilman AG (1983) The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. Resolution, activity, and properties of the 35,000-Dalton ( $\beta$ ) subunit. *J Biol Chem* 258: 11361-11368
376. Ohkawara A, Iizuka H (1985) Glucocorticoid-induced alteration of beta-adrenergic adenylate cyclase response of epidermis. *Arch Dermatol Res* 277: 88-92
377. Okada N, Kitano Y, Ichihara K (1982) Effects of cholera toxin on proliferation of cultured human keratinocytes in relation to intracellular cyclic AMP levels. *J Invest Dermatol* 79: 42-47
378. O'Keefe EJ, Briggaman RA, Herman B (1987) Calcium-induced assembly of adherens junctions in keratinocytes. *J Cell Biol* 105: 807-817
379. Orenberg EK, Wilkinson DI (1982) Effect of  $\beta$ -adrenergic receptor blockade or refractoriness induced by isoproterenol on growth of keratinocytes in vitro. *Br J Dermatol* 107 (Suppl 23): 119-124
380. Orenberg EK, Pfendt EA, Wilkinson DI (1983) Characterization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic agonist stimulation of adenylate cyclase activity in human epidermal keratinocytes in vitro. *J Invest Dermatol* 80: 503-507
381. Ortonne JP (1996) Aetiology and pathogenesis of psoriasis. *Br J Dermatol* 135 (Suppl 49): 1-5
382. Osawa Y, Koizumi H, Fukaya T, Yasui C, Ohkawara A, Ueda T (1991) Adenylate cyclase induces intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase in single human epidermal keratinocytes of the epidermal sheet as measured by digital imaging microscopy using Fura 2-AM. *Arch Dermatol Res* 283: 91-95

383. Palm D (1987) Wie viele Beta-Rezeptoren-Blocker braucht der Arzt?  
Klin Wochenschr 65: 289-295
384. Palm D, Meier-Sydow J (1989) Erkrankungen der Atemwege. In: Fülgraff G, Palm D (Hrsg) Pharmakotherapie - Klinische Pharmakologie. 7. Neubearbeitete Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart New York, S 171-183
385. Pastan IH, Johnson GS, Anderson WB (1975) Role of cyclic nucleotides in growth control. Annu Rev Biochem 44: 491-552
386. Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Smith DH, Ramachandran J, Capon DJ (1987) Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. EMBO J 6: 3923-3929
387. Perkins JP, Waldo GL, Harden TK (1982) Effects of concanavalin A and methylamine on catecholamine-induced desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptor linked adenylate cyclase (abstract). Federation Proc 41: 1327
388. Perkins JP (1983) Desensitization of the response of adenylate cyclase to catecholamines. Curr Top Membr Transp 18: 85-108
389. Perkins JP, Hausdorff WP, Lefkowitz RJ (1991) Mechanisms of ligand-induced desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptors. In: Perkins JP (ed) The  $\beta$ -adrenergic receptors. Humana Press, Clifton, pp 73-124
390. Petrides PE (1990) Wasser und Elektrolythaushalt. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg) Biochemie und Pathobiochemie. 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, S 679-706
391. Petrides PE (1990) Endokrine Gewebe III: Hypothalamisch-hypophysäres System und Zielgewebe. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg) Biochemie und Pathobiochemie. 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, S 813-856
392. Petrides PE (1990) Muskelgewebe. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg) Biochemie und Pathobiochemie. 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, S 949-970
393. Pillai S, Bikle DD, Hincenbergs M (1988) Alterations in intracellular free calcium influences the differentiation of normal but not malignant keratinocytes (abstract). J Cell Biol 107: 73a



394. Pillai S, Bikle DD (1989) A differentiation-dependent, calcium-sensing mechanism in normal human keratinocytes (abstract). *J Invest Dermatol* 92: 500
395. Pillai S, Bikle DD, Mancianti ML, Cline P, Hincenbergs M (1990) Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *J Cell Physiol* 143: 294-302
396. Pillai S, Bikle DD (1991) Role of intracellular-free calcium in the cornified envelope formation of keratinocytes: differences in the mode of action of extracellular calcium and 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Cell Physiol* 146: 94-100
397. Pillai S, Bikle DD, Mancianti ML, Hincenbergs M (1991) Uncoupling of the calcium-sensing mechanism and differentiation in squamous carcinoma cell lines. *Exp Cell Res* 192: 567-573
398. Pisansarakit P, Cros du D, Moore GPM (1990) Cultivation of keratinocytes derived from epidermal explants of sheep skin and the roles of growth factors in the regulation of proliferation. *Arch Dermatol Res* 281: 530-535
399. Pittman RN, Molinoff PB (1980) Interactions of agonists and antagonists with  $\beta$ -adrenergic receptors on intact L6 muscle cells. *J Cyclic Nucleotide Res* 6: 421-435
400. Pittman RN, Molinoff PB (1983) Interactions of full and partial agonists with beta-adrenergic receptors on intact L6 muscle cells. *Mol Pharmacol* 24: 398-408
401. Ponc M, Kempenaar JA, Kloet de ER (1981) Corticoids and cultured human epidermal keratinocytes: specific intracellular binding and clinical efficacy. *J Invest Dermatol* 76: 211-214
402. Porzig H, Becker C, Reuter H (1982) Competitive and non-competitive interactions between specific ligands and beta-adrenoceptors in living cardiac cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 321: 89-99
403. Poumay Y, Pittelkow MR (1995) Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J Invest Dermatol* 104: 271-276
404. Powell JA, Duell EA, Voorhees JJ (1971) Beta adrenergic stimulation of endogenous epidermal cyclic AMP formation. *Arch Dermatol* 104: 359-365

