

Aus dem Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**CHARAKTERISIERUNG β -ADRENERGER REZEPTOREN AUF
PFERDELYMPHOZYTEN UND DEREN REGULATION UNTER
DEM EINFLUß VON CLENBUTEROL UND DEXAMETHASON**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Getu Abraham Negash
aus Gojjam (Yetmen)/Äthiopien

Leipzig, 2001

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Jürgen Gropp

Betreuer: Professor Dr. Fritz R. Ungemach
Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
Veterinärmedizinische Fakultät
Universität Leipzig

Gutachter: Professor Dr. Otto-Erich Brodde
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Medizinische Fakultät
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Professor Dr. Gerald Schusser
Medizinische Tierklinik
Veterinärmedizinische Fakultät
Universität Leipzig

Tag der Verteidigung: 2. November 2001

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | EINLEITUNG | 1 |
| 2. | LITERATURÜBERSICHT | |
| | 3 | |
| 2.1. | Entdeckung und Vorkommen adrenerger Rezeptoren | 3 |
| 2.2. | Charakterisierung adrenerger Rezeptoren (Radioligandbindungsstudien) | 9 |
| 2.3. | Mechanismen der Signalübertragung über β -Adrenozeptoren | 12 |
| 2.4. | Mechanismen zur physiologischen und pharmakologischen Regulation von β -Adrenozeptoren | 15 |
| 2.4.1. | Homologe Desensibilisierung | 16 |
| 2.4.2. | Heterologe Desensibilisierung | 18 |
| 2.5. | Lymphozyten als Modell für die Charakterisierung der β -adrenergen Rezeptoren | 18 |
| 2.5.1. | Hintergrund und Eigenschaften | 18 |
| 2.5.2. | Korrelation mit β -Adrenozeptoren anderer Organe | 21 |
| 2.7. | Klinische Bedeutung der β -Adrenozeptoren | 22 |
| 2.8. | Eigenschaften und therapeutischer Einfluß des β -Adrenozeptor-Adenylatzyklase-Systems in equinen Organengeweben und Zellen | 26 |
| 3. | MATERIAL UND METHODEN | 28 |
| 3.1. | Tiere und Materialien | 28 |
| 3.1.1 | Versuchstiere | 28 |
| 3.1.2. | Einmalartikel | 29 |
| 3.1.3. | Chemikalien und Pufferlösungen | 29 |
| 3.1.4. | Geräte | 30 |
| 3.2. | Versuche und Versuchsprotokolle | 31 |
| 3.2.1. | Behandlungsversuche | 31 |
| 3.3. | Methoden | 33 |
| 3.3.1. | Isolierung der Lymphozyten | 33 |
| 3.3.2. | Radioligandbindungsstudien | 34 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.3.2.1. | (-)-[¹²⁵ I]-Iodocyanopindolol (ICYP) als Radioligand | 34 |
| 3.3.2.2. | Durchführung der Bindungsstudien | 35 |
| 3.3.2.2.1. | Sättigungsexperiment | 35 |
| 3.3.2.2.2. | Verdrängungsexperiment | 37 |
| 3.3.3. | Bestimmung der cAMP-Konzentration in Perdelymphozyten | 38 |
| 3.4. | Berechnungsgrundlagen und Rezeptortheorie | 39 |
| 3.4.1. | Sättigungsexperiment | 39 |
| 3.4.2. | Verdrängungsexperiment | 43 |
| 3.4.3. | Berechnung des durch Isoprenalin-induzierten Anstieges der cAMP-Akkumulation in Lymphozyten | 45 |
| 3.5. | Statistik | 45 |
| 4. | ERGEBNISSE | 47 |
| 4.1. | Charakterisierung der ICYP Bindung an intakten Pferde- lymphozyten | 47 |
| 4.1.1. | Definition der unspezifischen Bindung | 47 |
| 4.1.2. | Bestimmung der Stereoselektivität durch Kompetition der ICYP Bindung mit (-)-Propranolol und (+)-Propranolol | 50 |
| 4.1.3. | Subtypisierung β -adrenerger Rezeptoren | 52 |
| 4.1.4. | Rangfolge der pharmakologischen Wirkungsstärke von Isoprenalin, Adrenalin und Noradrenalin | 53 |
| 4.1.5. | Verdrängungsexperimente mit den Agonistliganden (-)-Isoprenalin und (-)-Adrenalin in Ab- und Anwesenheit von GTP | 54 |
| 4.1.6. | Sättigbarkeit der ICYP Bindung | 57 |
| 4.1.7. | Bestimmung der cAMP-Bildung in Lymphozyten | 59 |
| 4.2. | Einfluß von Clenbuterol und Dexamethason auf die Dichte der β_2 -Adrenozeptoren und auf die cAMP-Bildung in Pferdeymphozyten | 61 |
| 4.2.1. | Effekt von Clenbuterol auf die β_2 -Adrenozeptoren und intrazelluläre cAMP Bildung | 64 |
| 4.2.2. | Effekt von Dexamethason auf die Clenbuterol-induzierte Desensibilisierung von β -Adrenozeptoren | 66 |
| 4.2.3. | Wirkung einer gleichzeitigen Behandlung mit Clenbuterol und Dexamethason auf die β_2 -Adrenozeptordichte und deren | |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| | Funktion | 66 |
| 4.3. | Dissoziationskonstante (K_D) der ICYP Bindung an β -Adrenozeptoren von Pferdelymphozyten | 68 |
| 5. | DISKUSSION | 69 |
| 5.1. | Identifizierung und Charakterisierung der ICYP Bindung an intakten Pferdelymphozyten | 69 |
| 5.1.1. | Unspezifische Bindung | 69 |
| 5.1.2. | Sättigbarkeit | 72 |
| 5.1.3. | Stereoselektivität | 73 |
| 5.1.4. | Subtypisierung | 74 |
| 5.2. | Einfluß von Arzneimittel (Clenbuterol, Dexamethason) auf die Regulation von β -Adrenozeptoren und deren Ansprechbarkeit in Pferdelymphozyten | 76 |
| 5.2.1. | Einfluß von Clenbuterol | 76 |
| 5.2.2. | Einfluß von Dexamethason auf Clenbuterol-induzierte Desensibilisierung | 78 |
| 6. | ZUSAMMENFASSUNG | 82 |
| 7. | SUMMARY | 85 |
| 8. | LITERATURVERZEICHNIS | 87 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Eigenschaften der β -Adrenozeptoren | 4 |
| Tabelle 2: Eigenschaften der α_1 -Adrenozeptoren | 6 |
| Tabelle 3: Eigenschaften der α_2 -Adrenozeptoren | 7 |
| Tabelle.4: Radioliganden für den Nachweis β -adrenerger Rezeptoren | 11 |
| Tabelle 5: Veränderung der Anzahl der Adrenozeptoren bei verschiedenen Bedingungen | 25 |
| Tabelle 6: Kenndaten der Versuchstiere der gesamten Versuchsgruppe | 28 |
| Tabelle 7: Vergleich der Affinitäten β -adrenerger Agonist- und Antagonistliganden | 49 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|--|----|
| Abb. 1: | Schematische Darstellung der Struktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (β -Adrenozeptoren) | 13 |
| Abb. 2: | Modell für die Agonisten-induzierte Konformationsänderung der β -Adrenozeptoren | 14 |
| Abb. 3: | Schematische Darstellung der homologen Desensibilisierung β -adrenerger Rezeptoren | 17 |
| Abb. 4: | Versuchsprotokoll zur Clenbuterolbehandlung mit anschließender Dexamethasongabe | 31 |
| Abb. 5: | Versuchsablauf zur Kombinationsbehandlung Clenbuterol mit Dexamethason | 32 |
| Abb. 6: | Schematische Darstellung der Lymphozytenisolierung | 34 |
| Abb. 7: | Chemische Struktur des Radioliganden (ICYP) | 35 |
| Abb. 8: | Hemmung der Bindung von ICYP an intakte Pferdelymphozyten durch (\pm)-CGP 12177 und (-)-Isoprenalin | 48 |
| Abb. 9: | Stereoselektive Hemmung der Bindung von ICYP durch (-)- und (+)-Propranolol | 51 |
| Abb. 10: | Verdrängung der ICYP Bindung mit dem β_1 -selektiven (CGP 20712A) und dem β_2 -selektiven Adrenozeptorantagonisten (ICI 118,551) | 52 |
| Abb. 11: | Hemmung der ICYP Bindung durch (-)-Isoprenalin, (-)-Adrenalin und (-)-Noradrenalin | 54 |
| Abb. 12: | Hemmung der spezifischen ICYP Bindung durch (-)-Isoprenalin in Ab- und Anwesenheit von GTP (10^{-4} Mol/l) | 56 |
| Abb. 13: | Hemmung der spezifischen ICYP Bindung durch (-)-Adrenalin in Ab- und Anwesenheit von GTP (10^{-4} Mol/l) | 56 |
| Abb. 14: | Repräsentatives konzentrationsabhängiges Bindungsexperiment mit ICYP an Lymphozyten eines Pferdes (Sättigungsexperiment) | 58 |
| Abb. 15: | Spezifische ICYP Bindung und deren Transformation nach Scatchard | 59 |
| Abb. 16: | Konzentrations-Wirkungskurven der cAMP-Bildung in Pferdelymphozyten nach Stimulation mit (-)-Isoprenalin, (-)-Adrenalin und (-)-Noradrenalin | 60 |

- Abb. 17: Einfluß von Clenbuterol auf die β_2 -Adrenozeptorenzahl von Pferdelymphozyten 61
- Abb. 18: Einfluß von Clenbuterol auf die lymphozytäre cAMP-Bildung 62
- Abb.19: Zeitabhängigkeit der Abnahme und der Erholung der β -Adrenozeptoren (A) und der cAMP-Bildung (B) in Pferdelymphozyten während und nach einer Clenbuterolbehandlung. 63
- Abb. 20: Veränderungen der β_2 -Adrenozeptorendichte von Pferdelymphozyten unter Clenbuterolbehandlung und anschließender Dexamethasongabe 64
- Abb. 21: Einfluß von Dexamethason auf Clenbuterol-induzierte Veränderung der cAMP-Bildung in Pferdelymphozyten 65
- Abb. 22: Veränderungen der β -Adrenozeptorendichte (*obere Abb.*) und der cAMP-Bildung (*untere Abb.*) von Pferdelymphozyten unter gleichzeitiger Behandlung mit Clenbuterol und Dexamethason 67
- Abb. 23: Dissoziationskonstante (K_D) der ICYP Bindung an β -Adrenozeptoren von Pferdelymphozyten 68

ABKÜRZUNGEN

| | |
|------------------|---|
| A | Adrenalin |
| Abb. | Abbildung |
| AC | Adenylatzyklase |
| AR | Adrenozeptoren |
| βARK | beta-adrenerge Rezeptorkinase |
| B _{max} | maximale Rezeptordichte |
| BS | Bindungsstellen |
| cAMP | zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat |
| CB | Clenbuterol |
| CGP 12177 | (±)-4-(3-Tertiärybutylamino-2-hydroxypropoxy)-benzimidazol-2-ol |
| CGP 20712A | 1-[2-((3-Carbamoyl-4-hydroxy)phenoxy)ethylamino]-3-[4-(1-methyl-4-trifluoromethyl-imidazolyl)-phenoxy]-2-propanol |
| COB | chronische obstruktive Bronchitis |
| COPD | chronische obstruktive Lungenerkrankung |
| CPM | counts per minute, Zerfälle pro Minute |
| DAG | 1,2-Diacylglycerol |
| Dex | Dexamethason |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GF/C | Glasfaser Mikrofilter |
| G _I | inhibierendes G-Protein |
| GRK | G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase |
| G _S | Stimulierendes G-Protein |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| IBMX | 3-Isobutyl-1-methylxanthin |
| ICI 118,551 | Erythro-(+/-)-1-(7-methylindan-4-yloxy)-3-isopropylaminobutan-2-ol |
| ICYP | (-)-[¹²⁵ I]-Iodocyanopindolol |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-triphosphat |
| ISA | intrinsisch sympathomimetische Aktivität |
| ISO | Isoprenalin |
| K _D | Dissoziationskonstante |
| K _I | Inhibitionskonstante |

| | |
|----------|---|
| K_{IH} | Inhibitionskonstante für hochaffine Bindungsstellen |
| K_{IL} | Inhibitionskonstante für niederaffine Bindungsstellen |
| NA | Noradrenalin |
| n_H | Hill-Koeffizient |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PI | Phosphoinositol |
| pMNL | periphere mononukleäre Leukozyten |
| RIA | Radioimmunoassay |
| RPM | Umdrehung pro Minute |
| R.T. | Raumtemperatur |
| SB | spezifische Bindung |
| S.E.M. | Standard error of the mean |
| TB | Gesamtbindung |
| UB | unspezifische Bindung |

1. EINLEITUNG

β -Adrenozeptoren zählen zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Die Bestimmung dieser Rezeptoren in verschiedenen Organgeweben und Zellarten war ein wichtiger Schritt für pharmakologische Untersuchungen unter klinischen und therapeutischen Fragestellungen. Dies wurde möglich durch die Entwicklung hochaffiner radioaktiv markierter Liganden und deren Anwendung in der direkten, selektiven Markierung dieser Rezeptoren. Mit entsprechenden Radioligandbindungsstudien konnte in vivo und in vitro gezeigt werden, daß die wiederholte Applikation von Katecholaminen oder ihrer synthetischen Analoge mit β -sympathikomimetischer Wirkung bei Menschen und bei Tieren zur Verminderung der Empfindlichkeit des β -adrenergen Rezeptor-Adenylatzyklase-Komplexes führt (Harden, 1983; Lefkowitz et al., 1984; Stiles et al., 1984). Dieses Phänomen, das zeitabhängig ist und insbesondere bei β_2 -Adrenozeptoren intensiv untersucht wurde, bezeichnet man als "Desensibilisierung", "Toleranz" oder "Tachyphylaxe" bzw. wegen der Abnahme der Anzahl dieser Rezeptoren auch als "Down-Regulation". Die Desensibilisierung verringert die therapeutische Wirksamkeit adrenerger Katecholamine und anderer β -adrenerger Pharmaka, und ist somit ein Indiz für die klinisch bedeutsame Entwicklung einer Toleranz (Lefkowitz und Caron, 1985; Lohse, 1993).

Menschliche Lymphozyten, die eine homogene Population der Adenylatzyklase-gekoppelten β_2 -Adrenozeptoren enthalten (Brodde et al., 1981), erwiesen sich als ein geeignetes Modell für die Untersuchung der Agonist-induzierten bzw. krankheitsbedingten Rezeptorveränderungen an schwerer zugänglichen Zielorganen (Motulsky und Insel, 1982). Die Veränderungen der β -Adrenozeptoren dieser peripheren Blutzellen lieferten und liefern beispielhaft einen wichtigen Beitrag zur Erklärung der Pathophysiologie des Asthma bronchiale (Szentivanyi, 1980; Kariman, 1980; Bai, 1992) und der Bluthochdruckerkrankungen (Middeke et al., 1984; Brodde et al., 1984a) des Menschen. Man geht dabei davon aus, daß die Expression der Adrenozeptoren im gesamten Körper, unabhängig von der Gewebsart, den gleichen Steuerungsprozessen und pathologischen Mechanismen unterworfen ist.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß sich die β_2 -Adrenozeptoren auf Lymphozyten und in verschiedenen Geweben gleichsinnig verändern. So korrelierte die Anzahl der lymphozytären β_2 -Adrenozeptoren mit der des Herzen und des Myometriums (Brodde et al., 1987c; Michel et al., 1989). Auch sind die Eigenschaften von β_2 -Adrenozeptoren an Lymphozyten (cAMP-

Bildung) identisch mit β_2 -Adrenozeptoren in anderen Geweben (Herz, Venen, Lunge) und werden vergleichbar durch β -Adrenozeptorblocker und β -Mimetika reguliert (Brodde et al., 1988b).

Agonisten, die ihre Wirksamkeit über β_2 -Adrenozeptoren entfalten, werden weit verbreitet als Bronchodilatoren zur Behandlung der Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale des Menschen und chronische obstruktive Bronchitis (COB) des Pferdes sowie als Tokolytika eingesetzt. Sowohl bei gesunden Menschen als auch bei Asthmatikern konnte eine Abnahme der β_2 -Adrenozeptordichte und der cAMP-Bildung in Lymphozyten nach einwöchiger Terbutalingabe nachgewiesen werden (Hui et al., 1982; Aarons et al., 1983; Reinhardt et al., 1983; Brodde et al., 1985a). Ähnliche Befunde wurden auch in polymorphkernigen Leukozyten beobachtet (Galant et al., 1978). Eine klinisch relevante Konsequenz ist die Wirkungsabnahme bei Langzeittherapie mit diesen Pharmaka. Auch für den häufig in der Veterinärmedizin verwendeten und zur COB-Behandlung beim Pferd zugelassenen β_2 -Agonisten Clenbuterol existieren klinische Erfahrungen über eine interindividuelle unterschiedliche Ansprechbarkeit der Pferde und über Wirkungsabnahmen im Verlauf der Therapie (Sasse, 1995). Es existieren jedoch bisher bei dieser Tierart keine Untersuchungen über die Regulation der lymphozytären β -Adrenozeptoren unter Normalbedingungen sowie unter dem Einfluß von β_2 -Sympathomimetika.

Glucocorticoide, die ebenfalls in der Asthmatherapie und zur Behandlung der COB verwendet werden, scheinen die Desensibilisierung der β -Adrenozeptoren zu verhindern (Davies und Lefkowitz, 1984). Dies zeigten Versuche an Lymphozyten gesunder (Brodde et al., 1992) und asthmatischer (Brodde et al., 1988d) Menschen, die mit Terbutalin und zusätzlich mit Prednisolon behandelt wurden.

Mit dieser Arbeit soll deshalb ein Beitrag zur Klärung der Charakteristika und der Regulation der beta-adrenergen Rezeptoren bzw. deren Beeinflussung unter Clenbuterol- und Dexamethasonbehandlung geleistet werden. Zur Durchführung aller Versuche wurden intakte Lymphozyten aus dem Vollblut klinisch gesunder Pferde isoliert, an denen die Anzahl und Eigenschaften der β -Adrenozeptoren und deren funktionelle Ansprechbarkeit mit Hilfe der Radioligandbindungsstudien und Radioimmunoassay (RIA) für cAMP bestimmt wurden. Besonders interessierte hierbei das quantitative Ausmaß und der zeitliche Ablauf der Arzneimittel-induzierten Rezeptorveränderungen, um eine Grundlage für ein rationales Therapieschema zur Behandlung obstruktiver Bronchialerkrankungen des Pferdes zu liefern.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Entdeckung und Vorkommen adrenerger Rezeptoren

Die Erforschung adrenerger Rezeptoren hat in den letzten Jahrzehnten bei der Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Sympathomimetika eine große Rolle gespielt. Die wichtigsten Neurotransmitter im sympathischen Nervensystem sind das Noradrenalin, das auf Grund von elektrischen Aktionspotentialen an der präsynaptischen Membran in den synaptischen Spalt freigesetzt wird, und das Adrenalin, das im Nebennierenmark gebildet und über die Blutbahn zu den Erfolgsorganen gelangt. Die Wirkung dieser Katecholamine erfolgt über deren Bindung an spezifische Rezeptoren in der Zellmembran, den sogenannten adrenergen Rezeptoren.

Schon Anfang dieses Jahrhunderts stellten Langley (1905) und Sir Henry Dale (1906) die Theorie auf, daß die sympathischen Reaktionen über Rezeptoren ("receptive substances") vermittelt werden, die in den Erfolgsorganen lokalisiert sind und spezifische Haftstrukturen für hochspezifische Pharmaka darstellen. Dale beobachtete, daß Adrenalin, welches sonst zur Konstriktion von Gefäßen und damit zur Erhöhung des Blutdruckes führt, plötzlich vasodilatatorische Eigenschaften und damit eine Senkung des Blutdruckes entwickelt, wenn die Versuchstiere mit dem Alkaloid Ergotamin vorbehandelt waren. Er interpretierte seine Daten so, daß Adrenalin zwei Arten von Wirkungen besitzt, eine exzitatorische (Blutdruck erhöhende Wirkung) und eine inhibitorische (Blutdruck senkend). Daraus schloß er, daß es einen Rezeptor gibt, der durch zwei unterschiedliche Mediatoren, in erster Linie durch Adrenalin, gehemmt bzw. aktiviert wird. Ahlquist (1948) konnte zeigen, daß die unterschiedliche Wirkung von Adrenalin offensichtlich auf der Interaktion mit verschiedenen Rezeptoren beruht. Er fand, daß das sympathische Nervensystem zwei Gruppen von adrenergen Rezeptoren besitzt, mit denen die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin im Zielorganbereich eine Bindung eingehen können. Ahlquist untersuchte in isolierten Organen mit den klassischen pharmakologischen Methoden die unterschiedlichen Wirksamkeiten von natürlichen und synthetischen Agonistliganden (Adrenalin, Noradrenalin, α -Methylnoradrenalin, α -Methyladrenalin und Isoprenalin) auf Kontraktion und Relaxation der glatten Muskulatur. Beobachtungen mit diesen Agonistliganden zeigten eine charakteristische Wirkungsstärke für die Muskelkontraktion in der Reihenfolge Adrenalin > Noradrenalin > α -Methylnoradrenalin > α -Methyladrenalin > Isoprenalin, und für die Relaxation Isoprenalin > Adrenalin > α -Methyladrenalin > α -Methylnoradrenalin > Noradrenalin. Auf Grund dieser

pharmakologischen Eigenschaften der sympathomimetischen Amine in verschiedenen Geweben klassifizierte er diese Rezeptoren in α - und β -Adrenozeptoren. Die α -Adrenozeptoren vermitteln unter anderem die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur (Vasokonstriktion) und definitionsgemäß ergab sich für sie die Wirkungsreihenfolge der Agonisten Adrenalin \geq Noradrenalin \gg Isoprenalin, während die β -Adrenozeptoren vasodilatatorisch und am Herzen positiv inotrop und chronotrop wirken und sich für sie die Rangfolge Isoprenalin $>$ Adrenalin \geq Noradrenalin ergab. Mit dieser Theorie konnte letztendlich das Phänomen der von Dale beobachteten Adrenalinumkehr neu erklärt werden: Durch Ergotamin wurden die α -Adrenozeptoren blockiert, so daß Adrenalin nur noch an den β -Adrenozeptoren wirken konnte. Durch diese Erkenntnis war die Voraussetzung für die Entwicklung spezifischer Pharmaka geschaffen, die selektiv Rezeptoren blockieren konnten. Pharmakologisch werden die einzelnen Subtypen von β -Adrenozeptoren durch deren Affinität zu bestimmten Liganden definiert (siehe Tab. 1).

Tabelle 1: Eigenschaften der β -Adrenozeptoren

| Rezeptortypen | β_1 -Adrenozeptor | β_2 -Adrenozeptor | β_3 -Adrenozeptor |
|---|---|--|---|
| <i>Selektive Agonisten</i> | Xamoterol , Denopamin | Clenbuterol , Procaterol, Salbutamol, Salmeterol, Formoterol, Terbutalin , Fenoterol | BRL-37344, ZD-7114, CGP-12177, CL-316243 |
| <i>Selektive Antagonisten</i> | Betaxolol, Bisoprolol, Atenolol, Practolol, CGP 20712A | ICI 118,551 | SR 59230A |
| <i>Transduktions- mechanismen</i> | \uparrow Adenylatzyklase (über G_s) | \uparrow Adenylatzyklase (über G_s) | \uparrow Adenylatzyklase, $G_s, G_{i/0}$ |
| <i>Physiologische Funktion</i> | \uparrow Herzfrequenz und Kontraktilität | Relaxation der glatten Muskulatur, z.B. Bronchodilatation Glykogenolyse, Lipolyse | Lipolyse |
| <i>Reihenfolge der Wirkungsstärke</i> | ISO>A=NA | ISO>A>NA | ISO>A=NA |

ISO = Isoprenalin; A = Adrenalin; NA = Noradrenalin

(nach Alexander und Peters, 2000)

Mit der Erforschung adrenerger Rezeptoren kam auch die Frage auf, wie die biologische Information der Katecholamine bzw. Hormone in der Zelle vermittelt wird. Durch die Untersuchungen von Rall et al. (1957) und Sutherland et al. (1963) wurde die Bedeutung der zyklischen Nukleotide als "second messenger" das zyklische-3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) entdeckt und nachgewiesen, daß durch Stimulation der β -Adrenozeptoren das Enzym Adenylatzyklase aktiviert und dadurch cAMP aus ATP in der Zelle umgewandelt wird. α -Adrenozeptoren sind cAMP unabhängig oder können unter bestimmten Umständen die cAMP Bildung hemmen.

1967 konnte durch Lands und Mitarbeiter und wenig später durch Furchgott (1972) festgestellt werden, daß β -Adrenozeptoren keine einheitliche Population sind, und eine weitere Unterteilung der β -adrenergen Rezeptoren in zwei Subtypen (β_1 - und β_2 -Rezeptoren) notwendig war. Diese konnten wiederum durch die Rangfolge der Wirkungsstärke der Agonistliganden für deren β -adrenergen Effekt sowohl in isolierten Geweben als auch in Versuchstieren in vivo unterschieden werden. Die β -Adrenozeptoren, die für die Zunahme der Herzfrequenz und Kontraktilität der Herzmuskulatur sowie der Lipolyse des Fettgewebes verantwortlich sind, wurden durch Katecholamine in der Rangfolge Isoprenalin > Adrenalin = Noradrenalin stimuliert. Sie wurden als β_1 -Adrenozeptoren definiert. Die β -Adrenozeptoren, die vorwiegend eine Vaso- und Bronchodilatation sowie Relaxation der Uterusmuskulatur bewirken, besitzen dagegen die Agonistenrangfolge Isoprenalin > Adrenalin > Noradrenalin. Sie wurden als β_2 -Adrenozeptoren bezeichnet. Der wichtigste physiologische Unterschied zwischen β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren besteht darin, daß sich beide Subtypen in der Empfindlichkeit für Noradrenalin unterscheiden. β_1 -Adrenozeptoren haben in etwa die gleiche Affinität für Adrenalin und Noradrenalin, während β_2 -Adrenozeptoren wesentlich stärker durch Adrenalin stimuliert werden als durch Noradrenalin (Tabelle 1). Inzwischen erfolgte zwar durch zahlreiche pharmakologisch experimentelle und klinische Beobachtungen eine gewisse Annäherung an die Wirkmechanismen, dennoch sind die genauen Vorstellungen über Interaktionen zwischen Adrenozeptoren und Katecholaminen bzw. entsprechenden adrenerg wirksamen Pharmaka auf Grund der Vielfältigkeit der Wechselwirkungen auf zellulärer und molekularer Ebene noch lückenhaft. β -Adrenozeptoren kommen in fast allen menschlichen und tierischen Zellen vor. Die wichtigsten über die jeweilige β -Adrenozeptorsubtypen vermittelten Wirkungen (β_1 , β_2 , β_3) sind in Tabelle 1 dargestellt.

Die von Ahlquist benannten α -Adrenozeptoren wurden ebenfalls in den folgenden Jahren - zum Teil auf Grund der dann verfügbaren hochspezifischen, synthetischen adrenergen

Agonisten und Antagonisten und anhand der beschriebenen verschiedenen pharmakologischen Kriterien - weiter unterteilt in α_1 - und α_2 -Adrenozeptoren. α_1 -Rezeptoren sind postsynaptische Rezeptoren, die beispielsweise für die Kontraktion der glatten Muskulatur verantwortlich sind.

Tabelle 2: Eigenschaften der α_1 -Adrenozeptoren

| <i>Rezeptortypen</i> | α_{1A} -Adrenozeptor | α_{1B} -Adrenozeptor | α_{1D} -Adrenozeptor |
|---------------------------------------|---|--|--|
| <i>Selektive Agonisten</i> | Oxymetazolin, A61603 | keine | keine |
| <i>Nichtselektive Agonisten</i> | Cirazolin, M-6434, Methoxamin, Phenylephrin | Cirazolin, M-6434, Methoxamin, Phenylephrin | Cirazolin, M-6434, Methoxamin, Phenylephrin |
| <i>Selektive Antagonisten</i> | RS17053, WB 4101, (S)-(+)-Niguldipin, 5-Methylurapidil, SNAP5089, Rec152739, SB216469, RO700004, KMD3213 | CEC (irreversibel) | BMY7378, SKF105854 (irreversibel) |
| <i>Nichtselektive Antagonisten</i> | Corynanthin, Prazosin | Corynanthin, Prazosin | Corynanthin, Prazosin |
| <i>Transduktionsmechanismen</i> | aktiviert $G_{p/q}$, \uparrow PI "turnover", \uparrow [Ca^{2+}] _{i.c.} , aktiviert spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle | | |
| <i>Physiologische Funktion</i> | Kontraktion der glatten Muskulatur, myokardiale Kontraktion | Kontraktion der glatten Muskulatur | Kontraktion der glatten Muskulatur |
| <i>Reihenfolge der Wirkungsstärke</i> | NA \geq A | A=NA | A=NA |

(nach Alexander und Peters, 2000)

α_2 -Adrenozeptoren sind Rezeptoren, die an den präsynaptischen Membranen der sympathischen Nervenendigungen lokalisiert sind und mittels eines Feed-Back-Mechanismus die Freisetzung von Noradrenalin hemmen (siehe Tabelle 2 und 3). Postsynaptische α_2 -Adrenozeptoren können auch Vasokonstriktion hervorrufen (Brodde, 1988c).

Tabelle 3: Eigenschaften der α_2 -Adrenozeptoren

| Rezeptortypen | α_{2A}-Adrenozeptor | α_{2B}-Adrenozeptor | α_{2C}-Adrenozeptor |
|---------------------------------------|--|---|---|
| Selektive Agonisten | Oxymetazolin (partieller Agonist), Guanfacin | keine | keine |
| Nichtselektive Agonisten | UK 14, 304 Clonidin | UK 14, 304 Clonidin | UK 14, 304 Clonidin |
| Selektive Antagonisten | BRL 44408 , BRL 48962 | ARC 239 , Imiloxan | Rauwolscin , MK 912 |
| Nichtselektive Antagonisten | RS 79948 , Yohimb in , RS 15385, RX 821002, SKF 86466, MK-912, Rauwolscin , Prazosin | RS 79948 , Yohimb in , RS 15385, RX 821002, SKF 86466, MK-912, Rauwolscin , Prazosin | RS 79948 , Yohimb in , RS 15385, RX 821002, SKF 86466, MK-912, Rauwolscin , Prazosin |
| Transduktionsmechanismen | aktiviert $G_{i/o}$, hemmt Adenylatzyklase, \downarrow cAMP, hemmt spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, aktiviert Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle | | |
| Physiologische Funktion | Hypotension, Sedation, Analgesie, Anaesthesie, Hemmung der Freisetzung von Neurotransmittern | Vasokonstriktion | nicht bestimmt |
| Reihenfolge der Wirkungsstärke | A>NA | A>NA | A>NA |

(nach Alexander und Peters, 2000)

Um die wie oben beschrieben definierten β -Adrenozeptoren näher zu charakterisieren und sie gezielt pharmakologisch beeinflussen zu können, entwickelte man Substanzen, die möglichst selektiv nur β_1 - oder β_2 -Rezeptoren beeinflussen sollten (beispielsweise β_2 -selektive Agonisten, (Übersicht dieser Substanzen in der Tabelle 1). Man erkannte allerdings frühzeitig, daß diese Pharmaka nur eine relative Selektivität für einen Subtyp haben. Die erste Vermutung fand sich in dem Bericht von Carlsson et al. (1972), die zeigen konnten, daß der durch β -adrenerge Agonisten induzierte positiv chronotrope Effekt (am Herzen der Katze) sowohl durch den " β_1 -selektiven" Antagonisten Practolol als auch den " β_2 -selektiven" Antagonisten H 35/25 beeinflusst werden konnte. Außerdem zeigten

Radioligandbindungsstudien, daß die zu Anfang von Lands et al. (1967) postulierten β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren nicht organspezifisch verteilt sind, sondern beide Subtypen in ein und demselben Gewebe vorkommen können, wobei allerdings jeweils einer dominiert. Die Koexistenz beider β -adrenerger Rezeptorsubtypen wurde in menschlichen und tierischen Geweben vielfach beschrieben (Übersichten in Minneman et al., 1981; Stiles et al., 1984; Stiles und Lefkowitz, 1984; Brodde, 1991; Brodde und Michel, 1999). Vergleichbare Ergebnisse wurden im Laufe der Jahre durch in vivo oder in vitro Versuche bei verschiedenen Tierarten nachgewiesen. Inwieweit es für die Rezeptorverteilung individuelle Schwankungsbreiten bzw. Unterschiede bei verschiedenen Spezies gibt, ist bislang noch nicht geklärt. Mit Hilfe von Radioligandbindungsstudien wurde es möglich, das relative Verhältnis der β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren in einem Organ zu bestimmen. Die Quantifizierung dieses Verhältnisses erfolgt, indem man die Bindung von nicht selektiven Radioliganden (siehe Tabelle 4) durch eine Reihe selektiv bindender Pharmaka hemmt. Anhand des Verlaufs der Verdrängungskurven konnte man den relativen Anteil beider Rezeptortypen errechnen. Damit wurde das Bindungsverhalten selektiver und nichtselektiver Substanzen an verschiedenen Geweben untersucht (Minneman et al., 1979; Brodde et al., 1987c, 1989), um zu prüfen, ob ein oder zwei β -Adrenozeptorsubtypen existieren. Die geeignetste Methode ist die direkte Bestimmung der β_1 - und β_2 -Rezeptoren unter Verwendung eines hochselektiven Radioliganden für einen Rezeptorsubtyp. Es ergab sich, daß nahezu alle Gewebe sowohl β_1 - als auch β_2 -Adrenozeptoren enthalten. Man ermittelte unterschiedliche Verhältnisse der β_1 - und β_2 -Rezeptoren in verschiedenen Organen, z. B. an Rattenherzen ca. 83 % β_1 - und 17 % β_2 -Rezeptoren, an der Rattenlunge 85 % β_2 - und 15 % β_1 -Rezeptoren (Minneman et al., 1979, Brodde, 1989).

Unklar ist allerdings bisher, ob diese Rezeptoren innerhalb dieser Organe auf einer Zelle gemeinsam lokalisiert oder auf verschiedene Zellen verteilt sind, wie zum Beispiel an Rattenherzen (β_1/β_2) (Freissmuth et al., 1986) oder an C₆-Gliomazellen (β_1/β_2) (Neve et al., 1986). Es gibt einige Zellarten, die nur einen Rezeptorsubtyp aufweisen, wie Lymphozyten der Menschen (β_2) (Brodde et al., 1981; Motulsky und Insel, 1982), Granulozyten (β_2) (Galant et al., 1981), Rattenlymphozyten (β_2) (Aarons et al., 1980) und SK-N-MC-Zellen (β_1) (Fishman et al., 1991, Michel et al., 1993).

Zwischenzeitlich konnte auch noch die Existenz eines weiteren Subtypes der β -Adrenozeptoren, die als atypische oder β_3 -Adrenozeptoren bezeichnet werden, in verschiedenen Organen, beispielsweise am Herzen, gezeigt werden (Kaumann, 1989).

In verschiedenen Geweben von Säugetieren wurden die cDNA aller drei Subtypen der β -Adrenozeptoren geklont: für β_1 von Frielle et al. (1987), für β_2 von Dixon et al. (1986) und für β_3 von Emorine et al. (1989).

2. 2. Charakterisierung adrenerger Rezeptoren (Radioligandbindungsstudien)

Die klassische pharmakologische Methode, um Rezeptoren in intakten Geweben oder auch an Zellmembranen als α - bzw. β -Rezeptoren zu beschreiben, bestand darin, den Effekt von verschiedenen Agonisten oder Antagonisten auf die biologische Antwort sowie die biochemischen Eigenschaften dieser Rezeptoren zu untersuchen, die durch das betreffende Hormon oder den Neurotransmitter ausgelöst wurden. Damit war es jedoch nicht möglich, quantitative Aussagen über die Wechselbeziehung von Ligand und Rezeptor zu treffen. Dies wurde erst durch Radioligandbindungsstudien zur Identifizierung, Charakterisierung und quantitativen Bestimmung von Rezeptoren seit Anfang der siebziger Jahre möglich. Radioligandbindungsstudien zur direkten Erfassung der Dichte und Affinität von β -Adrenozeptoren wurden mit den radioaktiv markierten Antagonistliganden (-) [^3H]-Dihydroalprenolol (Lefkowitz et al., 1974); (\pm)[^3H]-Propranolol (Atlas et al., 1974) und (\pm)[^{125}I]-Iodohydroxybenzylpindolol (Aurbach et al., 1974) durchgeführt. Auf Grund von Untersuchungen zur Struktur-Wirkungs-Beziehung der biologischen Wirkungen von β -Agonisten und β -Antagonisten in vivo und der Kinetik der Aktivitätsänderung der Adenylatzyklase, lassen sich bestimmte Voraussagen machen, welche Eigenschaften die spezifische β -Rezeptorbindung dieser Substanzen in vitro haben muß. Die spezifische Bindung eines Radioliganden an einem Rezeptor sollte folgende Kriterien erfüllen:

– Sättigbarkeit

Da es nur eine endliche Zahl von Rezeptoren/Zelle gibt, muß die Bindung von Liganden an β -Rezeptoren ab einer bestimmten Konzentration gesättigt sein.

– Reihenfolge der Wirkungsstärke

Die Affinität von Agonisten oder Antagonisten sollte vergleichbar zur Spezifität der in vivo beschriebenen biologischen Wirksamkeit sein, z. B. dürfen α -Antagonisten nicht an den β -Rezeptor binden, Isoprenalin sollte eine höhere Affinität für β -Rezeptoren besitzen als Adrenalin und Noradrenalin.

– Stereospezifität

(-)-Stereoisomere von Agonisten und Antagonisten müssen wesentlich besser gebunden werden als die (+)-Isomere.

– Bindungskinetik (“Gleichgewichtseinstellung”)

Die Bindung muß schnell und reversibel sein.

