AUS DEM INSTITUT FÜR PHARMAKOLOGIE, TOXIKOLOGIE UND PHARMAZIE

DER TIERÄZRTLICHEN FAKULTÄT

DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

ANGERFERTIGT UNTER DER LEITUNG VON UNIV.-PROF. DR. HERMANN AMMER

KLONIERUNG UND PHARMAKOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DES EQUINEN HISTAMIN H1 REZEPTORS

INAUGURAL-DISSERTATION ZUR

ERLANGUNG DER

TIERMEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE

DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT

DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

von Birgit Wellmann

aus Schorndorf

München, 2007

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent:	Univ.-Prof. Dr. Ammer
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Zerbe

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

Inhaltsangabe Seite

1. Einleitung 1

2. Literatur 3

2.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren – der Histamin H1-Rezeptor 3

2.1.2 Intrazelluläre Signalwege 4
2.1.3 Regulation der Rezeptorfunktion 6
A) Desensibilisierung 6
B) Weitere regulatorische Einflüsse auf den H1R 8

2.2 Histamin und Antihistaminika 9

2.2.1 Histamin 9
A) Synthese und Abbau 10
B) Histamin an der glatten Muskulatur 10
C) Histamin im Gewebe 11
D) Histamin im ZNS 11
E) Wirkung von Histamin am Herzen 12
F) Histamin im Nebennierenmark 13
G) Vorkommen im Magen 13
H) Sonstige Vorkommen von Histamin 13
2.2.2 Die Rolle von Histamin und seinen Rezeptoren im Allergiegeschehen 14
2.2.3 Antihistaminika 15
A) Diphenhydramin 17
B) Chlorpheniramin 18
C) Klinische Anwendung von H1-Antihistaminika 18

2.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit 20

3. Materialien und Methoden 22

3.1 Molekularbiologische Methoden 22

3.1.1 Die Sequenzierung des equinen H1-Rezeptors 22
3.1.2 Primerauswahl 22
3.1.3 RNA-Isolation aus Pferdeblut 25
3.1.4 Reverse Transkriptions–Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) 26
3.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 27
3.1.6 3'-„rapid amplification of cDNA ends" (3' RACE) 28
3.1.7 5'-„rapid amplification of cDNA ends" (5' RACE) 30
3.1.8 PCR zur Amplifikation der eH1 kodierenden Sequenz 32
3.1.9 Agarose Gelelektrophorese 33
3.1.10 Aufreinigung der PCR-Produkte aus Agarose-Gel 33
3.1.11 Klonierung der PCR-Produkte 34
3.1.12 Verwendete Plasmide 34
3.1.13 Ligation 35
3.1.14 Herstellung kompetenter *E. coli* zur Transformation 35
3.1.15 Transformation kompetenter E. coli 36
3.1.16 Plasmid-Isolation 37
3.1.17 Restriktionsverdau 39
3.1.18 Gelaufreinigung 40

3.2 Zellkultur 41

3.2.1 Zellmodell 41
3.2.2 Transfektion von HEK-Zellen 42
3.2.3 Kryokonservierung 43
3.2.4 Membranpräparation für Bindungsstudien 44
3.2.5 Quantifizierung des Proteingehalts nach Lowry 45

3.3 Pharmakologische Untersuchungen 46

3.3.1 Verwendete Liganden 46
3.3.2 Radioligandenbindung 46
A) Sättigungsexperimente 46
B) Heterologe Verdrängungsexperimente 48
3.3.3 Proteinbestimmung im Westernblot 50
3.3.4 Regulation der Adenylatzyklase 53

3.4 Konfokale Mikroskopie 57

3.4.1 Herstellung von transient transfizierten HEK293-Zellinien mit EGFP markierterten eH1 und hH1 57
3.4.2 Regulation des eH1 in HEK293-Zellen mittels konfokaler Mikroskopie 57

4. Ergebnisse 58

4.1 Klonierung des eH1 58

4.1.1 **Identifikation der eH1 kodierenden Sequenz** 58
A) Identifikation des Mittelstücks 59
B) Identifikation des 3'-Endes 61
C) Identifikation des 5'-Endes 62
4.1.2 Translation des Proteins 65
4.1.3 Homologien 66
4.1.4 Subklonierung und Expression von eH1 und hH1 in HEK293-Zellen 69
A) Erstes Screening mit ^{3}H-Pyrilamin an HEK-eH1 und HEK-hH1 durch Ein-Punkt Messungen 70

4.2 Charakterisierung des eH1 72

4.2.1 Pharmakologische Charakterisierung des eH1 72
A) Sättigungsbindungen / Scatchard Plot 72
1. Analyse der Bindungsdaten 72
2. Bestimmung von B_{max} und K_D im Scatchard Plot 72

3. Sättigungsexperiment an isolierten Membranen aus equinem Lungengewebe 75
B) Heterologe Verdrängungsexperimente 75
1. Histamin 76
2. Diphenhydramin 76
3. Chlorpheniramin 76
4. Cimetidin und Thioperamid 76
4.2.2 Biochemische Charakterisierung des eH1 im Western Blot 79
4.2.3 Funktionelle Effekte des eH1 81
A) Regulation der Adenylylzyklase durch Histamin 80
B) Erhöhung der Forskolininduzierten Stimulation von cAMP 81
C) Untersuchungen zur Rezeptorregulation mittels Konfokaler Mikroskopie 82
1. Nachweis der Membranlokalisation des eH1 82
2. Regulation des eH1 unter dem konfokalen Mikroskop 83
2.1 Der Agonist Histamin 83
2.2 Inverse Agonisten 83
A) Diphenhydramin 83
B) Chlorpheniramin 84
C) Loratadin 84
D) Cimetidin 84

5. Diskussion 87

5.1 Antihistaminika und ihre Verwendung in der Human- und Pferdemedizin 88
5.2 Detektion der eH1-Sequenz 88
5.3 Klonierungsstrategie 89
5.4 Charakterisierung der translatierten eH1-Sequenz 89
5.5 Expression von eH1 und hH1 in HEK293-Zellen 91
5.6 Bindungseigenschaften des eH1 92
5.6.1 Sättigungsbindungen 92
5.6.2 Heterologe Verdrängungsstudien 92
5.7 Regulation der cAMP-Produktion durch Histamin 93
5.8 Regulation des eH1 im konfokalen Mikroskop 94
5.9 Ausblick 95

6. Zusammenfassung **97**

7. Summary: Cloning and pharmacological Characterization of the equine Histamine H1 Receptor **98**

8. Literaturverzeichnis **99**

9. Anhang **110**

9.1. Alignment der H1R-Proteinsequenzen **110**

9.2 Alignment der H1R-Nukleinsäuresequenzen **111**

9.3 Abkürzungsverzeichnis **120**

9.4 Danksagung **122**

9.5 Lebenslauf **123**

1. Einleitung

Im Jahr 1896 muß der Berliner Pathologe Langerhans mit ansehen, wie sein eigenes Kind nach einer wiederholten prophylaktischen Gabe des „Behring'schen Heilserums" gegen Diphterie innerhalb von sieben Minuten verstirbt (Langerhans, 1896). Die Ärzte stehen vor einem Rätsel. Beinahe wird das „Heilserum", das die Todesrate der Diphteriekranken um ein Vielfaches senkte, zum Gift erklärt. Der Kinderarzt Clemens von Pirquet sammelt die Fälle der Nebenwirkungen gegen das Serum, in denen oftmals von Urtikaria und lokalen Exanthemen bis hin zu Todesfällen berichtet wird. Seine Beobachtungen führen zu einer neuen Krankheitslehre: Demnach bestimmt nicht nur die Vermehrung der in den Körper eingedrungenen Keime den Krankheitsverlauf, sondern auch die aktive Wechselwirkung zwischen Organismus und Erreger. 1906 schreibt er in einer Veröffentlichung in der „Münchener Medizinischen Wochenschrift" über „eine veränderte Reaktionsfähigkeit des Körpers auf eine Fremdsubstanz" und geht damit als Begründer der Allergie in die Geschichte der Medizin ein.
Heute leidet fast die Hälfte der nordamerikanischen und europäischen Bevölkerung unter der sogenannten Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I, die im allgemeinen Sprachgebrauch und auch in dieser Arbeit mit der Allergie gleichgesetzt wird. Wie schon von Piquet beschrieben, sind die Erscheinungsformen vielfältig und können mitunter lebensbedrohlich werden.

In der Pathogenese der Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I nimmt Histamin eine zentrale Rolle ein. Seine Wirkung am Histamin H1 Rezeptor (H1R) kann bei den meisten Spezies durch kompetitive Blockade mittels Antihistaminika erfolgreich unterbunden werden. Antihistaminika besitzen daher als Therapeutikum bei Anaphylaxien eine große Bedeutung.

Beim Pferd sind allergische Reaktionen ein weit verbreitetes Problem. Da es meist unmöglich ist, das Antigen aus der natürlichen Umgebung des Pferdes zu eliminieren, kommt der medikamentösen Behandlung eine umso größere Bedeutung zu. Die Wirksamkeit von Antihistaminika beim Pferd ist jedoch in den meisten Fällen unbefriedigend (Smith, 2002; Reed et al., 2004). Die Ursachen hierfür sind bis heute

noch völlig unbekannt. Deshalb werden bei Hypersensibilitätsreaktionen vom Typ I beim Pferd nach wie vor häufig Kortikosteroide eingesetzt, obwohl diese bei Langzeitanwendung mit zahlreichen Nebenwirkungen behaftet sind.

Während beim Menschen Antihistaminika aufgrund der bekannten Struktur des H1R schnell und effektiv in *in vitro*-Studien auf ihre Wirksamkeit hin getestet und somit eine Vorauswahl aus einer großen Anzahl an Substanzen getroffen werden kann, fehlt diese Möglichkeit beim Pferd. Dies erschwert derzeit die Suche nach einem wirksamen Antihistaminikum maßgeblich.

Die in der vorliegenden Arbeit erfolgte Sequenzierung und Strukturaufklärung des equinen H1R ermöglicht es in Zukunft, besser wirksame Antihistaminka zu identifizieren und ihre Wirkung beim Pferd zu charakterisieren. Zudem werden die Voraussetzungen für Untersuchungen zur Rolle des H1R bei der Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I beim Pferd geschaffen. Durch Strukturvergleich mit Sequenzen anderer Spezies können schließlich wertvolle mechanistische Einsichten in die Funktionsweise aminerger Rezeptoren gewonnen werden.

2. Literatur

2.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren - der Histamin H1-Rezeptor

Der H1R gehört, wie alle vier Histaminrezeptortypen, zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Die von ihm vermittelten Signalwege sind vor allem für Allergien vom Typ I verantwortlich (White, 1990). Er wurde 1966 von Ash und Schild entdeckt, 1991 erstmals vom Rind (Yamashita et al., 1991) und 1993 vom Menschen (De Backer et al., 1993) kloniert und charakterisiert. In der Northern blot Analyse wurden 2 verschiedene mRNA Transkripte unterschiedlicher Länge identifiziert. Die 3 Kilobasen (kb) lange Variante wurde in der Plazenta, Lunge, Skelettmuskel und Niere gefunden, die 3,5 kb lange Form dagegen im Gehirn. Die stärkste Expression der Rezeptor-mRNA findet in der Plazenta statt. (Fukui et al., 1994). Angaben zum Molekulargewicht des translatierten Proteins variieren je nach Gewebe und Spezies und liegen zwischen 53 und 58 kDa (Hill et al., 1997).

Die GPCR stellen die größte Familie der Zelloberflächenrezeptoren dar und sind in allen Eukaryonten zu finden. Sie besitzen eine charakteristische Grundstruktur und bestehen aus einer Polypeptidkette, die sich sieben Mal durch die Zellmembran windet und über eine extrazelluläre Ligandenbindungstasche sowie eine intrazelluläre Kontaktstelle für G-Proteine verfügt. Wenn nun der an das G-Protein gekoppelte Rezeptor aktiviert wird, so erfährt dieser eine Konformationsänderung und kann so seine assoziierten G-Proteine aktivieren. G-Proteine besitzen ebenfalls eine charakteristische Grundstruktur und sind in drei Einheiten aufgebaut, die α-, β- und γ-Untereinheit. Im nicht stimulierten Zustand ist GDP an die α-Untereinheit gebunden, welches nach Aktivierung durch den Rezeptor mit GTP ausgetauscht wird. Hierdurch dissoziiert die α-Untereinheit vom $\beta\gamma$-Dimer ab, die nun beide eine Vielzahl intrazellulärer Effektoren regulieren können.

2.1.2 INTRAZELLULÄRE SIGNALWEGE

Der G-Protein gekoppelte H1R aktiviert das in der Plasmamembran gebundene Enzym Phospholipase Cβ (PLCβ) (Hill et al., 1997). Bei allen Rezeptoren, die diesen so genannten Inositol-Phospholipid-Signalweg über die Aktivierung der PLC einleiten, wird die Reaktion über das G-Protein G_q vermittelt. Im Falle des H1R ist das G-Protein $G_{q/11}$ beteiligt (Iwata et al., 2005). Dieses aktiviert die PLCβ, die das in der inneren Lipidschicht der Zellmembran eingelagerte Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (IP_2) in zwei Produkte, das Inositol-1,4,5-trisphophat und das Diacylglycerol aufspaltet. Hierdurch wird der Signalweg aufgeteilt. Das wasserlösliche Inositol1,4,5-trisphosphat (IP_3) diffundiert in das Cytosol, bindet an das Endoplasmatische Reticulum (ER) und kann dort über IP_3-vermittelte Ca^{2+}- Kanäle zum Ausstrom von Ca^{2+} und einem intrazellulären Anstieg der Ca^{2+}- Konzentration führen. Diese Reaktion kann über drei Wege beendet werden:

1. Dephosphorylierung von IP_3 zum IP_2
2. Phosphorylierung von IP_3 zu IP_4
3. Ca^{2+} Efflux

Das zweite Spaltprodukt, Diacylglycerol, verbleibt im Gegensatz zu IP_3 an der Zellwand und kann ebenfalls zwei unterschiedliche Signalwege einleiten. Es kann zu Arachidonsäure gespalten werden, die wiederum selbst als Signalmolekül wirken aber auch als Vorläufer für Eikosanoide dienen kann. Eikosanoide sind essentieller Bestandteil bei Entzündungsreaktionen und der Schmerzentstehung. Von größerer Bedeutung ist jedoch, dass Diacylglycerol die Ca^{2+}-abhängige Serin/Threoninkinase Proteinkinase C (PKC) aktivieren kann. Durch das über IP_3 freigesetzte Ca^{2+} kann die PKC nun an die innere zytoplasmatische Oberfläche wandern, wo es durch die Kombination von Ca^{2+}, Diacylglycerol und dem negativ geladenen Phosphatidylserin aktiviert wird. Je nach Zelltyp kann die PKC nun verschiedene Proteine phosphorylieren und so die Zellfunktion beeinflussen.

Unter den Histaminrezeptoren vermittelt der H1R ein Signal über IP_3 zu einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+}-Mobilisierung (Moguilevsky et al., 1994). Die Freisetzung von Ca^{2+} als Folge der Hydrolyse von IP_2 findet sich in Zellen der glatten

Muskulatur, wie z.B. der Atemwege und des vaskulären Endothels (Hall and Hill, 1988; Kotlikoff et al., 1987; Matsumoto et al., 1986; Paniettieri et al., 1989; Takuwa et al., 1987; Van Amsterdam et al., 1989).

Nach der Aktivierung der Zelle über den Phospholipid-Signalweg bleibt der induzierte Ca^{2+}-Efflux oft auf wenige kleine Stellen in der Zelle begrenzt. Diese Stellen sind wahrscheinlich die Öffnungen der Ca^{2+}-Kanäle im ER. Wenn das Signal ausreichend lang stattfindet, kann es zu einer Ca^{2+}-Welle durch das Cytosol kommen. Ein solcher "Spike" wird häufig von mehreren Spikes gefolgt, die jeweils Sekunden andauern können. Diese Ca^{2+}-Schwankungen können in der Zelle so lange fortbestehen wie der Rezeptor aktiviert ist. Hierbei kann Ca^{2+} seine eigene Freisetzung bis zu einem bestimmten Grad selbst noch intensivieren. Wird seine Konzentration jedoch zu hoch, so kann es seine eigene Freisetzung inhibieren. Die Frequenz der Ca^{2+}-Schwankungen reflektiert dabei die Stärke des extrazellulären Signals und ist für die Spezifität der Zellantwort (Aktivierung bestimmter Gene) verantwortlich. Auch existieren Ca^{2+}-empfindliche Proteine, die ihre Aktivität in Abhängigkeit von der Ca^{2+}-Frequenz ändern.

Ca^{2+}-bindende Proteine sind die Vermittler von cytosolischem Ca^{2+}-Signalen. Hierzu zählt z.B. Troponin C in der Skelettmuskelzelle oder auch Calmodulin, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Es vermittelt viele Ca^{2+}-regulierte Prozesse und wird bei der Bindung an Ca^{2+} durch eine Konformationsänderung aktiviert. Es müssen mehrere Ca^{2+}-Ionen zur Aktivierung binden, die Aktivierung selbst findet wiederum gestaffelt statt. So bewirkt eine 10-fache Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration eine 50-fach stärkere Aktivierung von Ca^{2+}-Calmodulin. Ca^{2+}-Calmodulin selbst verfügt über keine intrinsische Enzymaktivität, bindet jedoch an Proteine und reguliert diese. Wenn Ca^{2+}-Calmodulin an sein Zielprotein bindet kommt es zu einer Konformationsänderung. Unter den Zielproteinen befinden sich eine Vielzahl an Enzymen und Transportproteinen, u.a. auch die Ca^{2+}-Pumpe, die bei der Einstellung des normalen Ca^{2+}-Gehaltes der Zelle hilft.

Im Säugerhirn und der Nebennierenrinde wird durch die Aktivierung von H1R ebenfalls die Adenylylzyklase (AC) aktiviert und intrazelluläres zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat (cAMP) gebildet. cAMP dient als „second messenger" und kann

über Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und CREB-Phosphorylierung in eine Vielzahl von Zellfunktionen und Translation von Genen eingreifen. Der H1R ist nicht direkt an die AC gekoppelt, sondern moduliert die cAMP Produktion über PKC sowie Ca^{2+}-abhängige Signalwege (Garbarg und Schwartz, 1988). Der genaue Mechanismus ist jedoch noch weitestgehend unbekannt (Booth and Moniri, 2005; Maruko et al. 2005).

2.1.3 REGULATION DER REZEPTORFUNKTION

A) DESENSIBILISIERUNG

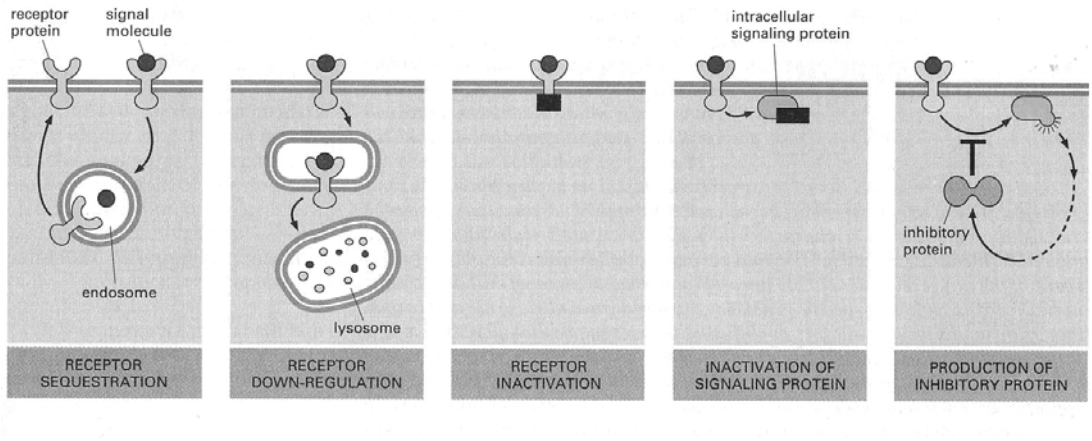
Zellen können das Ausmaß ihrer Antwort gegenüber eines extrazellulären Signals abschwächen. Dieser Vorgang der Adaptation wird als Desensibilisierung bezeichnet. Dabei führt ein längerfristiger Stimulus zu einer verminderten Zellantwort, ein Mechanismus der zur Entstehung einer pharmakologischen Toleranz beitragen kann. Die Adaptation ermöglicht es der Zelle auf unterschiedlichste Ligandenkonzentrationen verändert zu reagieren. Die Antwort entspricht einem negativem Feedback auf die Rezeptorfunktion, die innerhalb weniger Minuten einsetzen kann.

Die Desensibilisierung wird über einen komplexen Mechanismus vermittelt, der aus Phosphorylierung, Sequestrierung und Endozytose des Rezeptors besteht. Dabei werden die Rezeptoren von der Zelloberfläche entfernt (Internalisierung). Hält der Stimulus länger an, so werden die internalisierten Rezeptoren degradiert (Downregulation). Eine Desensibilisierung kann aber auch durch allosterische Änderung der Rezeptorkonformation oder durch Produktion von Inhibitoren, die den Signalweg unterbrechen können, induziert werden.

Bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind drei unterschiedliche Möglichkeiten der Desensibilisierung bekannt:

1. Inaktivierung und Abkoppelung des Rezeptors
2. Abnahme der Zahl an Oberflächenrezeptoren
3. Lysosomale Degradation von Rezeptoren

In jedem Fall wird der Desensibilisierungsprozeß durch Phosphorylierung des Rezeptors über PKA, PKC oder einer G-Protein gekoppelten Rezeptorkinase (GRK) eingeleitet. Die GRKs phosphorylieren Serin- und Threoninreste am Rezeptor, dies geschieht aber nur nach einer vorherigen Ligandenbindung. Ist der Rezeptor phosphoryliert so bindet er an ein Arrestin. Das gebundene Arrestin kann zur Desensibilierung auf zwei Arten beitragen: Zuerst inaktiviert es den Rezeptor indem es seine Bindung an ein G-Protein verhindert (Rezeptorabkopplung). Zweitens kann es als Adapterprotein mit dem Rezeptor an Chlathrin binden, wodurch seine Endozytose eingeleitet wird. Diese trägt einerseits zur Sequestrierung bei, kann aber auch nach Verschmelzung der Endosomen mit Lysosomen die Degradation des Rezeptors induzieren. Das Ausmaß der Rezeptorphosphorylierung, Internalisierung und Degradation hängt maßgeblich vom Zelltyp, Rezeptor, Ligandenkonzentration und Expositionsdauer mit dem Liganden ab (Alberts et al., 2002).



(Aus: The molecular biology of the cell, Alberts et al., 2002)

Abb. 1: Fünf Möglichkeiten der Desensibilisierung von Zellen durch Signalmoleküle.

Bei der Regulation des H1R sind vielfältige Faktoren beteiligt: So spielt unter anderem Ca^{2+}-Calmodulin eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zell-oberflächenrezeptoren, indem es deren Anzahl zu Beginn der Agonistenstimulation konstant hält. Es existieren ebenfalls Hinweise auf eine Mitwirkung von Ca^{2+}-Calmodulin in der frühen Phase der Desensibilisierung (Hishinuma et al.,1998; 2000). Viele Ca^{2+}-Effekte werden indirekt über Proteinphosphorylierungen vermittelt. Diese finden durch die Familie der Ca^{2+}-Calmodulin abhängigen Proteinkinasen statt, die

Serin oder Threoninreste in Proteinen phosphorylieren. Die Antwort der Zelle hängt davon ab, welche Ca^{2+}-Calmodulin abhängigen Proteinkinasen in der Zelle exprimiert werden. In der Muskelzelle findet sich z.B. die Myosin-light-Chain-Kinase, die die glatte Muskelkontraktion aktiviert. Einige Ca^{2+}-Calmodulinkinasen besitzen zusätzliche Funktionen. So können sie genregulatorische Proteine phosphorylieren, wodurch sie die Transkription spezifischer Gene entweder aktivieren oder inhibieren können.

B) WEITERE REGULATORISCHE EINFLÜSSE AUF DEN H1R

Die Aktivität von H1R kann auch durch heterologe Rezeptoren beeinflusst werden. So beschreiben Miyoshi et al. (2004) eine Downregulation von H1R um 60 % nach Stimulation des M_3-Acetylcholin-Rezeptors. Ebenso führt eine Stimulation von β_2-adrenergen Rezeptoren zur Abnahme von H1R in der Membran, die durch eine Blockade von PKA aufgehoben werden kann. Diese Beobachtung spricht dafür, daß β_2-Agonisten bei der Therapie von Asthma und COPD zusätzlich eine indirekte therapeutische Wirkung, ausgelöst durch eine Verringerung der Anzahl von H1R an der Zelloberfläche, entfalten können (Kawakami et al., 2004). Auch ist die Zelle unter physiologischen Bedingungen einer Vielzahl von Botenstoffen gleichzeitig ausgesetzt. So sind Interaktionen zwischen einzelnen Signalwegen durchaus vorstellbar, wie z.B. die Wechselwirkung von G_q und G_s in einigen Zellsystemen (Meszaros et al., 2000).

Darüber hinaus kann die Expression verschiedener Histaminrezeptortypen im Zellverband, verbunden mit einer unterschiedlichen Sensitivität und unterschiedlichen intrazellulären Signalwegen, schnell zu einer falschen Interpretation der Zellantwort auf Histamin führen. So kann z.B. der H1R Ca^{2+}-mobilisierende Signalwege auf Endothelzellen stimulieren und somit die NO-Produktion über endotheliale NO-Synthasen (eNOS) aktivieren, was eine Relaxation der glatten Muskelzelle bedingt. Die Stimulation von H1R der glatten Muskelzellen mobilisiert ebenfalls Ca^{2+} und verursacht so eine Kontraktion der Zellen, wohingegen die Stimulation von H2R auf der gleichen Muskelzelle via G_s und einer erhöhten cAMP-Produktion zu deren Relaxation führt (Leurs et al., 2001; Toda, 1987).
Unter Toleranz versteht man die Abschwächung der Effekte eines Pharmakons nach seiner längerfristigen Anwendung. Die Dosis muss erhöht werden, um den

ursprünglichen Wirkgrad aufrecht zu erhalten (Collier, 1984). Die Gesamtmenge der Rezeptoren einer Zelle befindet sich in einem ständigen Kreislauf zwischen Endozytose und Recycling (Szerkeres et al., 1998). Nach längerfristiger Einwirkung eines Agonisten kann sich dieses Gleichgewicht zugunsten der Internalisierung verschieben, wodurch der Anteil der an der Oberfläche befindlichen Rezeptoren geringer wird. Dieser Prozess wurde am Beispiel des β_2-Adrenozeptors erstmals untersucht und nachfolgend auf andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren übertragen (Ferguson et al., 1996; Hausdorff et al., 1990).

2.2 HISTAMIN UND ANTIHISTAMINIKA

2.2.1 HISTAMIN

Im Jahr 1910 wurden von dem späteren Nobelpreisträger Henry Dale erste pharmakologische Untersuchungen mit Histamin (2-(4-Imidazolyl)-ethylamin) veröffentlicht, in denen dem Histamin eine blutdrucksenkende Wirkung zugeschrieben sowie eine Kontraktion der glatten Muskulatur verschiedener Organe beschrieben wird. Histamin, ein Imidazol bestehend aus einem fünfgliedrigen Kohlenstoffring mit zwei Stickstoffatomen (Abb. 2), war damals aus Mutterkorn isoliert worden. Dass es sich dabei ebenfalls um eine endogene Substanz handelte, wusste man noch nicht. Erst 1927 wurde Histamin im Lungen- und Lebergewebe nachgewiesen, wodurch es seinen Namen (griech.: „histos“ = Gewebe) erhielt (Best et al., 1927). Bislang ist bekannt, dass es seine Wirkung über vier Rezeptortypen, H1R, H2R, H3R und H4R, vermittelt.

Der Referenzwert von Histamin im venösen Plasma des Menschen liegt bei <1 ng/mL. Nach Histaminausschüttung können Werte bis zu 100 ng/mL erreicht werden, die u.a. Herzstillstand auslösen können.