405. Pschyrembel W (1986) Avogadro-Zahl. In: Pschyrembel W (Hrsg) Klinisches Wörterbuch. 255. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, S 158
406. Pschyrembel W (1986) Zählkammer. In: Pschyrembel W (Hrsg) Klinisches Wörterbuch. 255. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, S 1829
407. Raff M, Neumann R (1985) Die Bedeutung adrenerger Rezeptoren für die Dermatologie. *Hautarzt* 36: 259-264
408. Raftery EB, Denman AM (1973) Systemic lupus erythematosus syndrome induced by practolol. *Br Med J* 2: 452-455
409. Rall TW, Sutherland EW, Berthet J (1957) The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase IV: effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. *J Biol Chem* 224: 463-475
410. Rall TW, Sutherland EW (1958) Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles *J Biol Chem* 232: 1065-1076
411. Raynaud F, Leduc C, Anderson WB, Evain-Brion D (1987) Retinoid treatment of human psoriatic fibroblasts induces an increase in cyclic AMP-dependent protein kinase activity. *J Invest Dermatol* 89: 105-110
412. Raynaud F, Gerbaud P, Evain-Brion D (1994) Beneficial effect of a combination of retinoids and longacting theophylline in the treatment of psoriasis vulgaris. *Br J Dermatol* 31: 740-742
413. Reiss M, Lipsey LR, Zhou ZL (1992) Extracellular calcium-dependent regulation of transmembrane calcium fluxes in murine keratinocytes. *J Cell Physiol* 147: 281-291
414. Repke H, Liebmann C (1987) Die experimentellen Verfahren zur Charakterisierung von Membranrezeptoren durch Radioligand-Bindungsstudien. In: Repke H, Liebmann C (Hrsg) Membranrezeptoren und ihre Effektorsysteme: theoretische und praktische Grundlagen der Rezeptorforschung. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, S 55-80
415. Repke H, Liebmann C (1987) Quantitative Analyse der Ligand-Bindungskinetik. In: Repke H, Liebmann C (Hrsg) Membranrezeptoren und ihre Effektorsysteme: theoretische und praktische Grundlagen der Rezeptorforschung. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, S 81-103

416. Reverdin EC, Birchall N, Boulpaep E (1988) Human keratinocytes have voltage-dependent ion channels and a cationic conductance (abstract). *J Invest Dermatol* 90: 601
417. Reverdin EC, Cohen G, Birchall NM, Boulpaep E (1989)  $Ca^{2+}$  current in human epidermal cells (abstract). *Biophys J* 55: 603
418. Rheinwald JG, Green H (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6: 331-344
419. Rheinwald JG, Beckett MA (1980) Defective terminal differentiation in culture as a consistent and selectable character of malignant human keratinocytes. *Cell* 22: 629-632
420. Ring J (1978) Zyklisches Adenosin-3-5-Monophosphat (c-AMP) und Allergie. *Hautarzt* 29: 625-631
421. Ringold GM (1985) Steroid hormone regulation of gene expression. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25: 529-566
422. Risum G (1973) Psoriasis exacerbated by hypoparathyroidism with hypocalcemia. *Br J Dermatol* 89: 309-312
423. Roberts JM, Jacobs MM, Cheng JB, Barnes PJ, O'Brien AT, Ballard PJ (1985) Fetal pulmonary  $\beta$ -adrenergic receptors: characterization in the human and in vitro modulation by glucocorticoids in the rabbit. *Pediatr Pulm* 1: S69-S76
424. Robison GA, Butcher RW, Sutherland EW (1971) *Cyclic AMP*. Academic Press, New York
425. Roesler WJ, Vandenbark GR, Hanson RW (1988) Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J Biol Chem* 263: 9063-9066
426. Roop DR, Huitfeldt H, Kilkenny A, Yuspa SH (1987) Regulated expression of differentiation-associated keratins in cultured epidermal cells detected by monospecific antibodies to unique peptides of mouse epidermal keratins. *Differentiation* 35: 143-150
427. Ross EM, Gilman AG (1980) Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase. *Annu Rev Biochem* 49: 533-564

428. Roth NS, Campbell PT, Caron MG, Lefkowitz RJ, Lohse MJ (1991) Comparative rates of desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptors by the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6201-6204
429. Rubin AL, Rice RH (1986) Differential regulation by retinoic acid and calcium of transglutaminases in cultured neoplastic and normal human keratinocytes. *Cancer Res* 46: 2356-2361
430. Ruffolo RR (1991) Molecular structure and genetics of adrenoceptors: chairman's comments. In: *Adrenoceptors: structure, mechanisms, function. Advances in Pharmacological Sciences*, Birkhäuser Verlag, Basel, pp 111-114
431. Sachs L (1997) Der Weg zur Normalverteilung. In: Sachs L (Hrsg) *Angewandte Statistik*. 8. Auflage, Springer Verlag, Berlin, S 96-177
432. Sachs L (1997) Die Student-t-Verteilung. In: Sachs L (Hrsg) *Angewandte Statistik*. 8. Auflage, Springer Verlag, Berlin, S 208-211
433. Sachs L (1997) Der Kolmogoroff-Smirnoff-Test für die Güte der Anpassung. In: Sachs L (Hrsg) *Angewandte Statistik*. 8. Auflage, Springer Verlag, Berlin, S 426-432
434. Salonen RO, Matilla MJ (1984) A 24-hour glucocorticoid treatment increases the number of  $\beta$ -adrenoceptors in the rat lung. *Acta Pharmacol Toxicol* 55: 425-428
435. Salonen RO (1985) Concomitant glucocorticoid treatment prevents the development of  $\beta$ -adrenoceptor desensitization in the guinea pig lung. *Acta Pharmacol Toxicol* 57: 147-153
436. Samuelson WM, Davies AO (1984) Hydrocortisone-induced reversal of beta-adrenergic receptor uncoupling. *Am Rev Respir Dis* 130: 1023-1026
437. Scarpace PJ, Abrass IB (1982) Desensitization of adenylate cyclase and down-regulation of beta adrenergic receptors after in vivo administration of beta agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 223: 327-331
438. Scatchard G (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51: 660-672
439. Schallreuter KU, Wood JM, Lemke R, LePoole C, Das P, Westerhof W, Pittelkow MR, Thody AJ (1992) Production of catecholamines in the human epidermis. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 72-78