Williams et al. (1976) führten Bindungsstudien an Membranen von mononukleären Leukozyten mit dem Radioliganden (-)[³H]-Alprenolol durch. Diese Studien erlaubten eine Quantifizierung der Rezeptorbindungsstellen und -affinität. Später wurden tritiierte, z.B. (±)[³H]-CGP-12177 (Staehein und Hertel, 1983), bzw. iodierter Radioliganden, z.B. (-)[¹²⁵I]-Iodopindolol (Barovsky und Brooker, 1980) und (±)[¹²⁵I]-Iodocyanopindolol (Engel et al., 1981) mit höherer spezifischer Aktivität synthetisiert (Tabelle 4), wodurch sich die Möglichkeit eröffnete, auch in kleinen Gewebsmengen β-Adrenozeptoren quantitativ zu bestimmen. Speziell die iodierten Liganden besitzen eine sehr hohe spezifische Aktivität (> 2000 Ci/mmol) und Affinität für β-Adrenozeptoren. Mit ihrer Hilfe war es möglich, β-adrenerge Rezeptoren in diversen Organen und Zellen bei Mensch und Tier nachzuweisen, so z. B. in Herz und Lunge der Ratte (Aarons und Molinoff, 1982) und in Blutzellen des Menschen, hauptsächlich in Lymphozyten (Williams et al., 1976; Galant et al., 1981; Brodde et al., 1981; Meurs et al., 1982; Marinetti et al., 1983; De Blasi et al., 1985 und 1986), in Erythrozyten (Sager, 1983) und in Thrombozyten (Kerry et al., 1984; Cook et al., 1985) sowie in Lymphozyten von Rindern (Roets und Burvenich, 1987; Vermeir et al., 1993). Während tritiierte Radioliganden nur bedingt für Untersuchungen an intakten Zellen einschließlich peripherer mononukleärer Leukozyten einsetzbar waren (Staehein et al., 1983; Davies and Lefkowitz, 1980), konnten mit (-)-[¹²⁵I]-Iodocyanopindolol wesentliche Kenntnisse über die physiologische und pathophysiologische Regulation von Adrenozeptoren in Geweben sowie deren pharmakologische Beeinflussung gewonnen werden (Brodde et al., 1981).

Tabelle 4: Radioliganden für den Nachweis β -adrenerger Rezeptoren

| Radioligand | Spezifische Aktivität (Ci/mmol) | K_D | Spezifität |
|---|--|----------------------|--|
| <i>Antagonisten</i> | | | |
| (-) [³ H]-Dihydroalprenolol ([³ H]-DHA) | 120 | 5-2 nmol/l | nicht selektiv |
| (±) [¹²⁵ I]-Iodohydroxybenzylpindolol (¹²⁵ I-HYP) | 2,200 | 10-1000 pmol/l | nicht selektiv |
| (±) [³ H]-Propranolol ([³ H]-PRO) | 30 | 1-10 nmol/l | nicht selektiv |
| (-) [¹²⁵ I]- Iodocyanopindolol (¹²⁵ I-CYP) | 2,200 | 10-50 pmol/l | zweifach β_2 -selektiv* ($\beta_2 \gg \beta_1$) |
| (-) [¹²⁵ I]-Iodopindolol (¹²⁵ I-PIN) | 2,200 | 50-200 pmol/l | nicht selektiv |
| (±) [³ H]-CGP-12177 ([³ H]-CGP) | 60 | 100-500 pmol/l | nicht selektiv |
| <i>Agonisten</i> | | | |
| (±) [³ H]-Hydroxybenzyl- isoproterenol ([³ H]-HBI) | 20 | 1-10 nmol/l | $\beta_2 > \beta_1$ |
| (-) [³ H]-Epinephrin ([³ H]-EPI) | 85 | 80 nmol/l | $\beta_2 > \beta_1$ |
| (±) [³ H]-Isoproterenol ([³ H]-ISO) | 15 | 100 nmol/l | nicht selektiv |

(nach Stadel und Lefkowitz, 1991); *(Brodde, 1991)

2. 3. Mechanismen der Signalübertragung über β -Adrenozeptoren

Adrenozeptoren sind membranständige Rezeptoren, über die eine für die jeweilige Zelle spezifische Signalkette - bestehend aus regulatorischem Guaninnukleotid-bindendem Protein (G-Protein) und Effektorproteinen (wie Adenylatzyklase und Ionenkanäle)- durch äußere Signale oder Reize, wie Hormone, Neurotransmitter oder Agonisten, ausgelöst wird. Hierfür sind heute zwei Hauptwege der Signalübertragung bekannt. Der eine verläuft über die Aktivierung des Enzyms Adenylatzyklase durch ein stimulierendes Guaninnukleotid-bindendes Protein (G-Protein, G_s) und Bildung des "second messenger" zyklisches Adenosin-3'5'-Monophosphat (cAMP) (β -Adrenozeptoren) bzw. Hemmung der Adenylatzyklase über ein inhibierendes G-Protein (G_i) durch α_2 -Adrenozeptoren; und der andere über ein Pertussistoxin (PTX)-unempfindliches G-Protein ($G_{q/11}$) über α_1 -Adrenozeptoren mit Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) nach Aktivierung des Enzyms Phospholipase C (Übersichten bei Ross und Gilman, 1980; Harden, 1983; Stiles et al., 1984; Lefkowitz et al., 1983; Levitzki, 1986; Gilman, 1987; Dohlman et al., 1991; Kobilka, 1992; und Brodde et al., 1995).

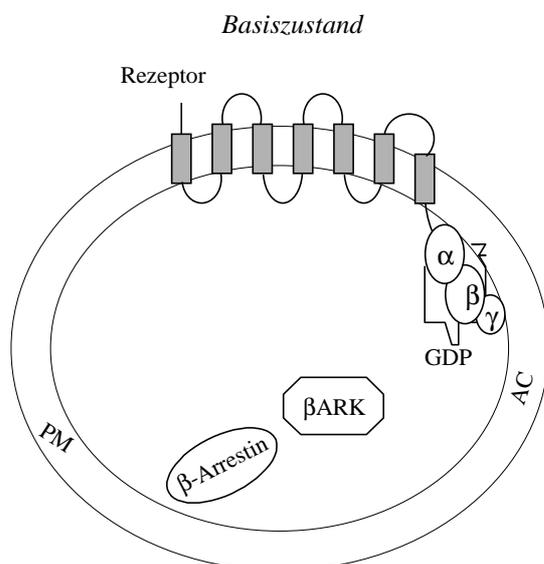


Abb. 1: Schematische Darstellung der Struktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (β -Adrenozeptoren), PM: Plasmamembran, sieben Transmembranhelices (rechteckig symbolisiert), $\alpha\beta\gamma$: Untereinheiten der G-Proteine, GDP: Guanosindiphosphat, AC: Adenylatzyklase, β ARK: β -adrenerge Rezeptorkinase

β -Adrenozeptoren sind Proteine mit sieben Transmembranhelices. Der N-Terminus, der die spezifischen Liganden binden kann, befindet sich außerhalb der Zelle, während sich der C-Terminus intrazellulär im Zytoplasma befindet (Abb. 1), dessen intrazelluläre Schleifen und Schwanz zur Interaktion mit G-Proteinen dienen.

Das β -Adrenozeptor-G-Protein-Adenylatzyklase-System besteht aus mindestens drei unterschiedlichen Proteinkomponenten (Abb. 1):

- 1) Dem Rezeptor (R), z. B. dem β -Adrenozeptor, der extrazelluläre biologisch aktive Liganden bindet und dabei die biologische Antwort initiiert.
- 2) Den katalytischen Komponenten der Adenylatzyklase, die das Substrat Adenosin-triphosphat (ATP) zu dem "second messenger" cAMP umsetzen.
- 3) Dem G-Protein, das Guanosintriphosphat (GTP) bindet und zu GDP hydrolysiert und die Information vom Rezeptor zu dem katalytischen Teil der Adenylatzyklase vermittelt. Es existieren zwei strukturell ähnliche Formen dieses Proteins, die entweder stimulierend (z. B. βG_s) oder hemmend (z. B. $\alpha_2 G_i$) Rezeptoren an den katalytischen Teil der Adenylatzyklase koppeln. G-Proteine sind heterotrimere und membranassoziierte Proteine, die aus drei Untereinheiten (α -, β - und γ -Untereinheit) bestehen. Die GTP Bindungsstelle befindet sich an der α -Untereinheit.

Diese drei Komponenten befinden sich in der Zellmembran. Die essentielle Eigenschaft dieses Modells besteht darin, daß jede der drei Hauptkomponenten des β -Adrenozeptor-G-Protein-Adenylatzyklase-Systems in einem aktiven oder inaktiven Zustand vorliegen kann, durch den sie zirkulieren.

Bindet sich ein Hormon (H) oder Agonist (A) an einen Rezeptor (R), entsteht ein binärer Komplex (AR) mit niederaffinem Zustand. Die durch die Agonistenbindung ausgelöste Konformationsänderung des Rezeptors führt zur Interaktion des binären Komplexes (AR) mit dem G-Protein (v.a. dem stimulierenden G_s -Protein). Dadurch entsteht ein ternärer Komplex ARG_s , der für den Agonisten eine höhere Affinität besitzt und die biologischen Effekte induziert (Abb. 2).

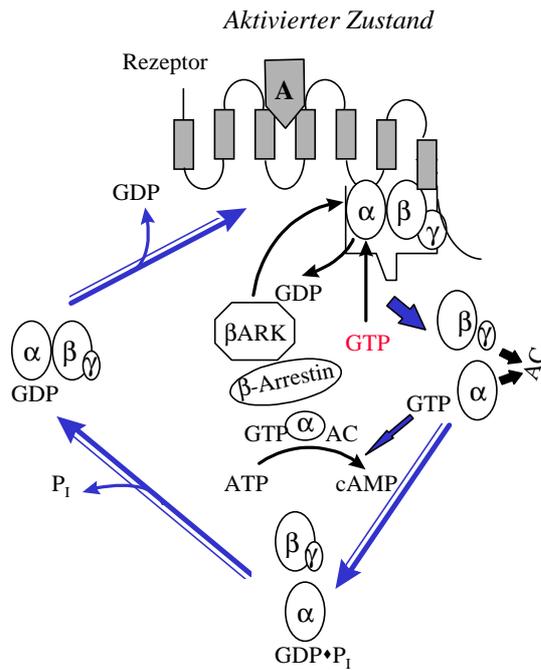


Abb. 2: Modell für die Agonisten-induzierte Konformationsänderung der β -Adrenozeptoren.

Durch die Bindung eines Agonisten erfährt der Rezeptor eine Konformationsänderung, der dadurch aktiviert wird und das an den Rezeptor gebundene G-Protein in dessen Untereinheiten (α , $\beta\gamma$) dissoziiert. Nur die α -Untereinheit (als stimulierende Untereinheit, α_s) vermag GTP zu binden. Der inaktive $G_s\alpha\beta\gamma$ -GDP-Komplex wird so durch Wechselwirkung mit dem aktivierten Rezeptor in das aktive $G_s\alpha$ -GTP unter Abspaltung der $\beta\gamma$ -Untereinheiten überführt. Beide Untereinheiten sind in der Lage, unabhängig von einander, ihre Effektoren zu aktivieren. Das GTP bewirkt eine Dissoziation der $\beta\gamma$ -Untereinheiten vom Agonist-Rezeptor-Komplex. Der Agonist-Rezeptor-Komplex kann mit G_s -GDP eine relativ stabile Bindung eingehen, nicht jedoch mit dem G_s -GTP. Dies wiederum aktiviert das Enzym Adenylatzyklase, welches die Bildung des cAMP aus ATP katalysiert (Pfeuffer, 1980; Lefkowitz et al., 1984; Stadel und Lefkowitz, 1991). Der "second messenger" cAMP phosphoryliert im Zytosol das Enzym Proteinkinase A, das dann die weiteren zellspezifischen Prozesse einleitet. Die Dauer der G-Proteinaktivierung wird durch Einwirkung der intrinsischen GTPase-Aktivität der α -Untereinheiten beendet, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf dem G-Protein lokalisiert sind und GTP zu Guanosindiphosphat GDP hydrolysieren. Die Untereinheiten des G-Proteins ($\alpha\beta\gamma$) lagern sich wieder zusammen. Das Rezeptor-G-Protein-Adenylatzyklase-System befindet sich nun wieder im deaktivierten Zustand (Abbildung 2).

Solange Hormone oder Agonisten noch vorhanden sind, kann ein neuer Zyklus dieser Signalkette beginnen.

Ein wichtiger Parameter für die Wirkung eines Pharmakons bzw. Hormons ist noch dessen intrinsische Aktivität. β -Adrenozeptorantagonisten mit geringer intrinsischer Aktivität sind nicht in der Lage, einen Agonist-Rezeptor-G-Protein-Komplex mit hoher Affinität zu bilden, so daß die Bindung von β -Adrenozeptorantagonisten durch GTP nicht beeinflusst wird (Lefkowitz et al., 1976; De Lean et al., 1980; Stiles et al., 1984).

2. 4. Mechanismen zur physiologischen und pharmakologischen Regulation von β -Adrenozeptoren

Die Anzahl der Rezeptoren bzw. deren Ansprechbarkeit ist nicht als statische, sondern als dynamische Größe zu betrachten, abhängig von verschiedenen Faktoren und physiologischen, pathologischen, endokrinologischen und pharmakologischen Interferenzen. Die für β -Adrenozeptoren charakteristischen transmembranären Informationsübertragungsprozesse zeichnen sich durch ihre außerordentliche Variabilität aus. Diese gewährleistet, daß sich die rezeptorvermittelten, zellulären Reaktionen an bestimmte veränderliche physiologische Erfordernisse adaptieren. Besonders deutlich wird dies durch die Fähigkeit zahlreicher tierischer und menschlicher Zellen, auf eine wiederholte oder chronische Stimulierung durch β -Agonisten mit einer mit der Zeit abgeschwächten Reaktion zu antworten (Lefkowitz et al., 1983; Harden, 1983; Lefkowitz et al., 1984; Lohse, 1993; Böhm et al., 1997). Dieses in vielen Hormonrezeptor- und Neurotransmittersystemen vorkommende Phänomen der Desensibilisierung (Down-Regulation) verringert die Wirksamkeit und Dauer adrenerger Katecholamine und anderer Sympathomimetika, und ist somit ein Indiz für die klinisch bedeutsame Entwicklung einer Toleranz (Lefkowitz und Caron, 1985). Zahlreiche in vivo und in vitro Untersuchungen haben gezeigt, daß die Desensibilisierung auf mehreren Ebenen stattfinden kann, nämlich auf Rezeptor-, G-Protein- und Effektorsystemebene (Harden, 1983; Stiles et al., 1984; Lefkowitz und Caron, 1985; Lohse, 1993; Pitcher et al., 1998). Diese Autoren beschrieben auch, daß auf Rezeptorebene zwei Mechanismen der Desensibilisierung unterschieden werden können, die zum einen die Funktion des Rezeptors und zum anderen die Anzahl der Rezeptoren an der Plasmamembran beeinträchtigen. Der Rezeptor, der diesem Mechanismus des Regulationsphänomens unterliegt und in den letzten Jahren intensiv untersucht wurde, ist der G-Protein gekoppelte β -Adrenozeptor, insbesondere der β_2 -Subtyp.

Man unterscheidet grundsätzlich zwei unabhängige Modelle (Formen) der Desensibilisierung der G-Protein gekoppelten β -Adrenozeptoren gegenüber Katecholaminen: die "homologe" und "heterologe" Desensibilisierung. Als homologe Desensibilisierung bezeichnet man den Vorgang, wenn am β -Adrenozeptor nach wiederholter Stimulation mit seinem spezifischen Agonistliganden, wie z.B. Adrenalin oder Noradrenalin, verminderte Reaktionen beobachtet werden (= Agonist desensibilisiert seinen Rezeptor), während die heterologe Desensibilisierung des β -Adrenozeptor keine Substanzspezifität, sondern verminderte Reaktionen gegenüber mehreren unterschiedlichen Agonistengruppen zeigt (= Agonist desensibilisiert verschiedene Rezeptoren).

2. 4. 1. Homologe Desensibilisierung

Die homologe Desensibilisierung der β -Adrenozeptoren wird durch wiederholte oder langzeitige Stimulation des Rezeptors durch einen Agonisten ausgelöst. Dabei vermindert sich seine Ansprechbarkeit auf einen Agonisten durch Abnahme der Rezeptordichte bzw. durch eine beeinträchtigte Koppelung des Rezeptors zum G_S -Protein-Adenylatzyklase-Komplex, die auch als "Entkoppelung" bezeichnet wird (Harden, 1983; Lefkowitz et al., 1983; Hertel und Perkins, 1984; Lohse, 1993). Dies geschieht sehr schnell (Sekunden bis Minuten) vermutlich durch Phosphorylierung der an dem Agonisten gebundenen β -Adrenozeptoren durch die cAMP-unabhängigen Enzyme β -Adrenozeptor-Kinasen (β ARK, auch bezeichnet als G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen, GRKs). Dadurch werden die Bindungsstellen für hemmende Proteine, sogenannten Arrestine, hochaffin, die wiederum durch ihre Bindung an den Agonist-gebundenen Rezeptor die Signalübertragung zum heterotrimeren G-Protein unterbrechen. Bei β_2 -Adrenozeptoren spielt überwiegend das zytosolische Protein β -Arrestin eine große Rolle (Abb. 2 und 3). Für diese Agonist-spezifische Desensibilisierung der β -Adrenozeptoren wurden Modellvorstellungen von verschiedenen Arbeitsgruppen vorgeschlagen (Sibley et al., 1985; Strasser et al., 1986; Clark et al., 1986; Benovic et al., 1987; Hausdorff et al., 1989 und 1990; Pitcher et al., 1992; Lohse et al., 1990; Lohse, 1993; Böhm et al., 1997 und Pitcher et al., 1998). Danach verlieren diese Rezeptoren die Fähigkeit, einen Agonisten mit hoher Affinität zu binden und die cAMP-Bildung katalysierende Adenylatzyklase zu aktivieren, wobei zu diesem Zeitpunkt die Anzahl der plasmamembranständigen Rezeptoren noch unverändert bleibt. Bald danach wird die Translokation der entkoppelten Rezeptoren von der Oberfläche ins Zellinnere ausgelöst

(sogenannte “Internalisierung” oder “Sequestrierung”) (Goodman et al., 1996; Koenig und Edwardson, 1997). Auf einem solchen Mechanismus einer Agonist-induzierten Internalisierung der β -Adrenozeptoren in Form von Endozytose weisen die Befunde hin, daß solche β -Adrenozeptoren noch Bindungscharakteristika für Liganden zeigen, die vermutlich durch das Auftreten von β -Adrenozeptoren an der Innenseite von Membranvesikeln erklärt werden können. Diese internalisierten Rezeptoren sind durch Radioligandbindungsstudien noch nachweisbar, und sie bleiben trotz Desensibilisierung in ihrer Funktionsfähigkeit intakt. Je nach Einwirkungsdauer des Agonisten können folgende Teilschritte der Regulationmechanismen zustande kommen, die jedoch noch nicht exakt bekannt sind: Die isolierten Rezeptoren scheinen strukturell intakt zu sein und können wieder an der Zelloberfläche erscheinen (sogenannte “Resensibilisierung”), wenn die Agonisten sobald wie möglich entfernt werden, oder sie können innerhalb der Zelle abgebaut werden (sogenannte “Degradierung”). Der letztere Vorgang führt im Zusammenhang mit der chronischen Stimulation mit Katecholaminen zum irreversiblen Verlust von β -Adrenozeptoren (Koenig und Edwardson, 1997), auch wenn dieser wahrscheinlich wesentlich langsamer abläuft. Dieser Prozeß, der Stunden dauern kann, wird häufig als “Down-Regulation” bezeichnet (Lohse, 1993). Nach dem Verlust von Rezeptoren durch Degradierung ist eine Neusynthese der Rezeptoren für die Resensibilisierung notwendig.

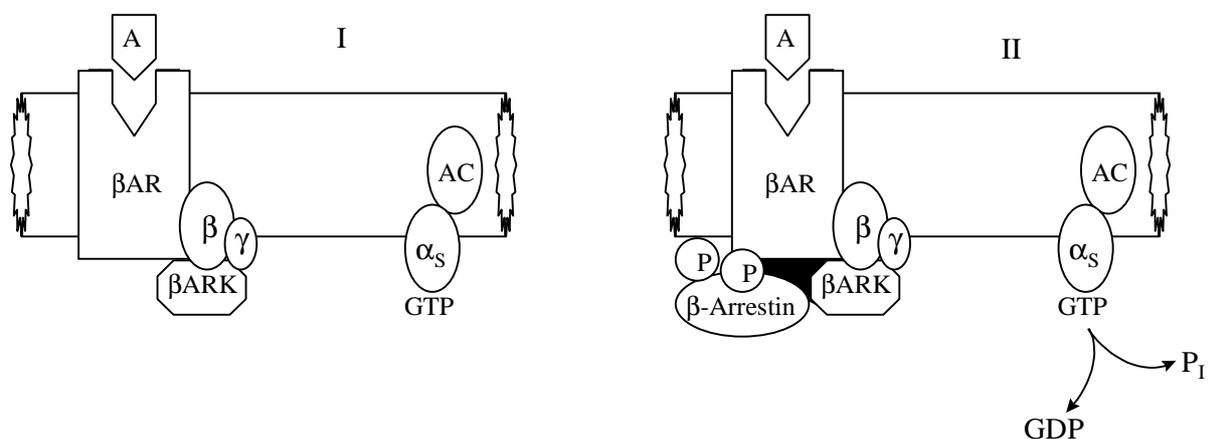


Abb. 3: Schematische Darstellung der homologen Desensibilisierung β -adrenerger Rezeptoren (Rezeptorkoppelung und -phosphorylierung). I) durch die Bindung des Agonisten wird der β -Adrenozeptor (β AR) aktiviert, und dadurch kommt es zur Konformationsänderung und Bindung der G-Protein- α -Untereinheit an GTP. Dieser Komplex ist in der Lage die Adenylatzyklase zu aktivieren. Der Agonist-aktivierte β -Adrenozeptor steht als Substrat für die Phosphorylierung durch β ARK (GRK-2) zur Verfügung. II). Im zweiten

Schritt bindet sich das β -Arrestin an den phosphorylierten Rezeptor mit hoher Affinität und die Weiterleitung der Signale wird blockiert.

2. 4. 2. Heterologe Desensibilisierung

Obwohl Unterschiede zwischen der homologen und heterologen Desensibilisierung der β -Adrenozeptoren bestehen, gibt es gewisse Ähnlichkeiten im Ablauf dieser Regulationsmechanismen. In beiden Fällen werden die β -Adrenozeptoren durch bestimmte Kinasen phosphoryliert und vom G_s -Protein-Adenylatzyklase-Komplex entkoppelt. Im Gegensatz zur homologen Desensibilisierung werden sie aber während der heterologen Desensibilisierung unabhängig von der Rezeptorkonformation durch das cAMP-abhängige Enzym Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert (Stiles et al., 1984; Sibley et al., 1984; Benovic et al., 1985). Dadurch werden diese Rezeptoren abgekoppelt und verbleiben in der Plasmamembran, sind jedoch nicht fähig, erneute Bindungen mit einem anderen Agonisten einzugehen.

2. 5. Lymphozyten als Modell für die Charakterisierung der β -adrenergen Rezeptoren

2. 5. 1. Hintergrund und Eigenschaften

Die Anwendung der Radioligandbindungsstudien zur Untersuchung von β -adrenergen Rezeptoren in verschiedenen Geweben von Mensch bzw. Tier bereitet einige Probleme, welche bei der Interpretation der erhaltenen Daten in Betracht gezogen werden müssen. So steht zur Bestimmung der Expression β -adrenerger Rezeptoren auf Organen, wie Herz, Leber, Lunge, Gehirn, Niere und ihrer krankheitsbedingten Veränderungen in vivo aus ethischen Gründen oft nur eine verhältnismäßig geringe Anzahl von Zielzellen zur Verfügung. Daher wurden häufig periphere Blutzellen als leicht verfügbares Zellmaterial für die Untersuchung der Veränderungen β -adrenerger Rezeptoren in anderen Organen verwendet (Motulsky und Insel, 1982), z.B. Leukozyten einschließlich Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten als intakte Zelle oder als Membranfraktion (Williams et al., 1976; Galant et al., 1981; Brodde et al., 1981; Meurs et al., 1982; Marinetti et al., 1983; De Blasi et al., 1986; Roets und

Burvenich, 1987; Sandnes et al., 1987; Brodde und Wang, 1988a; Vermeir et al., 1993), Erythrozyten (Sager, 1983) und Thrombozyten (Kerry et al., 1984; Cook et al., 1985).

Es wurde schon seit Anfang der siebziger Jahre vermutet, daß auf Lymphozyten β -adrenerge Rezeptoren existieren (Bourne und Melmon, 1971). Zunächst ließen sich die β -Adrenozeptoren an zirkulierenden Leukozyten nur indirekt über katecholamininduzierte Adenylatzyklase-Aktivierung nachweisen. Williams et al. (1976) führten die erste direkte Bestimmung der lymphozytären β -Adrenozeptoren mit (-)[^3H]-Alprenolol als Radioligand ein. Diese Autoren zeigten zusätzlich, daß Katecholamine die Bindung des Radioliganden bzw. die Aktivität der Adenylatzyklase in der Rangfolge der β -mimetischen Wirkungsstärke hemmen bzw. stimulieren: Isoprenalin > Adrenalin > Noradrenalin. Auf dieser Basis identifizierten sie die Lymphozytenrezeptoren als β_2 -Subtyp. Die Vielzahl von Untersuchungen lassen mit großer Wahrscheinlichkeit vermuten, daß es sich bei den β -Rezeptoren auf menschlichen Lymphozyten ausschließlich um eine homogene Population von β_2 -Adrenozeptoren handelt (Brodde et al., 1981; Motulsky und Insel, 1982). β_1 -Adrenozeptoren konnten bisher nicht nachgewiesen werden.

Die leicht zu gewinnenden Lymphozyten dienen, wie auch in der vorliegenden Arbeit, als Modell für die Untersuchung β_2 -adrenerger Rezeptoren repräsentativ für experimentell schwer zugängliche Organe. Es ist jedoch aus verschiedenen Gründen nicht unproblematisch, Lymphozyten als Modell für andere Organe anzusehen. Die isolierten Zellen bestehen abhängig von der Zellisolationsmethode aus einer heterogenen Population von B- und T-Lymphozyten (Bishopric et al., 1979; Krawietz et al., 1982; Khan et al., 1986; Landmann et al., 1988; Maisel et al., 1990), die eine unterschiedliche Anzahl der β -Adrenozeptoren exprimieren. Krankheitsbedingte oder spontane Verschiebungen im Verhältnis dieser Zellen zueinander können das Ergebnis beeinflussen, da B-Lymphozyten etwa die doppelte Anzahl an β -Adrenozeptoren/Zelle besitzen als T-Lymphozyten (Landmann et al., 1988; Maisel et al., 1990). Khan et al. (1986) konnten ferner zeigen, daß auch die einzelnen T-Zell-Fraktionen in sich eine unterschiedlich hohe Rezeptordichte aufweisen. Die T-Suppressor-Zellen besitzen mehr β -Rezeptoren als die zytotoxischen T-Zellen und Helferzellen. Weiterhin führt *körperliche Belastung* beispielsweise zu einer Erhöhung der Gesamtlymphozytenzahl mit einem verhältnismäßig stärkeren Anstieg der B-Lymphozyten (Landmann et al., 1988). Je nach Art und Dauer der Belastung der Probanden zeigten verschiedene Autoren auch ohne Berücksichtigung der Umverteilung dieser Zellpopulationen eine akute Zunahme der β -Adrenozeptordichte an Lymphozyten und des Agonist-induzierten Anstiegs des

intrazellulären cAMP-Gehaltes um bis zu etwa 100 %, und einen Anstieg der Plasmakatecholaminspiegel bis zum Vierfachen (Brodde et al., 1984b; Burman et al., 1985; Brodde et al., 1987d; Landmann et al., 1988; Frey et al., 1989; Mäki, 1989). Der Mechanismus dieser Zunahme in der Zahl der lymphozytären β -Adrenozeptoren und deren Ansprechbarkeit ist bisher nicht genau bekannt. So könnte der mechanische Effekt der Belastung Einfluß auf die Zellverteilung und nachfolgend auf eine akute "Up-Regulation" lymphozytärer β -adrenerger Rezeptoren ausgeübt haben, oder der streßbedingte in vivo Anstieg endogener Katecholamine könnte zuerst eine Zunahme und anschließend eine Abnahme der Rezeptorendichte hervorgerufen haben. Tohmeh und Cryer (1980) fanden vergleichbare Ergebnisse bei der Verabreichung von Isoprenalin und Adrenalin beim Menschen. Unter dem Einfluß dieser adrenergen Substanzen kam es zu einem biphasischen Verhalten der β -Adrenozeptorendichte und der Aktivität der Adenylatzyklase der Lymphozyten. Zunächst erfolgte ein Anstieg der Anzahl der Rezeptoren und des Enzyms Adenylatzyklase auf das Doppelte bis Vierfache mit anschließendem Abfall derselben. Allerdings sind Ergebnisse über den Umfang der Zunahme der β -Adrenozeptorendichte durch "Belastung" als Ursache widersprüchlich. So berichteten Feldman et al. (1983) und Eysmann et al. (1996) zum Beispiel, daß bei gesunden Probanden der zweifache Anstieg der Plasmakatecholamine durch körperliche Belastung lediglich mit einer Abnahme der cAMP-Akkumulation ohne Veränderung der β -Adrenozeptorendichte einhergeht. Hingegen konnten Williams et al. (1981) bei Untersuchungen an Marathonläufern keine Veränderung in der lymphozytären β -Adrenozeptorendichte feststellen. Eine Abnahme der β -Adrenozeptorendichte nach einer körperlichen Betätigung wurde von Krawietz et al. (1985) beschrieben. Außerdem bestehen Zweifel an der Verwendbarkeit von Lymphozyten als Modell in solchen Untersuchungen, da sie als Blutzellen nur den frei zirkulierenden Katecholaminen zugänglich sind und die interindividuelle Variabilität äußerst hoch ist (Insel und Motulsky, 1987).

Bezüglich der *altersabhängigen* Veränderungen der β -Adrenozeptorenzahl auf menschlichen Lymphozyten und des Isoprenalin-induzierten Anstiegs des cAMP-Gehaltes finden sich unterschiedliche Ergebnisse in der Literatur. Während O'Hara et al. (1985) mit zunehmendem Alter eine Abnahme der cAMP-Akkumulation und eine Zunahme der β -Adrenozeptorendichte beschrieben, fanden Schocken und Roth (1977) eine Abnahme und Abrass und Scarpace (1981) keine Veränderung der Rezeptorzahl.

An menschlichen Blutzellen wurde die *homologe Regulation* von β -Adrenozeptoren unter dem Einfluß von β -adrenergen Agonisten und Antagonisten mehrfach bewiesen. So wurden in diesen Zellen sowohl die *in vivo* erfolgte Agonist-vermittelte Abnahme der β -Adrenozeptordichte ("Down-Regulation") als auch der Aktivität des Enzyms Adenylatzyklase mit verminderter Bildung von intrazellulärem cAMP nachgewiesen (Galant et al., 1978; Tohmeh und Cryer, 1980; Tashkin et al., 1982; Brodde et al., 1985a). *In vitro* zeigten De Blasi et al. (1986) und Maisel und Motulsky (1987) an menschlichen mononukleären Leukozyten eine Isoprenalin-induzierte Down-Regulation der β_2 -Adrenozeptoren. Tittelbach et al. (1998) bestätigten ebenfalls die durch (-)-Isoprenalin-induzierte Abnahme der Gesamtdichte der lymphozytären β_2 -Adrenozeptoren. Wie oben beschrieben werden Agonist-besetzte β -Adrenozeptoren vom G_s -Protein entkoppelt, wenn sie von der β -Adrenozeptorkinase (β ARK) oder der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase (GRK) phosphoryliert werden. So konnten an Lymphozyten menschlicher Probanden gezeigt werden, daß bei jungen, hypertensiven Patienten die Abnahme der G-Protein-gekoppelten β_2 -Adrenozeptoren mit der zunehmenden Expression der GRK zusammenhängt (Gros et al., 1997). Isoprenalin-Stimulation von Lymphozyten *in vitro* führte ebenfalls zur Steigerung der GRK-Aktivität, die aufgrund der verstärkten Rezeptorphosphorylierung die Down-Regulation hervorruft (Chuang et al., 1992, De Blasi et al., 1995). Dagegen führte die Verabreichung von β -Adrenozeptorblockern zu einer Zunahme ("Up-Regulation") der β -Rezeptorzahl auf Blutzellen (Aarons et al., 1980; Brodde et al., 1985b) bzw. zu deren erhöhter Ansprechbarkeit. Weiterhin beeinflussen Glukokortikoide die Regulation der β -Adrenozeptoren auf Blutzellen, z.B. auf Lymphozyten. Kortisolgabe führte zu einer veränderten lymphozytären β_2 -Rezeptorenzahl und zu einem Einfluß auf die Koppelung zwischen Rezeptor und Adenylatzyklase, wobei verschiedene Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Es wird sowohl von einer Erhöhung (Hui et al., 1982), als auch von einer Verringerung (Davies und Lefkowitz, 1983) der β_2 -Adrenozeptordichte berichtet. Glukokortikoide können ferner die Agonist-induzierte Tachyphylaxie nicht nur durch Re-Exposition der internalisierten β -Adrenozeptoren an die Zellmembran, sondern auch durch eine *de novo* Synthese verhindern (Parker et al., 1973). So konnte für Glukokortikoide (wie beispielsweise Dexamethason) gezeigt werden, daß sich durch vermehrte Transkription der Rezeptor-mRNA die β -Adrenozeptordichte erhöht (Hadcock et al., 1988 und 1989).

2. 5. 2. Korrelation mit β -Adrenozeptoren anderer Organe

Menschliche Lymphozyten, die eine homogene Population der Adenylatzyklase-gekoppelten β_2 -Adrenozeptoren enthalten, erwiesen sich als ein geeignetes Modell für die Untersuchung der Agonist-induzierten bzw. krankheitsbedingten Rezeptorveränderungen. Es konnte gezeigt werden, daß sich die β_2 -Adrenozeptoren von Lymphozyten und von verschiedenen Geweben gleichsinnig verhalten:

1. Die Anzahl der lymphozytären β_2 -Adrenozeptoren korreliert mit der des Herzen und des Myometriums (Brodde et al., 1987a; Brodde et al., 1987c; Brodde et al., 1988b; Michel et al., 1986; Michel et al., 1988; Michel et al., 1989).
2. β -Adrenozeptorblocker regulieren β_2 -Adrenozeptoren in Herz und Venen wie auch in Lymphozyten (Brodde et al., 1988b).
3. Die Eigenschaften von β_2 -Adrenozeptoren an Lymphozyten sind identisch mit β_2 -Adrenozeptoren in anderen Geweben (Herz, Vene, Lunge).

So korreliert beispielsweise die lymphozytäre β_2 -Adrenozeptordichte mit dem positiven inotropen Effekt, der durch Stimulation der β_2 -Adrenozeptoren des rechten Vorhofs durch Isoprenalin ausgelöst wird (Michel et al., 1986). Auch auf die Verabreichung von β -Adrenozeptorantagonisten reagieren die lymphozytären β_2 -Adrenozeptoren mit der gleichen Up-Regulation wie die Rezeptoren des rechten Vorhofs und des Myometriums (Brodde et al., 1988b). Aussagen über Beziehungen zwischen lymphozytären β -Rezeptoren und denen anderer Organe sind nur dann zutreffend, wenn es sich bei der verwendeten zu untersuchenden Substanz um einen Liganden mit ausreichender Selektivität für β -Adrenozeptoren handelt (Michel et al., 1986; Brodde et al., 1987b). Pharmaka mit β_1 -Selektivität haben keine Wirkungen auf lymphozytäre β_2 -Rezeptoren, so daß zum Beispiel keine Rückschlüsse auf Veränderungen der β_1 -Rezeptoren des Herzens möglich sind (Brodde et al., 1987b).

2. 7. Klinische Bedeutung der β -Adrenozeptoren

Veränderungen an β -adrenergen Rezeptoren auf peripheren mononukleären Leukozyten (pMNL) einschließlich Lymphozyten wurden in den letzten 30 Jahren unter klinischen und pharmakotherapeutischen Aspekten für eine Vielzahl verschiedener Erkrankungen modellhaft für die entsprechenden Adrenozeptoren auf schwer zugänglichen Organen untersucht.

Die Theorie, daß der Pathogenese des *atopischen Asthma bronchiale* ein Defekt des β -adrenergen Systems und ein Mißverhältnis adrenerger Rezeptoren mit einer Zunahme von α -Adrenozeptoren und einer verminderten Zahl der β -Adrenozeptoren und dadurch eine Begünstigung bronchokonstriktorischer Einflüsse zugrunde liegen, wurden erstmals von Szentivanyi (1968, 1980) aufgestellt. Untersuchungen an Lungengewebe von Meerschweinchen nach einer experimentellen Induktion des Asthma bronchiale konnten zeigen, daß eine verminderte β -adrenerge und eine verstärkte bronchokonstriktorische α -adrenerge Reaktionsbereitschaft vorliegen. Ausgehend von der β -adrenergen Theorie des Asthma bronchiale haben viele Untersucher die Zahl der β -Adrenozeptoren in peripheren Leukozyten von Asthmatikern bestimmt (Conolly und Greenacre, 1976; Kariman und Lefkowitz, 1977; Brooks et al., 1979; Reinhardt et al., 1983; Haen et al., 1991). Tatsächlich sind auf zirkulierenden polymorphkernigen Granulozyten von Asthmatikern häufig weniger β -Adrenozeptoren als bei Gesunden nachweisbar. Dieser Unterschied machte sich aber nur bei asthmatischen Patienten, die mit β -Sympathomimetika behandelt worden waren, bemerkbar (Galant et al., 1980; Sano et al., 1983). In einigen Untersuchungen zeigte sich, daß auf Lymphozyten die Zahl der β -Adrenozeptoren bei Patienten mit Asthma bronchiale auch ohne β -mimetische Therapie vermindert ist, wobei bei Asthmatikern, die mit β -Agonisten chronisch behandelt waren, die Zahl der β -Adrenozeptoren und die Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase der Lymphozyten deutlich verringert war (Brooks et al., 1979; Kariman 1980; Sano et al., 1983; Haen et al., 1991). Ein Vergleich zwischen gesunden und asthmatischen Probanden vor einer Therapie mit β -adrenergen Agonisten zeigte zum Teil keinen signifikanten Unterschied in der β -Rezeptorendichte und in der Rezeptorfunktion der Lymphozyten und Granulozyten. Dies wurde unter anderem auf methodische Gründe zurückgeführt (Tashkin et al., 1982, Reinhardt et al., 1984; Newnham et al., 1993). Zusätzlich war es schwierig, asthmabedingte Veränderungen der β -Adrenozeptoren von den durch β -Agonisten-induzierten zu unterscheiden (Conolly und Greenacre, 1976; Galant et al., 1980; Tashkin et al., 1982). Diese Befunde stellen eine mögliche Erklärung für die geringere Effektivität der Therapie mit β -Adrenergika auch bei höherer Dosierung dar. β_2 -Agonisten bewirken eine Relaxation der glatten Muskulatur der Atemwege, die überwiegend β_2 -Adrenozeptoren aufweisen. Es gibt allerdings Wirkstoffe, die in der Lage sind, vor einer solchen Toleranzentwicklung zu schützen, z. B. Glukokortikoide oder Ketotifen (Antihistaminikum). Diese verhindern die Agonist-induzierten Veränderungen der β -Adrenozeptoren und/oder der cAMP-Bildung in menschlichen Lymphozyten oder heben sie

auf (Hui et al., 1982; Davies und Lefkowitz, 1983; Brodde et al., 1985a). Die klinische Wirkung der Glukokortikoide bei obstruktiven Atemwegserkrankungen beruht somit neben deren antiinflammatorischem Effekt durch die Hemmung der Freisetzung von Entzündungsmediatoren auf ihrem permissiven Effekt auf die β -Adrenozeptoren in den Atemwegen (Salonen und Mattila, 1984; Sauder et al., 1993). Die Zunahme der Dichte und Empfindlichkeit der β -Adrenozeptoren in der Lunge (Davies und Lefkowitz, 1984; Hadcock et al., 1989) bzw. die Regulierung der Effizienz der Koppelung der β -Adrenozeptoren an die Adenylatzyklase (Davies und Lefkowitz, 1995) sind mögliche Mechanismen für diesen permissiven Effekt.

