

**AUS DEM DEPARTEMENT FÜR VETERINÄRWISSENSCHAFTEN  
DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT  
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

ANGEFERTIGT UNTER DER LEITUNG VON: UNIV.-PROF. DR. HERMANN AMMER

**KLONIERUNG UND PHARMAKOLOGISCHE  
CHARAKTERISIERUNG DES EQUINEN HISTAMIN H4  
REZEPTORS**

INAUGURAL-DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DER TIERMEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE  
DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

VON  
FLORIAN FISCHER  
AUS BOCHUM

MÜNCHEN 2011

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Korreferent: \_\_\_\_\_

Tag der Promotion: 12.02.2011

*Für meine Familie*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>2</b>
<b>1.</b>	<b>G-Protein gekoppelte Rezeptoren - der Histamin H<sub>4</sub> Rezeptor ..</b>	<b>2</b>
1.1.	G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	3
1.2.	Inhibierung der Adenylylcyclase und Aktivierung der Mitogen- aktivierten Proteinkinasen .....	5
<b>2.</b>	<b>Histamin und Antihistaminika.....</b>	<b>8</b>
2.1.	Synthese und Abbau von Histamin .....	8
<b>3.</b>	<b>Histaminrezeptoren und Wirkungen von Histamin .....</b>	<b>9</b>
3.1.	Der Histamin H <sub>1</sub> Rezeptor .....	9
3.2.	Der Histamin H <sub>2</sub> Rezeptor .....	10
3.3.	Der Histamin H <sub>3</sub> Rezeptor .....	10
3.4.	Der Histamin H <sub>4</sub> Rezeptor .....	11
3.4.1.	Identifizierung des H <sub>4</sub> R .....	11
3.4.2.	Pharmakologische Charakterisierung des H <sub>4</sub> R .....	12
3.4.3.	Biologische Funktion des H <sub>4</sub> R.....	15
3.4.4.	Bindungseigenschaften des H <sub>4</sub> R.....	17
<b>III.</b>	<b>FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>20</b>
<b>IV.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
<b>1.</b>	<b>Material .....</b>	<b>21</b>
1.1.	Geräte .....	21
1.2.	Verbrauchsgegenstände .....	22
1.3.	Chemikalien .....	22
1.4.	Verwendete DNA und Antikörper .....	24
<b>2.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>24</b>
2.1.	Klonierung und Sequenzierung des equinen H <sub>4</sub> R.....	24
2.1.1.	Auswahl der spezifischen Primer .....	25
2.1.1.1.	GAPDH .....	25
2.1.1.2.	Klonierungsprimer.....	25

---

2.1.1.2.1.	Equiner H <sub>4</sub> Rezeptor .....	25
2.1.1.2.2.	Humaner H <sub>4</sub> Rezeptor .....	27
2.1.2.	mRNA-Isolierung.....	27
2.1.3.	cDNA-Synthese.....	28
2.1.4.	PCR-Versuche .....	29
2.1.4.1.	Agarose Gelelektrophorese .....	29
2.1.4.2.	GAPDH-PCR .....	30
2.1.4.3.	eH <sub>4</sub> R-PCR zur Amplifizierung und Sequenzierung .....	31
2.1.4.4.	Epitop-Tagging des eH <sub>4</sub> R .....	32
2.1.4.5.	Epitop-Tagging des hH <sub>4</sub> R .....	33
2.1.4.6.	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	34
2.1.5.	Klonierung und Transformation der PCR-Produkte.....	35
2.1.5.1.	Klonierung und Transformation der eH <sub>4</sub> R PCR-Produkte.....	36
2.1.5.2.	Klonierung und Transformation der hH <sub>4</sub> R PCR-Produkte.....	38
2.1.6.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> zur Transformation .....	39
2.1.7.	Transformation .....	40
2.1.8.	Aufreinigung der Plasmide .....	41
<b>3.</b>	<b>Zellkultur .....</b>	<b>42</b>
3.1.	Zellmodell.....	42
3.2.	Transfektion der HEK293 und der COS-7 Zellen .....	44
3.3.	Selektion nach der Transfektion.....	44
3.4.	Kryokonservierung .....	44
3.5.	Membranpräparation für Bindungsstudien .....	45
<b>4.</b>	<b>Pharmakologische Untersuchungen .....</b>	<b>46</b>
4.1.	Radioligandenbindungsstudien .....	46
4.1.1.	Verdrängungsexperimente.....	46
4.1.1.1.	Homologe Verdrängungsexperimente.....	47
4.1.1.2.	Heterologe Verdrängungsexperimente .....	47
4.2.	Quantifizierung des Proteingehalts nach Lowry .....	50
4.3.	Proteinbestimmung im Westernblot .....	51
4.3.1.	Qualitativer Rezeptornachweis .....	52
4.3.2.	Bestimmung der MAP-Kinase-Aktivität .....	56
4.4.	Regulation der Adenylylcyclase .....	57
<b>V.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>62</b>

<b>1.</b>	<b>Klonierung der Rezeptoren .....</b>	<b>62</b>
1.1.	Überprüfung der cDNA.....	62
1.2.	Amplifizierung und Sequenzierung des eH <sub>4</sub> R .....	62
1.3.	Vergleich der Proteinsequenzen .....	65
1.4.	Epitop-Tagging der equinen und humanen Rezeptoren und Expression in HEK293 Zellen .....	68
1.5.	Expression des eH <sub>4</sub> R und des hH <sub>4</sub> R in HEK293 Zellen .....	70
<b>2.</b>	<b>Charakterisierung der Rezeptoren .....</b>	<b>71</b>
2.1.	Biochemische Charakterisierung im Westernblot.....	71
2.2.	Pharmakologische Charakterisierung .....	72
2.2.1.	Homologe Verdrängung von <sup>3</sup> H-Histamin durch Histamin .....	72
2.2.2.	Homologe Verdrängung von <sup>3</sup> H-Pyrlamin mit Pyrlamin .....	73
2.2.3.	Heterologe Verdrängung von <sup>3</sup> H-Pyrlamin mit JNJ7777120 .....	73
2.2.4.	Heterologe Verdrängung von <sup>3</sup> H-Pyrlamin mit Thioperamid.....	74
2.2.5.	Heterologe Verdrängung von <sup>3</sup> H-Pyrlamin mit Diphenhydramin....	75
2.3.	Regulation der MAP-Kinase.....	76
2.4.	Regulation der Adenylylcyclase .....	77
2.4.1.	Regulation der Adenylylcyclase in eH6-Zellen .....	78
2.4.2.	Regulation der Adenylylcyclase in hH8-Zellen .....	79
<b>VI.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>80</b>
<b>1.</b>	<b>Klonierung des eH<sub>4</sub>R .....</b>	<b>81</b>
<b>2.</b>	<b>Vergleich der Aminosäuresequenzen .....</b>	<b>82</b>
<b>3.</b>	<b>Expression von eH<sub>4</sub>R und hH<sub>4</sub>R in HEK293 und COS-7 Zellen</b>	<b>83</b>
<b>4.</b>	<b>Bindungseigenschaften des eH<sub>4</sub>R.....</b>	<b>84</b>
<b>5.</b>	<b>Regulation der Adenylylcyclase durch Histamin .....</b>	<b>84</b>
<b>6.</b>	<b>Regulation der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen.....</b>	<b>85</b>
<b>7.</b>	<b>Pharmakologische Besonderheiten des eH<sub>4</sub>R.....</b>	<b>86</b>
<b>VII.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>88</b>
<b>VIII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>90</b>
<b>IX.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>92</b>

---

<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>99</b>
-----------	-------------------------	-----------

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

A. dest./bidest.	Aqua destillata / bidestillata
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adeonsin Monophosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleotide
GAPDH	Glycerinaldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HCl	Salzsäure
kDa	Kilodalton
KLH	keyhole limpet hemocyanine
Lsg.	Lösung
min	Minute
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction
PEI	Polyethylenimin
rpm	revolutions per minute
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMCC	Succinimidyl-4-(N- maleimidomethyl)cyclohexan

T<sub>m</sub>

Schmelztemperatur

TM

Transmembrane Domäne

## I. EINLEITUNG

Histamin nimmt bei vielen allergischen Reaktionen eine wichtige Rolle ein. Die Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen hat unter anderem die Entwicklung verschiedener Antihistaminika ermöglicht, die heute vielfach mit gutem Erfolg klinisch angewendet werden. So ist die symptomatische Therapie der allergischen Rhinitis ohne Weiteres kostengünstig möglich. Andere Krankheiten, wie Asthma oder die Atoptische Dermatitis sind dagegen weniger gut therapierbar. Aufgrund seiner Lokalisation und seines Expressionsmusters in Zellen des Immunsystems, stellt der kürzlich klonierte  $H_4R$  einen vielversprechenden Ansatzpunkt für neue Therapiestrategien für allergische Krankheiten dar. Antagonisten an diesem Rezeptor könnten die derzeit unbefriedigende und nebenwirkungsreiche Behandlung von Asthma mit Glukokortikoiden oder  $\beta_2$ -Adrenozeptoragonisten ablösen.

Beim Pferd stellt die Behandlung der Recurrent Airway Obstruction (RAO) ein ebenso großes Problem dar, das mit den derzeit zur Verfügung stehenden Antihistaminika nicht befriedigend behandelt werden kann. Obgleich die RAO selten mit Anfällen von akuter Atemnot einhergeht, ähnelt sie in Pathogenese und Therapie dem Asthma des Menschen.

In der vorliegenden Arbeit soll daher der equine  $H_4R$  kloniert und einer ersten pharmakologischen Charakterisierung unterzogen werden. Die gewonnenen Ergebnisse liefern die Voraussetzung für weitergehende Studien zur Beteiligung des  $H_4R$  bei allergischen Erkrankungen des Pferdes und zur Entwicklung neuer spezifischer Antihistaminika.

## **II. LITERATUR**

### **1. G-Protein gekoppelte Rezeptoren - der Histamin H<sub>4</sub> Rezeptor**

Histamin [2-(4-Imidazolyl)ethylamin] ist ein bedeutender chemischer Mediator, der an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen im Körper beteiligt ist. Es vermittelt seine Wirkung durch die Stimulation der vier bekannten Histaminrezeptoren, die alle zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören (Hough, 2001).

Antagonisten am Histamin H<sub>1</sub> Rezeptor (H<sub>1</sub>R) werden erfolgreich zur Behandlung von Allergien verwendet, während Antagonisten am Histamin H<sub>2</sub> Rezeptor zur Behandlung der Hyperazidität eingesetzt werden (Parsons und Ganellin 2006). Aufgrund einer wachsenden Anzahl von Hinweisen, dass die längerfristige Verabreichung von H<sub>2</sub>R-Blockern bei Notfallpatienten durch bakterielle Translokation im oberen Gastrointestinaltrakt systemische Infektionen auslösen kann, wird diese Stoffgruppe derzeit von Hemmstoffen der Protonenpumpe verdrängt (O'Keefe et al., 1998; Duan et al., 2010).

Im Rahmen von derzeit laufenden oder bereits abgeschlossenen klinischen Studien wird der Nutzen von Histamin H<sub>3</sub>R-Blockern bei der Behandlung von Erkrankungen des Zentralnervensystems wie der kognitiven Dysfunktion, Schlafstörungen, Schmerz und Adipositas, abgeschätzt (Gemkow et al., 2009).

Der humane Histamin H<sub>4</sub> Rezeptor (H<sub>4</sub>R) ist als Letzter der vier bekannten Subtypen in der Histaminrezeptorfamilie identifiziert und charakterisiert worden (Oda et al., 2000; Hough, 2001). Bisher konnten der H<sub>4</sub>R des Menschen sowie der des Hundes, der Maus, der Ratte, des Javaneraffen, des Meerschweinchens und des Schweins kloniert und charakterisiert werden (Liu et al., 2001; Oda et al., 2002; Oda et al., 2005; Jiang et al., 2008). Strukturvergleiche zeigen, dass wenig Übereinstimmung zwischen

den Varianten der einzelnen Spezies und dem H<sub>4</sub>R des Menschen besteht (65 - 71 %). Eine Ausnahme ist hier die Aminosäuresequenz des H<sub>4</sub>R des Javaneraffen, die eine 91%ige Übereinstimmung mit der des Menschen aufweist (Lim et al., 2010).

### 1.1. G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Alle Eukaryoten besitzen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Diese bilden die größte Gruppe der Zelloberflächenrezeptoren. Sie sind an der Übertragung fast aller von außerhalb des Organismus kommenden Signale beteiligt. Auch die meisten körpereigenen Signalwege werden über GPCRs bestritten. Als Beispiele hierzu sind unter anderem der Geschmackssinn, das Sehvermögen, aber auch Opioid- und Histaminrezeptoren zu nennen (Alberts et al., 2008).

Über 50 Prozent aller bekannten Medikamente wirken über GPCRs oder greifen in G-Protein-vermittelte Signalwege ein

Allein der Mensch verfügt über circa 700 verschiedene Gene für GPCRs, wobei sich die Rezeptoren dennoch in ihrem Grundaufbau gleichen. Sie bestehen stets aus einer einzelnen Polypeptidkette, die sich in sieben

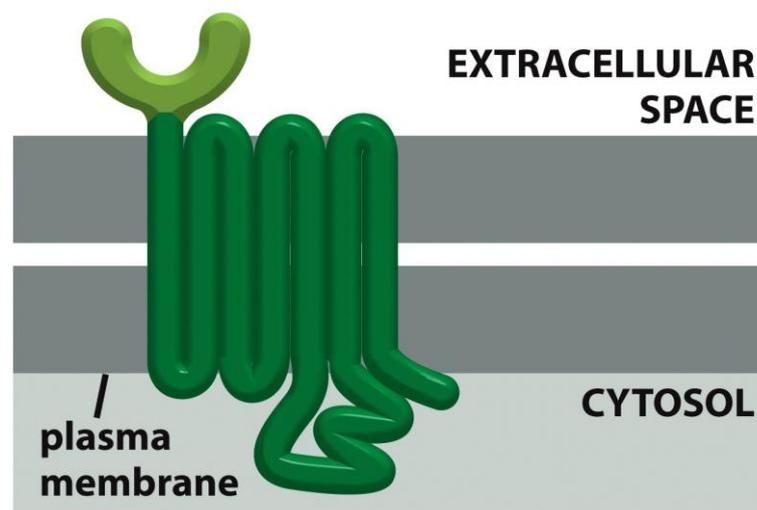


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (aus: Molecular Biology of THE CELL, 2008, 5. Auflage).

transmembranen Domänen, abgeschlossen durch eine extrazelluläre Aminogruppe und ein intrazelluläres Carboxylende, durch die Zellmembran windet. Die dritte intrazelluläre Schleife (3. IL) koppelt an die assoziierten G-Proteine und ist für die Signalweiterleitung verantwortlich.

Dockt ein Signalmolekül an einen GPCR an, so verändert sich die Konformation seiner intrazellulären Domänen. Diese aktivieren das assoziierte G-Protein, wodurch in der  $\alpha$ -Untereinheit GDP zu GTP ausgetauscht wird. Daraufhin dissoziiert die  $\alpha$ -Untereinheit vom  $\beta\gamma$ -Komplex, die beide nachfolgend die Aktivität verschiedener Effektorproteine regulieren können. Solange das Signalmolekül am GPCR gebunden bleibt, kann dieser weitere G-Proteine aktivieren.

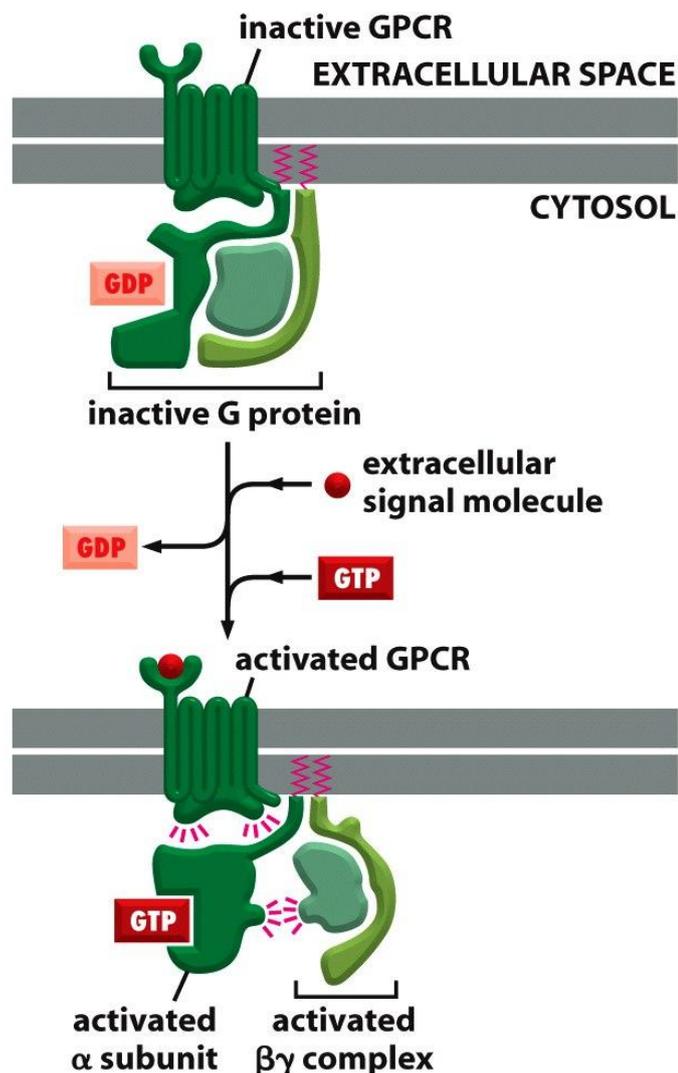


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aktivierung eines G-Proteins durch einen aktivierten GPCR (aus: Molecular Biology of THE CELL, 2008, 5. Auflage).

## 1.2. Inhibierung der Adenylylcyclase und Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen

Trotz dieses gemeinsamen Grundbauplanes gibt es große funktionelle Unterschiede zwischen den verschiedenen GPCRs (Boyer, Slesinger 2010). Bezogen auf den Aufbau der  $\alpha$ -Untereinheit werden G-Proteine in vier verschiedene Familien unterteilt. So umfasst Familie I die  $G_s$ -Proteine, deren  $G\alpha$ -Untereinheiten zu einer Aktivierung der Adenylylcyclasen führen. Im Gegensatz dazu rufen inhibitorische  $G_{i/o}$ -Proteine eine Hemmung der Adenylylcyclasen hervor (Klasse II).  $G_q$ -Proteine hingegen vermitteln eine Aktivierung der Phospholipase C- $\beta$  (Klasse III). In Klasse IV sind vor allem die  $G_{12/13}$  G-Proteine zu nennen, die über die  $\alpha$ -Untereinheit monomere GTPasen aus der Rho Familie aktivieren und so das Aktin-Zellgerüst regulieren (Alberts et al., 2008).

Der  $H_4R$  koppelt charakteristischerweise an  $G\alpha_{i/o}$  Proteine. Dies führt in  $H_4R$ -transfizierten Zellen zu einer Absenkung der intrazellulären cAMP-Konzentration (Thurmond et al., 2008). Neben einer Hemmung der Adenylylcyclasen ist der  $H_4R$  für die Stimulation der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-kinasen) verantwortlich (Oda et al., 2000; Morse et al., 2001).

Bei den Adenylylcyclasen handelt es sich um integrale membranständige Proteine, welche unter Verbrauch von ATP und Abspaltung von Diphosphat die Bildung des Second Messengers cAMP katalysieren. Bisher sind beim Säuger neun verschiedene Adenylylcyclasen bekannt (Mou et al., 2006). Die katalytische Umsetzung von ATP zu cAMP durch Adenylylcyclasen ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

Abbildung 4 zeigt den strukturellen Aufbau einer Adenylylcyclase vom Typ 1. Gut zu erkennen ist die Bindungsstelle für  $G_{i\alpha}$  Proteine, die für die Hemmung der katalytischen Aktivität der Adenylylcyclasen verantwortlich ist (Hurley, 1999).

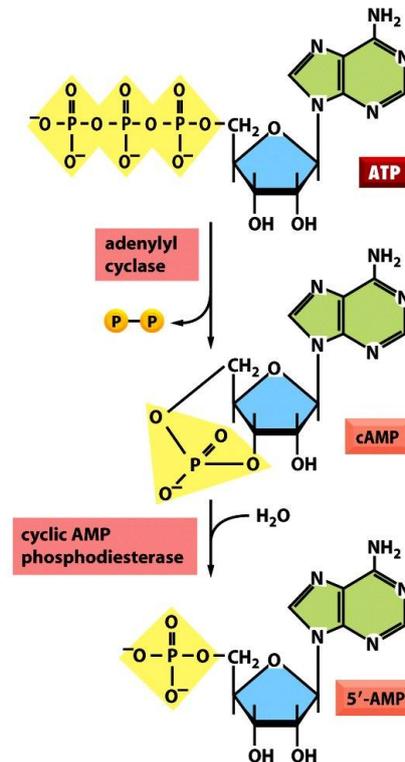


Abbildung 3: Katalytische Umsetzung von ATP zu cAMP (aus: Molecular Biology of The CELL, 2008, 5. Auflage).

Um Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose von Zellen einzuleiten, müssen Informationen zum Nucleus gelangen. Dabei sind eine Vielzahl an übermittelnden Faktoren beteiligt. Zu den wichtigsten Signalübertragungswegen für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gehören die MAP-Kinasen (Kholodenko und Birtwistle 2009). Dem voraus geht die Aktivierung des membranständigen Ras-Proteins. Über eine mehrstufige Kaskade von gegenseitiger Phosphorylierung und Dephosphorylierung wird die MAP-KK Kinase (Raf) über die MAP-K Kinase (Mek) zur MAP-Kinase (Erk1/2) aktiviert, welche nun ihrerseits verschiedene Proteine phosphoryliert. Hierbei handelt es sich als Antwort auf den zugrundeliegenden Stimulus am Ras Protein um weitere Kinasen oder um Gen-regulierende Proteine im Zellkern (Jeffrey et al., 2007; Alberts et al., 2008). Dieser fundamentale Signalübertragungsweg ist spezieübergreifend und kommt von Hefezellen über Nematoden bis zum Säuger vor (Kholodenko und Birtwistle 2009).

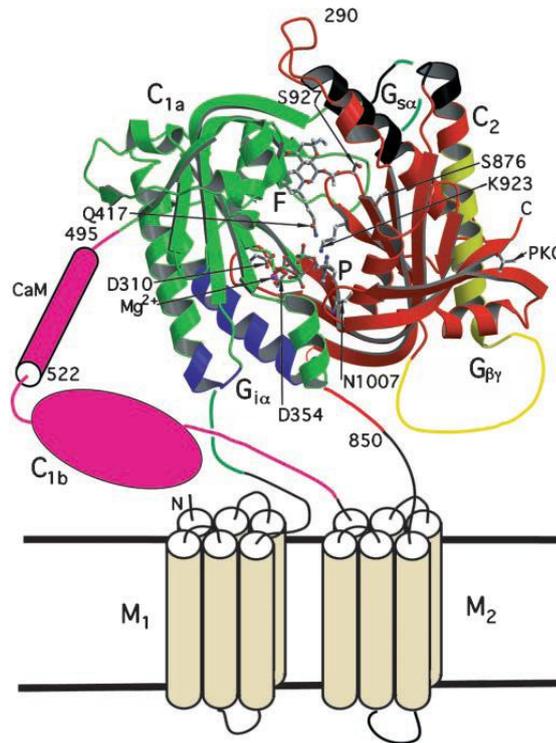


Abbildung 4: Strukturelle Darstellung der Adenylylcyclase Typ 1. Zu erkennen sind die Bindungsstellen für  $G_{s\alpha}$  und  $G_{\beta\gamma}$  an der C2- sowie von  $G_{i\alpha}$  an der C1-Domäne (aus: Hurley. 1999).

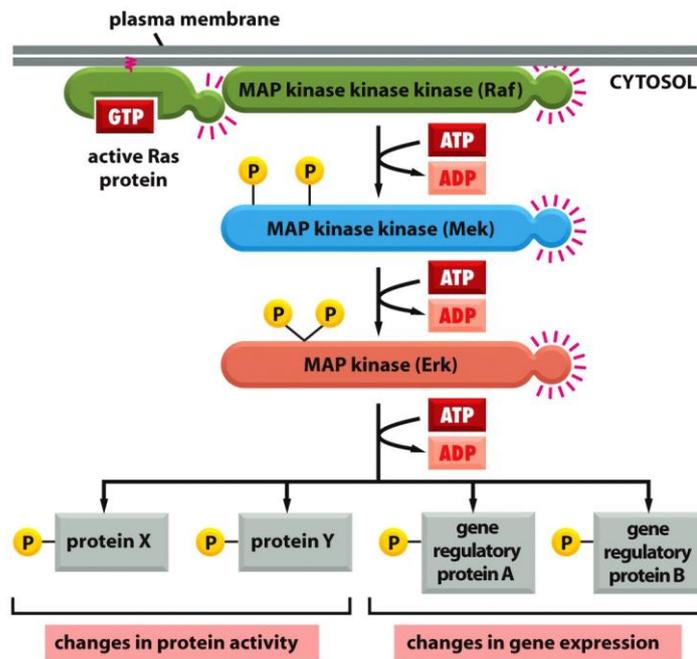


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Ras-aktivierten Phosphorylierung der MAP-Kinasen (aus: Molecular Biology of THE CELL, 2008, 5. Auflage).

Abbildung 5 illustriert beispielhaft die Signalübertragung vom aktivierten Ras zu den genregulierenden Proteinen einerseits sowie den proteinregulierenden Proteinen andererseits.

## 2. Histamin und Antihistaminika

Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts isolierte Sir Henry Dale als Erster die Substanz Histamin aus *Claviceps purpurea*. Wenig später wurde Histamin als ein Mediator biologischer Vorgänge identifiziert (Dale und Laidlaw 1919). Medikamente, die auf die verschiedenen Histaminrezeptoren abzielen, sind seit über 60 Jahren auf dem Markt.

Die verschiedenen Wirkungen von Histamin werden über die vier derzeit bekannten Histaminrezeptoren (H<sub>1</sub>R bis H<sub>4</sub>R) vermittelt.

### 2.1. Synthese und Abbau von Histamin

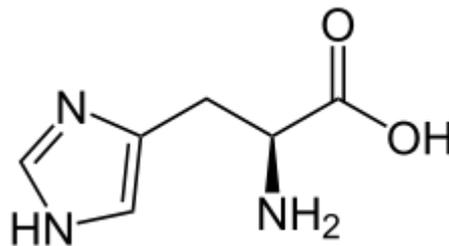


Abbildung 6: Strukturformel von L-Histidin

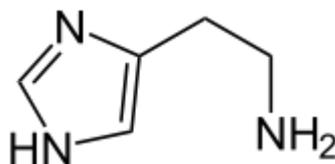


Abbildung 7: Strukturformel von Histamin

Histamin wird durch das Einwirken der L-Histidin-Decarboxylase aus L-Histidin synthetisiert. Danach wird es an Heparin gebunden in Vesikeln

von Mastzellen und basophilen Granulozyten gespeichert.

Histamin kann entweder durch die Diaminoxidase oder durch die Histamin-Methyltransferase metabolisiert werden. Im Falle des Abbaus durch die Diaminoxidase wird der Stickstoff in Position 1 des Imidazolrings oxidativ desaminiert. Das Enzym Histamin-Methyltransferase fügt an eben dieser Stelle eine Methylgruppe ein.