Histamin kann die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren und kommt in 20-mal höherer Konzentration in Gewebsmastzellen als in basophilen Leukozyten und Thrombozyten vor.

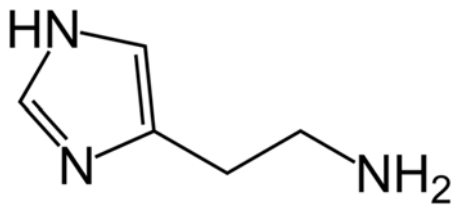


Abb. 2: Strukturformel von Histamin

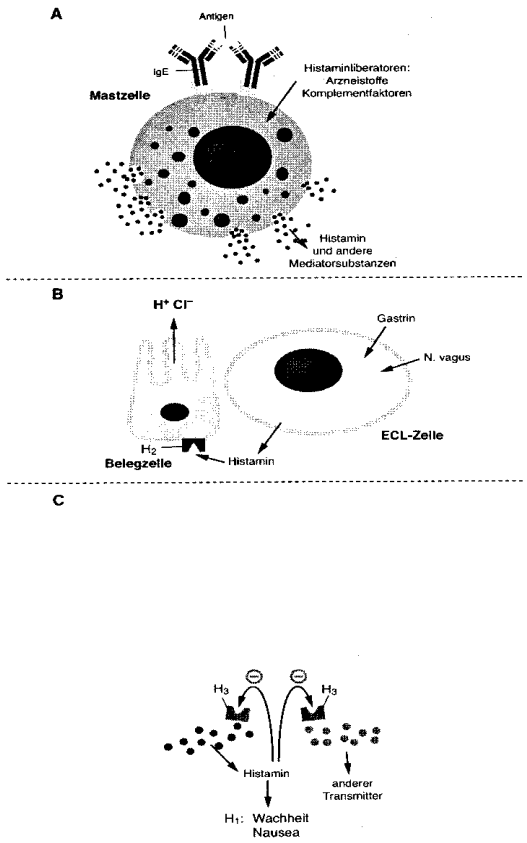
A) SYNTHESE UND ABBAU

L-Histidin wird durch oxidative Decarboxylierung mittels des zytoplasmatischen Enzyms L-Histidin-Decarboxylase (HDC) in einem Schritt zu Histamin synthetisiert und in Vesikeln gespeichert. Der Abbau kann auf zwei Arten stattfinden: entweder durch oxidative Desaminierung des Stickstoffs in Position 1 des Imidazolringes oder durch Methylierung mithilfe des Enzyms Histamin-N-methyltransferase. Die Ausscheidung von Histamin oder seiner Metabolite im Urin kann ein Hinweis auf die Beteiligung von Histamin an pathophysiologischen Prozessen sein (z.B. bei Urtikaria).

B) HISTAMIN AN DER GLATTEN MUSKULATUR

Nach seiner Freisetzung kontrahiert Histamin einen großen Anteil der glatten Muskulatur, wie die der Bronchen und des Darms über H1R (Ash und Schild, 1966) und kann so bei Allergikern zum histamininduzierten Bronchospasmus führen. Histamin relaxiert aber auch glatte Muskulatur, wie z.B. die der kleinen Blutgefäße, woran neben H1R auch der H2R beteiligt ist. Der H1R besitzt eine höhere Affinität zu Histamin und vermittelt eine schnelle und kurz dauernde NO-abhängige Vasodilatation. Im Gegensatz dazu wird über die Aktivierung der H2R eine langsamere und länger anhaltende Relaxation vermittelt. Deshalb können Antagonisten am H1R die Gefäßdilatation verhindern, jedoch bei starker Histaminausschüttung nur die Initialphase mildern. In größeren Blutgefäßen wurde speziesabhängig eine unterschiedlich starke Kontraktion beobachtet. Bei Nagetieren kann dieser Effekt sogar die Auswirkung der Dilatation der kleinen Blutgefäße überlagern. Die H1R vermittelte Konstriktion kann in einigen Venen sowie in Herzkranzgefäßen beobachtet werden (Toda, 1987).

C) HISTAMIN IM GEWEBE



Die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen und basophilen Granulozyten kann durch Allergene oder durch so genannte Histaminliberatoren hervorgerufen werden (A). Histamin wird von den enterochromaffin-artigen Zellen der Magenschleimhaut z.B. nach einer Stimulation durch Gastrin oder durch das von vagalen Nervenendigungen freigesetzte Acetylcholin freigesetzt (enterochromaffin-like cells, ECL-Zellen). An den benachbarten Belegzellen regt Histamin über H_2-Rezeptoren die Salzsäureproduktion an (B). Aus Nervenendigungen in bestimmten Hirngebieten freigesetztes Histamin kann über H_1-Rezeptoren Wachheit sowie Übelkeit und Erbrechen fördern. Über eine H_3-Rezeptor-vermittelte negative Rückkopplung hemmt das freigesetzte Histamin die weitere Histamin-Abgabe aus dem Neuron. Auch Neurone, die andere Überträgerstoffe freisetzen, können auf diesem Weg inhibiert werden (C).

Abb. 3: Aus Dittman et al., 2004

Histamin ist an der Ödembildung und der Stimulation von Nervenendigungen beteiligt. Die erhöhte Kapillarpermeabilität entsteht durch Einwirkung von Histamin auf postkapilläre Gefäße, wobei durch Kontraktion der Endothelzellen deren Basalmembran freigelegt wird, die wiederum für Plasma frei passierbar wird. Die Lücken zwischen den Endothelzellen erlauben auch eine Passage zirkulierender Zellen, die im Zuge einer Mastzellantwort angelockt werden. Die Migration zirkulierender Leukozyten wird durch die H1R-vermittelte Verstärkung der Leukozytenadhäsion begünstigt. Dieser Prozess beinhaltet die histamininduzierte Expression des Adhäsionsmoleküls P-Selectin (Gaboury et al., 1995). Außerdem greift Histamin in die Synthese von Prostacyclin, des Platelet activating factors (McIntyre et al., 1985), die Ausschüttung des Von-Willebrandt-Faktors (Hamilton und Sims, 1987) und die Bildung von NO ein (Toda, 1984). Durch Stimulation freier Nervenendigungen der Haut tritt Juckreiz auf. Dieser wird über die Phospholipase β3 vermittelt und an die C-Fasern nociceptiver Nerven geleitet (Han et al., 2006). Der H1R wurde 1996 von Kitamura et al. auf T-Lymphozyten nachgewiesen: Hier führt seine Stimulation zur Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels.

D) HISTAMIN IM ZNS

Histamin ist auch als Neurotransmitter von Bedeutung. Es kommt in gleichem Verhältnis in Mastzellen und Neuronen vor, wo sie an der Regulation des Schlaf-

wach-Rhythmus und der Vasopressinsekretion teilnehmen (Mochizuki et al., 1992). H1R werden im gesamten ZNS, besonders im Hypothalamus, exprimiert.

Innerhalb der Zellen wird Histamin in Vesikeln („Granula“) gespeichert. Die Histamin-Synthese wird hauptsächlich über die Verfügbarkeit des Vorläufers L-Histidin bestimmt, welches durch noch ungeklärte aktive Transportmechanismen in die Zelle aufgenommen wird. Von Axonterminalen ist bekannt, daß eine Depolarisation die Aufnahme von Histamin triggern kann (Hegstrand und Simon, 1985). HDC wird im Soma histaminerger Zellen synthetisiert und zu den Axonterminalen transportiert. Mit Ausnahme des Hippocampus ist seine Verteilung annähernd homolog zur Histaminverteilung (Baudry et al., 1973).

Durch die erhöhte Wachsamkeit die Histamin auslöst, lässt sich eine sedierende Wirkung zentralgängiger Antihistaminika erklären. Auch vermittelt Histamin über H1R Appetitlosigkeit (Ookuma et al., 1993) und ist wahrscheinlich über den H1R und den H2R an der Regulation des Durstgefühls, der Körpertemperatur, der Sekretion des antidiuretischen Hormons sowie der Kontrolle des Blutdrucks und der Schmerzwahrnehmung beteiligt. Simons (2003) zeigte bei H1R-knockout-Mäusen erhöhte Aggressivität, lokomotorische Defizite und andere neurologische Symptome.

H3R, die fast ausschließlich im Gehirn nachgewiesen wurden, sind an der Autoregulation der Histaminausschüttung beteiligt und sind vermutlich für die Ausbildung zentraler Histaminwirkungen verantwortlich. So zeigen H3R -/- Mäuse Änderungen im Angstverhalten und eingeschränkte kognitive Fähigkeiten (Brunton et al., 2006).

E) WIRKUNG VON HISTAMIN AM HERZEN

Am Herzen nimmt Histamin auf die Kontraktilität wie auch auf elektrische Spannungen Einfluß. Es erhöht sowohl die Stärke der Kontraktion am atrialen und ventrikulären Muskel durch die Förderung des Ca^{2+}-Influx und beschleunigt die Herzfrequenz durch eine schnellere diastolische Depolarisation im sinoatrialen Knoten. Es verlangsamt jedoch die atrioventrikuläre (AV) Überleitung und kann in

hohen Konzentration Arrhythmien auslösen. Diese Effekte werden im Wesentlichen, mit Ausnahme der verlangsamten AV-Leitung, durch den H2R vermittelt.

F) HISTAMIN IM NEBENNIERENMARK

Bereits 1949 wurde von Emmelin und Muren das Vorkommen von H1R im Nebennierenmark beschrieben, wo deren Stimulation, ebenso wie durch die Aktivierung von mesolimbischen dopaminergen Neuronen, zu einer Ausschüttung von Katecholaminen führen kann (Fleckenstein et al., 1993). Hier kann die zur Synthese der Katecholamine benötigte Tyrosinhydroxylase über Mechanismen, die mit einer intrazellulären Ca^{2+}-Erhöhung einhergehen, phosphoryliert werden (Bunn et al., 1995). Außerdem kann Histamin die Freisetzung von Leucin- und Methionin-Enkephalin auslösen. Bei chronischer Einwirkung auf Zellen lässt sich eine vermehrte Produktion von Proenkephalin A codierender mRNA beobachten (Bommer et al., 1987).

G) VORKOMMEN IM MAGEN

In der Magenschleimhaut, wo es an der Regulation der Magensaftsekretion über H2R beteiligt ist, kommt Histamin zusätzlich in „enterochromaffinähnlichen“ Zellen vor. Ebenso erhöht es die Produktion von Pepsin und dem Intrinsic Factor. Obwohl die Sekretion der Magensäure durch den N.vagus und Gastrin erzeugt wird, vermutlich durch die Stimulation von M_3-muskarinergen und Cholecystokinin (CCK2) -Rezeptoren an den Parietalzellen, stimuliert Acetylcholin und Gastrin ebenso die Histaminfreisetzung an den enterochromaffinähnlichen Zellen. Die Blockade der H2R eliminiert nicht nur die Säuresekretion durch Histamin sondern verursacht auch eine nahezu vollständige Inhibition der Reaktion auf Gastrin und Stimulation des N.vagus (Brunton et al., 2006).

H) SONSTIGE VORKOMMEN VON HISTAMIN

Histamin findet sich auch in Pflanzen und Bakterien. So kann z.B: der Histamingehalt in Fisch und Fischerzeugnissen ein Gradmesser für die hygienische Qualität eines Lebensmittels sein und bei erhöhten Werten zu mitunter letalen Fischvergiftungen führen (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin,

04/1997). In zahlreichen Lebensmitteln wie Wein, Käse und Konserven findet sich ein hoher Histamingehalt, der v.a. für Menschen mit Histaminintoleranz von Bedeutung ist (Jarisch, 2004). Hierbei wird Histidin durch Bakterien zu Histamin decarboxyliert. Das von *Bordetella pertussis*, dem Erreger des Keuchhustens, produzierte Pertussistoxin („Histamine-Sensitizing factor“) sensibilisiert dabei gegenüber der Histaminwirkung (Aktories et al., 2005).

2.2.2 Die Rolle von Histamin und seinen Rezeptoren im Allergiegeschehen

Die Allergie gehört zu den Hypensibilitätsreaktionen, die in vier Typen eingeteilt werden, wobei die IgE-vermittelte Reaktion dem Typ1 zugeordnet wird. Histamin spielt bei dieser Reaktion, der anaphylaktischen Sofortreaktion, eine bedeutende Rolle. Zur Auslösung einer allergischen Reaktion vom Typ I sind zwei Kontakte mit dem Allergen nötig. Beim ersten Kontakt werden IgE-Antikörper produziert, beim zweiten werden IgE-bindende Mastzellen durch das Allergen aktiviert, wodurch die Hypersensibilitätsreaktion ausgelöst wird.

Es herrscht derzeit noch Unklarheit darüber, was ein Allergen definiert. Einige Prinzipien wurden jedoch bisher erkannt: Es sind kleine, gut lösliche Proteine, die auf trockenen Partikeln transportiert werden (z.B. Pollenkörner). Kommen sie z.B. über Luft auf die Schleimhäute, eluieren und diffundieren sie in das Gewebe. Oftmals sind Allergene enzymatisch aktiv. Außerdem können Allergene an körpereigene MHC-II-Moleküle binden.

Die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen und basophilen Granulozyten kann durch Allergene und andere Histaminliberatoren ausgelöst werden. Vom Eindringen des Allergens in den Organismus bis zur Degranulation von Mastzellen und damit der Freisetzung von Histamin werden mehrere Mechanismen in Gang gesetzt, die hier kurz dargestellt werden sollen: Das Allergen kann intravenös (nach Medikamenten-gabe, subkutan (z.B. Bienenstich), durch Einatmen oder auf oralem Weg (Nahrungsmittelallergie) in den Organismus eindringen. Die darauf folgende Immunantwort, die zur Erzeugung von dem für die allergische Reaktion entscheidenden Immunglobulin E (IgE) führt, besteht wiederum ebenfalls aus zwei

Hauptkomponenten: Naive T_H0-Zellen werden dazu veranlasst in T_H2 zu differenzieren. Cytokine und costimulierende Signale der T_H2-Zellen führen bei B-Zellen zu einem Wechsel in Richtung IgE-Produktion. Abhängig von Cytokinen, Antigen, dessen Dosis und dem Präsentationsweg, entwickelt sich die T_H0-Zelle unterschiedlich. So stimuliert z.B. Interleukin (IL) 4 die Bildung von T_H2-Zellen, während IL12 die Entwicklung von T_H1-Zellen fördert. Die Präsentation *geringer* Antigendosen kann hierbei eine Aktivierung von T_H2- gegenüber T_H1-Zellen begünstigen. Die T_H2-Zellen setzen IL-4 und IL-10 frei. IL-4 und die Verbindung der T-Zelle über ihren CD40-Liganden mit CD40 an der Oberfläche der B-Zelle veranlassen die B-Zellen dazu, IgE zu produzieren. Sobald die IgE-Reaktion eingeleitet ist, kann sie durch basophile, eosinophile und Mastzellen weiter verstärkt werden.

Bei der anaphylaktischen Sofortreaktion sind bivalente Antigene involviert, die zellfixierte IgE-Antikörper brückenartig miteinander verbinden. Dies bewirkt eine intrazelluläre Ca^{2+}-Mobilisierung, die zur Exozytose der Speichergranula und zur Freisetzung des Histamins führt. Es kommt zu einer sofortigen Erhöhung der lokalen Durchblutung und Gefäßdurchlässigkeit, außerdem werden Enzyme, wie die mastzellspezifische Chymase, Tryptase und Serinesterase aktiviert, die ihrerseits bestimmte Mastzellproteasen der Bindegewebsmatrix aktivieren. Diese bauen dann Matrixproteine ab und verursachen so Gewebeschäden.

Die Veranlagung zur „Atopie“, zur übertrieben starken IgE-Antwort des Körpers auf Umweltantigene scheint durch mehrere Genloci beeinflusst zu werden, Loci auf den Chromosomen 11q und 5q scheinen beim Menschen von Bedeutung zu sein. Ebenso existieren z.B. beim Asthma des Menschen Hinweise darauf, dass u.a. die IgE-Bildung, die Entzündungsreaktion und auch die Reaktion auf klinische Behandlungsarten einer genetischen Variabilität unterliegt (Janeway et al., 2002).

2.2.3 ANTIHISTAMINIKA

H1R-Antagonisten, die sogenannten Antihistaminika, hemmen die Histaminwirkung am H1R. Alle bekannten Antihistaminika stellen inverse Agonisten dar und hemmen am hH1 die konstitutive Rezeptoraktivität (Leurs et al., 2002). Alle H1R-Antagonisten

sind reversible kompetitive Liganden am H1R. Sie binden an den Rezeptor und stabilisieren ihn in seiner inaktiven Konformation, wodurch die physiologischen und pathophysiologischen Effekte von Histamin verringert werden.

Antihistaminika werden in verschiedene Generationen eingeteilt. Wirkstoffe der ersten Generation weisen zusätzlich anticholinerge, antiadrenerge und antiserotoninerge Wirkqualitäten auf. Sie unterscheiden sich unter anderem von den Antihistaminika der neuen Generation durch ihre sedative Wirkung. Abgesehen von ihrer Lipophilität und dem Grad ihrer Ionisierung wird diese Wirkung auch über das P-Glykoprotein (P-gp) Transportsystem erklärt: Möglicherweise fehlt der neuen Generation der Antihistaminika aufgrund ihrer Fähigkeit zum aktiven Efflux über das P-gp-Transportsystem aus dem Gehirn die sedative Wirkung (Chen et al., 2003; Ishiguro et al., 2004). Sie sedative Wirkung von Doxylamin und Diphenhydramin wird z.B. bei Juckreiz therapeutisch genutzt.

Kardiotoxische Nebenwirkungen, wie sie bei den frühen Antihistaminika der zweiten Generation vorkamen (z.B. Astemziol, Terfenadin) werden bei den moderneren Antihistaminika (z.B. Loratadin, Desloratadin, Cetirizin, Fexofenadin) nicht mehr festgestellt (Simons, 2004).

Von Bedeutung ist weiterhin, dass Antihistaminika die permeabilitätserhöhende und konstriktorische Wirkung von Histamin an der glatten Muskulatur der Bronchien und des Darmes aufheben. Die Wirkung von Antihistaminika auf den Kreislauf wird jedoch nur partiell gehemmt, da hieran auch H2R-Effekte beteiligt sind.

Durch das Vorkommen von H1R im Brechzentrum und deren Beteiligung an der Auslösung des Brechreizes werden H1-Antihistaminika auch als Antiemetika, v.a. bei Kinetosen, eingesetzt. Hier haben sich jedoch nur wenig selektive H1-Antihistaminika mit zusätzlicher Wirkung auf muskarinerge Acetylcholinrezeptoren als wirksam erwiesen (z.B. Meclozin). Da phylogenetisch zwischen H1R und muskarinergen Acetylcholinrezeptoren eine engere Verwandtschaft besteht als zwischen H1R und H2R, sind die atropinartigen Wirkungen älterer H1-Antihistaminika nicht verwunderlich (Vernier et al., 1995).

Strukturell besitzen Antihistaminika einen substituierten Ethylaminrest mit folgender Grundstruktur:

$$R\text{-}X\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}N\text{-}$$

Hierbei steht X für Sauerstoff (Colamin-Typ), Stickstoff (Ethylendiamin-Typ) oder Kohlenstoff (Propylamin-Typ; z.B. Cetirizin, Levocetirizin, Terfenadin, Fexofenadin) und R für zwei aromatische oder heteroaromatische Ringe. Eine Aussage über die antihistaminergen Eigenschaften einer Substanz sind jedoch aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu einem der drei strukturellen Grundtypen nicht möglich.

Außerdem besitzen einige Antihistaminika einen zusätzlichen membranstabilisierenden Effekt, der die Degranulation von Mastzellen erschwert und zusätzlich in entzündliche Reaktionen eingreift (z.B. Ketotifen und Azelastin).

Neben pharmakodynamischen Unterschieden besitzen einzelne Vertreter der Antihistaminika zahlreiche pharmakokinetische Eigenheiten. So existieren teilweise gravierende substanz- und speziesspezifische Unterschiede in der Elimination und im Verteilungsvolumen einzelner Wirkstoffe, die unterschiedlich lange Plasmahalbwertszeiten bedingen können.

A) DIPHENHYDRAMIN

Diphenhydramin (2-Diphenylmethoxy-N,N-dimethylethanamin) wird zur Gruppe der Ethanoldiamine gezählt. Es gehört zur so genannten „ersten Generation“ der Antihistaminika, die bereits seit den 30er Jahren im klinischen Einsatz sind (Bovet und Staub, 1937). Die Antihistaminika der ersten Generation hemmen großteils nicht nur kompetitiv die H1R, sondern zeigen zusätzlich auch eine erhebliche sedative, anticholinerge, antitussive und antiemetische Wirkung. Diese „Nebenwirkungen“ sind nicht immer unerwünscht, sie werden bei bestimmten Indikationen sogar zur Hauptwirkung. So wird die sedative Komponente z.B. bei Juckreiz oder bei der Narkoseprämedikation, die antiemetische Wirkung bei Reisekrankheit ausgenutzt. Diphenhydramin verfügt auch über eine starke lokalanästhetische Wirkung, die bei lokaler Anwendung (z.B. allergisch bedingtem Juckreiz) ausgenutzt werden kann. Für

Diphenhydramin existieren beim Pferd noch weitere klinische Indikationen, wie z.B. die paroxysomale Myoglobinurie oder Azoturie, die periodische Konjunktivitis und das pulmonale Emphysem (Adams, 2001).

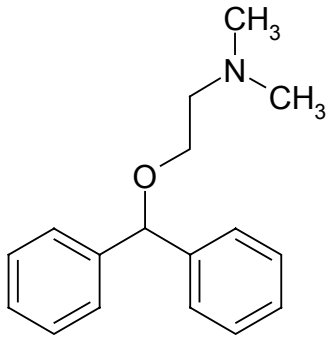


Abb. 4: Diphenhydramin

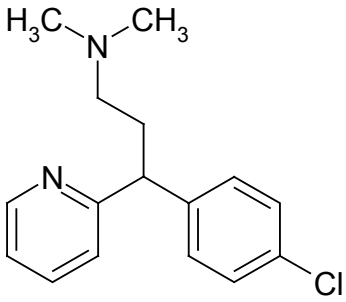


Abb. 5: Strukturformel Chlorpheniramin

B) CHLORPHENIRAMIN BZW. CHLORPHENAMIN

Dieses Antihistaminikum gehört ebenfalls zur „Ersten Generation“. Aus chemischer Sicht zählt es zu der Gruppe der Alkylamine. Chlorpheniramin wird in der Humanmedizin (seit den 50er Jahren) und in der Pferdemedizin eingesetzt. In seiner chemischen Struktur unterscheidet es sich vom Diphenhydramin durch ein zusätzliches Chlor- und Stickstoffatom in der Ringstruktur sowie durch ein fehlendes Sauerstoffatom in der aliphatischen Seitenkette.

C) KLINISCHE ANWENDUNG VON H1-ANTIHISTAMINIKA

Anwendung beim Menschen

Das Hauptindikationsgebiert der H1R-Antihistaminika beim Menschen sind alle Erkrankungen, die auf einer Freisetzung von Histamin beruhen, wie z.B. Urtikaria, Heuschnupfen, Quincke-Ödem, Serumkrankheit, Arzneimittelallergie und Insektenstiche. Insbesondere bei der Therapie von allergischen Erkrankungen wie Urticaria, allergische Conjunctivitis und Rhinitis kommen den Antihistaminika große Bedeutung zu.

Anwendung beim Pferd

Im Gegensatz zu anderen Spezies zeigen Anthihistaminika beim Pferd oftmals nur eine eingeschränkte Wirkung. Sie werden deshalb nahezu ausschließlich im Rahmen einer adjuvanten Therapie, z.B. bei allergischen Hauterkrankungen eingesetzt. Die derzeit in der Pferdemedizin am häufigsten eingesetzten Wirkstoffe sind Hydroxyzin, Diphenhydramin und Chlorpheniramin. Ihr therapeutischer Nutzen wird jedoch in der Fachliteratur kontrovers diskutiert (z.B. Reed et al., 2004; Scott et al., 2003; Rose et al., 2000). Aufgrund ihrer Zugehörigkeit zur ersten Generation verfügen diese Wirkstoffe über zahlreiche Nebenwirkungen. Der Bedarf an wirksameren und besser verträglichen Antihistaminika in der Pferdemedizin ist daher unübersehbar. Über weitere Wirkstoffe liegen bisher aber kaum Informationen vor. Es existieren lediglich Hinweise in der Literatur zu Clemastin und Fexofenadin. Obwohl beide Wirkstoffe eine viel versprechende Wirksamkeit bei histamininduzierten Hautveränderungen beim Pferd zeigen, sind sie aufgrund ihrer äußerst niedrigen Bioverfügbarkeit für eine klinische Anwendung ungeeignet (Torneke et al., 2003; Olsen et al., 2006).

Neben den heutigen Einsatzgebieten existieren beim Pferd aufgrund der Beteiligung von Histamin weitere potentielle Indikationen für H1-Antihistaminika. So spielt Histamin in der Pathogenese der COPD des Pferdes eine bedeutende Rolle. McGorum et al. (1993) konnten zeigen, dass COPD erkrankte Pferde signifikant höhere Histaminkonzentration in der PELF (pulmonal epithelial lining fluid) aufweisen als gesunde Tiere. Die derzeit eingesetzten Wirkstoffe zeigen bei der COPD des Pferdes aber nur eine eingeschränkte Wirksamkeit (Smith, 2002).

Anthistaminika werden beim Pferd ebenfalls häufig in Zusammenhang mit allergisch bedingtem Pruritus und Exanthemen eingesetzt. Ein wichtiges Anwendungsgebiet stellt dabei die Therapie allergischer Reaktionen gegenüber Arthropoden dar. Hier findet die allergische Reaktion gegen Antigene im Speichel der Insekten statt. Bei der folgenden Ausbildung von Hautveränderungen ist Histamin wahrscheinlich bei der Regulation der Adhäsion von eosinophilen Granulozyten beteiligt (Foster und Cunningham, 1998). Die klinische Wirksamkeit der derzeit verfügbaren Antihistaminika wird allerdings sehr unterschiedlich bewertet (Robinson et al., 2003a).

Bei allergischen Hautveränderungen können Antihhistaminika auch topisch im

Rahmen einer Kombinationstherapie angewendet werden. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass nicht alle Antihistaminika über eine ausreichende Lipophilität verfügen und das Stratum corneum durchdringen können (Scott et al., 2003).

2.3 ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Antihistaminika stellen eine wichtige Therapieform bei allergischen Erkrankungen dar, die im Vergleich zu den oft alternativ verabreichten Kortikosteroiden ein wesentlich geringeres Nebenwirkungsspektrum besitzen. Bisher werden beim Pferd nur Antihistaminika der ersten Generation eingesetzt, die im Vergleich zu anderen Spezies oftmals nur geringe oder keine Wirkung zeigen und im Vergleich zu neueren Wirkstoffgenerationen ebenfalls über unerwünschte Nebenwirkungen (Sedation; anticholinerge Wirkungen) verfügen.

Um die Ursache für die geringe Wirksamkeit von Antihistaminika beim Pferd zu untersuchen, ist die Strukturaufklärung des equinen H1R (eH1) unerlässlich. Die Verfügbarkeit des biochemischen Angriffspunkts für Antihistaminika stellt einen ersten Schritt für die Identifizierung und Charakterisierung neuer Antihistaminika in *in vitro*-Studien dar. Außerdem können durch Strukturvergleich mit bereits bekannten H1R-Sequenzen anderer Spezies wertvolle mechanistische Einblicke in die Rezeptorfunktion gewonnen werden.

Im Anschluß an die Klonierung des eH1 sollen erste pharmakologische Studien mit Histamin und den derzeit verwendeten Antihistaminika durchgeführt werden. Durch Vergleich der gewonnenen Bindungsparameter und funktionellen Rezeptoreigenschaften sollen erste Aussagen über quantitative Wirkunterschiede von Antihistaminika zwischen Pferd und Mensch ermöglicht werden.