Bei *kardiovaskulären Erkrankungen*, insbesondere bei dilatativen Kardiomyopathien, wurden bei gleichzeitiger Abnahme der myokardialen β -Adrenozeptorendichte erhöhte Katecholaminspiegel gemessen (Bristow, 1989; Brodde, 1991). Colucci et al. (1981) demonstrierten bei Patienten mit chronischen kongestiven Herzerkrankungen, bei denen ein erhöhter Katecholaminspiegel gemessen wurde, eine leichte Reduktion der lymphozytären β -Adrenozeptorendichte gegenüber gesunden Probanden. Nach einer Therapie mit dem β -adrenergen Agonisten Pirbuterol wurde trotz der initialen Verbesserung der klinischen Symptome weiter eine signifikante Abnahme der Zahl der β -Adrenozeptoren an Lymphozyten beobachtet.

β -Adrenozeptorantagonisten werden in der Humanmedizin zur Behandlung der Angina pectoris und des Bluthochdruckes verwendet. Dabei wurde klinisch festgestellt, daß es nach abruptem Absetzen der Therapie mit β -Adrenozeptorenblockern gehäuft zu adrenerger *Hypersensibilisierung* ("rebound effect") mit kardialen Symptomen (wie Arrhythmien) kommen kann. Eine andere Theorie geht von einer situationsangepaßten Expression von Rezeptoren aus. So konnte gezeigt werden, daß die Rezeptorenzahl auf den Membranen von Lymphozyten nach einer Therapie mit β -Adrenozeptorantagonisten, wie beispielsweise mit dem nicht selektiven Antagonisten Propranolol, zunahm (Aarons et al., 1980; Aarons und Molinoff, 1982; Brodde et al., 1985b). Nach dem Absetzen der Behandlung normalisierte sich die β -Adrenozeptorenzahl nur langsam, obwohl bereits 24 Stunden nach der letzten Propranololgabe keine Plasmakonzentrationen mehr meßbar waren. Hingegen bewirkten β -Adrenozeptorblocker mit intrinsisch sympathomimetischer Aktivität (ISA), wie Pindolol und Mepindolol, keine Erhöhung, sondern eine Reduktion der lymphozytären β -Adrenozeptorendichte (Giudicelli et al., 1984; Brodde et al., 1986a). Es wäre daher nach Unterbrechung einer Therapie mit β -Adrenozeptorblockern mit hoher ISA kein "rebound

effect” zu erwarten. So ist auch tatsächlich ein solches Syndrom nach Propranolol, nicht aber nach Pindolol beschrieben worden. Andere Autoren jedoch fanden keine Veränderungen der β -Adrenozeptoren auf Lymphozyten während und nach dem Absetzen einer Behandlung mit Propranolol (Giudicelli et al., 1984).

Tabelle 5: Veränderung der Anzahl der Adrenozeptoren bei verschiedenen Bedingungen (nach Brodde, 1988c)

| Rezeptor-Typ | Regulierender Prozeß | Änderung in der Rezeptoranzahl |
|----------------------|---|---|
| α und β | Agonisten | Abnahme |
| β | Antagonisten ohne ISA | Zunahme |
| | mit ISA | Abnahme |
| α und β | Denervierung | Zunahme |
| β | Schilddrüsenhormone | Zunahme |
| α | Schilddrüsenhormone | Abnahme |
| β | Glukokortikoide | Zunahme |
| β | Herzinsuffizienz | Abnahme |
| α und β | Phäochromozytom | Abnahme |
| α und β | Asympathikotone, orthostatische Hypotonie | Zunahme |
| α | Alter | Abnahme |
| β | Alter | Abnahme (?) unverändert (?) Zunahme (?) (?= nicht genau bekannt) |

Bei Untersuchungen der lymphozytären β_2 -Adrenozeptoren bei Patienten mit *Schilddrüsenerkrankungen* bzw. nach experimentell induzierter Hyperthyreose wurden keine einheitlichen Ergebnisse gefunden. Es wurde beispielsweise von einer Zunahme der lymphozytären β_2 -Adrenozeptorenzahl nach einer Applikation von Triiodthyronin (Ginsberg et al., 1981) bzw. bei hyperthyreotischen Patienten ohne Vorbehandlung (Ratge et al., 1985) berichtet. Dahingegen stellten Scarpace und Abrass (1981) keine Änderung der Zahl oder Affinität von β -Adrenozeptoren nach Gabe von Triiodthyronin fest. Cognini et al. (1983) beobachteten

nach Schilddrüsenentfernungen eine verminderte β -Adrenozeptorenzahl auf peripheren mononukleären Leukozyten.

In der Tabelle 5 sind zusammenfassend einige Einflußfaktoren auf die Anzahl adrenerger Rezeptoren dargestellt.

2. 8. Eigenschaften und therapeutischer Einfluß des β -Adrenozeptor-Adenylatzyklase-Systems in equinen Organengeweben und Zellen

Im Unterschied zu den bei menschlichen Probanden sehr intensiv durchgeführten Untersuchungen an β -Adrenozeptoren bezüglich ihrer Dynamik, pathophysiologischen Bedeutung sowie krankheits- und/oder arzneimittelbedingten Regulation existieren bei Tieren unter veterinärmedizinischen Aspekten nur wenige Studien. Eine beim Pferd häufig diagnostizierte Erkrankung ist die, dem Asthma bronchiale des Menschen ähnliche, chronisch obstruktive Bronchitis (COB/COPD), die zu einem vollständigen Verlust der Leistungsfähigkeit des Tieres führen kann und bislang nicht heilbar ist (Sasse, 1971; Gerber, 1994). In diesem Zusammenhang wird insbesondere eine verminderte beta-adrenerge Rezeptorfunktion als Ursache diskutiert, wobei Katecholamine und β -Adrenergika über diese Rezeptoren und dem damit gekoppelten Enzym Adenylatzyklase die Kontraktion der Atemwegsmuskulatur (d.h. Bronchodilatation) und Glukokortikoide die Entzündungsprozesse beeinflussen. Bislang liegen für Pferde keine gesicherten Daten bei gesunden und COB kranken Tieren über das β -adrenerge System sowie über seine Veränderungen unter pharmakotherapeutischen Maßnahmen zur Behandlung chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen vor.

Studien an Equiden beschränkten sich bisher lediglich auf vereinzelte experimentelle und klinische Beobachtungen sowohl eventueller β -Adrenozeptorveränderungen als auch des Therapieversagens. Messungen wurden in verschiedenen Geweben jedoch nicht in Lymphozyten (pMNL) durchgeführt.

Erste Hinweise, daß β -Adrenozeptoren an Membranen der glatten Muskulatur der Atemwege bzw. anderen Organgeweben des Pferdes nachzuweisen sind, lieferten Torneke et al. (1998), Torneke (1999) und Re et al. (1997a). Torneke et al. (1998) und Torneke (1999) untersuchten die Existenz und Charakteristika β -adrenerger Rezeptoren an Membranen des Epithels und der glatten Muskulatur des oberen Atemweges, wobei Hinweise auf einen überwiegend β_2 -Subtyp gefunden wurden.

Um weitere Einblicke zu bekommen, ob bei Ponies mit COB die Wirkung einiger β_2 -selektiver Agonisten einschließlich Clenbuterol über β -Adrenozeptoren vermittelt wird, erfaßten die Arbeitsgruppen von Derksen et al. (1987) und Scott et al. (1991) Veränderungen von Lungenfunktionsparametern, die primär von β_2 -Adrenozeptoren ausgehen.

Eine praxisnahe Untersuchung führten Derksen et al. (1987) bei gesunden Ponies über den Einfluß von Clenbuterol auf Histamin-induzierte Konstriktion der Atemwege durch. Hierbei konnte der bronchodilatierende Effekt von Clenbuterol bei steigender Dosis von 0,2 bis 1,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. nicht gezeigt werden und die Histamin-vermittelte Konstriktion der Bronchien nicht verhindert werden. Mögliche Ursachen dieses Therapieversagens könnten sein: einerseits eine nicht ausreichende Eignung der gewählten Funktionsparameter der Lunge (pulmonaler Widerstand und dynamische Compliance), die wahrscheinlich Veränderungen der Weite der Atemwege des Pferdes nicht hinreichend reflektieren; andererseits könnte Histamin beim Pferd noch zusätzlich zu den Muskelspasmen die Obstruktion der Atemwege durch Ödem- und Sekretbildung gefördert haben, die offensichtlich durch Gabe von β_2 -Mimetika nicht beeinflußt oder sogar forciert werden könnte. Im Gegensatz zu diesem Tiermodell, in dem Auswirkungen von β_2 -Agonisten auf Lungenfunktionsparameter untersucht wurden, konnte in neueren Untersuchungen gezeigt werden, daß eine primäre inhalative Behandlung mit dem β_2 -selektiven Agonisten Clenbuterol gleichzeitig mit dem β -Agonisten Isoprenalin bei klinisch gesunden Ponies zu einer Verbesserung einer durch intravenöse Applikation von Histamin induzierten Bronchokonstriktion führt (Scott et al., 1991). Diese Arbeitsgruppe konnte zugleich zeigen, daß die Isoprenalin-induzierte Bronchodilatation durch den β_1 -selektiven Antagonisten Atenolol nicht verhindert werden kann. Damit wurde bestätigt, daß diese Bronchodilatation hauptsächlich durch β_2 -Adrenozeptoren vermittelt war.

Gonzalez et al. (1998) wiesen den Trainingseffekt auf erythrozytäre β -adrenerge Rezeptoren und auf den Plasmakatecholamingehalt beim Pferd nach. Danach führte der durch das Training angestiegene Katecholamingehalt zu einer Abnahme der β -Adrenozeptordichte an Erythrozyten.

Bisher fehlen allerdings Befunde, zur physiologischen, pathophysiologischen und pharmakologischen Regulation β -adrenerger Rezeptoren an Lymphozyten bzw. Lungengewebe des Pferdes. Zur weiteren Klärung wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit an intakten Lymphozyten klinisch gesunder Pferde die β -Adrenozeptordichte und intrazelluläre Bildung von zyklischem AMP vor und nach Verabreichung des β_2 -selektiven Agonisten Clenbuterol und des Glukokortikoids Dexamethason untersucht.

3. MATERIAL UND METHODEN

3. 1. Tiere und Materialien

3. 1. 1. Versuchstiere

Die Studien der vorliegenden Arbeit wurden an zwölf klinisch gesunden Pferde (Tabelle 6), die der Medizinischen, Chirurgischen und Geburtshilflichen Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig gehören, durchgeführt. Die Tiere wurden in Einzelboxen gehalten. Sie erhielten mindestens zwei Wochen vor Studienbeginn keine Medikamente und waren keinen körperlichen Belastungen ausgesetzt. Sie bekamen Heu und Wasser ad libitum.

Tabelle 6: Kenndaten der Versuchstiere der gesamten Versuchsgruppe

| Tier-Nr. | Geschlecht | Alter (Jahre) | Gewicht (Kg) | Behandlung |
|----------|------------|---------------|--------------|-------------------------------|
| 1 | W | 13 | 497 | Clenbuterol |
| 2 | W | 15 | 571 | Clenbuterol |
| 3 | W | 18 | 615 | Clenbuterol |
| 4 | W | 14 | 572 | Clenbuterol |
| 5 | W | 16 | 588 | Clenbuterol; Dex [#] |
| 6 | W | 27 | 550 | Clenbuterol; Dex |
| 7 | M** | 11 | 440 | Clenbuterol; Dex |
| 8 | W | 20 | 580 | Clenbuterol; Dex |
| 9 | W | 15 | 598 | Clenbuterol + Dex |
| 10 | W | 20 | 560 | Clenbuterol + Dex |
| 11 | W | 5 | 480 | Clenbuterol + Dex |
| 12 | W | 12 | 560 | Clenbuterol + Dex |

M = männlich; W = weiblich; ** Wallach

[#] Dexamethason,

3. 1. 2. Einmalartikel

9 ml Monovette® 92×16,5 mm zur Blutabnahme (1,6 mg EDTA/ml Blut) (Sarstedt, Nümbrecht; Deutschland)

Kanüle zur Blutabnahme (Fa. Schädel, Holzhausen; Deutschland)

Röhrchen mit Schraubdeckel 50 ml (Fa. Greiner Labortechnik, Frickenhausen; Deutschland)

Polypropylenröhrchen (PP)10 ml (Fa. Greiner Labortechnik, Frickenhausen; Deutschland)

Zählröhrchen, Polystyrol (PS) 5 ml (Fa. Greiner Labortechnik, Frickenhausen; Deutschland)

Glasfaserfilter Whatman GF/C (Whatman, Inc., Clifton, NJ)

Eppendorfgefäße 1,5 ml (Eppendorf GmbH, Hamburg; Deutschland)

Pipettenspitzen (Eppendorf GmbH, Hamburg; Deutschland)

Pony (Mini-) vials (Packard, Groningen; Niederlande)

3. 1. 3. Chemikalien und Pufferlösungen

(-)-Adrenalin Hydrochlorid (Epinephrin) (Sigma Chemical Company, St. Louis; USA)

L-(+)-Ascorbinsäure (Merck, Darmstadt; Deutschland)

Clenbuterolhydrochlorid (als Fertigarzneimittel Ventipulmin®) (Geschenk von Fa. Boehringer Ingelheim; Deutschland)

Dexamethason (als Fertigarzneimittel Dexasel®) (Fa. Selectavet, Weyarn-Holzolling; Deutschland)

3 % Essigsäure

Ficoll-Paque® (Pharmacia-Biotech, Uppsala; Schweden)

(-)-[¹²⁵I]-Iodocyanopindolol (ICYP) (New England Nuclear/DuPont, Brüssel; Belgien)
(spez. Aktivität: 2200 Ci/mmol)

3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) (Sigma Chemical Company, St. Louis; USA)

(-)-Isoprenalin-Bitartrat (Isoproterenol) (Sigma Chemical Company, St. Louis; USA)

Natriumchlorid (Merck, Darmstadt; Deutschland)

(-)-Noradrenalin Hydrochlorid (Norepinephrin) (Sigma Chemical Company, St. Louis; USA)

Phentolamin (Sigma Chemical Company, St. Louis; USA)

(+/-)-Propranolol Hydrochlorid (Sigma Chemical Company, St. Louis; USA)

Szintillationscocktail (Packard, Dreieich; Deutschland)

Tris (hydroxymethyl) aminomethan (Merck, Darmstadt; Deutschland)

Phosphate Buffered Saline (PBS) (Biochrome, Berlin; Germany)

Zyklisches ^3H -AMP RIA-Kit (Amersham-Buchler, Braunschweig; Deutschland)

Geschenke von der Firma Ciba-Geigy (Basel; Schweiz):

| | |
|---------------|---|
| (±)-CGP 12177 | ((±)-4-(3-Tertiarybutylamino-2-hydroxypropoxy)-benzimidazole-2-ol) |
| CGP 20712A | (1-[2-((3-Carbamoyl-4-hydroxy)phenoxy)ethylamino]-3-[4-(1-methyl-4-trifluoromethyl-imidazolyl)-phenoxy]-2-propanol) |
| ICI 118,551 | (Erythro-(+/-)-1-(7-methylindan-4-yloxy)-3-isopropylaminobutan-2-ol) |

Inkubationspuffer (10 mmol/l Tris-HCl, 154 mmol/l NaCl, 0,55 mmol/l Ascorbinsäure, 30 µmol/l Phentolamin; pH 7,2; 25 °C)

Waschpuffer (10 mmol/l Tris-HCl, 154 mmol/l NaCl; pH 7,4; 25 °C)

3. 1. 4. Geräte

Analysenwaage Modell Mettler AT 261 (Mettler-Toledo AG, Greifensee; Schweiz)

Beta-Flüssigkeitsszintillationszähler Modell Nr.2250CA (Packard Instrument Company, Meriden; USA)

Digitalwaage Modell Mettler PM 300 (Mettler-Toledo AG, Greifensee; Schweiz)

Gamma-Zähler Modell Nr. D5002 (Packard Instrument Company, Meriden; CT, USA)

Mikroskop Modell Nr. CK2-RT (Olympus Optical Co., LTD; Japan)

pH-Meter (Wissenschaftlich-technische Werkstätte, Weilheim; Deutschland)

Pipetten: Multipipetten, Varipipetten (Eppendorf, Hamburg; Deutschland)

Rüttler (Vortex) (Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York; USA)

Vakuumfiltrationsanlage (Brandel Biomedical Research and Development Lab. Inc., Gaithersburg; USA)

Schüttelwasserbad (Schütt Labortechnik, Göttingen; Deutschland)

Zählkammer nach Neubauer

Zentrifugen:

Sorvall (DuPont Company, Newtown; USA)

Tischzentrifuge Modell Nr. 5415C (Eppendorf, Hamburg; Deutschland)

3. 2. Versuche und Versuchsprotokolle

3. 2. 1. Behandlungsversuche

Zwölf Pferde wurden in drei Versuchsgruppen zu je vier Tieren unterteilt:

Gruppe I (Versuch 1): Behandlung nur mit Clenbuterol

Gruppe II (Versuch 2): Behandlung mit Clenbuterol, und nachfolgend Behandlung mit Dexamethason unmittelbar nach dem Absetzen der Clenbuterolbehandlung

Gruppe III (Versuch 3): Gabe von Clenbuterol gleichzeitig mit Dexamethason

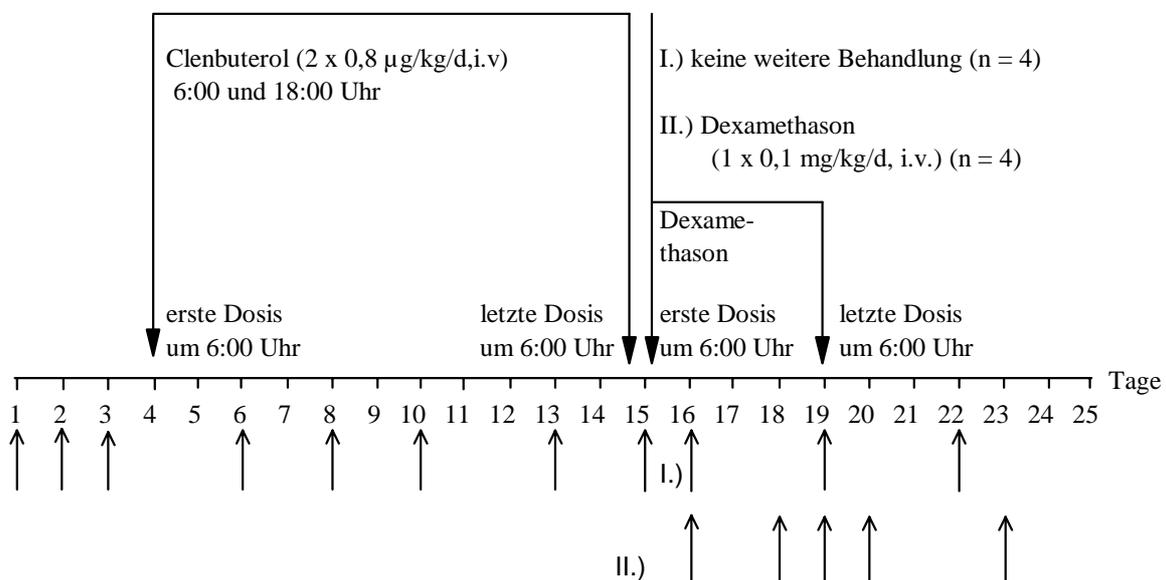


Abb. 4: Versuchsprotokoll zur Clenbuterolbehandlung mit anschließender Dexamethasongabe

An drei aufeinanderfolgenden Tagen vor dem Therapiebeginn wurde den acht Pferden in der Box morgens zwischen 7:00 und 8:00 Uhr venöses Vollblut nach vorangegangener Hautdesinfektion aus der Vena jugularis in EDTA-Röhrchen (1,6 mg EDTA/ml Blut) entnommen. Damit wurden die Basalwerte der β -Adrenozeptordichte (bestimmt durch ICYP Bindung) bzw. die durch (-)-Isoprenalin-induzierte cAMP-Akkumulation (bestimmt durch Radioimmunoassay, RIA) in Lymphozyten ermittelt.

30 ml venöses Vollblut: Zur Gewinnung von Lymphozyten für die Bindungsstudien (Bestimmung der maximalen Rezeptordichte B_{\max} und Affinität K_D)

20 ml venöses Vollblut: Zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Bildung

Anschließend wurden die Tiere über zwölf Tage mit Clenbuterol (Ventipulmin[®] 2×0,8 µg/kg/d; i. v.) um jeweils 6:00 und 18:00 Uhr behandelt. Nach Beendigung der zwölf-tägigen Clenbuterolbehandlung wurden die acht Pferde in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe (n=4) erhielt keine weitere Behandlung. Blutproben wurden noch bis zum 7. Tag nach dem Absetzen entnommen. Unmittelbar nach dem Absetzen der Clenbuterolbehandlung wurden die Tiere in der zweiten Gruppe (n=4) über fünf Tage mit Dexamethason (Dexasel[®], 1×0,1 mg/kg/d; i. v.) jeweils 6:00 Uhr morgens behandelt. Es wurden ebenfalls die Parameter B_{\max} , K_D , und intrazelluläres cAMP während der Erholungszeit nach der Dexamethasonbehandlung (1. und 4. Tag) bestimmt. Der zeitliche Versuchsablauf ist in der Abb. 4 wiedergegeben. Die Zeitpunkte der Blutentnahmen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

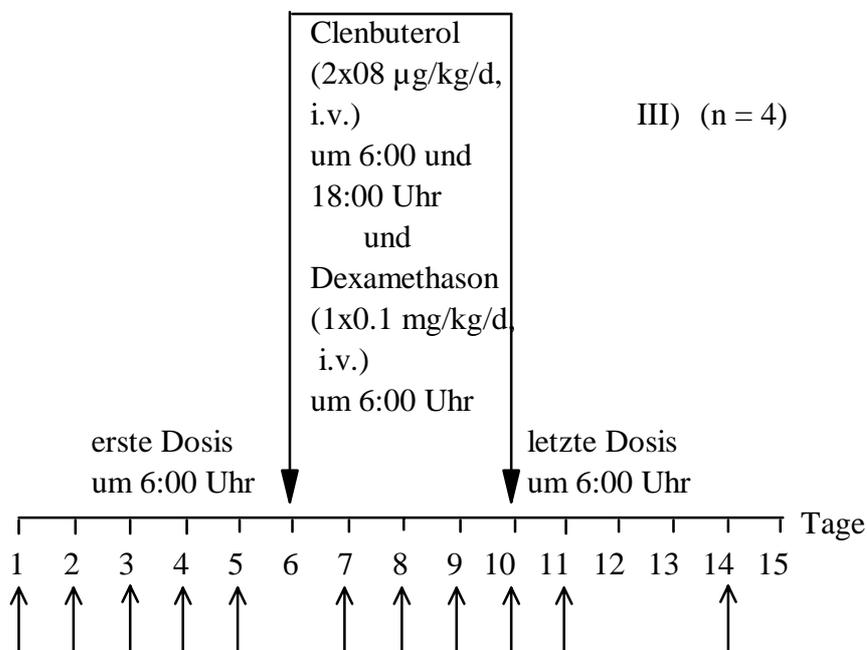


Abb. 5: Versuchsablauf zur Kombinationsbehandlung Clenbuterol mit Dexamethason

Ähnlich wie bei der ersten und zweiten Gruppe wurden bei der dritten Gruppe (n=4) an fünf aufeinanderfolgenden Tagen die Ausgangswerte der β -Adrenozeptordichte (bestimmt durch ICYP Bindung) und (-)-Isoprenalin-induzierte intrazelluläre cAMP-Bildung ermittelt.

Danach erhielten die Tiere eine gleichzeitige Kombinationsbehandlung über fünf Tage mit Clenbuterol (Ventipulmin[®], 2×0,8 µg/kg/d; i. v.) jeweils 6:00 und 18:00 Uhr und Dexamethason (Dexasel[®], 1×0,1 mg/kg/d; i. v.) jeweils 6:00 Uhr. Der zeitliche Versuchsablauf ist hierfür in Abb. 5 wiedergegeben.

Die verwendeten Dosierungen von Clenbuterol (0,8µg/kg zweimal täglich) und von Dexamethason (0,1 mg/kg einmal täglich) entsprechen den nach der Zulassung empfohlenen Dosierungen für Pferde.

3.3. Methoden

3.3.1. Isolierung der Lymphozyten

Die Lymphozyten wurden aus dem Vollblut mittels Dichte-Gradienten-Zentrifugation nach der Methode von Böyum (1968) isoliert. Man erhält hierdurch die Fraktion der mononukleären Leukozyten, die überwiegend aus Lymphozyten zusammengesetzt ist. Als Trennmedium wurde "Ficoll-Paque[®]" (Dichte: 1,077 g/ml) verwendet. Die Blutproben wurden in Falconröhrchen mit PBS 1:1 verdünnt. Jeweils 20 ml dieses Blut-Puffer-Gemisches wurden über je 20 ml Ficoll-Paque[®] vorsichtig überschichtet und über 20 min bei Raumtemperatur mit 3000 RPM (Umdrehung pro Minute) in 50 ml Falconröhrchen zentrifugiert (Sorvall RT 3000D, DuPont Company, Newtown; USA). Durch den ersten Zentrifugationsschritt erhält man vier Schichten von unten nach oben, wie in Abb. 6 schematisch dargestellt wurde: Erythrozyten und neutrophile Granulozyten sammelten sich als Pellet, es folgte eine Schicht Ficoll-Paque[®], dann eine dünne Schicht mononukleäre Leukozyten, hauptsächlich aus Lymphozyten. In der obersten Schicht befanden sich Thrombozyten und Plasmabestandteile. Anschließend wurden die Lymphozyten (als "buffy coat") mit einer Pipette in neuen Zentrifugenröhrchen gesammelt und zweimal bei 2000 RPM bzw. 800 RPM zentrifugiert und bei Raumtemperatur mit 40-50 ml PBS über 10 min gewaschen. Das letzte Zellpellet wurde in 1 ml Inkubationspuffer (10 mmol/l Tris-HCl, 154 mmol/l NaCl, 0,55 mmol/l Ascorbinsäure, 30 µmol/l Phentolamin; pH 7,2, 25 °C) resuspendiert. Zur Lymphozytenzählung wurden 10 µl Lymphozytensuspension mit 90 µl 3 % Essigsäure gemischt. Nach vorsichtigem Schütteln wurde ein Aliquot in einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch bei einer Vergrößerung von 1:40 ausgezählt, und die Zelldichte wurde auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Insgesamt wurden aus 30 ml Blut ca. $20\text{--}50 \times 10^6$ Zellen gewonnen. Für die Bindungsstudien wurden $0,75 \times 10^6$ Zellen/Ansatz benötigt.

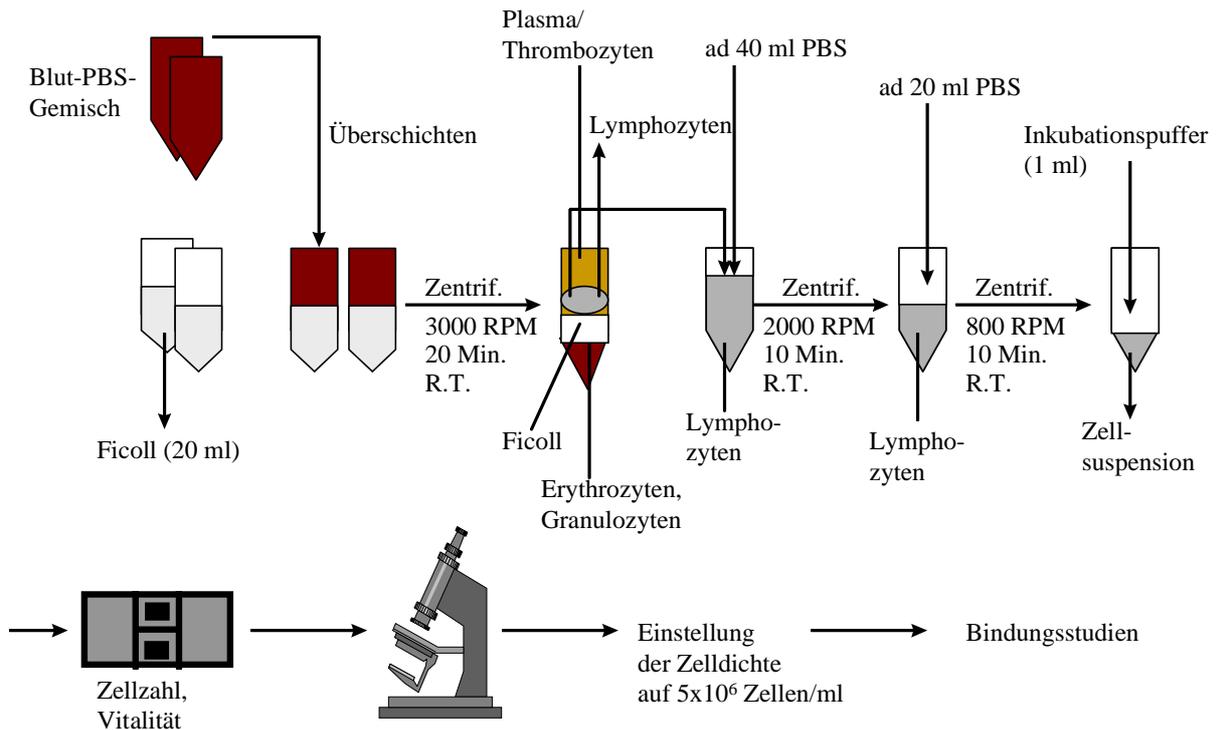


Abb. 6: Schematische Darstellung der Lymphozytenisolierung

3. 3. 2. Radioligandbindungsstudien

3. 3. 2. 1. (-)-[¹²⁵I]-Iodocyanopindolol (ICYP) als Radioligand

Für die Identifizierung und Charakterisierung der β -Adrenozeptoren an Pferdelymphozyten wurde ICYP mit einer spezifischen Aktivität von 2200 Ci/mmol verwendet. Dessen chemische Struktur ist in Abb. 7 dargestellt. Dieser Radioligand bietet gegenüber tritiierten Radioliganden insbesondere den Vorteil einer höheren spezifischen Aktivität, weshalb weniger Untersuchungsmaterial benötigt wird (Brodde et al., 1981; Engel et al., 1981; Hoyer et al., 1982; O'Hara und Brodde, 1984).

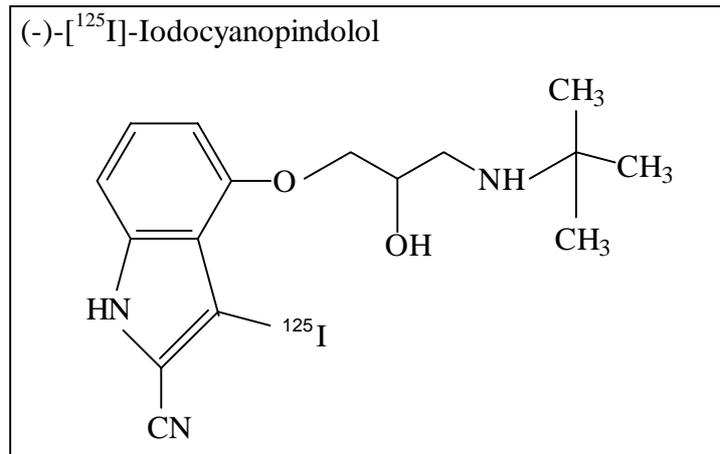


Abb.7: Chemische Struktur des Radioliganden (ICYP)

3. 3. 2. 2. Durchführung der Bindungsstudien

Die nach der Inkubation des Radioliganden an die Zellen gebundene Radioaktivität wird von der freien durch Vakuumfiltration abgetrennt. Anschließend wird die Radioaktivität, die an den Zellen als Gesamtbindung zurückbleibt, gemessen. Da ein Teil der Radioaktivität unspezifisch vor allem an Zellen und Filter gebunden wird, wurden parallel Bindungsstudien in Gegenwart einer hohen Konzentration eines nicht markierten Liganden - in den vorliegenden Untersuchungen (\pm)-CGP 12177 - durchgeführt. Dieser nichtselektive und nicht radioaktiv markierter β -Adrenozeptorantagonist verdrängt ICYP aus seiner spezifischen Bindung nicht jedoch aus der unspezifischen Bindung. Aus der Differenz der Gesamtbindung und unspezifischen Bindung läßt sich die spezifische Bindung des Radioliganden berechnen: Spezifische Bindung (SB) = Gesamtbindung (TB) - Unspezifische Bindung (UB).

Zwei Arten von Bindungsstudien wurden durchgeführt, um die Anzahl der Zelloberflächenrezeptoren und deren Eigenschaften zu bestimmen:

1. Sättigungsexperiment
2. Verdrängungsexperiment

3. 3. 2. 2. 1. Sättigungsexperiment

Konzentrationsabhängige Bindungsstudien wurden in Anlehnung an die Methode von Brodde et al. (1985a) durchgeführt. Zur Bestimmung der maximalen β -Adrenozeptorendichte je Zelle

(B_{\max}) und der Bindungsaffinität (Dissoziationskonstante K_D) wurden Sättigungsexperimente durchgeführt. Dazu waren folgende Schritte erforderlich.

ICYP und alle anderen verwendeten Substanzen wurden in einem gekühlten Inkubationspuffer (4 °C) (10 mmol/l Tris-HCl, 154 mmol/l NaCl, 0,55 mmol/l Ascorbinsäure, 30 µmol/l Phentolamin; pH 7,2; 25 °C) verdünnt bzw. gelöst.

Für den Ansatz wurden 2×12 Inkubationsröhrchen vorbereitet. Die Bindungsstudien wurden als Doppelbestimmung durchgeführt, wobei 2×6 Röhrchen für die Gesamtbindung und 2×6 Röhrchen für die unspezifische Bindung benötigt wurden. Die beschrifteten Röhrchen wurden anschließend auf Eis (4 °C) gestellt. Es wurde eine jeweils konstante Zellmenge von 150 µl (ca. $0,75 \times 10^6$ Lymphozyten) mit 50 µl ansteigenden Konzentrationen von ICYP (6 Konzentrationen zwischen etwa 5 bis 120 pmol/l) und 50 µl Inkubationspuffer (Gesamtbindung) oder 1 µmol/l (\pm)-CGP 12177 (unspezifische Bindung) in einem Gesamtvolumen von 250 µl im Schüttelwasserbad für 90 min bei 37 °C inkubiert^{**}. Nach 90minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml gekühltem Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, 154 mM NaCl; pH 7,4) und rasche Filtration über Whatman GF/C Filter gestoppt. Die Filter wurden mit weiteren 10 ml gekühltem Waschpuffer gewaschen. Nach dem Trockensaugen wurden die Filter mit einer Pinzette in Zählröhrchen überführt. Die Lymphozyten mit der gebundenen Radioaktivität blieben hierbei auf den Filtern. Anschließend wurde die Radioaktivität der Filterproben im Gamma-Counter bei einer Ausbeute von etwa 80 % gemessen und als "counts per minute" (cpm) angegeben. Die genaue Bestimmung der sechs rechnerisch ermittelten ICYP-Konzentrationen erfolgte über Messung der Radioaktivität, wobei von jeder angesetzten Konzentration die gleiche Menge wie im Ansatz (je 50 µl) direkt auf die Filter, die in Zählröhrchen eingesteckt waren, gegeben und gemessen wurde. Die so ermittelte Radioaktivität wird für den freien, ungebundenen Liganden (F) in pmol/l und für den gebundenen Liganden (B) in fmol/Ansatz in die entsprechenden ICYP-Konzentrationen umgerechnet und dann mit der Loschmidt'schen Zahl in Bindungsstellen des Radioliganden/Zelle multipliziert. Man geht davon aus, daß 1 Mol etwa $6,023 \times 10^{23}$ (Loschmidt'sche Zahl) Teilchen entspricht und je ein Teilchen eine Bindungsstelle besetzt (BS; Bindungsstelle/Zelle = spezifisch gebundene Radioaktivität in fmol \times Loschmidt'sche Zahl \div eingesetzte Zellzahl). Die Gesamtbindung besteht aus einer

^{**}Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit ergaben eine vollständige Gleichgewichtsstellung des Radioliganden mit den Rezeptoren nach 60 Minuten bei 37 °C. Daher wurden als Inkubationsbedingungen 90 Minuten bei 37 °C für alle Bindungsexperimente gewählt.

spezifischen und einer unspezifischen Bindung. Als unspezifische Bindung wurde diejenige Radioaktivität definiert, die nicht durch den hydrophilen β -Antagonisten (\pm)-CGP 12177 (1 $\mu\text{mol/l}$) verdrängt werden konnte; und die spezifische Bindung errechnet sich aus der Gesamtbindung minus der unspezifischen Bindung.

Für die Inkubationsansätze der Sättigungsexperimente ergab sich somit folgende Pipettierschemata:

Ansätze:

| | |
|---------------------|---|
| Gesamtbindung (GB): | 150 μl Zellsuspension (ca. $0,75 \times 10^6$ Zellen) |
| | 50 μl ICYP (steigende Konzentration: 5 bis 120 pmol/l) |
| | 50 μl Inkubationspuffer |
| | <hr/> |
| | 250 μl Gesamtvolumen |

| | |
|------------------------|---|
| Unspez. Bindung (USB): | 150 μl Zellsuspension (ca. $0,75 \times 10^6$ Zellen) |
| | 50 μl ICYP (steigende Konzentration: 5 bis 120 pmol/l) |
| | 50 μl 1 $\mu\text{mol/l}$ (\pm)-CGP 12177 |
| | <hr/> |
| | 250 μl Gesamtvolumen |

3. 3. 2. 2. 2. Verdrängungsexperiment

Um aus der Konkurrenz eines radioaktiv unmarkierten mit einem markierten Liganden, um die in einem Gewebe vorhandenen β -adrenergen Rezeptoren auf den Rezeptorsubtyp (β_1 oder β_2), die Affinität der Liganden (K_i) zu den Rezeptoren und die möglicherweise vorhandenen unterschiedlichen Aktivitätszustände der Rezeptoren (hoch- oder niederaffin) schließen zu können (Minneman und Malinoff, 1980), wurden Verdrängungsexperimente mit Agonist- und Antagonistliganden durchgeführt.