440. Schallreuter KU, Wood JM, Pittelkow MR, Swanson NN, Steinkraus V (1993) Increased in vitro expression of beta<sub>2</sub>-adrenoceptors in differentiating lesional keratinocytes of vitiligo patients. *Arch Dermatol Res* 285: 216-220
441. Schallreuter KU, Lemke KR, Pittelkow MR, Wood JM, Körner C, Malik R (1995) Catecholamines in human keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 104: 953-957
442. Schallreuter KU, Wei Y, Pittelkow MR, Swanson NN, Körner C, Lindsey NJ, Wood JM, Gardner MLG (1996) Atopic eczema can be associated with a mutation in the beta-2-adrenoceptor gene (abstract). *J Invest Dermatol* 106: 902
443. Schallreuter KU (1997) Epidermal adrenergic signal transduction as part of the neuronal network in the human epidermis. *JID Symposium Proceedings* 2: 37-40
444. Schocken DP, Roth GS (1977) Reduced  $\beta$ -adrenergic receptor concentrations in aging man. *Nature* 267: 856-858
445. Schwarz KR (1986) The principles of receptor binding studies. In: Fozzarú HA et al. (ed) *The heart and cardiovascular system*. Raven Press, New York, pp 169-188
446. Schwarz W, Schell H, Bachmann I, Hellmund HW (1984) Cyclic nucleotides in human epidermis - diurnal variations. *J Invest Dermatol* 82: 119-121
447. Segaert S, Garmyn M, Degreef H, Bouillon R (1997) Retinoic acid modulates the anti-proliferative effect of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in cultured human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 109: 46-54
448. Sellheyer K (1995) Transgene Mäuse als Modelle für Hautkrankheiten. *Hautarzt* 46: 755-761
449. Senet P, Peyri N, Berard M, Dubertret L, Boffa MC (1997) Thrombomodulin, a functional surface protein in human keratinocytes, is regulated by retinoic acid. *Arch Dermatol Res* 289: 151-157
450. Serres M, Viac J, Schmitt D (1996) Glucocorticoid receptor localization in human epidermal cells. *Arch Dermatol Res* 288: 140-146
451. Sharpe GR, Gillespie JI, Greenwell JR (1989) An increase in intracellular free calcium is an early event during differentiation of cultured human keratinocytes. *FEBS Lett* 254: 25-28

452. Sharpe GR, Fisher C, Gillespie JI, Greenwell JR (1993) Growth and differentiation stimuli induce different and distinct increases in intracellular free calcium in human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 284: 445-450
453. Shear M, Insel PA, Melmon KL, Coffino P (1976) Agonist specific refractoriness induced by isoproterenol. *J Biol Chem* 251: 7572-7576
454. Shipley GD, Pittelkow MR (1987) Control of growth and differentiation in vitro of human keratinocytes cultured in serum-free medium. *Arch Dermatol* 123: 1541a-1544a
455. Sibley DR, Strasser RH, Benovic JL, Daniel K, Lefkowitz RJ (1986) Phosphorylation / dephosphorylation of the  $\beta$ -adrenergic receptor regulates its functional coupling to adenylyl cyclase and subcellular distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 9408-9412
456. Sibley DR, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ (1987) Regulation of transmembrane signalling by receptor phosphorylation. *Cell* 48: 913-922
457. Sibley DR, Daniel K, Strader CD, Lefkowitz RJ (1987) Phosphorylation of the  $\beta$ -adrenergic receptor in intact cells: relationship to heterologous and homologous mechanisms of adenylate cyclase desensitization. *Arch Biochem Biophys* 258: 24-32
458. Siegenthaler G, Gumowski-Sunek D, Saurat JH (1990) Metabolism of natural retinoids in psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol* 95: 47S-48S
459. Siegenthaler G, Saurat JH, Ponc M (1990) Retinol and retinal metabolism. Relationship to the state of differentiation of cultured human keratinocytes. *Biochem J* 268: 371-378
460. Smith EL, Pincus SH, Donovan L, Holick MF (1988) A novel approach for the evaluation and treatment of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 19: 516-528
461. Solanki V, Murray AW (1978) The  $\beta$ -adrenergic receptor of newborn mouse skin. *J Invest Dermatol* 71: 344-346
462. Søndergaard J, Wadskov S, Jensen HÆ, Mikkelsen HI (1976) Aggravation of psoriasis and occurrence of psoriasiform cutaneous eruptions induced by practolol (Eraldin<sup>®</sup>). *Acta Derm Venereol (Stockh)* 56: 239-243