Die Halbwertszeit von Histamin beträgt bei der Ratte weniger als 10 Sekunden und 20 bis 30 Sekunden beim Hund (Parsons und Ganellin, 2006).

### **3. Histaminrezeptoren und Wirkungen von Histamin**

Im Entzündungsgeschehen, bei anaphylaktischen und anaphylaktoiden Reaktionen wird Histamin aus Mastzellen und basophilen Granulozyten freigesetzt. Gut erforscht sind die Wirkungen von Histamin bei Entzündungen, zur Magensäuresekretion und als Neurotransmitter (siehe 1).

#### **3.1. Der Histamin H<sub>1</sub> Rezeptor**

Der H<sub>1</sub>R wurde bisher in vielen Geweben, insbesondere in Nervenzellen, glatten Muskelzellen der Atemwege und der Gefäße, Hepatozyten, Chondrozyten, Endothelzellen, Epithelzellen, neutrophilen- und eosinophilen Granulozyten, Monozyten, T- und B-Zellen nachgewiesen.

Histamin kann H<sub>1</sub>R-vermittelt zur Vasodilatation in Meningeal- und Cerebralarterien führen (Jansen-Olesen et al., 1997). Daneshmand et al. (2004) konnten zeigen, dass sich Radial- und Intrathorakalarterien H<sub>1</sub>R-vermittelt unter dem Einfluss von Histamin kontrahieren. Durch Dilatation peripherer Gefäße können dagegen Blutdruckabfall mit Tachykardie und Angstzustände ausgelöst werden.

Die größte Bedeutung kommt den H<sub>1</sub>R-Antagonisten wohl in der symptomatischen Therapie der Allergie vom Typ I zu (Simons, 2004).

### **3.2. Der Histamin H<sub>2</sub> Rezeptor**

Dieser Rezeptor kommt, wie auch der H<sub>1</sub>R, in fast allen Körpergeweben vor. Die von ihnen dort eingenommene Rolle ist allerdings noch nicht vollständig geklärt (Wendorff, 2008). Nachgewiesen wurde der H<sub>2</sub>R in Nervenzellen, in der glatten Muskulatur der Atemwege und der Gefäße, in Hepatozyten, Chondrozyten, Endothelzellen, Epithelzellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Monozyten, T- und B-Zellen (Akdis und Blaser, 2003).

Am besten erforscht ist die Wirkung von Histamin am H<sub>2</sub>R im Magen, wo H<sub>2</sub>R-Antagonisten zur Hemmung der Magensäureproduktion angewendet werden (Parsons und Ganellin 2006).

Hohe Dosen von Histamin hemmen die Chemotaxis von eosinophilen Granulozyten durch Interaktion mit dem H<sub>2</sub>R (Clark et al., 1977). Der H<sub>2</sub>R ist ebenfalls auf Mastzellen und basophilen Granulozyten zu finden, wo er als Autorezeptor die Freisetzung von Histamin hemmt (Hill et al., 1997).

Ebenfalls beschrieben ist die Relaxation von glatter Muskulatur durch H<sub>2</sub>R-induzierte Signalwege (Martinez-Mir et al., 1992).

### **3.3. Der Histamin H<sub>3</sub> Rezeptor**

Der H<sub>3</sub>R ist bisher vor allem im zentralen und peripheren Nervensystem nachgewiesen worden, wo er ebenfalls als Autorezeptor die Histaminfreisetzung inhibiert (Arrang et al., 1983). Auf zellulärer Ebene geht dieser Effekt mit einer Hemmung der Adenylylcyclase und der Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> sowie einer Stimulation der MAP-Kinasen einher (Akdis und Blaser, 2003). Auch am Herzen, im Magen und in der Lunge

konnte der H<sub>3</sub>R, wenn auch in geringen Mengen, identifiziert werden. In der Lunge verhindert er eine übermäßige Bronchokonstriktion (Akdis und Blaser, 2006). Antagonisten am H<sub>3</sub>R scheinen durch die Beeinflussung des cholinergen Systems in die kognitiven Funktionen des ZNS einzugreifen. Histamin ist die bedeutendste wachmachende Substanz im ZNS. So zeigen Studien, dass H<sub>3</sub>R-Antagonisten zur Behandlung der Narkolepsie in Frage kommen. Sie sind dabei in der Lage, die Anzahl und Dauer von Schlafattacken in einem Hunde-Narkolepsiemodell zu reduzieren (Leurs et al., 2005; Gemkow et al., 2009). Als einer der wichtigsten Mediatoren für lokale Entzündungsreaktionen ist Histamin in die lokalen und zentralen Schmerzmechanismen involviert. Es gibt Hinweise darauf, dass eine schmerzlindernde Wirkung sowohl von H<sub>3</sub>R-Antagonisten (GSK207040) (Medhurst et al., 2007) als auch von H<sub>3</sub>R-Agonisten (Immepip) (Cannon und Hough, 2005) vermittelt werden kann.

### **3.4. Der Histamin H<sub>4</sub> Rezeptor**

#### **3.4.1. Identifizierung des H<sub>4</sub>R**

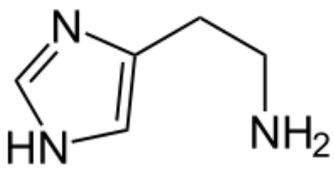
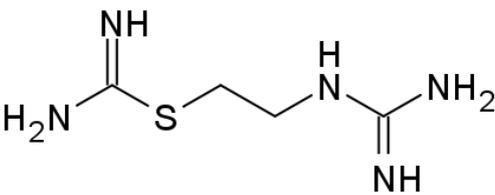
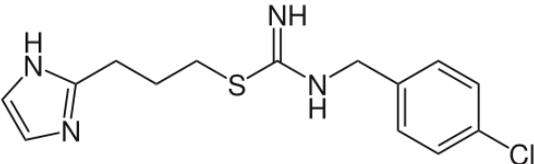
Im Jahr 2000 klonierten und charakterisierten mehrere Forschergruppen unabhängig voneinander einen vierten Histaminrezeptor des Menschen (Oda et al., 2000; Nakamura et al., 2000; Nguyen et al., 2001) - den hH<sub>4</sub>R. Wenige Zeit später erfolgte die Klonierung und Charakterisierung dieses Rezeptortyps bei Hund, Maus, Ratte, Javaneraffe, Meerschweinchen und Schwein (Liu et al., 2001; Oda et al., 2002; Oda et al., 2005; Jiang et al., 2008). Der H<sub>4</sub>R wurde bislang im Knochenmark, in peripheren hämatopoetischen Zellen, in eosinophilen (Liu et al., 2001), neutrophilen und basophilen Granulozyten, T-Zellen und Mastzellen nachgewiesen (Hofstra et al., 2003; Jiang et al., 2008). In niedrigen Expressionsraten wurde der H<sub>4</sub>R ebenfalls in Thymus, Milz, Dünndarm und Colon nachgewiesen (Oda et al., 2000). Der Nachweis des H<sub>4</sub>R wird dadurch erschwert, dass er kaum im gesunden Gewebe exprimiert wird (Morse et al., 2001). Cogé wies eine hohe Expression von Rezeptor-mRNA im entzündeten Gewebe von Lunge, Leber und Milz und eine niedrige

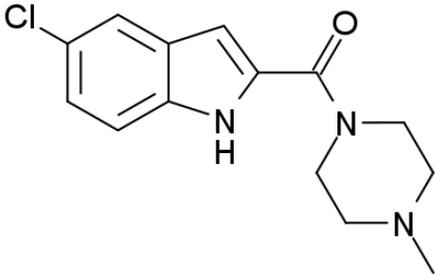
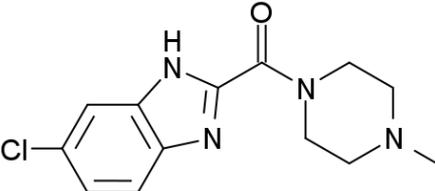
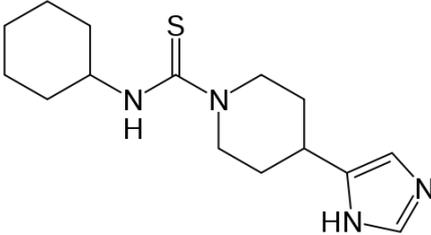
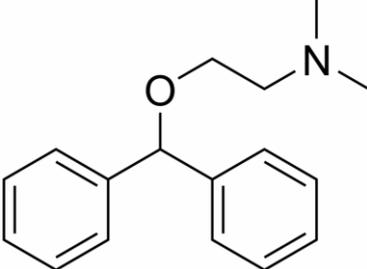
Expressionsrate im Gehirn nach (Coge et al., 2001).

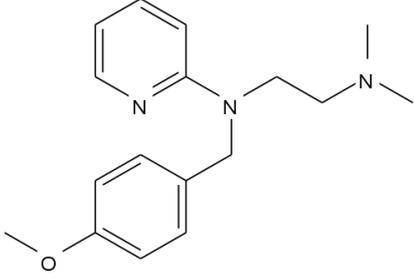
Auffallend ist, dass der H<sub>4</sub>R vor allem in Zellen des Immunsystems exprimiert wird, weswegen er eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen und bei der Immunantwort zu haben scheint. Besonders häufig wird der H<sub>4</sub>R in T-Zellen, in Mastzellen, in basophilen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie im Knochenmark exprimiert (Oda et al., 2000; Gutzmer et al., 2005).

### 3.4.2. Pharmakologische Charakterisierung des H<sub>4</sub>R

Für pharmakologische Studien am H<sub>4</sub>R stehen derzeit unter anderem folgende Agonisten und Antagonisten zur Verfügung.

Zusammenstellung verschiedener H <sub>4</sub> R Liganden		
Ligand	Wirkung	Referenz
 Histamin	Agonist	(Lim et al., 2005)
 VUF 8430	Agonist	(Lim et al., 2006)
 Clobenpropit	Agonist	(Buckland et al., 2003; Lim et al., 2009)

 <p>JNJ7777120</p>	Antagonist	(Thurmond et al., 2004; Zampeli et al., 2009)
 <p>VUF 6002</p>	Antagonist	(Terzioglu et al., 2004)
 <p>Thioperamid</p>	inverser Agonist	(Takeshita et al., 2003)
 <p>Diphenhydramin</p>	Antagonist ?	(Booth et al., 2002)

 <p>Pylaridin</p>	Antagonist	(Nguyen et al., 2001)
--	------------	-----------------------

Die Affinität von Histamin zum  $H_4R$  ( $K_D$ ) wurde mittels Radioligandenbindungsstudien ermittelt und zeigt, wie in der folgenden Tabelle zum Vergleich aufgeführt, starke speziesspezifische Unterschiede. So weist Histamin zum humanen  $H_4R$  und zu dem von *Macaca fascicularis* eine weitaus höhere Affinität auf als zum  $H_4R$  der Ratte oder der Maus.

Spezies	$K_D$ (nM)	Referenz
Homo sapiens	4,8	(Liu et al., 2001)
Canis familiaris	17,8	(Jiang et al., 2008)
Macaca fascicularis	3,0	(Jiang et al., 2008)
Sus scrofa	4,4	(Oda et al., 2002)
Cavia porcellus	6,0	(Liu et al., 2001)
Rattus norvegicus	136,0	(Liu et al., 2001)
Mus musculus	42,0	(Liu et al., 2001)

Die Affinitäten gebräuchlicher Agonisten und Antagonisten am  $hH_4R$  sind in folgender Tabelle vergleichend aufgeführt:

Ligand	pKi	Referenz
VUF 8430 (Agonist)	7,5	(Lim et al., 2006)
Clobenpropit (Antagonist)	7,2	(Liu et al., 2001)

JNJ7777120 (Antagonist)	8,3	(Thurmond et al., 2004)
VUF 6002 (Antagonist)	7,7	(Terzioglu et al., 2004)
Thioperamid (Antagonist)	7,6	(Liu et al., 2001)
Diphenhydramin (hH <sub>1</sub> R- Antagonist)	7,1	(Booth et al., 2002)
Pyrilamin	7,5 (K <sub>D</sub> ; nM)	(Nguyen et al., 2001)

### 3.4.3. Biologische Funktion des H<sub>4</sub>R

In in-vitro Versuchen konnte gezeigt werden, dass Histamin die Migration von Mastzellen stark begünstigt und diese Form der Chemotaxis über den H<sub>4</sub>R mediiert wird. Der in Mastzellen und eosinophilen Granulozyten beteiligte Signalweg schließt die Aktivierung des G<sub>αi/o</sub> Proteins ein, welches wahrscheinlich über die Freisetzung der βγ-Untereinheit die Phospholipase C aktiviert. Diese wiederum hydrolysiert Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat zu Diacylglycerol und IP<sub>3</sub>. IP<sub>3</sub> aktiviert nun einen Ca<sup>2+</sup>-Kanal im Endoplasmatischen Retikulum, welcher über derzeit noch nicht bekannte Mechanismen die Chemotaxis auslöst. Die Behandlung der Zellen mit dem H<sub>4</sub>R-Antagonist Thioperamid hebt diesen Effekt auf. Auch unter der Behandlung mit JNJ7777120 wird dieser Effekt blockiert. In H<sub>4</sub>R-defizienten (-/-) Mäusen ist dieser Signalweg blockiert (Thurmond et al., 2004). In Abbildung 8 wird der beteiligte Signalweg veranschaulicht (Hofstra et al., 2003).

Aus der Stimulation der Chemotaxis leitet sich ein möglicher Einsatz von H<sub>4</sub>R-Antagonisten bei Asthma und allergischer Rhinitis ab. Dies ist von besonderem Interesse, da derzeit die Therapiemöglichkeiten von Asthma begrenzt sind. Die akute Bronchokonstriktion wird hauptsächlich durch Inhalation von β<sub>2</sub>-Adrenozeptoragonisten und der zugrundeliegende Entzündungsprozess durch Inhalation von Glukokortikoiden behandelt (O'Byrne und Parameswaran, 2006). H<sub>1</sub>R-Antagonisten der ersten und

zweiten Generation sind trotz eventueller Synergieeffekte nicht ausreichend für die Therapie geeignet (Corren et al., 1997).

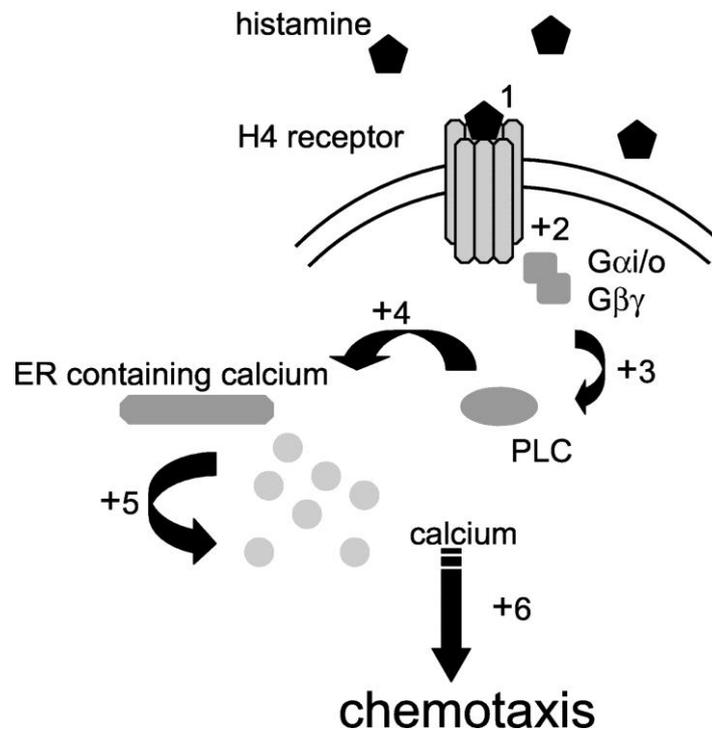


Abbildung 8: Signalweg der Histaminvermittelten Chemotaxis in Mastzellen. Aus: (Hofstra et al., 2003).

In einem murinen Asthmodell konnte die Gesamtzellzahl sowie die Zahl an eosinophilen Granulozyten durch die Behandlung mit JNJ7777120 im Bronchialsekret gesenkt werden. Bei H<sub>4</sub>R-defizienten (-/-) Mäusen konnte der gleiche Effekt beobachtet werden (Dunford et al., 2006). Neueste Erkenntnisse zeigen, dass selbst der H<sub>4</sub>R-Agonist 4-Methylhistamin das Entzündungsgeschehen in der Lunge abschwächen kann. Der Agonist wurde hierfür in einem Mausmodell vor dem Kontakt mit Antigenen intratracheal verabreicht. Dies ging mit einem Anstieg von IL-10, IFN-γ, nicht aber von TGF-β oder IL-16 einher. Darüber hinaus wurde ein Abfall von IL-13 im Bronchialsekret nachgewiesen (Morgan et al., 2007).

Auch existieren mehrere Hinweise auf eine Beteiligung des H<sub>4</sub>R bei

entzündlichen Erkrankungen der Haut. So kann das Clobenpropit-induzierte Kratzen bei BALB/c Mäusen durch die Gabe des H<sub>4</sub>R-Antagonisten Thioperamid reduziert werden (Bell et al., 2004). Bäumer berichtet über eine weniger ausgeprägte Wirkung von Clobenpropit bei BALB/c Mäusen im Vergleich mit NMRI Mäusen (Baumer et al., 2008). Dies weist darauf hin, dass die Ergebnisse je nach Mausstamm mit unterschiedlicher genetischer Ausstattung unterschiedlich zu interpretieren sind.

Die Erwartungen, die in JNJ7777120 bezüglich der Behandlung von Dermatitisen gesetzt werden, werden durch Untersuchungen von Dunford unterstützt. Dieser hat die Wirkung des H<sub>4</sub>R-Antagonisten in einem Mausmodell für Pruritus, hier auch im Vergleich mit H<sub>4</sub>R-Knockout Mäusen untersucht. Dabei ist JNJ7777120 wesentlich besser als H<sub>1</sub>R-Antagonisten dazu geeignet, Pruritus und Jucken abzumildern (Dunford et al., 2007).

Nachdem der H<sub>4</sub>R im synovialen Gewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Ohki et al., 2007) und Osteoarthritis (Grzybowska-Kowalczyk et al., 2008) nachgewiesen werden konnte, wird ebenso eine Rolle im Zusammenhang mit arthritischen Störungen und Schmerz diskutiert.

Die Proliferation von gesunden Zellen sowie von Krebszellen wird unter anderem durch Histamin-induzierte Signalwege begünstigt (Medina et al., 2006; Boer et al., 2008). So wurde der H<sub>4</sub>R in Kolonkarzinomen und im benachbarten Mucosagewebe identifiziert (Boer et al., 2008). Auch in malignen Brustkrebszellen (MDA-MB-231) kommen alle derzeit bekannten Histaminrezeptoren (H<sub>1</sub>R bis H<sub>4</sub>R) vor (Medina et al., 2006). Derzeit werden intensive Anstrengungen unternommen, um die bekannte Histaminfreisetzung und die Expression von Histaminrezeptoren im Krebsgeschehen besser einordnen zu können, sowie deren Bedeutung bei der Cancerogenese näher zu beleuchten (Medina und Rivera, 2010).

#### **3.4.4. Bindungseigenschaften des H<sub>4</sub>R**

Um die Bindungseigenschaften von Liganden an den H<sub>4</sub>R besser zu

verstehen, wurden die Aminosäuresequenzen der verschiedenen Spezies verglichen. In Abbildung 9 ist ein sogenannter Snake-like plot des Javaneraffen-H<sub>4</sub>R dargestellt. Die schwarz unterlegten Aminosäuren weichen vom hH<sub>4</sub>R ab. Die nach der Nomenklatur von Ballesteros und Weinstein (1995) mit V5.39 bezeichnete Aminosäure nimmt dabei eine besondere Stellung ein. Die Mutation vom beim hH<sub>4</sub>R vorkommenden Leucin zur Aminosäure Valin führte zu einer Abschwächung der Affinität gegenüber JNJ7777120 im Vergleich zu jener des hH<sub>4</sub>R. (Lim et al., 2010).

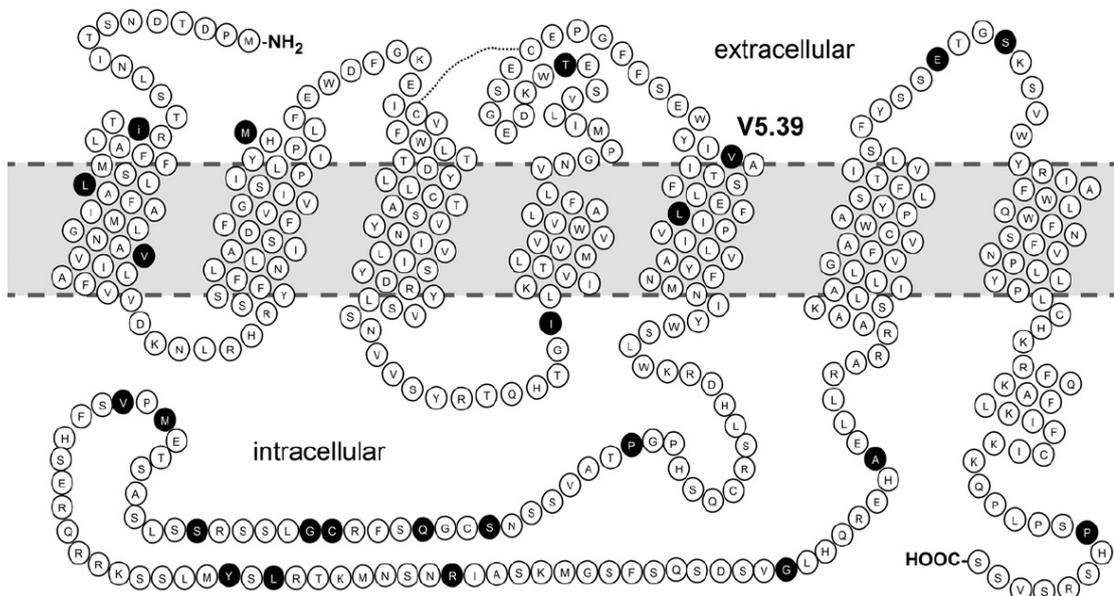


Abbildung 9: Schematische zweidimensionale Darstellung des H<sub>4</sub>R des Javaneraffen. Die schwarz unterlegten Aminosäuren verdeutlichen die Abweichungen zum hH<sub>4</sub>R. Aus: (Lim et al., 2010)

Abbildung 10 stellt die für die Histaminbindung besonders wichtigen Aminosäuren der transmembranen Domänen 4 und 5 vergleichend dar. Die mit N4.57 bezeichnete Aminosäure (Arginin) ist besonders wichtig für die Affinität des Histamins. Bei Hund und Schwein kommt an dieser Stelle ein Histidin vor, was sich negativ auf die Ligandenbindung der jeweiligen Histaminrezeptoren auswirkt (Shin et al., 2002). Schweine-N4.57H/S5.43 Mutanten erhalten wieder die volle Bindungsfähigkeit zurück (Lim et al., 2010).

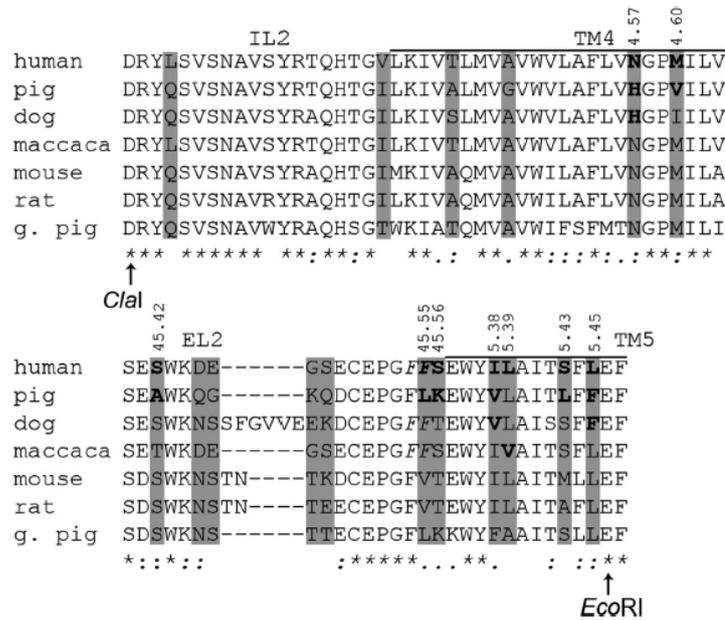


Abbildung 10: Speziesvergleich der Aminosäuresequenzen der transmembranen Domäne 4 und 5 des H<sub>4</sub>R. Aus: (Lim et al., 2010)

Abbildung 11 zeigt die Nahaufnahme der vermuteten Bindungstasche des hH<sub>4</sub>R. Ausgewählte Bindungsstellen sind nach der Ballesteros-Weinstein Methode kenntlich gemacht. Auch laut Schneider spielt E5.46 eine größere Rolle in der spezifischen Histaminbindung (Schneider et al., 2010).

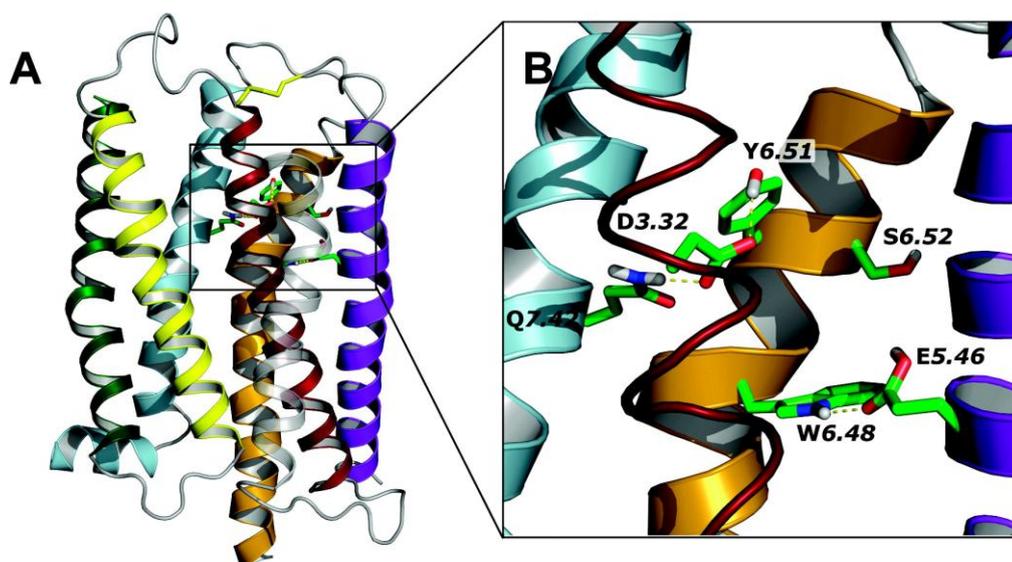


Abbildung 11: Schematische Darstellung des hH<sub>4</sub>R (A) mit Darstellung der Bindungstasche für Histamin (B). Aus: (Jongejan et al., 2008)

### III. FRAGESTELLUNG

Histamin spielt bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Geschehen eine bedeutende Rolle. Dabei konnten einige der Wirkungen den Histaminrezeptoren vom H<sub>1</sub>R bis H<sub>3</sub>R Typ zugeordnet werden. Die Wirkungen von Histamin am kürzlich identifizierten H<sub>4</sub>R sind derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen. Erste Ergebnisse am humanen H<sub>4</sub>R geben Anlass zur Hoffnung, dass Antagonisten am H<sub>4</sub>R vielversprechende Pharmaka zur Behandlung entzündlich-allergischer Erkrankungen wie Asthma und entzündlicher Arthritis darstellen könnten.