Folgende Agonist- und Antagonistliganden wurden bei den Verdrängungsexperimenten eingesetzt:

| | |
|--|--------------------------|
| vorwiegend β_2 -selektiver radioaktiv markierter Adrenozeptorantagonist: | ICYP |
| β_1 -selektiver Adrenozeptorantagonist: | CGP 20712A |
| β_2 -selektiver Adrenozeptorantagonist: | ICI 118,551 |
| nichtselektiver β -Adrenozeptorantagonist: | (-)- und (+)-Propranolol |
| nichtselektive Agonisten: | (-)-Isoprenalin |
| | (-)-Adrenalin |
| | (-)-Noradrenalin |

Ansteigende Konzentrationen (8 bis 22 Konzentrationen) eines obengenannten unmarkierten Liganden wurden zu einer konstanten ICYP Konzentration (30-40 pmol/l) beigegeben.

Für die Ansätze der Verdrängungsexperimente wurde folgende Pipettierschema erarbeitet:

Ansätze:

150 µl Zellsuspension (ca. $0,75 \times 10^6$ Zellen)

50 µl ICYP (konstante Konzentration: 30-40 pmol/l)

50 µl steigende Konzentration des unmarkierten Liganden (s.o.)

Die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung wurden - wie im Abschnitt 3.3.2.2.1. beschrieben - bestimmt.

Da für viele Gewebe gezeigt wurde, daß sich in Abwesenheit von Guanylnukleotiden die Agonistliganden an zwei Affinitätszustände des β -Adrenozeptors binden, was zu biphasischen Kompetionskurven führt (Kent et al., 1980; Minneman et al., 1981), wurde die Hemmung der Bindung von ICYP durch β -adrenerge Agonisten in Gegenwart oder Abwesenheit von GTP (100 µmol/l) bestimmt.

3. 3. 3. Bestimmung der cAMP-Konzentration in Pferdlymphozyten

Die Lymphozyten wurden - wie unter 3. 3. 1. beschrieben - isoliert. Die so isolierten Zellen wurden nach dem letzten Zentrifugationsvorgang im PBS-Puffer, der 100 µmol/l 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) (Phosphodiesterasehemmer) enthielt, aufgenommen. Der Versuchsansatz basierte auf der Methode von Werner et al. (1997). Aliquots von 300 µl Zellsuspension (2×10^6 Zellen) wurden bei 37 °C für 15 min mit 30 µl PBS/IBMX (basaler cAMP-Gehalt) oder (-)-Isoprenalin, (-)-Adrenalin und (-)-Noradrenalin (1 nmol/l-10 µmol/l) in einem Gesamtvolumen von 330 µl inkubiert. Die Reaktion wurde durch 5minütiges Erhitzen der Proben auf 95 °C gestoppt. Anschließend wurden die Proben kurz auf 4 °C gekühlt und bei 12 000×g für 10 min zentrifugiert. Es wurden dann von jedem Überstand 2×100 µl Aliquot entnommen und sofort bei -20 °C bis zur cAMP-Bestimmung eingefroren.

Die cAMP-Konzentration der Lymphozyten wurde in 100 µl Aliquot des Überstandes mittels ^3H -cAMP Radioimmunoassay-Kit (Amersham-Buchler, Braunschweig; Deutschland) bestimmt. Der Test basiert auf der kompetitiven Bindung von unmarkiertem zyklischen AMP und einer definierten Menge an tritiummarkiertem cAMP an ein spezifisches Bindungsprotein

mit hoher Affinität für cAMP. Der Anteil des proteingebundenen radioaktiven cAMP ist umgekehrt proportional zur Konzentration an nichtmarkiertem cAMP.

Die aufgetauten Proben (je 100 μ l) wurden mit 50 μ l Tris/EDTA-Puffer versetzt. Zu jeweils 50 μ l dieser Proben wurde 50 μ l ^3H -cAMP und 100 μ l Bindungsprotein zugegeben. Parallel wurde eine Eichkurve (Standardkurve) mit 5 Konzentrationen von unmarkiertem cAMP je 50 μ l (1 - 16 pmol/l) und 50 μ l ^3H -cAMP und 100 μ l Bindungsprotein angesetzt. Die Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden im Eisbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l eiskalter Aktivkohlesuspension (zur Adsorption von ungebundenem cAMP) gestoppt und das nichtgebundene cAMP wurde durch Zentrifugation bei 14 000 \times g für 2 min von dem proteingebundenen Anteil abgetrennt. Nach der Zentrifugation wurde jedem Röhrchen ohne Aufwirbeln des Niederschlags 200 μ l Überstand entnommen, in Zählgläschen überführt und mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Nach 10minütigem Schütteln wurde die ^3H -Radioaktivität der Proben im Beta-Counter gemessen. Das Ergebnis wurde als cAMP-Gehalt pro 10^6 Zellen (pmol/ 10^6 Lymphozyten) ermittelt.

3. 4. Berechnungsgrundlagen und Rezeptortheorie

3. 4. 1. Sättigungsexperiment

Bei den Sättigungsexperimenten wurden die Lymphozyten mit dem Radioliganden so lange inkubiert, bis ein Gleichgewichtszustand eingestellt war, um die β -Adrenozeptordichte (B_{\max}) und Dissoziationskonstante (K_D) zu bestimmen.

Diese Methode basiert auf dem Massenwirkungsgesetz und geht davon aus, daß sich aus einem radioaktiv markierten Liganden und dem Rezeptor ein reversibler Ligand-Rezeptor-Komplex bildet, und sich nach einer gewissen Zeit ein Gleichgewicht zwischen beiden einstellt. Die Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes hängt bei gleichbleibender Rezeptorkonzentration von der Konzentration der freien Liganden ab. Es ist daher möglich, diese Komplexbildung durch eine bestimmte Menge eines entsprechenden Liganden abzusättigen ("Sättigbarkeit"). Dabei ist aber zu beachten, daß nur die spezifischen Bindungsstellen (die Rezeptoren) absättigbar sind, nicht jedoch die unspezifischen, die ebenfalls in der Membran vorkommen, aber keinen Rezeptorencharakter haben. Die unspezifische Bindung zeigt bei steigender Ligandenkonzentration einen linear ansteigenden,

nicht sättigbaren Verlauf, wohingegen die spezifische Bindung eine kurvenförmig einem Plateau zustrebende Sättigungscharakteristik zeigt.



[L]= freie Ligandenkonzentration, [R]= freie Rezeptorkonzentration,
[LR]= Rezeptor-Ligand-Komplex

Die Gesamtzahl der vorhandenen Rezeptoren ($[R]_{TOT}$) errechnet sich aus der Summe aus freien und gebundenen Rezeptoren:

$$[R]_{TOT} = B_{max} = [R] + [LR] \quad (2)$$

Gleiches gilt für die freie, nicht gebundene Ligandenkonzentration [F], die aus der Differenz der eingesetzten Gesamtradioaktivität (Totalaktivität, $[L]_{TOT}$) und der gebundenen Rezeptorkonzentration [LR] errechnet wird:

$$[F] = [L]_{TOT} - [LR] \quad (3)$$

Unter der Voraussetzung, daß jede molekulare Interaktion eine bimolekulare ist, ergibt sich in Anlehnung an das Massenwirkungsgesetz und unter der Voraussetzung des Gleichgewichtes der Hin- und Rückreaktion für die Dissoziationskonstante (K_D) die Gleichung (1):

$$K_D = \frac{[L] \cdot [R]}{[LR]} \quad (4)$$

Die K_D kann auch aus den Gleichungen (2) und (4) errechnet werden:

$$K_D = \frac{([R]_{TOT} - [LR]) \times [L]}{[LR]} \quad (5)$$

Durch mathematische Umformung ergibt sich:

$$\frac{[\text{LR}]}{[\text{R}]_{\text{TOT}}} = \frac{[\text{L}]}{K_{\text{D}} + [\text{L}]} \quad (6)$$

Betrachtet man diejenige Konzentration $[\text{LR}]$, bei der die Hälfte aller Rezeptoren besetzt sind, $[\text{LR}] = \frac{1}{2} B_{\text{max}}$ bzw. $\frac{1}{2} [\text{R}]_{\text{TOT}}$, so ergibt sich nach Auflösung:

$$K_{\text{D}} = [\text{L}]_{1/2} \quad (7)$$

d.h. die Dissoziationskonstante entspricht der Konzentration des Liganden, bei der die Hälfte aller Rezeptoren mit dem Liganden besetzt sind ($K_{\text{D}} = B_{\text{max}}/2$ bzw. $[\text{R}]_{\text{TOT}}/2$). K_{D} ist somit umgekehrt proportional zur Affinität eines Liganden zu seinem Rezeptor. Je kleiner die K_{D} um so höher ist die Affinität.

Weitere Umformung der Gleichung (6) ergibt:

$$[\text{LR}] = B_{\text{max}} = \frac{[\text{R}]_{\text{TOT}} \times [\text{L}]}{K_{\text{D}} + [\text{L}]} \quad (8)$$

$$\text{oder} \quad y = \frac{a \cdot x}{b + x}$$

Die Gleichung (8) beschreibt die Hyperbel-Funktion eines Bindungsgleichgewichtes, bei der $[\text{LR}]$ gegen steigende, freie, ungebundene Ligandenkonzentrationen $[\text{L}]$ aufgetragen wird und die $[\text{R}]_{\text{TOT}}$ oder B_{max} als y-Wert der Asymptote bzw. die K_{D} als halber y-Wert der Asymptote ermittelt werden, d. h. $[\text{LR}] = 0$, wenn $[\text{L}] = 0$ ist, und nähert sich $[\text{LR}] = [\text{R}]_{\text{TOT}}$, wenn $[\text{L}]$ sehr groß ist. Zu unendlichen ist $[\text{R}]_{\text{TOT}}$ gleich B_{max} . Voraussetzung für Gleichung (8) ist, daß die freien, ungebundenen Ligandenkonzentrationen $[\text{L}]$ nur dann mit den totalen, eingesetzten Ligandenkonzentrationen $[\text{L}]_{\text{TOT}}$ gleichgesetzt werden dürfen, wenn $[\text{L}]_{\text{TOT}}$ im Überschuß eingesetzt wird. Dann ist der gebundene Anteil sehr klein (meist $< 10\%$) und $[\text{L}]$ praktisch gleich $[\text{L}]_{\text{TOT}}$. Beide Parameter (B_{max} und K_{D}) sind aus der Sättigungskurve nur ungenau zu bestimmen. Deshalb werden zwei Möglichkeiten verwendet, um B_{max} und K_{D} zu berechnen:

1. Iteratives nichtlineares Kurvenanpassungsverfahren

Mit diesem Verfahren wird, ausgehend von zunächst einzugebenden Schätzwerten der die Kurve bestimmenden Parameter, eine Kurve berechnet. Die Abweichungen der experimentell gewonnenen Daten von dieser Kurve werden in der Summe der Abweichungsquadrate ausgedrückt. Im ausschließenden iterativen Anpassungsverfahren werden die vorgegebenen Parameter schrittweise solange verändert, bis eine optimale Anpassung der Parameter des vorgegebenen mathematischen Modells, ausgedrückt in der Minimierung der Abweichungsquadrate, an die vorhandenen Daten erreicht ist. Mit dem Computerprogramm GraphPad™ Prism (GraphPad Software, San Diego; USA) wurden nach diesem Verfahren aus den experimentell gewonnenen Bindungsdaten die bestimmenden Bindungsparameter, K_D und B_{max} , berechnet.

2. Darstellung nach Scatchardplot

Scatchard (1949) stellte eine Gleichung zur linearen Transformation der Bindungsdaten auf, die eine graphische Ermittlung derselben zuläßt. Im Scatchard-Plot, das sehr oft angewendet wird, um Radioligandbindungsstudien quantitativ auszuwerten, ergibt sich aus der Auftragung des Quotienten $[LR]/[L]$ (Ordinate) gegen $[LR]$ (Abszisse) oder B/F vs. B eine entsprechende Gerade mit negativer Steigung (Steigung = $-1/K_D$) und einem Schnittpunkt mit der Abszisse in B_{max} , wobei:

$[LR] = B = \text{Bound} = \text{Spezifische Bindung des radioaktiv markierten Liganden im Gleichgewicht (Bindungsstellen/Zelle)}$

$[L] = F = \text{Free} = \text{Freie Konzentration des Radioliganden (pmol/l)}$

B/F als y-Achse und B als x-Achse lassen sich durch Umformung der Gleichung (8) ableiten.

$$(B)(K_D) + (B)(F) = (F)(R)_{TOT} , \quad (9)$$

$$([R]_{TOT} = B_{max})$$

Durch Multiplizieren mit $1/F$ ergibt sich:

$$(B/F)(K_D) + B = B_{max} \quad (10)$$

Durch weitere Umformung resultiert:

$$B/F = \frac{B_{\max} - B}{K_D} \quad (11)$$

Dies kann als Geradengleichung ($y = mx + b$) wie folgt ausgedrückt werden:

$$B/F = -1/K_D \times B + B_{\max}/K_D \quad (12)$$

Die Voraussetzung für einen linearen Verlauf der Bindung im Scatchard-Plot ist, daß der Ligand sich an nur einen Rezeptor mit einer konstanten Affinität bindet, so daß keine Kooperativitätsphänomene auftreten. Die Gerade läßt sich aus den einzelnen Punkten des Plots mittels linearer Regression errechnen, wobei als Maß der Linearität der Korrelationskoeffizient r dient. Im Falle einer heterogenen Rezeptorpopulation und Affinität wurden sich kurvlineare Scatchard-Plots mit zwei oder mehreren Tangenten ergeben.

Die praktische Auswertung der für diese Arbeit ermittelten Daten (Sättigungskurven, Scatchard-Plot, Verdrängungskurven) erfolgte mittels des Computerprogrammes GraphPad™ Prism Version 2.0 (GraphPad Software, San Diego; USA). Dabei ergaben sich für die Daten der Bindungsstudien sowohl bei der linearen Auswertung nach Scatchard als auch durch nichtlineare Kurvenanpassung identische Ergebnisse der Bindungskinetik.

3. 4. 2. Verdrängungsexperiment

Bei dieser Art von Bindungsstudien konkurrieren ein radioaktiv markierter und ein nicht markierter Ligand um die spezifischen Bindungsstellen in der Membran (siehe 3. 3. 2. 2. 2.). Der markierte Ligand sollte dabei von den höchsten Konzentrationen des unmarkierten vollständig, von den niedrigsten jedoch nicht aus seinen Bindungsstellen verdrängt werden. Aus der resultierenden Verdrängungskurve kann graphisch diejenige Konzentration bestimmt werden, bei der gerade die Hälfte (50 %) an die spezifischen Bindungsstellen gebundenen Radioliganden aus seiner Bindung verdrängt (IC_{50}) wird.

Aus dem IC_{50} -Wert des unmarkierten Liganden, der eingesetzten Konzentration von ICYP [L] und der Dissoziationskonstante (K_D aus Sättigungsexperimenten) des Radioliganden läßt sich die Inhibitionskonstante (K_I) nach Cheng und Prussoff (1973) wie folgt errechnen:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\frac{[L]}{K_D} + 1} \quad (13)$$

Kriterien für die Validierung dieser Gleichung sind:

- daß sich die freie Ligandenkonzentration nicht ändert, d.h. die gebundene Konzentration des markierten Liganden beträgt nur einen kleinen Teil der gesamten eingesetzten Konzentration (<10 %)
- daß B_{\max} wesentlich kleiner ist als die K_D des markierten oder unmarkierten Liganden ($B_{\max} \ll K_D$).

Man erhält bei einer Klasse von einer voneinander unabhängigen Rezeptorpopulation einen abfallenden, monophasisch-sigmoiden Kurvenverlauf bzw. bei mehreren Klassen von Bindungsstellen einen abfallenden, biphasisch sigmoiden, wenn man die spezifisch gebundenen Konzentrationen des Radioliganden (y-Achse) gegen die jeweils eingesetzten steigenden Konzentrationen des unmarkierten Liganden (x-Achse) aufträgt.

Zusätzlich wurde durch die Transformation der Meßdaten der Verdrängungskurven der (Pseudo)-Hill-Koeffizient (n_H) nach Hill (1910) ermittelt, um Aussagen zu treffen, ob die Pharmakon-Rezeptor-Interaktion dem Massenwirkungsgesetz folgt (eine Bindungsstelle). So weist die Transformation einer Verdrängungskurve bei einem Hill-Koeffizienten von $\sim 1,0$ auf eine Bindungsstelle hin. Dagegen deutet ein Hill-Plot mit einem Hill-Koeffizienten von $< 1,0$ auf die Existenz zweier Bindungsstellen oder Affinitäten oder auf eine durch das Pharmakon ausgelöste negative Kooperativität zwischen den Bindungsstellen hin.

Die Berechnung der Daten aus den für diese Arbeit durchgeführten kompetitiven Bindungsstudien erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPadTMPrism Version 2.0 (GraphPad Software, San Diego; USA) iterativ mittels nichtlinearer Regression. Dieses Programm erlaubt eine Bestimmung der IC_{50} des unmarkierten Liganden durch Berechnung des Kurvenverlaufs. Mit der Gleichung (13) läßt sich dann die K_i errechnen, wenn die K_D des Radioliganden bekannt ist.

3. 4. 3. Berechnung des durch Isoprenalin-induzierten Anstiegs der cAMP-Akkumulation in Lymphozyten

Das in den Lymphozyten nach einer Stimulation mit Agonistliganden gebildete cAMP wurde über eine Dosis-Wirkungskurve ausgewertet.

Die über die Doppelbestimmung gemittelten Werte des cAMP-Gehaltes der Lymphozyten (pmol/10⁶ Zellen; berechnet aus der gemessenen Radioaktivität) wurden zur Konzentration der Agonistliganden (mol/l) aufgetragen. Die sigmoide Kurve läßt sich dann mit Hilfe der nicht linearen Regressionsanalyse (GraphPadTMPrism Version 2.0; GraphPad Software, San Diego; USA) erstellt. Aus der Kurve kann die maximale cAMP-Stimulierbarkeit der Lymphozyten bestimmt werden. Außerdem kann die Konzentration von Isoprenalin, Adrenalin und Noradrenalin ermittelt werden, bei der die halbmaximale cAMP-Bildung der Zelle (EC₅₀) festzustellen war. Dieser Wert zeigt, mit welcher Empfindlichkeit die Zellen nach Stimulation durch die o. g. Liganden cAMP bilden.

3. 5. Statistik

Die experimentellen Daten werden im Text und in den Abbildungen sowohl als arithmetisches Mittel aller durchgeführten Versuche als auch im Rahmen der Behandlungsversuche als einzelne Werte der jeweiligen Versuchstage und Versuchstiere dargestellt. Die Genauigkeit der Verdrängungskurven für eine oder zwei Bindungsstellen wurde statistisch mit dem F-Ratio-Test ausgewertet. Unterschiede in der Signifikanz wurden durch einen ungepaarten Student's t-Test geschätzt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant betrachtet.

Da aufgrund der geringen Zahl von Versuchstieren keine Normalverteilung der gemessenen Parameter angenommen werden konnte, wurden nicht-parametrische Tests verwendet (Sachs, 1992).

Der statistische Vergleich zwischen zwei Daten erfolgte durch gepaarte bzw. ungepaarte Tests mit Hilfe des Wilcoxon-Test bzw. Mann-U-Whitney-Test. In diesem Fall wurden jeweils die vergleichbaren Daten der β -Adrenozeptordichte, Dissoziationskonstante und des cAMP-Gehaltes zu den jeweiligen Zeitpunkten vor, während und nach der Behandlung gegeneinander getestet. p < 0,05 wurde als signifikant betrachtet.

Die Ergebnisse der einzelnen Behandlungsversuche wurden folgenden statistischen Auswertungen unterzogen:

-
- Es wurde an acht Pferden geprüft, wie sich die maximale β_2 -Adrenozeptorendichte (B_{\max}) unter chronischer Gabe von Clenbuterol ändert. Auf Grund der geringen Zahl der Versuchstiere konnte keine Annahme zur Normalverteilung gemacht werden. Die Nullhypothese ($\mu_1 = \mu_2$) wurde mit Hilfe des zweiseitigen Mann-U-Whitney-Tests (gepaarte Beobachtungen) geprüft.
 - In einer Subgruppe von vier Pferden wurde danach weiter geprüft, ob es bei Absetzen des Clenbuterols und gleichzeitiger Dexamethasongabe wieder zu einer Zunahme der B_{\max} kommt (Nullhypothese: $\mu_1 > \mu_2$ ist falsch). Dies wurde im einseitigen, gepaarten Wilcoxon-Test geprüft.

Nach Absetzen von Clenbuterol und nachfolgender Gabe von Dexamethason wurde eine B_{\max} errechnet, die den ursprünglichen Wert überschritt. Aufgrund der niedrigen Zahl der Versuchstiere dieser Untergruppe (n=4) konnte nur eine Tendenz für diese Zunahme über den Basalwert ermittelt werden (p=0,068).
 - In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob die Abnahme der B_{\max} unter Clenbuterol bei gleichzeitiger Gabe von Dexamethason ebenfalls auftritt oder nicht. Die Nullhypothese hierzu lautete: $\mu_1 \neq \mu_2$ ist falsch. Es zeigte sich, daß die Nullhypothese zu verwerfen ist, da für die Untersuchung im zweiseitigen Wilcoxon-Test beide Gruppen keinen Unterschied zeigten.

4. ERGEBNISSE

4.1. Charakterisierung der ICYP Bindung an intakten Pferdelymphozyten

Um die Bindung von ICYP an Pferdelymphozyten zu charakterisieren, wurden die allgemeinen Bindungskriterien, die den spezifischen β -Adrenozeptor als solchen ausweisen, untersucht:

- Definition der unspezifischen Bindung
- Stereoselektivität
- Subtypisierung β -adrenerger Rezeptoren
- Spezifität der Agonistligandenbindung (Rangfolge der Wirkungsstärke)
- Sättigbarkeit der spezifischen Bindung
- Stimulierbarkeit der lymphozytären cAMP-Bildung, die der zellulären biologischen Antwort der β -Adrenozeptoren entsprechen sollte.

4.1.1. Definition der unspezifischen Bindung

Um eine Aussage über die spezifische Bindung des Radioliganden treffen zu können, mußte nicht nur der Umfang der Bindung eines Radioliganden an die Rezeptoren, sondern auch dessen unspezifische Bindung an andere Membranstrukturen (“Nicht-Rezeptor-Membranbestandteile”) und an verwendete Materialien, wie Filter oder Reaktionsröhrchen, bestimmt werden. Die unspezifische Bindung gibt an, in welcher Menge alle im Bestimmungsansatz eingesetzten molekularen Strukturen mit dem Radioliganden eine unspezifische Bindung eingehen. Der Umfang der unspezifischen Bindung ist nur dann meßbar, wenn für die Bindung des Liganden keine freien Rezeptoren mehr zur Verfügung stehen. Zu diesem Zweck wird ein nicht radioaktiv markierter β -Antagonist oder β -Agonist benötigt, der den Radioliganden aus seiner spezifischen Bindung, jedoch nicht aus seiner unspezifischen Bindung verdrängen kann. Der Antagonist oder Agonist muß in höherer Konzentration eingesetzt werden, um sicherzustellen, daß die vorhandenen Rezeptoren vollständig von ihm besetzt werden. Um den Einfluß des Antagonisten oder Agonisten auf den verwendeten Radioliganden so gering wie möglich zu halten, war es wichtig, eine Menge einzusetzen, die gerade ausreicht, alle Rezeptoren zu blockieren. Nach Brodde et al. (1985a) scheint der hydrophile β -Adrenozeptor Antagonist (\pm)-CGP 12177 ein geeigneter Ligand zu

sein, um den Anteil der unspezifischen Bindung zu bestimmen, da er bereits in niedrigen Konzentrationen (10^{-6} mol/l) eine ausreichende Besetzung der β -Adrenozeptoren gewährleistet. Durch Verwendung dieses Liganden wird das sogenannte "non-receptor-related ligand trapping" vermieden (Laduron, 1984).

Es wurde zuerst geprüft, welche Konzentration des hydrophilen β -Adrenozeptorantagonisten (\pm)-CGP 12177 unter gegebenen Versuchsbedingungen benötigt wird, um eine komplette Blockade der β -Adrenozeptoren von Pferdelymphozyten zu erreichen. Parallel dazu sollte die Konzentration von (-)-Isoprenalin, die ebenfalls eine vollständige Hemmung der ICYP Bindung hervorruft, bestimmt werden.

Eine Suspension intakter Lymphozyten wurden mit einer definierten Konzentration von ICYP inkubiert und dessen Bindung durch steigende Konzentrationen an (\pm)-CGP 12177 (10 bis 15 Konzentrationen zwischen 10^{-10} und 10^{-5} mol/l) bzw. an (-)-Isoprenalin (10 bis 15 Konzentrationen zwischen 10^{-9} und 10^{-4} mol/l) gehemmt.

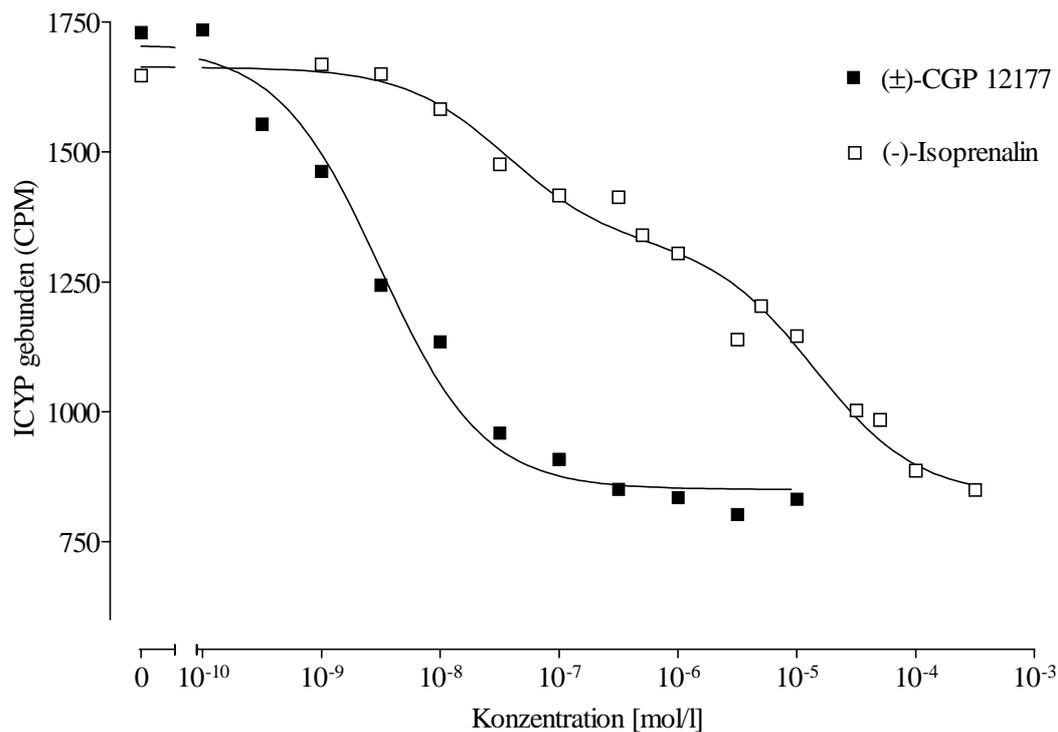


Abb. 8: Hemmung der Bindung von ICYP an intakte Pferdelymphozyten durch (\pm)-CGP 12177 und (-)-Isoprenalin.

Abszisse: Konzentration von unmarkiertem Liganden in mol/l

Ordinate: Gesamtbindung von ICYP in CPM

Lymphozyten ($0,75 \times 10^6$ Zellen/250 μ l) wurden mit 30-40 pmol/l ICYP in An- und Abwesenheit steigender Konzentrationen von (\pm)-CGP 12177 bzw. (-)-Isoprenalin bei 37 °C für 90 min im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Filtration zur Beendigung der Reaktion, die Radioaktivitätsmessung und die Ermittlung der spezifischen Bindung erfolgten wie in "Material und Methoden" beschrieben. Die in der Abbildung gezeigten Daten sind Mittelwerte aus drei Versuchen mit jeweils Dreifachbestimmung.

(±)-CGP 12177 hemmte die ICYP Bindung mit einem monophasischen Verlauf der Verdrängungskurve und entsprechendem Pseudo-Hill Koeffizienten (n_H) von 0,86 (Abb. 8).

Tabelle 7: Vergleich der Affinitäten β -adrenerger Agonist- und Antagonistliganden.

| β -adrenerge Substanzen | | | |
|---|---|-----------------------|--------------------------|
| | n | K_I (nmol/l) | |
| <i>Antagonisten</i> | | | |
| ICI 118.551 | 4 | 1,25 \pm 0,10 | |
| CGP 207.12A | 4 | 1849 \pm 0,37 | |
| (-)-Propranolol | 3 | 1,11 \pm 0,30 | |
| (+)-Propranolol | 3 | 40,07 \pm 4,0 | |
| (±)-CGP 12177 | 3 | 1,08 \pm 0,20 | |
| <i>Agonisten</i> | | | |
| | | $K_{I(H)}^*$ (nmol/l) | $K_{I(L)}^{**}$ (nmol/l) |
| (-)-Isoprenalin | 8 | 5,79 \pm 1,40 | 1040 \pm 194 |
| (-)-Isoprenalin +100 μ mol/l GTP | 3 | | 1241 \pm 499 |
| (-)-Adrenalin | 8 | 50,13 \pm 21 | 12680 \pm 4362 |
| (-)-Adrenalin +100 μ mol/l GTP | 3 | | 9866 \pm 2944 |
| (-)-Noradrenalin | 5 | 31444 \pm 9646 | |

Ergebnisse sind Mittelwerte \pm S.E.M. von n Experimenten.

* Inhibitionskonstante für hochaffine Bindungsstellen

** Inhibitionskonstante für niederaffine Bindungsstellen

Der mittlere K_I -Wert für (\pm)-CGP 12177 betrug $1,08 \pm 0,2$ nmol/l (siehe Tabelle 7). Bei einer Konzentration von $0,3 \mu\text{mol/l}$ (\pm)-CGP 12177 wurde ICYP nahezu vollkommen aus seiner Bindung verdrängt. Bei weiterer Erhöhung der (\pm)-CGP 12177-Konzentrationen wurde ein Plateau ohne weitere Verdrängung zwischen 10^{-6} bis 10^{-5} M erreicht, so daß durch weitere Erhöhung der (\pm)-CGP 12177-Konzentration die Bindung von ICYP nicht mehr beeinflußt werden konnte. Die noch gebundene ICYP Menge entspricht somit der unspezifischen Bindung.

(-)-Isoprenalin hingegen hemmte die Bindung von ICYP mit einem flachem und biphasischem Verlauf der Verdrängungskurve und dem Pseudo-Hill Koeffizienten (n_H) von 0,4 (Abb. 8). Eine maximale Hemmung der Bindung entsprechend $0,3 \mu\text{mol/l}$ (\pm)-CGP 12177 wurde bei $100 \mu\text{mol/l}$ (-)-Isoprenalin erreicht.

Anhand der Ergebnisse dieser Versuche wurde für die nachfolgenden Bindungsstudien zur Bestimmung des unspezifischen Anteils eine Konzentration von 10^{-6} mol/l (\pm)-CGP 12177 festgelegt und im weiteren Versuchsablauf routinemäßig eingesetzt.

4. 1. 2. Bestimmung der Stereoselektivität durch Verdrängung der ICYP Bindung mit (-)-Propranolol und (+)-Propranolol

Die Stereoselektivität als Ausdruck des Unterscheidungsvermögens des Rezeptors zwischen (-)- und (+)-Enantiomeren nicht markierter Agonist- bzw. Antagonistliganden ist ein wichtiges Kriterium zur Charakterisierung β -adrenerger Rezeptoren.

Zum Nachweis, daß die ICYP Bindung an Pferdelymphozyten stereospezifisch ist, wurde die Lymphozytensuspension ($0,75 \times 10^6$ Zellen/250 μl) mit einer ICYP-Konzentration von 30-40 pmol/l und mit steigenden Konzentrationen des (-)- und (+)-Enantiomers von Propranolol (8 Konzentrationen zwischen 10^{-10} und 10^{-4} Mol/l) inkubiert.

In Konzentrationen, die kleiner als 10^{-6} Mol/l sind, verursacht (-)-Propranolol eine etwa 40fach stärkere Bindungshemmung gegenüber dem radioaktiv markierten Liganden als (+)-Propranolol. In dem Konzentrationsbereich über 10^{-6} Mol/l ist die Fähigkeit beider Enantiomere zur ICYP-Verdrängung gleich (Abb. 9, Tabelle 7).

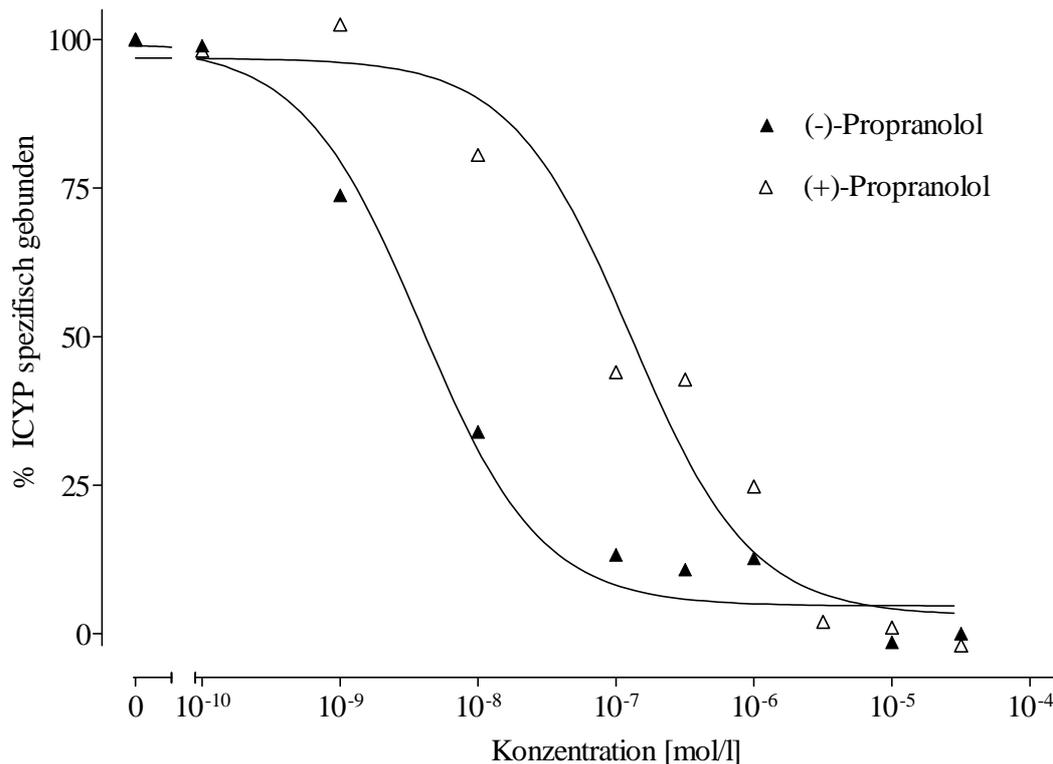


Abb. 9: Verdrängung der ICYP Bindung durch (-)- und (+)-Propranolol.

Abszisse: Konzentration von unmarkierten Liganden in mol/l

Ordinate: Spezifische Bindung von ICYP (%)

30-40 pmol/l ICYP und Lymphozyten ($0,75 \times 10^6$ Zellen/250 μ l) wurden mit Zusatz steigender Konzentrationen (-)- und (+)-Propranolol 90 min. bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die spezifische Bindung von ICYP wurde durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung ermittelt. Die 100%ige spezifische Bindung von ICYP wurde mit 1 μ mol/l (\pm)-CGP 12177 bestimmt. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte aus drei Versuchen mit jeweils Dreifachbestimmung.

Unter der Annahme, daß das stereospezifische Bindungsverhalten der Bindungsstelle ein Kriterium des β -Adrenozeptors ist, ergibt sich somit, daß in Konzentrationen bis zu 10^{-6} mol/l die ICYP Bindung β -spezifisch ist, während in Konzentrationen $> 10^{-6}$ mol/l ein stereoselektives Unterscheidungsvermögen des β -Adrenozeptors nicht mehr gegeben ist, und es sich demnach um eine unspezifische Bindung in diesen Konzentrationsbereich handelt.

Der aus 3 unabhängigen Experimenten und aus den IC_{50} -Werten nach Cheng und Prussoff (1973) errechnete mittlere K_I -Wert der spezifischen ICYP Bindung beträgt für (-)-Propranolol $1,11 \pm 0,30$ nmol/l und für (+)-Propranolol $40,07 \pm 4,0$ nmol/l (Abb. 9; Tab. 7). Die Lymphozyten weisen somit eine stereospezifische Konkurrenz zwischen ICYP und dem Enantiomerenpaar von Propranolol um ICYP-Rezeptorbindungsstellen auf.

4. 1. 3. Subtypisierung β -adrenerger Rezeptoren

Trotz der bekannten vorwiegend β_2 -selektiven Eigenschaft von ICYP war eine Zuordnung der durch den Radioliganden erfaßbaren spezifischen Bindungsstellen zur β_1 - bzw. β_2 -Rezeptorsubpopulation auf Pferdelymphozyten erforderlich. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden Lymphozyten des Pferdes in Verdrängungsexperimenten mit ICYP und dem selektiven β_1 -Adrenozeptorantagonisten CGP 20712A sowie dem selektiven β_2 -Adrenozeptorantagonisten ICI 118,551 inkubiert.

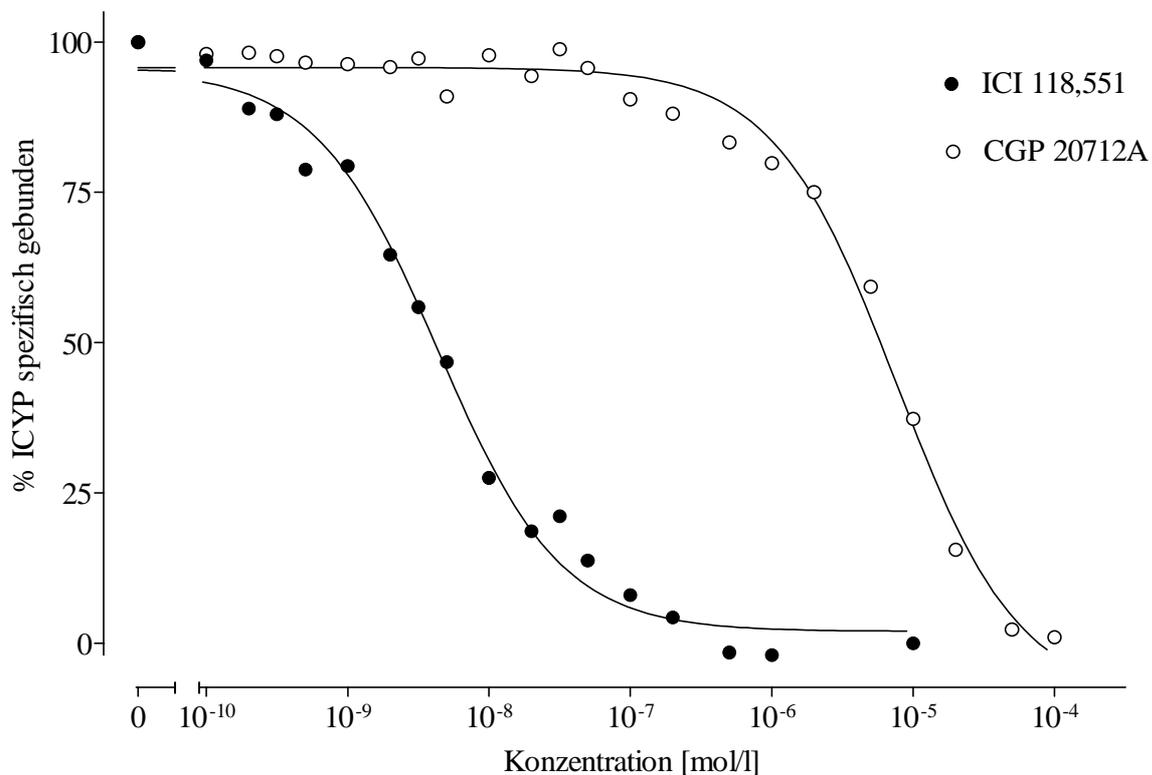


Abb. 10: Verdrängung der ICYP Bindung mit dem β_1 -selektiven (CGP 20712A) und dem β_2 -selektiven Adrenozeptorantagonisten (ICI 118,551).