463. Stadel JM, Mullikin D, Dukes D, Lefkowitz RJ (1981) Catecholamine-induced desensitization in turkey erythrocytes: cAMP mediated impairment of high affinity agonist binding without alteration in receptor number. *J Cyclic Nucleotide Res* 7: 37-47
464. Stadel JM, Strulovici B, Nambi P, Lavin TN, Briggs MM, Caron MG, Lefkowitz RJ (1983) Desensitization of the beta-adrenergic receptor of frog erythrocytes: recovery and characterization of the down regulated receptors in sequestered vesicles. *J Biol Chem* 258: 3032-3038
465. Stadel JM, Lefkowitz RJ (1991) Beta-adrenergic receptors. Identification and characterization by radioligand binding studies. In: Perkins JP (ed) *The  $\beta$ -adrenergic receptors*. Humana Press, Clifton, pp 1-40
466. Stadler R, Marcelo CL, Voorhees JJ, Orfanos CE (1984) Effect of a new retinoid, Arotinoid (Ro 13-6298), on in vitro keratinocyte proliferation and differentiation. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 64: 405-411
467. Stadler R, Müller M, Detmar M, Orfanos CE (1987) Retinoids and keratinocyte differentiation in vitro. *Dermatologica* 175: 48-49
468. Staehelin M, Simons P (1982) Rapid and reversible disappearance of beta-adrenergic cell surface receptors. *EMBO J* 1: 187-190
469. Staehelin M, Simons P, Jaeggi K, Wigger N (1983) CGP-12177. A hydrophilic  $\beta$ -adrenergic receptor radioligand reveals high affinity binding of agonists to intact cells. *J Biol Chem* 258: 3496-3502
470. Stanley JR, Yuspa SH (1983) Specific epidermal protein markers are modulated during calcium-induced terminal differentiation. *J Cell Biol* 96: 1809-1814
471. Steinberg ML, Defendi V (1983) Transformation and immortalization of human keratinocytes by SV40. *J Invest Dermatol* 81: 131s-136s
472. Steinfath M, Geertz B, Schmitz W, Scholz H, Haverich A, Breil I, Hanrath P, Reupcke C, Sigmund M, Lo HB (1991) Distinct down-regulation of cardiac  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenoceptors in different human heart diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 343: 217-220

473. Steinkraus V, Körner C, Mensing H (1990) Specific binding of (-)-CGP-12177, a hydrophilic beta-adrenoceptor antagonist to living human keratinocytes (abstract). *J Invest Dermatol* 95: 490
474. Steinkraus V, Nose M, Mensing H, Körner C (1990) Radioligand binding characteristics of  $\beta_2$ -adrenoceptors of cultured melanoma cells. *Br J Dermatol* 123: 163-170
475. Steinkraus V, Körner C, Achterberg V, Reymann A, Woermann C, Mensing H (1991) Beta-adrenergic receptors of intact human keratinocytes display functional coupling to the adenylate cyclase-cAMP system (abstract). *Arch Dermatol Res* 283: 36
476. Steinkraus V, Körner C, Steinfath M, Mensing H (1991) High density of beta<sub>2</sub>-adrenoceptors in a human keratinocyte cell line with complete epidermal differentiation capacity (HaCaT). *Arch Dermatol Res* 283: 328-332
477. Steinkraus V, Levenig C, Wachs U (1991) Psoriasis nach Metipranolol. *Dtsch Med Wschr* 116: 1814
478. Steinkraus V, Steinfath M, Körner C, Mensing H (1991) Direct measurement of beta<sub>2</sub>-adrenergic receptors in human epidermal tissue (abstract). *J Invest Dermatol* 96: 1024
479. Steinkraus V, Mensing H (1992) Psoriasis und  $\beta$ -Blockade. *Hautarzt* 43: 179-183
480. Steinkraus V, Steinfath M, Körner C, Mensing H (1992) Binding of beta-adrenergic receptors in human skin. *J Invest Dermatol* 98: 475-480
481. Steinkraus V, Steinfath M, Mensing H (1992)  $\beta$ -adrenergic blocking drugs and psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 27: 266-267
482. Steinkraus V, Steinfath M, Stöve L, Körner C, Abeck D, Mensing H (1992) Decreased beta-adrenergic binding in psoriatic involved skin (abstract). *Arch Dermatol Res* 284: 40
483. Steinkraus V, Mak JCW, Mensing H, Ring J, Barnes PJ (1993)  $\beta$ -Receptor autoradiography in atopic and normal skin: in vivo up-regulation of the receptor after treatment with glucocorticoids (abstract). *J Invest Dermatol* 100: 449
484. Steinkraus V, Steinfath M, Stöve L, Körner C, Abeck D, Mensing H (1993)  $\beta$ -Adrenergic receptors in psoriasis: evidence for down-regulation in lesional skin. *Arch Dermatol Res* 285: 300-304



485. Steinkraus V, Mak JCW, Pichlmeier U, Mensing H, Ring J, Barnes PJ (1996) Autoradiographic mapping of beta-adrenoceptors in human skin. *Arch Dermatol Res* 288: 549-553
486. Stewart AF, Battaglini-Sabetta J, Millstone L (1984) Hypocalcemia-induced pustular psoriasis of von Zumbush. *Ann Intern Med* 100: 677-680
487. Stiles GL, Caron MG, Lefkowitz RJ (1984)  $\beta$ -Adrenergic receptors: biochemical mechanisms of physiological regulation. *Physiol Rev* 64: 661-743
488. Strader CD, Dixon RAF, Cheung AH, Candelore MR, Blake AD, Sigal IS (1987) Mutations that uncouple the  $\beta$ -adrenergic receptor from  $G_s$  and increase agonist affinity. *J Biol Chem* 262: 16439-16443
489. Strader CD, Sigal IS, Register RB, Candelore MR, Rands E, Dixon RAF (1987) Identification of residues required for ligand binding to the  $\beta$ -adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 4384-4388
490. Strasser RH, Stiles GL, Lefkowitz RJ (1984) Translocation and uncoupling of the beta-adrenergic receptor in rat lung after catecholamine promoted desensitization in vivo. *Endocrinology* 115: 1392-1400
491. Strasser RH, Cerione RA, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1985) Homologous desensitization of the  $\beta$ -adrenergic receptor. Functional integrity of the desensitized receptor from mammalian lung. *Mol Pharmacol* 28: 237-245
492. Strasser RH (1988) Neue Wege zur Regulation beta-adrenerger Rezeptoren: Modulation der neu entdeckten beta-adrenergen Rezeptorkinase als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt. In: Grosdanoff P, Kaindl F, Kraupp O, Lehnert T, Lichtlen P, Schuster J, Siegenthaler W (Hrsg) *Beta-Rezeptoren und beta-Rezeptorenblocker*. Walter de Gruyter, Berlin, S 55-72
493. Strittmatter WJ, Hirata F, Axelrod J (1981) Regulation of the beta-adrenergic receptor by methylation of membrane phospholipids. In: Dumont JE, Greengard P, Robinson GA (eds) *Advances in cyclic nucleotide research*. Vol. 14, Raven Press, New York, pp 83-91
494. Strosberg AD, Couraud PO, Durieu-Trautmann O, Delavier-Klutchko C (1982) Biochemical and immunochemical analysis of  $\beta$ -adrenergic receptor adenylate cyclase complexes. *Trends Pharmacol Sci* 3: 282-285