Beim Pferd nehmen ältere Antihistaminika aufgrund ihrer geringen Wirksamkeit bei der Behandlung allergischer Krankheiten nur eine untergeordnete Rolle ein. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür könnte die Beteiligung von H<sub>4</sub>R bei diesen Krankheiten sein. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war daher die Klonierung und erste pharmakologische Charakterisierung des Rezeptors.

Insbesondere wurden folgende Ziele formuliert:

1. Klonierung und Sequenzierung des equinen H<sub>4</sub>R (eH<sub>4</sub>R) aus Lymphozyten
2. Pharmakologische Charakterisierung des eH<sub>4</sub>R nach heterologer Expression in HEK293 Zellen
3. Funktionelle Charakterisierung und Untersuchungen zur Signaltransduktion des eH<sub>4</sub>R.

Um die tierartlichen Besonderheiten des eH<sub>4</sub>R herauszuarbeiten, wurden sämtliche Untersuchungen vergleichend mit dem humanen H<sub>4</sub>R (hH<sub>4</sub>R) durchgeführt.

## IV. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Material

#### 1.1. Geräte

In der nachfolgenden Liste sind die verwendeten Gerätschaften aufgeführt:

Geräte	Firma
Brutschrank, Modell 6000	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammer, Mini-Protean II	Bio-Rad, München
-80°C Gefrierschrank	GFL, Burgwedel
Laminar Flow, Modell 6.12 S	BDK, Sonnenbühl
Minifuge	Heraeus, Hanau
Power Supply, Modell 1000/500	Bio-Rad, München
Sorvall Rotor SS 34	Du Pont Instruments, Mechelen, Belgien
Spektralphotometer, Modell U-3200	Hitachi Scientific Instruments, Schwäbisch Gmünd
Szintillationsmessgerät, Modell LS 6500	Beckmann-Coulter, Krefeld
Thermomixer kompakt	Eppendorf, Hamburg
Vakuum Filtrationseinheit	Millipore, Schwalbach
Thermocycler	Primus, MWG Biotech
Zentrifuge Hettich Mikro Rapid K	Hettich, Tuttlingen
Videodensitometer E.A.S.Y. RH-3	Herolab, Wiesloch
Homogenisator	Polytron, Bachofer

## 1.2. Verbrauchsgegenstände

Materialien	Firma
Zellkulturgefäße: Flaschen (25, 75, 150 cm <sup>2</sup> ); Rundschalen mit 6, 12 oder 24 Vertiefungen;	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Pipettenspitzen, weiß, gelb, blau	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5 ml	
Schraubgefäße 1,5 ml	
Glasfaserfilter, MGB	Munktell, Falun, Schweden
Reaktionsgefäße 0,2 ml, Multi Ultra Tubes	Roth, Karlsruhe

## 1.3. Chemikalien

Chemikalien	Abkürzung	Firma
Dimethylsulfoxid	DMSO	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	DMEM	PAA, Cölbe
Fetales Kälberserum	FKS	PAA, Cölbe
Geneticindisulfat	G 418	Roth, Karlsruhe
Enrofloxacin		ICN Biochemiclas, Aurora, OH, USA
Histamin	His	Calbiochem, Schwalbach am Taunus
JNJ7777120	JNJ	SIGMA-ALDRICH
Diphenhydramin	DPH	SIGMA-ALDRICH
Thioperamid	TPE	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA

Pyrilamin	Pyr	SIGMA-ALDRICH
Ampicillin sodium salt	Amp	
Ethidiumbromid		
peqGOLD Blood RNA Kit		PeqLab, Erlangen
peq Gold dNTP-Mix		
peq Gold 'Pure' Pfu Polymerase		
10 x Reaktionspuffer komplett		
10 x Reaktionspuffer inkomplett		
Verdünnungspuffer		
25 mM MgSO <sub>4</sub>		
Peq Gold Universal Agarose		
Nucleobond AX PC 500 Kit		Macherey-Nagel, Düren
QIAquick Gel Extraction Kit (50)		QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit (50)		
METAFACTENE EASY Easy Buffer (10 x)		Biontex Laboratories GmbH, Planegg/Martinsried
T4 DNA Ligase 5 u/μl		Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
Clone Jet1.2/blunt PCR Cloning Kit		
First Strand cDNA Synthesis Kit		
XhoI 10 u/μl		
XbaI 10 u/μl		
GeneRuler 100 bp		
6x Orange DNA loading Dye		
peqGOLD Universal Agarose		Peqlab, Erlangen
LB Broth mit oder ohne Ampicillin (50 μg/ml)		selbst hergestellt

Polyacrylamid Stammlösung (Rotiphorese Gel 30)		Fa. Roth
<sup>3</sup> H-Pyridylamine 32 Ci/mmol		Amersham Biosciences
<sup>3</sup> H-Histamine 13,4 Ci/mmol		PerkinElmer, Boston, MA, USA
Polyethylenglycol	PEG	
Bovines Serumalbumin	BSA	

#### 1.4. Verwendete DNA und Antikörper

Material	Bezugsquelle/ Firma
Plasmid pVL1392-SFhH <sub>4</sub> -His6	Dr. Strasser, Department of Pharmaceutical Chemistry I, Universität Regensburg
Antikörper anti-eH <sub>4</sub> R	selbst hergestellt

## 2. Molekularbiologische Methoden

### 2.1. Klonierung und Sequenzierung des equinen H<sub>4</sub>R

Der eH<sub>4</sub>R wurde mittels RT-PCR kloniert. Dazu wurde mRNA aus Leukozyten des Pferdes gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde als Template für die PCR-Amplifizierung unter Verwendung eigens entworfener, spezifischer Primer verwendet. Das eH<sub>4</sub>R-Amplifikat wurde unter Zuhilfenahme von Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in ebenfalls mit denselben Restriktionsenzymen vorbehandelte Plasmide subkloniert. Die Plasmide wurden in kompetente *E. coli* transformiert und über Nacht vermehrt. Aufgereinigte Plasmid DNA wurde durch ein Fremdlabor sequenziert.

### **2.1.1. Auswahl der spezifischen Primer**

Spezifische Primer wurden mithilfe des Programms Primer 3 (Rozen und Skaletzky, 2000) erstellt. Dabei wurde darauf geachtet, die Wahrscheinlichkeit einer Dimerbildung zu minimieren, die Schmelztemperaturen der Primer möglichst anzugleichen sowie die Länge der Primer kurz zu halten. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion International AG, Martinsried, synthetisiert und vor der Anwendung mit sterilem H<sub>2</sub>O in einer Konzentration von 100 pmol/μl gelöst.

#### **2.1.1.1. GAPDH**

Vor der Isolierung des eH<sub>4</sub>R wurde die Qualität der cDNA überprüft. Zu diesem Zweck wurde eine Teilsequenz der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) des Pferdes amplifiziert. Das Amplifikat wurde im Agarosegel sichtbar gemacht und die erwartete Basenlänge überprüft. Die Länge des Fragmentes wurde mit dem equinen GAPDH Gen verglichen, das in der NCBI Genbank im Internet zu finden ist (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/5163489>). Die Kennung lautet: AF157626.1. Die zu erwartende Basenlänge des ausgewählten Amplifikats beträgt 232 bp. Folgende Primer wurden verwendet:

eGAPDH fwd: 5'-AGT TCC ATG GCA CAG TCA AG-3' (Tm: 58°C)

eGAPDH rev: 5'-ACA AAC ATT GGG GCA TCA GC-3' (Tm: 58°C)

#### **2.1.1.2. Klonierungsprimer**

##### **2.1.1.2.1. Equiner H<sub>4</sub> Rezeptor**

Die vermutete mRNA Sequenz des eH<sub>4</sub>R ist in der Nucleotidbank des NCBI unter der Kennung „NM\_001163969.1“ zu finden und wurde als

Grundlage genommen, um mithilfe des Programms Primer 3 (Rozen und Skaletzky, 2000) spezifische Forward- und Reverseprimer zu erstellen. Dabei wurde ebenfalls darauf geachtet, die Wahrscheinlichkeit einer Dimerbildung zu minimieren, die Schmelztemperaturen der Primer möglichst anzugleichen sowie die Länge der Primer kurz zu halten.

Um den exprimierten Rezeptor später mit der Westernblot-Methode mithilfe eines spezifischen Antikörpers sicher nachweisen zu können, wurde die Sequenz für das FLAG-Antigen an den Forwardprimer angehängt, was diesen dadurch verlängert und die Schmelztemperatur stark erhöht.

Die Primer enthalten zudem spezifische Basenfolgen als Schnittstelle für die Restriktionsenzyme HindIII (AAG CTT) am Forwardprimer und XhoI (CTC GAG) am Reverseprimer. Diese werden für den letzten Klonierungsschritt benötigt (2.1.5.1). Es ist wichtig, dass der zu klonierende Genabschnitt diese Erkennungsstellen nicht an weiteren Stellen aufweist, damit er im Enzymverdau nicht degradiert wird.

Auch wurden die Basenpaare vor dem Startcodon ATG in Übereinstimmung mit den von Kozak (1984, 1987) ermittelten kritischen Sequenzen ausgewählt, um größtmögliche Sicherheit für den reibungslosen Ablauf für eine Translation in Eukaryontenzellen zu erhalten. In diesem Fall: CTT ATG G.

Somit wurde folgender Forwardprimer für die Klonierung von eH<sub>4</sub>R ausgewählt:

eH<sub>4</sub>R flagfwd: 5'-GCC AAG CTT ATG GAC TAC AAG GAT GAC GAT AAG GGG TCA GCT ACT AAT AGC ACA A-3' (T<sub>m</sub>: 85°C)

Der korrespondierende Reverseprimer lautet:

eH<sub>4</sub>R rev: 5'-CGC CTC GAG TTA TCT TTG AGA GGA CAT TGA-3' (T<sub>m</sub>: 71°C)

Aufgrund der geringen Expressionsrate des H<sub>4</sub>R und den damit einhergehenden Schwierigkeiten bei der RT-PCR die Temperaturwahl und Spezifität der oben beschriebenen Primer betreffend, wurde ein Zwischenschritt eingeführt. Hier wurde zuerst der eH<sub>4</sub>R mit kürzeren,

spezifischeren Primern amplifiziert, das PCR-Produkt anschließend in den pJET1.2/blunt Cloning Vektor subkloniert und dieses anschließend als Template verwendet.

eH<sub>4</sub>Rfwd2: 5'-ATG TCA GCT ACT AAT AGC ACA AAT ATT TTA TCG-3'  
(T<sub>m</sub>: 66°C)

eH<sub>4</sub>Rrev2: 5'-TTA TCT TTG AGA GGA CAT TGA CTG ATT G-3' (T<sub>m</sub>: 64°C)

#### **2.1.1.2.2. Humaner H<sub>4</sub> Rezeptor**

Freundlicherweise wurde von Frau Dr. Strasser (Universität Regensburg) ein pVL1392-SFhH<sub>4</sub>-His6 Plasmid zur Verfügung gestellt, welches die hH<sub>4</sub>R cDNA enthält.

Um gleiche Bedingungen wie beim eH<sub>4</sub>R Versuch zu erhalten, war es zuerst erforderlich, die cDNA mittels PCR zu isolieren und anschließend in Plasmid pcDNA3.1(+) zu klonieren. Die Primer enthielten ebenfalls die Sequenz für das gewünschte FLAG-Antigen und Bindungsstellen für die Restriktionsenzyme HindIII (AAG CTT) am Forwardprimer sowie XbaI (TCT AGA) am Reverseprimer. Die Bedingungen waren die gleichen, wie im Punkt 2.1.1.2.1. Die Primer hatten folgende Sequenz:

hH<sub>4</sub>Rflagfwd: 5'-GCC AAG CTT ATG GAC TAC AAG GAC GAT GAT-3'  
(T<sub>m</sub>: 71°C)

hH<sub>4</sub>Rrev: 5'-CGC TCT AGA TTA AGA AGA TAC TGA CCG ACT-3' (T<sub>m</sub>: 69°C)

#### **2.1.2. mRNA-Isolierung**

Der „peqGOLD Blood RNA Kit“ wurde verwendet, um mRNA aus Pferdeleukozyten zu gewinnen. Die Erythrozyten im mit EDTA vorbehandelten Vollblut wurden selektiv lysiert und daraufhin die

Leukozyten durch Zentrifugation gesammelt. Nach der Lyse der Leukozyten wurde die dabei frei werdende mRNA an eine Silicamatrix gebunden und durch Waschschriffe von unerwünschten Kontaminationen gereinigt. Nach einem Eluierungsschritt standen 1 - 5 µg RNA pro 1 ml Vollblut zur Verfügung. Die gewonnene mRNA wurde umgehend zur cDNA Synthese verwendet. Reste wurden sofort bei -80°C gelagert, da RNA ansonsten sehr schnell von ubiquitär vorhandenen RNAsen enzymatisch abgebaut wird.

Hier konnten 50 µl mRNA mit einer Konzentration von 0,0915 µg/µl gewonnen werden.

### **2.1.3. cDNA-Synthese**

Der „First Strand cDNA Synthesis Kit“ der Firma Fermentas arbeitet unter Verwendung der M-MuLV Reverse Transcriptase, um RNA oder mRNA in cDNA umzuschreiben und damit zu amplifizieren und haltbarer zu machen. Der Kit enthält einen RNase Inhibitor und ein Set an verschiedenen Primern, RNase freies Wasser und einen dNTP Mix. Bei 37°C liest die M-MuLV Reverse Transcriptase die mRNA Sequenzen ab und ergänzt die Einzelstränge mit den komplementären Basen zu einem cDNA Doppelstrang. Darüber hinaus vervielfältigt sie auch die neu erstellten Doppelstränge, sodass mehr Erbinformation für folgende Anwendungen zur Verfügung steht.

Das von Fermentas vorgeschlagene Protokoll wurde angewendet. Die notwendigen Temperaturen wurden in einem Thermoblock erzeugt. Als Reaktionsgefäße dienten 1,5 ml Tubes der Firma Eppendorf, Hamburg. Abweichend vom Protokoll wurden je Ansatz 10 µl mRNA [0,0915 µg/µl], sowie verschiedene Reverseprimer eingesetzt, um unterschiedliche cDNA Präparationen zu erhalten. Daraus ergeben sich folgende 4 Ansätze je mit Ausbeute:

<b>Ansatz</b>	<b>Primer</b>	<b>Ausbeute</b>
1	H <sub>4</sub> R rev	2,65 µg/µl
2	H <sub>4</sub> R rev	1,25 µg/µl
3	random hexamer	2,45 µg/µl
4	oligo (dT) <sub>18</sub> primer	2,52 µg/µl

#### **2.1.4. PCR-Versuche**

Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl in 0,2 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt, welche während des gesamten Pipettiervorganges auf schmelzendem Eis gehalten wurden. In Optimierungsexperimenten wurden verschiedene Konzentrationen und Mengen der verwendeten Salze und Enzyme sowie verschiedene Temperaturprogramme im Thermocycler ausgetestet. Die PCR Produkte wurden mit je 4 µl 6 x Orange Loading Dye aufgenommen und auf ein 1,8%iges Agarose Gel aufgetragen. Um die Länge der PCR Amplifikate bestimmen zu können, wurde außerdem mit in Loading Dye Sample Buffer aufgenommener GeneRuler 100 bp Ladder neben den Proben aufgebracht.

##### **2.1.4.1. Agarose Gelelektrophorese**

Agarosegele eignen sich sehr gut, um nach Anlegen einer elektrischen Spannung DNA Fragmente der Größe entsprechend aufzutrennen. Sichtbar werden die DNA-Banden nach Anfärben mit Ethidiumbromid im UV-Licht. Die Größe der DNA wird im Vergleich mit einem auf dem gleichen Gel mitlaufenden Längenstandard ermittelt.

Für ein 1,8%iges Gel werden folgende Materialien benötigt:

0,9	g	Agarose
50	ml	Trisacetat EDTA Puffer
1	µl	Ethidiumbromid
4	µl	Loading Dye je Probe
1	µl	Gene Ruler 100 bp

Nach dem Aufschmelzen der Agarose zusammen mit TAE Puffer in der Mikrowelle und Zugabe von Ethidiumbromid wurde das Gel in die Gelelektrophoresekammer gegossen und ausgehärtet. Ein von oben aufgesetzter Kamm sorgte für die Ausformung von Kammern. Als Laufmittel und zum Anlegen der Spannung diente TAE Puffer. 20 µl der fertigen PCR Reaktion wurden mit 4 µl der Loading Dye vermischt, in die Geltaschen gegeben und bei einer Stromstärke von 70 mA für ca. 1 h aufgetrennt. Danach wurde das Gel unter UV Licht im Videodensitometer ausgewertet.

#### 2.1.4.2. GAPDH-PCR

Zur Überprüfung der Qualität der gewonnenen cDNA wurde das Vorhandensein von GAPDH in einer PCR Anwendung überprüft. Diese wurde wie folgt ausgeführt:

Zutaten	Angaben in µl
H <sub>2</sub> O	144
dNTP mix	6
PufferY	30
Enhancer	60
Primer eGAPDHfwd	3
Primer eGAPDHrev	3
Taq Polymerase	6

Tube Nr.	Template	MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O
1 (Kontrolle H <sub>2</sub> O)	-	2	6
2	2	-	6
3	2	2	4
4	2	4	2
5	2	6	-

Programm Thermocycler:

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
1	95°C	5 min	keine
2	95°C	30 sec	Schritte 2 - 4 wurden 30 mal wiederholt
3	55°C	30 sec	
4	72°C	1 min	

#### 2.1.4.3. eH<sub>4</sub>R-PCR zur Amplifizierung und Sequenzierung

Nachdem die Qualität der cDNA durch den Nachweis von GAPDH bestätigt war, konnte diese verwendet werden, um den gewünschten eH<sub>4</sub>R Genabschnitt mittels PCR zu amplifizieren und daraufhin in pJET1.2/blunt Plasmide zu klonieren. Diese wurden in kompetente *E. coli* transformiert, in denen sich die Plasmide über Nacht vermehrten. Durch Lyse der Bakterien und anschließende Anreicherung der Plasmid-DNA wurde ausreichend Material gewonnen, um einerseits ein Fremdlabor mit der Sequenzierung zu beauftragen und andererseits die hochkonzentrierte Plasmid-DNA als Template für den folgenden diffizileren PCR-Versuch, bei dem die Information für das FLAG-Antigen mit übertragen wird, zu verwenden.

Die Versuche wurden wie folgt ausgeführt:

<b>Material</b>	<b>Ansatz 1 [<math>\mu</math>l]</b>	<b>Ansatz 2 [<math>\mu</math>l]</b>
H <sub>2</sub> O	34	34
Puffer	5	5
MgSO <sub>4</sub> 25 mM	6	6
dNTP mix	0,5	0,5
eH <sub>4</sub> Rfwd2 1/10	1	1
eH <sub>4</sub> Rrev2 1/10	1	1
cDNA 1/10 erstellt mit H <sub>4</sub> Rrev Primer	2	-
cDNA 1/10 erstellt mit oligo Primer	-	2
Pfu Polymerase	0,5	0,5

Programm Thermocycler:

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Wiederholungen</b>
1	94°C	5 min	keine
2	94°C	60 sec	Schritte 2 - 4 werden 35 mal wiederholt, darauf folgt Schritt 5
3	63°C	60 sec	
4	72°C	75 sec	
5	72°C	5 min	keine

Die gewonnenen Genabschnitte wurden wie beschrieben aufgereinigt, kloniert, selektiert und die gewonnenen Plasmide zur Sequenzierung an die Eurofins GmbH, Ebersberg versandt.

#### **2.1.4.4. Epitop-Tagging des eH<sub>4</sub>R**

Die im Schritt 2.1.4.3 erstellte Plasmid DNA diente nun als Template, um in einem neuen PCR Versuch eH<sub>4</sub>R Genabschnitte zu synthetisieren, die die in Absatz 2.1.1.2 erwähnten Eigenschaften besitzen (FLAG-Antigen,

Bindungsstellen für XhoI und HindIII).

Die Versuche wurden wie folgt ausgeführt:

<b>Material</b>	<b>Ansatz 1 [µl]</b>
H <sub>2</sub> O	35
Puffer	5
MgSO <sub>4</sub> 25 mM	6
dNTP mix	0,5
eH <sub>4</sub> Rfwd2 1/10	1
eH <sub>4</sub> Rrev2 1/10	1
Template Plasmid 1/10	1
Pfu Polymerase	0,5

Programm Thermocycler:

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Wiederholungen</b>
1	94°C	5 min	keine
2	94°C	60 sec	Schritte 2 - 4 werden 35 mal wiederholt, darauf folgt Schritt 5
3	65°C	60 sec	
4	72°C	75 sec	
5	72°C	5 min	keine

#### 2.1.4.5. Epitop-Tagging des hH<sub>4</sub>R

Das von Frau Dr. Strasser, Universität Regensburg, erhaltene Plasmid pVL1392-SFhH<sub>4</sub>-His6 diente als Template, um in einem PCR Versuch hH<sub>4</sub>R Genabschnitte zu amplifizieren. Diese enthielten durch die Primerauswahl Erbinformation für das gewünschte FLAG-Antigen und Bindungsstellen für die Restriktionsenzyme HindIII und XbaI.

Die Versuche wurden wie folgt ausgeführt:

Material	Ansatz 1 [ $\mu$ l]
H <sub>2</sub> O	35
Puffer	5
MgSO <sub>4</sub> 25 mM	6
dNTP mix	0,5
hH <sub>4</sub> Rfwd2 1/10	1
hH <sub>4</sub> Rrev2 1/10	1
Template Plasmid 10 ng/ $\mu$ l	1
Pfu Polymerase	0,5

Programm Thermocycler:

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
1	94°C	5 min	keine
2	94°C	60 sec	Schritte 2 - 4 werden 35 mal wiederholt, darauf folgt Schritt 5
3	63°C	60 sec	
4	72°C	75 sec	
5	72°C	5 min	keine

#### 2.1.4.6. Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden im Videodensitometer unter UV Licht als entsprechende Banden wahrgenommen. Mit sterilen Skalpellklingen wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel geschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA wird hier an eine Silicamatrix gebunden, durch Waschschrirte gereinigt und schließlich eluiert. Die in den kommerziell verfügbaren PCR-Reinigungskits der verschiedenen Firmen zugrundeliegende Technologie

befreit die DNA zuverlässig von Kontaminationen jeder Art. Es muss allerdings ein deutlicher Verlust an PCR-Produkt in Kauf genommen werden.

### 2.1.5. Klonierung und Transformation der PCR-Produkte

Zwei verschiedene Vektoren wurden verwendet. Zur erstmaligen Sequenzierung des eH<sub>4</sub>R wurde Plasmid pJET1.2/blunt eingesetzt. Der Vektor zeichnet sich dadurch aus, dass mit Pfu-Polymerase erstellte PCR-Produkte ohne vorherigen Verdau mit Restriktionsenzymen in den Genabschnitt *eco471R* (s. Abb.) eingeschleust werden können.

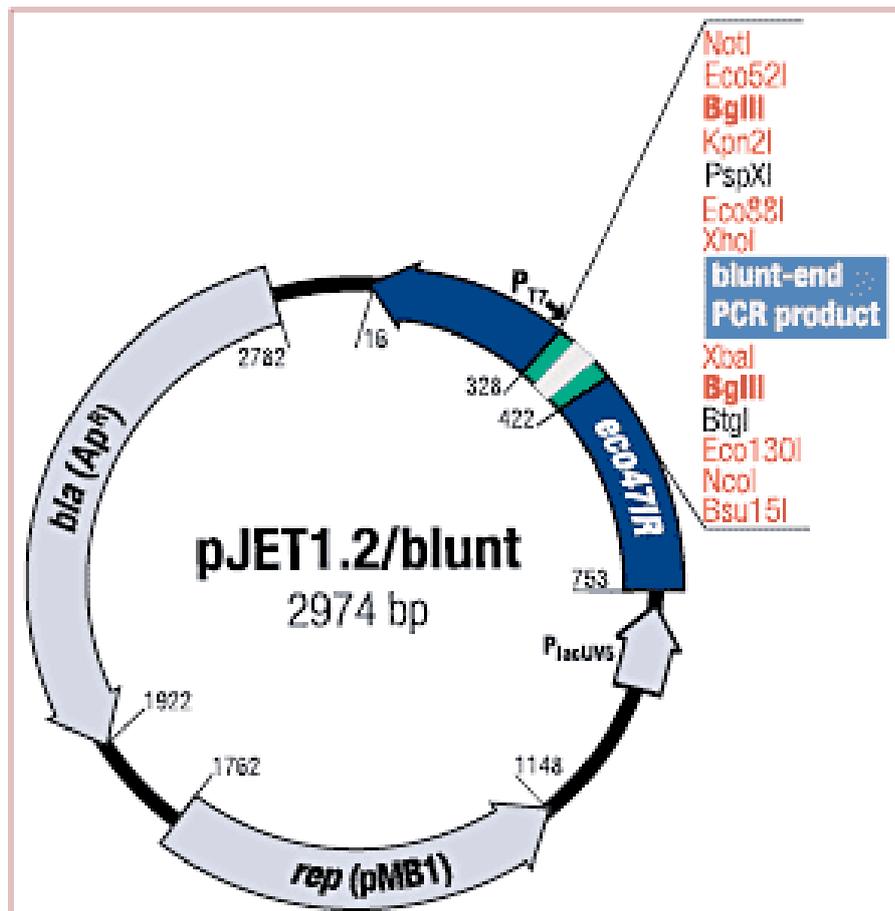


Abbildung 12: pJET1.2/blunt Vektor (aus: [www.fermentas.com](http://www.fermentas.com))

Als Expressionsvektor für eH<sub>4</sub>R und hH<sub>4</sub>R wurde Plasmid pcDNA3.1(+)  
der Fa. Invitrogen eingesetzt.