Abszisse: Konzentration von unmarkierten Liganden in mol/l
 Ordinate: Spezifische Bindung von ICYP (%)

30-40 pmol/l ICYP wurden mit $0,75 \times 10^6$ Zellen und steigenden Konzentrationen der genannten unmarkierten Antagonisten in einem Gesamtvolumen von 250 μ l (siehe 3. 3. 2. 2.) 90 min bei 37 °C inkubiert. Gleichzeitig wurde die unspezifische Bindung in Gegenwart von 1 μ mol/l (\pm)-CGP 12177 bestimmt. 100% entspricht der spezifischen Bindung von ICYP in Anwesenheit von 1 μ mol/l (\pm)-CGP 12177. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte von vier Versuchen mit jeweils Doppelbestimmung.

Die Abb. 10 zeigt, daß ICI 118,551 den Radioliganden ICYP mit wesentlich höherer Affinität verdrängte als CGP 20712A. Für ICI 118,551 ergaben sich etwa 90 % hochaffine

Bindungsstellen mit einer Inhibitionskonstante (K_I) von $1,25 \pm 0,10$ nmol/l (Tab.7) und einem Hill-Koeffizienten n_H von $\sim 0,89$. Die übrigen 10 % der Bindungsstellen ließen sich keiner homogenen rezeptortypischen Bindungsstelle zuordnen. Die durch Computer-gestützte Anpassung der Bindungskurven ermittelte Funktion unterschied sich nicht signifikant von dem Modell einer Bindungsstelle. Für CGP 20712A ergab sich ebenfalls ein monophasischer Kurvenverlauf mit der Funktion für eine Bindungsstelle mit etwa 90 % Rezeptorbesetzung und einem Hill-Koeffizienten (n_H) von $\sim 1,0$. Die Inhibitionskonstante (K_I) betrug $1849 \pm 0,37$ nmol/l (Tab. 7) und lag damit im sehr niederaffinen Bereich. Der hoch selektive β_2 -Adrenozeptorantagonist ICI 118,551 (Bilski et al., 1983) bewirkte somit eine über 1500fach stärkere Hemmung der Bindung von ICYP als der hoch selektive β_1 -Adrenozeptorantagonist CGP 20712A (Dooley et al., 1986, Abb. 10). Aufgrund dieser Ergebnisse können die durch ICYP markierten, spezifischen Bindungsstellen der Pferdelymphozyten zu mindestens 90 % den β_2 -Adrenozeptoren zugeordnet werden. Die Existenz einer gewissen Anzahl von β_1 -Adrenozeptoren (<10%) an Pferdelymphozyten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

4.1. 4. Rangfolge der pharmakologischen Wirkungsstärke von Isoprenalin, Adrenalin und Noradrenalin

Zum weiteren Nachweis dafür, daß die ICYP Bindung an intakten Pferdelymphozyten eine Interaktion des Radioliganden mit Bindungsstellen der β_2 -Rezeptorpopulation darstellt, wurden Kompetitionsexperimente mit verschiedenen β -adrenergen Agonistliganden durchgeführt. Dazu wurden 30-40 pmol/l ICYP mit steigenden Konzentrationen an (-)-Isoprenalin, (-)-Adrenalin und (-)-Noradrenalin inkubiert. Der biphasische Kurvenverlauf der Agonistliganden (-)-Isoprenalin und (-)-Adrenalin läßt eindeutig zwei unterschiedliche Bindungsstellen erkennen (Abb. 11) . Da (-)-Isoprenalin ein nicht selektiver β -Agonist ist, der an β_1 - und β_2 -Rezeptoren mit annähernd gleicher Affinität bindet (McElligott et al., 1985), können diese Bindungsstellen nur zwei unterschiedliche Affinitätszustände eines Rezeptorsubtyps sein (K_{IH} , K_{IL}). Dieses gilt ebenfalls für den Agonisten (-)-Adrenalin, der ebenfalls einen kleinen Teil hochaffiner und einen großen Teil niederaffiner Bindungsstellen zeigte. Durch nicht-lineare Regressionsanalyse wurde errechnet, daß etwa 40 % der β -Adrenozeptoren der Pferdelymphozyten im hochaffinen Zustand vorliegen. Hingegen zeigte (-)-Noradrenalin nur einen niederaffinen Zustand der Bindungsstellen. Die K_I -Werte (Inhibitionskonstanten) dieser Agonisten sind in Tab. 7 aufgeführt. Die Abb. 11 zeigt, daß die

Agonisten in der Rangfolge ihrer pharmakologischen β -sympathomimetischen Wirkungsstärke (-)-Isoprenalin > (-)-Adrenalin > (-)-Noradrenalin die Bindung des Radioliganden ICYP hemmen, wodurch bestätigt wird, daß die in den Bindungsexperimenten mit dem überwiegend β_2 -selektiven Radioliganden ICYP erfaßten Bindungsstellen der Pferdelymphozyten die Charakteristik eines β_2 -Adrenozptors aufweisen.

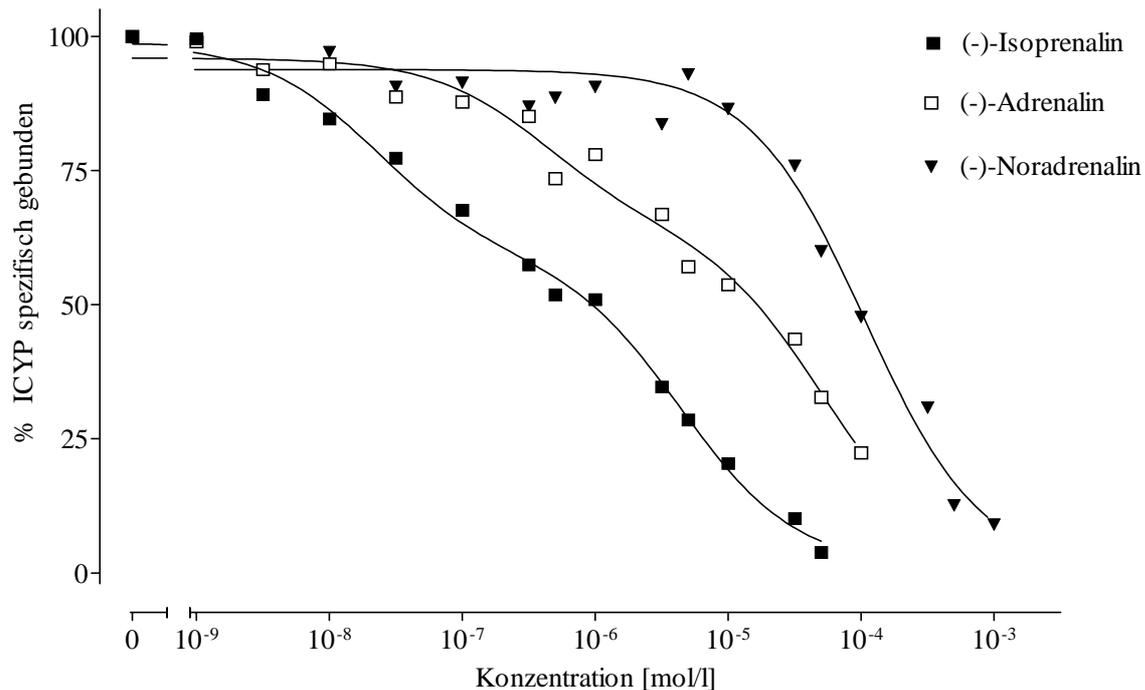


Abb. 11: Hemmung der ICYP Bindung durch (-)-Isoprenalin, (-)-Adrenalin und (-)-Noradrenalin.

Abszisse: Konzentration von unmarkierten Liganden in mol/l

Ordinate: Spezifische Bindung von ICYP (%)

30-40 pmol/l ICYP wurden mit $0,75 \times 10^6$ Zellen und steigenden Konzentrationen der genannten unmarkierten Agonisten in einem Gesamtvolumen von 250 μ l (siehe 3.3.2.2.2.) 90 min bei 37 °C inkubiert. Gleichzeitig wurde die unspezifische Bindung in Gegenwart von 1 μ mol/l (\pm)-CGP 12177 bestimmt. 100% entspricht der spezifischen Bindung von ICYP in Anwesenheit von 1 μ mol/l (\pm)-CGP 12177. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte von fünf Versuchen mit jeweils Dreifachbestimmung.

4. 1. 5. Verdrängungsexperimente mit den Agonistliganden (-)-Isoprenalin und (-)-Adrenalin in Ab- und Anwesenheit von GTP

Aus früheren Studien ist bekannt, daß die Agonist-Rezeptor-Interaktion durch Guanosin triphosphat (GTP) bzw. durch das nicht-hydrolysierbare GTP-Analogon Guanylyl-

imidodiphosphat (Gpp(NH)p) moduliert wird (Lefkowitz et al., 1976; Minneman und Molinoff, 1980; Davies et al., 1981; Wiemer et al., 1981). Im Gegensatz zu der durch Guaninnukleotide veränderten Konformation der β -Adrenozeptoren für Agonistliganden, die durch eine niedrigere Bindungsaffinität charakterisiert ist, werden die Bindungseigenschaften der Antagonistliganden durch Guaninnukleotide nicht beeinflusst (Lefkowitz et al., 1976; De Lean et al., 1980; Stiles et al., 1984;). Wie in den Abb. 11, 12 und 13 zu sehen ist, verlaufen die Verdrängungskurven für (-)-Isoprenalin und (-)-Adrenalin biphasisch. Dies deutet darauf hin, daß dieser Verlauf der Bindungskurven in Abwesenheit von GTP durch eine Kompetition der Agonistliganden um Rezeptorbindungsstellen erhalten wird, die in einem hochaffinen bzw. niederaffinen Bindungszustand vorliegen können. Um die Modulation der β_2 -Adrenozeptoren der Pferdelymphozyten durch Guaninnukleotide zu untersuchen, wurde nachfolgend der Einfluß von GTP auf die Bindung der Agonisten Isoprenalin und Adrenalin geprüft. Eine Charakterisierung des Einflusses von GTP auf eine Agonist-Rezeptor-Interaktion erfolgte im Verdrängungsexperiment mit ICYP und den Agonistliganden (-)-Isoprenalin und (-)-Adrenalin. Die mittleren Inhibitionskonstante (K_i) der Agonistliganden mit oder ohne GTP (10^{-4} mol/l), errechnet durch nichtlineare Regressionsanalyse, ist aus der Tab. 7 zu entnehmen. GTP wandelte die biphasische Agonistenkompetitionskurve in eine monophasische von niederer Affinität um (Abb. 12 und 13).

Da Noradrenalin die Bindung von ICYP an Pferdelymphozyten mit monophasischem Kurvenverlauf hemmte, der dem niederaffinen Bindungszustand entspricht, wurde die Verdrängungskurve durch GTP nicht beeinflusst (Ergebnisse nicht dargestellt).

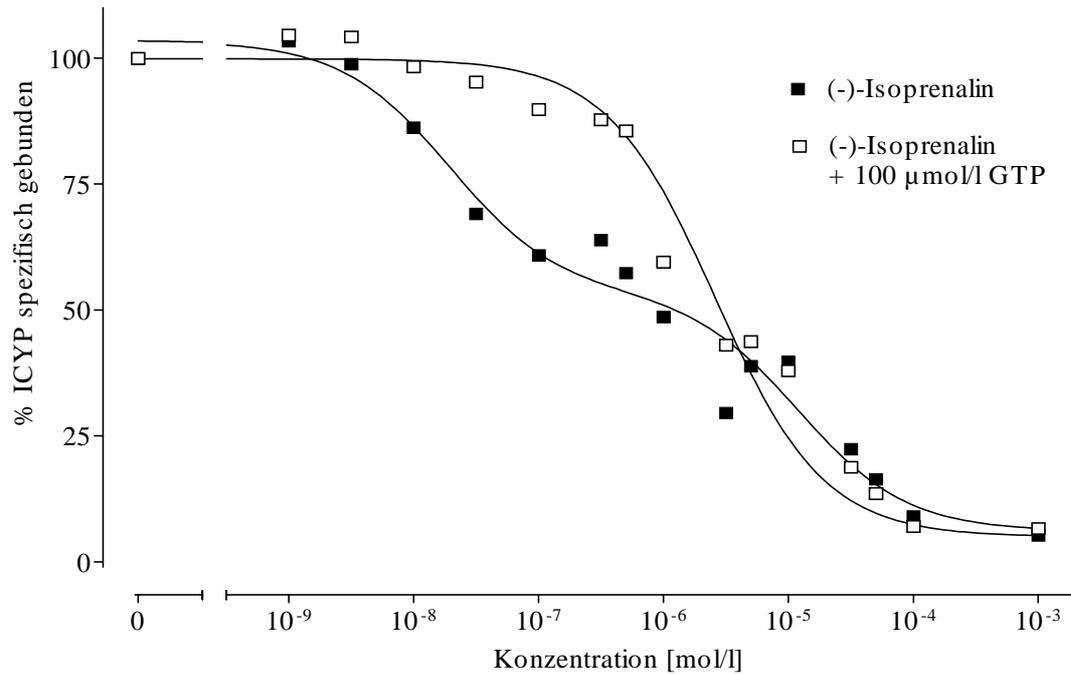


Abb. 12: Hemmung der spezifischen ICYP Bindung durch (-)-Isoprenalin in Ab- und Anwesenheit von GTP (10^{-4} mol/l).

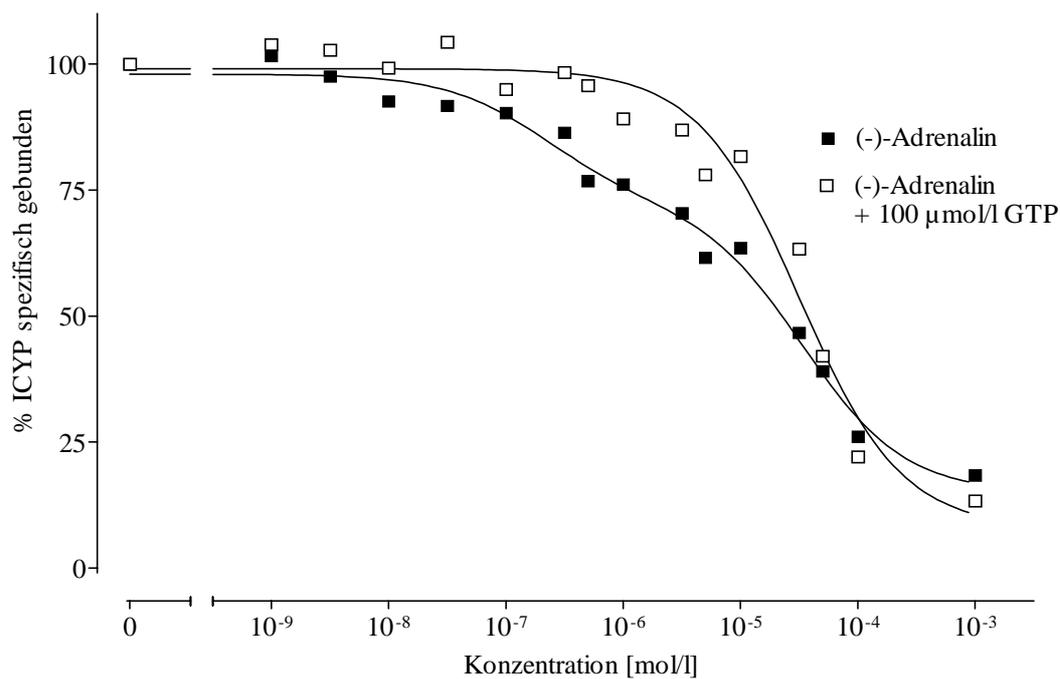


Abb. 13: Hemmung der spezifischen ICYP Bindung durch (-)-Adrenalin in Ab- und Anwesenheit von GTP (10^{-4} mol/l).

30-40 pmol/l ICYP wurden mit $0,75 \times 10^6$ Zellen und steigenden Konzentrationen der unmarkierten Agonisten (-)-Isoprenalin und (-)-Adrenalin (10^{-9} bis 10^{-4} mol/l) mit oder ohne GTP (10^{-4} M) in einem Gesamtvolumen von 250 μ l (siehe 3.3.2.2.2.) 90 min bei 37 °C inkubiert. Gleichzeitig wurde die unspezifische Bindung in Gegenwart von 1 μ mol/l (\pm)-CGP 12177 bestimmt. 100% entspricht der spezifischen Bindung von ICYP in Anwesenheit von 1 μ mol/l (\pm)-CGP 12177. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte von drei verschiedenen Versuchen mit jeweils Dreifachbestimmung.

4. 1. 6. Sättigbarkeit der ICYP Bindung

Die Sättigbarkeit der spezifischen Bindung ist ein wichtiges Kriterium zur Charakterisierung einer Rezeptorbindung. Für den Nachweis einer endlichen Anzahl von spezifischen ICYP Bindungsstellen wurden Lymphozyten mit steigenden Konzentrationen 5 bis 120 pmol/l des radioaktiv markierten Liganden inkubiert. Abb. 14 zeigt die Beziehung von Gesamtbindung, spezifischer und unspezifischer Bindung von ICYP in Abhängigkeit von der Konzentration. Gesamtbindung und unspezifische Bindung stiegen mit zunehmenden ICYP-Konzentrationen linear an, und waren nicht sättigbar. Der Anteil der spezifischen Bindung zeigte konzentrationsabhängig einen asymptotischen Verlauf und erreichte ein Plateau zwischen 60 bis 100 pmol/l, woraus abgeleitet werden kann, daß die spezifische Bindung ab diesen Ligandenkonzentrationen gesättigt ist. Die spezifische Bindung von ICYP, die sich als Differenz der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung darstellt, betrug im Bereich der K_D etwa 80-90 % und bei einer ICYP Konzentration von 120 pmol/l etwa 50 % der Gesamtbindung (Abb. 14). Die nach Transformation der Daten der spezifischen Bindung im Scatchard-Plot erhaltene Gerade (Abb. 15, *Inset*) weist auf eine einheitliche Rezeptorpopulation hin, an die der radioaktiv markierte Ligand bindet. Bei Auswertung der Daten mittels iterativer, nichtlinearer Kurvenanpassung ergaben sich für die maximale Rezeptordichte (B_{max}) und Dissoziationskonstante (K_D) gleiche Werte wie mit der Methode nach Scatchard.

Der Mittelwert aus 50 unabhängigen Experimenten ergab für die ICYP Rezeptorbindung eine B_{max} von 320 ± 20 Bindungsstellen/Zelle und eine K_D von $14,37 \pm 1,66$ pmol/l.

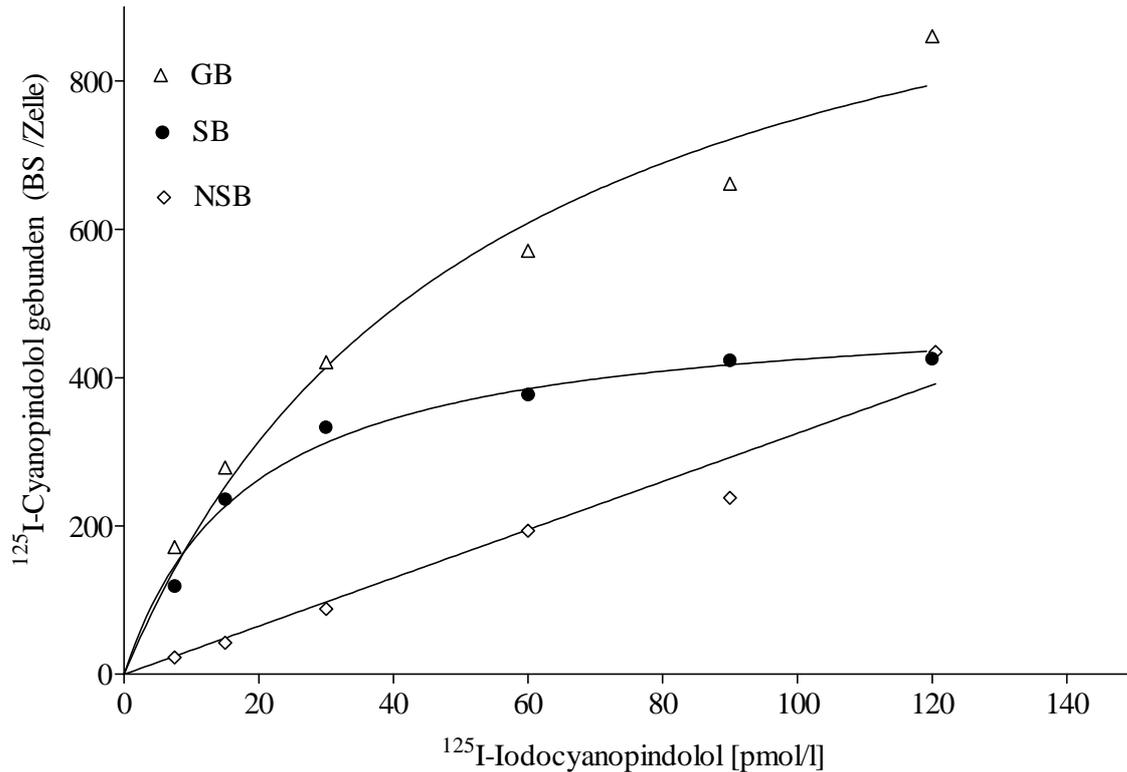


Abb. 14: Repräsentatives konzentrationsabhängiges Bindungsexperiment mit ICYP an Lymphozyten eines Pferdes (Sättigungsexperiment).

Abszisse: Konzentration von freiem ICYP (pmol/l)

Ordinate: Gebundenes ICYP in Bindungsstellen/Zelle (BS/Zelle)

Lymphozyten ($0,75 \times 10^6$ Zellen) wurden mit steigenden Konzentrationen von ICYP (5 - 120 pmol/l) in Abwesenheit (Gesamtbindung; GB) und Anwesenheit von $1 \mu\text{mol/l}$ (\pm)-CGP 12177 (unspezifische Bindung; USB) für 90 min bei 37°C inkubiert (siehe 3.3.2.2.1.). Gesamtbindung und unspezifische Bindung von ICYP nehmen mit steigenden Konzentrationen linear zu, die spezifische Bindung erreicht dagegen eine Sättigung.

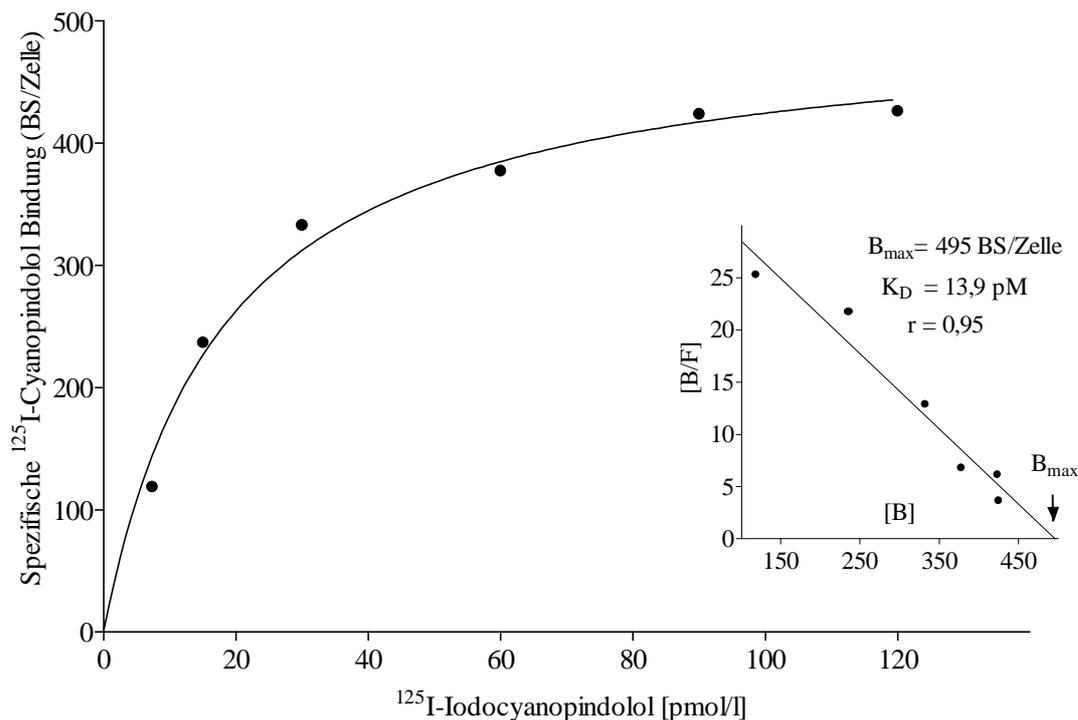


Abb. 15: Spezifische ICYP Bindung und deren Transformation nach Scatchard (1949).

Abszisse: Konzentration von freiem ICYP (pmol/l)

Ordinate: Spezifisch gebundenes ICYP in Bindungsstellen/Zelle (BS/Zelle)

Die spezifische Bindung von ICYP an Pferdelymphozyten, ermittelt durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung, erreicht eine Sättigung.

Inset: Transformation der spezifischen Bindung nach Scatchard (B/F vs. B).

Ordinate: Spezifische Bindung B (Bindungsstelle/Zelle)/Freie ICYP Konzentration F (pmol/l); F = Frei = Total eingesetzte Radioaktivität minus spezifische Bindung; Abszisse: Spezifische Bindung (Bindungsstelle/Zelle).

Der Schnittpunkt der x-Achse entspricht der maximalen Rezeptordichte B_{\max} von 495 Bindungsstellen/Zelle. Die Linearität der Geraden zeigte das Vorhandensein einer homogenen Rezeptorpopulation mit einer Affinität K_D von 13,90 pmol/l (ermittelt aus der Steigung der Geraden).

4. 1. 7. Bestimmung der cAMP-Bildung in Pferdelymphozyten

Unter den molekularen Mechanismen, über die durch Agonisten an β -Adrenozeptoren ihre zelluläre Wirkungen ausgelöst werden, spielt die Aktivierung des in der Zellmembran lokalisierten Adenylatzyklase-Systems eine entscheidende Rolle. Durch den β -Agonisten wird die Adenylatzyklase aktiviert und ATP in 3',5'-cAMP umgewandelt ("second messenger"). Veränderungen der cAMP-Bildung in einer Zelle spiegeln somit das Ausmaß des durch den Agonisten über den adrenergen Rezeptor stimulierten Adenylatzyklase-Systems wieder.

Die cAMP-Bildung in Pferdelymphozyten wurde nach einer dosisabhängigen in vitro Stimulation mit (-)-Isoprenalin, (-)-Adrenalin und (-)-Noradrenalin bestimmt, um zu zeigen, daß die in den Verdrängungsexperimenten zur Charakterisierung der β -Adrenozeptoren verwendeten Agonistliganden auch in der Lage sind, eine zelluläre Antwort hinsichtlich der cAMP-Bildung auszulösen.

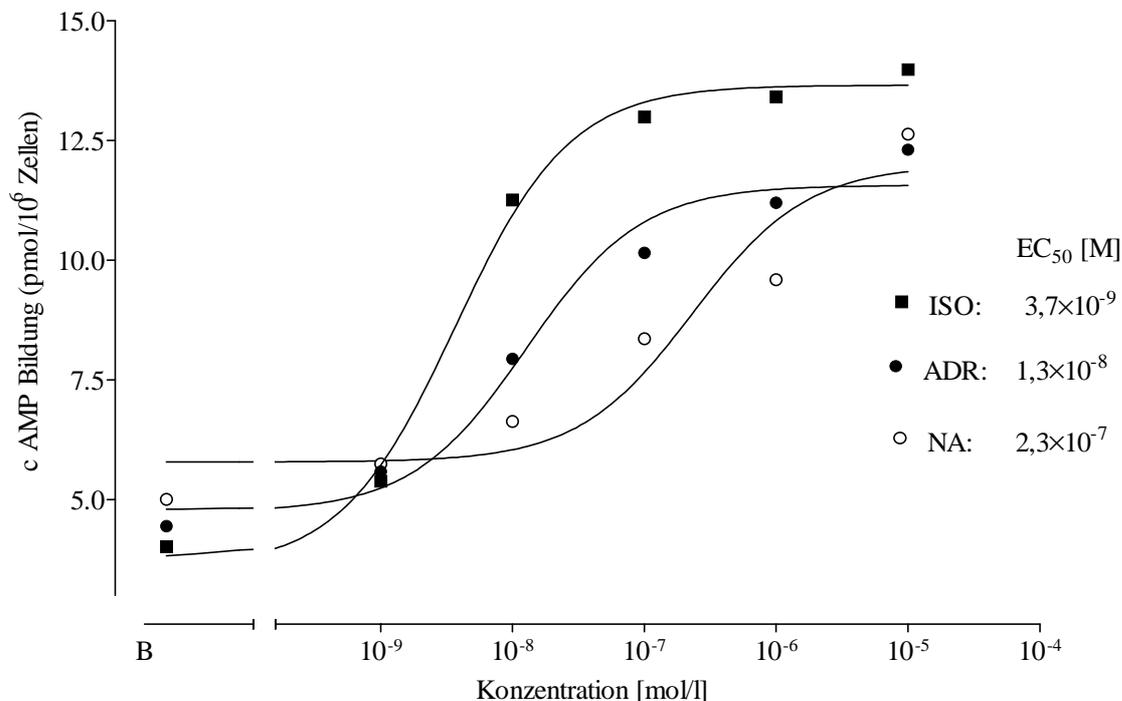


Abb. 16: Konzentrations-Wirkungskurven der cAMP-Bildung in Pferdelymphozyten nach Stimulation mit (-)-Isoprenalin, (-)-Adrenalin und (-)-Noradrenalin.

Lymphozyten (2×10^6 Zellen/Ansatz) wurden entweder in PBS Puffer (zur Bestimmung der basalen cAMP-Bildung = B) oder in Gegenwart von (-)-Isoprenalin, (-)-Adrenalin und (-)-Noradrenalin (10^{-9} bis 10^{-5}) für 15 min inkubiert. Details der Versuchsdurchführung siehe unter 3.3.3.

Die Punkte sind Mittelwerte von drei verschiedenen Experimenten mit jeweils Doppelbestimmung.

Abb. 16 gibt die Konzentrations-Wirkungskurven für die Bildung von cAMP in Lymphozyten nach der Stimulation mit oben genannten Agonisten wieder. Die durch nicht-lineare Regressionsanalyse geschätzten EC_{50} -Werte der Konzentrations-Wirkungskurven von Isoprenalin, Adrenalin und Noradrenalin betragen $3,7 \times 10^{-9}$, $1,3 \times 10^{-8}$ und $2,3 \times 10^{-7}$ mol/l. Diese Wirksamkeitsreihenfolge stimmte gut mit den aus Radioligandbindungsstudien erhaltenen Ergebnissen überein (vgl. Abb. 11); sie unterstütze die Hypothese, daß Pferdelymphozyten überwiegend β_2 -Rezeptoren enthalten.

4. 2. Einfluß von Clenbuterol und Dexamethason auf die Dichte der β_2 -Adrenozeptoren und auf die cAMP-Bildung in Pferdelymphozyten

4. 2. 1. Effekt von Clenbuterol auf die β_2 -Adrenozeptoren und intrazelluläre cAMP-Bildung

Zur Frage der Toleranzentwicklung durch eine Behandlung mit dem β_2 -Sympathomimetikum Clenbuterol sollte untersucht werden, ob die Gabe von Clenbuterol in therapeutischen Dosen ($2 \times 0,8 \mu\text{g/kg/d}$; i. v., für zwölf Tage) zu einer Änderung der β -Adrenozeptordichte oder -affinität und des Isoprenalin-induzierten Anstiegs des intrazellulären cAMP-Gehaltes in den Lymphozyten führt. Von allen Versuchstieren wurden die Ausgangswerte der β_2 -Adrenozeptoren in den Lymphozyten hinsichtlich der maximalen Bindungskapazität (B_{max}) und

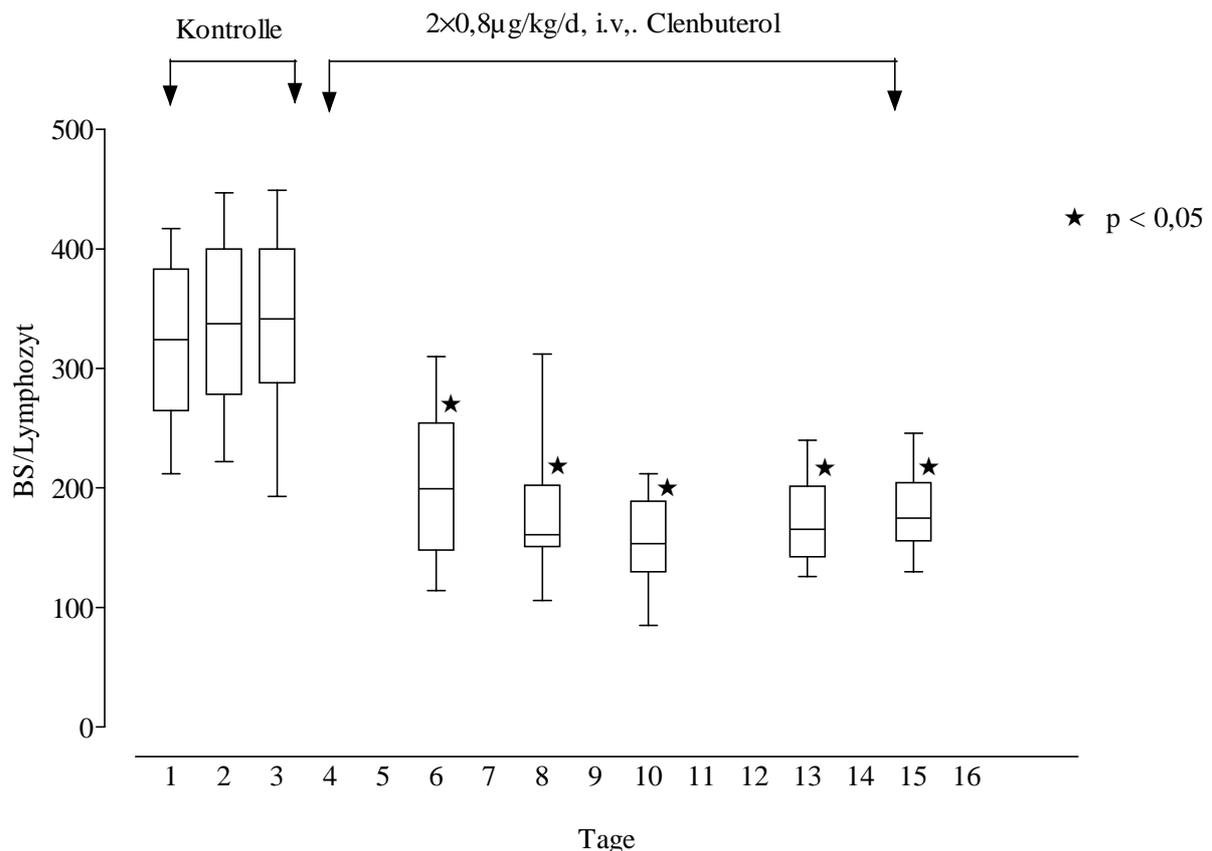


Abb. 17: Einfluß von Clenbuterol auf die β_2 -Adrenozeptorenzahl von Pferdelymphozyten.

Abszisse: Versuchstage

Ordinate: β_2 -Adrenozeptorenzahl an Lymphozyten als spezifische ICYP Bindungsstellen (BS)/Zelle

Dargestellt sind Daten innerhalb einer Datenreihe im Boxplot mit 75/25-Perzentilen und Min/Max-Werten von jeweils 8 Versuchstieren. Medianwerte sind durch Striche gekennzeichnet.* signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) im Vergleich zu den Werten vor Clenbuterolgabe ($n=8$)

der Dissoziationskonstanten (K_D) bzw. der cAMP-Bildung vor der Clenbuterolbehandlung bestimmt. Die mittlere β_2 -Adrenozeptordichte der zwölf Pferde betrug 320 ± 20 (Mittelwert \pm SEM) spezifische ICYP Bindungsstellen/Zelle (zwischen 200-500 BS/Zelle). Der K_D -Wert der ICYP Bindung lag bei $14,37 \pm 1,66$ pmol/l (Mittelwert \pm SEM) (Messungen aus 50 Experimenten an 12 Tieren).

Die Abb. 17 zeigt, daß die spezifischen Bindungsstellen/Lymphozyt gegenüber den Ausgangswerten in der Kontrollphase bereits 48 Stunden nach der Clenbuterolbehandlung signifikant ($p < 0,05$, $n=8$) um etwa 30-40 % abnahmen.

Parallel zur β -Adrenozeptordichte nahm auch der durch $10 \mu\text{mol/l}$ (-)-Isoprenalin-induzierte Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehaltes signifikant ($p < 0,05$, $n=4$) ab (Abb. 18). Im weiteren Verlauf der Behandlung blieben beide Parameter auf diesem niedrigen Niveau. Die Abbildungen 17 und 18 zeigen eine tendenzielle weitere Abnahme bis zu maximal ca. 50%iger Reduktion am 10. Tag und anschließend eine leichte Wiedererholung, jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungstagen.