495. Su YF, Harden TK, Perkins JP (1979) Isoproterenol-induced desensitization of adenylate cyclase in human astrocytoma cells: relation of loss of hormonal responsiveness and decrement in  $\beta$ -adrenergic receptors. *J Biol Chem* 254: 38-41
496. Su YF, Harden TK, Perkins JP (1980) Catecholamine-specific desensitization of adenylate cyclase. Evidence for a multistep process. *J Biol Chem* 255: 7410-7419
497. Sugimoto M, Tajima K, Kojima A, Endo H (1974) Differential acceleration by hydrocortisone of the accumulation of epidermal structural proteins in the chick embryonic skin growing in a chemically defined medium. *Dev Biol* 39: 295-307
498. Summers RJ, McMartin LR (1993) Adrenoceptors and their second messenger systems. *J Neurochem* 60: 10-23
499. Sutherland EW, Rall TW (1960) The relation of adenosine-3',5'-phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones. *Pharmacol Rev* 12: 265-299
500. Suzuki N, Kanno T, Nagata Y, Kato T (1986) Inhibition of proliferative growth in glioma cells by calmodulin antagonists. *J Neurosurg* 65: 74-79
501. Szecsi E, Kohlschütter S, Schiess W, Lang E (1982) Abrupt withdrawal of pindolol or metoprolol after chronic therapy. *Br J Clin Pharmacol* 13 (Suppl 2): 353S-357S
502. Szentivanyi A (1968) The beta adrenergic theory of the atopic abnormality in bronchial asthma. *J Allergy* 42: 203-232
503. Takahashi H, Tamura T, Tsutsui M, Iizuka H (1990) Adenylate cyclase system in fetal rat keratinizing epidermal cells (FRSK cells) and SV40-transformed human keratinocytes. *J Dermatol* 17: 457-464
504. Takahashi H, Iizuka H (1991) Regulation of  $\beta_2$ -adrenergic receptors in keratinocytes: glucocorticoids increase steady-state levels of receptor mRNA in foetal rat keratinizing epidermal cells (FRSK cells). *Br J Dermatol* 124: 341-347
505. Takahashi H, Iizuka H (1993) Retinoid-induced beta-adrenergic inhibitory effect associated with increased thymidine incorporation of fetal rat keratinizing epidermal cells (FRSK cells). *J Dermatol Sci* 5: 122-129
506. Takigawa M, Yamada M, Taniguchi S, Imamura S (1988) Adenylate and guanylate cyclase activities in isolated guinea pig epidermal cells at various stages of differentiation. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 68: 27-32

507. Tang W, Ziboh VA, Isseroff R, Martinez D (1988) Turnover of inositol phospholipids in cultured murine keratinocytes: possible involvement of inositol triphosphate in cellular differentiation. *J Invest Dermatol* 90: 37-43
508. Tashkin DP, Conolly ME, Deutsch RI, Hui KK, Littner M, Scarpace P, Abrass I (1982) Subsensitization of beta-adrenoceptors in airways and lymphocytes of healthy and asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 125: 185-193
509. Tauscher M (1987) Methylxanthine. In: Tauscher M (Hrsg) *Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie*. 5. neu bearbeitete Auflage, Jungjohann, Neckarsulm München, S 36-38
510. Teelmann K (1984) Wirkungsmechanismen und Nebenwirkungen der Retinoide. In: Bauer R, Gollnick H (Hrsg) *Retinoide in der Praxis*. Grosse Verlag, Berlin, S 8-17
511. Tell GP, Haour F, Saez JM (1978) Hormonal regulation of membrane receptors and cell responsiveness: a review. *Metabolism* 27: 1566-1592
512. Thiele B (1995) Einfluß von Endothelin-1 (ET-1) auf die  $Ca^{2+}$ -Homöostase transformierter und nichttransformierter Keratinozyten in vitro. *Z Hautkr* 70: 129-131
513. Thomas L (1992) *Labor und Diagnose*. 4. Auflage, Med. Verlagsgesellschaft, Marburg
514. Titeler M (1989) Receptor binding theory and methodology. In: Williams M, Glennon RA, Timmermans PBMWM (eds) *Receptor pharmacology and function*. Marcel Dekker, New York Basel, pp 17-45
515. Tohmeh JF, Cryer PE (1980) Biphasic adrenergic modulation of  $\beta$ -adrenergic receptors in man. Agonist-induced early increment and late decrement in  $\beta$ -adrenergic receptor number. *J Clin Invest* 65: 836-840
516. Tong PS, Mayes DM, Wheeler LA (1988) Differential effects of retinoids on DNA synthesis in calcium-regulated murine epidermal keratinocyte cultures. *J Invest Dermatol* 90: 861-868
517. Tong PS, Horowitz NN, Wheeler LA (1990) Trans retinoic acid enhances the growth response of epidermal keratinocytes to epidermal growth factor and transforming growth factor beta. *J Invest Dermatol* 94: 126-131