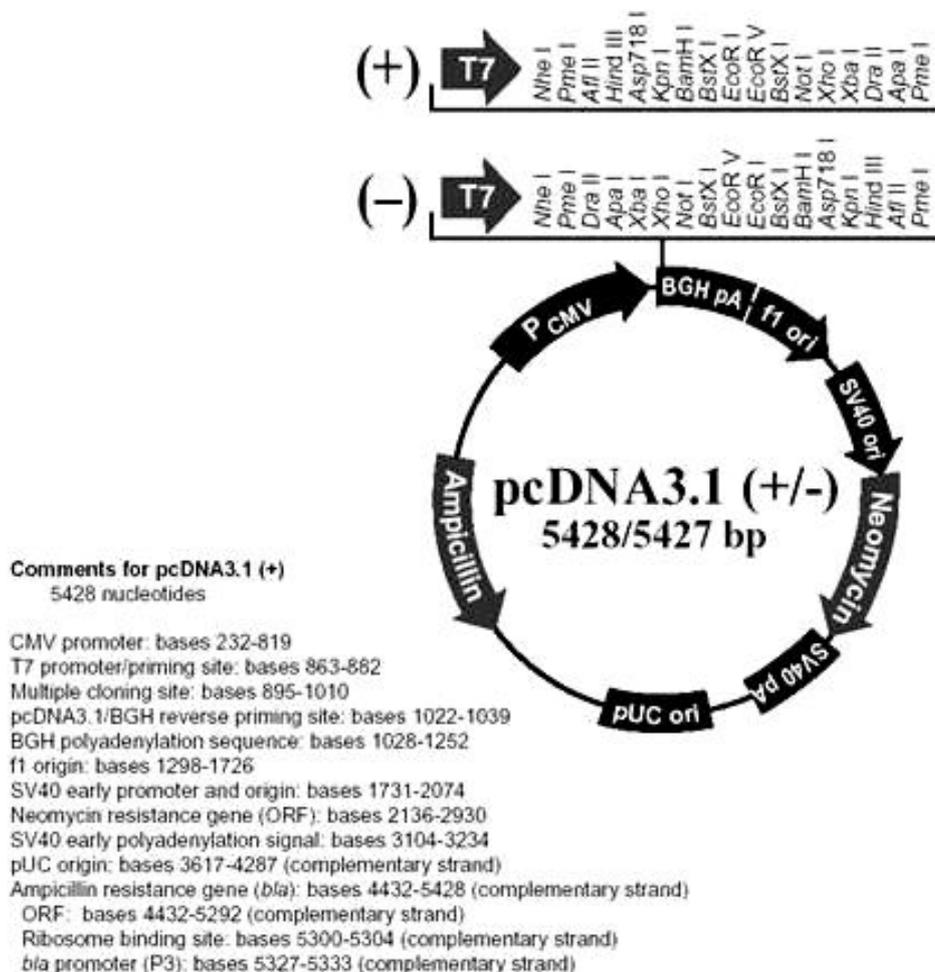


Abbildung 13: pcDNA3.1 Vektor (aus: www.invitrogen.com)

### 2.1.5.1. Klonierung und Transformation der eH4R PCR-Produkte

Die gereinigten PCR-Produkte wurden nach der PCR zum Zwecke der Amplifizierung (siehe Absatz: 2.1.4.3) in pJet1.2/blunt Vektoren kloniert. Die Klonierungsstelle des pJET1.2/blunt Vektors liegt inmitten eines Genabschnittes, der ein für das Wirtsbakterium letales Restriktionsenzym codiert. Bei nicht erfolgter Klonierung wird dieses Enzym exprimiert und tötet das nicht erfolgreich transformierte Bakterium ab (positive Selektion). Die Klonierung wurde streng nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die überlebenden Bakterien wuchsen über Nacht bei 37°C in 6 ml LB Broth heran und wurden daraufhin auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Hier wurden sie wiederum über Nacht bei 37°C kultiviert. In dieser Zeit wuchsen die erfolgreich mit den gewünschten Vektoren transformierten *E.*

*coli* zu sichtbaren Kolonien heran. Der Agar enthielt Ampicillin, um das Wachstum von unerwünschter Fremdflora zu unterbinden. Da pJet1.2/blunt auch ein Gen für Ampicillinresistenz enthielt, litten die klonierten *E. coli* nicht unter diesem antibiotischen Milieu. Die Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher isoliert aufgenommen und in 300 ml LB Broth + Amp über Nacht unter Schütteln bei 37°C vermehrt.

Klonierung mit CloneJET™ PCR Cloning Kit:

Versuchsansatz:

Ansatz [µl]	Material
10	2 x Reaction Buffer
2	PCR Produkt
1	pJET1.2/blunt cloning vector
1	T4 DNA Ligase
	Water, nuclease free, ad 20 µl

Der Versuchsansatz wurde kurz vermischt und abzentrifugiert. Danach wurde bei 22°C für 25 min inkubiert. Nun konnte die Transformation lt. Beschreibung unter Punkt 2.1.7 vollzogen werden.

Die PCR-Produkte aus Schritt 2.1.4.4 wurden in den Klonierungsvektor pcDNA3.1(+) subkloniert. Dieser enthält definierte Bindungsstellen für verschiedene Restriktionsenzyme, darunter HindIII und XhoI. Die PCR Produkte sowie das Plasmid wurden daher mit HindIII und XhoI vorbehandelt (Enzymverdau), um zueinander passende Schnittstellen für die Sticky End Klonierung zu erhalten. Das Plasmid verfügt seinerseits ebenso über die korrespondierenden Bindungsstellen. Danach wurden die verdauten PCR Produkte mit dem verdauten Plasmid unter der Einwirkung des Enzyms T4-Ligase miteinander verbunden. Die Arbeitsschritte wurden wie folgt ausgeführt:

Verdau, über Nacht, 37°C, im Thermoblock:

Zutaten	pcDNA3.1 [ $\mu$ l]	PCR Produkt [ $\mu$ l]
H <sub>2</sub> O	15,5	13
Puffer R	2	2
pcDNA3.1(+)	0,5	-
eH <sub>4</sub> R (0,18 $\mu$ g/ $\mu$ l)	-	3
HindIII	1	1
XhoI	1	1

Nun folgte die Ligation über 2 Stunden bei 37°C im Thermoblock:

Zutaten [ $\mu$ l]	
13,8	H <sub>2</sub> O
2	10 x T4 DNA Ligase Buffer
1	pcDNA3.1(+)
3	eH <sub>4</sub> R
0,2	T4 DNA Ligase

Danach wurden die Plasmide in kompetente *E. coli* transformiert.

### 2.1.5.2. Klonierung und Transformation der hH4R PCR-Produkte

Das PCR-Produkt aus Schritt 2.1.4.5 wurde in den Klonierungsvektor pcDNA3.1(+) kloniert. Prinzipiell geschah dies wie oben beschrieben, mit der Ausnahme, dass bei dieser hH<sub>4</sub>R Sequenz anstatt der Bindungsstelle für XhoI die Bindungsstelle für das Enzym XbaI codiert ist. Die Arbeitsschritte wurden also wie folgt ausgeführt:

Verdau, über Nacht, 37°C, im Thermoblock:

Zutaten	pcDNA3.1 [µl]	PCR Produkt [µl]
H <sub>2</sub> O	15,5	13
Puffer Tango	2	2
pcDNA3.1(+) (1,4 µg/µl)	0,5	-
hH <sub>4</sub> R (0,25 µg/µl)	-	3
HindIII	1	1
XbaI	1	1

Ligation, 2 Stunden, 37°C, im Thermoblock:

Zutaten	in µl
H <sub>2</sub> O	12,8
10 x T4 DNA Ligase Buffer	2
pcDNA3.1(+)	1
hH <sub>4</sub> R	4
T4 DNA Ligase	0,2

Danach wurden die Plasmide in kompetente *E. coli* transformiert.

### 2.1.6. Herstellung kompetenter *E. coli* zur Transformation

Um *E. coli* zur Aufnahme der pcDNA3.1(+) und der pJET1.2/blunt Vektoren zu befähigen, werden diese durch chemische Vorbehandlung wie folgt künstlich kompetent gemacht:

Folgende Reaktionspuffer werden benötigt:

<b>TfB I</b>		
500	µl	3 M Kaliumacetat
5	ml	0,5 M MnCl <sub>2</sub>
10	ml	0,5 M RbCl <sub>2</sub>
500	µl	1 M CaCl <sub>2</sub>
7,5	ml	Glycerol

<b>TfB II</b>		
1	ml	100 mM MOPS pH 7,0
750	µl	1 M CaCl <sub>2</sub>
200	µl	0,5 M RbCl <sub>2</sub>
1,5	ml	Glycerin
6,5	ml	H <sub>2</sub> O bidest. (steril)

2ml einer frischen *E. coli* TOP 10F Übernachtskultur wurden in 100 ml LB Broth überführt und 2 Stunden bei 37°C geschüttelt, bis eine optische Dichte (OD) von 0,55 bei 660 nm erreicht war. Das Medium wurde 10 min auf Eis abgekühlt und danach 10 min bei 4°C und 3000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 25 ml kaltem TfB I resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in TfB II aufgenommen, zu 200 µl Aliquots auf Eis abgefüllt und bei -80°C eingefroren (Wellmann 2007).

### 2.1.7. Transformation

Dieser Schritt gilt für alle in dieser Arbeit beschriebenen Transformierungen.

Kompetente *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut. Unmittelbar nach Überschreiten des Taupunkts wurden 5 µl der gewünschten

Ligationsansätze zupipettiert, vorsichtig vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 45 sec bei 42°C. Hierauf wurden die Ansätze 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 500 µl LB Broth dazugegeben, eine Stunde bei 37°C unter Schütteln im Thermomixer inkubiert und anschließend auf Ampicillin haltigen Agarplatten ausplattiert. Da die beiden verwendeten Vektoren ein Codon für Ampicillinresistenz enthalten, überleben nur vollständig transformierte *E. coli*.

Die gewachsenen Kolonien wurden im Falle der pJet1.2/blunt Plasmide mit dem positiven Klonierungsmarker umgehend in 300 ml LB Broth unter Zugabe von Ampicillin überimpft und bei 37°C über Nacht unter Schütteln kultiviert. Darauf folgte stets Schritt 2.1.8.

Da der Vektor pcDNA3.1(+) oftmals auch ohne einklonierte cDNA zu überlebensfähigen *E. coli* führt, wurden die Kolonien vor der Vermehrung mithilfe eines PCR Versuches auf das Vorkommen des erwünschten Inserts hin überprüft. Der Versuch ist gleich aufgebaut wie im Schritt 2.1.4.3. beschrieben, mit der Ausnahme, dass als Template lediglich 1 µl von einer in 100 µl A. dest. verdünnten Bakterienkolonie verwendet wurde. Dieses Experiment spart mindestens einen Arbeitstag Zeit im Vergleich zur sonst üblichen Methode der Plasmidisolation mit anschließendem enzymatischen Verdau und Auftrennung auf Agarosegel.

Positive *E. coli* Kolonien wurden zur Sicherheit als Glycerol-Stock archiviert, um bei Bedarf darauf zurückgreifen zu können. Dazu wurden Übernachtskulturen bei 5000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterien in 850 µl LB-Medium durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. 150 µl steriles Glycerin wurde in Kryoröhrchen vorgelegt. Damit wurde die Bakteriensuspension ebenfalls durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt. Jetzt konnten die Röhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefrostet werden. Die dauerhafte Lagerung geschah bei -80°C.

### **2.1.8. Aufreinigung der Plasmide**

Positive Kolonien wurden über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien abzentrifugiert, lysiert und die Plasmide aufgereinigt. Die Aufreinigung geschah mit dem Nucleobond AX PC 500 Kit nach Herstellerangaben. Nach der Aufreinigung wurde die Konzentration der Ausbeute im Spektralphotometer bestimmt.

Nun waren die Plasmide bereit, um im Fall von pJET1.2/blunt sequenziert zu werden oder im Falle der pcDNA3.1(+) Plasmide zur Transfektion verwendet zu werden.

### 3. Zellkultur

#### 3.1. Zellmodell

Zur Expression der gewünschten H<sub>4</sub>R Rezeptoren wurden HEK293 Zellen sowie COS-7 Zellen verwendet. Diese sind in der Lage posttranslationale Proteinmodifikationen auszuführen, sodass funktionsfähige Rezeptoren exprimiert werden (Völzke, 2008). Dies ist für eine pharmakologische Charakterisierung der Rezeptoren notwendig. Beide Zelllinien sind zudem leicht zu transfizieren und besonders effizient in der Proteinproduktion. Desweiteren sind beide Zelllinien für die Expression von hH<sub>4</sub>R geeignet (van Rijn et al., 2006).

Die Zellen wurden in Kunststoffgefäßen der Firma TPP kultiviert.

Beide Zelllinien wurden im gleichen Wachstumsmedium kultiviert. Zu 500 ml DMEM wurden folgende Zusätze gegeben:

10	%	Fetales Kälberserum	inaktiviert (65°C/30min)
4	mM	L-Glutamin	
100	IU/ml	Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin	
3	µg/ml	Enrofloxacin	

<b>PBS</b>		
8	g	NaCl
0,2	g	KCl
2.145	g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
0,2	g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		ad 1l H <sub>2</sub> O bidest.; pH 7,43

<b>PBS/EDTA</b>		
0,04	%	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in PBS; pH 7,43

Die Behandlung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen im Laminar Flow. Die Zellen wurden als Monolayer bei 37°C und einer Atmosphäre von 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> in Luft und gesättigtem Wasserdampf im Brutschrank kultiviert. Je nach Wachstumsintensität wurden die Zellen verdünnt in neue Gefäße überführt. Dazu wurden die HEK293 Zellen abgeklopft und zusammen mit dem Medium in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Bei 1200 rpm wurden die Zellen für 10 min pelletiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Je nach gewünschter Verdünnung konnte nun Zellsuspension für die Experimente oder zur weiteren Kultivierung entnommen werden.

COS-7 Zellen wurden entsprechend vermehrt, mit der Ausnahme, dass sich diese Zellen nicht durch Abklopfen ablösen lassen. Deswegen mussten COS-7 Zellen nach dem Absaugen vom Medium zuerst mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend für eine Minute mit 2 ml 37°C warmem Trypsin inkubiert werden. Dadurch wurden die Zellen vom Zellkulturgefäß abgelöst. Danach wurde Trypsin mit 10 ml frischem Medium inaktiviert.

### **3.2. Transfektion der HEK293 und der COS-7 Zellen**

Als Transfektion wird das Einbringen von genetischem Material in Eukaryontenzellen bezeichnet. Die Transfektion der Zelllinien wurde mit dem Metafectene Easy Transfektionsreagenz für Säugerzellen der Firma Biontex nach Herstellerangaben durchgeführt. Das zugrundeliegende Prinzip ist die Liposomentransfektion, bei der die DNA Moleküle in kationischen Lipiden und Colipiden aufgenommen werden und daraufhin durch Endozytose in die HEK293 oder COS-7 Zellen gelangen.

### **3.3. Selektion nach der Transfektion**

Für die weiteren Versuche wurde der H<sub>4</sub>R stabil in HEK293 Zelllinien exprimiert, um konstante Rezeptordichten bei den nachfolgenden Bindungsexperimenten zu erhalten. Dazu mussten die Zellen einer Selektion mit dem Antibiotikum Geneticin (G418) unterzogen werden, um nicht-transfizierte Zellen sicher auszuschließen. Um den Fortschritt der Selektion beurteilen zu können, wurden parallel HEK293 Wildtypstämme mit der gleichen Konzentration an Antibiotikum kultiviert. Waren diese abgestorben, galten die überlebenden Klone als stabil transfiziert. Zur Selektion wurden 200 µg/ml G418 im vorher beschriebenen Wachstumsmedium verwendet. Eukaryotische Zellen können in Anwesenheit von G418 überleben, wenn die von Plasmid pcDNA3.1 (+) codierte Neomycinresistenz exprimiert wird.

COS-7 Zellen sind für die stabile Expression von Proteinen nicht geeignet. Sie wurden für die transiente Transfektion verwendet.

### **3.4. Kryokonservierung**

Einfriermedium:

Wachstumsmedium mit 20 % (v/v) FKS und 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid

(DMSO)

Nach mehreren Generationsfolgen lässt die Expression der Rezeptoren in HEK293 Zellen nach. Deswegen mussten Sicherungsstocks von erfolgreich transfizierten Zelllinien in flüssigem Stickstoff konserviert werden. Dazu wurden die durch Zentrifugation gewonnenen Zellpellets in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Einfrier Röhrchen abgefüllt. Um einen plötzlichen Kälteschock zu vermeiden, wurden die Röhrchen auf Eis in einer Styroporbox bei -80°C eingefroren und erst am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff bei -196°C überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen in 10 ml eiskaltem Wachstumsmedium resuspendiert und durch Zentrifugation bei 1200 rpm vom Einfriermedium befreit. Danach wurden die Zellen im 37°C warmen Wachstumsmedium aufgenommen und nach Bedarf auf Zellkulturflaschen verteilt (Wellmann, 2007).

### 3.5. Membranpräparation für Bindungsstudien

Verwendete Puffer:

<b>Homogenisierungspuffer</b>	
5 mM	Tris
1 mM	Ethylenglycol-bis( $\beta$ -Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA)
1 mM	Threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol (DTT) gelöst in H <sub>2</sub> O bidest.; eingestellt auf pH 7,4

<b>Bindungspuffer</b>	
50 mM	Tris/HCl
	gelöst in H <sub>2</sub> O bidest.; pH 7,4

Die Arbeitsschritte wurden bei transient transfizierten COS-7 Zellen, wie

auch bei stabil transfizierten HEK293 Klonen stets in gleicher Weise ausgeführt.

Waren die Zellen dicht genug gewachsen, wurden sie abgelöst und in 50 ml Zentrifugengefäßen bei 1200 rpm abzentrifugiert und vom Mediumüberstand getrennt. Die darauf folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf schmelzendem Eis.

Das Zellpellet wurde in 10 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert und für 10 sec homogenisiert. Durch anschließende 10-minütige Zentrifugation bei 1200 rpm und 4°C wurden die Zellkerne, wie auch intakte Zellen abgetrennt. Der Überstand wurde für 30 min bei 17000 rpm und 4°C zentrifugiert, um die Plasmamembranen zu pelletieren. Die Membranen wurden in TM Puffer aufgenommen und sofort für die Radioligandenbindungsversuche sowie die Proteinbestimmung verwendet.

## **4. Pharmakologische Untersuchungen**

### **4.1. Radioligandenbindungsstudien**

Die Radioligandenbindung ist eine Methode um die Interaktion eines radioaktiv markierten Agonisten oder Antagonisten mit seinem Rezeptor zu messen (Keen, 1997). Die Bindungseigenschaften werden an einer rezeptorhaltigen Membransuspension ermittelt. Die Bindungsstudien in dieser Arbeit erfolgten unter Verwendung des radioaktiv markierten Agonisten  $^3\text{H}$ -Histamin und des Antagonisten  $^3\text{H}$ -Pyrilamin. Die freien, radioaktiv markierten Liganden wurden durch Filtration über Glasfaserfilter abgetrennt, während an die Rezeptoren gebundenen Liganden im Filter zurückblieben und über Szintillationsmessung quantitativ bestimmt wurden.

#### **4.1.1. Verdrängungsexperimente**

In einem Verdrängungsexperiment wird die Affinität eines nicht-markierten Liganden zum Rezeptor bestimmt. Hierfür wird seine Befähigung, eine definierte Menge eines Radioliganden aus seiner spezifischen Bindung zu verdrängen, herangezogen. Die Konzentration des Radioliganden wird dabei konstant gehalten, während die Konzentration des Kompetitors stufenweise erhöht wird. Nach der Messung und graphischen Auswertung ergeben sich die Datenpunkte einer Verdrängungskurve, aus deren Steigung die Affinität abgelesen werden kann. Unterstützt durch das Computerprogramm GraphPad Prism, unter Verwendung der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (Barlow und Blake, 1989) erfolgt eine nichtlineare Regressionsanalyse der Daten:

$$B_{ges} = MIN + \frac{MAX - MIN}{1 + \left( \frac{IC_{50}}{10^{[X]}} \right)^{n_H}}$$

$B_{ges}$ :	Gesamtbindung des Radioliganden
MIN:	unteres Plateau der Kurve
MAX:	oberes Plateau der Kurve
$IC_{50}$ :	Konzentration des Kompetitors im Wendepunkt der Kurve
[X]:	Konzentration des Kompetitors
$n_H$ :	Hill-Koeffizient; Maß für die Kurvensteigung

Weicht der Hill-Koeffizient nicht signifikant von -1 ab, ist dies ein Hinweis auf eine homogene Rezeptorpopulation.

#### 4.1.1.1. Homologe Verdrängungsexperimente

Bei den homologen Verdrängungsexperimenten werden die Radioliganden  $^3\text{H}$ -Histamin und  $^3\text{H}$ -Pyrilamin jeweils von ihren strukturidentischen, nicht markierten Liganden verdrängt.

#### 4.1.1.2. Heterologe Verdrängungsexperimente

In heterologen Verdrängungsexperimenten werden die tritiierten Radioliganden  $^3\text{H}$ -Histamin und  $^3\text{H}$ -Pyrilamin durch andere Liganden am  $\text{H}_4\text{R}$  verdrängt.

Nach Cheng und Prusoff (1973) wird die Affinität ( $K_i$ -Wert) aus der halbmaximalen Hemmkonzentration des Verdrängers ( $\text{IC}_{50}$ ) mithilfe folgender Gleichung bestimmt:

$$K_i = \frac{\text{IC}_{50}}{(1 + [L]) / K_D}$$

$K_i$	= Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Kompetitor-Bindung
$\text{IC}_{50}$	= Wendepunkt der Inhibitionskurve bei halblogarithmischer Auftragung
$[L]$	= Konzentration des Radioliganden
$K_D$	= Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Radioligand-Bindung

Da bei homologen Kompetitions-Experimenten Radioligand und Kompetitor strukturgleich sind und folglich auch die gleichen Bindungseigenschaften am Rezeptor besitzen, gilt bei diesen  $K_i = K_D$ . Damit vereinfacht sich die Gleichung von Cheng und Prusoff zu:

$$K_D = K_i = \text{IC}_{50} - [L]$$

Mithilfe dieser Formel kann aus dem Wendepunkt der Kurve ( $\text{IC}_{50}$ ) die maximale Bindung errechnet werden (DeBlasi et al., 1989).

$$B_{\max} = \frac{B_0 \cdot \text{IC}_{50}}{[L]}$$

$B_{\max}$ :	Maximale Bindung; oder: in der Membransuspension vorhandene Bindungsstellen für den Radioliganden
$B_0$ :	Spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Kompetitors

Die Versuche wurden wie folgt durchgeführt:

Material		
20	µl	Radioligand
20	µl	Kompetitoren in verschiedenen Konzentrationen
160	µl	Membranpräparation: siehe 3.5.
200	µl	Gesamtvolumen

Die totale Radioligandenbindung wurde in Abwesenheit eines Kompetitors ermittelt ( $B_0$  = totale Bindung). Die Verdränger wurden in Konzentrationen von  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  M eingesetzt.

Als Radioliganden wurden  $^3\text{H}$ -Histamin und  $^3\text{H}$ -Pyrilamin eingesetzt.

Als Kompetitoren wurden in verschiedenen Experimenten folgende Substanzen eingesetzt:

Substanz	Charakteristik am $\text{hH}_4\text{R}$
Histamin	Agonist
JNJ7777120	Antagonist
Diphenhydramin	Antagonist
Thioperamid	inverser Agonist
Pyrilamin	Antagonist

Die Reaktionsansätze wurden für 60 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und danach durch, für 15 min in 0,1 % (m/v) PEI behandelte MGB Filter filtriert. Optimierungsexperimente ergaben, dass 0,1 % (m/v) PEI Lösung am besten dazu geeignet war, die unspezifische Bindung des Radioliganden am Filter zu verhindern. PEG in verschiedenen Konzentrationen sowie BSA waren hierzu weniger geeignet. Die Filter wurden in der Vakuum-Filtrationseinheit mit 5 ml eiskaltem TM Buffer gewaschen, danach wurde die Probe aufgetragen und wiederum mit 10 ml des kalten Puffers gewaschen.

Nach dem Absaugen des Puffers wurden die Filter in Szintillations-Tubes überführt und mit 3 ml Rotiszint versetzt. Nach guter Durchmischung konnte mithilfe des Szintillationsmessgerätes die an die Membranen gebundene, im Filter verbliebene Radioaktivität in CPM gemessen werden. Die Ergebnisse wurden mithilfe von nichtlinearer Regressionsberechnung ausgewertet. Es stehen zu diesem Zweck verschiedene Computerprogramme bereit. Hier wurde „GraphPad Prism“ verwendet.

#### 4.2. Quantifizierung des Proteingehalts nach Lowry

Für die quantitative Bestimmung der Membranproteine in den Bindungsexperimenten wurde die Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) angewandt. Diese beruht auf einer erweiterten Biuret-Reaktion, bei der zunächst aromatische Aminosäurereste oxidiert werden und dabei Cu (II) zu Cu (I) reduziert wird, das mit dem bereitgestellten Folinreagenz einen tiefblauen Farbkomplex bildet.

<b>Kupfersulfat-Tartrat-Natriumcarbonat (CTC-Lsg.)</b>		
0,1	% (m/v)	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
0,2	% (m/v)	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> - Tartrat
10	% (m/v)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
		zu lösen in A. bidest.

<b>Lowry A</b>		
10	ml	CTC Lsg.
10	ml	0,8 M NaOH
20	ml	5 % (m/v) SDS

<b>Lowry B</b>		
1	ml	Folin Ciocaleau Phenol Reagenz (Folin-Reagenz)
		verdünnt in 5 ml A. bidest.

<b>Standardkurve</b>			
A			A. dest.
B	2,5	% (m/v)	BSA
C	5	% (m/v)	BSA
D	7,5	% (m/v)	BSA
E	10	% (m/v)	BSA
		jeweils gelöst in A. bidest.	

Die Versuche wurden im Doppelansatz durchgeführt. Nach der Herstellung zweier Probenverdünnungen von je 3 µl Probe und 197 µl A. dest. wurden 400 µl Lowry A Reagenz zupipettiert. Es folgte eine Inkubation für 10 Minuten, worauf 200 µl Lowry B Reagenz dazupipettiert wurden. Nach einer Inkubation für 30 Minuten konnte die Farbintensität im Photometer bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 750 \text{ nm}$  gemessen werden. Die Ableitung der Proteingehalte ergab sich aus der Standardkurve.

### 4.3. Proteinbestimmung im Westernblot

Mithilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine der Größe nach aufgetrennt werden. Nach anschließender elektrophoretischer Übertragung auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran, kann man gewünschte Proteine mit spezifischen Antikörpern nachweisen (Westernblot). Die Antigen-Antikörper-Verbindungen können mittels Chemilumineszenz dargestellt werden (Wellmann, 2007).

### 4.3.1. Qualitativer Rezeptornachweis

Hiermit wurden die verwendeten Zellklone auf die Expression der Rezeptoren hin untersucht und deren Molekulargewicht bestimmt.

Im ersten Versuch wurde ein affinitätsgereinigter FLAG-Antikörper (Sequenz: DYKDDDK) in einer Arbeitskonzentration von 1 µg/µl verwendet. Dieser war am Institut bereits vorhanden. Durch das artifiziiell an den Rezeptor angefügte FLAG-Antigen (2.1.1.2) waren die Rezeptoren bei Vorhandensein in einer Membransuspension sicher zu detektieren.

Im zweiten Versuch wurde ein selbst gezogener, spezifischer anti-eH<sub>4</sub>R Antikörper verwendet. Die Peptidsequenz STNILSLSARVTLAFL-Cys wurde von der Firma Actavis, Reutlingen, synthetisiert. Das Peptid wurde über das C-terminale Cystein an KLH mittels SMCC gekoppelt. Die Firma Gramsch Laboratories, Schwabhausen, wurde damit beauftragt, mithilfe des Peptids und drei verschiedener Kaninchen nach folgendem Schema Antikörper zu produzieren:

Antikörperproduktion für 1. Antikörper anti-hH <sub>4</sub> R			
Tätigkeit/Datum	Kaninchen 1	Kaninchen 2	Kaninchen 3
Erstimmunisierung 18.12.2009	300 µg	300 µg	300 µg
1.Boost 08.01.2010	300 µg	300 µg	300 µg
2. Boost 17.02.2010	300 µg	300 µg	300 µg
3. Boost 16.03.2010	300 µg	300 µg	300 µg
Testserum 26.03.2010	20 ml	20 ml	20 ml
4. Boost 19.04.2010	300 µg	300 µg	300 µg
Production Bleed 27.04.2010	80 ml	80 ml	80 ml

Das gewonnene Serum wurde affinitätsgereinigt und in einer Konzentration von 1 µg/ml im Westernblot eingesetzt.