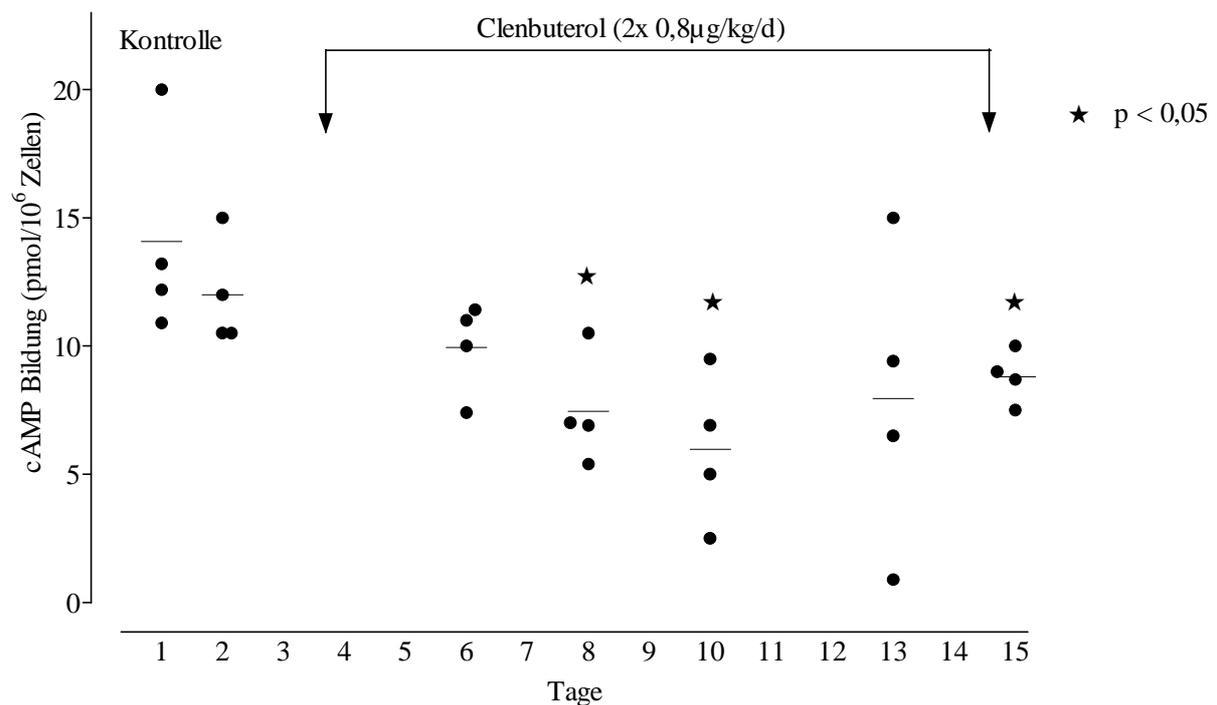


Abb. 18: Einfluß von Clenbuterol auf die lymphozytäre cAMP-Bildung.

Abszisse: Versuchstage

Ordinate: Der durch $10 \mu\text{mol/l}$ (-)-Isoprenalin-induzierte Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehaltes in pmol/10⁶ Zellen

Dargestellt sind im Streudiagramm einzelne Werte der jeweiligen Versuchstage und Versuchstiere. Striche kennzeichnen den Medianwert aller Einzelwerte.

*signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) im Vergleich zu den Werten vor Clenbuterolgabe ($n=4$)

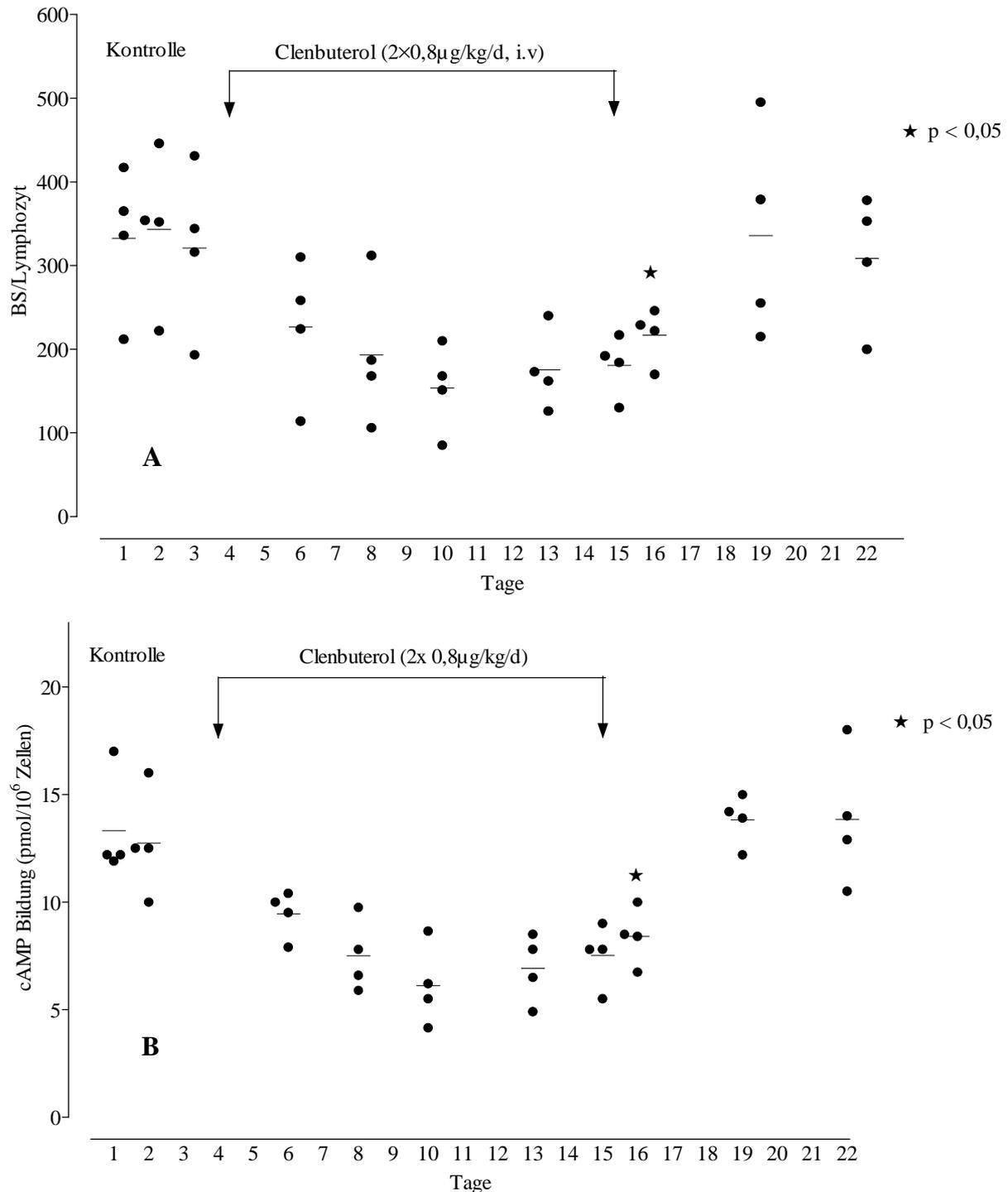


Abb. 19: Zeitabhängigkeit der Abnahme und der Erholung der β -Adrenozeptoren (A) und der cAMP-Bildung (B) in Pferdelymphozyten vor, während und nach einer Clenbuterolbehandlung.

Abszisse: Versuchstage

Ordinate: β_2 -Adrenozeptorenzahl in den Lymphozyten als spezifische ICYP Bindungsstellen/Zelle (A) und cAMP-Bildung in pmol/10⁶ Zellen

Dargestellt sind im Streudiagramm einzelne Werte der jeweiligen Versuchstage und Versuchstiere. Striche kennzeichnen den Medianwert aller Einzelwerte.

*signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) im Vergleich zu den Werten vor Clenbuterolgabe ($n=4$)

Nach Absetzen der Clenbuterolbehandlung nahmen die β_2 -Adrenozeptorenzahl und der durch 10 $\mu\text{mol/l}$ (-)-Isoprenalin-induzierte Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehaltes nur langsam wieder zu und erreichten vier Tage nach der letzten Clenbuterolgabe wieder ihre Ausgangswerte vor der Behandlung (Abb. 19 A und B).

4. 2. 2. Effekt von Dexamethason auf die Clenbuterol-induzierte Desensibilisierung von β_2 -Adrenozeptoren

Es sollte zunächst untersucht werden, ob die Erholungsphase für die durch eine 12tägige Clenbuterolbehandlung hervorgerufene Abnahme der lymphozytären β_2 -Adrenozeptordichte bzw. des (-)-Isoprenalin-induzierten Anstiegs des intrazellulären cAMP-Gehaltes durch das

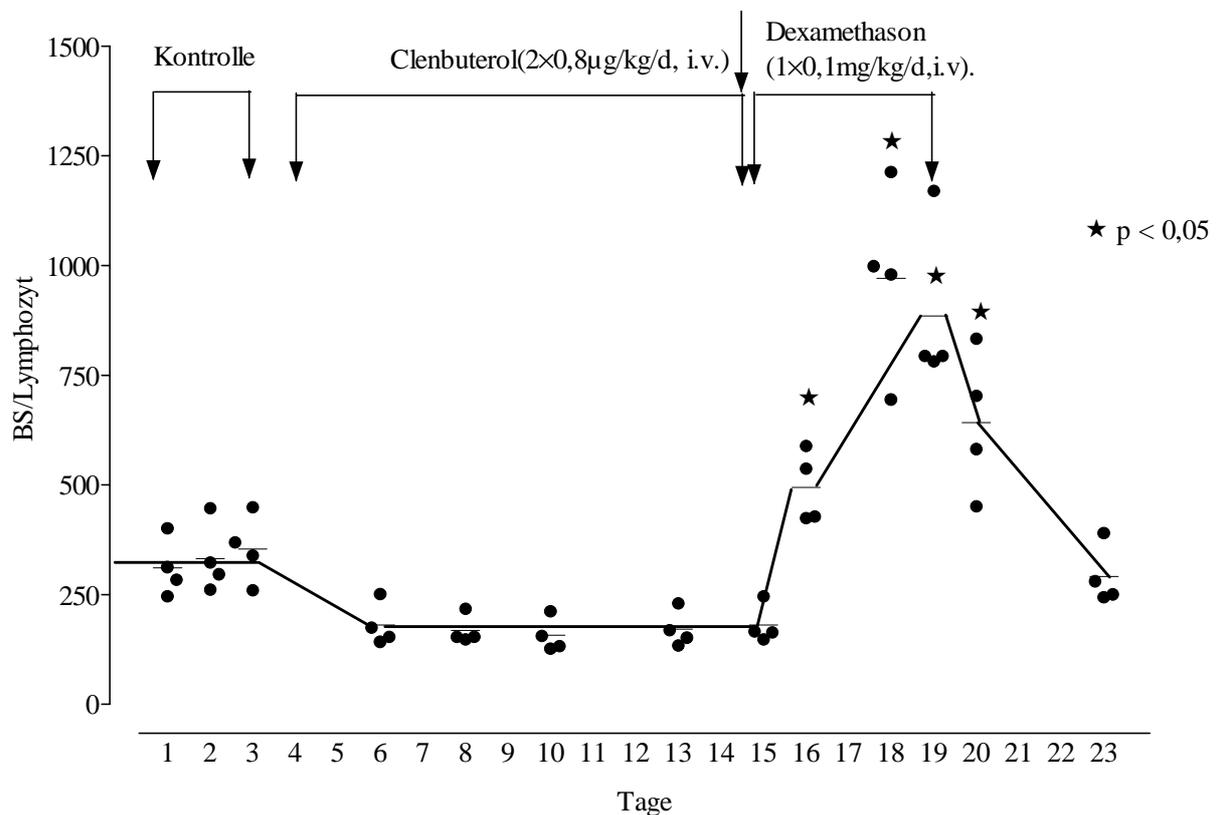


Abb. 20: Veränderungen der β_2 -Adrenozeptordichte von Pferdelymphozyten unter Clenbuterolbehandlung und anschließender Dexamethasongabe.

Abszisse: Versuchstage

Ordinate: Spezifische ICYP Bindungsstellen/Zelle (BS/Zelle)

Dargestellt sind im Streudiagramm einzelne Werte der jeweiligen Versuchstage und Versuchstiere. Striche kennzeichnen den Medianwert aller Einzelwerten.

*signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) im Vergleich zu den Werten während Clenbuterolgabe ($n=4$)

unmittelbar nach der letzten Clenbuteroldosis verabreichtes Glukokortikoid Dexamethason beeinflusst werden kann.

Unter dem Einfluß einer therapeutischen Dosierung von Dexamethason ($1 \times 0,1 \text{ mg/kg/d}$, i. v., für fünf Tage) kam es bereits nach 24 Stunden nach Absetzen von Clenbuterol und einer ersten Dexamethasoninjektion zu einem signifikanten ($p < 0,05$, $n=4$) Wiederanstieg der β -adrenergen Rezeptoren und deren funktioneller Ansprechbarkeit (gemessen an der cAMP-Bildung). Die β -Adrenozeptordichte und der durch $10 \mu\text{mol/l}$ (-)-Isoprenalin-induzierte Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehaltes hatten zu diesem frühen Zeitpunkt bereits wieder Werte erreicht, die sich nicht mehr signifikant von den Ausgangswerten vor Beginn der Behandlung mit Clenbuterol unterschieden (Abb. 20 und 21). Vom dritten Tag bis zum Ende der Dexamethasongabe erhöhte sich die β -Adrenozeptordichte weiter auf das Doppelte des Ausgangswertes.

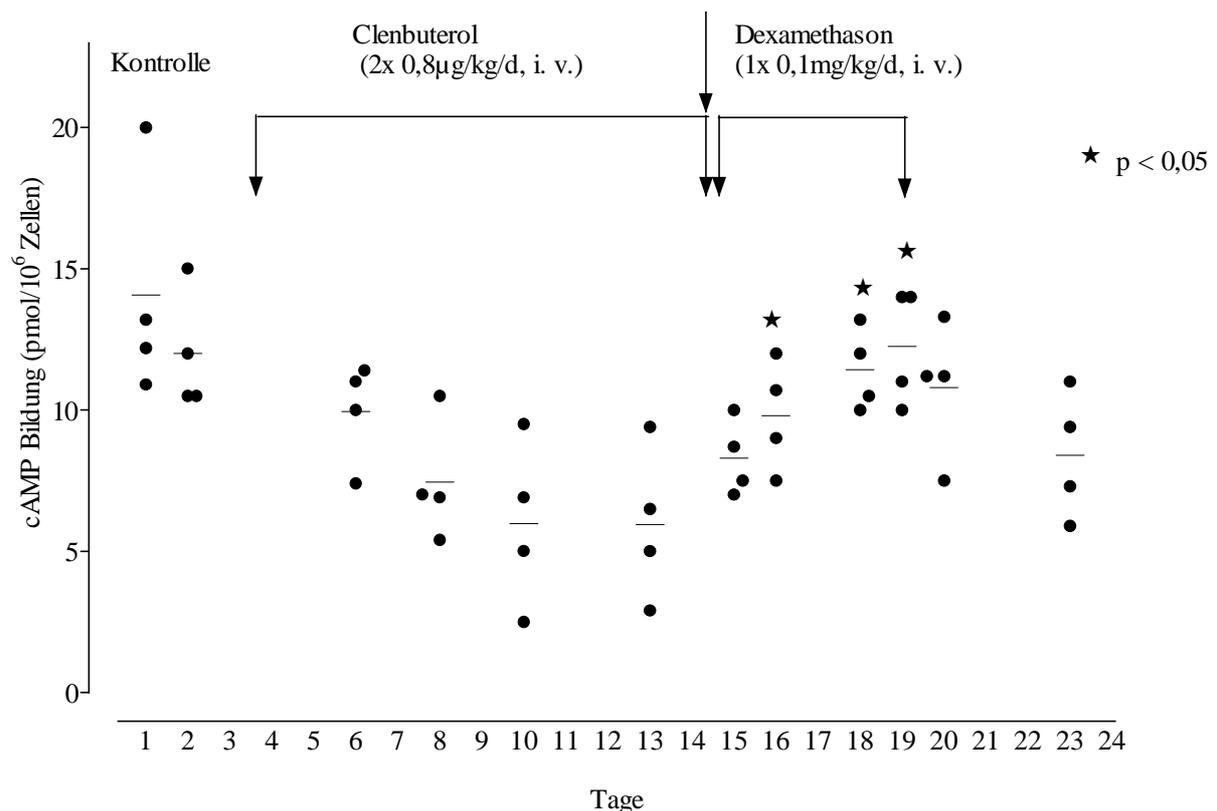


Abb. 21: Einfluß von Dexamethason auf Clenbuterol-induzierte Veränderung der cAMP-Bildung in Pferdelymphozyten.

Abszisse: Versuchstage

Ordinate: der durch $10 \mu\text{mol/l}$ (-)-Isoprenalin-induzierte Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehaltes in $\text{pmol}/10^6$ Zellen

Dargestellt sind im Streudiagramm einzelne Werte der jeweiligen Versuchstage und Versuchstiere. Striche kennzeichnen den Medianwert aller Einzelwerten.

*signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) im Vergleich zu den Werten während Clenbuterolgabe (n=4)

24 Stunden nach dem Absetzen der Dexamethasonbehandlung waren die Dichte der β_2 -Adrenozeptoren und die cAMP-Akkumulation wieder geringfügig gesunken, die Ausgangswerte der Kontrollphase vor der Clenbuterolgabe wurden allerdings erst vier Tage nach der letzten Dexamethasongabe erreicht.

4. 2. 3. Wirkung einer gleichzeitigen Behandlung mit Clenbuterol und Dexamethason auf die β_2 -Adrenozeptorendichte und deren Funktion

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluß einer gleichzeitigen Verabreichung von Clenbuterol und Dexamethason auf die β -Adrenozeptorendichte bzw. deren Ansprechbarkeit in Lymphozyten untersucht. Wie in der Abb. 22 ersichtlich, wurde die desensibilisierende Wirkung von Clenbuterol, die zu einer Abnahme der β -Adrenozeptorendichte und der intrazellulären cAMP-Bildung führt (vgl. Abbildungen 17, 18, 19), durch Dexamethason vollständig verhindert. Vielmehr war die Anzahl der Bindungsstellen, ebenso wie der durch 10 $\mu\text{mol/l}$ Isoprenalin-induzierte Anstieg des cAMP-Gehaltes in Lymphozyten am 3. und 4. Behandlungstag, 24 Stunden nach Gabe beider Substanzen über die Ausgangswerte angestiegen. Die überschießende Zunahme der Rezeptorendichte war trotz eindeutiger Tendenz eines Anstiegs zu keinem Zeitpunkt signifikant ($p=0,068$) unterschiedlich zu den Ausgangswerten vor der Behandlung, während die Stimulierbarkeit der cAMP-Bildung ab dem 2. Tag der gleichzeitigen Behandlung signifikant gesteigert war.

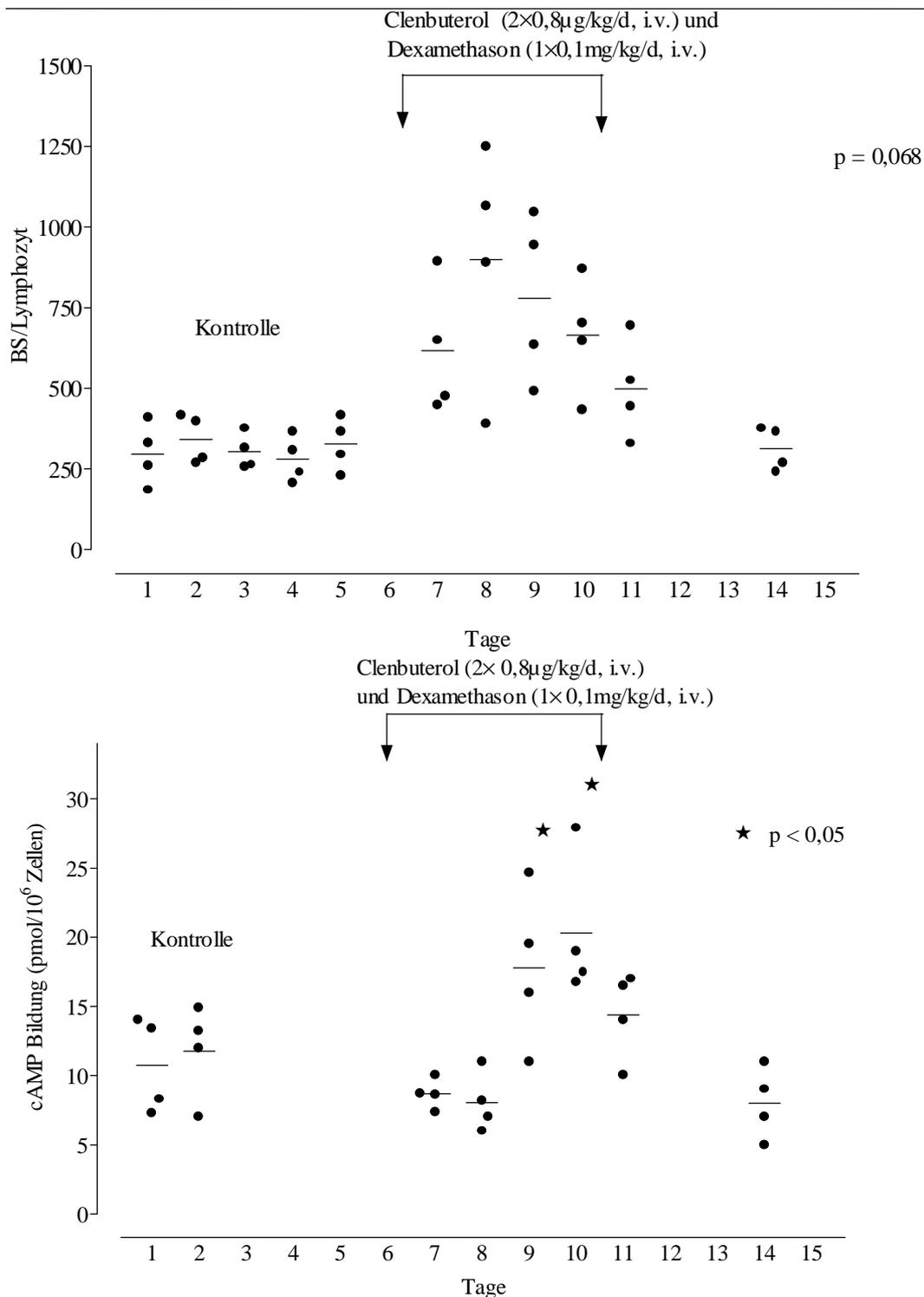


Abb. 22: Veränderungen der β -Adrenozeptordichte (*obere Abb.*) und der cAMP-Bildung (*untere Abb.*) von Pferdelymphozyten unter gleichzeitiger Behandlung mit Clenbuterol und Dexamethason.

Abszisse: Versuchstage; Ordinate: Spezifische ICYP Bindungsstellen/Zelle (BS/Zelle) bzw. cAMP-Gehalt in pmol/10⁶ Zellen

Dargestellt sind im Streudiagramm einzelne Werte der jeweiligen Versuchstage und Versuchstiere. Striche kennzeichnen den Medianwert aller Einzelwerten.

*signifikant unterschiedlich (p < 0,05) im Vergleich zu den Werten vor gleichzeitiger Gabe von Clenbuterol und Dexamethason (n=4)

4. 3. Dissoziationskonstante (K_D) der ICYP Bindung an β -Adrenozeptoren von Pferdelymphozyten

Für die Affinität der ICYP-Bindung an β_2 -Adrenozeptoren ergab sich in allen Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied (Abb. 23). Sie betrug bei unbehandelten Tieren $14,37 \pm 1,66$ pmol/l, während der Clenbuterolbehandlung $12,77 \pm 5,10$ pmol/l, während der nachfolgenden

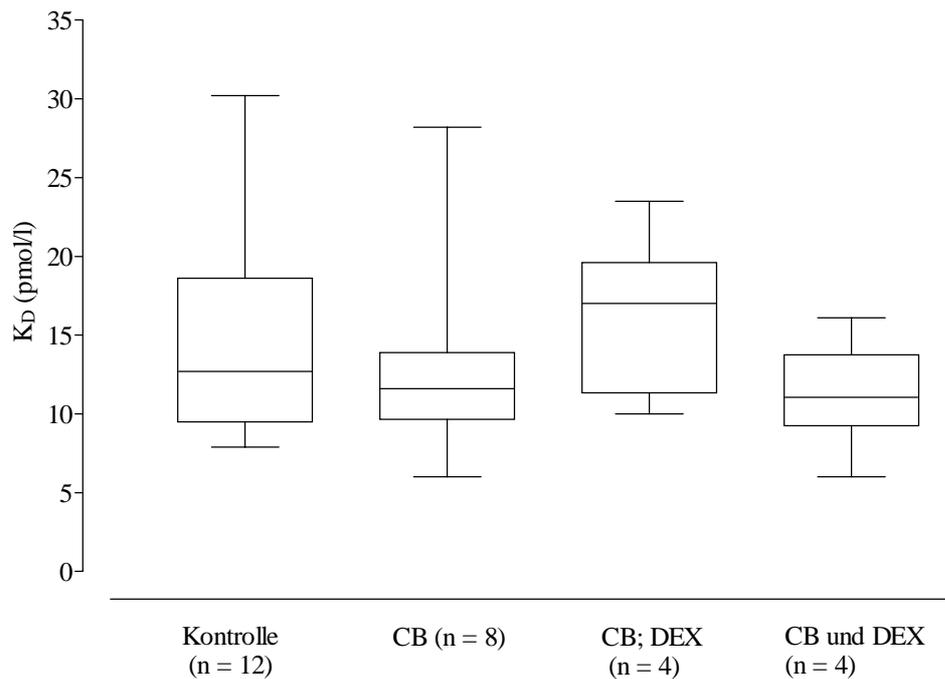


Abb. 23: Dissoziationskonstante (K_D) der ICYP-Bindung an β -Adrenozeptoren von Pferdelymphozyten.

Dargestellt sind Daten innerhalb einer Datenreihe im Boxplot mit 75/25-Perzentilen und Min/Max-Werten von den jeweiligen Versuchsgruppen. Medianwerte sind durch Striche gekennzeichnet.

Dexamethasongabe unmittelbar nach dem Absetzen der Clenbuterolbehandlung $16,33 \pm 4,70$ pmol/l und nach der Kombinationstherapie mit Clenbuterol und Dexamethason $11,44 \pm 2,67$ pmol/l.

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden das Vorkommen von β -Adrenozeptoren mittels Radioligandbindungsstudien mit dem radioaktiv markierten Antagonistliganden ICYP und deren funktionelle Ansprechbarkeit durch Bestimmung der intrazellulären cAMP-Bildung mit Hilfe eines Radioimmunoassays (RIA) an intakten Lymphozyten klinisch gesunder Pferde untersucht. Weiterhin wurde der Einfluß einer wiederholten Behandlung der Pferde mit dem β_2 -selektiven Agonisten Clenbuterol und dem Glukokortikoid Dexamethason auf die Zahl der lymphozytären β_2 -Adrenozeptoren und den Isoprenalin-induzierten Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehaltes verfolgt.

5.1. Identifizierung und Charakterisierung der ICYP Bindung an intakten Pferdelymphozyten

5.1.1. Unspezifische Bindung

Ein Problem von Rezeptorbindungsstudien zur Bestimmung der maximalen Rezeptordichte (B_{max}) und der Dissoziationskonstante (Affinität des Rezeptors zum Radioliganden, K_D) besteht darin, daß die radioaktiv markierten Liganden (Tab. 4) nicht ausschließlich spezifisch an den Rezeptor, sondern auch an andere Bestandteile der Zellmembran oder, nach Aufnahme in die Zelle, an intrazelluläre Strukturen sowie an Material, wie Filter, unspezifisch binden können. Bis heute existiert keine exakte einheitliche Definition der unspezifischen Bindung. Die verbreitete Definition der unspezifischen Bindung des Radioliganden, als derjenige Anteil, der durch Zugabe überschüssiger Konzentrationen eines nicht radioaktiv markierten Agonist- oder Antagonistliganden (als Kompetitor) nicht verdrängt werden kann, ist häufig ungenau. So kann es entweder zu einer Überschätzung oder Unterschätzung der hochaffinen Rezeptorenzahl oder aber auch zu Ergebnissen in Form eines kurvilinearen Scatchard-Plots kommen, aus dem gefolgert wird, daß eine negative Kooperativität oder mehrere Bindungsstellen existieren (Krawietz et al., 1979). Negative Kooperativität bedeutet, daß durch zunehmende Besetzung eines Rezeptors durch steigende Konzentration eines Radioliganden dieser in höheren Konzentrationen nicht mehr so gut gebunden wird, so daß die Affinität des Liganden zum Rezeptor mit steigender Konzentration abnimmt. Aus diesen Gründen ist eine möglichst genaue Unterscheidung zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung erforderlich. Cuatrecasas (1974) fand z.B. eine spezifische, hochaffine und sättigbare

Bindung für ^{125}I -Insulin an Talkum. Obwohl diese Bindung zum Teil identische Eigenschaften wie die spezifische Bindung (Stereoselektivität, Sättigbarkeit, Reversibilität, hohe Affinität, Spezifität) aufwies, ist sie als unspezifische Bindung zu bezeichnen, da keine biologische Aktivität an dieser "Ligand-Rezeptor-Bindung" nachgewiesen werden konnte (Randall et al., 1977). An Filtermaterial gebundenes iodmarkiertes Glukagon kann durch Glukagon verdrängt werden (Rodbell et al., 1971). Diese Bindung ist definitionsgemäß unspezifisch, obwohl sie Charakteristika einer spezifischen Bindung besitzt.

In früheren Publikationen zu β -Adrenozeptoren wurden beträchtliche Unterschiede sowohl in der Anzahl der Rezeptoren als auch hinsichtlich der Affinität der Ligandenbindungsstellen berichtet. Es ist anzunehmen, daß eine nicht korrekte Definition des unspezifischen Anteils einer Radioligandbindung an verschiedenen Geweben einschließlich Zellmembranen und intakten Zellen, als eine Ursache hierfür in Frage kommt. Williams et al. (1976) bestimmten z.B. bei Bindungsversuchen mit $[^3\text{H}]$ -Alprenolol an Membranpräparationen von Lymphozyten den nicht Rezeptor-gebundenen Anteil in Anwesenheit von $10\ \mu\text{mol/l}$ (\pm)-Propranolol. Die spezifische Bindung entsprach dabei trotz der höheren Konzentration von Propranolol den Charakteristika der β -Adrenozeptoren. Die Durchführung von Bindungsstudien an isolierten Membranen ist mit weniger Problemen verbunden als an intakten Zellen. So ist das Problem bei Bindungsstudien mit lipophilen Radioliganden wie $[^3\text{H}]$ -Dihydroalprenolol (Dulis und Wilson, 1980; Meurs et al., 1982; Marinetti et al., 1983; Galant und Allred, 1981; Staehelin et al., 1983; Cramb, 1986) und $[^{125}\text{I}]$ -Iodocyanopindolol (O'Hara und Brodde, 1984) an intakten Zellen, einschließlich Lymphozyten, die zu hohe unspezifische Bindung, die vermutlich durch eine intrazelluläre Aufnahme des Radioliganden in die Lysosomen bedingt ist. Dadurch kommt es insbesondere bei Verwendung hoher Konzentrationen lipophiler Liganden, wie Propranolol, bei der Ermittlung der unspezifischen Bindung zu einer ungenauen Bestimmung der unspezifischen Bindung und in der Folge auch der spezifischen Bindung. Von diesen Autoren wurde als Möglichkeit zur Verminderung der intrazellulären Aufnahme der Zusatz von lysosomotropen Aminen, wie Phentolamin oder Chloroquin, vorgeschlagen, wodurch die spezifische Bindung nicht beeinflußt wird. Ein weitere Möglichkeit zur Vermeidung unspezifischer intrazellulärer Bindung ist die Verwendung hydrophiler β -Adrenozeptoragonisten, wie Isoprenalin, oder nicht selektiver β -Adrenozeptorantagonisten, wie (\pm)-CGP 12177, zur Ermittlung der unspezifischen Bindung (Sandnes et al., 1987), da sie von den Zellen nicht aufgenommen werden und so lediglich den spezifisch gebundenen Anteil des Radioliganden von der Zelloberfläche verdrängen. Bei Rezeptorbestimmungen in

Gegenwart solcher hydrophiler Liganden lagen die Anzahl spezifischer Bindungsstellen/Zelle bei etwa 500 bis 3000, unabhängig vom verwendeten Radioliganden, und der Anteil der unspezifischen Bindung im Bereich der K_D bei 10 bis 20 %.

Um die genannten experimentellen Probleme bei der Bestimmung der unspezifischen Bindung zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit zuerst diejenige Konzentration an unmarkierten Liganden bestimmt, die den Radioliganden aus der spezifischen Bindung vollständig, nicht aber aus der unspezifischen Bindung verdrängt. Hierzu wurde die konzentrationsabhängige Hemmung der Bindung von ICYP durch den unmarkierten nichtselektiven β -Adrenozeptorantagonisten (\pm)-CGP 12177 und den β -Adrenozeptoragonisten (-)-Isoprenalin ermittelt. Bei einer Konzentration von 0,3 $\mu\text{mol/l}$ verdrängte (\pm)-CGP 12177 das ICYP nahezu vollständig aus seiner spezifischen Bindung, wobei die Verdrängungskurve steil monophasisch verlief und ein Plateau zwischen 1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$ erreicht wurde (Abb. 8). Wegen des im Vergleich hierzu flachen und biphasischen Verlaufs der Verdrängungskurven von (-)-Isoprenalin wurde eine vergleichbare maximale Hemmung der Bindung von ICYP bei 100 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt (Abb. 8). (\pm)-CGP 12177 erwies sich somit für die Bestimmung der unspezifischen Bindung unter den verwendeten Bedingungen als geeignet und es wurde die in Gegenwart von 1 $\mu\text{mol/l}$ (\pm)-CGP 12177 routinemäßig gemessene Bindung von ICYP in allen Bindungsexperimenten dieser Arbeit als unspezifisch gebunden betrachtet. Um eine eventuelle zelluläre Anreicherung des Radioliganden ICYP zu minimieren, wurde Phentolamin, einem α -Rezeptorblocker, bei jedem Versuch der Rezeptorbestimmung zugesetzt (O'Hara und Brodde, 1984; Brodde et al., 1987c; Brodde, 1997, persönliche Mitteilung).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Befunde über die unspezifische Bindung von ICYP an Pferdelymphozyten stimmen mit den Ergebnissen von Untersuchungen überein, in denen die unspezifische Bindung von ICYP an intakten menschlichen mononukleären Leukozyten bei einer Konzentration von 0,3 $\mu\text{mol/l}$ (Sandnes et al., 1987) und 1 $\mu\text{mol/l}$ (\pm)-CGP 12177 (Brodde et al., 1985a) bestimmt wurde. Im Gegensatz zu Sandnes et al. (1987) wurde in der vorliegenden Arbeit eine monophasisch verlaufende (\pm)-CGP 12177-Verdrängungskurve festgestellt (siehe Abb. 8). Möglicherweise beruht dies darauf, daß die Einstellung des Gleichgewichtes bei 37 °C und 90 min erfolgte, während Sandnes et al. (1987) Bindungsstudien für 2 Stunden bei 32 °C durchführten. Im Einklang mit Untersuchungen an intakten menschlichen Leukozyten (Galant und Allred, 1981; Meurs et al., 1982; O'Hara und Brodde, 1984) wurde die spezifische ICYP Bindung an Pferdelymphozyten durch den Zusatz

von Phentolamin nicht beeinflusst. Der Mechanismus der Phentolaminwirkung ist bislang nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, daß das Phentolamin durch Verminderung des pH-Gradienten zwischen dem Medium und den Lysosomen in der Zelle, analog zu Chloroquin (Dulis und Wilson, 1980; Marinetti et al., 1983), die intrazelluläre Aufnahme des Radioliganden in die Lysosomen reduziert. Unter diesen Bedingungen erfüllte die spezifische Bindung von ICYP an Pferdelymphozyten die erwarteten Kriterien für β -Adrenozeptoren.

5.1.2. Sättigbarkeit

Als wichtige Charakteristika der Bindung von Liganden an β -Adrenozeptoren in Pferdelymphozyten wurde das Verhalten der spezifischen ICYP Bindung hinsichtlich Sättigbarkeit, Reversibilität und Geschwindigkeit verfolgt sowie die Affinitätskonstante und die maximale Anzahl der β -Adrenozeptoren/Lymphozyt bestimmt. Die spezifische Bindung von ICYP (siehe Abb.14, 15), war rasch, sättigbar, reversibel und von hoher Affinität. Sie zeigte in Übereinstimmung mit den Befunden von Brodde et al. (1981), wie auch von Sandnes et al. (1984) bei Konzentrationen von ungefähr 60 bis 120 pmol/l ICYP ein Sättigungsverhalten. Ähnliches wurde auch von Krawietz et al. (1982) und Reinhardt et al. (1983) für intakte menschliche Lymphozyten berichtet. Die Analyse nach Scatchard (1949) ergab für die untersuchte spezifische ICYP Bindung eine linear verlaufende Gerade (siehe Abb. 15, *inset*), die auf Interaktion mit einer homogenen Rezeptorpopulation hindeutet. Aus dem Scatchard-Plot konnten die maximalen spezifischen Bindungsstellen von ICYP pro Lymphozyt für gesunde, unbehandelte Pferde mit 320 ± 20 ICYP Bindungsstellen/Zelle (Mittelwert \pm SEM, n=12) berechnet werden. Identische Daten wurden mit der iterativen, nicht-linearen Regressionsanalyse erhalten. Die Anzahl der ICYP Bindungsstellen/Lymphozyt (zwischen 200-500) lag unter der menschlicher Lymphozyten (etwa 1000 Bindungsstellen/Zelle; Brodde und Wang, 1988b) und boviner Lymphozyten (etwa 700 Bindungsstellen/Zelle; Vermeir et al., 1993). Die Bindungseigenschaften des Radioliganden an β -Adrenozeptoren der Pferdelymphozyten war vergleichbar zu den in verschiedenen Organen und Zellen unterschiedlicher Spezies erhaltenen Dissoziationskonstanten (K_D) für ICYP. Die mit Hilfe der iterativen, nichtlinearen Regressionsanalyse bzw. der Scatchard-Analyse berechnete Dissoziationskonstante für ICYP betrug in Pferdelymphozyten $14,37 \pm 1,66$ pmol/l. Dieser K_D -Wert liegt im gleichen Bereich wie die von Brodde et al. (1986b) am Herzgewebe des Menschen mit 20,0 pmol/l, von Engel et al. (1981) an

Lungenmembranen von Meerschweinchen mit 27 pmol/l und von Brodde et al. (1985a) an intakten menschlichen Lymphozyten mit 19,7 pmol/l ermittelten Werte.

5.1.3. Stereoselektivität

Die Stereoselektivität ist ein weiteres wichtiges Kriterium bei der Identifizierung einer Bindungsstelle als adrenerger Rezeptor (Minneman und Molinoff, 1980). Aus pharmakodynamischen Studien und Bindungsstudien ist bekannt, daß die biologisch aktiven (-)-Enantiomere der Agonisten und Antagonisten eine ca. 10-100fach höhere Affinität zu β -Adrenozeptoren und eine ebenfalls 10-100fach höhere physiologische Wirksamkeit als (+)-Enantiomere haben (Lefkowitz et al., 1974; Galant und Allred, 1981; Krawietz et al., 1982; Sandnes et al., 1987).