518. Tota MR, Candelore MR, Dixon RAF, Strader CD (1991) Biophysical and genetic analysis of the ligand-binding site of the  $\beta$ -adrenoceptor. *Trends Pharmacol Sci* 12: 4-6
519. Trüeb RM (1995) Mutationen der G Proteine. *Hautarzt* 46: 603-606
520. Tsai JS, Chen A, (1977) L-Triiodothyronine increases the level of  $\beta$ -adrenergic receptor in cultured myocardial cells (abstract). *Clin Res* 25: 303A
521. Tse J, Powell JR, Baste CA, Priest RE, Kuo JF (1979) Isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: modifications in characteristics of  $\beta$ -adrenergic receptors, adenylate cyclase, and ventricular contraction. *Endocrinology* 105: 246-255
522. Tsutsui M, Iizuka H (1990) Inhibitory guanine nucleotide binding protein in pig epidermis: regulation of epidermal adenylate cyclase. *Arch Dermatol Res* 282: 469-474
523. Tucker WFG, MacNeil S, Bleehen SS, Tomlinson S (1984) Biologically active calmodulin levels are elevated in both involved and uninvolved epidermis in psoriasis. *J Invest Dermatol* 82: 298-299
524. Varani J, Nickoloff BJ, Dixit VM, Mitra RS, Voorhees JJ (1989) All-trans retinoic acid stimulates growth of adult human keratinocytes cultured in growth factor-deficient medium, inhibits production of thrombospondin and fibronectin, and reduces adhesion. *J Invest Dermatol* 93: 449-454
525. Vatner DE, Homcy CJ, Sit SP, Manders WT, Vatner SF (1984) Effects of pressure overload, left ventricular hypertrophy on beta-adrenergic receptors and responsiveness to catecholamines. *J Clin Invest* 73: 1473-1482
526. Veigl ML, Vanaman TC, Sedwick WD (1984) Calcium and calmodulin in cell growth and transformation. *Biochim Biophys Acta* 738: 21-48
527. Venter JC, Fraser CM, Harrison LC (1980) Autoantibodies to  $\beta_2$ -adrenergic receptors: a possible cause of adrenergic hyporesponsiveness in allergic rhinitis and asthma. *Science* 207: 1361-1363
528. Vestal RE, Wood AJJ, Shand DG (1974) Reduced  $\beta$ -adrenoceptor sensitivity in the elderly. *Clin Pharmacol Ther* 26: 181-185
529. Vivier du A (1976) Tachyphylaxis to topically applied steroids. *Arch Dermatol* 112: 1245-1248

530. Voorhees JJ, Duell EA (1971) Psoriasis as a possible defect of the adenylyl cyclase-cyclic AMP cascade. *Arch Dermatol* 104: 352-358
531. Voorhees JJ, Duell EA, Bass LJ, Kelsey WH (1971) Inhibition of epidermal cell division by isoproterenol, dibutyryl cyclic AMP, and theophylline (abstract). *Clin Res* 19: 682
532. Voorhees JJ, Duell EA, Kelsey WH (1972) Dibutyryl cyclic AMP inhibition of epidermal cell division. *Arch Dermatol* 105: 384-386
533. Voorhees JJ, Stawiski M, Duell EA, Haddox MK, Goldberg ND (1973) Increased cyclic GMP and decreased cyclic AMP levels in the hyperplastic, abnormally differentiated epidermis of psoriasis. *Life Sci* 13: 639-653
534. Voorhees JJ, Mier PD (1974) The epidermis and cyclic AMP. *Br J Dermatol* 90: 223-227
535. Voorhees JJ, Marcelo CL, Duell EA (1975) Cyclic AMP, cyclic GMP, and glucocorticoids as potential metabolic regulators of epidermal proliferation and differentiation. *J Invest Dermatol* 65: 179-190
536. Voorhees JJ (1982) Commentary: cyclic adenosine monophosphate regulation of normal and psoriatic epidermis. *Arch Dermatol* 118: 869-874
537. Walden RJ, Bhattacharjee P, Tomlinson B, Cashin J, Graham BR, Prichard BNC (1982) The effect of intrinsic sympathomimetic activity on  $\beta$ -receptor responsiveness after  $\beta$ -adrenoceptor blockade withdrawal. *Br J Clin Pharmacol* 13 (Suppl 2): 359S-364S
538. Wang HY, Berrios M, Hadcock JR, Malbon CC (1991) The biology of  $\beta$ -adrenergic receptors: analysis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Int J Biochem* 23: 7-20
539. Watt FM, Green H (1982) Stratification and terminal differentiation of cultured epidermal cells. *Nature* 295: 434-436
540. Watt FM (1983) Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J Invest Dermatol* 81: 100s-103s
541. Watt FM, Matthey DL, Garrod DR (1984) Calcium-induced reorganization of desmosomal components in cultured human keratinocytes. *J Cell Biol* 99: 2211-2215