Durch die Verfügbarkeit des klonierten eH1 soll zudem die Grundlage dafür geschaffen werden, die pathophysiologische Bedeutung von Histamin und des H1R beim Pferd zu untersuchen: Da Hypersensibilitätsreaktionen vom Typ I des Pferdes mit denen des Menschen vergleichbar sind, wird das Pferd als mögliches Modell für

die humane COPD-Forschung diskutiert, einer Krankheit, die weltweit als vierthäufigste Todesursache beim Menschen gilt und allein in Deutschland 5 Millionen Menschen betrifft (z.B. Doucet et al., 1991).

3. Materialien und Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Die Sequenzierung des equinen H1-Rezeptors

Die cDNA für den eH1 wurde mittels PCR-Klonierung isoliert. Zur Durchführung der PCR wurden degenerierte Primer mithilfe eines „Multiple Sequence Alignment“ ausgewählt und damit ein erstes Stück aus dem Mittelteil der Sequenz mithilfe der „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) isoliert. Für die Amplifizierung dienten degenerierte Primerpaare, die aus den Sequenzen von Mensch, Hund, Maus, Rind und Ratte abgeleitet wurden. Die erhaltene cDNA diente als Vorlage zur Ableitung genspezifischer „Forward“- und „Reverse“ Primer für die Amplifikation der 5’- und 3’-Enden mittels „Rapid Amplification of cDNA Ends“ (RACE) PCR. Dafür wurde RNA aus frisch entnommenem Pferdeblut isoliert und hieraus anschliessend cDNA synthetisiert, die nun als Templet für eine Reverse Transkription (RT)-PCR dienen konnte. Die cDNA-Synthese wurde jeweils sofort an die RNA-Isolation anschließend durchgeführt.

3.1.2 Primerauswahl

Durch ein „Multiple Alignment“ mithilfe des Computerprogramms ClustalW (European Bioinformatics Institute; http://www.ebi.ac.uk/clustalw/) wurden aus den H1R-mRNA-Sequenzen von Mensch, Hund, Rind, Maus und Ratte hochkonservierte Bereiche identifiziert und degenerierte Primer für die Amplifikation des Mittelstückes abgeleitet. Bei der Auswahl aller Primerpaare wurde darauf geachtet, dass die Wahrscheinlichkeit einer Dimerbildung möglichst gering, die ausgewählten Sequenzabschnitte spezifisch und die berechneten Anlagerungstemperaturen möglichst identisch waren. Primer mit einer Länge von ca. 20 Basenpaaren (bp) wurden verwendet. Bei Unterschieden in den Sequenzen verschiedener Spezies wurden an den entsprechenden Stellen sogenannte “Mixed Base Sites“ eingebaut, d.h. ein Primergemisch hergestellt, das zu gleichen Teilen die Sequenzinformation

der beiden voneinander abweichenden Matrizen enthielt. Um die Erfolgsquote zu erhöhen, wurden für jeden PCR-Ansatz mindestens zwei Primerpaare ausgewählt. Die für die Primerauswahl verwendeten mRNA-Sequenzen wurden der Gendatenbank Pubmed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi) entnommen:

Spezies:	Zugangsnummer (GI):
Homo sapiens	38174244
Canis familiaris	73984991
Bos taurus	31342870
Mus musculus	31542962
Rattus norvegicus	8393563

Die Primer wurden zudem so ausgewählt, dass sie möglichst nahe am 5'- bzw. 3'-Ende platziert waren (siehe Anhang, 6.3.1 H1R-Nukleinsäuresequenzen, S. 112ff.). Als „Forward" Primer wurden zwei 20 bp lange Sequenzabschnitte gewählt, die bei bp222 und bp321 der kodierenden H1R-Sequenz beginnen. Da sich die Sequenzen der verglichenen Spezies an der Stelle bp237 und bp335 (bezogen auf Homo sapiens) unterscheiden - es liegen die Varianten G und C vor - wurde hier eine "Mixed Base Site" eingeführt, die zu 50% G und zu 50% C enthält. Somit wurden folgende degenerierte „Forward" Primer ausgewählt:

(bp222) 5' GAA GAC AAG ATG TGT (G/C)AG GG 3' (eH1: bp31)
(bp321) 5' CTC AAC CTG CTG GT(G/C) CTG TA 3' (eH1: bp130)

Die „Reverse" Primer wurden beginnend mit bp1611 und bp1510 der mRNA von Homo sapiens gewählt. Die komplementäre Sequenz lautet:

(bp1611) 5' TTG AA(G/T) GTC TTC TTG AAG TT 3' (eH1: bp1417)
(bp1488) 5' GCA ATG ACC ATG AAG AAG AT 3' (eH1: bp1294)

Die Primer zur Amplifikation des 3'-Endes wurden aus dem zuvor ermittelten Mittelstück abgeleitet. Die Primer wurden so ausgewählt, dass sie mindestens 80 Basenpaare vom 3'-Ende des Mittelstücks entfernt liegen. Es wurden folgende „Forward" Primer ausgewählt:

(bp1063) 5' CCA TCC TTC TCC CAG ACA GA 3'
(bp1214) 5' ACA TGA ACC GAG AAC GGA AG 3'
(bp1259) 5' TGG CAG CCT TCA TCC TTT GCT 3'

Als „Reverse" Primer diente der im 3'-RACE-Kit mitgelieferte „Adapter" Primer, der mit seiner poly(T)-Region die cDNA-Synthese an der poly(A)-Region der mRNA initiiert. So selektiert er die polyadenylierten mRNA-Stränge.

Für das 5'-Ende wurden entsprechend aus dem Mittelstück Primer abgeleitet, die mindestens 80 Basenpaare vom 5'-Ende entfernt lagen. Die Stellenangaben beziehen sich auf die gesamte kodierende Sequenz des eH1. Folgende „Reverse" Primer wurden ausgewählt:

(bp550) 5'-CCA GGT GAC ATC ATA GAA-3'
(bp423) 5'-GCT GAT GCT CGG GTC TTG GT-3'
(bp375) 5'-GCT GCT GGA CCG AGC GAT AG-3'

Alle Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg, synthetisiert und für die PCR in einer Konzentration von 10 pmol/µl in sterilem H_2O bidest. resuspendiert.

Im letzten Schritt wurde aus dem verlängerten Mittelstück die vollständig kodierende Sequenz des eH1 amplifiziert. Hierzu wurde dem „Forward" Primer vor dem Startcodon eine HindIII-Schnittstelle (AAG CTT) sowie eine artifizielle Erkennungssequenz (Flag-Tag: GAC TAC AAG GAC GAT GAT GAC AAA) eingefügt:

5'-GCG AAG CTT ATG GAC TAC AAG GAC GAT GAT GAC AAA ACC TGT CTC AAT TCC TCC TC-3'

Dem „Reverse“ Primer wurde nach dem Stoppcodon eine XbaI-Schnittstelle (TCT AGA) angehängt, der eine anschließende Klonierung in das Expressionsplasmid pcDNA3.1(+) ermöglicht:

(bp1567) 5’-CGC TCT AGA TTA GGA GCG AAT GTG CAG GA-3’

3.1.3 RNA-ISOLATION AUS PFERDEBLUT

Mithilfe des TRIzol®LS Reagenz (Fa. Invitrogen; BRD; Best. Nr.: 10296-010) kann RNA aus verschiedenen Gewebeflüssigkeiten nach einem von Chomczynski und Sacchi (1987) beschriebenen Protokoll durch Auftrennung in verschiedene Phasen isoliert werden. TRIzol®LS setzt sich aus Phenol, Guanidin-isothiocyanat, rotem Farbstoff und anderen nicht näher angegebenen Komponenten zusammen. Bei dieser Methode wird die RNA durch ihre Löslichkeit in der wässrigen Phase separiert.
Das durch Punktion der Vena jugularis externa beim Pferd mit einer sterilen Kanüle entnommene Blut wurde mit Natriumcitratlösung (Fa. Sarstedt; BRD; Sarstedt Monovette®) versetzt und damit seine Gerinnung gehemmt.
Zur Isolierung der equinen RNA wurde jeweils 2,28 ml frisch entnommenes und nach der Entnahme sofort auf Eis gelagertes Na-Citrat-Blut verwendet. Pro ml Blut konnte eine RNA-Ausbeute von etwa 15-20 µg erwartet werden.
Alle Materialien stammen, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Sigma-Aldrich, BRD.

Verwendete Materialien für die RNA-Isolation:

6,84 ml	TRIzol®LS
1,82 ml	Chloroform (Best. Nr.: C2432)
4,56 ml	Isopropanol (Best. Nr.: 19516)
9,12 ml	Ethanol 75 % (Best. Nr.: 459836)
0,04 ml	Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC) - behandeltes H_2O bidest. (Best. Nr.: D5758 für DEPC)

Das Blut wurde zur Zelllyse mit dem TRIzol®LS vermischt und 5 Min. bei Raumtemperatur (Rt) inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von Chloroform homogenisiert, die Lösung gemischt und nochmals 15 Min. bei Rt inkubiert, um die vollständige Dissoziation der Nucleoproteinkomplexe zu erwirken. In der auf 4°C vorgefühlten Zentrifuge (1 K 15, Sigma®) wurde 15 Min. bei 12.000 Umdrehungen /Min. zur Phasenseparation zentrifugiert. Aus den drei entstandenen Phasen wurde die obere wässrige Phase mit der RNA abgenommen und diese mit Isopropanol präzipitiert, 10 Min. bei Rt inkubiert und erneut für 15 Min. bei 12 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das gelartige Pellet in Ethanol 75 % aufgenommen, gemischt und bei 7.500 x g, 5 Min. und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde erneut der Überstand verworfen und das RNA-Pellet für 5 Min. getrocknet. Die Resuspension erfolgte in 40 µl RNAse-freiem H_2O. Dies wurde durch die Behandlung von H_2O bidest. mit 0,1 % Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC) erreicht. DEPC ist ein Nukleaseinhibitor, der mit -NH, -SH, und -OH - Gruppen an deren aktiven Seiten reagiert. Durch eine anschließende Autoklavierung des H_2O bidest. wird das DEPC zerstört. Die Lösung wurde 10 Min. bei 57 °C inkubiert, um das Auflösen des Pellets zu unterstützen. Die RNA-Präparation wurde unmittelbar anschließend für die Durchführung der Reversen Transkriptionsreaktion verwendet.

3.1.4 RT - PCR

Die gewonnene RNA wurde in der RT-PCR eingesetzt. Alle Bestandteile wurden während des Versuchablaufs auf Eis gelagert.

Materialien:

10 µl	RNA-Präparation
1 µl	10 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)-Mix (Fa. Fermentas ; BRD; Best. Nr.: R0192)
1 µl	10 pM bp1488 „Reverse“ Primer
	DEPC-behandeltes H_2O bidest., steril filtriert
1 µl	0,1 M Dithiothreitol (DTT), (Fa. Invitrogen; Best. Nr.: D1532)
4 µl	5 x First Strand Puffer für SuperScript™ II

(200 mM Tris-HCl, pH 7,5 bei RT; 375 mM KCl; 15 mM $MgCl_2$)

1 µl SuperScript™ II Reverse Transkriptase (Fa. Invitrogen; Best. Nr.: 18064-022)

Zur RNA und dem dNTP-Mix wurde der Primer und 1 µl H_2O zugefügt. Die Probe wurde im Thermocylcer 5 Min. auf 65°C erhitzt und anschließend 5 Min. auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert und mit dem Reaktionsmix, bestehend aus First Strand Buffer, DTT, H_2O und Reverse Transkriptase 60 Min. bei 50°C inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte bei 70 °C, 15 Min. Nicht benötigte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.1.5 PCR

Die Reaktionen hatten ein Gesamtvolumen von 50 µl und wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen (Multi® Ultra Tubes; Fa. Roth; BRD) durchgeführt. Es wurde ein programmierbarer Thermocycler mit Heizdeckel (Primus; Fa. MWG Biotech) verwendet. Die Deckeltemperatur betrug 110°C. In Optimierungsexperimenten wurden die Anlagerungstemperatur, Inkubationszeit, Zykluszahl und Primer variiert. Die folgenden Angaben beziehen sich auf die PCR zur Ermittlung des Mittelstücks. Abweichungen bei nachfolgenden PCRs werden in den jeweiligen Abschnitten angegeben.

Materialien:

10 µl 5 x Puffer (mit Polymerase geliefert)

2,5 µl 10 µM bp321 “Forward” Primer

2,5 µl 10 µM bp1488 “Reverse” Primer

5 µl 2 mM dNTP Mix, (Fa. Fermentas; Best. Nr.: R0192)

1 µl Bovines Serumalbumin (BSA); (Fa. Roth; BRD; Best. Nr.: T844.2)

0,25 µl Go Taq® Flexi DNA Polymerase (Fa. Promega; BRD; Best. Nr.: M8301)

2 µl cDNA aus Synthese mit bp1488 “Reverse” Primer

3 µl $MgCl_2$ (Fa. Promega; Best. Nr.: A351B)

Zur Überprüfung der Reinheit des Ansatzes wurde ein Kontrollansatz mit durchgeführt, bei dem der Anteil an cDNA durch steriles H_20 bidest. ersetzt war. Die Reaktionszyklen wurden nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

1.	94°C	2 Min.	Schmelzen
2.	94°C	45 Sek.	Schmelzen (Erster Zyklusschritt)
3.	55°C	45 Sek.	Primeranlagerung
4.	72°C	2 Min.	Verlängerung
5.	72°C	20 Min.	Endverlängerung

Die Schritte 2. bis 4. wurden 33 mal wiederholt.

Die Bestimmung der DNA-Sequenz des Mittelstücks wurde mit 1 μg des klonierten und isolierten Plasmids zur Doppelstrangsequenzierung („Forward“ und „Reverse“) von MWG Biotech, Ebersberg, durchgeführt. Die zwei Sequenzen wurden mithilfe des Computerprogramms GeneJockey™ (Fa. Biosoft; USA) zusammengesetzt und mithilfe der Pubmed-Gendatenbank abgeglichen. Es ergab sich ein Mittelstück der eH1-Sequenz mit einer Länge von 1267 bp. Hieraus wurden die „Forward“ und „Reverse“ Primer für das 5’- und 3’-Ende abgeleitet.

3.1.6 3’-RACE (3’-RAPID AMPLIFICATION OF CDNA ENDS)

Bei der 3’-RACE-PCR verwendet man einen zum Polyadenosinschwanz des 3’-Endes der mRNA komplementären Oligodesoxythymidinprimer zur Reversen Transkription, dessen 5’-Ende durch einen sogenannten Adapterprimer (AP) verlängert ist. In den nachfolgenden PCRs werden sequenzspezifische Primer aus dem Positivstrang der Sequenz und der AP zur Amplifikation des unbekannten 3’-Endes verwendet. Die „Forward“ Primer zur Synthese des 3’-Endes wurden aus dem sequenzierten PCR-Produkt des Mittelstückes ausgewählt. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Protokoll des 5’-RACE-Systems. Die zusätzlich verwendeten Materialien sind Bestandteil des 3’-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Fa. Invitrogen; Best. Nr.: 18373-019).

Materialien:

1 µl	Adapter Primer (AP)
2 µl	10 x PCR Puffer (200 mM Tris-Hcl (pH 8,4), 500 mM KCl)
1 µl	25 mM $MgCl_2$
1 µl	10 mM dNTP-Mix
1 µl	RNAse H

Die Synthese wurde unter Verwendung des bp1063 „Forward“ Primers durchgeführt und erfolgte in einer vom Protokoll leicht abgewandelten Form: 10 µl RNA wurden mit 6 µl DEPC-H_2O und dem AP vermischt, 10 Min. bei 70°C inkubiert und anschließend 1 Min. auf Eis gelagert. Nach Zugabe von Puffer, $MgCl_2$, dNTP und DTT wurde der Ansatz kurz gemischt, wenige Sekunden zentrifugiert und bei 42°C 5 Min. inkubiert. Das Enzym wurde zugegeben und der Ansatz bei 42°C 50 Min. inkubiert, anschließend wurde das Enzym bei 70°C 15 Min inaktiviert. Zur Inaktivierung von RNAsen wurde ein RNAse H-Verdau durchgeführt bei 37°C/20 Min.

PCR Bestimmung des 3’-Endes:
Es wurden drei unterschiedliche PCRs durchgeführt. Durch die Verwendung von zwei „Nested“ Primern konnte das 3’-Ende spezifiziert werden. Mit Ausnahme des spezifisch synthetisierten „Forward“-Primers und der Go Taq® Flexi DNA Polymerase waren alle Materialien Bestandteil des 3’-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Fa. Invitrogen; Best. Nr.: 18373-019):

23,75	µl	H_2O steril, bidest.
10	µl	10 x Puffer
2,5	µl	10 µM bp1063 “Forward” Primer
2,5	µl	“Abridged Universal Amplification Primer” (AUAP)
5	µl	2 mM dNTP Mix (Fa. Fermentas; Best. Nr.:0192)
1	µl	BSA 25%
0,25	µl	Go® Taq-Polymerase
2	µl	cDNA aus Synthese mit 1488 “Reverse” Primer
3	µl	$MgCl_2$
2	µl	der spezifisch synthetisierten cDNA

Die PCR wurde unter identischen Bedingungen wie die PCR zur Ermittlung des Mittelstücks durchgeführt. Im Thermocycler wurde die Annealingtemperatur entsprechend an die Primer angepasst: der 3. Schritt wurde bei 60°C durchgeführt. Außerdem wurde die Zyklenanzahl auf 30 reduziert und die Endverlängerung auf 10 Min. gekürzt.

Nested-PCR zur Ermittlung des 3-'Endes:
Da sich nach der oben beschriebenen PCR keine scharfen Banden ergaben, wurde der Ansatz 1:10 vedünnt und als Templet für die zweite PCR benutzt, die mit dem bp1214 „Forward" Primer durchgeführt wurde. Es wurde eine kombinierte „Hot Start" und „Touchdown" PCR durchgeführt: Nach zweiminütiger Erhitzung des Ansatzes auf 94°C wurde die Polymerase, der bp1214 „Forward" Primer sowie 2,25 µl H_2O zugegeben. Um ein Verdampfen des Ansatzes durch die Öffnung des Tubes zu vermeiden wurde der Ansatz mit 30 µl Mineralöl überschichtet. Die Annealingtemperatur wurde zuerst pro Zyklus um 0,3°C in 10 Zyklen von 61°C auf 58°C reduziert. Die nachfolgenden 20 Zyklen wurden bei 58 °C Annealingtemperatur durchgeführt.

Für die zweite PCR wurde der bp1259 "Forward" Primer verwendet. Die Temperaturbedingungen wurden angepasst und mit 61°C im ersten Zyklus eingestellt. In den ersten zehn Zyklen verringerte sich die Temperatur um jeweils 0,3 °C. Die nachfolgenden 20 Zyklen wurden bei 58°C durchgeführt.

3.1.7 5'-RACE (5'-RAPID AMPLIFICATION OF CDNA-ENDS)

Die cDNA-Synthese wurde unter Verwendung des '5-Race System for Rapid Amplification of cDNA-Ends-Kit durchgeführt (Fa. Invitrogen; Best. Nr.: 18373-019). Bei der 5'-RACE-PCR wird die Reverse Transkription mit einem sequenz-spezifischen, komplementären „Reverse" Primer durchgeführt. Die erhaltene cDNA wird gereinigt und an das 5'-Ende wird mithilfe des Enzyms Terminale Deoxynucleotidyltransferase (TdT) ein Polydesoxycytidinschwanz angehängt. Die nachfolgenden PCRs werden mit einem zu diesem komplementären Ankerprimer (AP, einem Oligodesoxyguanidinprimer, dessen 5'-Ende durch einen sogenannten Adapterprimer verlängert ist) und mit sequenzspezifischen Primern aus dem

Negativstrang der Sequenz durchgeführt. Zusätzlich wurden folgende Materialien verwendet, die Bestandteil des 5'RACE-Systems sind:

2	µl	10-fach Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl)
2	µl	25 mM $MgCl_2$
1	µl	10 mM dNTP
2	µl	0,1 M DTT
1	µl	Superscript™ II Reverse Transkriptase
120	µl	Bindungspuffer (6 M NaI)
		Bindungssäulen
400	µl	Waschpuffer
800	µl	70 % Ethanol
5	µl	5-fach TdT-"tailing" Puffer
50	µl	2 mM Desoxycytidintriphosphat (dCTP)
15	µl	TdT

Zur RNA wurde der genspezifische bp550 „Reverse" Primer und 4,5 µl DEPC-H_2O zugefügt. Nach einer Inkubation von 10 Min. bei 70°C wurde die Probe 1 Min. auf Eis gekühlt. Der Reaktionspuffer, $MgCl_2$, dNTP und DTT wurden zugegeben, gemischt, kurz zentrifugiert und die Probe bei 48 °C inkubiert. Nach 1 Min. wurde die Reverse Transkriptase zugegeben und die Probe für weitere 50 Min. bei 48°C belassen. Nach einer anschließenden Inkubation von 70°C/15 Min. wurde die Probe kurz zentrifugiert. Um das Risiko einer möglichen Kontamination mit RNAsen zu verringern, wurde der Ansatz nach Zugabe von RNAse H für 20 Min. bei 37°C inkubiert.

TdT-„Tailing":
120 µl Bindungspuffer wurden hinzugefügt und die cDNA über Säulenchromatografie aufgereinigt. Die Säule wurde 20 Sek. bei 13.000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert. 400 µl kalter Waschpuffer wurde auf die Säule gegeben und wiederum 20 Sek. bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Waschvorgang zweimal wiederholt. Ein letzter Waschvorgang mit 400 µl kaltem 70 %igem Ethanol

wurde angeschlossen. Die Säule wurde nochmals 1 Min. bei 13.000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert, um Reste des Ethanols zu entfernen. Der Säuleneinsatz wurde auf ein neues, steriles Auffanggefäß gesetzt und cDNA mit 50 µl auf 65 °C vorgewärmtem sterilem H_2O bidest. durch erneute Zentrifugation (20 Sek./13.000 Umdrehungen/Min.) eluiert. 10 µl der gereinigten cDNA wurden mit 6,5 µl DEPC-H_20, 5 µl 5-fach „tailing" Puffer und 2,5 µl dCTP gemischt, 3 Min. bei 94°C inkubiert und sofort 1 Min. auf Eis gekühlt. Es wurde 1 µl der TdT zugegeben, 10 Min. bei 37 °C und danach 10 Min. bei 65 °C inkubiert. Die Probe wurde auf Eis gekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.
Jeweils 5 µl des Reaktionsgemisches wurden als Matrizen-DNA in der nachfolgenden ersten PCR eingesetzt.

Nested-PCR zur Bestimmung des 5'-Endes:
Die PCR wurde wie die zuvor beschriebene „Nested" PCR zur Ermittlung des 3'-Endes mit dem bp423 „Reverse" Primer durchgeführt, bis auf folgende Ausnahmen: Die Annealingtemperatur der „Touchdown" PCR wurde den neuen Primern angepasst und mit 62,5 °C gewählt, wobei die Temperatur sich mit jedem der ersten zehn Zyklen um 0,3°C verringerte und die letzten 20 Zyklen bei gleichbleibenden 59,5 °C durchgeführt wurden.

Zweite PCR zur Bestimmung des 5'-Endes:
Das gleiche Protokoll diente als Vorlage, wobei die Annealingtemperatur an den bp375 „Reverse" Primer folgendermaßen angepasst wurde: 65 °C (-0,3 °C bei den ersten 10 Zyklen) für 45 Sek., anschließend 10 Zyklen bei 62 °C.

3.1.8 PCR zur Amplifikation der eH1 kodierenden Sequenz

Die Primer wurden mit einem zusätzlichen Flag-Tag sowie einer HindIII Schnittstelle (am „Forward"-Primer) und XbaI – Schnittstelle (am „Reverse"-Primer) synthetisiert. Als Annealingtemperatur für die kombinierte „Hot Start" und „Touchdown" PCR wurden 59 °C zu Anfang (-0,3 °C bei den ersten 10 Zyklen) gewählt, anschließend 10 Zyklen bei 56 °C.

3.1.9 AGAROSE GELELEKTROPHORESE

Im Agarosegel kann DNA durch Anlegen einer elektrischen Spannung entsprechend seiner Größe aufgetrennt werden. Die Detektion der DNA erfolgt nach Anfärben mittels Ethidiumbromid im UV-Licht. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgt anhand eines Längenstandards.

Materialien:

0,3	g	Agarose (Fa. Peqlab; BRD; Best. Nr.: 205465)
30	ml	0,5 M TBE Puffer:
		10,8 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Fa. Fluka Chemie AG; BRD; Best. Nr.: R01954)
		5,5 ml Borsäure (Fa. Sigma-Aldrich; Best. Nr.: B-7660)
		4 ml 0,5 M EDTA pH 7,4 (Fa. Sigma-Aldrich; Best. Nr.: E 5134)
		auf 1 l H_2O bidest.
0,25	µg	Ethidiumbromid (Fa. Sigma-Aldrich; Best. Nr.: E8751)
7	µl	EcoRI + HindIII Leiter (Fa. Fermentas; Best. Nr.: SM0199)
4	µl	6 x Loading Dye Solution (Fa. Fermentas; Best. Nr.: R0611)

Es wurde eine Mini-Gelelektrophorese-Kammer (Fa. Peqlab; Modell B1A) verwendet. Das Gel wurde durch Aufschmelzen der Agarose in 30 ml TBE-Puffer und Zugabe des Ethidiumbromids angefertigt. Als Laufmittel diente TBE-Puffer.

Es wurden 20 µl des PCR Ansatzes zusammen mit dem Puffer vermischt in die Geltaschen gegeben und bei einer Stromstärke von 70 mA für 1 h aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel im Videodensitometer unter UV-Licht (Modell E.A.S.Y. RH-3; Fa. Herolab; BRD) ausgewertet. Die Bandengröße konnte anhand eines mit aufgetragenen Längenstandards abgeschätzt werden.

3.1.10 AUFREINIGUNG DER PCR-PRODUKTE AUS AGAROSE-GEL

Alle Materialien waren Bestandteil des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Fa. Qiagen; BRD; Best. Nr.: 28704). Das ausgeschnittene Gelstück wird in der dreifachen Menge

an QG-Puffer bei 50°C, 10 Min. gelöst und anschließend Isopropanol im gleichen Gewichtsanteil wie das ausgeschnittene Gelstück zugegeben. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 14.000 Umdrehungen/Minute (Centrifuge 5417C; Fa. Eppendorf; BRD). Die Lösung wurde auf Säulen aufgetragen und zentrifugiert. Der Schritt wurde zuerst nach Zugabe von 500 µl QG-Puffer, dann mit 750 µl PE-Puffer wiederholt. Nach einer Leerzentrifugation wurden die Säulen auf ein leeres Reaktionsgefäß gesetzt und die DNA mit 50 µl H_20 eluiert.

3.1.11 KLONIERUNG DER PCR-PRODUKTE

Das gewonnene Mittelstück wurde zur Sequenzierung in den pCR®2.1-Vektor kloniert. Die PCR-Produkte wurden mithilfe des TA Cloning Kits (Fa. Invitrogen; Best.-Nr.: K2020-20) kloniert. Das System nutzt die Eigenschaft der in der PCR verwendeten DNA-Polymerase, ein einzelnes Desoxyadenosin unabhängig von der DNA-Matrize an das 3'-Ende der amplifizierten Stränge anzuhängen. Der verwendete Vektor pCR®2.1 wird linearisiert mit zwei Desoxythymidinüberhängen geliefert, zwischen die das PCR-Produkt eingesetzt werden kann. Der pCR®2.1-Vektor ist 3,9 kb groß, enthält das lacZα-Gen zur „blau-weiß"-Selektion der Klone, Ampicillin- und Kanamycinresistenzgene, eine „Multiple Cloning Site", sowie M13 Primersequenzen und einenT7 Promoter.

3.1.12 VERWENDETE PLASMIDE

Es wurde der Vektor pCR2.1 zur Klonierung und anschließenden Sequenzierung der verschiedenen Teilstücke verwendet. In den Vektor pcDNA3.1(+) (Fa. Invitrogen; Best. Nr.: V790-20) wurde die vollständige kodierende Sequenz von hH1R und eH1R ligiert, zur anschließenden Transfektion in die Zellinie HEK293. Zur Gewährleistung vergleichbarer Transfektionsbedingungen wurde für eH1 und hH1 ein einheitlicher Expressionsvektor verwendet.