Die Stereoselektivität wurde mit den Stereoisomeren (+/-) des nicht selektiven β -Adrenozeptorantagonisten Propranolol als Kompetitor überprüft. Propranolol hemmte die Bindung von ICYP mit steilem monophasischem Verlauf der Verdrängungskurve und einem Hill-Koeffizienten von 0,87. Die Affinität von (-)-Propranolol war etwa 40 mal höher als die von (+)-Propranolol (Tabelle 7). Die Verdrängungskurven in Anwesenheit von (-)- und (+)-Propranolol belegen, daß die Bindung von ICYP an intakte Pferdelymphozyten eindeutig stereoselektiv ist. Bis zu einer Konzentration von $< 10^{-6}$ mol/l wurde die Bindung von ICYP durch (-)- und (+)-Propranolol stereospezifisch gehemmt, während bei Konzentrationen über 10^{-6} mol/l die Stereoselektivität nicht mehr nachweisbar war. Dies ist damit zu erklären, daß Propranolol in dieser Konzentration ICYP unspezifisch aus nicht aus β -Adrenozeptorbestehenden Bindungsstellen verdrängt.

Vermeir et al. (1993) konnten ebenfalls bei Verdrängungsversuchen mit Propranolol an intakten bovinen mononukleären Leukozyten eine gleiche Stereoselektivität und Affinität feststellen. (-)-Propranolol war in dieser Untersuchung 23-fach stärker wirksam als das (+)-Propranolol, wobei hier als Radioligand der β -Adrenozeptorantagonist [3 H]-CGP-12177 verwendet wurde.

5.1.4. Subtypisierung

Als weitere Charakterisierung der durch ICYP erfaßbaren spezifischen Bindungsstellen war es erforderlich, die an Pferdelymphozyten vorkommenden β -Adrenozeptoren zu subklassifizieren, da der verwendete Radioligand ICYP eine Affinität zu β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren besitzt (Engel et al., 1981; Hoyer et al., 1981). Hierfür wurde in der vorliegenden Arbeit die Interaktion verschiedener β -Adrenozeptoragonisten und -antagonisten mit dem Radioliganden ICYP bestimmt. Die Agonistliganden hemmten die Bindung von ICYP bzw. stimulierten die cAMP-Akkumulation in der Rangfolge der Wirkungsstärke für β_2 -Adrenozeptoren: Isoprenalin > Adrenalin > Noradrenalin (siehe Abb. 11 und 16, Tab. 7). Folglich gehört der β -Adrenozeptor an Pferdelymphozyten in erster Linie zum β_2 -Subtyp, in Übereinstimmung mit der ursprünglich vorgeschlagenen Klassifizierung der β -Adrenozeptoren von Lands et al. (1967).

Die Verdrängungskurven der Agonistliganden, insbesondere von Isoprenalin und Adrenalin, zeigten einen flachen und biphasischen Verlauf, der darauf hinweist, daß sich die β -Adrenozeptoren in zwei Affinitätszuständen - einem hochaffinen und einem niederaffinen - befinden. Deren Pseudo-Hill-Koeffizienten lagen zwischen 0,4 und 0,5, und der Anteil des Rezeptors im hochaffinen Zustand betrug zwischen 40 und 50 % (siehe Abb. 11, 12 und 13). In Gegenwart GTP wurde auf Grund einer erniedrigten Bindungsaffinität der Agonistliganden zum Rezeptor eine Rechtsverschiebung der Kompetitionskurven mit steilem Verlauf festgestellt (Abb. 12 und 13); die Verdrängung von ICYP war durch einem Hill-Koeffizienten von $\sim 1,0$ gekennzeichnet. Durch den Zusatz von GTP zum Bindungsassay wurde weder die Bindung von ICYP noch die Form der Verdrängungskurve von Antagonistliganden beeinflusst, da nur Agonisten, nicht aber Antagonisten, einen Komplex mit β -Adrenozeptoren im hochaffinen Zustand bilden, der durch GTP beeinflusst werden kann.

Eine mögliche Erklärung für die biphasisch verlaufenden Verdrängungskurven der Agonistliganden (insbesondere von Isoprenalin und Adrenalin) könnte eine negative Kooperativität zwischen den Rezeptorbindungsstellen sein. Würde eine solche Agonist-induzierte negative Kooperativität vorliegen, so wäre zu erwarten, daß die Hill-Koeffizienten der Verdrängungskurven in Anwesenheit von GTP, das keine Affinität zu β -Adrenozeptoren besitzt, ebenfalls zwischen 0,4 und 0,5 liegen. Da jedoch nach Zusatz von GTP die flach verlaufenden Verdrängungskurven einen Pseudo-Hill-Koeffizienten von $\sim 1,0$ aufweisen und somit unter diesen Versuchsbedingungen eine negative Kooperativität nicht nachweisbar war,

kann diese als Erklärung für den biphasischen Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurven von Agonistliganden (Isoprenalin, Adrenalin) ausgeschlossen werden.

Der hochaffine Zustand ist charakterisiert durch die Bildung eines Komplexes zwischen Agonist, Rezeptor und Guaninnukleotid-bindendem Protein (G-Seite) (Hoffman und Lefkowitz, 1980; De Lean et al., 1980). Dieser wird in Gegenwart von GTP durch eine Interaktion mit der G-Seite, die in Verbindung mit dem Adenylatzyklase-System steht, destabilisiert. Die Überführung der β -Adrenozeptoren vom hochaffinen in den niederaffinen Zustand erfolgt durch die Dissoziation von Agonist-Rezeptor-Komplex und G-Seite, die von einer Aktivierung der membrangebundenen Adenylatzyklase begleitet wird (Limbird, 1981; Gilman, 1984).

In Bindungsstudien mit Agonistliganden liegen somit zwei Rezeptorzustände vor, deren Übergang vom hochaffinen in den niederaffinen Zustand durch GTP konzentrationsabhängig vermittelt wird (Kent et al., 1980). So konnte auch in den vorliegenden Untersuchungen an Pferdelymphozyten gezeigt werden, daß durch den Zusatz von 100 $\mu\text{mol/l}$ GTP der hochaffine Zustand der Isoprenalin- und Adrenalinbindungskinetik in einen niederaffinen Zustand überführt wird.

Durch die Anwendung selektiver β -Adrenozeptorantagonisten konnten darüber hinaus die β -Adrenozeptorsubtypen an intakten Pferdelymphozyten analysiert werden. Dies erfolgte durch Verdrängung des nicht-selektiven Radioliganden ICYP durch den nicht radioaktiv markierten β_1 -selektiven Adrenozeptorantagonisten CGP 20712A bzw. dem β_2 -selektiven Adrenozeptorantagonisten ICI 118,551. Aufgrund der aus den Verdrängungskurven ermittelten K_I -Werte einer 50%igen Hemmung, läßt sich für die verwendeten Antagonisten ableiten, daß der β_2 -selektive Adrenozeptorantagonist ICI 118,551 das ICYP über 1500 mal stärker als der β_1 -selektive Adrenozeptorantagonist CGP 20712A aus seiner Bindung verdrängen kann. Die hier ermittelten K_I -Werte für ICI 118,551 von 1,25 nmol/l und CGP 20712A von etwa 18 $\mu\text{mol/l}$ (Tabelle 7) stimmen mit den in anderen Untersuchungen für beide Antagonisten ermittelten Werten an β_2 -Adrenozeptoren überein (Bilski et al., 1983; Del Monte et al., 1993). Die sehr unterschiedlichen K_I -Werte belegen nahezu eine homogene Population von β_2 -Adrenozeptoren auf Pferdelymphozyten. Allerdings kann ein geringer Anteil an β_1 -Adrenozeptoren von 5-10 % nicht ausgeschlossen werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch an menschlichen Lymphozyten erhalten, die eine homogene Population von β_2 -Adrenozeptoren (100%) enthalten (Brodde et al., 1981; Motulsky und Insel 1982; Haen et al., 1992), während Odore et al. (1999) und Borgarelli et al. (1999) an Lymphozyten gesunder

Hunde nur ein Verhältnis der β_1 - zu β_2 -Adrenozeptoren von 40:60 feststellen konnten. Ein Vergleich der Ergebnisse an Pferdelymphozyten mit denen anderer Studien ist jedoch nur eingeschränkt möglich, da die Charakterisierung der β -Adrenozeptoren mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt wurde.

5.2. Einfluß von Arzneimitteln (Clenbuterol, Dexamethason) auf die Regulation von β -Adrenozeptoren und deren Ansprechbarkeit in Pferdelymphozyten

Zahlreiche in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen haben gezeigt, daß die wiederholte Applikation von β_2 -Adrenozeptoragonisten zu einer Verminderung der Anzahl der β_2 -Adrenozeptoren auf peripheren Leukozyten sowohl bei gesunden als auch asthmakranken Menschen führt (Galant et al., 1978; Brodde et al., 1987b; Brodde und Wang, 1988a). Es gibt jedoch bislang keine derartigen Studien beim Pferd, die die Veränderungen lymphozytärer β -Adrenozeptoren und unter dem Einfluß von β_2 -Agonisten und anderen Pharmaka belegen.

β -adrenerge Agonisten und Glukokortikoide sind die wirksamsten und am häufigsten verwendeten Arzneimittel zur Behandlung der COB bzw. COPD des Pferdes (Ungemach, 1999) und des Asthma bronchiale des Menschen (Barnes, 1995). In der Humanmedizin werden sie meist in Kombination eingesetzt.

5.2.1. Einfluß von Clenbuterol

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Behandlung klinisch gesunder Pferde mit dem β_2 -selektiven Agonisten Clenbuterol bei empfohlener therapeutischer Dosis ($2 \times 0,8 \mu\text{g/kg/d}$) zu einer Abnahme der Dichte der lymphozytären β_2 -Adrenozeptoren um etwa 30 - 40 % führte (siehe Abb. 17 und 18). Dies wurde bereits 48 Stunden nach Beginn der Clenbuterolapplikation beobachtet, und dieser Abfall blieb während des gesamten weiteren Behandlungszeitraums mit Clenbuterol erhalten. Der gleichzeitig durch $10 \mu\text{mol/l}$ Isoprenalin-induzierte Anstieg der cAMP-Bildung in den Lymphozyten und damit die zelluläre Antwort auf eine β_2 -Adrenozeptorstimulation war ebenfalls verringert (siehe Abb. 18). Nach dem Absetzen von Clenbuterol kam es zu einer langsamen Wiederherstellung der β_2 -Adrenozeptordichte und ihrer Ansprechbarkeit. Einen Tag nach dem Absetzen dieser Behandlung lagen die Dichte der β_2 -Adrenozeptoren und deren Ansprechbarkeit noch signifikant unter den Durchschnittswerten vor Behandlungsbeginn. Die Ausgangswerte

wurden erst ab dem vierten Tag wieder erreicht. Diese Befunde belegen, daß die Applikation von Clenbuterol beim Pferd zur Desensibilisierung und Down-Regulation von lymphozytären β_2 -Adrenozeptoren führt, die sowohl vom Umfang als auch vom Zeitverlauf her vergleichbar zu in-vivo-Befunden bei Menschen sind, die mit anderen β_2 -Agonisten behandelt wurden. Wiederholte Verabreichung von β -Agonisten oder langfristige Katecholamin-Infusionen führten sowohl bei gesunden Menschen als auch bei Asthmatikern zu einer etwa 40 - 50%igen Abnahme der lymphozytären β_2 -Adrenozeptordichte und der Isoprenalin-induzierten cAMP-Bildung (Greenacre et al., 1978; Borst et al. 1990; Brodde et al., 1985a und 1992). Die mehrtägige Erholungszeit der β_2 -Adrenozeptoren nach dem Absetzen von Clenbuterol bestätigt die Befunde der vorgenannten und anderer Arbeitsgruppen (Hui et al., 1982; Aarons et al., 1983; Reinhardt et al., 1983; Maisel et al., 1987), die feststellten, daß die Erholungsphase von einer Desensibilisierung der lymphozytären β_2 -Adrenozeptoren nach Langzeitbehandlung von unterschiedlichen Probanden mit dem β_2 -Agonisten Terbutalin erst etwa eine Woche nach dem Absetzen der Behandlung abgeschlossen war.

In Studien an menschlichen Lymphozytenmodellen konnte auch mit anderen Subtyp-selektiven Agonisten gezeigt werden, daß in Übereinstimmung mit den Befunden der vorliegenden Arbeit Procaterol als β_2 -selektiver Agonist zu einer Verminderung der lymphozytären β_2 -Adrenozeptordichte und der cAMP-Bildung führte und daß auch in vivo β_2 -Adrenozeptor-vermittelte physiologische Funktionen beeinflußt wurden, während kein Einfluß auf β_1 -Adrenozeptor-vermittelte Effekte in vivo beobachtet wurden. Im Gegensatz dazu beeinflußte der β_1 -selektive Agonist Xamoterol mit Ausnahme einer Abnahme der β_1 -Adrenozeptoren-vermittelten Effekte weder die lymphozytären β_2 -Adrenozeptoren noch die β_2 -Adrenozeptor-vermittelten Effekte in vivo (Brodde et al., 1990). Diese Befunde zeigen auch, daß Lymphozyten als Modell dazu geeignet sind, Veränderungen der β_2 - und weniger der β_1 -Adrenozeptorfunktion zu verfolgen.

Bei Untersuchungen an Gewebeproben von Kälbern zeigte sich, daß Clenbuterol nach peroraler Applikation ebenfalls zu einer Verminderung der β -Adrenozeptordichte führte (Roets und Burvenich, 1993; Re et al., 1995, 1997b). Die vorliegenden Befunde an Pferdelymphozyten stimmen mit der bei Kälbern ebenfalls beobachteten signifikanten Abnahme der β -Adrenozeptoren von 40-70 % überein. Während bei Clenbuterol-behandelten Kälbern eine Zunahme der cAMP-Akkumulation gefunden wurde, zeigte sich vorliegend in Untersuchungen Clenbuterol-behandelter Pferde eine zu erwartende Abnahme. Die Gründe für diese Diskrepanz sind unklar. In Untersuchungen von Re et al. (1995, 1997b) wurde an

Geschlechtsorganen, Herz, Bronchien und Gehirn, die von Fleischkälbern nach 40tägiger oraler Gabe von hohen Clenbuteroldosen ($20 \mu\text{g}/\text{kg KG}$) entnommen wurden, eine starke Abnahme beider Subtypen der β -Adrenozeptoren (β_1 und β_2) bis zu 70% festgestellt. Diese in den Studien an Kälbern beobachtete stärkere Abnahme der Rezeptordichte gegenüber den in der vorliegenden Arbeit an Pferdelymphozyten erhobenen Befunden findet eine Erklärung wahrscheinlich darin, daß die den Kälbern verabreichte Dosis weit über der therapeutisch verwendeten Dosis lag.

5.2.2. Einfluß von Dexamethason auf Clenbuterol-induzierte Desensibilisierung

In den vorliegenden Untersuchungen wurde ferner der Frage nachgegangen, welche Auswirkungen eine Dexamethasonbehandlung auf die durch Clenbuterol-induzierte Desensibilisierung der β_2 -Adrenozeptoren von Pferdelymphozyten und deren funktionelle Ansprechbarkeit hat. Dazu wurde den Pferden Dexamethason als nicht retardierte Formulierung in der üblichen therapeutischen Dosis ($1 \times 0,1 \text{ mg}/\text{kg}/\text{d}$; i. v.) über 5 Tage unmittelbar nach der letzten Clenbuteroldosis verabreicht.

Nach der Desensibilisierung der β_2 -Adrenozeptoren zeigte sich unter der Behandlung mit Dexamethason eine beschleunigte Wiederherstellung der Anzahl der lymphozytären β_2 -Adrenozeptoren und des Isoprenalin-induzierten Anstiegs des intrazellulären cAMP-Gehaltes (siehe Abb. 20 und 21). Schon 24 Stunden nach der ersten Dexamethasongabe waren beide Parameter von den Durchschnittswerten des letzten Tages vor der Clenbuterolbehandlung statistisch nicht mehr zu unterscheiden. Die Rezeptordichte überstieg sogar ab dem dritten Tag der Dexamethasonbehandlung die Ausgangswerte um das Zweifache, wobei diese überschießende Reaktion nach dem Absetzen der Behandlung nur langsam innerhalb von vier Tagen auf die vor der Behandlung gemessenen Werte zurückging. Die schnelle Aufhebung der Desensibilisierung von lymphozytären β_2 -Adrenozeptoren beim Pferd durch Glukokortikoide steht im Einklang mit Ergebnissen aus Studien bei Menschen, in denen die Terbutalin-induzierte Desensibilisierung der lymphozytären β_2 -Adrenozeptoren sowohl durch einmalige intravenöse Applikation von Methylprednisolon (Hui et al., 1982) als auch durch orale Applikation von Prednisolon (Brodde et al., 1985a; Reinhardt et al., 1983) aufgehoben werden konnte.

Hui et al.(1982) führten eine Untersuchung bei asthmatischen Menschen durch, die mit Terbutalin behandelt wurden. Unter der Therapie sank die lymphozytäre β -Adrenozeptorenzahl ab. Bei Fortführung der Therapie und zusätzlicher Gabe von Methylprednisolon wurde innerhalb von 16 Stunden die Desensibilisierung aufgehoben und der Ausgangswert wieder erreicht. Allerdings konnte bei alleiniger Gabe von Methylprednisolon ohne vorherige Down-Regulation keine Veränderung der β -Adrenozeptorendichte festgestellt werden. Ähnliche Beobachtungen konnten von Brodde et al. (1985a) an Lymphozyten gesunder Probanden gemacht werden, die eine rasche Erholung von einer Terbutalin-induzierten Down-Regulation unter der Wirkung von Prednisolon oder Ketotifen zeigten. Im Unterschied zu den Ergebnissen in diesen Untersuchungen, in denen nach einmaliger Gabe von Glukokortikoiden lediglich die Ausgangswerte wieder erreicht wurden, wurde in den vorliegenden Studien an Pferdelymphozyten vom 3. bis 5. Behandlungstag mit Dexamethason ein kontinuierlicher und ausgeprägter Anstieg der β_2 -Adrenozeptorzahl über die Ausgangswerte beobachtet. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied ist die längere Behandlungsdauer, die im Gegensatz zu einmaliger Gabe in den Untersuchungen an Menschen beim Pferd fünf Tage dauerte. Für diese Annahme sprechen übereinstimmende Befunde bei Menschen, bei denen erst nach mehrmaliger Glukokortikoidgabe, z. B. nach 4tägiger Behandlung von Säuglingen mit Keuchhusten und asthmatischen Kindern, eine deutliche Zunahme (siebenfach) der lymphozytären β_2 -Adrenozeptorendichte festgestellt werden konnte (Reinhardt et al., 1983). Eine mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbare, ausgeprägte Hochregulation der β -Adrenozeptoren unter Glukokortikoideinfluß wurde auch von Davies und Lefkowitz (1980) an menschlichen polymorphkernigen Leukozyten festgestellt.

Von klinischer Bedeutung ist die bei den Pferden gemachte Beobachtung, daß bei gleichzeitiger Behandlung mit Clenbuterol und Dexamethason die desensibilisierende Wirkung von Clenbuterol durch Dexamethason vollständig verhindert werden kann (siehe Abb. 22). Bei gleichzeitiger Applikation kam es zu keinem Zeitpunkt während der Clenbuterolbehandlung zu einem Abfall der Rezeptordichte unter die Ausgangswerte, vielmehr zeigte sich auch hier der unter wiederholter Glukokortikoidgabe charakteristische Anstieg. Diese Befunde belegen, daß Glukokortikoide, wie Dexamethason, bei kombinierter Gabe von vornherein den desensibilisierenden Effekt von β_2 -Agonisten, wie Clenbuterol, verhindern können. Ähnliche Befunde eines protektiven Effekts von Prednisolon auf die

Terbutalin-induzierte Down-Regulation von β_2 -Adrenozeptoren wurden an menschlichen Lymphozyten gefunden (Brodde et al., 1985).

Auch in vitro konnte in einem vergleichbaren Versuchsmodell gezeigt werden, daß es unter dem Einfluß von Glukokortikoiden zu einer Hochregulation der β -Adrenozeptorendichte an Lymphozyten und verschiedenen anderen Zellen kommt. Cotecchia und De Blasi (1984) beobachteten an intakten menschlichen Lymphozyten eine signifikante Erhöhung der β -Adrenozeptorendichte bereits nach 15minütiger Inkubationszeit mit Hydrokortison. Dieser Effekt wurde mit steigender Kortisolkonzentration noch deutlicher. In Übereinstimmung hierzu kam es auch in anderen Untersuchungen während der Kultivierung von Lymphozyten in prednisolonhaltigem Medium über 72 Stunden zu einem tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Anstieg der ICYP-Bindungsstellen, während Prednisolon in Lymphozyten, die zuvor für 24 Stunden mit Isoprenalin stimuliert worden waren, 48 Stunden nach der Inkubation eine ausgeprägte Hochregulation der β -Adrenozeptoren bewirkte (Sertl et al., 1986). Der hochregulierende Effekt von Prednisolon trat allerdings bei gleichzeitiger Anwesenheit Isoprenalin und Prednisolon im Kulturmedium nicht auf (Sertl et al., 1986; Davies und Lefkowitz, 1983). Es konnte außerdem an verschiedenen Zellen, wie z. B. Lungenzellen, Lungentumorzellen, Muskelzellen, Fibroblasten, gezeigt werden, daß es unter dem Einfluß von Glukokortikoiden zu einer Zunahme der β -Adrenozeptorendichte kommt (Mano et al., 1979; Fraser und Venter, 1980; Davies und Lefkowitz, 1984). Im Unterschied zu diesen Befunden einer Hochregulation stellten Michel et al. (1994) an Lymphozyten mit Ausnahme einer erhöhten Prostaglandin- E_2 -stimulierten cAMP-Bildung keinen Einfluß von Dexamethason auf die β -Adrenozeptorendichte fest.

Die Befunde der vorliegenden Arbeit zeigen, daß bei gesunden Pferden mit normaler Lungenfunktion β_2 -Agonisten und Glukokortikoide zu Veränderungen der β_2 -Adrenozeptorendichte und deren funktioneller Ansprechbarkeit an Lymphozyten führen. Untersuchungen beim Menschen lassen den Schluß zu, daß die Veränderungen der β -Adrenozeptoren an Lymphozytenmembranpräparationen entsprechende Veränderungen in anderen Geweben, wahrscheinlich auch in der Lunge (Brodde et al., 1986b; Liggett et al., 1988) reflektieren. Die beobachtete Down-Regulation durch Clenbuterol bestätigt klinische Beobachtungen, nach denen bei alleiniger wiederholter Gabe von Clenbuterol (≈ 14 Tage) zur

Behandlung der COB bei Pferden dessen Wirkung nachläßt. Inwieweit die beobachteten arzneimittel-abhängigen Veränderungen der lymphozytären β -Adrenozeptordichte bei COB-Pferden auftreten, und ob diese mit denen des Lungengewebes des Pferdes korrelieren, ist durch weitere Untersuchungen zu klären.

Die Ergebnisse der vorliegenden klinisch pharmakologischen Studien bei Pferden mit anschließender Untersuchung der β -Adrenozeptoren von Lymphozyten zeigen weiterhin, daß sowohl durch die Verabreichung von Dexamethason unmittelbar nach dem Absetzen der Clenbuterolbehandlung als auch durch eine Kombinationstherapie mit beiden Wirkstoffen die desensibilisierende Wirkung von Clenbuterol aufgehoben wird. Diese Befunde belegen den Vorteil einer zusätzlichen gleichzeitigen Gabe von Dexamethason bei COB-Pferden, die β_2 -adrenerge Arzneimittel, wie Clenbuterol, benötigen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Charakterisierung β -adrenerger Rezeptoren auf Pferdelymphozyten und deren Regulation unter dem Einfluß von Clenbuterol und Dexamethason

Getu Abraham

Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie, Veterinärmedizinische Fakultät,
Universität Leipzig, Deutschland

Juni, 2001

86 S., 205 Lit., 7 Tab., 23 Abb.

Über Vorkommen und Eigenschaften von β -Adrenozeptoren auf Pferdelymphozyten und ihre pharmakologische Regulation liegen bisher keine Untersuchungen vor. Mit der vorliegenden Arbeit sollten β -adrenerge Rezeptoren an intakten Pferdelymphozyten in Bindungsstudien mit dem Radioliganden (-)-(125 I)-Iodocyanopindolol (ICYP), einem potenten β_2 -selektiven Adrenozeptorantagonisten, charakterisiert und deren funktionelle Ansprechbarkeit durch Messung des Isoprenalin-induzierten Anstiegs des intrazellulären cAMP-Gehaltes mittels Radioimmunoassay bestimmt werden.

Die Bindung von ICYP an intakten Pferdelymphozyten war schnell, sättigbar (maximale Anzahl der Bindungsstellen 320 ± 20 ICYP Bindungsstellen/Zelle, Mittelwert \pm SEM, n = 12) und hochaffin (K_D -Wert für ICYP $14,37 \pm 1,66$ pmol/l, Mittelwert \pm SEM, n = 12). Verdrängungsexperimente mit Agonisten und Antagonisten zeigten eine Affinität und Stereoselektivität, wie sie bei β -Adrenozeptoren zu erwarten waren. Der nicht radioaktiv markierte β_2 -selektive Adrenozeptorantagonist ICI 118,551 verdrängte den Radioliganden ICYP aus seiner Bindung mit mehr als 1500fach höherer Affinität als der nicht radioaktiv markierte β_1 -selektive Adrenozeptorantagonist CGP 20712A. In Pferdelymphozyten können somit mehr als 90 % der β -Adrenozeptoren dem β_2 -Subtyp zugeordnet werden. Ein Anteil von weniger als 10 % an β_1 -Adrenozeptoren kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Die Bindungsstellen waren stereospezifisch, da das biologisch aktive (-)-Propranolol die Bindung von ICYP mit 40fach höherer Affinität verdrängte als (+)-Propranolol. β -adrenerge

Agonisten verdrängten ICYP aus seiner spezifischen Bindung in der Rangfolge ihrer pharmakologischen Wirkungstärke, die typisch für den β_2 -Subtyp des Adrenozeptors ist: (-)-Isoprenalin > (-)-Adrenalin > (-)-Noradrenalin. Eine ähnliche Rangfolge wurde auch für die Agonist-induzierte cAMP-Bildung in Lymphozyten festgestellt.

Aufgrund der dargestellten Befunde kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß ICYP ein geeigneter Radioligand ist, um β -adrenerge Rezeptoren an Pferdelymphozyten zu identifizieren und zu charakterisieren. Die Bindung von ICYP an intakte Lymphozyten stellt somit ein geeignetes Modell dar, um wichtige Informationen über die Funktion und Regulation des β -adrenergen Systems beim Pferd sowohl unter physiologischen (pathophysiologischen) Bedingungen als auch über Arzneimittel-induzierte Veränderungen in vivo zu gewinnen.

Ausgehend von den beschriebenen Grundlagenuntersuchungen wurden in einer weiteren Versuchsreihe bei zwölf klinisch gesunden Pferden der Einfluß von Clenbuterol und Dexamethason lymphozytäre β_2 -Adrenozeptoren, hinsichtlich ihrer Dichte, ihrer Affinität zum Radioliganden und ihrer cAMP-Bildung (als Maß für die funktionelle Ansprechbarkeit der β_2 -Adrenozeptoren bestimmt über Stimulation durch 10 $\mu\text{mol/l}$ Isoprenalin) untersucht.

Während der 12tägigen Clenbuterolbehandlung ($2 \times 0,8 \mu\text{g/kg/Tag}$, i. v.) fielen die Anzahl der β_2 -Adrenozeptoren an Lymphozyten und der durch (-)-Isoprenalin-induzierte Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehaltes signifikant ($p < 0,05$, $n = 8$) unter die Ausgangswerte unbehandelter Tiere ab. Clenbuterol bewirkte in der therapeutischen Dosis bereits 48 Stunden nach der Behandlung einen Abfall der Anzahl der β_2 -Adrenozeptoren bzw. der cAMP-Bildung um etwa 30 - 40 %. Während der restlichen Behandlungsdauer unter Clenbuterol blieb die Rezeptordichte auf diesem niedrigen Niveau. Bei einer weiteren Versuchsgruppe wurde der Effekt des Glukokortikoids Dexamethason auf die Clenbuterol-induzierte Desensibilisierung von β_2 -Adrenozeptoren untersucht. Dexamethasonverabreichung ($1 \times 0,1\text{mg/kg/d}$, i. v.) unmittelbar nach der letzten Clenbuteroldosis über 5 Tage beschleunigte die Wiederherstellung der down-regulierten Anzahl der lymphozytären β_2 -Adrenozeptoren und des Isoprenalin-induzierten Anstiegs des intrazellulären cAMP-Gehaltes ($p < 0,05$, $n = 4$). Schon 24 Stunden nach der ersten Dexamethasongabe waren beide Parameter von den Durchschnittswerten am Tag vor Behandlungsbeginn statistisch nicht zu unterscheiden. Die Anzahl der lymphozytären β_2 -Adrenozeptoren stieg sogar ab dem dritten Tag der Dexamethasonbehandlung bis auf das Doppelte bei unbehandelten Tiere an. Nach dem Absetzen der Dexamethasonbehandlung kam es zu einer langsam Abnahme der

Rezeptorendichte und ihrer Ansprechbarkeit, wobei die vor der Clenbuterolbehandlung gemessenen Werte erst nach 4 Tagen erreicht wurden. Bei gleichzeitiger Behandlung der Tiere mit Clenbuterol und Dexamethason konnte durch das Glukokortikoid die Clenbuterol-induzierte Abnahme der β_2 -Adrenozeptorendichte und deren Ansprechbarkeit vollständig verhindert werden. Weder durch die Clenbuterol-abhängige Down-Regulation noch durch die Dexamethason-bedingte Hochregulation kam es zu signifikanten Veränderungen der Dissoziationskonstante (K_D) und somit der Affinität von ICYP zu β_2 -Adrenozeptoren.

Die Ergebnisse zeigen, daß es unter Behandlung mit Clenbuterol zu einer schnell einsetzenden, umfangreichen Down-Regulation der β_2 -Adrenozeptorendichte an Lymphozyten des Pferdes kommt und daß diese Toleranzentwicklung durch Glukokortikoide vollständig wieder aufgehoben oder verhindert werden kann. Zur Therapie der COB von Pferden scheint somit die kombinierte Anwendung von β_2 -Mimetika und Glukokortikoiden von Vorteil zu sein.

7. Summary

Characterization of β -adrenergic Receptors on Equine Lymphocytes and their Regulation under the Influence of Clenbuterol and Dexamethasone

Getu Abraham

Institute of Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Leipzig, Germany

June, 2001

86 pp., 205 ref., 7 tab., 23 fig.

β -Adrenoceptors and their regulation by pharmacological active substances have not yet been characterized in equine lymphocytes. In this study, β -adrenoceptors were identified and subclassified by (-)-[¹²⁵I]-iodocyanopindolol (ICYP) binding, a potent β_2 -adrenergic antagonist, as well as by their isoprenaline-induced responsiveness using radioimmunoassay in intact viable equine lymphocytes.

The specific ICYP binding was rapid, saturable (maximum number of binding sites 320 ± 20 ICYP binding sites/cell, means \pm SEM, n = 12) and of high affinity (K_D -value for ICYP 14.37 ± 1.66 pmol/l, means \pm SEM, n = 12). The competition binding studies with agonists and antagonists showed the affinity and stereoselectivity to be expected for β -adrenergic receptors. The unlabelled selective β_2 -adrenoceptor antagonist ICI 118,551 was about 1500 times more potent in inhibiting ICYP binding than was the β_1 -selective adrenoceptor antagonist CGP 20712A. It is, therefore, concluded that in intact equine lymphocytes ICYP labels a class of functional β -adrenoceptors, that belong predominantly (> 90 %) to the β_2 -adrenoceptor subtype. A minor (< 10 %) β_1 -adrenoceptor component, however, cannot be completely ruled out. The binding sites were stereoselective, as the (-)-isomer of propranolol was about 40 times more potent to inhibit ICYP binding than was the (+)-isomer. Agonists competed for specific binding with a rank order of potency (-)-isoprenaline > (-)-adrenaline > (-)-noradrenaline, which is typical for a β_2 -subtype of adrenergic receptor; the same order of potency was obtained for agonist-induced stimulation of lymphocyte cyclic AMP content.

Thus, it can be concluded that ICYP is a promising compound for the reliable determination of the binding characteristics of β -adrenoceptors of equine lymphocytes and besides that, this might give an insight in providing physiologically significant information about the regulation of the β -adrenergic receptor system.

Based upon this study, we further investigated, in 12 healthy thoroughbred horses, the effects of the β_2 -agonist clenbuterol and the glucocorticoid dexamethasone on the lymphocyte β_2 -adrenergic receptor density and affinity as well as on its responsiveness (assessed by lymphocyte cyclic AMP responses to 10 μ mol/l (-)-isoprenaline). Clenbuterol (2 \times 0.8 μ g/kg/d, i. v. for 12 days) decreased ICYP binding sites only 48 h after application by ~30-40 %; concomitantly, lymphocyte cAMP response to (-)-isoprenaline was significantly reduced ($p < 0.05$, $n = 8$). The values remained at these low levels throughout the following 10 days of treatment. After withdrawal of clenbuterol the density and responsiveness of β_2 -adrenoceptors gradually increased, reaching pre-drug levels after 4 days. Next the effects of dexamethasone on clenbuterol-induced desensitisation were studied. Administration of dexamethasone (1 \times 0.1mg/kg/d, i. v. for five days) immediately after clenbuterol withdrawal accelerated β_2 -adrenergic receptor recovery ($p < 0.05$, $n = 4$): only 24 hours after administration dexamethasone restored the number of binding sites and cAMP response to (-)-isoprenaline to levels statistically indistinguishable from the values before starting clenbuterol treatment. Three days after dexamethasone administration the density of lymphocyte β_2 -adrenoceptors was further increased about two fold the pre-treatment values, and this increase declined gradually after dexamethasone withdrawal, reaching baseline values after 4 days. Furthermore, in groups simultaneously exposed to both drugs dexamethasone completely prevented clenbuterol-induced decrease in lymphocyte β_2 -adrenoceptor density and responsiveness. No significant change was observed in the dissociation constant and, thus, in the affinity of ICYP to β -adrenoceptors remained unchanged during or after treatment with either clenbuterol or dexamethasone.