<b>Weitere Antikörper</b>		
1. Antikörper	anti-FLAG	1/2000 in TBS/T
2. Antikörper	anti-Rabbit POX	1/20000 in TBS/T

SDS Polyacrylamidgel:

<b>Trenngel</b>		
5	ml	30 % (m/v) Polyacrylamid (PAA)-Stammlösung
3,75	ml	1,5 M Tris/HCl-Lösung, pH 8,8
150	µl	10 % (m/v) SDS-Lösung
6,1	ml	H <sub>2</sub> O bidest.
75	µl	10 % (m/v) APS
15	µl	TEMED

<b>Sammelgel</b>		
1,7	ml	Rotiphorese – Gel (= 30 % PAA-Stammlösung)
1	ml	Tris-HCl 1,25 M
100	µl	10 % (m/v) SDS-Lösung
20	µl	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin (TEMED)
100	µl	Ammoniumperoxodisulfat (APS) 10 % (m/v)
7	ml	A. bidest.

## Westernblot Material:

<b>Anodenpuffer I</b>		
20	% (v/v)	Methanol
0,25	M	Tris-HCl

<b>Anodenpuffer II</b>		
20	% (v/v)	Methanol
0,025	M	Tris-HCl

<b>Kathodenpuffer</b>		
20	% (v/v)	Methanol
2,6	g	$\epsilon$ -Aminocaprylsäure

## SDS-PAGE:

Die Proteine wurden für 5 min bei 95°C im Probenpuffer nach Laemmli (1970) erhitzt, abgekühlt und anschließend 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. 10  $\mu$ l der Proben wurden in die Probentaschen der Sammelgele pipettiert. Anschließend wurde Laufpuffer zugegeben und die Proteine unter einer elektrischen Spannung von 100 V im Sammelgel und bei 200 V im Trenngel aufgetrennt.

## Durchführung des Semi-Dry-Proteintransfers:

Eine Graphitanode wurde mit in A. dest. getränktem Zellstoff befeuchtet. Je nach Anzahl der verwendeten Gele wurden PVDF-Membranen in der Größe von 8 x 5 cm ausgeschnitten und erst in Methanol (ca. 15 Minuten) und anschließend in Anode II Puffer (bis zur Verwendung) geschwenkt.

18 Filterpapiere in passender Größe wurden ausgeschnitten (für ein Gel: 8 x 5 cm, für 2 Gele 8 x 10 cm, etc.)

## Gelbehandlung nach der Elektrophorese:

Nachdem die Elektrophorese beendet war (s.o.), wurde der Rahmen mit den Gelen aus der Kammer entnommen.

Die Gele wurden aus den Gelhaltern entnommen, das Sammelgel abgetrennt, die Trenngele markiert und daraufhin in Anode II Puffer eingelegt.

Aufbau Semi-dry Blot:

Der feuchte Zellstoff wurde von der Anode genommen und 6 der zugeschnittenen Filterpapiere wurden in Anode I Puffer getränkt und übereinander auf die Anode gelegt, wobei Luftblasenbildung vermieden werden musste. Drei Filterpapiere wurden in Anode II Puffer getränkt und über die anderen auf die Anode gelegt. Nun wurden die PVDF-Membranen auf den Filterstapel gelegt und beschriftet. Darauf kamen die jeweiligen Gele zu liegen. Neun Filterpapiere wurden in Kathodenpuffer getränkt und über die Gele geschichtet. Nun wurde die Kathode aufgelegt und der Blot-Sandwich in die Apparatur gelegt.

Bei 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Membranfläche (64 mA in diesem Versuch) wurde für ca. 1,5 h geblottet.

Nach dem Blotten wurden die Filterpapiere sowie die Gele verworfen und die Membranen für eine Stunde in eine Roti-Block-Lösung eingelegt.

Nach dem Blockieren der freien Bindungsstellen wurden die Membranen in eine Lösung mit dem 1. Antikörper eingelegt und über Nacht schüttelnd bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Blots 4 x je 10 Minuten mit TBS/T gewaschen und danach für 1 h mit dem 2. Antikörper inkubiert. Jetzt wurden die Membranen wiederum 4 x je 10 Minuten mit TBS/T gewaschen.

Entwickeln der Blots:

Die Membranen wurden einzeln für jeweils 1 Minute in ECL-Reagenz eingelegt und danach in einer Klarsichthülle in eine Fotokassette gelegt.

Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter Rotlicht im Kühlraum:

Entwickler, Stopp-Lösung und Fixierer wurden in die dafür vorgesehenen Schalen gegossen. Über die Membranen wurde ein zugeschnittener Hyperfilm gelegt: Je 2 Membranen untereinander werden mit  $\frac{1}{4}$  des Films abgedeckt. Die Fotokassette wurde nun für ca. 1 Minute verschlossen und der belichtete Film danach bis zur gewünschten Intensität in Entwickler eingelegt. Nach der Behandlung mit Stopp-Lösung wurde der Film in Fixierlösung gelegt und abschließend mit Wasser gewaschen.

#### 4.3.2. Bestimmung der MAP-Kinase-Aktivität

Um den Einfluss von verschiedenen Histaminrezeptoragonisten und – antagonistien auf die MAP-Kinase-Aktivität messen zu können, wurden eH<sub>4</sub>R und hH<sub>4</sub>R Zellklone gleichmäßig auf Zellkulturplatten mit 12 Vertiefungen ausgesät und im Brutschrank kultiviert. Waren die Zellen dicht genug gewachsen, wurden sie mit DMEH Medium (siehe: 4.4) gewaschen und für den Zeitraum von einer Stunde mit 1 ml DMEH bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen nach folgendem Schema mit verschiedenen Liganden behandelt:

	1	2	3	4
A	basal, 500 $\mu$ l Medium	His, 1 mM	His, 1 mM JNJ, 1 $\mu$ M	JNJ, 1 $\mu$ M
B	basal, 500 $\mu$ l Medium	His, 1 mM	His, 1 mM JNJ, 1 $\mu$ M	JNJ, 1 $\mu$ M
C	Pyr, 1 $\mu$ M	Pyr, 1 $\mu$ M	Thio, 1 $\mu$ M	Thio, 1 $\mu$ M

Danach erfolgte eine fünfminütige Inkubation im Wasserbad bei 37°C. Die Reaktion wurde auf dem Eisbad gestoppt. Das Medium wurde nun abgesaugt, die Zellen mit 500  $\mu$ l Probenpuffer nach Laemmli für 15 Minuten lysiert, in ein 1,5 ml Schraubgefäß überführt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt.

Nun konnten die Proben nach dem Abkühlen sofort elektrophoretisch aufgetrennt werden. Der Vorgang wurde bereits unter Punkt 4.3.1 beschrieben. Auch der Semi-dry Proteintransfer wurde analog dem in Punkt 4.3.1 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Als Primäre Antikörper wurden anti-phospho-ERK1/2 und anti-ERK1/2, jeweils 1/2000 in TBS/T verdünnt, verwendet. Als 2. Antikörper wurde wiederum anti-Rabbit POX eingesetzt.

#### 4.4. Regulation der Adenylylcyclase

Die Regulation der Adenylylcyclase durch Histamin wurde in, den eH<sub>4</sub>R und hH<sub>4</sub>R stabil exprimierenden HEK293 Zellen durch Bestimmung der cAMP-Akkumulation bestimmt.

<b>Versuchsmedium DEMEH</b>		
25	mmol/l	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure] (Hepes)
500	µmol/l	3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)
gelöst in DMEM		
<b>Acetylierung der Proben mit</b>		
		Triethylamin
		Essigsäureanhydrid
		im Verhältnis 3 : 1

<b>Weiteres Zubehör</b>		
		Poly-L-Lysin
		24er Zellkulturplatten
50	mmol/l	HCl

Da HEK293 Zellen die Eigenschaft besitzen, sich schnell vom Boden der Kulturgefäße abzulösen, mussten die Zellkulturplatten für dieses

Experiment mit Poly-L-Lysin vorbehandelt werden. Dazu wurde 1%iges Poly-L-Lysin, in PBS gelöst, für 15 min in die Gefäße pipettiert und danach abgesaugt. Anschließend wurden die Zellklone auf die so vorbehandelten Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen im Wachstumsmedium ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 75 bis 80 % kultiviert.

Nach dem Absaugen des Wachstumsmediums wurde dieses durch 250 µl eiskaltes Versuchsmedium ersetzt, in dem die entsprechenden Liganden gelöst waren. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 15 Minuten im Wasserbad. Durch Zugabe von 750 µl 50 mmol/l HCl wurden die Reaktionen gestoppt und die Zellen lysiert. Nach dreißigminütiger Ruhe im Eisbad folgte der Acetylierungsschritt unter Schütteln mit 50 µl eines 3 : 1 Gemisches aus Triethylamin und Essigsäureanhydrid. Das acetylierte freie cAMP wurde anschließend im ELISA bestimmt.

Das dem Versuchsmedium zugesetzte IBMX, ein unspezifischer Phosphodiesterasehemmer, verhinderte die hydrolytische Spaltung des cAMP während des Versuches.

Im verwendeten Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) wird die im Versuch durch Forskolin und die entsprechenden Histaminrezeptorliganden stimulierte Neubildung von cAMP gemessen. In einer kompetitiven Verdrängung konkurriert das in der Probe vorhandene cAMP mit zugesetztem cAMP-Meerrettichperoxidasekonjugat um die Bindung an einem spezifischen Antikörper, welcher an einen affinitätsgereinigten anti-Kaninchen Antikörper in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte gebunden wird. Eine enzymgesteuerte Farbreaktion erlaubt die Detektion des Antigen-Antikörperkomplexes. Bei dieser katalysiert die Meerrettichperoxidase die Spaltung von  $H_2O_2$  zu Wasser und elementarem Sauerstoff, der nachfolgend farbloses  $TMBH_2$  zum blauen TMB umsetzt. Die Farbintensität wird im Photometer bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 405$  nm bestimmt. Je geringer die Farbintensität, umso mehr intrazellulär freigesetztes cAMP ist vorhanden.

## Benötigte Materialien:

Mikrotiterplatten, Nunc Nanosorp, mit Zertifikat

<b>Beschichtungspuffer</b>		
0,2	M	Carbonatpuffer, pH 9,4
100	µl	anti-Kaninchen IgG (10 µg/ml)

<b>Blockpuffer</b>		
0,05	M	NaAcetat, pH 6,0
200	µl/well	BSA (1 %)

<b>Probenpuffer</b>		
0,05	M	NaAcetat, pH 6,0
0,1	% (v/v)	BSA

<b>Waschpuffer</b>		
10	mM	Phosphatpuffer, pH 7,4
0,01	%	Tween-20

<b>1. AK</b>		
100	µl/well	Affinitätsgereinigtes anti-cAMP IgG (2,5 µg/ml)

<b>Konjugat</b>		
120	µl	Succinyl-cAMP an POX gekoppelt, 1/20 in Assaypuffer verdünnt, lyophilisiert
		Mit 120 µl A. bidest. rekonstituieren und weiter 1/1000 in Assaypuffer verdünnen

<b>Substratlösung A</b>		
1	g/l	Wasserstoffperoxid-Harnstoff
18	g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
10,3	g/l	Citronensäure x 1 H <sub>2</sub> O

<b>Substratlösung B</b>		
500	mg	Tetramethylbenzidin
40	ml	DMSO
10,3	g/l	Citronensäure x 1 H <sub>2</sub> O
ad 1l		A. bidest.

Vor dem Gebrauch sind die Substratlösungen A und B im Verhältnis 1:1 zu mischen.

<b>Standard Stammlösung</b>		
1	mmol/l	cAMP, in A. bidest.

<b>1/1000 Standard I (1 nmol/l)</b>		
10	µl	cAMP Stammlösung
990	µl	Assaypuffer

Erstellung der Standardreihe im Assaypuffer:

<b>Bezeichnung</b>	<b>Konzentration cAMP in 100 µl</b>	
A	0	mol
B	100	pmol
C	10	pmol
D	1	pmol
E	100	fmol

F	10	fmol
G	1	fmol
H	0,1	fmol

Alle Mengenangaben verstehen sich pro Vertiefung einer Zellkulturmikrotiterplatte.

Zum Beschichten der Platten wurden die Vertiefungen mit je 100 µl anti-Kaninchen IgG für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten ausgeklopft.

Daraufhin wurde zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen 200 µl Blockpuffer zugegeben, für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, abgegossen und ausgeklopft.

Jetzt konnten 100 µl der 1. Antikörperlösung aufgetragen werden. Nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Platten ausgeklopft und neunmal gewaschen.

Nun konnten 100 µl der Standards sowie der Proben aufgetragen werden. Die acetylierten Proben wurden vorher 1 : 10 in Assaypuffer verdünnt. Anschließend wurden in die Vertiefungen 100 µl Konjugatlösung pipettiert und die Platten über Nacht bei 4°C unter stetigem Schütteln inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde der Inhalt der Vertiefungen ausgekippt, die Platten ausgeklopft und neunmal gewaschen. Zum Entwickeln wurden nun 150 µl Substrat hinzugefügt und die beginnende Farbreaktion nach ca. 15 Minuten durch Zugabe von 50 µl 1 M HCl gestoppt.

Die Messung erfolgte im Gerät Tecan Spectra.

Die Graphische Auswertung des Ergebnisses geschah mithilfe des Computerprogrammes „Graphpad Prism5“.

## **V. ERGEBNISSE**

### **1. Klonierung der Rezeptoren**

#### **1.1. Überprüfung der cDNA**

Um die Qualität der aus der mRNA umgeschriebenen cDNA sicherzustellen, wurde in einem ersten PCR-Schritt das Vorhandensein von GAPDH bestimmt. Die Arbeitsschritte wurden unter Punkt IV.2.1.4.2 ausführlich beschrieben.

Die erwartete Länge des Amplifikats lag bei 232 Basenpaaren. Die im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel sichtbare Bande entspricht dieser Länge. Diese Einschätzung ergibt sich aufgrund eines Vergleiches mit dem ebenfalls aufgetragenen Längenstandard.

Das Ergebnis war positiv, sodass die cDNA für die Klonierung des eH<sub>4</sub>R verwendet werden konnte.

#### **1.2. Amplifizierung und Sequenzierung des eH<sub>4</sub>R**

Die im Schritt 1.1 geprüfte cDNA wurde nun als Template für die Amplifizierung und Klonierung des eH<sub>4</sub>R in pJET1.2/blunt Vektoren verwendet.

Die Versuchsbedingungen wurden in Vorversuchen bestimmt und sind unter Punkt IV.2.1.4.3 beschrieben. Wie in Abbildung 14 dargestellt, konnte ein 1185 bp langes Fragment vervielfältigt werden, das der errechneten Basenlänge des eH<sub>4</sub>R entsprach. Das Ergebnis der PCR mit anschließender Gelelektrophorese war daher als positiv zu betrachten. Die Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend, wie unter Punkt IV.2.1.4.6 beschrieben, aufgereinigt. Die Ausbeute betrug 0,175 µg/µl cDNA.

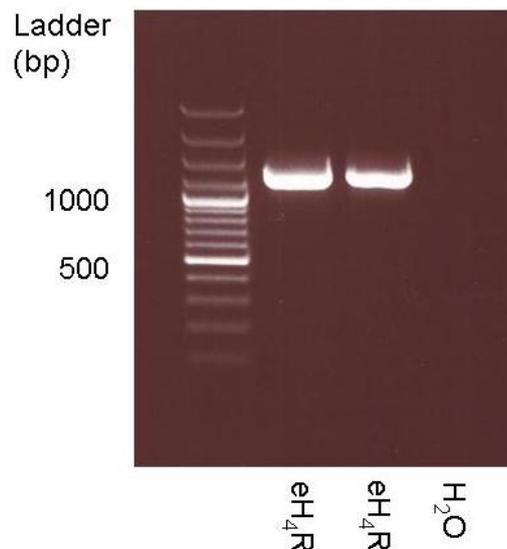


Abbildung 14: Gelelektrophoretische Darstellung des eH<sub>4</sub>R Fragmentes aus der PCR-Klonierung mit gut sichtbaren Banden in Höhe von ca. 1200 bp.

Das gereinigte PCR Produkt wurde nun nach Anleitung in pJET1.2/blunt Vektoren kloniert (IV.2.1.5.1), danach in kompetente *E. coli* transformiert (IV.2.1.7) und nach der positiven Selektion über Nacht kultiviert.

Die isolierten, aufgereinigten Plasmide wurden nun zur Doppelstrangsequenzierung an die Firma Eurofins/Martinsried verschickt.

Die isolierte Sequenz des ersten Klonierungsversuchs vom eH<sub>4</sub>R unterschied sich in drei Basenpaaren (57 A/G, 767 G/A, 792 C/T) von derjenigen des equinen Genomprojekts, die ebenfalls in der GenBank des NCBI unter der Kennung NM\_001163969.1 hinterlegt ist. Daher war es notwendig herauszufinden, ob dieser Unterschied auf einen Fehler bei der PCR zurückzuführen war oder ob die bisher noch nicht überprüfte Sequenz aus dem equinen Genomprojekt fehlerhaft ist. Es wurde daher ein zweiter Klonierungsversuch unternommen. Die dabei gewonnene Sequenz unterschied sich nur noch in einem Basenpaar (792 C/T). Demzufolge wurde der eH<sub>4</sub>R aus einem weiteren Pferd kloniert. Hier wurde ebenfalls an Stelle 792 ein C anstatt eines T gefunden. Da an dieser Stelle in einer partiellen cDNA Sequenz des eH<sub>4</sub>R (GenBank: DQ681354.1) ebenfalls ein C vorliegt, schien hier ein Fehler in der Sequenz des equinen Genomprojekts vorzuliegen. Die auf diese Weise verifizierte cDNA Sequenz des eH<sub>4</sub>R wurde in der Nucleotid Datenbank

von Pubmed veröffentlicht (Abbildung 15).

NCBI Resources How To

Nucleotide  
Alphabet of Life

Search: Nucleotide Limits Advanced search Help

Search Clear

Display Settings: GenBank

### Equus caballus breed Standardbred histamine 4 receptor (HRH4) mRNA, complete cds

GenBank: HM015200.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS HM015200 1185 bp mRNA linear MAM 15-MAY-2010

DEFINITION Equus caballus breed Standardbred histamine 4 receptor (HRH4) mRNA, complete cds.

ACCESSION HM015200

VERSION HM015200.1 GI:295882013

KEYWORDS .

SOURCE Equus caballus (horse)

ORGANISM [Equus caballus](#)  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Perissodactyla; Equidae; Equus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1185)  
AUTHORS Fischer, F. and Ammer, H.  
TITLE Cloning and pharmacological characterization of the equine histamine H4 receptor  
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1185)  
AUTHORS Fischer, F. and Ammer, H.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (19-MAR-2010) Veterinary Sciences, Institute of Pharmacology, Toxicology and Pharmacy, Koeniginstrasse 16, Munich 80539, Federal Republic of Germany

FEATURES

source Location/Qualifiers  
1..1185  
/organism="Equus caballus"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:9796"  
/chromosome="8"  
/note="breed: Standardbred"

gene 1..1185  
/gene="HRH4"

CDS 1..1185  
/gene="HRH4"  
/codon\_start=1  
/product="histamine 4 receptor"  
/protein\_id="ADG56720.1"  
/db\_xref="GI:295882014"  
/translation="MSATNSTNLSLSARVTLAFLMSLLAFIAVLGNVAVILAFVVDK NLRHRSNYFFLNLAISDFVGMISIPLYIPYKMFWDKFGTKICAFWLIIDYLLCTASV YNIVLISYDRYQSVSNNAISYRTQHTGILKIVAQMVAWVLAFLVHGEPVILVSESKEI EKGCEPGFFSQWYILVITSFLEFLVPVFSVAYFNMYIYRWLWKRGNLSRGPSPHGGIAS SVSSSNGCSCCKRFLFSSTSLPEVKEAGEAAAPLHKKQGRKNSLFFSLRTQNSNIIA SKMCSLSPSDSLLRQKEQLELLKARKLAKSLAILLAVFVVCWAPYSLFTIVHSTYPS DQRPATIWEYIAFWLQWFNSFINPFLYPLCHKSFQRAFLKLCRKKQPISSYNQSMSS QR"

ORIGIN

```

1 atgtcagcta ctaatagcac aaatatttta tcgttaagtg ctgcggtgac tttagcgttt
61 ttaatgagct tgctagcttt tgctatagtg ctgggaaatg ccggtggtcat tttagccttt
121 gtggtggaca aaaatcttag acatogaagt aattattttt ttcttaacct ggccatttct
181 gacttctctg ttggtatgat ctccattcct ttgtacatcc cttacaagat gtttgattgg
241 aagtttgtaa ctaaaatctg tgcattttgg ctcatatttg actatctttt gtgtacagca
301 tctgtatata acattgtact catcagctat gatogatacc agtcagcttc gaatgctata
361 tttacagaa ctcaacacac tgggatcttg aagattgttg cccagatggt ggccgtctgg
421 gtgttggcct tcttagtgca tggcccagta attctagttt cagagtcttg gaaggagagc
481 gagaagggtt gtgaacctgg attcttttca caatggtata tccttgtcat cacatcattc
541 ttggaattct tggttccggg cttctcagtg gottatttca acatgtatat ttaactggaga
601 ctatggaagc gtggcaatct cagcagggga ccaagccacc ctggaatcgc ttctctctgc
661 tcttccagta actgtggatg ctcatgcaag tgtagaactat tttcaagcac atctcttctc
721 gaagtgaagg aagcagggga agcagcggca ccccttcatt ccaagaaaca gggagaggag
781 aacagtctct tcttttcttt aagaaccocag aatagtaata taattgcttc caaaatgtgt
841 tccctctccc catcagattc cctacttctt cgccaaaagg aacagcttga actgctcaaa
901 gccaggaat tagccaagtc actggccatt ctcttagctg tttttgtggt ttgctgggct
961 ccttattctc tgttcacaat tgttcattca acttaccocct cagatcagcg tctctgcaaca
1021 atttggtaag aaatcgcat tggcttcag tggttcaatt cctttatcaa tcttttttg
1081 tatccattat gtcacaagag ttttcagagg gctttcttga aactattttg taggaaaaag
1141 caaccatata catcatacaa tcagtcaatg tctctctcaa gataa

```

//

Abbildung 15: GenBank Eintrag des aus einem Traber klonierten eH<sub>4</sub>R (accession number: HM015200).

### 1.3. Vergleich der Proteinsequenzen

Um Hinweise auf mögliche Unterschiede in der Funktion des eH<sub>4</sub>R zu finden, wurde die translatierte Proteinsequenz nun mit denjenigen anderer Spezies verglichen. Ausgewählt wurden bekannte Aminosäuresequenzen des H<sub>4</sub>R folgender Spezies. Die Sequenzen wurden der GenBank des NCBI unter der Adresse [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) entnommen:

Spezies	GenBank ID
Equus caballus	ADG56720.1
Homo sapiens	NP_067637.2
Macaca fascicularis	BAE16558.1
Sus scrofa	NP_999287.1
Cavia porcellus	NP_001166218.1
Rattus norvegicus	NP_571984.1
Mus musculus	NP_694727.1
Canis lupus	XP_547634.2
Oryctolagus cuniculus	XP_002713506.1

Zur Darstellung der Gemeinsamkeiten sowie der Unterschiede zwischen den verschiedenen Aminosäuresequenzen, wurde ein Aminosäurealignment mit dem Programm GeneJockeyII der Firma Biosoft durchgeführt. Die sieben transmembranen Domänen TM des eH<sub>4</sub>R wurden online mit dem Programm SMART ([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set\\_mode.cgi?NORMAL=1](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)) berechnet. Diese sind: TM1 (AA 20-42), TM2 (AA 51-73), TM3 (AA 86-108), TM4 (AA 129-151), TM5 (AA 171-193), TM6 (AA 307-329), TM7 (AA 339-361).