3.1.13 LIGATION

Durch Ligation kann ein PCR-Produkt in ein Plasmid eingeschleust werden. Um ein optimales Sequenzierungsergebnis zu erhalten, wurden sämtliche PCR-Produkte in Vektoren eingebracht um anschließend in kompetenten *E.coli* Bakterien amplifiziert zu werden.
Materialien zu Ligation in pCR2.1 (bzw. pcDNA3.1/EGFP-Vektor):

4,5	µl	H_2O bidest., steril
1	µl	10 x Ligase Puffer
1	µl	pCR®2.1 Vektor, linearisiert, 25 ng/µl
2,5	µl	PCR-Produkt
1	µl	T4 DNA Ligase

Alle Materialien sind Bestandteil des TA Cloning® Kit (Fa. Invitrogen; Best. Nr.: K2000-01). Der Ansatz wurde über Nacht bei 14°C inkubiert.

3.1.14 HERSTELLUNG KOMPETENTER *E.COLI* ZUR TRANSFORMATION

In der Molekularbiologie versteht man unter Transformation die Übertragung von freier, löslicher DNA auf ein Empfänger-Bakterium. *E. coli* besitzen keine natürliche Transformationskompetenz. Um diese zur Aufnahme zirkulärer Plasmid-DNA zu befähigen, werden sie durch chemische Veränderungen künstlich kompetent gemacht.

Materialien:

TfB I:

500	µl	3 M Kaliumacetat
5	ml	0,5 M $MnCl_2$
10	ml	0,5 M $RbCl_2$
500	µl	1 M $CaCl_2$
7,5	ml	Glycerin (autoklaviert)

TfB II:

1	ml	100 mM MOPS pH 7,0
750	µl	1 M $CaCl_2$
200	µl	0,5 M $RbCl_2$
1,5	ml	Glycerin (autoklaviert)
6,5	ml	H_2O bidest., steril filtriert

Die verwendeten kompetenten Bakterien waren vom *E.coli* Stamm TOP 10F. Bei der Herstellung wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet, alle verwendeten Gefäße wurden zuvor autoklaviert. Es wurden 2 ml einer frischen Übernachtkultur in 100 ml LB überführt, für ungefähr 2 Stunden bei 37°C geschüttelt, bis eine Optische Dichte (OD) bei 660 nm von 0,55 erreicht wurde. Das Medium wurde 10 Min. auf Eis abgekühlt, anschließend bei 4°C, 10 Min., 3000 rpm (Fa. Eppendorf; Centrifuge 5417C) abzentrifugiert und das Pellet in 25 ml kaltem TfB I gut resuspendiert. Der Vorgang wurde wiederholt, das Pellet anschließend in TfB II resuspendiert, 200 µl Aliquots auf Eis abgefüllt und sofort bei -70 °C eingefroren.

3.1.15 TRANSFORMATION KOMPETENTER *E.COLI*

Durch die Transformation wird fremde DNA (Plasmide) in Bakterien eingebracht und dort anschließend repliziert. Das eingebrachte Plasmid enthält ein Resistenzgen für bestimmte Antibiotika, das die Selektion plasmidhaltiger Bakterien auf entsprechend antibiotikahaltigen Agarplatten ermöglicht.

Materialien:

300	µl	kompetente E.coli
2	µl	Ligationsansatz
500	µl	SOC-Medium (Fa. Invitrogen; TA Cloning® Kit; Best. Nr.: K2000-01)

Lucia-Bertoni (LB) – Medium:

20	g	LB Broth Base (Fa. Sigma-Aldrich; Best. Nr.: L3022)

ad 1l H_2O dest.; autoklaviert
Mit Ampicillin (50 μg/ml) (Fa. Sigma-Aldrich; Best. Nr.: A9393)

35 g LB Agar (Fa. Sigma-Aldrich; Best. Nr.: 2897)
auf 1l H_2O dest.; autoklaviert,
mit Ampicillin (50 μg/ml), 30 ml pro Agarplatte

Der Ligationsansatz wurde abzentrifugiert und auf Eis gelagert. Kompetente *E.coli* wurden auf Eis aufgetaut, anschließend mit dem Ligationsansatz vorsichtig mit der Pipettenspitze verrührt und 30 Min. auf Eis gelagert. Ein Hitzeschock bei 42°C, 30 Sekunden wurde durchgeführt und nach erneuter Lagerung auf Eis für 5 Min. wurde das SOC-Medium zugegeben. Der Ansatz wurde 1 Std. bei 37°C geschüttelt und anschließend 100 μl von vier verschiedenen Konzentrationen (1:50, 1:4, unverdünnt und Leerkontrolle) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden in jeweils 3 ml LB Broth Base bei 37°C kultiviert. Diese Übernachtkultur wurde zum Nachweis der Plasmidreplikation in isolierten Kolonien verwendet.

3.1.16 PLASMID-ISOLATION

In Bakterien vermehrte Plasmide können mithilfe der alkalischen Extraktionsmethode isoliert werden (Birnboim und Doly, 1979). Dabei werden die Bakterien durch die Anwesenheit von SDS lysiert und die DNA denaturiert. Durch Zugabe von Kaliumacetat wird die chromosomale DNA zusammen mit denaturierten Proteinen gefällt. Die doppelsträngige Plasmid-DNA wird nach Abzentrifugation des Präzipitats im Überstand isoliert, mit Isopropanol gefällt und in H_2O bidest. aufgenommen. Die Ausbeute und Reinheit der Plasmid-DNA kann anschließend photometrisch bei λ = 260/280 nm bestimmt werden.

Materialien:

LB-Medium (s.o.)

Nucleo-Bond Puffer (Fa. Macherey-Nagel; BRD):

Puffer S1:	50 mM	Tris(hidroxymethyl)-aminomethan (Tris)/Hcl
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNAse A
	in H_2O bidest.; eingestellt auf pH 8,0	
Puffer S2:	280 mM	NaOH
	1 %	SDS
	in H_2O bidest.	
Puffer S3:	2,8 M	Kaliumacetat
	in H_2O bidest.; eingestellt auf pH 5,1	
Puffer N2:	100 mM	Tris/ H_3PO_4
	15 % (v/v)	Ethanol
	900 mM	KCl
	0,15 % (m/v)t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton-X-100)	
	in H_2O bidest.; eingestellt auf pH 6,3	
Puffer N3:	100 mM	Tris / H_3PO_4
	15 % (v/v)	Ethanol
	1,15 M	KCl
	in H_2O bidest.; eingestellt auf pH 6,3	
Puffer N5:	100 mM	Tris/H_3PO_4
	15 % (v/v)	Ethanol
	1 M	KCl
	in H_2O bidest.; eingestellt auf pH 8,5	

Von den Agarplatten wurden jeweils 9–18 Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen, in 2 ml LB mit Ampicillin (50 µg/ml) überführt und über Nacht bei 37°C

unter Schütteln kultiviert. Parallel wurden als Negativkontrolle 2 ml des Mediums mit entsprechender Ampicillinzugabe kultiviert.
200 µl einer Kolonie, bei der in der Gelelektrophorese das entsprechende Insert nachgewiesen werden konnte, wurden steril entnommen, in einen Erlenmeyerkolben mit 200 ml LB-Medium und Ampicillin (50 µg/ml) überführt und erneut über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakterienkultur wurde bei 4°C für 15 Min. bei 8.000 Umdrehungen/Min. im GSA-Rotor pelletiert (Sorvall® RC-5; Fa. DuPont Instruments). Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 12 ml Puffer S2 für 5 Min. bei Rt inkubiert und die Proteine sowie chromosomale DNA durch Zugabe von Puffer S3 innerhalb von 5 Min. gefällt. Die Plasmid-DNA wurde nach zweimaliger Zentrifugation im SS34-Rotor (12.000 Umdrehungen/Min., 20 Min., 4°C) aus dem Überstand isoliert und durch Säulenchromatografie (NucleoBond®; Fa. Macherey-Nagel; Best. Nr.: AX500) aufgereinigt. Hierzu wurden die Anionenaustauschsäulen mit 6 ml Puffer N2 equilibriert, der oben gewonnene Überstand aufgetragen und die nicht gebundenen Anteile mit 32 ml Puffer N3 ausgewaschen. Die Plasmid-DNA konnte anschließend mit 15 ml Puffer N5 eluiert und mit 11 ml Isopropanol gefällt werden. Das DNA-Pellet wurde einmal mit 5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, eingetrocknet und schließlich in 300 µl sterilem H_2O bidest. aufgenommen. Die Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde im Spektrophotometer (Modell U 3200; Fa. Hitachi Instruments; USA) bei einer Wellenlänge von λ = 260 nm in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke bestimmt. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht dabei einer DNA Konzentration von 50 µg/ml. Die Reinheit der Plasmidpräparation wurde gleichzeitig durch Bestimmung der OD bei einer Wellenlänge von λ = 280 nM (Absorptionsmaximum von Proteinen) und der Bildung des Quotienten aus OD 260/OD 280 abgeschätzt. Nur Präparationen mit einem Quotienten > 1,8 wurden zur Transfektion verwendet.

3.1.17 RESTRIKTIONSVERDAU

Die Identität der verwendeten Plasmide wurde durch Restriktionsverdau mithilfe geeigneter Endonukleasen (HindIII, XbaI) verifiziert. Die Schnittstellen dieser Enzyme

sind sowohl bei hH1 als auch bei eH1 HindIII (am 5'-Ende) und XbaI (am 3'-Ende) einkloniert, und dienten bereits zur Ligation in den Vektor. Die DNA-Fragmente wurden nachfolgend durch Agarose-Gelelektrophorese ihrer Länge nach aufgetrennt.

Restriktionsenzyme (Fa. Fermentas; 10 U/µl):
0,5 µl HindIII (Best. Nr.: ER 0501)
0,5 µl XbaI (Best. Nr.: ER 0681)

Reaktionspuffer :
2 µl Y Tango (Fa. Fermentas; Best. Nr.: 9411)

Reaktionspuffer, Restriktionsenzyme und 1 µg Plasmid-DNA wurde mit sterilem H_2O bidest. auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Die Ansätze wurden für 1,5 Std. bei 37°C im Thermocycler inkubiert, anschließend wurde das Enzym bei 65°C für 10 Min. inaktiviert.

3.1.18 GELAUFREINIGUNG

Die Banden wurden unter UV-Licht mithilfe eines Skalpells ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Fa. Quiagen; Best. Nr.: 28704) aufgereinigt. Das herausgeschnittene Agarosestück wurde hierzu in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Multi® Sicherheitsreaktionsgefäße; Fa. Roth; Best. Nr.: 7137.1) gegeben. Das Gelstück wurde gewogen, die dreifache Menge an QG-Puffer zugegeben und anschließend bei 50°C für 10 Min. unter Schütteln inkubiert. Nach kompletter Auflösung des Gels wurde Isopropanol entsprechend der Gelmenge zugegeben. Die Lösung wurde auf die mitgelieferten Säulchen aufgetragen und bei 14.000 Umdrehungen/Min. 1 Min. zentrifugiert (Fa. Eppendorf; BRD; Centrifuge 5417C). Die Flüssigkeit wurde ausgeleert, nochmals 500 µl QG-Puffer aufgetragen und zentrifugiert. Dann wurden 750 µl des PE-Puffers aufgetragen, zweimal zentrifugiert, der Filter auf ein leeres Tube gesetzt, 50 µl H_2O zur Elution darauf gegeben und erneut zentrifugiert.

3.2 ZELLKULTUR

3.2.1 ZELLMODELL

Die pharmakologische Charakterisierung des eH1 wurde nach Expression in „Human Embryonic Kidney“ (HEK)293-Zellen durchgeführt. HEK293-Zellen sind in der Lage, den Großteil der posttranslationalen Faltungen und Verarbeitungen, die zur Herstellung funktionaler Säugerproteine notwendig sind, auszuführen und sie besitzen zudem auch sämtliche Komponenten die zur Untersuchung der Rezeptorfunktion notwendig sind. Außerdem sind sie hocheffizient bei der Transfektion und der nachfolgenden Proteinproduktion (Thomas und Smart, 2004).

Kultivierung der Zellen:
Alle in der Zellkultur verwendeten Plastikgefäße wurden von der Firma TPP® (BRD) bezogen. Die Chemikalien stammen, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Sigma-Aldrich.

Wachstumsmedium:
Zu 500 ml „Dulbecco’s Modified Eagle Medium“ (DMEM; Fa. PAA) wurden folgende Zusätze gegeben:

10	% (v/v)	Fetales Kälberserum (FKS; Fa. PAA), inaktiviert (65°C/30 min.)
4	mM	L-Glutamin (Fa. PAA)
100	IU/ml	Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (Fa. PAA)
3	µg/ml	Enrofloxacin (Fa. ICN Biochemicals; BRD)

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) :

8	g	NaCl
0,2	g	KCl
2.145	g	Na_2HPO_4 x 7 H_2O
0,2	g	KH_2PO_4
		ad 1l H_2O bidest.; pH 7,43

PBS/EDTA:

0,04	%	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in PBS; pH 7,43

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen im Laminar Flow (Modell 6.12; Fa. BDK; BRD). Die HEK293-Zellen wurden als Monolayer im Brutschrank (Fa. Heraeus; BRD) bei 37°C und einer Atmosphäre bestehend aus 5% (v/v) CO_2 in Luft und gesättigtem Wasserdampf kultiviert. Die Zellen wurden ca. zwei Mal pro Woche im Verhältnis von 1/5 bwz. 1/10, je nach Wachstumsintensität, passagiert. Hierzu wurden die Zellen durch leichtes Schütteln und Klopfen vom Boden abgelöst und mit dem Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1.200 Umdrehungen/Min. 10 Min. (Zentrifuge der Fa. Heraeus) pelletiert, das Medium abgesaugt und in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Entsprechend dem Verdünnungsverhältnis wurde hieraus Medium in Zellkulturflaschen bzw. Petrischalen überführt.

3.2.2 TRANSFEKTION VON HEK293-ZELLEN

Als Transfektion wird das Einbringen fremder DNA in Säugerzellen bezeichnet. Die in dieser Arbeit verwendete Methode der Calciumphosphat Co-Präzipitation basiert auf der Bildung unlöslicher Komplexe aus Calcium und Phosphatresten der DNA, die durch Endozytose von den Zellen aufgenommen werden (Chen und Okayama, 1987). Für die Calciumphosphat Co-Präzipitation wurden folgende Materialien verwendet:

Calciumchlorid-Lösung ($CaCl_2$-Lösung):

3,68 g $CaCl_2 \times 2H_2O$
in H_2O bidest.; steril filtriert

Transfektionspuffer (BBS):

0,819 g NaCl
0,02 g $Na_2PO_4 \times 7\ H_2O$
0,533 g N'N-bis-Aminoethansulfonsäure (BES)
in 50 ml H_2O bidest.; eingestellt auf pH 6,95; steril filtriert

Einschleusen der DNA:
Zur Transfektion wurden HEK293-Zellen auf Petrischalen mit 10 cm Durchmesser ausplattiert und bei ca. 70 % Konfluenz für die Versuche eingesetzt. Kurz vor der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und durch je 10 ml frisches Wachstumsmedium mit nur 0,1 % FKS ersetzt. Die Transfektionsansätze wurden wie folgt vorbereitet: In ein Polypropylenröhrchen wurde eine Gesamtmenge von 10 µg Plasmid-DNA in 450 µl steril filtriertem H_2O bidest. gelöst und im Anschluss daran tropfenweise 50 µl $CaCl_2$-Lösung unter leichtem Schütteln zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend unter leichtem Schütteln zu 500 µl BBS gegeben und für 30 Min. bei Rt inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde gemischt, gleichmäßig verteilt auf die Zellen getröpfelt und für 36 Std. im Brutschrank inkubiert.

Stabile Expression von Proteinen:
Es erfolgte ein Mediumwechsel mit Zugabe von Geneticin G418 (1600 mg/ml). Nach drei Tagen wurde die G418-Konzentration auf 800 mg/ml verringert. Nach weiteren zehn Tagen wurden aus den wenigen überlebenden Zellen, die aufgrund des aufgenommenen pcDNA3.1-Vektors eine G418-Resistenz erzeugen konnten, einzelne Kolonien unter dem Mikroskop isoliert und kultiviert.

3.2.3 KRYOKONSERVIERUNG

Einfriermedium:
Wachstumsmedium mit
20 % (v/v) FKS
10 % (v/v) Dimethylsufoxid (DMSO)

Da bei HEK293-Zellen mit fortschreitender Passagierung die Transfektionseffizienz nachlässt, wurde von frisch aufgetauten Zellen ein größerer Stock in flüssigem Stickstoff konserviert. Hierzu wurden die Zellen durch Abklopfen vom Boden der Kulturflasche abgelöst, durch Zentrifugation pelletiert und in 1 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden in ein Einfrierröhrchen überführt, in einer eisgefüllten Styroporbox bei -70°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Aus diesem Vorrat wurden in regelmäßigen

Abständen neue Zellen aufgetaut. Die gerade auftauenden Zellen wurden in 10 ml eiskaltem Wachstumsmedium resuspendiert und durch anschließende Zentrifugation bei 1200 Umdrehungen/Min. (Zentrifuge der Fa. Heraeus; BRD) von den Resten des Einfriermediums befreit. Die Zellen wurden in 37°C warmem Wachstumsmedium aufgenommen und auf Zellkulturflaschen ausgesät.

3.2.4 MEMBRANPRÄPARATION FÜR BINDUNGSSTUDIEN

Materialien:

PBS-Puffer:

8	g	NaCl
0,2	g	KCl
1,44	g	Na_2HPO_4
0,2	g	KH_2PO_4
		gelöst in 1l H_2O bidest.; eingestellt auf pH 7,4

Homogenisierungspuffer:

5mM	Tris
1mM	Ethylenglycol-bis(β-Aminoethylether)- N, N, N', N'-Tetraessigsäure (EGTA)
1mM	Threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol (DTT)
	gelöst in H_2O bidest; eingestellt auf pH 7,4

Bindungspuffer:

50	mM	Tris/HCl
5	mM	$MgCl_2$
		gelöst in H_2O bidest; eingestellt auf pH 7,4

Alle Arbeitsschritte erfolgten im Eisbad nach Vachon et al. (1987). Das dreimal mit 10 ml PBS-Puffer gewaschene Zellpellet wurde in 10 ml Homogenisierungspuffer aufgenommen und für 10 Sek. homogenisiert (Fa. Bachofer; BRD; Polytron, Stufe 6). Nicht zerstörte Zellen sowie Zellkerne wurden durch anschließende Zentrifugation bei 1.200 Umdrehungen/Min., 4°C 10 Min. abgetrennt. Der Überstand wurde gewonnen und schwere Plasmamembranen durch Zentrifugation bei 18.000 Umdrehungen/Min.,

30 Min. im SS34 Rotor (Sorvall®; Fa. DuPont Instruments) isoliert. Das Membranpellet wurde mit Homogenisierungspuffer gewaschen, in 2 ml Bindungspuffer aufgenommen und sofort für die Radioligandenbindung verwendet.

3.2.5 QUANTIFIZIERUNG DES PROTEINGEHALTES NACH LOWRY

Die im Bindungsexperiment eingesetzte Proteinmenge wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) quantifiziert. Das Prinzip beruht auf eine durch Tyrosin und Tryptophan vermittelte Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+}, die nachfolgend mit Folinreagenz einen tiefblauen Farbkomplex bilden.

Kupfersulfat-Tartrat-Natriumcarbonat (CTC-Lösung):

0,1	% (m/v)	$CuSO_4$ x 5 H_2O
0,2	% (m/v)	Na^+/K^+ - Tartrat
10	% (m/v)	Na_2CO_3
		gelöst in H_2O bidest.

Lowry A:

10	ml	CTC-Lösung
10	ml	0,8 M NaOH
20	ml	5 % (m/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)

Lowry B:

1	ml	Folin Ciocaleau Phenol Reagenz (Folin-Reagenz)
		verdünnt in 5 ml H_2O bidest.

Standardkurve:

A:			H_2O bidest.
B:	2,5	%	(m/v) bovines Serumalbumin (BSA)
C:	5	%	(m/v) BSA
D:	7,5	%	(m/v) BSA
E:	10	%	(m/v) BSA
	jeweils gelöst in H_2O bidest.		

Die Bestimmung erfolgte jeweils im Doppelansatz. Die in jeweils 100 µl H_2O bidest. verdünnten Proben wurden mit 200 µl Lowry A für 10 Min. bei Rt inkubiert. Anschließend wurde jeweils 100 µl Lowry B zugesetzt, die Ansätze gemischt und für weitere 30 Min. inkubiert. Bei den Standardlösungen wurde entsprechend verfahren. Die Farbintensität wurde anschließend im Spektrophotometer (U-3200; Fa. Hitachi) bei einer Wellenlänge von λ = 750 nm gemessen. Aus der Standardkurve wurden die Proteingehalte der Proben durch lineare Regression abgeleitet.

3.3 PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

3.3.1 VERWENDETE LIGANDEN

Atropin (Fa. Sigma-Aldrich; Best. Nr.: A0132)
Cimetidin (Fa. Sigma-Aldrich; Best. Nr.: C4522-5G)
Diphenhydramin Hydrochlorid (Fa. Sigma-Aldrich; Best. Nr.: D3630-5G)
Histamin (Fa. Calbiochem; BRD; Best. Nr.: 001647)
Loratadin (Fa. Sigma-Aldrich; Best. Nr.: L9664-10MG)
[pyridinyl-5-^{3}H-]Pyrilamin, (^{3}H-Pyrilamin), (Fa. Amersham Biosciences; BRD; Best. Nr.: TRK608)
S-(+)-Chlorpheniramin-Maleat (Fa. Sigma-Aldrich; Best. Nr.: C4915-1G)

3.3.2 RADIOLIGANDENBINDUNG

Die Bestimmung von Zelloberflächenrezeptoren erfolgte mittels Radioliganden-bindung an isolierten Plasmamembranen (Vachon et al., 1987). Die Bindungsstudien erfolgten mithilfe des radioaktiv markierten Liganden ^{3}H-Pyrilamin. ^{3}H-Pyrilamin ist ein Antagonist am H1R mit gleich hoher Affinität zu G-Protein gekoppelten wie ungekoppelten Rezeptoren.

A) SÄTTIGUNGSEXPERIMENTE

Die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand folgt dem Massenwirkungsgesetz. Als Dissoziationskonstante (K_D) wird diejenige Konzentration eines Liganden bezeichnet, bei der 50 % der Rezeptoren besetzt sind. Sie wird im Sättigungsexperiment aus

dem Verhältnis des gebundenen zum freien Anteil eines Radioliganden ermittelt. Bei konstanter Rezeptorzahl nähert sich der Anteil des gebundenen Radioliganden mit steigender Ligandenkonzentration in Form einer hyperbolen Funktion einem Plateau an, das der maximalen Bindungskapazität (B_{max}) entspricht. Die K_D dagegen wird als diejenige Radioligandenkonzentration definiert, bei der 50 % der Bindungsstellen besetzt sind.
Aus einem Sättigungsexperiment können die Werte für B_{max} und K_D grafisch aus der Sättigungskurve abgeleitet werden. Es wurde hierzu das Computerprogramm GraphPad Prism™ (Fa. GraphPad Software Inc.; USA) verwendet. Die Bestimmung der unspezifischen Bindung (B_0) erfolgt dabei in Anwesenheit eines molaren Überschusses an Histamin.

Die spezifische Bindung von ^{3}H-Pyrilamin am H1-Rezeptor kann nach folgender Gleichung ermittelt werden:

$$B_0 = B_{total} - B_{unspez.}$$

Legende:
B_0 = spezifische Bindung von ^{3}H-Mepyramin
B_{total} = Bindung von ^{3}H-Mepyramin in Abwesenheit von Histamin
$B_{unspez.}$ = Bindung von ^{3}H-Mepyramin in Anwesenheit von Histamin

Materialien:

^{3}H-Pyrilamin (spezifische Aktivität = 32 Ci/mmol)
Histamin

Bindungspuffer:
50 mmol/l Tris
5 mmol/l $MgCl_2$
in H_2O dd, pH 7,4

Blocklösung für GF/B-Filter (Whatman®; Fa. VWR; BRD; Best. Nr.: 1821 025):

0,1	% (m/m)	Polyethylenglycol 6000 (PEG), (Fa. Merck; BRD; Best. Nr.: 807491) gelöst in H_2O bidest.

Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint®EcoPlus; Fa. Roth; Best. Nr.: 0016.2)

Jeder Messpunkt erfolgte in Doppelbestimmung. Alle Arbeitsschritte wurden im Eisbad durchgeführt.

Die Bestimmung der K_D für ^{3}H-Pyrilamin erfolgte an frisch präparierten oder bei -70°C gelagerten und auf Eis aufgetauten Membranen von hH1- bzw. eH1-Rezeptoren tragenden HEK293-Zellen. Die Reaktionsansätze zur Erstellung der Sättigungskurven enthielten 8 verschiedene Konzentrationen an ^{3}H-Pyrilamin (15; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 und 0,156 nM). Es wurden 80-120 µg Membranprotein (bzw. 300 µg bei der Verwendung von Lungengewebe) in einem Gesamtvolumen von 200 µl Bindungspuffer verwendet. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 10 µM Histamin bestimmt. Die Bindungsansätze wurden gemischt und bis zum Erreichen eines Equilibriums im Wasserbad inkubiert (25°C; 90 Min.) Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Bindungspuffer gestoppt und das an die Plasmamembranen gebundene ^{3}H-Pyrilamin durch Filtration über Silikatfaserfilter (GF/B-Filter) mithilfe einer Vakuum Filtrationseinheit (Fa. Millipore; BRD) abgetrennt. Zur Absättigung der unspezifischen Bindung wurden die Glasfaserfilter zuvor mit PEG-Blocklösung benetzt. Die Filter wurden dreimal mit 3 ml eiskaltem Bindungspuffer gewaschen, in Zählfläschchen überführt (Minis® 2001; Fa. Zinsser Analytic; BRD; Best. Nr.: 3020001) und mit je 3 ml Szintillationsflüssigkeit extrahiert. Die gebundene Radioaktivität wurde im Szintillationsmessgerät (Fa. Beckmann; BRD) bestimmt und zur Konstruktion der Sättigungskurven verwendet. Aus den Sättigungsexperimenten konnte mithilfe des Computerprogramms GraphPad Prism™ die B_{max} sowie die K_D für ^{3}H-Pyrilamin am H1R ermittelt werden.

B) HETEROLOGE VERDRÄNGUNGSEXPERIMENTE

Die Bestimmung funktionell G-Protein gekoppelter Rezeptoren wird in heterologen Verdrängungsexperimenten durchgeführt. Hierbei wird eine konstante Menge eines radioaktiv markierten Antagonisten (hier ^{3}H-Pyrilamin) durch steigende

Konzentrationen eines (Inversen) Agonisten (Displacer) vom Rezeptor verdrängt. Die K_i wird aus der halbmaximalen Hemmkonzentration des Displacers (IC_{50}) mithilfe der Formel nach Cheng-Prusoff (1973) bestimmt:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{(1 + L) / K_D}$$

Legende:
- K_i = inhibitorische Konstante des Displacers
- IC_{50} = halbmaximale Hemmkonzentration des Displacers
- L = Konzentration des Radioliganden
- K_D = Dissoziationskonstante des Radioliganden

Materialien:

^{3}H-Pyrilamin	spezifische Aktivität = 32 Ci/mmol (Fa. Amersham Biosciences; Best. Nr.: TRK 608)
Histamin	(Fa. Calbiochem; Best.-Nr.: 1647)

Blocklösung für GF/B-Filter :

0,1	% (m/v)	PEG gelöst in H_2O bidest.