It is concluded that dexamethasone (glucocorticoids) can reverse and prevent clenbuterol-induced down-regulation of the lymphocyte β_2 -adrenoceptors and thus, a combined therapy with clenbuterol and dexamethasone may be potentially beneficial in COPD of horses.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aarons, R.D., Nies, A.S., Gal, J., Hegstrand, L.R., Molinoff, P.B. (1980): Elevation of beta-adrenergic receptor density in human lymphocytes after propranolol administration. *J. Clin. Invest.* 65, 949-957
2. Aarons, R.D., Molinoff, P.B. (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, R.D., Nies, A.S., Gerber, J.G., Molinoff, P.B. (1983): Decreased beta adrenergic receptor density on human lymphocytes after chronic treatment with agonists. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 224, 1-6
4. Abrass, I.B., Scarpace, P.J. (1981): Human lymphocyte beta-adrenergic receptors are unaltered with age. *J. Gerontol.* 36, 298-301
5. Ahlquist, R.P. (1948): A study of the adrenergic receptors. *Am. J. Physiol.* 153, 585-600
6. Alexander, S:P.H., Peters, J.A. (2000): Receptor and ion channel nomenclature supplement. *Trends Pharmacol. Sci.*, 11. Ausgabe
7. Atlas, D., Steer, M.L., Levitzki, A. (1974): Stereospecific binding of propranolol and catecholamines to the beta-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 4246-4248
8. Aurbach, G.D., Fedak, S.A., Woodard, C.J., Palmer, J.S., Hauser, D., Troxler, F. (1974): The beta-adrenergic receptor: Stereospecific interaction of an iodinated beta-blocking agent with a high affinity site. *Science* 186, 1223-1224
9. Bai, T.R. (1992): Beta₂-adrenergic receptors in asthma: a current perspective. *Lung* 170, 125-140
10. Barnes, P.J. (1995): Inhaled glucocorticoids for asthma. *N. Engl. J. Med.* 332, 869-875
11. Barovsky, K., Brooker, G. (1980): ¹²⁵I-Iodopindolol, a new highly selective radioiodinated beta-adrenergic receptor antagonist: measurement of beta-receptors on intact rat astrocytoma cells. *J. Cyclic Nucl. Res.* 6, 297-307

12. Benovic, J.L., Pikes, L.J., Cerione, R.A., Staniszewski, C., Yoshimasa, T., Codina, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1985): Phosphorylation of the mammalian β -adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 260, 7094-7101
13. Benovic, J.L., Mayor, F., Staniszewski, C., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1987): Purification and characterization of the β -adrenergic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* 262, 9026-9032
14. Bilski, A.J., Halliday, S.E., Fitzgerald, J.D. and Wale, J.L. (1983): The pharmacology of a β_2 - selective adrenoceptor antagonist (ICI 118,551). *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 5, 430-437
15. Bishopric, N.A., Cohen, H.J., Lefkowitz, R.J. (1979): Beta-adrenoceptors in lymphocyte subpopulations. *J. Allergy Clin. Immunol.* 65, 29-33
16. Böhm, S.K., Grady, E.F., Bunnett, N.W. (1997): Regulatory mechanisms that modulate signaling by G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* 322, 1-18
17. Böyum, A. (1968): Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21, Suppl. 97, 77-89
18. Borgarelli, M., Badino, P., Bergamasco, L., Odore, R., Re, G., Tarducci, A., Torino, R.Z., Bussadori, I., Bussadori, C. (1999): Lymphocyte-Adrenoceptor Down-Regulation in DCM dogs. In: Proc. 17th ACVIM, Chicago, IL, 90-91
19. Borst, S.E., Hui, K.K., Conolly, M.E. (1990): Beta-adrenergic receptors on human lymphocytes: Comparison of down-regulation in vivo and in vitro. *Pharmacology* 40, 325-329
20. Bourne, H.R., Melmon, K.L. (1971): Adenyl cyclase in human leukocytes: evidence for activation by separate beta-adrenergic and prostaglandin receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 178, 1-7
21. Bristow, M.R., Hershberger, R.E., Port, J.D., Minobe, W., Rasmussen, R. (1989): β_1 - and β_2 -adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase Stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Mol. Pharmacol.* 35, 295-303

-
22. Brodde, O.-E., Engel, G., Hoyer, D., Bock, K.D., Weber, F. (1981): The β -adrenergic receptor in human lymphocytes: Subclassification by the use of a new radioligand, (\pm)-¹²⁵Iodocyanopindolol. *Life Sci.* 29, 2189-2198
23. Brodde, O.-E., Prrywarra, A., Daul, A., Anlauf, M., Bock, K.D. (1984a): Correlation between lymphocyte β_2 -adrenoceptor density and mean arterial blood pressure: elevated β -adrenoceptors in essential hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6, 678-682
24. Brodde, O.-E., Daul, A., O'Hara, N. (1984b): β -Adrenoceptor changes in human lymphocytes induced by dynamic exercise. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 325, 190-192
25. Brodde, O.-E., Brinkmann, M., Schemuth, R., O'Hara, N., Daul, A. (1985a): Terbutaline-induced desensitization of human lymphocyte β_2 -adrenoceptors: Accelerated restoration of β -adrenoceptor responsiveness by prednisolone and ketotifen. *J. Clin. Invest.* 76, 1096-1101
26. Brodde, O.-E., Daul, A., Stuka, N., O'Hara, N., Borchhard, U. (1985b): Effects of beta-adrenoceptor antagonist administration on β_2 -adrenoceptor density in human lymphocytes. The role of "intrinsic sympathomimetic activity". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 328, 417-422
27. Brodde, O.-E., Schemuth, R., Brinkmann, M., Wang, X.L., Daul, A., Borchhard, U. (1986a): β -Adrenoceptor antagonists (non-selective as well as β_1 -selective) with partial agonistic activity decrease β_2 -adrenoceptor density in human lymphocytes. Evidence for a β_2 -agonistic component of the partial agonistic activity. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 333, 130-138
28. Brodde, O.-E., Kretsch, R., Ikezono, K., Zerkowski, H.-R., Reidemeister, J.-C. (1986b): Human β -adrenoceptors: Relation of myocardial and lymphocyte β -adrenoceptor density. *Science*, 231, 1584-1585
29. Brodde, O.-E. (1987a): Cardiac beta-adrenergic receptors. *ISI Atlas of Sci: Pharmacol.* 1, 107-112

-
30. Brodde, O.-E., Beckeringh, J.J., Wang, X.L., Michel, M.C. (1987b): Validation of lymphocyte beta-adrenoceptor as model to study beta-adrenoceptor regulation in man. *Pharmacologist* 29, 168
31. Brodde, O.-E., Beckeringh, J.J., Michel, M.C. (1987c): Human heart beta-adrenoceptors: a fair comparison with lymphocyte beta-adrenoceptors? *Trends Pharmacol. Sci.* 8, 403-407
32. Brodde, O.-E., Daul, A., Wang, X.L., Michel, M.C., Galal, O. (1987d): Dynamic exercise-induced increase in lymphocyte beta-2-adrenoceptors: Abnormality in essential hypertension and its correction by antihypertensives. *Clin. Pharmacol. Ther.* 41, 371-379
33. Brodde, O.-E., Wang, X.L. (1988a): Beta-adrenoceptor changes in blood lymphocytes and altered drug responsiveness. *Ann. Clin. Res.* 20, 311-323
34. Brodde, O.-E., Michel, M.C., Wang, X.L., Zerkowski, H.-R. (1988b). The relevance of determination of lymphocyte beta₂-adrenoceptors as index for beta-adrenoceptors in other human tissues. *Br. J. Pharmacol.* 93 (Suppl.), 27P
35. Brodde, O.-E. (1988c): Die Rolle adrenerger alpha- und beta-Rezeptoren in der Pathogenese von Hypertonie und Herzerkrankungen. *Der Internist (Berlin)* 29, 397-413
36. Brodde, O.-E., Howe, U., Egerzegi, S., Konietzko, N., Michel, M.C. (1988d): Effects of prednisolone and ketotifen on beta₂-adrenoceptors in asthmatic patients receiving beta 2-bronchodilators. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 34, 145-150
37. Brodde, O.-E. (1989): beta-Adrenoceptors. In: *Receptor pharmacology and function*: Eds. M. Williams, R. A. Glennon, P. B. M. W. M. Timmermanns. Marcel Dekker, New York, Basel, 207-255
38. Brodde, O.-E., Daul, A., Michel-Reher, M., Boomsma, F., Man in't Veld, A.J., Schlieper, P., Michel, M.C. (1990): Agonist-induced desensitization of beta-adrenoceptor function in humans: Subtype-selective reduction in beta₁- or beta₂-adrenoceptor-mediated physiological effects by xamoterol or procaterol. *Circulation* 81, 914-921
39. Brodde, O.E. (1991): beta₁- and beta₂-Adrenoceptors in human heart: Properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol. Rev.* 43, 203-242

-
40. Brodde, O.-E., Petrasch, S., Bauch, H.J., Daul, A., Gnadt, M., Oefler, D., Michel, M.C. (1992): Terbutaline-induced desensitization of β_2 -adrenoceptor in vivo function in humans: attenuation by ketotifen. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20, 434-439
41. Brodde, O.-E., Michel, M.C., Zerkowski, H.-R. (1995): Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure. *Cardiovasc. Res.* 30, 570-584
42. Brodde, O.-E., Michel, M.C. (1999): Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol. Rev.* 51, 651-689
43. Brooks, S.M., McGowan, K., Bernstein, L., Altenau, P., Peagler, J. (1979): Relationship between numbers of beta-adrenergic receptors in lymphocytes and disease severity in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 63, 401-406
44. Burman, K.D., Ferguson, E.W., Djuh, Y.Y. (1985): Beta Receptors in peripheral mononuclear cells increase acutely during exercise. *Acta Endocrinologica* 109, 563-568
45. Carlsson, E., Ablad, B., Brändström, A., Carlsson, B. (1972): Differentiated blockade of the chronotropic effects of various adrenergic stimuli in the cat heart. *Life Sci.* 11, 953-958
46. Cheng, Y., Prusoff, W.H. (1973): Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108
47. Chuang, T.T., Sallese, M., Ambrosini, G., Parruti, G., De Blasi, A. (1992): High expression of β -adrenergic receptor kinase in human peripheral blood leukocytes. *J. Biol. Chem.* 267, 6886-6892
48. Clark, R.B., Goka, T.J., Proll, M.A., Friedman, J. (1986): Homologous desensitization of β -adrenergic receptors in lymphoma cells is not altered by the inactivation of N_i (G_i), the inhibitory guanine nucleotide regulatory protein. *Biochem. J.* 235, 399-405
49. Cognini, G., Piantanelli, L., Paolinelli, E., Orlandoni, P., Pellegrini, A., Masera, N. (1983): Decreased beta-adrenergic receptor density in mononuclear leukocytes from thyroidectomized patients. *Acta Endocrinologica* 103, 40-45

-
50. Colucci, W.S., Alexander, R.W., Williams, G.H., Rude, R.E., Holman, L., Konstam, M.A., Wynne, J., Mudge, G.H., Braunwald, E. (1981): Decreased lymphocyte beta-adrenergic receptor density in patients with heart failure and tolerance to the beta-adrenergic agonist pirbuterol. *N. Engl. J. Med.* 305, 185-190
51. Conolly, M.E., Greenacre, J.K. (1976): The lymphocyte β -adrenoceptor in normal subjects and patients with bronchial asthma. *J. Clin. Invest.* 58, 1307-1316
52. Cook, N., Nahorski, S.R., Barnett, D.B. (1987): Human platelet β_2 -adrenoceptors: agonist-induced internalization and downregulation in intact cells. *Br. J. Pharmacol.* 92, 587-596
53. Cotecchia, S., De Blasi, A. (1984): Glucocorticoids increase β -adrenoceptors on human intact lymphocytes in vivo. *Life Sci.* 35, 2359-2364
54. Cramb, G. (1986): Selective lysosomal uptake and accumulation of the beta-adrenergic antagonist propranolol in cultured and isolated cell systems. *Biochem. Pharmacol.* 35, 1365-1372
55. Cuatrecasas, P. (1974): Insulin receptors, cell membranes and hormone action. *Biochem. Pharmacol.* 23, 2353-2361
56. Dale, H.H. (1906): On some physiological actions of ergot. *J. Physiol. (London)* 34, 165-206
57. Davies, A.O., Lefkowitz, R.J. (1980): Corticosteroid-induced differential regulation of β -adrenergic receptors in circulating human polymorphonuclear leukocytes and mononuclear leukocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51, 599-605
58. Davies, A.O., DeLean, A., Lefkowitz, R.J. (1981): Myocardial beta-adrenergic receptors from adrenalectomized rats: Impaired formation of high-affinity agonist-receptor complexes. *Endocrinology* 108, 720-722
59. Davies, A.O., Lefkowitz, R.J. (1983): In vitro desensitization of beta-adrenergic receptors in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 71, 565-571
60. Davies, A.O., Lefkowitz, R.J. (1984): Regulation of β -adrenergic receptors by steroid hormones. *Ann. Rev. Physiol.* 46, 119-130

-
61. Davies, A.O., Lefkowitz, R.J. (1995): Agonist-promoted high affinity state of the beta₂-adrenergic receptor transcription in human lung. *Am. J. Physiol.* 12, L41-L46
62. De Blasi, A., Lipartiti, M., Motulsky, H.J., Insel, P.A., Fratelli, M. (1985): Agonist-induced redistribution of β-adrenergic receptors on intact human mononuclear leukocyte redistributed receptors are non-functional. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61, 1081-1088
63. De Blasi, A., Cotecchia, S., Fratelli, M., Lipartiti, M. (1986): Agonist-induced beta-adrenergic receptor internalization in intact human mononuclear leukocytes: Effects of temperature of mononuclear leukocyte separation. *J. Lab. Clin. Med.* 107, 86-94
64. De Blasi, A., Parruti, G., Sallese, M. (1995): Regulation of G Protein-coupled receptor kinase subtypes in activated T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 95, 203-210
65. De Lean, A., Stadel, J.M., Lefkowitz, R.J. (1980): A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of adenylate cyclase-coupled β-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 255, 7108-7117
66. Del Monte, F., Kaumann, A.J., Poole-Wilson, P.A., Wynne, D.G., Pepper, J. and Harding, S.E. (1993): Coexistence of functioning β₁- and β₂-adrenoceptors in singly myocytes from human ventricle. *Circulation* 88, 854-863
67. Derksen, F.J., Scott, J.S., Slocombe, R.F., Robinson, N.E. (1987): Effect of clenbuterol on histamin-induced airway obstruction in ponies. *Am. J. Vet. Res.* 48, 423-426
68. Dixon, R.A.F., Kobilka, B.K., Strader, D.J., Benovic, J.L., Dohlman, H.G., Frielle, T., Bolanowski, M.A., Bennett, C.D., Rands, E., Diehl, R.E., Mumford, R.A., Slater, E.E., Sigal, E.S., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Strader, C.D. (1986): Cloning of the gene and cDNA for mammalian adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321, 75-79
69. Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1991): Model Systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 653-688
70. Dooley, D.J., Bittiger, H., Reymann, N.C. (1986): CGP 20712A: a useful tool for quantitating beta 1- and beta 2-adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 130, 137-139

-
71. Dulis, B.H., Wilson, I.B. (1980): The β -adrenergic receptor of live human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 255, 1043-1048
72. Emorine, L.J., Marullo, S., Briand-Sutren, M.M., Patey, G., Tate, K.M., Delavier-Klutschko, C., Strosberg, A.D. (1989): Molecular characterization of the human β_3 -adrenergic receptor. *Science* 245, 1118-1121
73. Engel, G., Hoyer, D., Berthold, R., Wagner, H. (1981): (\pm)- 125 Iodocyanopindolol, a new ligand for β -adrenoceptors: Identification and quantitation of subclasses of β -adrenoceptors in guinea pig. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 317, 277-285
74. Eysmann, S.B., Gervino, E., Vanter, D.E., Katz, S.E., Decker, L., Douglas, P.S. (1996): Prolonged exercise alters beta-adrenergic responsiveness in healthy sedentary humans. *J. Appl. Physiol.* 80, 616-622
75. Feldman, R.D., Limbird, L.E., Nadeau, J., Fitzgerald, G.A., Robertson, D., Wood, A.J. (1983): Dynamic regulation of leukocyte beta adrenergic receptor-receptor interactions by physiological changes in circulating catecholamines. *J. Clin. Invest.* 72, 164-170
76. Fishman, P.H., Nussbaum, E., Duman, R.S. (1991): Characterization and regulation of β_1 -adrenergic receptors in a human neuroepithelioma cell line. *J. Neurochem.* 56, 596-602
77. Fraser, C.M., Venter, J.C. (1980): The synthesis of β -adrenergic receptors in cultured human lung cells: Induced by glucocorticoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94, 390-397
78. Frey, M.J., Mancini, D., Fischberg, D., Wilson, J.R., Malinoff, P.B. (1989): Effect of exercise duration on density and coupling of β -adrenergic receptors on human mononuclear cells. *J. Appl. Physiol.* 66, 1494-1500
79. Freissmuth, M., Hausleithner, V., Nees, S., Böck, M., Schütz, W. (1986): Cardiac ventricular β_2 -adrenoceptors in guinea-pigs and rats are localized on the coronary endothelium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 334, 56-62

-
80. Frielle, T., Collins, S., Daniel, K.W., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Kobilka, B.K. (1987): Cloning of the cDNA for the human beta-1 adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 7920-7924
81. Furchgott, R.F. (1972): The classification of adrenoceptors. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 33, Catecholamines, eds. H. Blaschko und E. Muscholl. Springer-Verlag, Berlin, 283-335
82. Galant, S.P., Duriseti, L., Underwood, S., Insel, P.A. (1978): Decreased beta-adrenergic receptor in polymorphonuclear leukocytes after adrenergic therapy. *New Engl. J. Med.* 299, 933-936
83. Galant, S.P., Duriseti, L., Underwood, S., Allred, S. (1980): Beta-adrenergic receptors of polymorphonuclear particulate in bronchial asthma. *J. Clin. Invest.* 65, 577-585
84. Galant, S.P., Allred, S. (1981): Binding and functional characteristics of beta-adrenergic receptors in the intact neutrophil. *J. Lab. Clin. Med.* 98, 227-237
85. Gerber, H. (1994): Krankheiten der Bronchien und Lungen. In: *Pferdekrankheiten. Band I: Innere Medizin einschließlich Dermatologie*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 120-146
86. Gilman, A.G. (1984): Guanine nucleotide-binding regulatory proteins and dual controls of adenylate cyclase. *J. Clin. Invest.* 73, 1-4
87. Gilman, A.G. (1987): G-Proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 615-649
88. Ginsberg, A.M., Clutter, W.E., Shah, S.D., Cryer, P.E. (1981): Triiodothyronine-induced thyreotoxicosis increases mononuclear leukocyte β -adrenergic receptor density in man. *J. Clin. Invest.* 67, 1785-1791
89. Giudicelli, Y., Lacasa, D., Agli, B., Leneveu, A. (1984): Comparison of changes in the characteristics of β -adrenoceptors and responsiveness of human circulating lymphocytes during and after chronic administration of pindolol and propranolol. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 26, 7-12

-
90. Gonzalez, O., Gonzalez, E., Sanchez, C., Pinto, J., Gonzalez, I., Enriquez, O., Martinez, R., Filgueira, G., White, A. (1998): Effect of exercise on erythrocyte β -adrenergic receptors and plasma concentrations of catecholamines and thyroid hormones in thoroughbred horses. *Equine Vet. J.* 30, 72-78
91. Goodman, O.B., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H., Benovic, J.L. (1996): Beta-arrestin acts as a clathrin adapter in endocytosis of the β_2 -adrenergic receptor. *Nature* 383, 447-450
92. Greenacre, J.K., Schofield, P., Conolly, M.E. (1978): Desensitization of the beta-adrenoceptor of lymphocytes from normal subjects and asthmatic patients in vitro. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 5, 199-206
93. Gros, R., Benovic, J.L., Tan, C.M., Feldman, R.D. (1997): G-Protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. *J. Clin. Invest.* 99, 2087-2093
94. Hadcock, J.R., Malbon, C.C. (1988): Down-regulation of β -adrenergic receptors: agonist-induced reduction in receptor mRNA levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5021-5025
95. Hadcock, J.R., Wang, H.-Y., Malbon, C.C. (1989): Agonist-induced desensitization of β -adrenergic receptor mRNA: Attenuation of glucocorticoid-induced up-regulation of β -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 264, 19928-19933
96. Haen, E., Hauck, R., Emslander, H.P., Langenmayer, I., Liebl, B., Schopohl, J., Remien, J., Fruhmann, G. (1991): Nocturnal asthma: β_2 -adrenoceptors on peripheral mononuclear leukocytes, plasma cAMP and cortisol concentrations. *Chest* 100, 1239-1245
97. Haen, E., Emslander, H.P., Reinhardt, D. (1992): Characterization of the β -adrenoceptor on human lymphocytes by dose-response curves for the stimulation of cAMP. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 345, R110
98. Harden, T.K. (1983): Agonist induced desensitization of the beta-adrenergic receptor linked adenylate cyclase. *Pharmacol. Rev.* 35, 5-41

-
- 99.Hausdorff, W.P., Bouvier, M., O'Dowd, B.F., Irons, G.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1989): Phosphorylation sites on two domains of the β_2 -adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* 264, 12657-12665
- 100.Hausdorff, W.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1990): Turning off the signal: desensitization of β -adrenergic receptor function. *FASEB J.* 4, 2881-2889
- 101.Hertel, T.K., Perkins, J.P. (1984): Receptor-specific mechanisms of desensitization of β -adrenergic receptor function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 37, 245-256
- 102.Hill, A.V. (1910): The possible effects of the aggregation of molecules of hemoglobin in its dissociation curves. *J. Physiol.* 40, iv-vii
- 103.Hoffman, B.B., Lefkowitz, R.J. (1980): Radioligand binding studies of adrenergic receptors: new insights into molecular and physiological regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 581-608
- 104.Hoyer, D., Engel, G., Berthold, R. (1982): Binding characteristics of (\pm)- and (-)-¹²⁵Iodocyanopindolol to guinea-pig left ventricle membranes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 318, 319-329
- 105.Hui, K.P.P., Conolly, M.E., Tashkin, D.P. (1982): Reversal of human lymphocyte β -adrenoceptor desensitization by glucocorticoids. *Clin. Pharmacol. Ther.* 32, 566-571
- 106.Insel, P.A., Motulsky, H.J. (1987): Physiologic and pharmacologic regulation of adrenergic receptors. In: Insel PA: Adrenergic receptors in man. Master Decker Incorp. New York-Basel, 201-236
- 107.Kariman, M., Lefkowitz, R.J. (1977): Decreased beta-adrenergic receptor binding in lymphocytes from patients with bronchial asthma. *Clin. Res.* 25, 503A
- 108.Kariman, K. (1980): β -Adrenergic receptor binding in lymphocytes from patients with asthma. *Lung* 158, 41-51
- 109.Kaumann, A.J. (1989): Is there a third heart β -adrenoceptor? *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 316-320

-
- 110.Kent, R.S., De Lean, A., Lefkowitz, R.J. (1980): A quantitative analysis of β -adrenergic receptor interactions: resolution of high and low affinity states of the receptor by computer modeling of ligand binding data. *Mol. Pharmacol.* 17, 14-23
- 111.Khan, M.M., Sanson, P., Silverman, E.D., Engelman, E.G., Melmon, K.L. (1986): Beta-adrenergic receptors on human suppressor, helper, and cytolytic lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 35, 1137-1142
- 112.Kerry, R., Scrutton, M.C., Wallis, R.B. (1984): Mammalian platelet adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* 81, 91-102
- 113.Kobilka, B. (1992): Adrenergic receptors as models for G-protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 15, 87-114
- 114.Koenig, J.A., Edwardson, J.M. (1997): Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 18, 276-287
- 115.Krawietz W., Weinsteiger, M., Pruchniewski, M., Erdmann, E. (1979): Evidence for negative cooperativity among β -adrenergic receptors in cardiac and lung tissue of guinea pig. *Biochem. Pharmacol.* 28, 2999-3007
- 116.Krawietz W., Werdan, K., Schober, M., Erdmann, E., Rindfleisch, G.E., Hannig, K. (1982): Different numbers of beta-receptors in human lymphocyte subpopulations. *Biochem. Pharmacol.* 31, 133-136
- 117.Krawietz, W., Klein, M.E., Unterberg, C.H., Ackenheil, M. (1985): Physical exercise decreases the number of β -adrenergic receptors on human lymphocytes. *Klin. Wochenschr.* 63, 73-78
- 118.Laduron, P.M. (1984): Criteria for receptor sites in binding studies. *Biochem. Pharmacol.* 33, 833-839
- 119.Landmann, R., Portenier, M., Staehelin, M., Wesp, M., Box, R. (1988): Changes in β -adrenoceptors and leukocyte subpopulations after physical exercise in normal subjects. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 337, 261-266

-
- 120.Lands, A.M., Arnold, A., McAuliff, J.P., Luduena, F.P. and Braun, T.G. (1967): Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 214, 597-598
- 121.Langley, J.N. (1905): On the reaction of cells and nerve endings to certain poisons, in regards the reaction of striated muscle to nicotine and curare. *J. Physiol. (London)* 33, 374-413
- 122.Lefkowitz, R.J., Mukherjee, C., Coverstone, M., Caron, M.G. (1974): Stereospecific [³H] (-)-alprenolol binding sites, beta-adrenergic receptors and adenylyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 703-709
- 123.Lefkowitz, R.J., Mullikin, D., Caron, M.G. (1976): Regulation of β -adrenergic receptors by guanyl-5'-yl imidodiphosphate and other purine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 251, 4686-4692
- 124.Lefkowitz, R.J., Stadel, J.M., Caron, M.G. (1983): Adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptors: Structure and mechanisms of activation and desensitization. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 159-186
- 125.Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., Stiles, G.L. (1984): Mechanisms of membrane-receptor regulation: Biochemical, physiological, and clinical insights derived from studies of the adrenergic receptors. *N. Engl. J. Med.* 310, 1570-1579
- 126.Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1985): Adrenergic receptors: Molecular mechanism of clinically relevant regulation. *Clinical Res.* 33, 395-405
- 127.Levitzki, A. (1986): β -Adrenergic receptors and their mode of coupling to adenylate cyclase. *Physiol. Rev.* 66, 819-854
- 128.Liggett, S.B., Marker, J.C., Shah, S.D., Roper, C.L., Cryer, P.E. (1988): Direct relationship between mononuclear leukocyte and lung beta-adrenergic receptors and apparent reciprocal regulation of extravascular, and not intravascular, alpha- und beta-adrenergic receptors by sympathochromaffin system in humans. *J. Clin. Invest.* 182, 48-56

-
- 129.Limbird, L.E. (1980): Activation and attenuation of adenylate cyclase: The role of GTP-binding proteins as macromolecular messengers in receptor-cyclase coupling. *Biochem. J.* 195, 1-13
- 130.Lohse, M.J., Benovic, J.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1990): Multiple pathways of rapid β_2 -adrenergic receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* 265, 3203-3209
- 131.Lohse, M.J. (1993): Molecular mechanisms of membrane-receptor desensitization. *Biochem. Biophys. Acta* 1179, 171-188
- 132.Mäki, T. (1989): Density and functioning of human lymphocytic β -adrenergic receptors during prolonged exercise. *Acta Physiol. Scand.* 136, 569-574
- 133.Maisel, A. S., Motulsky, H.J. (1987): Receptor redistribution does not accompany terbutaline-induced down-regulation of beta-adrenergic receptors on human mononuclear leukocytes. *Clin. Pharmacol.*42, 100-106
- 134.Maisel, A.S., Knowlton, K.U., Fowler, P., Rearden, A., Ziegler, M.G., Motulsky, H.J., Insel, P.A., Michel, M.C. (1990): Adrenergic control of circulating lymphocyte subpopulations: effects of congestive heart failure, dynamic exercise, and terbutaline treatment. *J. Clin. Invest.* 85, 462-467
- 135.Mano, K., Akbarzadeh, A., Koesnadi, B.A., Sano, Y., Bewtra, A., Townley R.G. (1979): The effect of hydrocortisone on beta-adrenergic receptors in lung tissue. *J. Allergy Clin. Immunol.* 63, 147
- 136.Marinetti, G.V., Rosenfeld, S.J., Thiem, P.A., Condemi, J.J., Leddy, J.P. (1983): Beta-adrenergic receptors of human leukocytes. *Biochem. Pharmacol.* 32, 2033-2043
- 137.McElligott, M.A., Molenaar, P., Malta, E. (1985): The affinity and efficacy of naturally occurring catecholamines at β -adrenoceptor subtypes. *J. Pharmacy and Pharmacol.* 37, 499-501
- 138.Meurs, H., Van Den Bogaard, W., Kauffman, H.F. and Bruynzeel, P.L.B. (1982): Characterization of (-)-(3H)-dihydroalprenolol binding to intact and broken cell preparations of human peripheral blood lymphocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 85, 185-194

139. Michel, M.C., Beckeringh, J.J., Ikezeno, K., Kretsch, R., Brodde, O.-E. (1986): Lymphocyte β_2 -adrenoceptors mirror precisely beta₂-adrenoceptors but poorly beta₁-adrenoceptor changes in the human heart. *J. Hypertens.* 4 (Suppl. 6), 215-218
140. Michel, M.C., Pingsmann, Beckeringh, J.J., Zerkowski, H.-R., Doetsch, N., Brodde, O.-E. (1988): Selective regulation of beta₁- and beta₂-adrenoceptors in human heart by chronic beta-adrenoceptor antagonist treatment. *Br. J. Pharmacol.* 94, 685-692
141. Michel, M.C., Pingsmann, A., Nohlen, M., Siekmann, U., Brodde, O.-E. (1989): Decreased myometrial β -adrenoceptors in women receiving β_2 -adrenergic tocolytic therapy: Correlation with lymphocytic β -adrenoceptors. *Clin. Pharmacol. Ther.* 45, 1-8
142. Michel, M.C., Feth, F., Sundermann, M., Rascher, W., Brodde, O.-E. (1993): β -Adrenoceptor desensitization in SK-N-MC-cells, a human cell line containing a homogeneous of population of β_1 -adrenoceptors. *J. Auton. Pharmacol.* 13, 425-438
143. Michel, M.C., Knapp, J., Ratjen, H. (1994): Sensitization by dexamethasone of lymphocyte cyclic AMP formation: evidence for increased function of adenylyl cyclase catalyst. *Br. J. Pharmacol.* 113, 240-246
144. Middeke, M., Remien, J., Holzgreve, H. (1984): The influence of sex, age, blood pressure and physical stress on β_2 -adrenoceptor density of mononuclear cells. *J. Hypertension* 2, 261-264
145. Minneman, K.P., Hedberg, A., Molinoff, P.B. (1979): Comparison of beta adrenergic receptor subtypes in mammalian tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 221, 502-508
146. Minneman, K.P., Molinoff, P.B. (1980): Classification and quantitation of β -adrenergic receptor subtypes. *Biochem. Pharmacol.* 29, 1317-1323
147. Minneman, K.P., Pittman, R.N., Molinoff, P.B. (1981): β -Adrenergic receptor subtypes: Properties, deistribution, and regulation. *Annu. Rev. Neurosci.* 4, 419-461
148. Motulsky, H.J., Insel, P.A. (1982): Adrenergic receptors in man: direct identification, physiological regulation and clinical alterations. *N. Engl. J. Med.* 307, 18-29

149. Neve, K.A., McGonigle, P., Molinoff, P.B. (1986): Quantitative analysis of the selectivity of radioligands for subtypes of beta-adrenergic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238, 46-53
150. Newnham, D.M., Coutie, W.J.R., McFarlane, L.C., Lipoworth, B.J. (1993): Comparison of parameters of in vitro lymphocyte β_2 -adrenoceptor function in normal and asthmatic subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 45, 535-538
151. Odore, R., Re, G., Badino, P., Bergamasco, L., Girardi, C. (1999): Modifications in serum catecholamine levels and down-regulation of lymphocyte and cardiac β -adrenoceptors in dogs affected by dilated cardiomyopathy. In: SISVet Annual Meeting, Anno I-vol. 1, Italy, 127
152. O'Hara, N., Brodde, O.-E. (1984): Identical Binding properties of (\pm)- and (-)-¹²⁵Iodocyanopindolol to β_2 -adrenoceptors in intact human lymphocytes. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 272, 24-39
153. O'Hara, N., Daul, A.E., Fesel, R., Siekmann, U., Brodde, O.-E. (1985): Different mechanisms underlying reduced beta₂-adrenoceptor responsiveness in lymphocytes from neonates and old subjects. *Mech. Ageing Dev.* 31, 115-122
154. Parker, C.W., Huber, M.G., Baumann, M.L. (1973): Alterations in cAMP metabolism in human bronchial asthma. III. Leukocyte and lymphocyte responses to steroids. *J. Clin. Invest.* 52, 1342-1348
155. Pitcher, J., Lohse, M.J., Codina, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1992): Desensitization of the isolated β_2 -adrenergic receptor by β -adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms. *Biochemistry* 31, 3193-3197
156. Pitcher, J.A., Freedman, N.J., Lefkowitz, R.J. (1998): G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 653-692
157. Pfeuffer, V.T. (1980): Signal-Transfer vom β -adrenergen Rezeptor auf die Adenylatzyklase. *Drug Res.* 30, 1987-1991

- 158.Rall, T.W., Sutherland, E.W., Berthet, J. (1957): The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase IV: Effect of epinephrine, and glucagon on the reactivation of phosphroylase in liver homogenates. *J. Biol. Chem.* 224, 463-475
- 159.Randall, M.H., Altman, L.J., Lefkowitz, R.J. (1977): Structure and biological activity of (-)-[³H] dihydroalprenolol, a radioligand for studies of beta-adrenergic receptors. *J Med Chem* 20, 1090-1094
- 160.Ratge, D., Hansel-Bessey, S., Wissner, H. (1985): Altered plasma catecholamines and number of α - and β -adrenergic receptors in platelets and leukocytes in hyperthyroid patients normalized under antithyroid treatment. *Acta Endocrinologica* 110, 75-82
- 161.Re, G., Badino, P., Novelli, A., Girardi, C. (1995): Down-regulation of β -adrenergic receptors and up-regulation of oestrogen and progesterone receptors induced in the reproductive system of female veal calves by dietary clenbuterol. *Am. J. Vet. Res.* 56, 1493-1497
- 162.Re, G., Belloli, C., Badino, P., Arioli, F., Novelli, A., Girardi, C., Beretta, C. (1997a): Identification of beta-adrenergic receptor subtypes mediating relaxation in isolated equine ileum. *Am. J. Vet. Res.* 58, 621-625
- 163.Re, G., Badino, P., Novelli, A., Girardi, C. (1997b): Effects of clenbuterol as a repartitioning agent on β -adrenoceptor concentration in heart, bronchi and brain of veal calves. *Vet. J.* 153, 63-70
- 164.Reinhardt, D., Becker, B., Nagel-Hiemke, M., Schiffer, R., Zehmisch, T. (1983): Influence of beta-receptor-agonists and glucocorticoids on alpha- and beta-adrenoceptors of isolated blood cells from asthmatic children. *Pediatr. Pharmacol.* 3, 293-302
- 165.Reinhardt, D., Zehmisch, T., Becker, B., Nagel-H.iemke, M. (1984): Age-dependency of alpha- and beta-adrenoceptors on thrombocytes and lymphocytes of asthmatic and nonasthmatic children. *Eur. J. Pediatr.* 142, 111-116
- 166.Rodbell, M., Krans, H.M., Pohl, S.L., Birnbaumer, L. (1971): The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. 3. Binding of glucagon: method of assay and specificity. *J. Biol. Chem.* 246, 1861-1871

-
167. Roets, E., Burvenich, C. (1987): Isolation of bovine lymphocytes for β_2 -adrenoceptor determination by means of radioligand technique: Some practical implications. *Vet. Q.* 9, 375-377
168. Roets, E., Burvenich, C. (1993): Effect of clenbuterol on beta-adrenoceptors and adenylate cyclase activity in smooth muscle and epithelium of trachea of calves. *Vet. Q.* 15, 180-181
169. Ross, E.M., Gilman, A.G. (1980): Biochemical properties of hormone sensitive adenylate cyclase. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 533-564
170. Sachs, L. (1992): *Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden*, 7. Aufl., Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
171. Sager, G. (1983): Beta-2 adrenergic receptors in intact human erythrocytes. *Biochem. Pharmacol.* 32, 1946-1949
172. Salonen, R.O., Mattila, M.J. (1984): A 24-hour glucocorticoid treatment increases the number of β -adrenoceptors in the rat lung. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 55, 425-428
173. Sandnes, D., Westergren, T., Sand, T.E., Sager, G., Refsnes, M., Christoffersen, T., Jacobsen, S. (1984): A comparison of binding characteristics of the β -adrenoceptor antagonists ^3H -dihydroalprenolol and ^{125}I -iodocyanopindolol in rat liver. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 55, 287-296
174. Sandnes, D., Jacobsen, F.W., Jacobsen, S. (1987): Modes of determining β -adrenoceptor number in human mononuclear leukocytes. *Pharmacol. Toxicol.* 61, 265-270
175. Sano, Y., Watt, G., Townley, B.A., Townley, R.G. (1983): Decreased mononuclear cell beta-adrenergic receptors in bronchial asthma: parallel studies of lymphocyte and granulocyte desensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.* 72, 495-503
176. Sasse, H.H.L. (1971): *Some pulmonary function tests in horses*. Habilschr., Reichsuniversität Utrecht, Niederlande
177. Sasse, H.H.L. (1995) COB Prognose und Behandlungsmaßnahmen: COPD-Prognosis and Therapy. *Prakt. Tierarzt* 76, 66-69

-
- 178.Sauder, R.A., Lenox, W.C., Tobias, J.D., Hirshman, C.A. (1993): Methylprednisolone increases sensitivity to β -adrenergic agonists within 48 hours in basenji greyhounds. *Anesthesiology* 79, 1278-1283
- 179.Scarpace, P.J., Abrass, I.B. (1981): Thyroid hormone regulation of rat heart, lymphocyte, and lung β -adrenergic receptors. *Endocrinology* 108, 1007-1011
- 180.Scatchard, G. (1949): The interaction of proteins for molecules and ions. *Ann. NY Acad. Sci.* 51, 660-672
- 181.Schocken, D.P., Roth, G.S. (1977): Reduced beta-adrenergic receptor concentrations in ageing man. *Nature (London)* 267, 856-858
- 182.Scott, J.S., Berney, C.E., Derksen, F.J., Robinson, N.E. (1991): β -adrenergic receptor activity in ponies with recurrent obstructive pulmonary disease. *Am. J. Vet. Res.* 52, 1417-1422
- 183.Sertl, K., Paietta, E., Meryn, S., Schlick, W., Schwarzmeier, J.D. (1986): Effects of prednisolone on beta-adrenergic desensitization of normal peripheral lymphocytes. *W. Klin. Wochenschr.* 98 (14), 445-449
- 184.Sibley, D.R., Peters, J.R., Nambi, P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1984): Desensitization of turkey erythrocyte adenylate cyclase: β -Adrenergic receptor phosphorylation is correlated with attenuation of adenylate cyclase activity. *J. Biol. Chem.* 259, 9742-9749
- 185.Sibley, D.R., Strasser, R.H., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1985): Homologous desensitization of adenylate cyclase is associated with phosphorylation of the β -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 260, 3883-3886
- 186.Stadel, J.M., Lefkowitz, R.J. (1991): Beta-Adrenergic Receptors: Identification and characterization by radioligand binding studies. In: *The Beta-Adrenergic Receptors*. Ed. John P. Perkins, The Humana Press Inc., 1-40

-
187. Staehelin, M., Simons, P., Jaeggi, K., Wigger, N. (1983): [³H]CGP 12177: A hydrophilic β -adrenergic receptor radioligand reveals high affinity binding of agonists to intact cells. *J. Biol. Chem.* 258, 3496-3502
188. Staehelin, M., Hertel, C. (1983): [³H]CGP 12177, a beta-adrenergic ligand suitable for measuring cell surface receptors. *J. Recept. Res.* 3, 35-43
189. Strasser, R.H., Sibley, D.R., Lefkowitz, R.J. (1986): A novel catecholamine-activated cyclic 3',5'-phosphate independent pathway for β -adrenergic receptor phosphorylation in wild-type and mutant S₄₉ lymphoma cells: Mechanisms of homologous desensitization of adenylate cyclase. *Biochemistry* 25, 1371-1377
190. Stiles, G.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1984): β -Adrenergic receptors: biochemical mechanisms of physiological regulation. *Physiol. Rev.* 64, 661-743
191. Stiles, G.L., Lefkowitz, R.J. (1984): Cardiac adrenergic receptors. *Ann. Rev. Med.* 35, 149-164
192. Sutherland, E.W., Rall, T.W., Menon, T. (1963): Adenyl cyclase I. Distribution, preparation and properties. *J. Biol. Chem.* 237, 1220-1227
193. Szentivanyi, A. (1968): The beta-adrenergic theory of the atopic abnormality in bronchial asthma. *J. Allergy* 42, 203-232
194. Szentivanyi, A. (1980): The radioligand binding approach in the study of lymphocytic adrenoceptors and the constitutional basis of atopy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 65, 5-11
195. Tashkin, D.P., Conolly, M.E., Deutsch, R.I., Hui, K.K., 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
196. Tittelbach, V., Volff, J.-N., Giray, J., Ratge, D., Wisser, H. (1998): Agonist-induced down-regulation of the β_2 -adrenoceptor and its mRNA in human mononuclear leukocytes. *Biochem. Pharmacol.* 56, 967-975
197. Tohmeh, J.F., Cryer, P.E. (1980): Biphasic adrenergic modulation of β -adrenergic receptors in man. *J. Clin. Invest.* 65, 836-840

-
198. Torneke, K., Larsson, I., Appelgren, L.E. (1998): A comparison between clenbuterol, salbutamol and terbutaline in relation to receptor binding and in vitro relaxation of equine tracheal muscle. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 21, 388-92
199. Torneke, K. (1999): Beta-adrenoceptors in equine trachea and heart. *Vet. Res. Commun.* 23, 41-51
200. Ungemach, F.R. (1999): Pharmakotherapie des Respirationstrakts. In: Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren (4. Auflage), Löscher, W., Ungemach, F.R., Kroker, R. (Hrsg.), Paul Parey, Berlin, 178-185
201. Vermeir, M., Roets, E. and Burvenich, C. (1993): [³H]CGP-12177 binding to β -adrenoceptors of intact bovine mononuclear leukocytes. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 321, 103-111
202. Werner, C., Poller, U., Brodde, O.-E. (1997): Chronic terbutaline treatment desensitizes β -adrenergic inhibition of lymphocyte activation in healthy volunteers. *J. Auton. Pharmacol.* 17, 237-242
203. Wiemer, G., Reinhardt, M., Wellstein, A., Palm, D. (1981): Differentiation between agonist binding and antagonist binding at β -adrenoceptors of rat erythrocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 316, Suppl. R32
204. Williams, R.S., Eden, R.S., Moll, M.E., Lester, R.M., Wallace, A.G. (1981): Autonomic mechanisms of training bradycardia: β -adrenergic receptors in humans. *J. Appl. Physiol.* 51, 1232-1237
205. Williams, L.T., Synderman, R., Lefkowitz, R.J. (1976): Identification of β -adrenergic receptors in human lymphocytes by (-)[³H] alprenolol binding. *J. Clin. Invest.* 57, 149-155