Aufgrund des charakteristischen Aufbaus wird der Rezeptor zur Familie der aminergen Vertreter der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Familie 1 gezählt.

```

          10      20      30      40      50      60
Contig# 1  . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . .
eHR4      MSATNST--NILSLSARVTLAFLMSLLAFIVLGNNAVVILAFVVDKNLRHRSNYFFLNLAISDFVGM
hHR4      MPDTNSTIN--LSLSTRVTLAFLMSLVAFAIMLGNALVILAFVVDKNLRHRSYFFLNLAISDFVGV
macHR4    MPDTNSTIN--LSLSTRITLAFMSLLAFAIMLGNNAVVILAFVVDKNLRHRSYFFLNLAISDFVGV
susHR4    MSAINDTNTNTPLNTRIALAFLMSLLALVIMLGNNAVVILAFVVDKNLRHRSNYFFLNLAISDFVGV
gpHR4     MLANNSTIALT---SIKISLTFMSLLAIAIMLGNVVVILAFIVDRNLRHRSNYFFLNLAIADFVGA
rHR4      MSESNGT--DVLPLTAQVPLAFLMSLLAFAITIGNNAVVILAFVADRNLRHRSNYFFLNLAISDFVGV
mHR4      MSESNST--GILPPAAQVPLAFLMSSFAFAIMVGNNAVVILAFVVDNLRHRSNYFFLNLAISDFLVGL
chr4      MSATNGTIT--LPLSTRITLAFMSLLAFAIMLGNNAVVILAFVVDKLRHRSNYFFLNLAIADFVGM
oHR4      MSNTNSTTH--LS-SVNIALAFLMSLLAFFITVGNNAVVILAFVVDKNLRHRSNYFFLNLAISDFVGV
    
```

```

          70      80      90      100     110     120     130
Contig# 1  | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . .
eHR4      SIPLYIPYKMFWDKFGTKICAFWLIIDYLLCTASVYNIIVLISYDRYQSVSNAISYRTQHTGILKIVAQM
hHR4      SIPLYIPHTLFEWDFGKEICVFWLTDDYLLCTASVYNIIVLISYDRYLSVSNVSYRTQHTGVLKIVTLM
macHR4    SIPLYIPHTLFEWDFGKEICVFWLTDDYLLCTASVYNIIVLISYDRYLSVSNVSYRTQHTGILKIVTLM
susHR4    SIPLYIPHTLFEWDFGKEICVFWLTDDYLLCTASVYNIIVLISYDRYQSVSNVSYRTQHTGILKIVALM
gpHR4     AIPLYIPSSLYTWTSGKQACVFWLITDYLCTASVYNIIVLISYDRYQSVSNVSYRAQHSQGTWKIATQM
rHR4      SIPLYIPHTLFNWNFGSGICMFWLITDYLCTASVYNIIVLISYDRYQSVSNVSYRAQHTGILKIVAQM
mHR4      SIPLYIPHTLFNWNFGSGICMFWLITDYLCTASVYNIIVLISYDRYQSVSNVSYRAQHTGIMKIVAQM
chr4      SIPLYIPHTLFDWDFGNKLCAFWLIADYLLCTTSVYNIIVLISYDRYQSVSNVSYRAQHTGILKIVSLM
oHR4      SIPLYIPHTLFNWNFGKEVCLFWLIIDYLLCTASVYNIIVLISYDRYQSVSNVSYRAQNTGSLRIVFQM
    
```

```

          140     150     160     170     180     190     200
Contig# 1  | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . .
eHR4      VAVVWLAFLVHGPIVILVSESWKET-----EKGCEPGFFSQWYILVITSFLEFLVVPVFSVAYFNMYYIW
hHR4      VAVVWLAFLVNGPMILVSESWKD-----EGSECEPGFFSEWYILAITSFLEFLVPIVILVAYFNMNIYW
macHR4    VAVVWLAFLVNGPMILVSETWKD-----EGSECEPGFFSEWYIVAITSFLEFLVPIVILVAYFNMNIYW
susHR4    VGVVWLAFLVHGPIVILVSEAWKQK-----QDCEPGFLKEWYVLAITLFFEFLLAPVLLVAYFNLYIYW
gpHR4     VAVWIFSFMTNGPMILISDSWQNST-----TECEPGFLKQWYFALPTSLEFLVPIVILVAYFSAHIYW
rHR4      VAVWILAFVNGPMILASDSWKNST-----NTECEPGFVTEWYILAITAFLEFLVLPVSVVYFVQIYW
mHR4      VAVWILAFVNGPMILASDSWKNST-----NTKCEPGFVTEWYILTITMLLEFLVPIVSVAYFNVQIYW
chr4      VAVVWLAFLVHGPIVILVSESWKNSFGVVEEKDCEPGFFTRWYVLAISSFFEFLLVVPVFSVAYFNMYYIW
oHR4      AAVVWLAFSVNTPMILISESWKNG-----SQACEPGFFSTWYILAITSLEFLVPIVIFVAYFNVYYIR
    
```

```

          210     220     230     240     250     260     270
Contig# 1  | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . .
eHR4      RLWKRGNLSRGPSPGPIASSVSSNCGCSCKRCLFSSTSLPEVKEAGEAAAPLHSHKQGRKNSLFFSLR
hHR4      SLWKRDLHLSRCQSHPGPTA--VSSNICGHSFRGLSSRRSLSAST---EVPASFHSERQRRKSSLMFSSR
macHR4    SLWKRDLHLSRCQSHPGPTA--VSSNSCGQSFRGLSSRGLSAST---EMPVSLHSESRQRRKSSLMYSLR
susHR4    SLWKRGLHLSRCQSHCGLTP--VSSGSGWHSFRGLFSRSLSDPK---EAAASLHSEPRRKRSTLWFSLR
gpHR4     SLWKREKLSRCLSHPVLPDSSSSDHGHSRQDPDSRATLPARKETT---ASLGSDKSRKSSLLFSLR
rHR4      SLWKRGLSRCPSHAGFIATSSRGT--GHSRRTGLACRSLPGLKEPA---ASLHSESPRGKSSLLVSLR
mHR4      SLWKRRALSRCPSHAGFSTSSAS--GHLHRAGVACRTSNPGLKESA---ASRHSESPRRKSSILVSLR
chr4      SLWKRGNLSRWQSQPTLTS--VSSNCGSLLRGLFSRSLSEQK---ETAPSVPLKRHERKSNLLLSLR
oHR4      RLRKRGVTRDGGHPRLPA--VPSSVCGYLLRCLLRSRSLPPSEEA---RTSLHSESRQGGKSSLLTSLQ
    
```

```

          280     290     300     310     320     330     340
Contig# 1  | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . .
eHR4      TQ--NSNIIASKMCSLSPSDSLLRQKEQLELLKARKLAKSLAILLAVFVVCWAPYSLETTIVHSTYPSDQ
hHR4      TKMNSNTIASKMGSFQSQSDSVALHQREHVELLRARRLAKSLAILLGVFAVCWAPYSLETTIVLSFYSSAT
macHR4    TKMNSNRIASKMGSFQSQSDSVALHQREHVELLRARRLAKSLAILLGVFAVCWAPYSLETTIVLSFYSSAT
susHR4    TRM--SSLTASNKGFVSHSDSLALHQHEHLELLRARKLARSALILLGVFAICWAPYSLETTIRSVYPTNP
gpHR4     AYKNSNVIASKMGFLSHSDSLALQQREHIELFRARKLAKSLAILLAAFAICWAPYSLETTVIYSFFPERN
rHR4      THMSGSI IAFKVSFCRSESPVLHQREHVELLRGRKLARSALVLLSAFAICWAPYCLETTIVLSTYRRGE
mHR4      THMNSSITAFKVSFWRSESAALRQREYAEHLLRGRKLARSALVLLSAFAICWAPYCLETTIVLSTYPRTE
chr4      AQMNSSIITSKMASLTHSDSLCLHQHEHLELLRARKLAKSLAILLGVFAVCWAPYSLETTIIRSIYPLEQ
oHR4      TQTKNNIIASKMSSLSHSDSLSLHQREHLKFRASKLA----ILLGVFAVCWTPYSLYTTIVHSIHPQAV
    
```



Um die phylogenetische Verwandtschaft der Primärsequenzen besser darstellen zu können, wurde mithilfe eines Programms der Moscow State University, welches auf der Seite [www.belozersky.msu.ru/institute.html](http://www.belozersky.msu.ru/institute.html) zu finden ist, ein phylogenetischer Stammbaum erstellt (Abbildung 17). Die Verwandtschaftsverhältnisse werden in Abbildung 18 dargestellt. Daraus geht hervor, dass der eH<sub>4</sub>R mit demjenigen des Hundes am nächsten verwandt ist. Danach folgen die Rezeptoren von Mensch, Javaneraffe, Schwein, Kaninchen, Maus, Ratte und Meerschweinchen.

#### Distance Matrix

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 eHR4	0.000	0.271	0.273	0.282	0.361	0.306	0.303	0.259	0.295
2 hHR4	0.271	0.000	0.056	0.257	0.321	0.283	0.298	0.253	0.289
3 macHR4	0.273	0.056	0.000	0.257	0.323	0.290	0.300	0.257	0.297
4 susHR4	0.282	0.257	0.257	0.000	0.352	0.310	0.314	0.262	0.337
5 gpHR4	0.361	0.321	0.323	0.352	0.000	0.341	0.337	0.363	0.377
6 rHR4	0.306	0.283	0.290	0.310	0.341	0.000	0.120	0.329	0.340
7 mHR4	0.303	0.298	0.300	0.314	0.337	0.120	0.000	0.331	0.353
8 cHR4	0.259	0.253	0.257	0.262	0.363	0.329	0.331	0.000	0.309
9 oHR4	0.295	0.289	0.297	0.337	0.377	0.340	0.353	0.309	0.000

#### Legende:

eHR4	Aminosäuresequenz des eH <sub>4</sub> R
hHR4	Aminosäuresequenz des hH <sub>4</sub> R
macHR4	Aminosäuresequenz des H <sub>4</sub> R von <i>Macaca fascicularis</i>
susHR4	Aminosäuresequenz des H <sub>4</sub> R von <i>Sus scrofa</i>
gpHR4	Aminosäuresequenz des H <sub>4</sub> R von <i>Cavia porcellus</i>
rHR4	Aminosäuresequenz des H <sub>4</sub> R von <i>Rattus norvegicus</i>
mHR4	Aminosäuresequenz des H <sub>4</sub> R von <i>Mus musculus</i>
cHR4	Aminosäuresequenz des H <sub>4</sub> R von <i>Canis lupus</i>
oHR4	Aminosäuresequenz des H <sub>4</sub> R von <i>Oryctolagus cuniculi</i>

Abbildung 18: Veranschaulichung der Variabilität zwischen den H<sub>4</sub>Rs der verschiedenen Spezies; erstellt mit: [http://www.genebee.msu.su/services/phtree\\_reduced.html](http://www.genebee.msu.su/services/phtree_reduced.html).

### 1.4. Epitop-Tagging der equinen und humanen Rezeptoren und Expression in HEK293 Zellen

Um die Rezeptoren immunologisch detektieren zu können, wurde am equinen und humanen H<sub>4</sub>R ein N-terminales FLAG-Antigen angefügt (siehe Punkt IV.2.1.1.2). Die dafür erforderlichen PCR-Experimente wurden in Punkt IV.2.1.4.4 und IV.2.1.4.5 beschrieben. Die PCR-Produkte

wurden nach der Auftrennung im Agarose Gel unter Sichtkontrolle aus dem Gel ausgeschnitten.

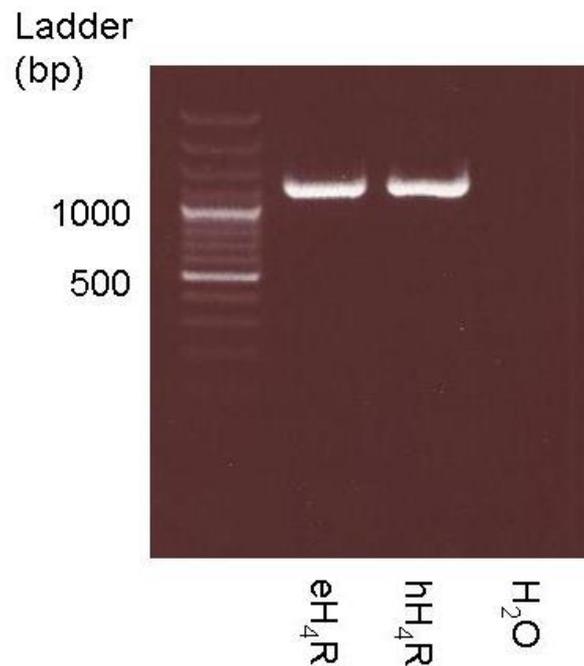


Abbildung 19: Gelelektrophoretische Auftrennung der FLAG-getaggten Konstrukte des eH<sub>4</sub>R und hH<sub>4</sub>R.

Die FLAG-getaggten Rezeptorkonstrukte wurden anschließend in den eukaryonten Expressionsvektor pcDNA3.1(+) subkloniert. Das Plasmid pcDNA3.1(+) verfügt über eine multiple cloning site (MCS) für verschiedene Restriktionsenzyme. In die PCR-Primer wurden entsprechende Schnittstellen bereits integriert, sodass das PCR-Produkt nach enzymatischem Verdau in den pcDNA3.1(+) Vektor eingefügt werden kann.

Nach dem Verdau wurde der Vektor elektrophoretisch aufgetrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt. In den gereinigten Vektor wurde anschließend das verdaute und ebenfalls aufgereinigte PCR-Produkt ligiert (IV.2.1.5.2). Nach erfolgreicher Transformation wurden einzelne *E. coli* Kolonien mittels entsprechender PCR-Primer auf das Vorhandensein von eH<sub>4</sub>R oder hH<sub>4</sub>R getestet. Positive Klone wurden über Nacht in LB-Broth weitergezogen. Am nächsten Morgen wurden die Plasmide mittels MidiPräp gewonnen (IV.2.1.8).

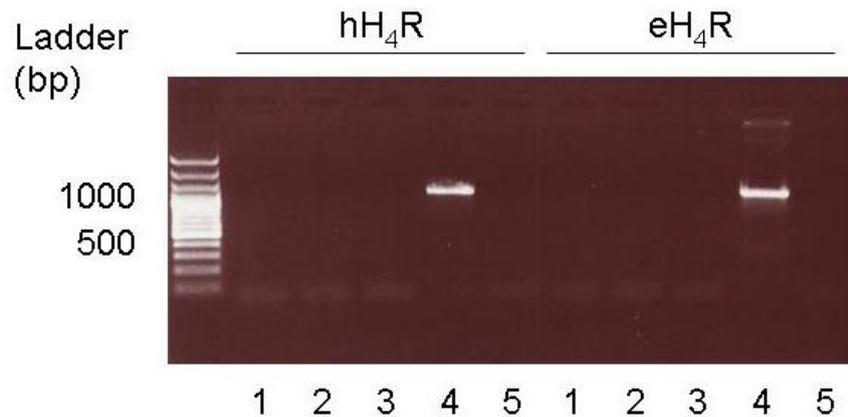


Abbildung 20: Gelelektrophorese der PCR zur Identifikation erfolgreich transformierter E. coli Kolonien. Klone hH<sub>4</sub>R 4 und eH<sub>4</sub>R 4 sind positiv und wurden für die weiteren Versuche verwendet.

Die so gewonnenen Plasmide wurden für die Transfektion von HEK293 und COS-7 Zellen verwendet (siehe Abschnitt: IV.3.2). Die Plasmid DNA wurde mittels Liposomentransfektionstechnologie in die Zellen eingebracht.

Da die Liposomentransfektion nicht alle Zellen eines Versuchsansatzes erfolgreich zu transfizieren vermag, war es notwendig, einzelne stabil exprimierende HEK293 Klone zu selektieren. Dies geschah mithilfe der Zugabe des Antibiotikums G418 zum Wachstumsmedium (IV.3.3).

### 1.5. Expression des eH<sub>4</sub>R und des hH<sub>4</sub>R in HEK293 Zellen

Insgesamt wurden je 12 positive HEK293 Klone für den eH<sub>4</sub>R und den hH<sub>4</sub>R ausgewählt, weiterkultiviert und auf ihre Rezeptorexpression in Radioligandenbindungsstudien mit <sup>3</sup>H-Pyridylamin untersucht. Folgende Klone wurden ausgewählt und für die weiteren Versuche verwendet:

Rezeptor	Bezeichnung	Rezeptorendichte (pmol/mg Membranprotein)
eH <sub>4</sub> R	eH6	26,44 ± 10,4 (Mittelwert ± SD; n = 3)
hH <sub>4</sub> R	hH8	22,12 ± 12,3 (Mittelwert ± SD; n = 3)

## 2. Charakterisierung der Rezeptoren

### 2.1. Biochemische Charakterisierung im Westernblot

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der Rezeptoren wurden Membranen von eH<sub>4</sub>R- und hH<sub>4</sub>R-HEK293 Klonen sowie von HEK293wt Zellen im Westernblot untersucht. Wie unter Punkt IV.4.3 beschrieben kamen zwei verschiedene Antikörper zum Einsatz. Zum einen ein anti-FLAG-Antikörper, zum anderen der eigens für diesen Versuch entworfene und hergestellte N-terminale anti-eH<sub>4</sub>R Antikörper.

Aus Abbildung 21 ist ersichtlich, dass beide Antikörper sowohl an das equine und humane Rezeptorprotein binden. Aufgrund der posttranslationalen Glycosylierung werden die Laufeigenschaften in der SDS-PAGE beeinträchtigt, sodass sich die Rezeptoren als multiple Banden mit einem Molekulargewicht zwischen 60 bis 90 kD darstellen. Die nichtglykosylierte Form läuft bei ca. 40 kDa.

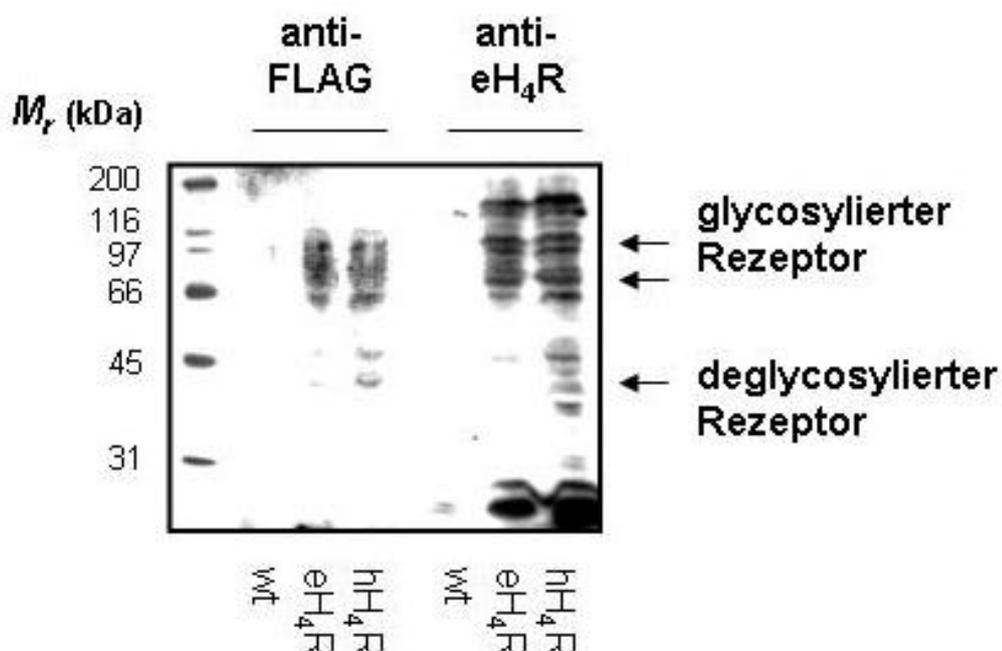


Abbildung 21: Darstellung des eH<sub>4</sub>R und hH<sub>4</sub>R im Westernblot mithilfe affinitätsgereinigter anti-FLAG und anti-eH<sub>4</sub>R Antikörpern (je 1 µg IgG/ml Inkubationslösung). Aufgetragen sind je 20 µg Membranprotein von HEK293 wt oder stabil exprimierenden eH<sub>6</sub> und hH<sub>8</sub> Klonen.

## 2.2. Pharmakologische Charakterisierung

Die Radioligandenbindungsuntersuchungen zur Bestimmung der Affinität von Histamin und ausgewählten Antagonisten wurden wie unter Punkt IV.4.1 beschrieben, durchgeführt.

### 2.2.1. Homologe Verdrängung von $^3\text{H}$ -Histamin durch Histamin

Um die Affinität von Histamin an seinem Rezeptor zu bestimmen, wurden homologe Verdrängungsexperimente mit  $^3\text{H}$ -Histamin als Radioligand durchgeführt. Obwohl unter Verwendung des Antagonisten  $^3\text{H}$ -Pyrilamin hohe Rezeptordichten in den stabil exprimierenden HEK293 Klonen nachgewiesen wurden, konnte mit dem Agonisten  $^3\text{H}$ -Histamin keine spezifische Bindung in diesen Zellen gefunden werden. Aus diesem Grund wurde die Affinität von Histamin in transient transfizierten COS-7 Zellen bestimmt. Trotz vergleichbarer experimenteller Bedingungen und verwendeter Plasmidmengen konnte hierbei jedoch nur für den  $\text{hH}_4\text{R}$  eine hinreichende Rezeptorexpression erreicht werden. Aus den Daten der Abbildung 22 wurde die Affinität von Histamin für den  $\text{hH}_4\text{R}$  mit  $1,31 \pm 0,8 \times 10^{-7} \text{ M}$  bestimmt (Mittelwert  $\pm$  SD;  $n = 3$ ).

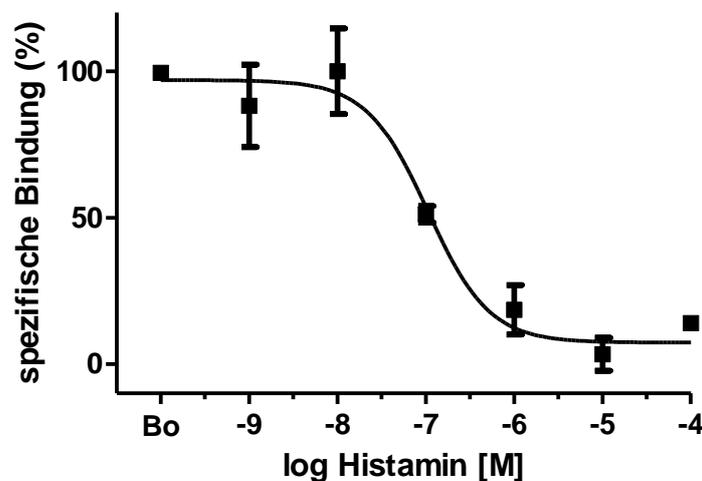


Abbildung 22: Homologe Verdrängung von  $^3\text{H}$ -Histamin mit Histamin in transient den  $\text{hH}_4\text{R}$  exprimierenden COS-7 Zellen.

### 2.2.2. Homologe Verdrängung von $^3\text{H}$ -Pyrilamin mit Pyrilamin

Da in den stabil exprimierenden HEK293 Klonen keine hochaffine  $^3\text{H}$ -Histaminbindung bestimmt werden konnte, wurden die folgenden Versuche mit dem nicht-selektiven Antagonisten  $^3\text{H}$ -Pyrilamin durchgeführt, der die G-Protein-gekoppelte und -ungekoppelte Rezeptorkonformation mit gleicher Affinität erkennt. In einem ersten Schritt wurde die Affinität am  $\text{H}_4\text{R}$  im homologen Verdrängungsexperiment bestimmt. Aus den in Abbildung 23 dargestellten Verdrängungskurven konnten unter Verwendung der Methode von DeBlasie et al. (1989), wie in Punkt IV.4.1.1.2 beschrieben, die Affinitäten berechnet werden. Diese liegen beim e $\text{H}_4\text{R}$  bei  $3,16 \pm 2,8 \times 10^{-7}$  M und beim h $\text{H}_4\text{R}$  bei  $1,78 \pm 1,1 \times 10^{-7}$  M (jeweils Mittelwert  $\pm$  SD; n = 3).

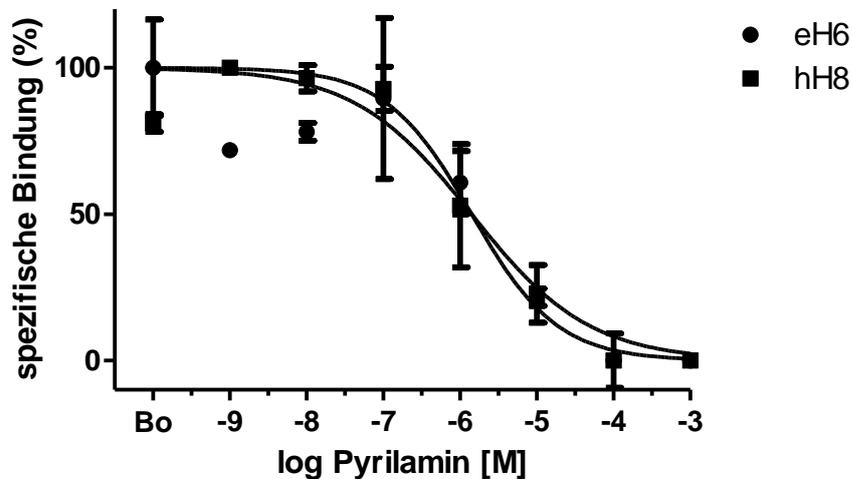


Abbildung 23: Homologe Verdrängung von  $^3\text{H}$ -Pyrilamin mit Pyrilamin in stabil  $\text{H}_4\text{R}$ -exprimierenden HEK293 Zellen.

### 2.2.3. Heterologe Verdrängung von $^3\text{H}$ -Pyrilamin mit JNJ7777120

Die Affinität des spezifischen  $\text{H}_4\text{R}$ -Antagonisten JNJ7777120 wurde in heterologen Verdrängungsexperimenten mit  $^3\text{H}$ -Pyrilamin als

Radioliganden bestimmt. Wie aus Abbildung 24 ersichtlich, existiert für den eH<sub>4</sub>R in HEK293 Zellen nur eine niederaffine Bindungsstelle, während für den hH<sub>4</sub>R zusätzlich eine hochaffine Bindungsstelle zu beobachten ist. Die Berechnung der inhibitorischen Konstante ( $K_i$ ) für JNJ7777120, nach der unter Punkt IV.4.1.1.2 beschriebenen Methode von Cheng und Prusoff (1973) ergab aufgrund der niedrigen Affinität von <sup>3</sup>H-Pyriamin am eH<sub>4</sub>R und hH<sub>4</sub>R keine aussagekräftigen Ergebnisse. Nichtsdestotrotz zeigen die Bindungsdaten, dass es sich bei den exprimierten Rezeptoren um die H<sub>4</sub>R handelt.

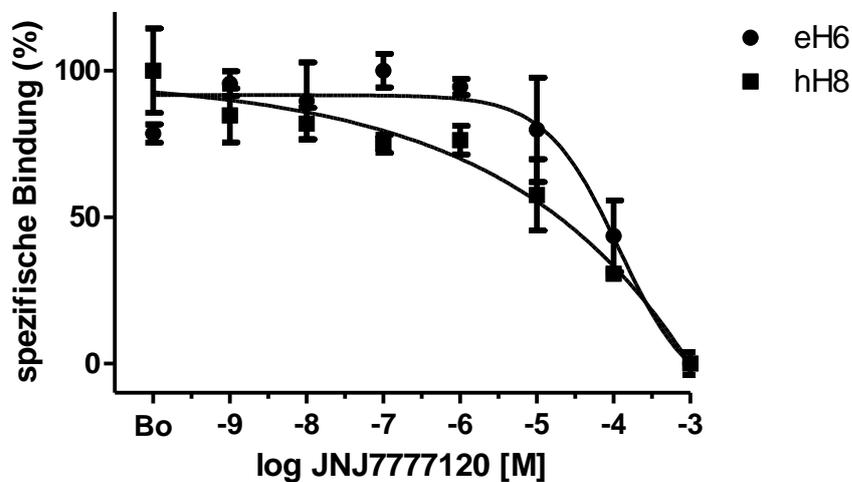


Abbildung 24: Heterologe Verdrängung von <sup>3</sup>H-Pyriamin mit JNJ7777120 in stabil H<sub>4</sub>R-exprimierenden HEK293 Zellen.

#### 2.2.4. Heterologe Verdrängung von <sup>3</sup>H-Pyriamin mit Thioperamid

Die Affinität des am hH<sub>4</sub>R als inverser Agonist wirkenden Thioperamid wurde in heterologen Verdrängungsexperimenten mit <sup>3</sup>H-Pyriamin als Radioliganden bestimmt. Abbildung 25 veranschaulicht die unterschiedlichen Bindungseigenschaften des eH<sub>4</sub>R und hH<sub>4</sub>R zu Thioperamid. Der Hill-Koeffizient von -0,44 für den eH<sub>4</sub>R zeigt, dass in diesen Zellen zwei Bindungsstellen für Thioperamid existieren. Diese konnten in hH<sub>4</sub>R-exprimierenden Zellen nicht aufgelöst werden.

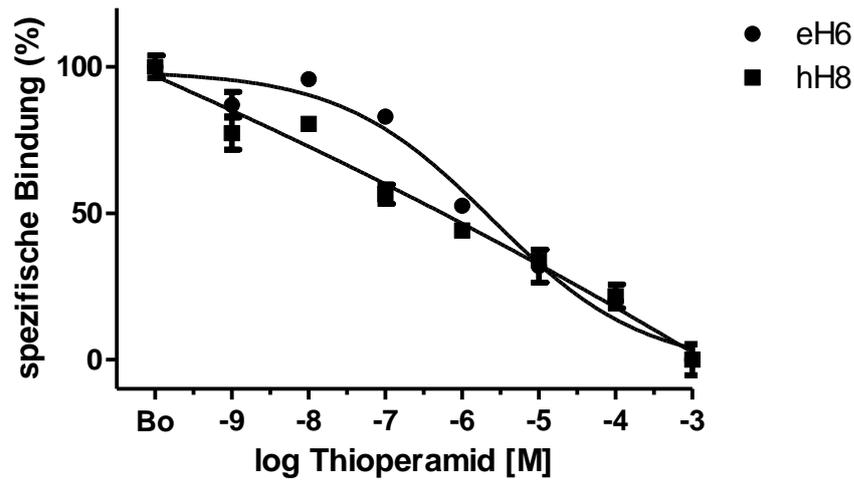


Abbildung 25: Heterologe Verdrängung von  $^3\text{H}$ -Pyirilamin mit Thioperamid in stabil  $\text{H}_4\text{R}$ -exprimierenden HEK293 Zellen.