Die Ansätze für heterologe Verdrängungskurven enthielten in einem Totalvolumen von 200 µl Bindungspuffer ca 1,9 nM ^{3}H-Pyrilamin, mindestens 50 µg Membranprotein und aufsteigende Konzentrationen an Histamin (0; 0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 100; 1000 µM). Die totale ^{3}H-Pyrilaminbindung wurde in Abwesenheit eines Überschusses Histamin bestimmt. Die Reaktionsansätze wurden für 90 Min. bei 20 °C inkubiert und wie oben beschrieben weiter prozessiert. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal an unterschiedlichen Membranpräparationen in Doppelbestimmung wiederholt.

3.3.3 PROTEINBESTIMMUNG IM WESTERNBLOT

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine zuerst ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Werden die Proteine anschließend elektrophoretisch auf Membranen transferiert, so können diese mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden (Westernblot). Die Antigen-Antikörper-Komplexe werden mittels Chemilumineszenz detektiert.

Materialien für SDS-Polyacrylamidgele:

Trenngel:

5	ml	30 % (m/v) Polyacrylamid (PAA)-Stammlösung (Rotiphorese® Gel 30; Fa. Roth; Best. Nr.: 3029.1)
3,75	ml	1,5 M Tris/HCl-Lösung, eingestellt auf pH 8,8
150	µl	10 % (m/v) SDS-Lösung
6,1	ml	H_2O bidest.

Die Proteine wurden im Probenpuffer nach Laemmli (1970) für 5 Min. bei 95°C erhitzt und anschließend abgekühlt. In der Gelkammer (Mini-Protean II; Fa. Bio-Rad; BRD) wurde je ein Sammel- und Trenngel gegossen. In die Sammelgele wurden Probenkämme eingesetzt. Nach vollständiger Auspolymersierung der Gele wurden diese in die Laufkammer eingesetzt, die Probenkämme entfernt und jeweils 10 µl der Proben in die Probentaschen eingebracht. Als Größenstandard dienten biotinylierte Proteine mit bekanntem Molekulargewicht (Broad Range; Fa. Bio-Rad). Anschließend wurde Laufpuffer zugegeben und die Proteine unter Anlegen einer elektrischen Spannung von 100 V im Sammelgel und 200 V im Trenngel aufgetrennt.

Materialien für den Westernblot:

Anodenpuffer I:

20	% (v/v)	Methanol
0,2	M	Tris-HCl
		in H_2O bidest.; keine pH-Einstellung nötig

Anodenpuffer II:

20	% (v/v)	Methanol
0,02	M	Tris-HCl
		in H_2O bidest.; keine pH-Einstellung nötig

Kathodenpuffer:

20	% (v/v)	Methanol
40	mM	ε-Aminocaprylsäure (Fa. Serva; BRD)
		in H_2O bidest.; keine pH-Einstellung nötig

Für jedes SDS-Polyacrylamidgel wurde eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran (Immobilion-P®; Fa. Millipore) vorbereitet. Die Membranen wurden für 10 Min. mit Methanol aktiviert, anschließend für 10 Min. mit H_2O bidest. hydratisiert und bis zur weiteren Verwendung in Anodenpuffer II equilibriert. Auf eine befeuchtete Graphitanode (Transblot; Fa. Pharmacia; BRD) wurden nacheinander 6 in Anodenpuffer I sowie 3 in Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere geschichtet. Darauf wurden die Membranen und die Gele gelegt. Den Abschluß bildeten 9 in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Dieser sogenannte Sandwich wurde mit der Graphitkathode abgedeckt und die Proteine bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm^2 Blotfläche für eine Stunde transferiert.

Antikörperdetektion:

Als erster Antikörper wurde ein affinitätsgereinigter, gegen ein C-terminales 17-mer Peptid (Cys-NENEKKTFKKILHIRS-COOH; aa-470-486) im Kaninchen gezogener Antikörper verwendet. Der Antikörper wurde im Rahmen der Dissertation hergestellt. Als zweiter Antikörper wurde ein an Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG Antikörper verwendet (Fa. Dianova; BRD). Der biotinylierte Proteinmarker wurde mit einem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten anti-Biotin-IgG (Fa. Cell Signalling; USA) identifiziert.

Materialien:

Blocklösung:

10	% (v/v)	Blockierungsreagenz auf Polymerbasis (Roti®-Block; Fa. Roth) in H_2O bidest.

Waschpuffer (TBS-T):

25	mM	Tris-HCl
190	mM	NaCl
1	% (m/v)	Tween®-20 in H_2O bidest.; eingestellt auf pH 8,0

Nach dem Transfer wurden die Membranen für eine Stunde bei Rt mit Blocklösung behandelt. Anschließend wurden die Membranen mit dem ersten Antikörper (1 µg/ml TBS-T) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Membranen 3 x mit TBS-T gewaschen und für eine weitere Stunde mit dem zweiten Antikörper (verdünnt in TBS-T mit 1 % Roti®-Block) bei Rt inkubiert. Die Membranen wurden erneut 3 x mit TBS-T gewaschen und zur Detektion der Antikörperbindung verwendet.

Chemilumineszenz:

Die Antigen-Antikörperkomplexe wurden mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. Dabei wird Luminol durch die Aktivität der Meerrettich-Peroxidase in Anwesenheit von H_2O_2 oxidiert. Fällt das Luminol nach dieser chemischen Aktivierung wieder in den Grundzustand zurück, wird Energie in Form von Licht ausgesendet, die durch Auflegen eines Röntgenfilms dokumentiert werden kann.

Materialien für die Substratlösung:

2,5	mM	Luminol (3-Aminophtalhydrazid) in DMSO
400	µM	p-Cumarsäure in DMSO
100	mM	Tris-HCl; eingestellt auf pH 8,5
2,7	mM	H_2O_2 gelöst in H_2O bidest.

Die gewaschenen PVDF Membranen wurden für 2 Min. mit der Substratlösung inkubiert, in eine Röntgenkassettte verbracht und ein Röntgenfilm (Hyperfilm^{TM}; Fa. Amersham Biosciences) belichtet. Nach einer Expositionszeit von ca. 1-5 Min. wurden die Filme entwickelt und mithilfe eines Videodensitometers (Modell E.A.S.Y. RH-3; Fa. Herolab; BRD) dokumentiert und ausgewertet.

3.3.4 REGULATION DER ADENYLATZYKLASE

Die Histaminrezeptor-vermittelte Regulation der Adenylatzyklaseaktivität kann durch verschiedene Methoden bestimmt werden. Einerseits kann die Effektoraktivität indirekt über die Anreicherung des gebildeten Second Messengers cAMP in intakten Zellen bestimmt werden (cAMP-Akkumulation). Da an der Stabilität des intrazellulären cAMP eine Reihe endogener Regulationsmechanismen beteiligt sind (z.B. Phosphodiesterasen), gestattet diese Methode keine direkte Aussage über die Aktivität der Adenylatzyklase an sich. Diese kann dagegen in isolierten Membranen durch die Umsetzung des Substrats ATP zu cAMP gemessen werden (Johnson und Solomon, 1991). Um einen möglichst genauen Hinweis auf die Verhältnisse in lebenden Zellen zu gewinnen, wurde die Akkumulation von cAMP in stabil H1R exprimierenden HEK293-Zellen bestimmt. Hierbei wurden die intakten Zellen mit verschiedenen Agonisten und inversen Agonisten inkubiert und das gebildete cAMP bestimmt. Die Bestimmung des gebildeten cAMP erfolgte im Zellüberstand mittels Radioimmunoassay (Brooker, 1979).

cAMP-Akkumulation in intakten Zellen:
Bei der Bestimmung der cAMP-Akkumulation bleiben die oben erwähnten endogenen Regulationsmechanismen intakt. In der Literatur sind verschiedene Methoden beschrieben, um die intrazelluläre Bildung von cAMP zu messen (Wong, 1994). Einerseits kann nach radioaktiver Markierung des ATP-Pools mit ^{3}H-Adenosin die Bestimmung der Umsetzung von ATP zu cAMP als Maß für die Umsetzung herangezogen werden (Salomon, 1991). Da dies relativ aufwendig ist und um radioaktives Arbeiten im Zellkulturlabor zu vermeiden, wurde das in einem bestimmten Zeitraum neu gebildete cAMP mittels RIA bestimmt (Steiner, 1972; Steiner et al., 1974; Brooker et al., 1979).

Materialien:

7,72 g Dulbecco's Modified Medium mit 25 mM Hepes (DMEH), (GibcoBRL®; Fa. Invitrogen)
ad 500 ml H_2O bidest.,
pH 7,4, sterilfiltriert

IBMX-Stammlösung:

0,5 M 3-Isobuthylmethyl-1-xanthine (IBMX), (Fa. Calbiochem) in DMSO

Inkubationsmedium für die cAMP-Akkumulation:
DMEH:
0,5 mM IBMX

Je Ansatz wurden 2 x 10^5 Zellen eingesetzt. Es wurden stets Doppelansätze in einer 24-Loch Zellkulturplatte durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst durch 10-minütige Zentrifugation bei 600 Umdrehungen/Min. (Zentrifuge der Fa. Heraeus) und 20°C vom Medium getrennt. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 500 µl Inkubationsmedium resuspendiert. Der zugesetzte Phosphodiesterasehemmer IBMX soll den enzymatischen Abbau des gebildeten cAMP hemmen. Histamin wurde in variablen Konzentrationen mit einer maximalen Konzentration von 100 µM, Atropin in einer Konzentration von 1 µM und Forskolin mit einer Konzentration von ebenfalls 1 µM eingesetzt. Die jeweiligen Konzentrationen wurden im Inkubationsmedium eingestellt.
Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in jeweils 250 µl Inkubationsmedium für die Akkumulation mit den entsprechenden Liganden für 15 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Ablauf der Reaktion wurde mit 750 µl eiskalter, 50 mM HCl abgestoppt und 30 Min. auf Eis stehen gelassen. Nach erneuter 10 minütiger Zentrifugation bei 9.500 x g konnte im Überstand das gebildete cAMP bestimmt werden. In Vorversuchen erwies sich ein Volumen von 25 µl für den Einsatz im RIA als geeignet.
Das in der cAMP-Akkumulation oder in der Aktivitätsbestimmung der Adenylatzyklase gebildete cAMP wurde nach der Methode von Brooker bestimmt (Brooker et al., 1979). Im RIA wird das cAMP durch Antikörperbindung bestimmt. Um eine Aussage über die Menge zu erreichen, wird den Ansätzen eine bestimmte Menge

[^{125}J]cAMP als Tracer zugegeben. Dieses konkurriert mit dem zu bestimmenden cAMP in der Probe um die Bindungsstellen eines zugesetzten cAMP Antikörpers (Prinzip eines kompetitiven Testes). Je mehr cAMP sich hierbei in der Probe befindet umso weniger jodiertes Tracer-cAMP kann am Antiserum binden. Nach Einstellung eines Gleichgewichtes (über Nacht im Kühlraum) wird das Antikörper gebundene [^{125}J]cAMP gefällt und die Radioaktivität im γ-Counter bestimmt. Anhand einer Standardkurve kann die in der Probe enthaltene Menge an freiem cAMP errechnet werden.

3'5'-cyclo-AMP 2'-O-Succiniyl-3-[^{125}J]Jodotyrosinemethylester (Fa. Amersham);
spez. Aktivität: 1910 mCi/ µM
bovines IgG, RIA-grade, (Fa. Sigma-Aldrich)
Ziege anti-cAMP-Antikörper (Fa. Gramsch Laboratories; BRD)

Acetatpuffer-Stock:

500	mM	Natriumacetat
		mit Eisessig auf pH 6 einstellen

cAMP-Stocklösung:

1	mM	cAMP in H_2O
		Molarer Extinktionskoeffizient = 14,65 bei λ= 258 nm, pH 7,0

Für jeden Radioimmunoassay musste eine cAMP-Standardkurve erstellt werden. Die cAMP Stocklösung wurde 1:1000 über zwei Vorverdünnungen [1) = 1: 100; 2) = 1:10 aus 1)] in Acetatpuffer verdünnt.

Pipettierschema für die Standardkurve:

Standard Konzentration	*Mischverhältnis*	*cAMP*
A = 1/10 aus Standard 2	146 µl aus Standard 2 + *1314 µl*	10 pmol / Ansatz
B = 1/3 aus A	366 µl aus A + *734 µl*	3,3 pmol / Ansatz
C = 1/10 aus A	100 µl aus A + *900 µl*	1 pmol / Ansatz
D = 1/10 aus B	100 µl aus B + *900 µl*	333 fmol / Ansatz

E = 1/10 aus C	100 µl aus C + *900 µl*	100 fmol / Ansatz
F = 1/10 aus D	100 µl aus D + *900 µl*	33 fmol / Ansatz
G = 1/10 aus E	100 µl aus E + *900 µl*	10 fmol / Ansatz
H = 1/10 aus F	100 µl aus F + *900 µl*	3,33 fmol / Ansatz

Die kursiv angegebenen Werte stehen für den jeweils zugegebenen Acetatpuffer. Hinter den bezeichnenden Buchstaben der entsprechenden Standards ist die entsprechende cAMP-Endkonzentration des Ansatzes angegeben. Pro Ansatz der Standardkurve wurden von jedem Standard 100 µl in einem Polyethylenröchrchen eingesetzt. Auch hier wurde im Doppelansatz und bei 4°C gearbeitet. Zur Erstellung einer vollständigen Standardkurve wurden zusätzlich je zweimal 100 µl Acetatpuffer zur Ermittlung der maximalen [^{125}J]cAMP-Bindung durch den Antikörper und zwei Reaktionsgefäße mit jeweils 100 µl Standard 2 zur Ermittlung der unspezifischen Antikörperbindung (UsB) erstellt. Weiter wurden zwei Polyethylenröhrchen nur mit 100 µl der entsprechenden Tracer-Verdünnung zur Dokumentation der pro Ansatz eingesetzten Counts (cpm) bereit gestellt.

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C ausgeführt. Zunächst wurden je Probenansatz 75 µl Acetatpuffer in Polyethylenröhrchen vorgelegt. Dazu wurden jeweils 25 µl der zu bestimmenden Proben hinzupipettiert. Anschließend wurden je 100 µl der Antikörperverdünnung und des [^{125}J]-cAMP-Tracers (8000 cpm) zugegeben. Die Verdünnung der anti-cAMP-Antikörper wurde so gewählt (1/12.500), dass etwa 40-50% des eingesetzten [^{125}J]-cAMP gebunden wird. Anschließend wurden alle Ansätze (Proben und Standardkurve) zur Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes zwischen Antikörper und cAMP über Nacht bei 4°C im Kühlraum eingestellt. Am folgenden Tag wurden die Antigen-Antikörperkomplexe gefällt. Zur Erhöhung der Proteinfraktion in den Röhrchen wurden zunächst pro Reaktionsansatz 50 µl 5% BSA in Acetatpuffer zugegeben. Hierdurch sollte die Proteinfraktion erhöht und dadurch eine quantitative Fällung gewährleistet werden (Brooker et al., 1979). Zur eigentlichen Fällungsreaktion wurden 2 ml eiskaltes Ethanol zugegeben, gemischt und die Ansätze für 30 Min. auf Eis inkubiert. Die gefällten Antikörper-cAMP Komplexe wurden durch Zentrifugation (30 Min., 2000 x g, 4°C) abgetrennt. Nach Abkippen des Überstandes wurde das Pellet zweimal mit 1 ml eiskaltem Ethanol gespült und die präzipierte Radioaktivität im γ-Counter (1272 Clinigamma, Fa. LKB; Finnland) bestimmt.

3.4 KONFOKALE MIKROSKOPIE

3.4.1 HERSTELLUNG VON STABIL TRANSFIZIERTEN HEK293-ZELLINIEN MIT EGFP MARKIERTEN EH1 UND HH1

Die cDNA-Sequenzen des eH1 und hH1 wurden in den EGFP-Vektor (Enhanced Green Fluorescent Protein) der Firma Clontech ligiert. Dieser Vektor enthält eine Sequenzvariante des GFP-Proteins der bioluminezenten Qualle Aequorea victoria (Shimomura et al., 1962), die aufgrund der Verschiebung der maximalen Exzitation auf ca. 490 nm 4-35 mal heller fluoresziert als der GFP-Wildtyp. HEK293-Zellen wurden mit dem ligierten Vektor transfiziert und stabile Klone selektiert.

3.4.2 REGULATION DES EH1 IN HEK293-ZELLEN MITTELS KONFOKALER MIKROSKOPIE

Bei der konfokalen Mikroskopie können im Gegensatz zur Lichtmikroskopie virtuelle optische Schnitte durch ein Objekt erzeugt werden. Das Prinzip der Laser-Rastermikroskopie wurde 1955 von Marvin Minsky entwickelt. Hierbei wird ein Objekt punktweise von einem Laserstrahl gerastert, wobei in der gewünschten Schnittebene maximal fokussiert wird. Dabei werden die Fluoreszenmoleküle angeregt, die sich im Laserstrahl befinden. Die Aufnahmen wurden am LSCM 510 der Firma Zeiss angefertigt. Es wurden zwei stabil transfizierte HEK293-Zellinien mit eH1 verwendet. Die Zellen wurden zwei Tage zuvor auf Objektträger ausgesät und im Wachstumsmedium kultiviert. Die untersuchten Zellen wurden nach morphologischen Kriterien und nach optimaler Fluoreszenz ausgesucht. Die Liganden wurden vor der Zugabe in 1 ml Wachstumsmedium vorverdünnt. Es wurde Histamin (20 µM) sowie die Antagonisten Diphenhydramin, Loratadin und Chlorpheniramin in unterschiedlichen Konzentrationen getestet und Aufnahmen vor sowie 2, 4, 8,10 und 20 Min. nach der Zugabe der Liganden angefertigt.

4. Ergebnisse

4.1 KLONIERUNG DES EH1

4.1.1 IDENTIFIKATION DER EH1 KODIERENDEN SEQUENZ

Um einen Nachweis für die kodierende Sequenz des eH1 zu erhalten, musste zuerst eine RT-PCR für das Mittelstück etabliert werden. Hierzu wurden degenerierte Primer aus einem „Multiple Alignment“ bekannter Sequenzen anderer Säugetierspezies ausgewählt. Zur Durchführung von „Multiple Alignments“, die als Vorlage für die Ableitung degenerierter Primer für das Mittelstück dienten, wurden die mRNA-Sequenzen von Rind (GI: 31342870), Hund (GI: 57101033), Mensch (GI: 38174244), Maus (GI: 31542962) und Ratte (GI: 8393563) aus der NCBI Datenbank verwendet.

Bei der Durchführung der PCRs eines jeden Teilschrittes wurde mit Standardreaktionsbedingungen begonnen. Da es bei allen Teilschritten für den Erfolg der Reversen Transkription keine Erfolgskontrolle gab, wurden die für die PCR verwendeten Reaktionsbedingungen schrittweise und einzeln nacheinander variiert. Durch Variation in den Temperaturzyklen, der Primeranlagerungstemperatur, dem Zusatz von DMSO und der Erhöhung des Magnesiumgehaltes wurden schließlich PCR-Produkte in der erwarteten Länge erhalten. Bei allen PCRs wurde für jede Primerkombination ein Ansatz mitgeführt, bei dem an Stelle der Matrizen-DNA steriles H_2O bidest. hinzugefügt worden war. Diese Proben waren sämtlich negativ. Die erhaltenen Fragmente wurden mithilfe der „Nested“ PCR verifiziert. Wurden diese PCR-Produkte als Matrizen-DNA in nachfolgenden „Nested“ PCRs mit Primern eingesetzt die innerhalb des ersten Amplifikats lagen, wie dies bei den „Nested“ PCRs für das 3’- und das 5’-Ende der Fall war, konnten wieder Amplifikate in der erwarteten Länge erzielt werden. Alle Teilstücke wurden mit dem TA Cloning Kit in den pCR2.1-Vektor kloniert und sequenziert. Im Anschluß an eine Plasmidisolation wurden ca. 1 µg des Isolats bei Rt über Nacht verdampft und zur Sequenzierung verwendet.

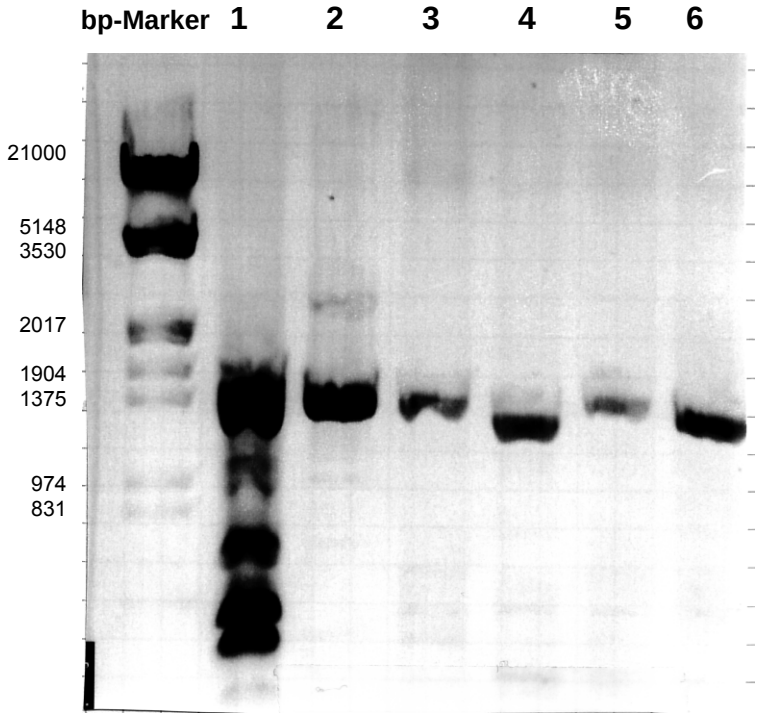
A) IDENTIFIKATION DER MITTELSTÜCKS

Im ersten Schritt wurde eine PCR zum Nachweis eines Teilstückes in der Mitte der kodierenden mRNA für eH1 etabliert. Hierzu mussten mehrere PCRs mit verschiedenen degenerierten „Forward“ und „Reverse“ Primern sowie unterschiedlichen Anlagerungstemperaturen und Zyklenanzahl zur Optimierung durchgeführt werden. RT-PCRs mit zwei verschiedenen „Reverse“ Primern lieferten erfolgsversprechende Produkte. Bei der anschließenden Verwendung dieser cDNAs als Matrize, zudem mit mehreren Primerkombinationen, konnten dem H1R-Sequenzbereich anderer Spezies verwandte Fragmente isoliert werden (Abb. 6). Da bei jeder Amplifikation zusätzliche Lesefehler durch die Taq-Polymerase entstehen können, wurde für die Sequenzierung ein PCR-Ansatz mit cDNA-Templet und den Primern der zweiten Bande (cDNA mit bp1611 „Reverse“ Primer.; bp321 „Forward“ Primer, bp1611 „Reverse“ Primer) bei verringerter Zyklenanzahl wiederholt .
Aufgrund eines Längenvergleiches der Sequenzen anderer Spezies wurde in dieser PCR eine Länge von ca 1200 bp des Teilstückes erwartet. Dies wurde auch so bestätigt: In Abbildung 7 ist ein mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarose Gel mit der durch die „Forward“ und „Reverse“ Primer erhaltenen Bande knapp unterhalb der 1375 bp-Bande des Längenstandards abgebildet.

Die erhaltene Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und in den pCR2.1-Vektor ligiert. Nach einer Transformation wurden 9 Klone aus einer Platte entnommen, auf die der inkubierte Ansatz mit der Verdünnung 1:20 aufgetragen worden war. Die Sequenzierung wurde komplett doppelsträngig durchgeführt. Sie ergab ein Mittelstück in Länge von 1266 bp. Der Vergleich dieser Sequenz mit der NCBI-Gendatenbank zeigte eine hohe Homologie zu den H1R anderer Spezies und wurde deshalb als mögliche mRNA von eH1 angenommen. Es diente nun als Grundlage für die Ableitung genspezifischer Primer. Aus dieser Sequenz wurden jeweils zwei spezifische Primer für das 5’- und 3’- Ende zur Durchführung der PCRs mit den 5’- und 3’-RACE-Kits abgeleitet.

Abb. 6: PCR-Ergebnisse mit verschiedenen cDNA- und Primerkombinationen
Die Angaben der bp beziehen sich auf die eH1-Sequenz und sind in der cds in Abb. hervorgehoben. (rev = „Reverse“; fwd = „Forward“)

1. RT-PCR mit Primer rev bp1611; Primer fwd: bp222; Primer rev: bp1611
2. RT-PCR mit Primer rev bp1611; Primer fwd: bp321; Primer rev: bp1611
3. RT-PCR mit Primer rev bp1611; Primer fwd: bp222; Primer rev: bp1488
4. RT-PCR mit Primer rev bp1488; Primer fwd: bp321; Primer rev: bp1488
5. RT-PCR mit Primer rev bp1488; Primer fwd: bp222; Primer rev: bp1488



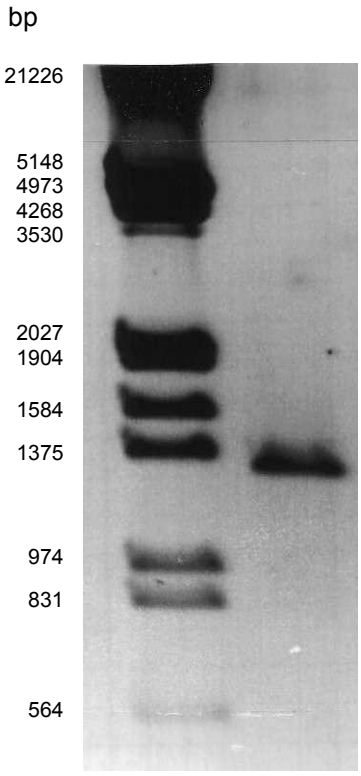
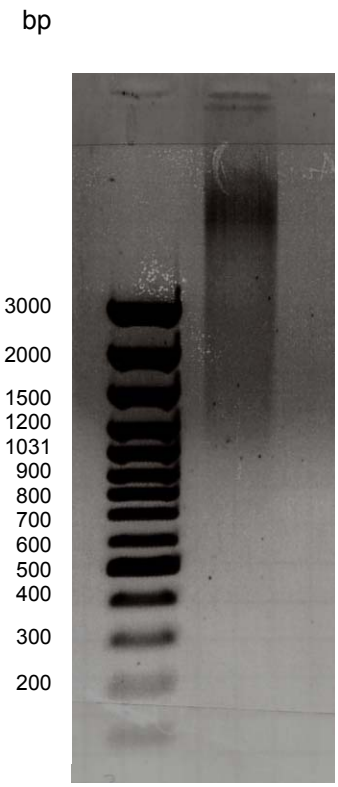


Abb. 7: PCR-Produkt aus der PCR zur Sequenzierung einer internen Teilsequenz des eH1. Verwendet wurde die Primerkombination unter 2. der Abb. 6

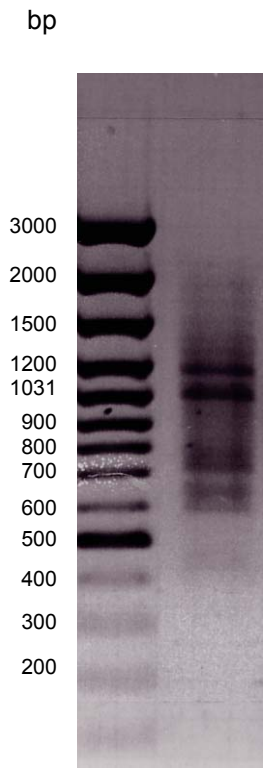
B) IDENTIFIKATION DES 3'-ENDES

Für das 3'-Ende wurde der „Reverse" Adapter Primer (AP) aus dem 3'-RACE-Kit der Firma Invitrogen verwendet. Der AP-Primer bindet durch seine Oligo(dT)-Region an das polyadenylierte 3'-Ende der mRNA, wodurch diese in der PCR amplifiziert werden kann. In einer, im Anschluß an eine erneute RNA-Isolation mit dem genspezifischen bp1063 „Forward" Primer durchgeführten PCR zeigte sich in der Gelelektrophorese vorerst eine undeutliche Bande. Um dieses Ergebnis zu spezifizieren, wurde anschließend eine erste „Nested" PCR mit dem „Forward" Primer bp1214 durchgeführt. Sie ergab mehrere Banden in Höhe von 1200 bp, 1031 bp, 750 bp, 650 bp und 600 bp. Mit einer anschließenden kombinierten „Hot Start" und „Touchdown" „Nested" PCR und der Verwendung des „Forward" Primers bp1259 konnten die Banden weiter eingeschränkt werden: Es ergab sich eine breite Bande auf einer Höhe von ungefähr 950 bp sowie drei weitere, nur schwach zu erkennende Banden im Bereich um 800 bp, 600 bp und 1100 bp des Längenstandards. Die Bande um 950 bp wurde ausgeschnitten, aufgereinigt, kloniert und sequenziert. Die Ergebnisse des Vergleiches mit der Gendatenbank sind in Tab. 1 zusammengefasst.