542. Webb JG, Newman WH, Walle T, Daniell HB (1981) Myocardial sensitivity to isoproterenol following abrupt propranolol withdrawal in conscious dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 3: 622-635
543. Weinstein GD, Frost P (1968) Abnormal cell proliferation in psoriasis. *J Invest Dermatol* 50: 254-259
544. Wellhöner HH (1988) Gegenregulation, Toleranz, Supersensitivität, Rebound-Phänomene. In: Wellhöner HH (Hrsg) *Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie*. 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, S 74-77
545. Wellhöner HH (1988) Glucocorticoide. In: Wellhöner HH (Hrsg) *Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie*. 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, S 128-136
546. Wellhöner HH (1988) Purinderivate. In: Wellhöner HH (Hrsg) *Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie*. 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York; S 226-228
547. Wellhöner HH (1988)  $\beta$ -Sympatholytica ( $\beta$ -Blocker). In: Wellhöner HH (Hrsg) *Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie*. 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, S 300-302
548. Wellstein A, Palm D, Belz GG (1986) Affinity and selectivity of  $\beta$ -adrenoceptor antagonists in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol* 8: S36-S40
549. West MR, Page JM, Turner DM, Wood EJ, Holland DB, Cunliffe WJ, Rupniak HAT (1992) Simple assays of retinoid activity as potential screens for compounds that may be useful in treatment of psoriasis. *J Invest Dermatol* 99: 95-100
550. Whyte K, Jones CR, Howie CA, Deighton N, Sumner DJ, Reid JL (1987) Haemodynamic, metabolic, and lymphocyte  $\beta_2$ -adrenoceptor changes following chronic  $\beta$ -adrenoceptor antagonism. *Eur J Clin Pharmacol* 32: 237-243
551. Wiemer G, Kaiser G, Dietz J, Reinhardt M, Wellstein A, Palm D (1981) Desensitization of the  $\beta$ -adrenoceptor-adenylate cyclase system of immature erythrocytes by in-vivo treatment of rats with isoprenaline. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 317: 294-301

552. Wiley III HE, Weinstein GD (1979) Abnormal proliferation of uninvolved psoriatic epidermis: differential induction by saline, propranolol, and tape stripping in vivo. *J Invest Dermatol* 73: 545-547
553. Wilkinson DI, Orenberg EK (1981) Change with maturation in the response of keratinocyte adenylate cyclase to agonists (abstract). *Clin Res* 26: 156
554. Wilkinson DI, Orenberg EK (1983) Retinoids increase the response of guinea pig but not human keratinocytes to agonists of adenylate cyclase in vitro. *Arch Dermatol Res* 275: 147-151
555. Williams LT, Lefkowitz RJ, Watanabe AM, Hathaway DR, Besch HR (1977) Thyroid hormone regulation of  $\beta$ -adrenergic receptor number. *J Biol Chem* 252: 2787-2789
556. Wollina U, Klinger R, Wetzker R, Knopf B (1989) Increase of epidermal calmodulin precedes the formation of a psoriatic lesion. *Arch Dermatol Res* 281: 73-74
557. Wood AJJ, Feldman R, Nadeau J (1982) Physiological regulation of beta-receptors in man. *Clin Exp Hypertension A* 4: 807-817
558. Wright RK, Mandy SH, Halprin KM, Hsia SL (1973) Defects and deficiency of adenyl cyclase in psoriatic skin. *Arch Dermatol* 107: 47-53
559. Xiao JH, Durand B, Chambon P, Voorhees JJ (1995) Endogenous retinoic acid receptor (RAR)-retinoid X receptor (RXR) heterodimers are the major functional forms regulating retinoid-responsive elements in adult human keratinocytes. *J Biol Chem* 270: 3001-3011
560. Yaar M, Stanley JR, Katz SI (1981) Retinoic acid delays the terminal differentiation of keratinocytes in suspension culture. *J Invest Dermatol* 76: 363-366
561. Yarden Y, Rodriguez H, Wong SKF, Brandt DR, May DC, Burnier J, Harkins RN, Chen EY, Ramachandran J, Ullrich A, Ross EM (1986) The avian  $\beta$ -adrenergic receptor: primary structure and membrane topology. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6795-6799
562. Yasui C, Koizumi H, Fukaya T, Kumakiri M, Ohkawara A, Ueda T (1992) Adenylate cyclase induces intracellular calcium increase in single human epidermal keratinocytes measured by fluorescence microscopy using Fura 2-AM. *Br J Dermatol* 127: 589-594

563. Yoshikawa K, Adachi K, Halprin KM, Levine V (1975) On the lack of response to catecholamine stimulation by the adenylyl cyclase system in psoriatic lesions. *Br J Dermatol* 92: 619-624
564. Yoshikawa K, Adachi K, Halprin KM, Levine V (1975) The effects of catecholamine and related compounds on the adenylyl cyclase system in the epidermis. *Br J Dermatol* 93: 29-36
565. Yu SS, Lefkowitz RJ, Hausdorff WP (1993)  $\beta$ -Adrenergic receptor sequestration. *J Biol Chem* 268: 337-341
566. Yuspa SH, Hennings H, Tucker RW, Jaken S, Kilkenney AE, Roop DR (1988) Signal transduction for proliferation and differentiation in keratinocytes. In: Milstone LM, Edelson RL (eds) *Endocrine, metabolic and immunologic functions of keratinocytes*. Ann NY Acad Sci, vol. 548, New York Academy of Sciences, New York, pp 191-196
567. Yuspa SH, Kilkenney AE, Steinert PM, Roop DR (1989) Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol* 109: 1207-1217
568. Zaagsma J, Nahorski SR (1990) Is the adipocyte  $\beta$ -adrenoceptor a prototype for the recently cloned atypical ' $\beta_3$ -adrenoceptor'? *Trends Pharmacol Sci* 11: 3-7
569. Zelickson AS, Mottaz JH (1968) Epidermal dendritic cells: a quantitative study. *Arch Dermatol* 98: 652-659
570. Ziboh VA, Isseroff RR, Pandey R (1984) Phospholipid metabolism in calcium-regulated differentiation in cultured murine keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 122: 1234-1240
571. Zohar J, Bannet J, Drummer D, Fisch R, Epstein RP, Belmaker RH (1983) The response of lymphocyte  $\beta$ -adrenergic receptors to chronic propranolol treatment in depressed patients, schizophrenic patients, and normal controls. *Biol Psychiatr* 18: 553-560
572. Zweifach BW, Shorr E, Black MM (1953) The influence of the adrenal cortex on behavior of terminal vascular bed. *Ann NY Acad Sci* 56: 626-633