### 2.2.5. Heterologe Verdrängung von $^3\text{H}$ -Pyirilamin mit Diphenhydramin

Die Affinität des nicht selektiven  $\text{hH}_1\text{R}$ -Antagonisten Diphenhydramin wurde in heterologen Verdrängungsexperimenten mit  $^3\text{H}$ -Pyirilamin als Radioligand bestimmt. Aus Abbildung 26 geht hervor, dass Diphenhydramin in der Tat eine einzige Bindungsstelle am  $\text{H}_4\text{R}$  mit niedriger Affinität besitzt. Dabei besteht kein Unterschied zwischen  $\text{eH}_4\text{R}$  und  $\text{hH}_4\text{R}$ . Die Berechnung der inhibitorischen Konstante ( $K_i$ ) für Diphenhydramin nach der unter Punkt IV.4.1.1.2 beschriebenen Methode von Cheng und Prusoff (1973) ergab aufgrund der niedrigen Affinität von  $^3\text{H}$ -Pyirilamin am  $\text{eH}_4\text{R}$  und  $\text{hH}_4\text{R}$  keine aussagekräftigen Ergebnisse. Die  $\text{EC}_{50}$ -Werte für Diphenhydramin lagen bei  $3,6 \pm 0,3 \times 10^{-5} \text{ M}$  ( $\text{eH}_4\text{R}$ ) und  $2,4 \pm 0,2 \times 10^{-5} \text{ M}$  ( $\text{hH}_4\text{R}$ ).

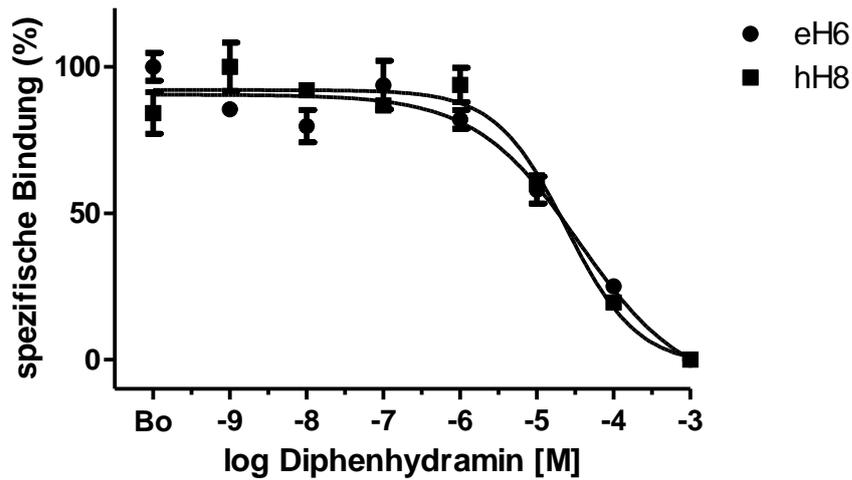


Abbildung 26: Heterologe Verdrängung von <sup>3</sup>H-Pyrlamin mit Diphenhydramin in stabil H<sub>4</sub>R-exprimierenden HEK293 Zellen.

### 2.3. Regulation der MAP-Kinase

Wie unter Punkt IV.4.3.2 beschrieben, wurde zunächst die Regulation der ERK1/2 durch den klonierten eH<sub>4</sub>R untersucht. Hierfür wurden eH6 und hH8 Zellen in An- und Abwesenheit von Histamin (10 μM) sowie verschiedener Antagonisten und inverser Agonisten (JNJ7777120, 1 μM; Pyrilamin, 1 μM und Thioperamid, 1 μM) für 5 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion auf Eis gestoppt und die Aktivierung der ERK1/2 mithilfe eines Phospho-spezifischen Antikörpers im Westernblot bestimmt. Wie aus Abbildung 27 ersichtlich ist, resultiert die Stimulation von eH6-Zellen mit Histamin in einer Zunahme der ERK1/2-Phosphorylierung um  $54,4 \pm 12 \%$  ( $n = 3$ ). Dieser Effekt ist in Anwesenheit von JNJ7777120 vollständig aufhebbar. Die alleinige Stimulation von eH6-Zellen mit JNJ7777120 und Thioperamid hat keinen Effekt. Dagegen führt die kurzzeitige Stimulation von eH6-Zellen mit Pyrilamin zu einer Abnahme der basalen ERK1/2-Aktivität um  $35,3 \pm 11 \%$  ( $n = 3$ ). Aufgrund der hohen basalen ERK1/2-Aktivität in hH8-Zellen konnte nach Inkubation mit Histamin (10 μM; 5 min) keine weitere Zunahme der Phosphorylierung gemessen werden. Dagegen nahm die basale ERK1/2-Phosphorylierung

in Anwesenheit von Pyrilamin um  $73,4 \pm 6,5$  % ( $n = 3$ ) ab.

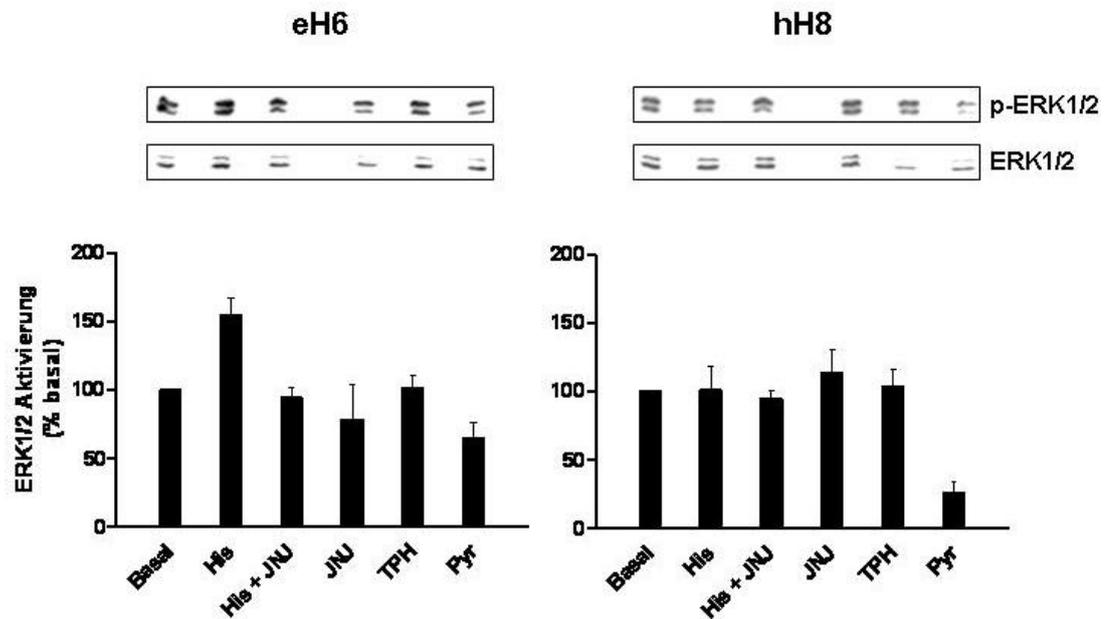


Abbildung 27: Regulation der ERK1/2-Aktivität durch Histamin, Antihistaminika und inverse Agonisten am  $H_4R$ .

#### 2.4. Regulation der Adenylylcyclase

Der  $H_4R$  ist über  $G\alpha_{i/o}$  Proteine inhibitorisch an die Adenylylcyclase gekoppelt, was zu einer Absenkung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt (Thurmond et al., 2008). Wie unter Punkt IV.4.4 beschrieben, wurden eH6 und hH8-Zellen mit Histamin, JNJ7777120, Thioperamid, Pyrilamin und Diphenhydramin behandelt und der intrazelluläre cAMP-Gehalt bestimmt. Forskolin bindet an die katalytische Einheit der Adenylylcyclasen und steigert so die intrazelluläre cAMP-Produktion, wodurch die  $H_4R$ -vermittelten Effekte besser bestimmbar werden.

### 2.4.1. Regulation der Adenylylcyclase in eH6-Zellen

Abbildung 28 zeigt, dass die Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Forskolin eine starke Stimulation der cAMP-Produktion bewirkt. Diese wird in Anwesenheit von Histamin (10  $\mu\text{M}$ ) um ca. 75 % gehemmt. Der selektive H<sub>4</sub>R-Antagonist JNJ7777120 (1  $\mu\text{M}$ ) ist in der Lage, diese Hemmung teilweise aufzuheben. Die H<sub>4</sub>R-Antagonisten JNJ7777120 und Pylramin besitzen eine geringe eigenständige Hemmwirkung auf die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion. Der inverse H<sub>4</sub>R-Agonist Thioperamid und der nicht selektive Antagonist Diphenhydramin haben keinen Einfluss auf die Aktivität der Adenylylcyclase.

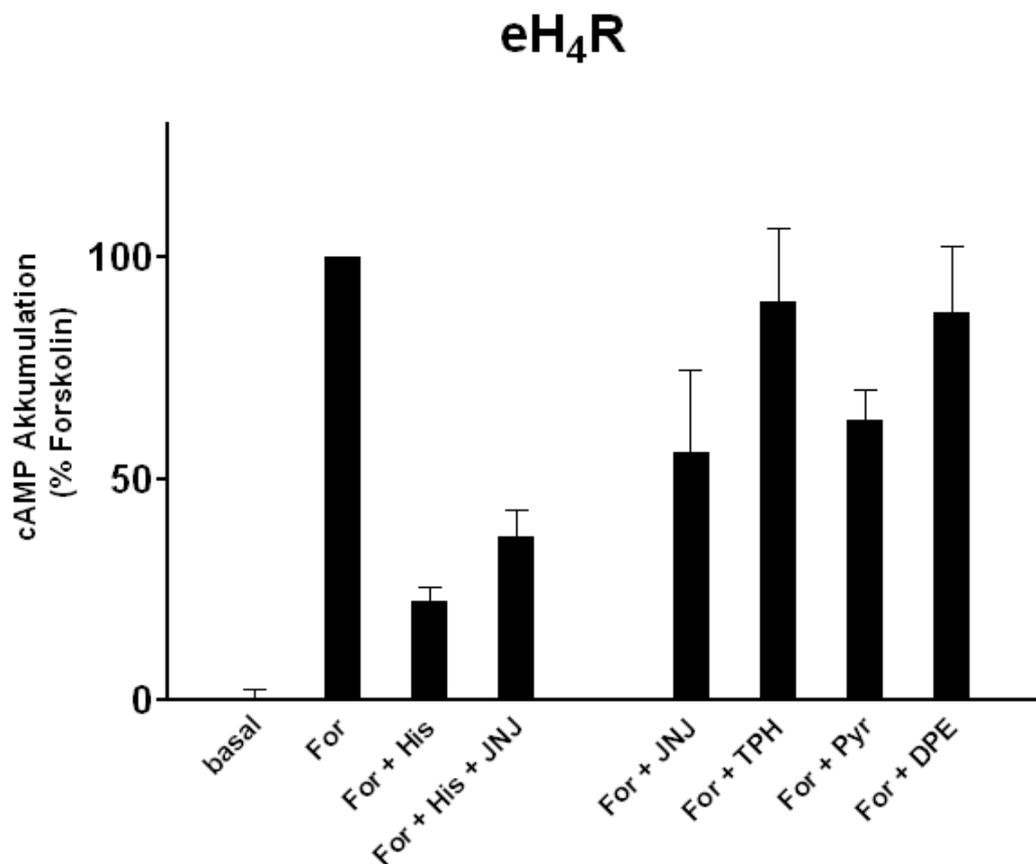


Abbildung 28: Regulation der cAMP-Produktion in eH6-Zellen durch verschiedene Histaminrezeptorliganden.

### 2.4.2. Regulation der Adenylylcyclase in hH8-Zellen

Aus Abbildung 29 geht hervor, dass Histamin auch über den hH<sub>4</sub>R die intrazelluläre cAMP-Konzentration sehr stark reduziert (-84 %). Im Vergleich zum eH<sub>4</sub>R hebt der H<sub>4</sub>R-Antagonist JNJ7777120 den Histamineffekt fast vollständig auf. Die Antagonisten JNJ7777120 und Pyrilamin alleine besitzen kaum Einfluss auf die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion. Thioperamid hingegen scheint am hH<sub>4</sub>R als Agonist zu wirken und die Adenylylcyclase zu hemmen. Diphenhydramin jedoch verhält sich in hH8-Zellen als inverser Agonist und stimuliert die cAMP-Produktion.

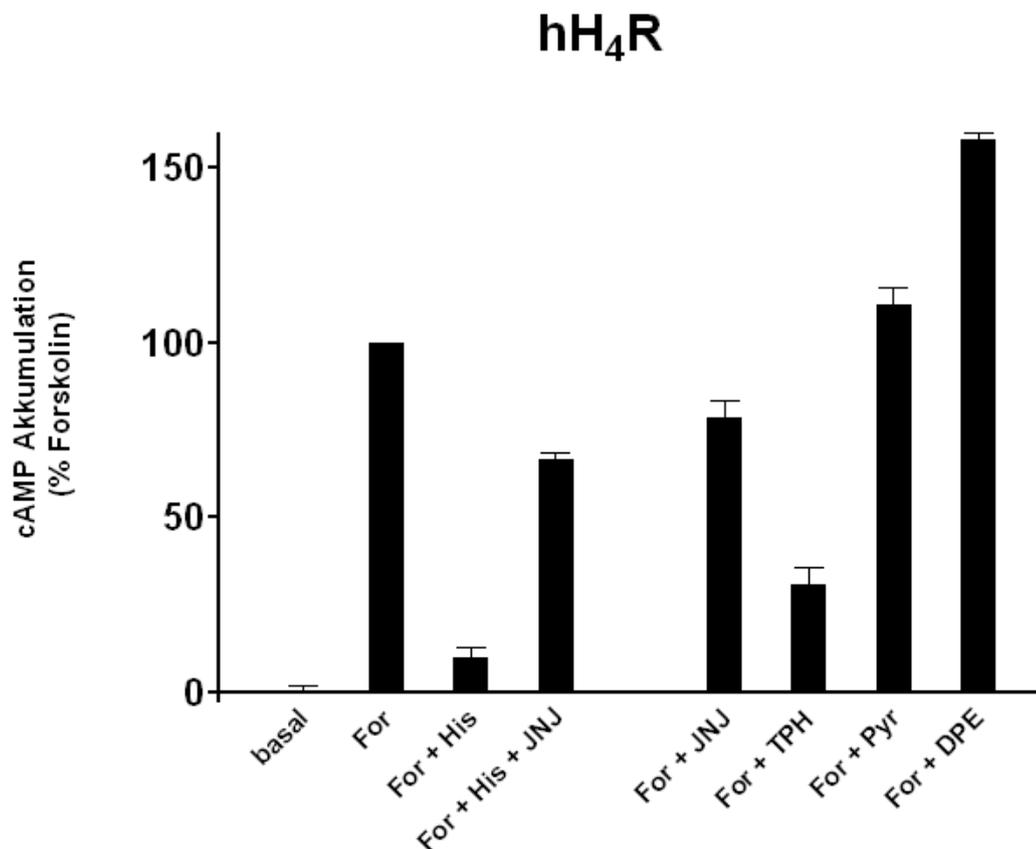


Abbildung 29: Regulation der cAMP-Produktion in hH8-Zellen durch verschiedene Histaminrezeptorliganden.

## VI. DISKUSSION

In der Humanmedizin wird gegenwärtig ein weltweiter Anstieg von Asthmaerkrankungen, wenn auch mit großen regionalen Unterschieden, verzeichnet (Asher et al., 2006). Aus klinischer Sicht muss dieser Tendenz mit wirksamen Medikationen entsprochen werden (Peat und Li, 1999). Derzeit werden zur Behandlung von allergisch bedingten Atemwegserkrankungen hauptsächlich Glukokortikoide zur Inhalation verwendet (Ohbayashi et al., 2010). Hier ist in neuester Zeit der Wirkstoff Ciclesonid in den Vordergrund gerückt, der als Prodrug erst in den Schleimhautzellen aktiviert wird und somit keine systemischen Nebenwirkungen besitzt (Gelfand et al., 2006; Meltzer und Derendorf, 2006). Glukokortikoide sind nicht dazu in der Lage, das Fortschreiten der Erkrankung aufzuhalten (Guilbert et al., 2006). Im Falle einer akuten Bronchokonstriktion sind  $\beta_2$ -Adrenozeptoragonisten zur schnellen Weitung der Atemwege das Mittel der Wahl (Bateman et al., 2004). Aufgrund dieser unbefriedigenden Lage wird eine Verbesserung der derzeitigen Therapiemethoden angestrebt.

Der humane  $H_4R$  stellt sich seit seiner Klonierung und Charakterisierung als vielversprechendes Ziel pharmakologischer Interventionen dar. Aufgrund seiner Expression in Zellen des Immunsystems liegen die Schwerpunkte hier auf der Therapie von Asthma und anderen entzündlich bedingten Krankheiten (Parsons und Ganellin, 2006). Ähnlich dem menschlichen Asthma, geht die sogenannte Recurrent Airway Obstruction (RAO) des Pferdes einher mit reversibler Bronchokonstriktion sowie einer Ansammlung von neutrophilen Granulozyten und Mucus in den Atemwegen (Furness et al., 2010). Das Pferd wird deswegen als mögliches Modell für die menschliche Asthma- und COPD-Forschung gesehen (Ghio et al., 2006). Die genannten Überlegungen gaben ursprünglich den Anstoß für die Durchführung dieses Dissertationsprojekts, mit dem Ziel, den  $H_4R$  des Pferdes erstmals vollständig zu klonieren, zu sequenzieren und pharmakologisch zu charakterisieren – dies im Vergleich mit dem  $hH_4R$ .

## 1. Klonierung des eH<sub>4</sub>R

Um den eH<sub>4</sub>R klonieren und exprimieren zu können, wurde als Referenzsequenz die vermutete eH<sub>4</sub>R mRNA-Sequenz des NCBI mit der Bezeichnung „NM\_001163969.1“ verwendet. Davon wurden spezifische Primer abgeleitet. Die zur Klonierung durchgeführte RT-PCR ist qualitativer Natur und lässt kaum Rückschlüsse auf die Expressionsrate der mRNA des eH<sub>4</sub>R in equinen Leukozyten zu. Die Tatsache, dass die Ergebnisse der RT-PCR selbst unter definierten Bedingungen großen Schwankungen unterlagen, lässt darüber spekulieren, dass entweder die Expression in Leukozyten allgemein oder der relative Anteil der m-RNA exprimierenden Zellpopulationen variiert. Dies steht in Übereinstimmung mit Morse et al. (2001) und Coge et al. (2001), die ebenfalls alternierende Rezeptorexpressionen beschrieben. Hier wurden sie vor allem in entzündetem Gewebe fündig. Das Gelingen der PCR und der Vergleich mit dem NCBI-Eintrag bestätigt die vom equinen Genomprojekt erarbeitete, aber bisher nicht veröffentlichte mRNA-Sequenz.

Der klonierte Rezeptor unterschied sich in Basenpaar 792 von der mRNA-Sequenz „NM\_001163969.1“. An Stelle 792 steht im PCR Produkt ein C, wohingegen die mRNA des NCBI hier ein T aufweist. Eine frühere partielle Klonierung des eH<sub>4</sub>R mit dem GenBank Eintrag DQ681354.1 weist an dieser Stelle ebenfalls ein C auf, was die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten bestätigt. Die Substitution des C durch T an dieser Stelle besitzt keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz. Die ermittelten Daten wurden daher als Grundlage für die Veröffentlichung in der GenBank des NCBI unter der Kennung HM015200 verwendet. Siehe auch Abbildung 15: GenBank Eintrag des aus einem Traber klonierten eH<sub>4</sub>R (accession number: HM015200).

## 2. Vergleich der Aminosäuresequenzen

Die Aminosäuresequenzen des H<sub>4</sub>R folgender Spezies wurden miteinander verglichen (angegeben ist die NCBI accession Number): *Equus caballus* (ADG56720.1), *Homo sapiens* (NP\_067637.2), *Macaca fascicularis* (BAE16558.1), *Sus scrofa* (NP\_999287.1), *Cavia porcellus* (NP\_001166218.1), *Rattus norvegicus* (NP\_571984.1), *Mus musculus* (NP\_694727.1), *Canis lupus* (XP\_547634.2), *Oryctolagus cuniculus* (XP\_002713506.1).

Die Homologien zwischen dem hH<sub>4</sub>R und dem eH<sub>4</sub>R innerhalb der transmembranen Domänen stellen sich wie folgt dar: TM1: 85 %; TM2: 95 %; TM3: 90 %; TM4: 80 %; TM5 78 %; TM6: 96 %; TM7: 77 %. Die TM 3, 5 und 6 werden als die für die Ligandenbindung bedeutendsten transmembranen Domänen angesehen.

Die ausgeprägte Heterogenität in der 3. intrazellulären Domäne sowie im C-Terminus fällt besonders auf. Lim et al. (2010) beschrieben für die Aminosäure H4.57, dass Histidin bei Hund und Schwein anstelle von Asparagin bei Mensch, Maus, Ratte, Javaneraffe und Meerschweinchen die Ligandenbindung von Histamin, JNJ7777120, Clozapin und VUF 8430 negativ beeinflusst. In einer N4.57H/S5.43L Rezeptormutante des Schweins lassen sich diese negativen Bindungseigenschaften vollkommen aufheben (Lim et al., 2010). Dieselben Autoren beschrieben auch einen negativen Einfluss von L5.43 auf die Ligandenbindung beim Schwein im Vergleich zum Menschen (Serin). Aminosäure V5.39 (siehe Abb.9) wird als alleinig verantwortlich für die gesteigerte Affinität von Histamin, JNJ7777120 und VUF8430 zum hH<sub>4</sub>R im Vergleich zum Rezeptor des Javaneraffen angesehen (Lim et al., 2010). Der eH<sub>4</sub>R weist an Stelle 4.57, genau wie der des Schweins ein Histidin auf, was die Bindungseigenschaften negativ beeinflussen könnte. An Stelle V5.39 weist der eH<sub>4</sub>R, genau wie der hH<sub>4</sub>R die Aminosäure Leucin auf, was sich positiv auf die Bindungseigenschaften zu Histamin, JNJ7777120 und VUF 8430 auswirken könnte. Aminosäure S5.43 des H<sub>4</sub>R ist bei Pferd und Mensch homolog. Jongejan et al. (2008) beschrieben die herausragende

Funktion der Aminosäure Glutamat E5.46 im hH<sub>4</sub>R. Die Mutation von E zu Q an dieser Stelle führt zu einer 1000-fach verminderten Affinität von Histamin und des spezifischen H<sub>4</sub>R-Agonisten VUF 8340. Auch Schneider et al. (2010) messen dieser Aminosäure wichtige Bedeutung zu. Der eH<sub>4</sub>R weist an dieser Stelle E auf, sodass hier keine negative Beeinträchtigung der Bindungseigenschaften zu erwarten ist. Laut Shi et al. (2002) spielt D3.32 in der TM3 des hH<sub>4</sub>R eine entscheidende Rolle bei der Bindung biogener Amine. Sie kommt auch beim Pferd an dieser Stelle vor.

### **3. Expression von eH<sub>4</sub>R und hH<sub>4</sub>R in HEK293 und COS-7 Zellen**

Zur heterologen Expression für pharmakologische Studien von H<sub>4</sub>R wurden in der Vergangenheit verschiedene Zelllinien herangezogen. Lim et al. (2010) beschrieben eine ausreichende Rezeptorexpression in HEK293 Zellen von 1 - 6,9 pmol/mg Membranprotein. COS-7 Zellen wurden erfolgreich zur Expression des caninen H<sub>4</sub>R verwendet (Jiang et al., 2008). Schneider et al. (2010) verwendeten Sf9 Insektenzellen. HEK293 Zellen fanden auch in den pharmakologischen Studien von Morse et al. (2000) Verwendung. Van Rijn et al. (2006) verwendeten ebenso HEK293 und COS-7 Zellen zur Expression des hH<sub>4</sub>R. Die unzureichende Bindung von <sup>3</sup>H-Histamin in den Versuchen der vorliegenden Arbeit wirft im Gegensatz dazu die Frage nach der Expression funktionell aktiver Rezeptoren in HEK293 Zellen auf. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass der nicht-selektive Antagonist <sup>3</sup>H-Pyrlamin eine hohe und vergleichbare Affinität zum eH<sub>4</sub>R und hH<sub>4</sub>R besitzt. Die transiente Expression in COS-7 Zellen dagegen ließ im Fall von hH<sub>4</sub>R, nicht aber von eH<sub>4</sub>R eine spezifische <sup>3</sup>H-Histaminbindung zu.

#### 4. Bindungseigenschaften des eH<sub>4</sub>R

Die pharmakologische Charakterisierung des Rezeptors erfolgte mithilfe der Radioligandenbindung. In homologen und heterologen Verdrängungsexperimenten wurde die Affinität ( $K_D$ ;  $IC_{50}$ ) für die Kompetitoren bestimmt. Vergleichbare Experimente wurden bei der Charakterisierung des H<sub>4</sub>R anderer Spezies verwendet (Oda et al., 2001; van Rijn et al., 2006, 2008; Jiang et al., 2008; Lim et al., 2009; Schneider et al., 2010).

Der in früheren Arbeiten bestimmte  $K_D$ -Wert für Histamin am hH<sub>4</sub>R wird mit 25 bis 250 nM angegeben (Liu et al., 2001; Morse et al., 2001; Zhu et al., 2001). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelte  $K_D$  liegt mit 131 nM im vergleichbaren Rahmen. Aufgrund der niedrigen Expressionsrate in HEK293 und COS-7 Zellen konnte die Affinität des equinen Rezeptors in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt werden. Nguyen et al. (2001) bestimmten die  $K_D$  für <sup>3</sup>H-Pyrilamin des hH<sub>4</sub>R mit 32 nM. Im Zuge dieser Arbeit wurde im Gegensatz dazu die Affinität des hH<sub>4</sub>R etwas niedriger mit 178 nM bestimmt. Für den eH<sub>4</sub>R konnte unter gleichen Versuchsbedingungen eine Affinität von 316 nM ermittelt werden. Dieser speziesspezifische Unterschied könnte in den Variationen in der Primärstruktur der Rezeptoren begründet liegen. In der vorliegenden Arbeit konnte zudem die Affinität des selektiven H<sub>1</sub>R-Antagonisten Diphenhydramin bestimmt werden. Die  $K_i$ -Werte lagen jedoch mit 240 nM (hH<sub>4</sub>R) und 360 nM (eH<sub>4</sub>R) sehr niedrig. Vergleichswerte für Diphenhydramin am hH<sub>4</sub>R existieren in der Literatur derzeit nicht. Der  $K_i$ -Wert liegt jedoch dreifach niedriger als derjenige für den H<sub>1</sub>R (79 nM; Booth et al., 2002).