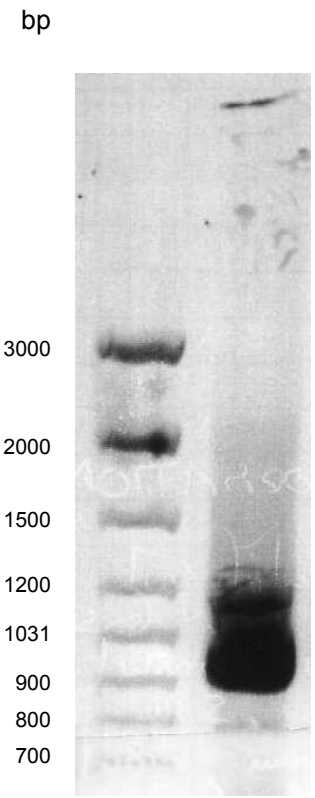
Abb. 8: PCR-Ergebnisse zur Ermittlung des 3'-Endes. Durch zwei „Nested" PCRs konnte das fehlende Teilstück am 3'-Ende amplifiziert werden.



Ergebnis der ersten PCR zur Ermittlung des 3'-Endes. (mit „Forward" Primer bp1063)



Ergebnis der ersten nested-PCR zur Ermittlung des 3'-Endes (mit „Forward" Primer bp1214)



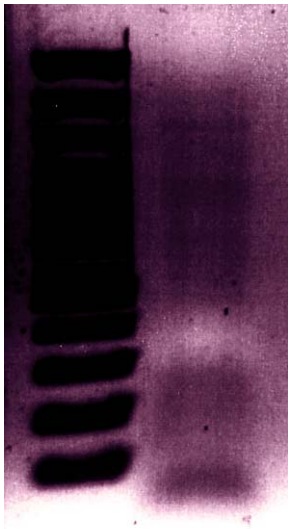
Bande nach der zweiten nested-PCR zur Ermittlung des 3'-Endes. (mit „Forward" Primer bp1259)

C) IDENTIFIKATION DES 5'-ENDES

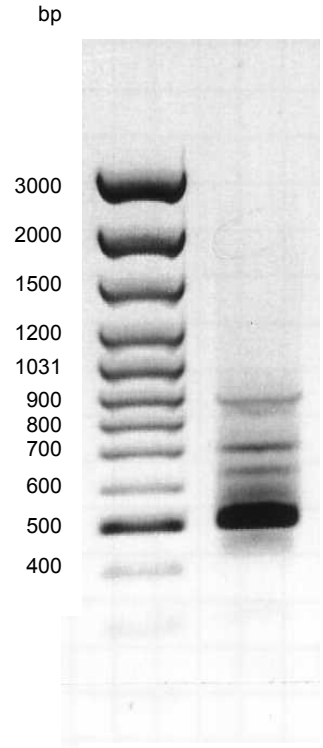
Der genspezifische „Reverse" Primer für das 5'-Ende wurde mit dem „Abridged Anchor Primer" (AAP) des 5'-RACE-Kits kombiniert. Die „First-Strand"-cDNA-Synthese wurde mit dem „Reverse" Primer bp550 durchgeführt. Anschließend wurde die Matrize aufgereinigt, um es von überschüssigen dNTPs und Resten des „Reverse" Primers zu entfernen. Mithilfe des Enzyms „Terminale Deoxynucleotidyltransferase" (TdT) wurde ein homopolymeres Ende an die cDNA angehängt, wodurch der AAP in nachfolgenden PCRs an die Matrize binden kann.

Der AAP-Primer wurde in allen nachfolgenden PCRs als „Forward“ Primer verwendet. In der ersten anschließenden PCR führte der „Reverse“ Primer bp423 in einer „Hot Start“ und „Touchdown“ PCR zu keinem Ergebnis. Die anschließende „Nested“ PCR mit dem „Reverse“ Primer bp375 ergab ein Fragment in der Größe von ca. 500 bp in der Agarose Gelelektrophorese. Es zeichneten sich noch weitere vier bis fünf schwache Banden ab. Nach der Ligation und Transformation des PCR-Produktes und einer anschließenden Plasmidisolation wurden von den neun Kolonien diejenige zur Sequenzierung ausgewählt, die in der Agarose Gelektrophorese eine Bande in der erwarteten Größe zeigte. Auch dieses Teilstück wies in einem Blast-Vergleich mit der NCBI-Gendatenbank hohe Homologie zu den H1R-Sequenzen anderer Spezies auf (siehe Tab. 1, Seite 68).

Abb. 9: PCR-Ergebnisse zur Ermittlung des 5’-Endes. Aus einem anfänglich unspezifischen Bandenmuster wurde durch eine „Nested“ PCR eine spezifische Bande isoliert.



5’RACE:
PCR-Produkt mit „Reverse“ Primer bp423



5’RACE:
PCR-Produkt der „Nested“ PCR mit „Reverse“ Primer bp550

Abb. 10: Die vollständige eH1-mRNA (kodierende Sequenz). Die verwendeten Primer sind eingezeichnet (fwd = „Forward“, rev = „Reverse“)

bp

1 atgacctgtc tcaattcctc ctccgactta gaagacaaga tgtgtgaggg gaacaagacc

61 accatagcca gtccccaact gatgcccctg gtggtagtcc tgagcaccat ctccttggtc

130 fwd

121 acagtggcg**c tcaacctgct ggtcctgta**t gctgtgcgga gcgagcggaa gctacacact

181 gtggggaacc tgtacatcgt cagcctctcg gtggcagacc tgattgtggg agctgttgtc

241 atgcccatga acatcctcta cctcttcacg tccaagtggc ccctgggccg gcctctctgc

301 ctcttttggc tttccatgga ctacgtggcc agcacagcat ccattttcag tgtcttcatc

375 rev

361 ttgtgcattg atcg**ctatcg ctcggtccag cagc**ccctca gatacttgag gtatcgtacc

423 rev

421 aa **gacccgag catcagcc**ac catcttgggg gcctggtttc tgtccttcct gtgggttatt

481 cccatttggg gctggcatca cttcgtgtca cagacctgga atcgccagga ggacaagtgt

550 rev

541 gagacagac**t tctatgatgt cacctgg** ttc aagatcatga ccgccatcat caacttctac

601 ctgcccacct tgctcatgct atggttctac accaagatct acaaggctgt acggcagcac

661 tgtcagcacc gagatctcat caacggatcc ctcccttcct tctctgacgt taagctgaag

721 ccagagaatc ccaaggtgga tgctaagaaa tcagaggagt ctccctggga ggttctgaaa

781 aggaagccaa aagatgctgg tggtggatct gtcttgaagc taccatctga agacccaaag

841 gagatgaagt ccccagctgt tttcagccaa gaggaggttg gagaagtaga caacctccac

901 tgcttcccac ttaacactgt gcagatgcac actgaggcag aggggaatga caggggctac

961 gtagccatca accagagcca gagccagctt gagatgggtg agcagggcct gaacatgcgt

1063 fwd

1021 gaggccaacg agatgccaga ggatcagatc ctgggtgaca gc**ccatcctt ctcccagaca**

1081 **ga** cttagaca ccccccccaga gccagcatct gggaaaggca aaccgagagg tgggtctaac

1141 acaggcctgg attacatcaa gttcacttgg aagaggctcc gctcacattc gagacagtgc

1214 fwd 1259 fwd

1201 gtgtctgggt tgc**acatgaa ccgagaacgg aag**gctgcca aacaattggg gtttatca**tg**

1261 **gcagccttca tcctttgct**g gattccttac ttcatcttct tcatggttat tgccttctgt

1321 aagagctgtt gcaatgagca tgtacacatg ttcaccatct ggctgggcta cattaactcc

1417 rev

1381 acactgaatc ccctcattta ccctttgtgc aatgag**aact tcaagaagac gttcaa**gaaa

1441 atcctgcaca ttcgctccta a

4.1.2 TRANSLATION DES PROTEINS

Mithilfe des Computerprogramms Gene Jockey™ wurden die drei Einzelstücke zusammengesetzt und das zweite ATG bei bp49 als Startcodon für ein translatierbares Protein bestimmt. Ein Translationsversuch mit dem ersten ATG als Startcodon ergab kein funktionelles Protein. Entsprechend ergab sich das Codon TAA bei 1459 bp der sequenzierten cDNA als Stoppcodon. Die so definierten Start- und Stoppstellen stimmten auch mit den im „Mulitple Alignment“ gefundenen Start- und Stoppstellen anderer H1-Rezeptor-mRNAs überein. Die vollständige kodierende Sequenz und das translatierte Protein wurden in einem „Blast“ mit den vorhandenen Sequenzen in der Gendatenbank des NCBI verglichen. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 auf Seite 68 zu sehen. Wie auch zuvor beim Sequenzvergleich der Nukleotide ergab sich eine hohe Homologie zu H1R anderer Spezies.

Aus der konstruierten kodierenden Sequenz wurden nun Primer am 5’- und 3’-Ende abgeleitet, mit denen durch erneute cDNA-Synthese und PCR eine zusammenhängende kodierende Sequenz gewonnen wurde. An den Primern wurden zusätzlich Schnittstellen für Restriktionsenzyme (3’: XbaI; 5’: HindIII) sowie ein Flag-Tag am 5’-Ende eingefügt.

Obwohl die verwendete Taq-Polymerase eine niedrige Fehlerfrequenz aufweist, wurden zusätzlich zu den drei doppelt sequenzierten Einzelteilen zweimal je eine komplette Doppelstrangsequenzierung aus zwei Klonen mit jeweils der vollständig kodierenden Sequenz durchgeführt.

Die klonierte und verifizierte Sequenz wurde von der Autorin in der Gendatenbank des National Center of Biotechnology Information veröffentlicht. Sie kann unter der Nummer DQ681103, bzw. GI:110350942 abgerufen werden.

Abb. 11: Translatierte Sequenz des eH1

eH1 Protein

```
                                        1.TM
1    MTCLNSSSDL  EDKMCEGNKT  TIASPQLMPL  VVVLSTISLV  TVALNLLVLY

                2.TM                                        3.TM
51   AVRSERKLHT  VGNLYIVSLS  VADLIVGAVV  MPMNILYLFT  SKWPLGRPLC

                                                4.TM
101  LFWLSMDYVA  STASIFSVFI  LCIDRYRSVQ  QPLRYLRYRT  KTRASATILG

                                          5. TM
151  AWFLSFLWVI  PIWGWHHFVS  QTWNRQEDKC  ETDFYDVTWF  KIMTAIINFY

201  LPTLLMLWFY  TKIYKAVRQH  CQHRDLINGS  LPSFSDVKLK  PENPKVDAKK

251  SEESPWEVLK  RKPKDAGGGS  VLKLPSEDPK  EMKSPAVFSQ  EEVGEVDNLH

301  CFPLNTVQMH  TEAEGNDRGY  VAINQSQSQL  EMGEQGLNMR  EANEMPEDQI

351  LGDSPSFSQT  DLDTPPEPAS  GKGKPRGGSN  TGLDYIKFTW  KRLRSHSRQC

                6.TM                                        7.TM
401  VSGLHMNRER  KAAKQLGFIM  AAFILCWIPY  FIFFMVIAFC  KSCCNE HVHM

451  FTIWLGYINS  TLNPLIYPLC  NENFKKTFKK  ILHIRS
```

TM: Transmembrane Region entsprechend hH1 (Seifert et al., 2003), entsprechende Aminosäuren sind fettgedruckt und unterstrichen.

4.1.3 HOMOLOGIEN

Jede Teilsequenz zeigte in einem Vergleich mit den eingetragenen Sequenzen in der Gendatenbank des National Center of Biotechnology Information („Blast“) hohe Homologien (84–87 %) zu H1R-Sequenzen anderer Spezies. Die Homologien der einzelnen Teilstücke zu den jeweiligen Sequenzen kann der Tab. 1 entnommen werden.

Tab. 1: Homologien der drei Teilsequenzen in einem Vergleich mit der internationalen Gendatenbank.

	Homologien in %		
Gefundene Sequenzen	**Zum Mittelstück:**	**Zum 5'-Ende:**	**Zum 3'-Ende:**
H1R Canis familiaris (Hund)	88	90	88
H1R Macaca mulatta (Rhesusaffe)	88	91	n.b.
H1R Pongo pygmäus (Orang Utan)	88	91	90
H1R Pan troglodytes (Schimpanse)	87	89	89
H1R Gorilla gorilla (Gorilla)	87	89	89
H1R Homo sapiens (Mensch)	87	89	91
H1R Cavia porcellus (Meerschweinchen)	85	85	n.b.
H1R Mus musculus (Maus)	87	85	88
H1R Rattus norvegicus (Ratte)	87	85	88
H1R Bos taurus (Rind)	85	88	86

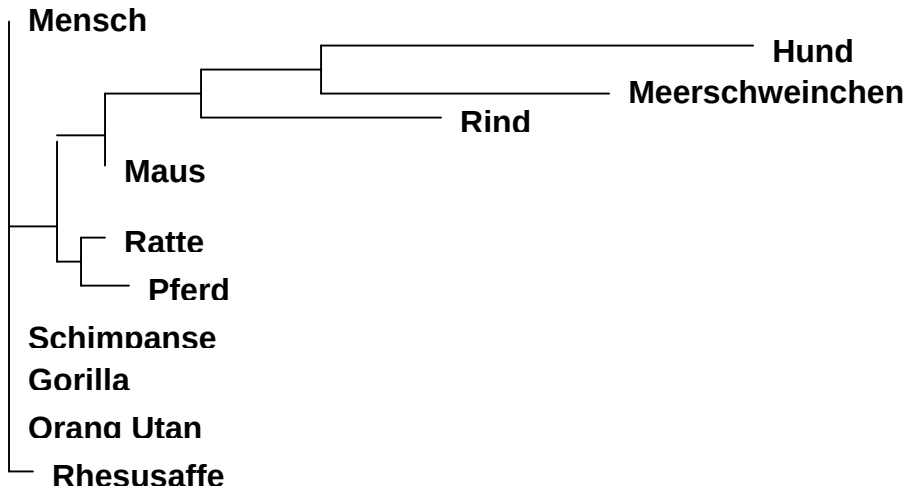
n.b.: im „Blast" wurde hierfür kein Ergebnis angezeigt

Tab. 2: Ergebnisse des „Blast" der vollständigen mRNA sowie des Proteins mit der NCBI Gendatenbank

	Homologien in %	
Gefundene Sequenzen	**eH1 mRNA**	**eH1 Protein**
H1R Canis familiaris (Hund)	88	85
H1R Pongo pygmäus (Orang Utan)	88	85
H1R Pan troglodytes (Schimpanse)	88	85
H1R Gorilla gorilla (Gorilla)	88	85
H1R Homo sapiens (Mensch)	87	84
H1R Bos taurus (Rind)	n.b.	81
H1R Rattus norvegicus (Ratte)	n.b.	76
H1R Mus musculus (Maus)	n.b.	75
H1R Cavia porcellus (Meerschweinchen)	n.b.	71
Muscarinerger Rezeptor M4 Rattus norvegicus (Ratte)	n.b.	30

Das Ergebnis (Abb.: 10) zeigte im Vergleich mit den Sequenzen der NCBI-Gendatenbank hohe Homologien ausschließlich zu H1R-Sequenzen anderer Spezies (Hund 88 %, Orang Utan 87 %, Gorilla 87 %, Mensch 87 %, Maus 86 %, Ratte 86 %, Rind 85 %, Meerschweinchen 85 %). Als nächster Schritt wurde das Protein mit determiniertem Start- und Stoppcodon translatiert. Das translatierte Protein (Abb.: 11) ergab bei einem Blast mit der NCBI-Proteindatenbank höchste Homologie zum Orang Utan, Schimpansen, Gorilla und Hund (85%) sowie hohe Homologien zum Menschen (84%), Rind (81%), Ratte (76%), Maus (75%) und Meerschweinchen (71%). Ähnlichkeiten mit dem G-Protein gekoppelten muskarinergen Rezeptor 4 der Ratte wurden aufgezeigt (Homologie 30%).

Abb. 12: Phylogramm der H1R-Proteine, erstellt mit ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)

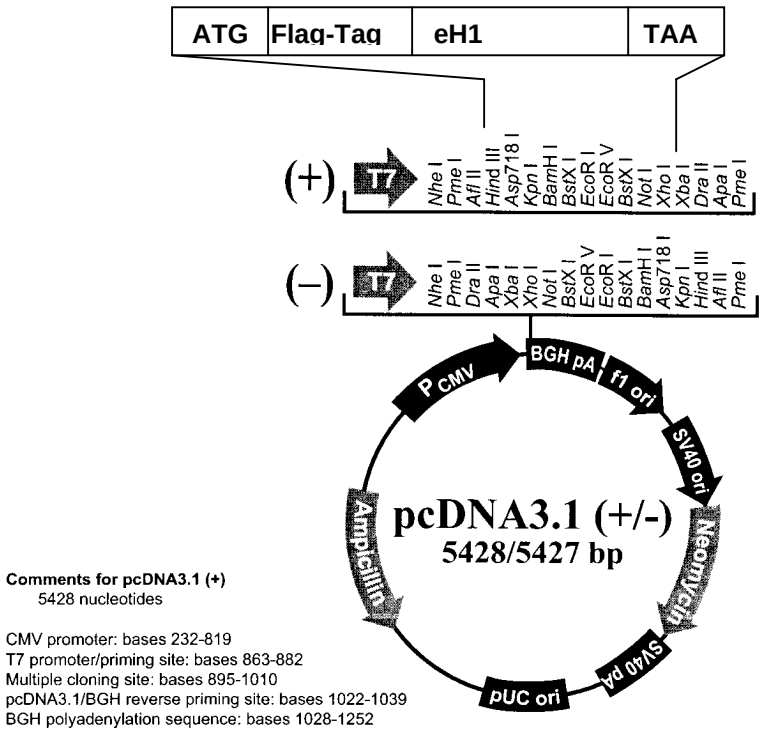


4.1.4 SUBKLONIERUNG UND EXPRESSION VON EH1 UND HH1 IN HEK293-ZELLEN

Die eH1-Sequenz wurde mithilfe ihrer angehängten Schnittstellen HindIII und XbaI in den pcDNA3.1(+)-Vektor subkloniert. Dieser Vektor ermöglichte die Transfektion von HEK293-Zellen. Der hH1 wurde (im Vektor pGEM®; Fa. Promega) von Herrn Prof. Dr. Roland Seifert (Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt. Er wurde durch die angehängten Restriktionsenzymschnittstellen HindIII und XbaI ebenfalls in den Vektor pcDNA3.1(+) subkloniert, um vergleichbare experimentelle Bedingungen zu schaffen.

Am N-terminalen Ende der eH1-Sequenz wurde zusätzlich die Flag-Tag-Sequenz, die ein Oktapeptid kodiert (DYKDDDDK), subkloniert. Diese ermöglicht eine spätere Detektion mit einem entsprechenden Antikörper. Die Frage nach einer Beeinträchtigung der Funktionalität eines Proteins bzw. des Zellsystems durch eine Flag-Tag-Sequenz wurde in zahlreichen Studien verneint (u.a.: Molloy et al, 1994; Chubet et al., 1996). Wie auch im Rahmen dieser Doktorarbeit, so zeigte auch Weill et al. (1999) mit Aufnahmen am konfokalen Mikroskop von HEK293-Zellen, die mit dem M1-muskarinergen Rezeptor in EGFP-Vektoren transfiziert waren und ebenfalls eine angehängte, bzw. eingefügte Flag-Tag Sequenz enthielten, einen voll funktionsfähigen GPCR in einem intakten Zellsystem.

Abb. 13: Vektorkarte pcDNA3.1 mit eH1-Insert



Comments for pcDNA3.1 (+)
5428 nucleotides

CMV promoter: bases 232-819
T7 promoter/priming site: bases 863-882
Multiple cloning site: bases 895-1010
pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1022-1039
BGH polyadenylation sequence: bases 1028-1252
f1 origin: bases 1298-1726
SV40 early promoter and origin: bases 1731-2074
Neomycin resistance gene (ORF): bases 2136-2930
SV40 early polyadenylation signal: bases 3104-3234
pUC origin: bases 3617-4287 (complementary strand)
Ampicillin resistance gene (*bla*): bases 4432-5428 (complementary strand)
ORF: bases 4432-5292 (complementary strand)
Ribosome binding site: bases 5300-5304 (complementary strand)
bla promoter (P3): bases 5327-5333 (complementary strand)

A) ERSTES SCREENING VON AN HEK-EH1 UND HEK-HH1 KLONEN DURCH EIN-PUNKT-MESSUNGEN MIT ^{3}H-PYRILAMIN

Zur Charakterisierung der stabil transfizierten Zellinien wurden zunächst mehrere HEK293-Zellen die eH1/hH1 exprimierten, kultiviert und in einer Ein-Punkt-Messung auf ihren Gehalt an Rezeptoren untersucht. Die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand kann durch die Bestimmung der Bindungsparameter Dissoziationskonstante (K_D) und B_{max} näher definiert und quantifiziert werden. Hierbei stellt die K_D ein Maß für die Affinität des Liganden zum betreffenden Rezeptor dar, die B_{max} steht für die maximale Bindungskapazität, d.h. für die Menge der exprimierten Rezeptoren.

Es wurden mit einer vergleichsweise geringen Menge an ^{3}H-Pyrilamin (ca. 1,6 nM) spezifische Bindungen nachgewiesen. Diese Werte dürfen nicht mit den B_{max}-Werten nach vollständiger Charakterisierung der Zellen verwechselt werden. Ein Schätzwert kann aber nach Extrapolation dieser Werte angegeben werden. In Tab. 3 sind diese Ergebnisse zusammengestellt. Die K_D für ^{3}H-Pyrilamin (4,43 nM) wurde von Seifert et al. (2003) übernommen. Die Berechnung wurde mithilfe der Scatchard Transformation durchgeführt:

$$B_{max} = \frac{B_O\ (L+K_D)}{L}$$

Legende: L = Konzentration des Radioliganden
B_O = spezifische Bindung von ^{3}H-Pyrilamin
K_D = Dissoziationskonstante des Radioliganden

Tab. 3: Ergebnisse der Ein-Punkt-Messung an stabil mit hH1/eH1 transfizierten HEK293-Zellen.

hH1		**eH1**	
Klon	B_{max} (fmol/mg Membranprotein)	Klon	B_{max} (fmol/mg Membranprotein)
C2	1631	3	3669
C3	1668	4	4430
G3	826	5	11177
J3	1429	9	1304
A2	522		

So konnte für eH1 als auch für hH1 eine Vorauswahl an stabil transfizierten Zellinien mit vergleichbaren Expressionsniveaus durchgeführt werden. Da sich *in vivo* die Rezeptorkonzentrationen im fmol-Bereich bewegen und auch aufgrund der insgesamt niedrigeren Expressionsrate der HEK-eH1 Klone wurde der Klon J3 der

HEK-hH1 Zellinie sowie der Klon 9 der HEK-eH1 Zellinie für weiterführende Studien ausgewählt (1429 vs 1304 fmol/mg Protein).

4.2 CHARAKTERISIERUNG DES EH1

4.2.1 PHARMAKOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DES EH1

Bei der Transfektion von HEK293-Zellen mit Plasmiden, die wie das pcDNA3.1 den CMV Promoter enthalten, wird die nachfolgende Transkription des künstlich eingeschleusten Proteins verstärkt. Auch hat sich die verwendete Ca-P-Transfektionsmethode in dieser Zellinie als geeignet bewiesen (Thomas und Smart, 2004).

Um auszuschließen, dass der H1R endogen in HEK293-Zellen vorkommt, wurden Sättigungsbindungen mit nicht transfizierten HEK293-Zellen und ^{3}H-Pyrilamin durchgeführt wurde, überprüft. Dabei konnten keine spezifischen Bindungen festgestellt werden.

Versuche von Shaw et al. (2002), zeigen, dass GPCR in HEK293-Zellen wichtige intrazelluläre Signalwege, wie Inositol-Phospholipid-Metabolismus und die Bildung des second messengers cAMP, stattfinden können. HEK293-Zellen exprimieren die AC-Isoformen: I, II, III, VI und VII (Premont, 1994; Hellevuo et al., 1993).

A) SÄTTIGUNGSBINDUNGEN/SCATCHARD PLOT

1. Analyse der Bindungsdaten

Zur Ermittlung von K_D und B_{max} durch eine lineare Regression muss die Bindungskurve in eine lineare Form gebracht werden. Die Linearisierung der Bindungsdaten basiert hierbei auf den Verfahren von SCATCHARD (Scatchard, 1949) für die Interaktion von Proteinen mit kleinen Molekülen. Der Scatchard-Plot ergibt sich aus der Auftragung der Konzentration des gebundenen Radioliganden (B) gegen den Quotienten aus gebundenem und freiem Radioliganden (B/F). Die Neigung der Geraden ergibt den negativ reziproken Wert der Dissoziationskonstante

($-1/K_D$). Der Schnittpunkt mit der Abszisse ergibt die Menge der Bindungsstellen (B_{max}). Die Daten wurden mit dem Computerprogramm Graphpad ermittelt.

2. Bestimmung der eH1 Bindungsparameter im Scatchard Plot

Die Bestimmung der Rezeptorendichte sowie deren Affinität zum Radioliganden erfolgte in Sättigungsexperimenten. Hierbei konnte die Rezeptorendichte auf der Zelloberfläche (B_{max}) und die Affinität für ^{3}H-Pyrilamin, ausgedrückt durch die Dissoziationskonstante $K_{D,}$ bestimmt werden. Wie in Materialien und Methoden erläutert, wurden die Versuche mit steigenden Konzentrationen an ^{3}H-Pyrilamin durchgeführt. Aus den Messwerten für die totale und die unspezifische Bindung wurde mittels nichtlinearer Regression der Kurvenverlauf für die spezifische Bindung von ^{3}H-Pyrilamin errechnet und daraus die B_{max} und K_D-Werte bestimmt. Für jeden Rezeptor wurden die Werte in mindestens 3 unabhängigen Versuchen ermittelt. In der folgenden Tabelle 4 sind die K_D und B_{max} - Werte zusammengestellt.

Tab. 4: Sättigungsexperimente mit ^{3}H-Pyrilamin am eH1 und hH1. Jeder der 9 Messpunkte je Sättigungskurve resultierte aus der Mittelung von Doppelbestimmungen.