## 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	:	Adenosin
AC	:	Adenylatcyclase
AR	:	Adrenozeptor
$\beta$ ARK	:	$\beta$ -Adrenozeptorkinase
AS	:	Aminosäure
ATP	:	Adenosintriphosphat
BM	:	Basalmedium
$B_{\max}$	:	Maximale Anzahl an spezifischen Bindungsstellen
BPE	:	Hypophysenextrakt (bovine pituitary extract)
$^{\circ}\text{C}$	:	Grad Celsius
$\text{Ca}^{2+}$	:	Calciumionen
cAMP	:	Zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
Ci	:	Curie
$\text{cm}^2$	:	Quadratcentimeter
cpm	:	Counts per minute
$\text{CO}_2$	:	Kohlendioxid
CRBP	:	Cellular retinol-binding protein
CRABP	:	Cellular retinoic acid-binding protein
CRE	:	cAMP-responsive element
d	:	Tag
D	:	Distanz
Da	:	Dalton
DAG	:	1,2-Diacylglycerol
DNA	:	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	:	Ethylendiamintetraacetat
EGF	:	Epidermal growth factor
fmol	:	Femtomol
FGF	:	Fibroblast growth factor
FKS	:	Fötales Kälberserum

g	:	Gramm
G-CSF	:	Granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	:	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GC	:	Glukokortikoid
GR	:	Glukokortikoidrezeptor
GRE	:	Glucocorticoid-responsive element
G-Protein	:	Guanin-Nukleotid (GTP)-bindendes Protein
GDP	:	Guanosindiphosphat
GTP	:	Guanosintriphosphat
h	:	Stunde
H	:	Histamin
HBSS	:	Hanks' balanced salts solution
IP <sub>3</sub>	:	Inositol-1,4,5-triphosphat
kDa	:	Kilodalton
K <sub>D</sub>	:	Dissoziationskonstante
kg	:	Kilogramm
KM	:	Komplettmedium
k <sub>+1</sub>	:	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
k <sub>-1</sub>	:	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
l	:	Liter
min	:	Minute
mg	:	Milligramm
mm	:	Millimeter
mM bzw. mmol/l	:	Millimolar
ml	:	Milliliter
μg	:	Mikrogramm
μl	:	Mikroliter
mOsm/kg	:	Milliosmolar
mRNA	:	„Messenger“-Ribonucleinsäure
n	:	Anzahl
ng	:	Nanogramm

nmol	:	Nanomol
NGF	:	Nerve growth factor
NHK	:	Normale, humane Keratinozyten
p	:	Signifikanzwert
PAA	:	Partiell agonistische Aktivität
PBS	:	Phosphate buffered saline
PC	:	Primärkultur (primary culture)
PDE	:	Phosphodiesterase
PDGF	:	Platelet derived growth factor
PG	:	Prostaglandin
PKA, PKC	:	Proteinkinase A, Proteinkinase C
PUVA	:	Psoralen-Ultraviolett A
R	:	Rezeptor
RL	:	Radioligand
RNA	:	Ribonucleinsäure
rpm	:	Rounds per minute
RAR	:	Retinoid acid receptor
RARE	:	Retinoid acid responsive element
RS	:	Retinsäure
RXR	:	Retinoid-X-receptor
s	:	Sekunde
SD	:	Standardabweichung (standard deviation)
SFM	:	Serum freies Medium
T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub>	:	Trijodthyronin, Thyroxin
TGF $\alpha$	:	Transforming growth factor $\alpha$
TNF $\alpha$	:	Tumor necrosis factor $\alpha$
TH $\frac{1}{2}$	:	Halbwertszeit
TR	:	Thyroidhormon-Rezeptor
UVB	:	Ultraviolett B
VDR	:	Vitamin D-Rezeptor
$\bar{x}$	:	Mittelwert

## 8. DANKSAGUNG

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von 1992 bis 1994 an der Hautklinik der Universität Hamburg erstellt. Dem damaligen Direktor der Hautklinik, Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. J. Ring möchte ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Geräte der Hautklinik danken.

Herrn Prof. Dr. med. H. Mensing danke ich ganz herzlich für die Anregung zu dieser Dissertationsschrift. Durch sein beständiges Interesse am Fortgang der Arbeit und seine Unterstützung bei der Durchführung, Auswertung und Beurteilung der Befunde stand er mir bei der Anfertigung der Arbeit stets hilfreich zur Seite. Er ermöglichte mir durch die Bereitstellung finanzieller Mittel die Durchführung der experimentellen Untersuchungen.

Herrn Dr. med. G. Büttner möchte ich für die zahlreichen, fundierten Anregungen bei der Planung und Durchführung der experimentellen Arbeiten sowie der Auswertung und Beurteilung der Befunde danken. Seine stete Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreude hat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Christa Körner, die mich in das zellbiologische Arbeiten und den Umgang mit radioaktivem Material unterwiesen hat, gilt mein besonderer Dank. Sie stand mir stets engagiert, motivierend und hilfreich bei der Durchführung der Experimente zur Seite. Insbesondere danke ich ihr für das angenehme Arbeitsklima im Laborbereich.

Herrn Prof. Dr. med. V. Steinkraus danke ich für die Bereitstellung des Computerprogrammes, mit dessen Hilfe die Linearisierung der Bindungsdaten nach Hofstee erfolgte. Ferner ermöglichte er mir die Einsicht in seine umfangreiche Literatursammlung, wodurch mir die Literaturrecherche und das Literaturstudium erleichtert wurde.

Außerdem möchte ich meiner Familie für die verständnisvolle Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit ganz herzlich danken.

## **10. ERKLÄRUNG**

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.