#### 5. Regulation der Adenylylcyclase durch Histamin

Der H<sub>4</sub>R ist an inhibitorische G-Proteine gekoppelt, die für die Hemmung der katalytischen Aktivität der Adenylylcyclase verantwortlich sind (Hurley,

1999; Hofstra et al., 2003). Unsere Versuche zeigten, dass die forskolininduzierte cAMP-Akkumulation in HEK-eH<sub>4</sub>R Klonen durch Histamin stark gehemmt wird. Dieser Effekt wird in Anwesenheit des H<sub>4</sub>R-Antagonisten JNJ7777120 wie von Thurmond et al. (2004) beschrieben, teilweise aufgehoben. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in hH8-Zellen erzielt, die mit der Literatur übereinstimmen (Oda et al., 2000; Liu et al., 2001). Morse et al. (2001) konnten dagegen keine Regulation der Adenylylcyclase durch Histamin in HEK293 Zellen beobachten. Es ist beschrieben, dass in humanen SK-N-MC-Zellen der inverse H<sub>4</sub>R-Agonist Thioperamid die Forskolin-induzierte cAMP-Akkumulation zusätzlich steigert (Liu et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit verhielt sich Thioperamid dagegen als Agonist; in hH8-Zellen führte dies zu einer Hemmung der cAMP-Produktion, während in eH6-Zellen kein Effekt zu beobachten war. Diphenhydramin erwies sich dagegen in hH8-Zellen als starker inverser Agonist, während es in eH6-Zellen ebenfalls keine intrinsische Aktivität aufwies (siehe: V.2.4.2). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass H<sub>4</sub>R-Liganden am equinen im Vergleich zum humanen Rezeptor unterschiedliche intrinsische Aktivitäten aufweisen können.

## 6. Regulation der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen

Morse et al. (2001) wiesen erstmals nach, dass Histamin in stabil hH<sub>4</sub>R-transfizierten HEK293 Zellen die ERK1/2 aktiviert. In der vorliegenden Arbeit konnten wir nur in eH6-, nicht aber in hH8-Zellen eine Histamin-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung beobachten, die in Anwesenheit von JNJ7777120 hemmbar war. Die basale ERK1/2-Aktivität wurde dagegen durch Pylilamin, insbesondere beim hH<sub>4</sub>R stark gemindert. Dies weist darauf hin, dass Pylilamin in diesem System als inverser Agonist wirkt. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstrichen, dass der hH<sub>4</sub>R eine hohe konstitutive Aktivität aufweist (Schneider et al., 2010b).

## 7. Pharmakologische Besonderheiten des eH<sub>4</sub>R

Die Affinität von Histamin zu dem in der vorliegenden Arbeit klonierten eH<sub>4</sub>R ist mit der des hH<sub>4</sub>R vergleichbar. Da der selektive H<sub>4</sub>R-Antagonist JNJ7777120 Histamin nicht nur in vergleichbarer Konzentration vom Rezeptor verdrängt, sondern auch die Histamin-vermittelte Hemmung der Adenylylcyclase und Aktivierung der ERK1/2 aufhebt, lässt darauf schließen, dass es sich bei dem klonierten Rezeptor in der Tat um den eH<sub>4</sub>R handelt. Pyrilamin ist in der Literatur als H<sub>4</sub>R-Antagonist beschrieben (Nguyen et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine Bindung von Pyrilamin an den H<sub>4</sub>R bestätigt. Diese lag jedoch beim hH<sub>4</sub>R um den Faktor 5, beim eH<sub>4</sub>R um den Faktor 10 niedriger. Der Unterschied in der Affinität spiegelte sich in einer deutlich stärkeren Hemmung der basalen MAP-Kinase-Aktivität in hH8-Zellen wider. Diphenhydramin ist ein bekannter H<sub>1</sub>R- und H<sub>3</sub>R-selektiver Antagonist (Booth et al., 2002). Über die Bindung von Diphenhydramin an den H<sub>4</sub>R ist bisher nichts bekannt. Unsere Ergebnisse zeigen nicht nur eine Bindung sondern auch ausgeprägte inverse Aktivität sowohl am eH<sub>4</sub>R, als auch am hH<sub>4</sub>R. Die Bindungsstärken liegen jedoch um den Faktor 1000 niedriger als am H<sub>1</sub>R (Booth et al., 2002). Dies bedeutet, dass therapeutische Dosierungen von Diphenhydramin beim Pferd (0,25 mg/kg KM; Plumb, 1999) kaum H<sub>4</sub>R-Aktivität zeigen und damit immunmodulatorisch wirken. Der spezifische H<sub>4</sub>R-Antagonist JNJ7777120 (Thurmond et al., 2004) hebt die Histaminwirkung kompetitiv auf, verfügte aber über keine ausgeprägte inverse Aktivität in den durchgeführten funktionellen Assays. In den heterologen Bindungsexperimenten konnte in hH8-Zellen eine zweite hochaffine Bindungsstelle aufgelöst werden, während in eH6-Zellen nur eine niederaffine Bindungsstelle beobachtet wurde. Diese Beobachtung korreliert mit der geringen inversen Aktivität von JNJ7777120 am hH<sub>4</sub>R (Schneider et al., 2010a). Das derzeit in der Literatur als stärkster inverser Agonist am H<sub>4</sub>R beschriebene Thioperamid (Liu et al., 2001), wies in unseren Experimenten keine derartige Aktivität auf. Im Gegenteil, Thioperamid verhielt sich in hH8-, nicht aber in eH6-Zellen bei der Bestimmung der Adenylylcyclase als Agonist. Mögliche Gründe für die

---

unterschiedlichen intrinsischen Aktivitäten der untersuchten Liganden können die Rezeptordichte, die G-Proteinkopplung oder posttranslationelle Modifikationen in den verwendeten HEK293 Zellen sein (Schneider und Seifert, 2010).

## VII. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der equine Histamin 4 Rezeptor (eH<sub>4</sub>R) kloniert, sequenziert und einer ersten pharmakologischen Charakterisierung unterzogen. Die Ergebnisse wurden vergleichend mit dem humanen H<sub>4</sub>R (hH<sub>4</sub>R) dargestellt. Aufgrund seiner Expression in Zellen des Immunsystems stellt der hH<sub>4</sub>R einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Arzneistoffe für die Behandlung allergischer Krankheiten dar. Beim Pferd sind hier vor allem Recurrent Airway Obstruction (RAO) und allergische Dermatitis zu nennen.

Für die Klonierung wurde mRNA aus Pferdeblut gewonnen, diese durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und der eH<sub>4</sub>R mithilfe von spezifischen Primern vervielfältigt. Danach wurde das Amplifikat in pJET1.2/blunt Vektoren umklont und sequenziert. Die codierende cDNA-Sequenz ist 1185 bp lang, das translatierte Protein weist 394 Aminosäuren und eine 72,9%ige Homologie zum Rezeptor des Menschen auf. Die cDNA-Sequenz wurde in der GENBANK des NCBI unter der Accession Number HM015200 veröffentlicht.

Für die pharmakologische und funktionelle Charakterisierung wurden die eH<sub>4</sub>R und hH<sub>4</sub>R cDNA in den Expressionsvektor pcDNA3.1 umklont und entweder transient in COS-7 oder stabil in HEK 293 Zellen exprimiert. Die Bindungseigenschaften wurden in homologen und heterologen Verdrängungsexperimenten mit dem Antagonisten <sup>3</sup>H-Pyrimin oder Agonisten <sup>3</sup>H-Histamin als Radioliganden bestimmt. Dabei konnte für Histamin nur in hH<sub>4</sub>R-, nicht aber in eH<sub>4</sub>R-transfizierten COS-7 Zellen eine hochaffine Bindung identifiziert werden. Unabhängig davon ist Histamin in den stabil exprimierenden HEK293 Zellen in der Lage, sowohl über den eH<sub>4</sub>R als auch über den hH<sub>4</sub>R die cAMP-Produktion zu hemmen. Der in HEK293 Zellen exprimierte eH<sub>4</sub>R ist ebenfalls an die Stimulation der ERK1/2 gekoppelt, während der hH<sub>4</sub>R eine ausgeprägte konstitutive Aktivität aufweist. Die Antagonisten JNJ777120, Thioperamid, Pyrimin und Diphenhydramin zeigen nicht nur erhebliche speziesspezifische

Unterschiede in ihren Affinitäten zwischen eH<sub>4</sub>R und hH<sub>4</sub>R, sie unterscheiden sich auch in ihrer intrinsischen Aktivität. Während das am hH<sub>4</sub>R als inverser Agonist beschriebene Thioperamid bei der Regulation der ERK1/2 als Agonist wirkte, zeigte der neutrale, nicht-selektive Antagonist Diphenhydramin eine ausgeprägte inverse Aktivität, die besonders stark beim hH<sub>4</sub>R zur Geltung kam. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der klonierte eH<sub>4</sub>R umfangreiche pharmakologische und funktionelle Unterschiede zum hH<sub>4</sub>R besitzt.

## VIII. SUMMARY

### Molecular cloning and pharmacological characterization of the equine histamine H<sub>4</sub> receptor

In the present study, the equine histamine 4 receptor (eH<sub>4</sub>R) was cloned, sequenced and pharmacologically characterized. The findings were compared to those, obtained with the human H<sub>4</sub>R (hH<sub>4</sub>R). Due to its expression in cells of the immune system, the eH<sub>4</sub>R provides a promising target for the development of novel therapeutic strategies in allergic diseases, such as Recurrent Airway Obstruction (RAO) and allergic dermatitis in the horse.

To clone the eH<sub>4</sub>R, mRNA was isolated from horse white blood cells and cDNA was synthesized by reverse transcription. Specific primers were used to amplify the eH<sub>4</sub>R sequence, which was then cloned into pJET1.2/blunt vectors. The open reading frame is 1185 bp long and codes for a 394 amino acid protein which shows 72,9 % homology to the human receptor. The cDNA sequence was published in the NCBI GenBank under the accession number HM015200.

To pharmacologically and functionally characterize the eH<sub>4</sub>R and hH<sub>4</sub>R, their cDNAs were subcloned into the expression vector pcDNA3.1 and either transfected transiently into COS-7 cells or stably into HEK293 cells. Binding-characteristics were examined by homologous and heterologous competition experiments using the antagonist <sup>3</sup>H-pyramine or the agonist <sup>3</sup>H-histamine as radioligand. High affinity binding of histamine could only be detected in hH<sub>4</sub>R, but not in eH<sub>4</sub>R transfected COS-7 cells. Nevertheless, histamine was able to inhibit cAMP-production in stably transfected HEK293 cells via the eH<sub>4</sub>R and the hH<sub>4</sub>R. The eH<sub>4</sub>R expressed in HEK293 cells is coupled to the stimulation of ERK1/2, while the hH<sub>4</sub>R shows already high constitutive activity. The antagonists JNJ7777120, Thioperamide, Pyrilamine and Diphenhydramine display considerable species-specific differences concerning the affinities between eH<sub>4</sub>R and hH<sub>4</sub>R and also vary in their intrinsic activities. Thioperamide, known for its inverse agonism at the hH<sub>4</sub>R showed agonist behaviour in

---

ERK1/2 regulation. In contrast, the non-selective antagonist Diphenhydramin showed inverse agonist behaviour, which was more pronounced at the hH<sub>4</sub>R than the eH<sub>4</sub>R. These findings suggest that there are considerable pharmacological and functional differences between the cloned eH<sub>4</sub>R and hH<sub>4</sub>R.

## IX. LITERATURVERZEICHNIS

Akdis, C. A. and K. Blaser (2003). "Histamine in the immune regulation of allergic inflammation." J Allergy Clin Immunol **112**(1): 15-22.

Akdis, C. A. and F. E. Simons (2006). "Histamine receptors are hot in immunopharmacology." Eur J Pharmacol **533**(1-3): 69-76.

Alberts, B., J. H. Wilson, et al. (2008). Molecular biology of the cell. 5. Edition, New York, Garland Science.

Arrang, J. M., M. Garbarg, et al. (1983). "Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor." Nature **302**(5911): 832-837.

Asher, M. I., S. Montefort, et al. (2006). "Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys." Lancet **368**(9537): 733-743.

Ballesteros J.A., Weinstein H. (1995). "Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein coupled receptors." Methods Neurosci **25**: 366-428

Barlow R., Blake J. F. (1989) Hill coefficients and the logistic equation. Trends Pharmacol Sci.**10**: 440-441.

Bateman, E. D., H. A. Boushey, et al. (2004). "Can guideline-defined asthma control be achieved? The Gaining Optimal Asthma Control study." Am J Respir Crit Care Med **170**(8): 836-844.

Baumer, W., S. Wendorff, et al. (2008). "Histamine H4 receptors modulate dendritic cell migration through skin--immunomodulatory role of histamine." Allergy **63**(10): 1387-1394.

Bell, J. K., D. S. McQueen, et al. (2004). "Involvement of histamine H4 and H1 receptors in scratching induced by histamine receptor agonists in Balb C mice." Br J Pharmacol **142**(2): 374-380.

Boer, K., E. Helinger, et al. (2008). "Decreased expression of histamine H1 and H4 receptors suggests disturbance of local regulation in human colorectal tumours by histamine." Eur J Cell Biol **87**(4): 227-236.

Booth, R. G., N. H. Moniri, et al. (2002). "A novel phenylaminotetralin radioligand reveals a subpopulation of histamine H(1) receptors." J Pharmacol Exp Ther **302**(1): 328-336.

Boyer, S. B. and P. A. Slesinger (2010). "Probing novel GPCR interactions using a combination of FRET and TIRF." Commun Integr Biol **3**(4): 343-346.

Buckland, K. F., T. J. Williams, et al. (2003). "Histamine induces cytoskeletal changes in human eosinophils via the H(4) receptor." Br J Pharmacol **140**(6): 1117-1127.

Cannon, K. E. and L. B. Hough (2005). "Inhibition of chemical and low-intensity mechanical nociception by activation of histamine H3 receptors." J Pain **6**(3): 193-200.

Cheng, Y. and W. H. Prusoff (1973). "Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction." Biochem Pharmacol **22**(23): 3099-3108.

Clark, R. A., J. A. Sandler, et al. (1977). "Histamine modulation of eosinophil migration." J Immunol **118**(1): 137-145.

Coge, F., S. P. Guenin, et al. (2001). "Structure and expression of the human histamine H4-receptor gene." Biochem Biophys Res Commun **284**(2): 301-309.

Corren, J., A. G. Harris, et al. (1997). "Efficacy and safety of loratadine plus pseudoephedrine in patients with seasonal allergic rhinitis and mild asthma." J Allergy Clin Immunol **100**(6 Pt 1): 781-788.

Dale, H. H. and P. P. Laidlaw (1919). "Histamine shock." J Physiol **52**(5): 355-390.

Daneshmand, M. A., R. S. Keller, et al. (2004). "Histamine H1 and H2 receptor-mediated vasoreactivity of human internal thoracic and radial arteries." Surgery **136**(2): 458-463.

DeBlasi, A., K. O'Reilly, et al. (1989). "Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor." Trends Pharmacol Sci **10**(6): 227-229.

Duan, L., X. Chen, et al. (2010), "Regulatory Effect of Histamine on the Barrier Function of Intestinal Mucosal." J Gastrointest Surg. **14**(7):1180-5

Dunford, P. J., N. O'Donnell, et al. (2006). "The histamine H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells." J Immunol **176**(11): 7062-7070.

Dunford, P. J., K. N. Williams, et al. (2007). "Histamine H4 receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus." J Allergy Clin Immunol **119**(1): 176-183.

Furness, M. C., D. Bienzle, et al. (2010). "Immunohistochemical identification of collagen in the equine lung." Vet Pathol **47**(5): 982-990.

Gelfand, E. W., J. W. Georgitis, et al. (2006). "Once-daily ciclesonide in children: efficacy and safety in asthma." J Pediatr **148**(3): 377-383.

Gemkow, M. J., A. J. Davenport, et al. (2009). "The histamine H3 receptor as a therapeutic drug target for CNS disorders." Drug Discov Today **14**(9-10): 509-515.

Ghio, A. J., M. R. Mazan, et al. (2006). "Correlates between human lung injury after particle exposure and recurrent airway obstruction in the horse." Equine Vet J **38**(4): 362-367.

Grzybowska-Kowalczyk, A., D. Maslinska, et al. (2008). "Expression of histamine H4 receptor in human osteoarthritic synovial tissue." Inflamm Res **57 Suppl 1**: S63-64.

Guilbert, T. W., W. J. Morgan, et al. (2006). "Long-term inhaled corticosteroids in preschool children at high risk for asthma." N Engl J Med **354**(19): 1985-1997.

Gutzmer, R., C. Diestel, et al. (2005). "Histamine H4 receptor stimulation suppresses IL-12p70 production and mediates chemotaxis in human monocyte-derived dendritic cells." J Immunol **174**(9): 5224-5232.

Hill, S. J., C. R. Ganellin, et al. (1997). "International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors." Pharmacol Rev **49**(3): 253-278.

Hofstra, C. L., P. J. Desai, et al. (2003). "Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells." J Pharmacol Exp Ther **305**(3): 1212-1221.

Hough, L. B. (2001). "Genomics meets histamine receptors: new subtypes, new receptors." Mol Pharmacol **59**(3): 415-419.

Hurley, J. H. (1999). "Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase." J Biol Chem **274**(12): 7599-7602.

Jansen-Olesen, I., A. Ottosson, et al. (1997). "Role of endothelium and nitric oxide in histamine-induced responses in human cranial arteries and detection of mRNA encoding H1- and H2-receptors by RT-PCR." Br J Pharmacol **121**(1): 41-48.

Jeffrey, K. L., M. Camps, et al. (2007). "Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses." Nat Rev Drug Discov **6**(5): 391-403.

Jiang, W., H. D. Lim, et al. (2008). "Cloning and pharmacological characterization of the dog histamine H4 receptor." Eur J Pharmacol **592**(1-3): 26-32.

Jongejan, A., H. D. Lim, et al. (2008). "Delineation of agonist binding to the human histamine H4 receptor using mutational analysis, homology modeling, and ab initio calculations." J Chem Inf Model **48**(7): 1455-1463.

Keen, M. (1997). "Radioligand-binding methods for membrane preparations and intact cells." Methods Mol Biol **83**: 1-24.

Kholodenko, B. N. and M. R. Birtwistle (2009). "Four-dimensional dynamics of MAPK information processing systems." Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med **1**(1): 28-44.

Kozak, M. (1984). "Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo." Nature **308**(5956): 241-246.

Kozak, M. (1987). "An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs." Nucleic Acids Res **15**(20): 8125-8148.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Leurs, R., R. A. Bakker, et al. (2005). "The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drugs." Nat Rev Drug Discov **4**(2): 107-120.

Lim, H. D., R. M. van Rijn, et al. (2005). "Evaluation of histamine H1-, H2-, and H3-receptor ligands at the human histamine H4 receptor: identification of 4-methylhistamine as the first potent and selective H4 receptor agonist." J Pharmacol Exp Ther **314**(3): 1310-1321.

Lim, H. D., R. A. Smits, et al. (2006). "Discovery of S-(2-guanidylethyl)-isothiourea (VUF 8430) as a potent nonimidazole histamine H4 receptor agonist." J Med Chem **49**(23): 6650-6651.

Lim, H. D., E. P. Istyastono, et al. (2009). "Clobenpropit analogs as dual activity ligands for the histamine H3 and H4 receptors: synthesis, pharmacological evaluation, and cross-target QSAR studies." Bioorg Med Chem **17**(11): 3987-3994.

Lim, H. D., C. de Graaf, et al. (2010). "Molecular determinants of ligand binding to H4R species variants." Mol Pharmacol **77**(5): 734-743.

Liu, C., S. J. Wilson, et al. (2001). "Comparison of human, mouse, rat, and guinea pig histamine H4 receptors reveals substantial pharmacological species variation." J Pharmacol Exp Ther **299**(1): 121-130.

Liu, C., X. Ma, et al. (2001). "Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H(4)) expressed in bone marrow." Mol Pharmacol **59**(3): 420-426.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.

Martinez-Mir, M. I., L. Estan, et al. (1992). "Effect of histamine and histamine analogues on human isolated myometrial strips." Br J Pharmacol **107**(2): 528-531.

Medhurst, A. D., M. A. Briggs, et al. (2007). "Structurally novel histamine H3 receptor antagonists GSK207040 and GSK334429 improve scopolamine-induced memory impairment and capsaicin-induced secondary allodynia in rats." Biochem Pharmacol **73**(8): 1182-1194.

Medina, V., G. Cricco, et al. (2006). "Histamine-mediated signaling processes in human malignant mammary cells." Cancer Biol Ther **5**(11): 1462-1471.

Medina, V. A. and E. S. Rivera (2010). "Histamine receptors and cancer pharmacology." Br J Pharmacol. **161**(4): 755-67

Meltzer, E. O. and H. Derendorf (2006). "The systemic safety of inhaled corticosteroid therapy: a focus on ciclesonide." Ann Allergy Asthma Immunol **97**(2): 149-157.

Morse, K. L., J. Behan, et al. (2001). "Cloning and characterization of a novel human histamine receptor." J Pharmacol Exp Ther **296**(3): 1058-1066.

Morgan, R. K., B. McAllister, et al. (2007). "Histamine 4 receptor activation induces recruitment of FoxP3+ T cells and inhibits allergic asthma in a murine model." J Immunol **178**(12): 8081-8089.

Mou, T. C., A. Gille, et al. (2006). "Broad specificity of mammalian adenylyl cyclase for interaction with 2',3'-substituted purine- and pyrimidine nucleotide inhibitors." Mol Pharmacol **70**(3): 878-886.

Nakamura, T., H. Itadani, et al. (2000). "Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R." Biochem Biophys Res Commun **279**(2): 615-620.

Nguyen, T., D. A. Shapiro, et al. (2001). "Discovery of a novel member of the histamine receptor family." Mol Pharmacol **59**(3): 427-433.

O'Byrne, P. M. and K. Parameswaran (2006). "Pharmacological management of mild or moderate persistent asthma." Lancet **368**(9537): 794-803.

Oda, T., N. Morikawa, et al. (2000). "Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes." J Biol Chem **275**(47): 36781-36786.

Oda, T., S. Matsumoto, et al. (2002). "cDNA cloning and characterization of porcine histamine H4 receptor." Biochim Biophys Acta **1575**(1-3): 135-138.

Oda, T., S. Matsumoto, et al. (2005). "Molecular cloning of monkey histamine H4 receptor." J Pharmacol Sci **98**(3): 319-322.

O'Keefe, G. E., L. M. Gentilello, et al. (1998). "Incidence of infectious complications associated with the use of histamine2-receptor antagonists in critically ill trauma patients." Ann Surg **227**(1): 120-125.

Ohki, E., M. Suzuki, et al. (2007). "Expression of histamine H4 receptor in synovial cells from rheumatoid arthritic patients." Biol Pharm Bull **30**(11): 2217-2220.

Ohbayashi, H., S. Hozawa, et al. (2010). "Current Situation of Asthma Therapy by Allergists in Primary Medical Facilities in Japan." Allergol Int **59**(4).

Parsons, M. E. and C. R. Ganellin (2006). "Histamine and its receptors." Br J Pharmacol **147 Suppl 1**: S127-135.

Peat, J. K. and J. Li (1999). "Reversing the trend: reducing the prevalence of asthma." J Allergy Clin Immunol **103**(1 Pt 1): 1-10.

Plumb DC (1999). *Veterinary Drug Handbook*. PharmaVet Publishing, White Bear Lake (USA); 853 pp

Rozen, S. and H. Skaletsky (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." Methods Mol Biol **132**: 365-386.

Schneider, E. H. and R. Seifert (2010). "Sf9 cells: A versatile model system to investigate the pharmacological properties of G protein-coupled receptors." Pharmacol Ther. **128**(3): 387-418

Schneider, E. H., A. Strasser, et al. (2010). "Structural requirements for inverse agonism and neutral antagonism of indole-, benzimidazole-, and thienopyrrole-derived histamine H4 receptor ligands." J Pharmacol Exp Ther **334**(2): 513-521.

Schneider, E. H., D. Schnell, et al. (2010). "Impact of the DRY motif and the missing "ionic lock" on constitutive activity and G-protein coupling of the human histamine H4 receptor." J Pharmacol Exp Ther **333**(2): 382-392.

Shin, N., E. Coates, et al. (2002). "Molecular modeling and site-specific mutagenesis of the histamine-binding site of the histamine H4 receptor." Mol Pharmacol **62**(1): 38-47.

Simons, F. E. (2004). "Advances in H1-antihistamines." N Engl J Med **351**(21): 2203-2217.

Takeshita, K., K. Sakai, et al. (2003). "Critical role of histamine H4 receptor in leukotriene B4 production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan in vivo." J Pharmacol Exp Ther **307**(3): 1072-1078.

Terzioglu, N., R. M. van Rijn, et al. (2004). "Synthesis and structure-activity relationships of indole and benzimidazole piperazines as histamine H(4) receptor antagonists." Bioorg Med Chem Lett **14**(21): 5251-5256.

Thurmond, R. L., P. J. Desai, et al. (2004). "A potent and selective histamine H4 receptor antagonist with anti-inflammatory properties." J Pharmacol Exp Ther **309**(1): 404-413.

Thurmond, R. L., E. W. Gelfand, et al. (2008). "The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines." Nat Rev Drug Discov **7**(1): 41-53.

van Rijn, R. M., P. L. Chazot, et al. (2006). "Oligomerization of recombinant and endogenously expressed human histamine H(4) receptors." Mol Pharmacol **70**(2): 604-615.

van Rijn, R. M., A. van Marle, et al. (2008). "Cloning and characterization of dominant negative splice variants of the human histamine H4 receptor." Biochem J **414**(1): 121-131.

Völzke, C., (2008). "Funktionelle Besonderheiten des equine Histamin H1 Rezeptors" München, Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der tierärztlichen Fakultät, LMU

Wellmann, B., (2007). "Klonierung und pharmakologische Charakterisierung des equinen Histamin H1 Rezeptors". München, Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der tierärztlichen Fakultät, LMU

Wendorff, S., (2008). "Untersuchungen zum Histamin H4-Rezeptor auf murinen dendritischen Zellen und in Modellen der allergischen Dermatitis". Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Tierärztliche Hochschule Hannover

Zampeli, E., R. L. Thurmond, et al. (2009). "The histamine H4 receptor antagonist JNJ7777120 induces increases in the histamine content of the rat conjunctiva." Inflamm Res **58**(6): 285-291.

Zhu, Y., D. Michalovich, et al. (2001). "Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor." Mol Pharmacol **59**(3): 434-441.

## **X. DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer für die Bereitstellung des Themas, sowie für seine außerordentliche Hilfsbereitschaft in wissenschaftlichen und organisatorischen Belangen.

Bei Frau Univ.-Prof. Dr. Potschka bedanke ich mich für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Herrn Thomas Christ, der völlig unerwartet und viel zu früh verstorben ist, danke ich vielmals für die Einarbeitung in die Labortechniken, deren Kenntnisse zur Klonierung des eH<sub>4</sub>R unumgänglich waren.

Frau Sarah Koutnik gilt besonderer Dank für die stetige wertvolle Unterstützung und Hilfestellung bei technischen Fragestellungen.

Bei Frau Dr. Edina Speckmeier möchte ich mich recht herzlich für stets gewährte moralische Unterstützung bedanken.

Bei Frau Dr. Strasser von der Universität Regensburg möchte ich mich für die Bereitstellung des humanen Histamin 4 Rezeptors bedanken.

Bei Christina Braun, Julian Schneider und Sarah Koutnik bedanke ich mich herzlich für zügige Durchsicht der Arbeit und wertvolle Hinweise auf Flüchtigkeitsfehler.

Auch bei den Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich für die Zusammenarbeit bedanken.