Equiner H1:

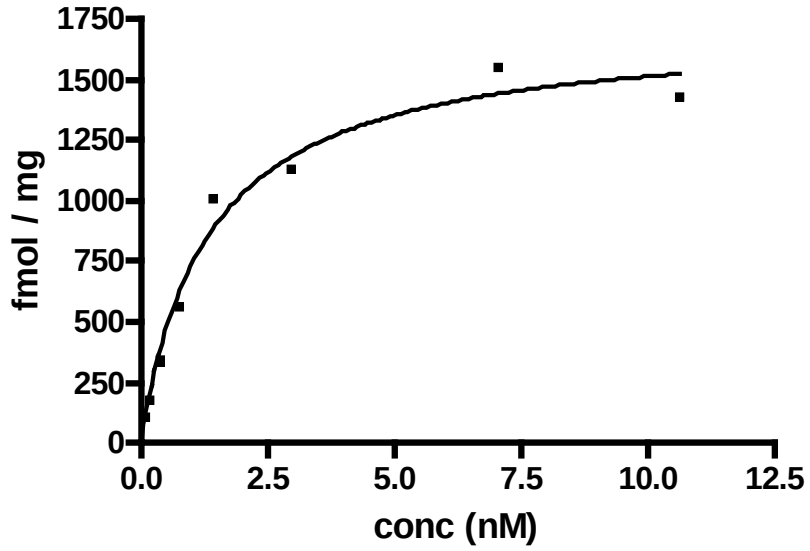
	Mittelwerte	**S.D.**
K_D	1,274 nM	0,612
B_{max}	1276 fmol/mg	379

Humaner H1:

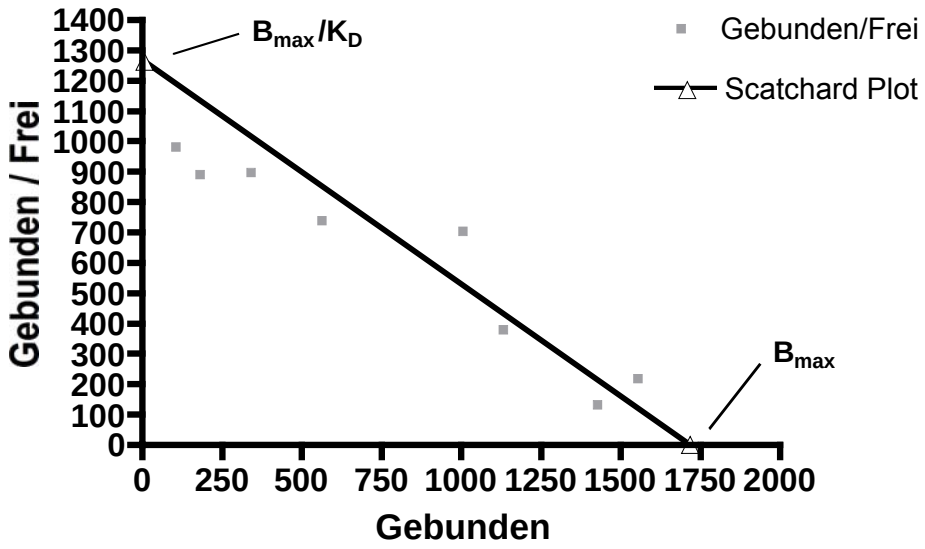
	Mittelwerte	**S.D.**
K_D	2,053 nM	0,861
B_{max}	2109 fmol/mg	829

Abb. 14: a) Repräsentative Sättigungsexperimente an Zellmembranen von stabil transfizierten HEK-eH1 Zellen. Der Kurvenverlauf stellt die spezifische Bindung (■) dar.
b) Darstellung der Ergebnisse im Scatchard Plot.

a)



b)



3. Sättigungsexperiment an isolierten Membranen aus equinem Lungengewebe

^{3}H-Pyrilamin wurde vielfach zum Nachweis von H1R in unterschiedlichen Geweben verwendet, darunter auch zum Nachweis in der glatten Muskulatur der Atemwege (Hill et al., 1997). Lungengewebe eines Pferdes wurde ca. 20 Min. nach der Euthanasie entnommen, auf Eis transportiert und bei -70 °C bis zur Herstellung von Zellmembranen eingefroren. Die präparierten Membranen wurden in einer Konzentration von 300 µg im Sättigungsexperiment eingesetzt. Der Versuch wurde dreimal wiederholt.

Tab. 5: Ergebnisse der Sättigungsexperimente an Membranen aus equinem Lungengewebe

	Bmax	**K_D**
Mittelwert	373 fmol/mg	1,420 nM
S.D.	144,561	1,268

B) HETEROLOGE VERDRÄNGUNGSEXPERIMENTE

Um das pharmakologische Profil von eH1 und hH1 in stabil transfizierten Zellinien genauer zu charakterisieren, wurden Verdrängungsexperimente mit unterschiedlichen Liganden durchgeführt. Hierbei wurden die IC_{50} bzw. K_i-Werte für die jeweiligen Liganden bestimmt. Neben dem natürlichen Agonisten Histamin wurden die inversen Agonisten Diphenhydramin und Chlorpheniramin untersucht, die im klinischen Alltag, sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin eingesetzt werden. Außerdem wurde der H2R Antagonist Cimetidin und der H3R Antagonist Thioperamid getestet. Die Ergebnisse der Verdrängungsexperimente stammen aus je 3-5 unabhängigen Versuchen und sind in Tabelle 6 dargestellt.

1. Histamin

Für Histamin existieren keine Unterschiede in der Affinität zwischen eH1 und hH1.

2. Diphenhydramin

Für das Ethanolaminderivat Diphenhydramin, ein Antihistaminikum der ersten Generation, konnte eine deutlich höhere Affinität (ca. 4-fach) zu hH1 im Gegensatz zu eH1 nachgewiesen werden.

3. Chlorpheniramin

Heterologe Verdrängungsstudien wurden ebenfalls mit dem Alkylaminderivat d-Chlorpheniramin, einem Antihistaminikum der 1. Generation, durchgeführt. Chlorpheniramin zeigte eine um das doppelte höhere Affinität zu hH1 im Vergleich zu eH1.

4. Cimetidin und Thioperamid

Ergänzend wurden die H2-Antagonisten Cimetidin sowie der H3R-Antagonist Thiperamid getestet. Beide Antihistaminika waren nicht in der Lage, ^{3}H-Pyrilamin sowohl vom eH1 als auch vom hH1 zu verdrängen.

.

Tab. 6: Zusammenstellung der Daten aus den Verdrängungsversuchen an eH1 und H1. Die Liganden wurden in Konzentrationen zwischen 0,1 und 20 nM eingesetzt.. Die Werte wurden mit dem Computerprogramm Graphpad Prism™ errechnet.

HISTAMIN		
Equiner H1:	**EC_{50} (nM)**	**K_i (nM)**
Mittelwerte:	**9520**	**3901**
S.D.	**(1773)**	**(726)**
Humaner H1	**EC_{50} (nM)**	**K_i (nM)**
Mittelwerte:	**7582**	**3957**
S.D.	**(1457)**	**(760)**

DIPHENHYDRAMIN		
Equiner H1:	**EC_{50} (nM)**	**K_i (nM)**
Mittelwerte:	**73,8**	**30,3**
S.D.	**(58)**	**(24)**
Humaner H1	**EC_{50} (nM)**	**K_i (nM)**
Mittelwerte:	**15,2**	**8**
S.D.	**(9)**	**(5)**

CHLORPHENIRAMIN		
Equiner H1:	**EC_{50} (nM)**	**K_i (nM)**
Mittelwerte:	**20,6**	**9,3**
S.D.	**(27)**	**(11)**
Humaner H1	**EC_{50} (nM)**	**K_i (nM)**
Mittelwerte:	**7,4**	**4,2**
S.D.	**(6)**	**(3)**

Abb. 15: **Verdrängungkurve von Chlorpheniramin an eH1 und hH1. Repräsentatives Ergebnis aus 3 Versuchen.**

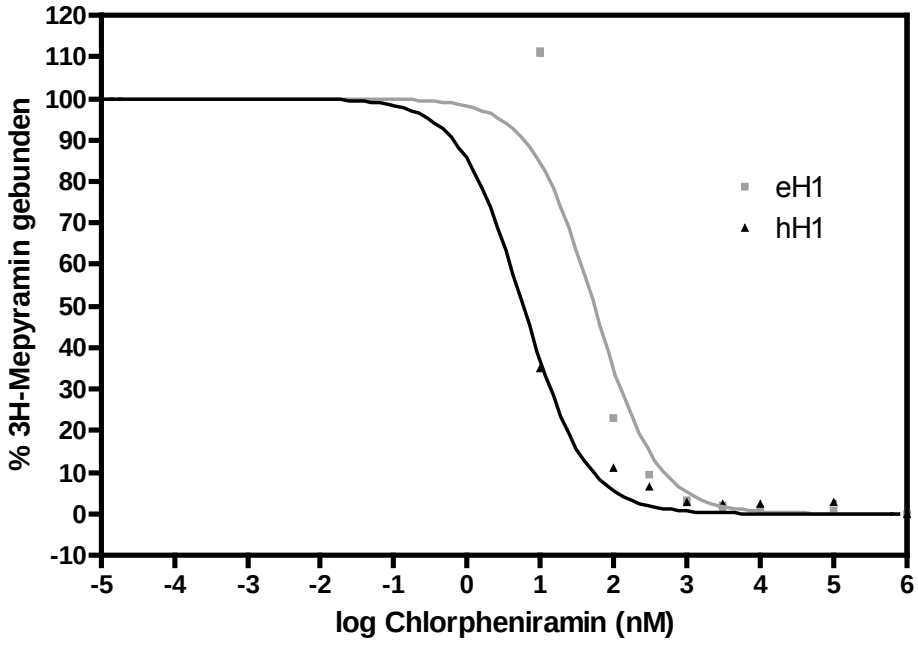
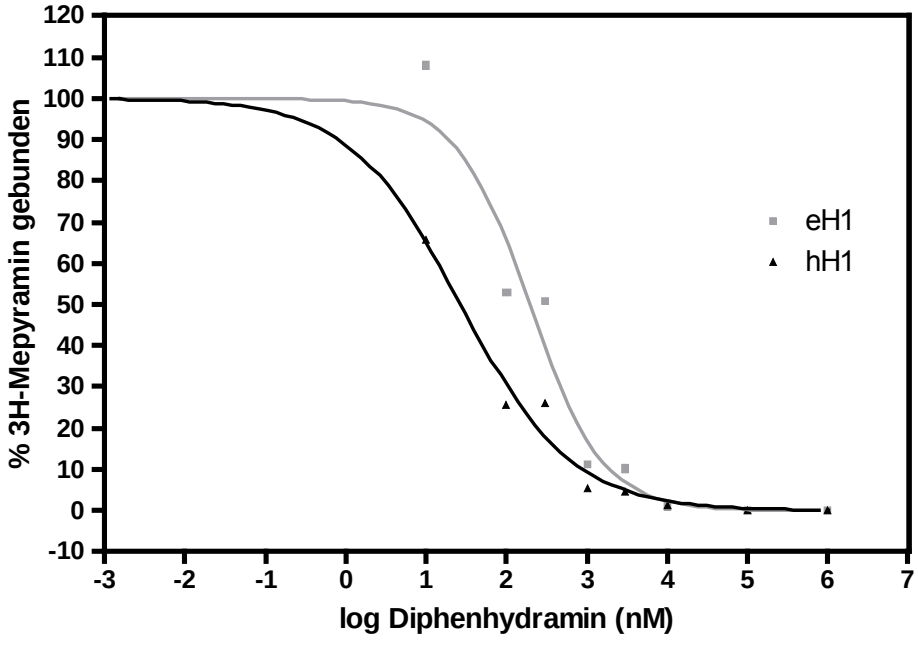


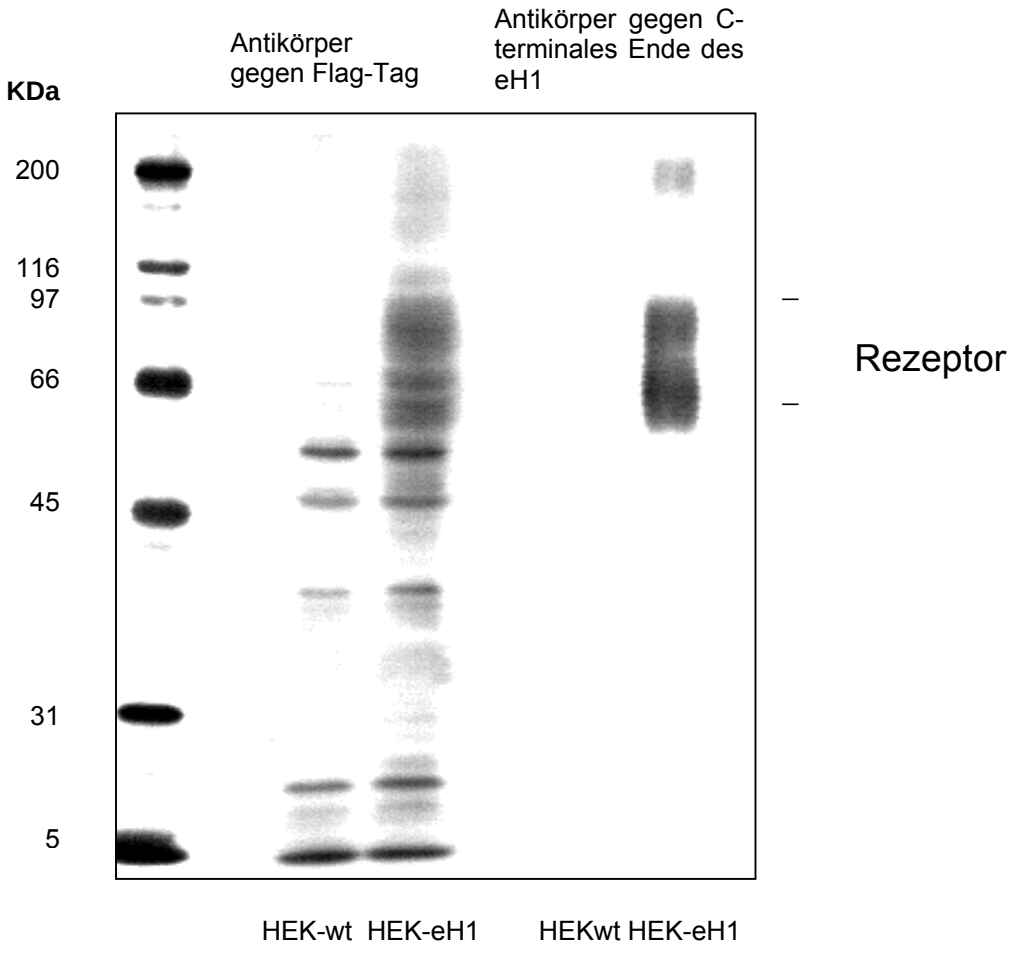
Abb. 16: **Verdrängungskurve von Diphenhydramin an eH1 und hH1. Repräsentatives Ergebnis aus 4 Versuchen.**



4.2.2 BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DES EH1 IM WESTERNBLOT

Zur Bestimmung des Molekulargewichts des translatierten Proteins wurden Membranen von HEK-wt und HEK-eH1 Zellen einer Westernblot-Analyse unterzogen. Dabei wurden die Rezeptoren entweder mit einem Antikörper gegen das N-terminale Flag-Epitop oder gegen den C-Terminus des klonierten Rezeptors nachgewiesen. Beide Antikörper erkennen zwei breite Banden bei ca. 60 und 80 kDa, die dem glykosylierten Rezeptor entsprechen.

Abb. 17: Immunologischer Nachweis des eH1 nach Expression in HEK293 Zellen.



4.2.3 FUNKTIONELLE EFFEKTE DES EH1

A) REGULATION DER ADENYLYZYKLASE DURCH HISTAMIN

HEK293-Zellen enthalten endogen 5 verschiedene Isoformen der Adenylyzyklase (I, II, III, VI und VII), die über verschiedene Regulatoren, wie z.B. G-Proteine, Proteinkinasen, Ca^{2+}, und Calmodulin unterschiedlich reguliert werden können. Bisher ist noch nicht geklärt, über welches G-Protein die Stimulation der AC über den H1R vermittelt wird (Hill et al., 1997).

In den HEK293-wt-Zellen konnte keine Regulation der intrazellulären cAMP-Produktion durch Histamin, Diphenhydramin und Cimetidin nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass Histamin indirekt über muskarinerge Rezeptoren in die AC-Regulation eingreift (Thomas und Smart, 2004), wurde Atropin (1 µM), an HEK-wt, HEK-eH1 und HEK-hH1 getestet. In keinem Fall wurde die cAMP-Produktion beeinflußt.
Auch der H2-Antagonist Cimetidin zeigte in einer Konzentration von 10 µM keine Wirkung, sowohl an HEK-eH1 als auch an HEK-hH1.

Die Stimulation der stabil mit eH1 bzw. hH1 transfizierten HEK293-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Histamin führte zu einer dosisabhängigen Zunahme der cAMP-Produktion, die bei eH1 deutlich stärker ausgeprägt war als bei hH1. So zeigte Histamin in der Konzentration 100 µM am eH1 eine 33-fache Erhöhung, wohingegen dieselbe Histaminkonzentration am hH1 lediglich eine Erhöhung um das 2,3-fache des Basalwertes bewirkte. Auch bei einer Histaminkonzentration von 10 µM war die cAMP-Akkumulation durch eH1 noch um das 16,4-fache im Vergleich zum 1,5-fachen des hH1 erhöht. Bei Stimulation mit 1 µM Histamin zeigte der eH1 immer noch einen Anstieg von cAMP um das 4,6-fache, wohingegen beim hH1 eine Erhöhung um das 0,65-fache stattfand (Abb. 18). In HEK-wt konnte mit den gleichen Histaminkonzentrationen keine Stimulation cAMP-Produktion nachgewiesen werden.

B) ERHÖHUNG DER FORSKOLININDUZIERTEN STIMULATION VON CAMP

Die Erhöhung der Forskolin induzierten cAMP-Akkumulation an eH1und hH1, die bereits von Daum et al. (1982), Donaldson et al. (1988), und Leurs et al. (1994a) an hH1 gezeigt wurde, konnte auch in unseren Experimenten bestätigt werden. So konnte die endogene cAMP-Akkumulation mit Forskolin (1 µM) durch Zugabe von Histamin in verschiedenen Konzentrationen (1; 10; 100 µM) deutlich verstärkt werden (Abb. 19).

Forskolin stimulierte Zellen zeigten im Vergleich zu Zellen, die zusätzlich noch mit dem H1-Antagonist Diphenhydramin in einer Konzentration von 100 µM behandelt wurden keinen Unterschied in der cAMP-Produktion.

Abb. 18: Stimulation von cAMP durch verschiedene Konzentrationen von Histamin (His)

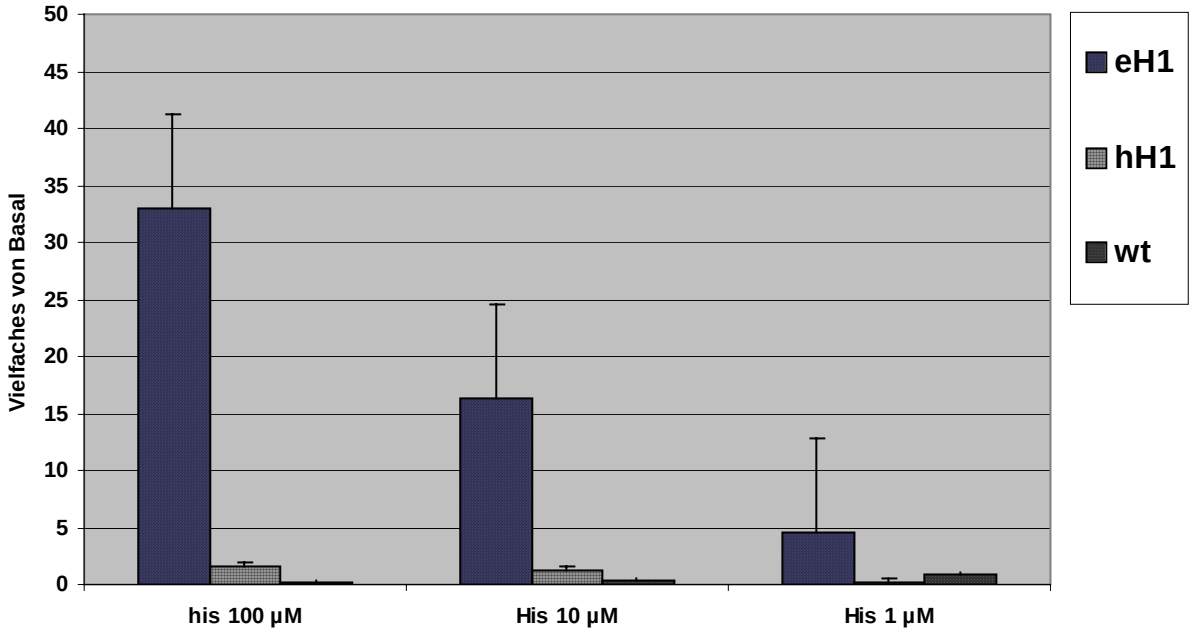
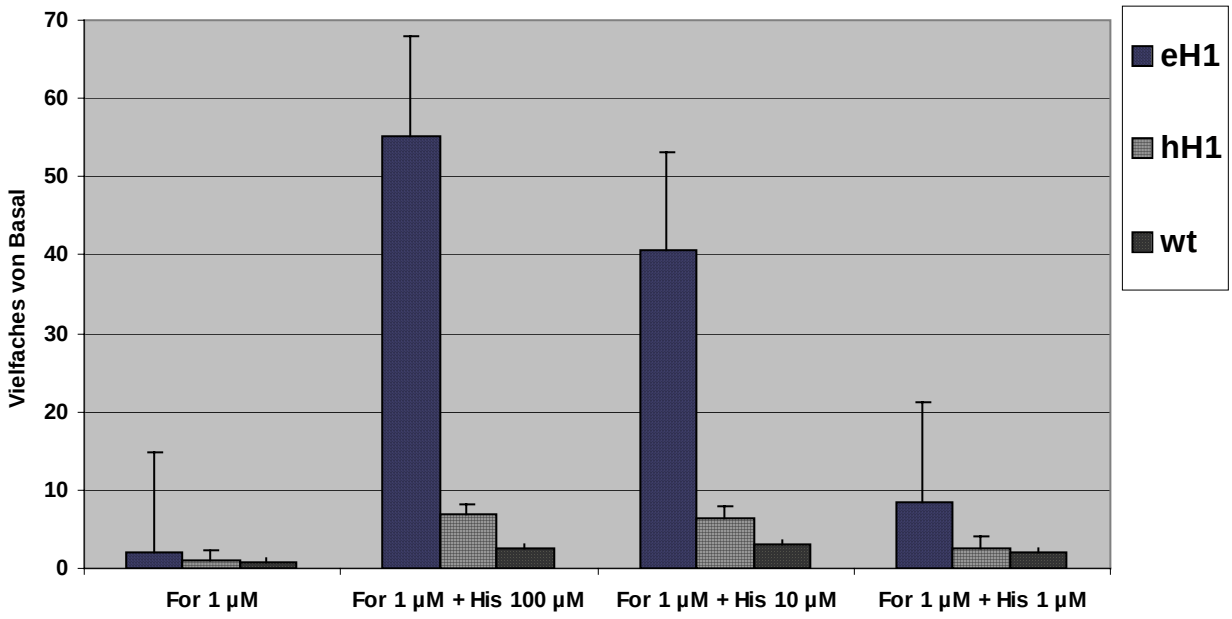


Abb. 19: Forskolininduzierte Stimulation von cAMP in HEK-eH1, HEK-hH1 und HEK-wt.



C) UNTERSUCHUNGEN ZUR REZEPTORREGULATION MITTELS KONFOKALER MIKROSKOPIE

1. Nachweis der Membranlokalisation des eH1

In allen Aufnahmen war die Membranlokalisation der eH1 deutlich zu erkennen. Um die Funktionalität des in HEK-Zellen exprimierten eH1 zu untersuchen, wurden HEK-Zellen mit der cDNA eines eH1-EGFP-Fusionsproteines transfiziert und im konfokalen Mikroskop mit Histamin stimuliert. Die Verwendung von GPCR in EGFP-Vektoren zur Translation in HEK293-Zellen mit anschließender Untersuchung am konfokalen Mikroskop wurde bereits von Weill et al. (1999) gezeigt. Im Rahmen der Untersuchungen am konfokalen Mikroskop muss darauf hingewiesen werden, dass lediglich subjektive Aussagen über die Regulation von Rezeptoren getroffen werden können. Die Abbildungen stellen repräsentative Aufnahmen für die jeweiligen Behandlungen dar.

2. Regulation des eH1 unter dem Konfokalen Mikroskop

Der Effekt von Histamin sowie den inversen Agonisten Diphenhydramin, Loratadin und Chlorpheniramin auf die Regulation von Zelloberflächenrezeptoren wurde im konfokalen Mikroskop ermittelt. Die abgebildeten Aufnahmen wurden mit maximal effektiven Ligandenkonzentrationen angefertigt.

2.1 Der Agonist Histamin

Die Zugabe von Histamin zum Kulturmedium bewirkte eine deutliche Internalisierung des eH1 innerhalb weniger Minuten. Wurden die Zellen dagegen längerfristig mit Histamin behandelt, so kehrten die internalisierten Rezeptoren innerhalb eines Zeitraums von ca. 30 Min. wieder an die Oberfläche zurück (Abb.: 20,A1-A2). Die schwächere Fluoreszenz der Abb. A2 ist durch das mehrmalige Scannen der Bilder bedingt. Untersuchungen an hH1 transfizierten HEK293-Zellen ergaben vergleichbare Ergebnisse.

2.2 Inverse Agonisten

Zusätzlich zur Auswirkung von Histamin wurden die inversen Agonisten Diphenhydramin, Chlorpheniramin und Loratadin untersucht. Der Effekt des inversen Agonisten wurde auf verschiedene Weise getestet: wurden Zellen mit Histamin stimuliert und nach ca. 10 Min. der inverse Agonist zugegeben. Unter diesen Bedingungen konnte nur ein geringer Einfluss auf die Histamin-vermittelte Rezeptorinternalisierung beobachtet werden. Wurden die Zellen dagegen zuerst mit dem inversen Agonisten und nachfolgend mit Histamin behandelt, konnte die Abnahme von Oberflächenrezeptoren durch Histamin unterbunden werden. Dabei konnte eine stärkere Wirkung von Diphenhydramin im Vergleich zu Chlorpheniramin beobachtet werden.

A) Diphenhydramin

Bei der Stimulation der HEK-eH1 mit Histamin zeigte sich eine deutliche Rezeptorinternalisierung. Die nachfolgende Zugabe von Diphenhydramin (10 µM) konnte die Internalisierung nicht vollständig, aber dennoch sichtbar, innerhalb von etwa acht Minuten rückgängig machen (Abb. 20, C1-C3). Wurde zuerst Diphenhydramin (100 µM) und nach etwa 5 Min. Histamin (20 µM) zugegeben, so

war eine Rezeptorinternalisierung nach Zugabe von Histamin schwächer bis garnicht zu erkennen (Abb.: 20, D1-D3).
Vergleichbare Ergebnisse wie an den abgebildeten eH1 wurden auch am hH1 festgestellt.

B) Chlorpheniramin

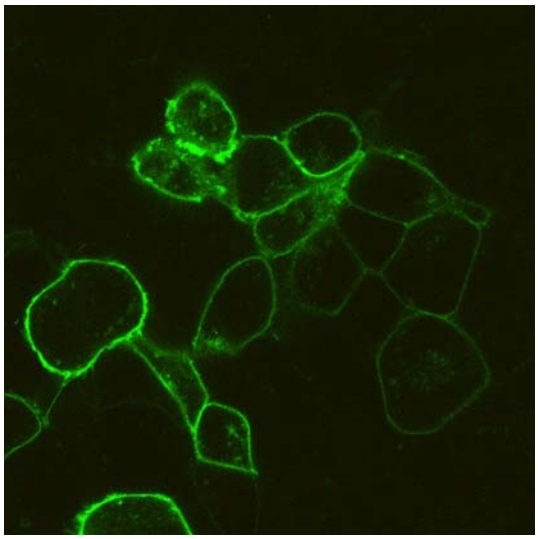
Vergleichbar mit den Ergebnissen von Diphenhydramin zeigte sich, dass bei einer vorangehenden Zugabe von Chlorpheniramin eine Rezeptorinternalisierung durch Histamin aufgehoben wird (Abb. 20, B1-B3). Wurde zuerst Histamin verabreicht, so konnte eine anschließende Gabe von Chlorpheniramin in einem Zeitraum von 10 Min. nach anfänglicher Histaminzugabe über eine Zeitspanne von 15 Min. keine wesentlichen Änderungen hervorrufen.

C) Loratadin

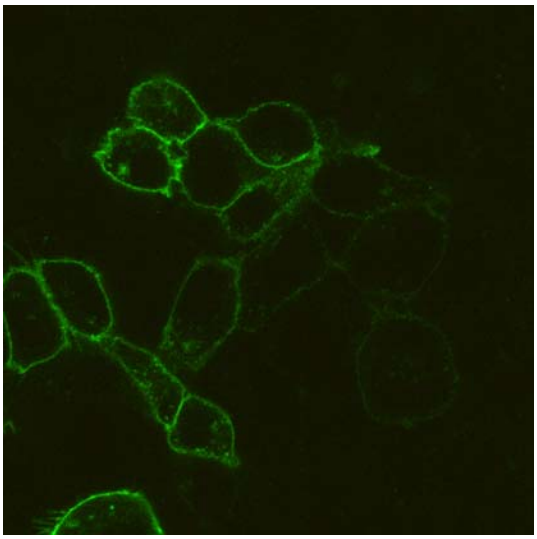
Loratadin war der einzige verwendete Ligand, der nur in DMSO löslich war. Eine anfänglich hochkonzentrierte Lösung in DMSO und anschließende Verdünnung mit Wachstumsmedium führte wiederum zum Ausfallen der Substanz. Die Zugabe von Loratadin in DMSO oder DMSO alleine führte zu einem abgerundeten Aussehen der Zellen. Deshalb wurden diese Bilder nicht in die Auswertung der Ergebnisse einbezogen.

D) Cimetidin

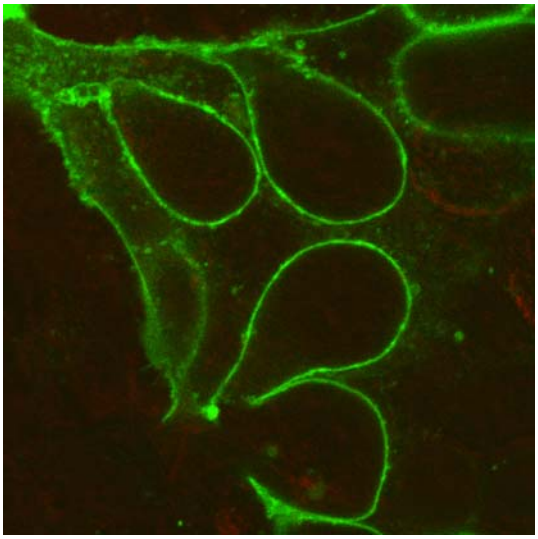
Die Zugabe des H2R-Liganden Cimetidin (10 µM) hatte keinen Effekt auf die Zellen.



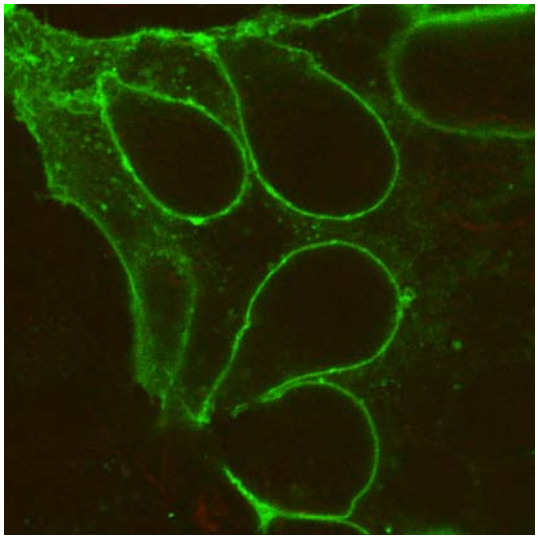
A1. Zellen vor Versuchsbeginn



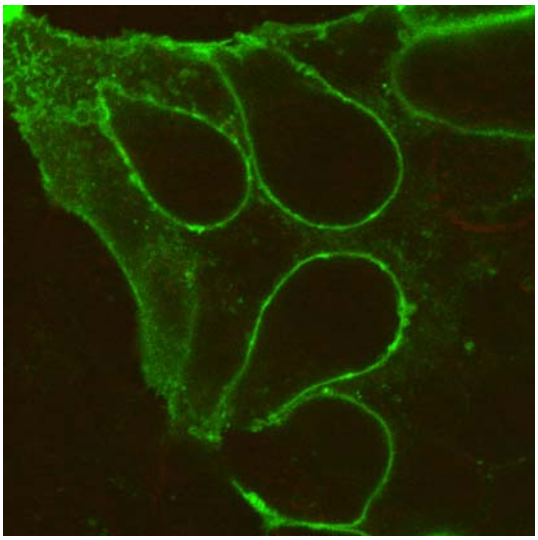
A2. 30 Min. nach Zugabe von Histamin (20 µM) . Der Basalzustand hat sich nahezu vollständig wiederhergestellt.



B1. Zellen im basalen Zustand

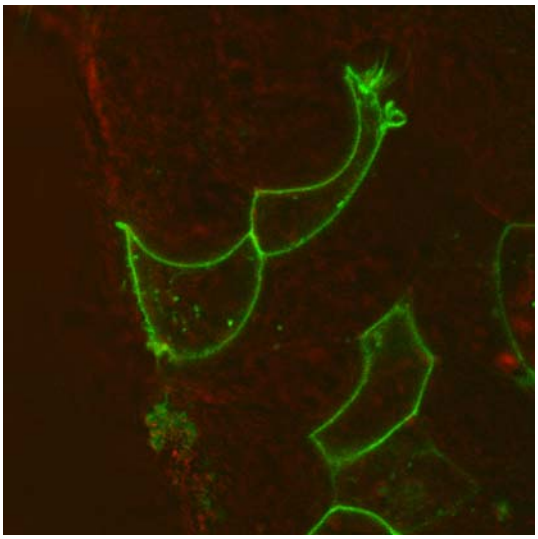


B2. 10 Min. nach Zugabe von Chlorpheniramin (20 µM)

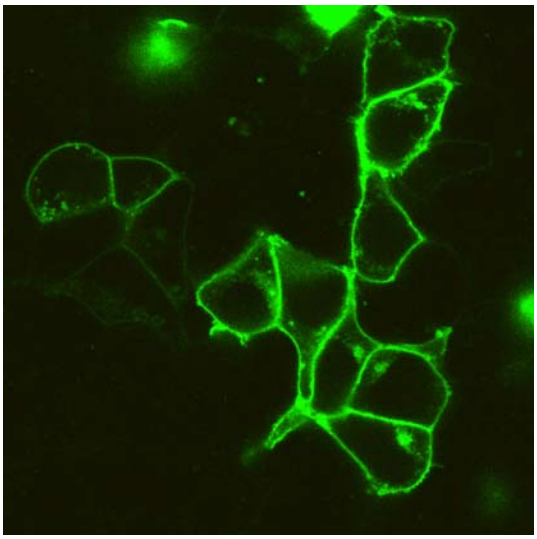


B3. 5 Min. nach zusätzlicher Zugabe von Histamin

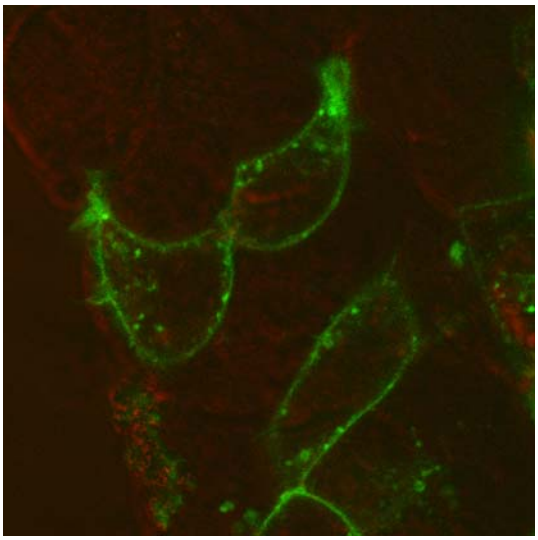
Abb. 20; S.86/87:
HEK293-Zellen stabil transfiziert mit dem eH1-EGFP-Fusionsprotein. Aufnahmen am Konfokalen Lasermikroskop.



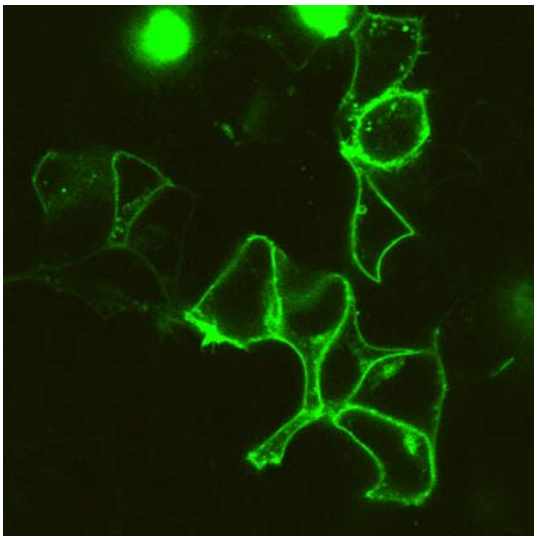
C1. Zellen vor Versuchsbeginn



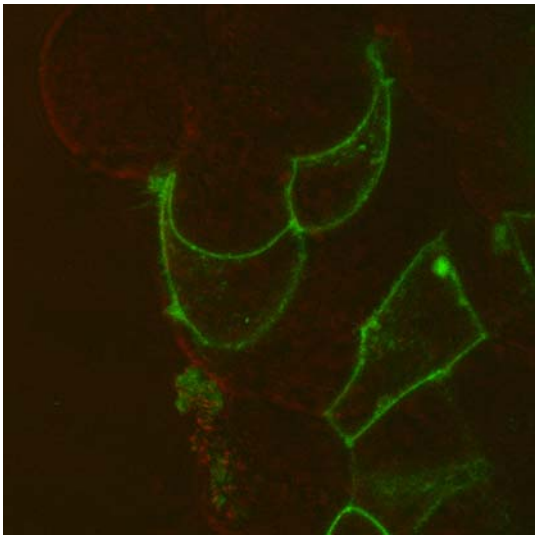
D1. Zellen vor Versuchsbeginn



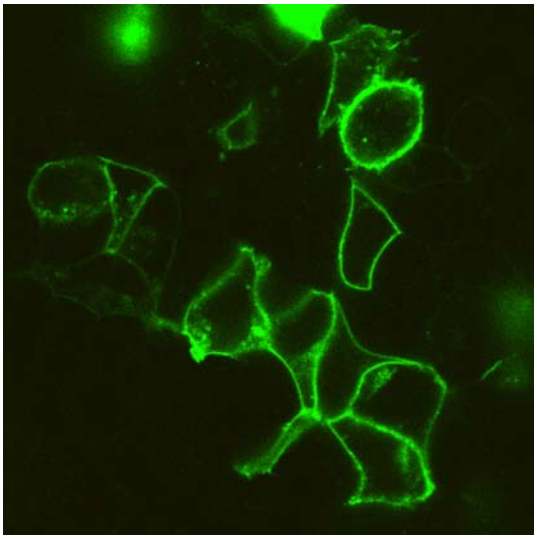
C2. 6 Min. nach Zugabe Histamin (20 µM)



D2. 5 Min. nach Zugabe von Diphenhydramin (100 µM)



C3. Nach 10 Min. Stimulation mit Histamin (20µM) und anschließender Diphenhydramin-Zugabe, 8 Min. (100 µM)



D3. Nach 10 Min. Zugabe von DPH und anschließender Histamin-Zugabe 10 Min. (20 µM)

5. Diskussion

Um die Rolle des H1R im Allergiegeschehen zu erfassen, ist die Verfügbarkeit des klonierten Rezeptors unerlässlich. Sie ermöglicht eine speziesvergleichende Untersuchung der H1R-Sequenzen und kann in Verbindung mit deren pharmakologischen Eigenschaften Rückschlüsse auf die Bedeutung einzelner Aminosäuren in Bezug auf deren Lage und Anordnung geben. Es kann die dreidimensionale Struktur des Rezeptors erstellt werden, die im Rahmen des „Drug Screenings“ für die Identifizierung und Entwicklung neuer, wirkungsvollerer Antihistaminika Voraussetzung ist.

Durch Vergleich mit bereits bekannten H1R-Sequenzen anderer Spezies können wertvolle Einblicke in speziesspezifische Bindungseigenschaften von Antihistaminika bzw. H1R-induzierte Signalwege ermöglicht werden. So zeigt z.B. der H1R des Meerschweinchens, der oftmals für vergleichende Studien herangezogen wird, bedeutende speziesspezifische Unterschiede in der Wirkung von Histamin-Analoga und Antihistaminka im Vergleich zum hH1 (Chang et al., 1979; Seifert et al., 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der eH1-Rezeptor erstmals kloniert und damit der Grundstein für weiterführende Studien zum Allergiegeschehens beim Pferd geschaffen. Der klonierte Rezeptor kann darüber hinausgehend wertvolle mechanistische Einblicke in die Wirkung von Histamin auf zellulärer Ebene liefern.

Da der Atmungsapparat des Pferdes in seinen anatomischen und physiologischen Grundlagen demjenigen des Menschen ähnlich ist und die chronisch obstruktive Bronchitis (COB) des Pferdes sowohl Merkmale des Asthma bronchiale als auch der humanen chronisch-obstruktiven Lungenkrankheit (COPD) des Menschen aufweist, wird das Pferd als mögliches Modell für die humane Asthma- und COPD-Forschung gesehen (Doucet et al., 1991; Robinson, 2000). Für die Verwendbarkeit des Modellsystems könnte die Wirkung von Histamin am eH1 von ausschlaggebender Bedeutung sein. Bislang wurden bereits mehrere Zytokine des Pferdes kloniert und erste Studien damit bestätigten eine große Ähnlichkeit zwischen dem equinen und humanen Immunsystem (Reed et al., 2004).

5.1 ANTIHISTAMINIKA UND IHRE VERWENDUNG IN DER HUMAN- UND PFERDEMEDIZIN

Die Angaben über Auswahl und Dosierung von Antihistaminika beim Pferd variieren in der Literatur teils erheblich. Häufig genannte Wirkstoffe sind Hydroxizin, Chlorpheniramin und Diphenhydramin. Auch Pyrilamin kommt in eingeschränktem Umfang zum Einsatz (Scott et al., 2003; Robinson, 2003b). Entsprechend dieser klinischen Anwendung wurden als Liganden die Antihistaminika Chlorpheniramin und Diphenhydramin für die durchgeführten Studien gewählt. Da die erwähnten Liganden ebenfalls in der Humanmedizin zur Anwendung kommen, wurde für die vergleichenden Studien der *humane* Histamin H1 Rezeptor herangezogen.

5.2 DETEKTION DER EH1-SEQUENZ

Bei der Blutprobennahme wurde darauf geachtet, dass den Pferden innerhalb der letzten vier Wochen keine Antihistaminika bzw. Glukocorticoide verabreicht wurden und keine Allergien bekannt waren, die durch Einfluß auf die mRNA-Expression die Ergebnisse verfälschen könnten.

Für die Identifizierung der eH1-Sequenz bot sich die RT-PCR als Klonierungsstrategie an. Sie besitzt den Vorteil einer hohen Sensitivität und kann mithilfe von degenerierten Primern, die von bekannten H1R-Sequenzen anderer Spezies abgeleitet wurden, effektiv durchgeführt werden. Für die Ableitung der Primer wurden konservierte Bereiche der entsprechenden Nukleinsäuresequenzen von Mensch, Hund, Rind, Ratte und Maus verwendet, die unter allen in der Gendatenbank eingetragenen H1R-Sequenzen den höchsten Verwandschaftsgrad versprachen. Da selbst in den hochkonservierten Regionen speziesspezifische Varianten auftraten, mußten degenerierte Primer mit unbekannten Bindungs-eigenschaften für die PCR der inneren Teilsequenz ausgewählt werden.

5.3 KLONIERUNGSSTRATGIE

Grundsätzlich können mit den verwendeten PCR-Methoden lediglich qualititative Aussagen über das Vorhandensein einer spezifischen mRNA gemacht werden. Aufgrund der verschiedensten Einflüsse kann aus der Menge der vervielfältigten PCR-Produkte kein Rückschluß auf die Quantität der ursprünglich vorgelegenen mRNA gezogen werden (Siebert, 1993).

Nachdem mit den degenerierten Primerpaaren eine erste innere Teilsequenz des eH1 kloniert werden konnte, wurden die noch fehlenden 3'- und 5'-Sequenzabschnitte unter Zuhilfenahme der RACE-PCR identifiziert (Frohman et al., 1988; Frohman und Martin, 1989). Aus den drei zusammen gesetzten Teilstücken wurde die cds ermittelt, sequenzspezifische Primer abgeleitet und damit die vollständige cds erneut kloniert. Durch Abgleich der kompletten cds mit den zusammen gesetzten Teilstücken konnte die Sequenz verifiziert werden.

Beim Abgleich der mittels Doppelstrangsequenzierung gewonnenen cds zeigten sich in drei Fällen Abweichungen von den vorherigen drei Teilsequenzen an. Diese könnten mit der Lesegenauigkeit der Gotaq®-DNA Polymerase erklärt werden, die vereinzelt Fehler einbauen kann. Ebenso könnten aber auch durch Verunreinigung der PCR-Produkte bei der Sequenzierung Abweichungen entstehen. In diesen Fällen wurden Ergebnisse früherer Einzelstrangsequenzierungen miteinbezogen, die ein eindeutiges Ergebnis erbrachten. Außerdem wurde die Reinheit des Produktes und damit die Wahrscheinlichkeit der Lesegenauigkeit bei der Interpretation der Sequenzierungsdaten berücksichtigt.

5.4 CHARAKTERISIERUNG DER TRANSLATIERTEN EH1-SEQUENZ

Bei der Translation des eH1 wurde das zweite Startcodon (ATG) an Stelle bp70 bis 72 gewählt, das ein Protein mit hoher Homologie zu H1R-Sequenzen anderer Spezies erzeugte. Das zweite ATG dient ebenfalls in der H1R-Sequenz von Mensch und Maus als Startstelle für die Translation.
Das translatierte eH1-Protein zeigte eine hohe Homologie zum klonierten hH1 bezüglich der transmembranen Bereiche, die für die Ligandenbindung von

besonderer Bedeutung sind: TM2 – die vor kurzem als möglicher Bestandteil der Ligandenbindungstasche vorgeschlagen wurde (Bruysters et al., 2005), zeigte eine 93,3 %ige Übereinstimmung zwischen beiden Spezies. TM3 ist sogar vollständig homolog. In TM4 befindet sich lediglich eine Aminosäurensubstitution (95,6% Homolgie). In TM5 sind zwei Aminosäuren unterschiedlich (92,3 % Homologie), während die 31 Aminosäuren in TM6 wiederum identisch sind. Zusammengefasst beträgt die Homologie sämtlicher TM-Bereiche 96,4 %, was auf geringfügie Unterschiede im pharmakologischen Verhalten der Rezeptoren hinweisen könnte.

Für den hH1 wurden für die Ligandenbindung verantwortliche Aminosäuren bereits bestimmt. So wurde Aspartat (Asp) 107 als Teil der Bindungstasche für Agonisten und Antagonisten identifiziert (Ohta et al., 1994; Moguilevsky et al. 1998; Nonaka et al., 1998; Bruysters et al., 2004). Diese Aminosäure ist beim eH1 konserviert und ist daher höchstwahrscheinlich an der Ligandenbindung beteiligt. Der in TM3 befindliche Asp-Rest ist in allen aminergen GPCR hoch konserviert und für die Bindung des protonierten Stickstoffs aminerger Liganden verantwortlich (Shi und Javitch, 2002).

Auch alle anderen Aminosäuren, die als Teil der Bindungstasche für Histamin identifiziert wurden, sind im eH1 hochkonserviert:

- Tryptophan (Trp) 158 in TM4 (Wieland et al.,1999)
- Lysin (Lys) 191 in TM5 (Leurs et al.,1995; Moguilevsky et al., 1998; Wieland et al., 1999)
- Asparagin (Asn) 198 in TM5 (Leurs et al., 1994b; Ohta et al., 1994; Moguilevsky et al., 1995; Bruysters et al., 2004)
- Phenylalanin (Phe) 432 in TM6 (Wieland et al., 1999; Bruysters et al., 2004) Phe435 in TM6 (Bruysters et al., 2004)

Die Aminosäuren Trp158 und Phe432 sitzen tiefer in der Bindungstasche und sind neben der Histaminbindung auch für die Antagonistenbindung von Bedeutung.

Aus diesen strukturellen Übereinstimmungen kann abgeleitet werden, dass der eH1 in seinen Histamin-Bindungseigenschaften keinen Unterschied zum hH1 aufweisen dürfte. Diese Annahme stimmt mit den Ergebnissen unserer

Radioligandenbindungsstudien überein. Das Fehlen struktureller Unterschiede in der Ligandenbindungstasche schließt nicht aus, dass individuelle pharmakologische Unterschiede aufgrund von Polymorphismen in diesem Bereich existieren könnten. Entsprechende Rezeptor-Isoformen wurden beim Menschen bereits in Betracht gezogen (Smit et al., 1999). Die Existenz analoger eH1-Subtypen könnte als möglicher Erklärungsansatz für individuelle Wirkunterschiede der Antihistaminika dienen. Eine entsprechende pharmakologische Heterogenität des H1R wurde bereits für andere Spezies beschrieben (z.B. Chang et al., 1979; Seifert et al., 2003).

Der 3.IL ist für die Rezeptorfunktion von entscheidender Bedeutung (G-Protein-Kopplung). Dabei sind die Serin (Ser) - und Threonin (Thr)-resten in der 3.IL für die Phosphorylierung und Desensibilisierung des Rezeptors wichtig. In diesem Abschnitt finden sich beim eH1 im Vergleich zum hH1 eine Vielzahl an Substitutionen: Insgesamt verfügt die equine Sequenz über weniger Ser- (eH1: 19 / hH1: 23) und Thr-reste (eH1: 6 / hH1: 10). Für den hH1 wurden die exakten Phosphorylierungsstellen untersucht. Horio et al. (2004) beschrieben fünf mögliche Aminosäuren (Thr140, Thr142, Ser396, Ser398 und Thr478), basierend auf den Ergebnissen von „Site Directed Mutagenesis“ *in vitro* – Studien. Dabei scheinen Thr140 und Ser398 entscheidend zur „Downregulation“ beizutragen. Obwohl diese Aminosäuren beim Pferd konserviert sind könnte die absolute Abnahme an potentiellen Phosphorylierungsstellen beim eH1 Auswirkungen auf die Desensibilisierung des Rezeptors haben. Dies erscheint insofern plausibel, da G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen sämtliche Ser- und Thr-Reste unabhängig von ihrem Kontext phosphorylieren können.

5.5 EXPRESSION VON EH1 UND HH1 IN HEK293-ZELLEN

In der Literatur wurden verschiedene Zellinien zur Untersuchung von H1R herangezogen. So sind Sf9-Zellen (Spodoptera frugiperda-Insektenzellen), CHO-Zellen („Chinese Hamster Ovary“-Zellen), Humane U373 MG Astrocytoma Zellen oder auch COS-7 Zellen (Nierenzelllinie von Grünen Meerkatzen) beschrieben (Seifert et al., 2003; Moniri und Booth, 2004; Hishinuma und Ogura, 2000).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten HEK293-Zellen wurden ebenfalls bereits zur Untersuchung des H1R herangenommen (z.B. Iwata et al., 2005). Sie besitzen alle für die untersuchten Signalwege des H1R wichtigen Bestandteile und stellen daher ein adäquates Zellsystem für funktionelle Untersuchungen des H1R dar.

5.6 BINDUNGSEIGENSCHAFTEN DES EH1

Die pharmakologische Charakterisierung von GPCR erfolgt durch Radioligandenbindung. Die Auswahl der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden orientierte sich an früheren Arbeiten über H1R-Rezeptoren (Seifert et al., 2003).

5.6.1 SÄTTIGUNSBINDUNGEN

Zur Bestimmung der Affinität des radioaktiv markierten Pyrilamins zum H1R wurden Sättigungsexperimente durchgeführt. Für den klonierten eH1 wurde dabei ein K_D-Wert für ^{3}H-Pyrilamin von 1,3 nM ermittelt. Dieser bewegt sich im Rahmen der in dieser Arbeit für den klonierten hH1 bestimmten Wert von 2,1 nM. Vergleichbare K_D-Werte für den hH1 (4,5 nM; 1,0 nM; 1,2 nM) wurden bereits von Seifert et al. (2003), Chang et al. (1978) und De Backer et al. (1993) bestimmt. Untersuchungen zur K_D von ^{3}H-Pyrilamin am H1R weiterer Spezies erbrachten ebenfalls Affinitäten von 1-4 nM (Chang et al., 1978).

Die Affinität von ^{3}H-Pyrilamin zum endogenen eH1 wurde in Radioligandenbindungsstudien an equinem Lungengewebe untersucht. Dabei wurde eine K_D von 1,4 nM ermittelt, die mit der des klonierten eH1 nahezu übereinstimmt. Dies weist darauf hin, dass bezüglich der Bindungseigenschaften für den Radioliganden ^{3}H-Pyrilamin der klonierte eH1 dem endogen exprimierten Rezeptor entspricht.

5.6.2 HETEROLOGE VERDRÄNGUNGSSTUDIEN

Durch heterologe Verdrängungsstudien kann die Affinität verschiedener Agonisten und Antagonisten am Rezeptor bestimmt werden. Für Histamin konnte dabei kein

Unterschied zwischen eH1 und hH1 beobachtet werden, was mit der konservierten Ligandenbindungsstelle an beiden Rezeptoren erklärbar ist.

Im Gegensatz dazu zeigten die Antagonisten Chlorpheniramin und Diphenhydramin eine wesentlich niedrigere Affinität für den eH1 im Vergleich zum hH1 (2,2- bzw. 3,8-fach). Dieser Unterschied ist auf den ersten Blick überraschend, da die bisher für den hH1 beschriebenen Aminosäuren für die Antagonistenbindung beim Pferd konserviert sind. Allerdings existieren verschiedene Aminosäuresubsitutionen in den TM-Domänen, die ebenso an der Bildung der Ligandenbindungstasche beteiligt sind. Die niedrigere Affinität der Antagonisten am eH1 könnte somit eine Erklärung für ihre eingeschränkte klinische Wirksamkeit beim Pferd darstellen. Um äquivalente Wirkungen zu erzielen, würden höhere Dosierungen erforderlich werden, die wiederum mit einer Zunahme an Nebenwirkungen, z.B. der sedativen Wirkung, einher gehen.

5.7 REGULATION DER CAMP-PRODUKTION DURCH HISTAMIN

Die Mechanismen, die zur Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel via H1R beitragen, sind nach wie vor unbekannt. So beschreiben Marley et al. (1991) eine H1R-vermittelte Stimulation der intrazellulären cAMP-Produktion in Gehirn und Nebennieren durch intrazelluläres Ca^{2+} und PKC. Im Gegensatz dazu konnten Leurs et al. (1994a) und Maruko et al. (2005) keine Beteiligung von Ca^{2+} und PKC an der Histamininduzierten Erhöhung cAMP-Akkumulation in CHO-H1R Zellen zeigen. Maruko et al. (2005) zeigten dagegen alternativ eine Stimulation der AC über freigesetzte $G_{\alpha q}$- und $G_{\beta\gamma}$-Untereinheiten auf. Da in unseren Experimenten Cimetidin keinen Einfluß auf die intrazelluläre cAMP-Produktion hatte, scheidet eine $G_{\alpha s}$-vermittelte Aktivierung der AC über H2R aus.

Eine unseren Ergebnissen vergleichbare Stimulation der cAMP-Produktion durch H1R wurde bereits in verschiedenen Zellinien und Gewebe beschrieben (Garbarg und Schwartz, 1988; Moniri und Booth, 2006). Sie zeigt, dass der klonierte eH1 funktionell aktiv ist. Im Vergleich zum hH1 stimuliert der eH1 die AC allerdings signifikant stärker (33- vs 2,2-fach). Die Ursachen hierfür könnten methodisch (Unterschiede in der Rezeptorexpression, Zellkonfluenz) oder strukturell bedingt

sein. Die Tatsache, dass die 3. IL des eH1, die für die G-Protein-Interaktion verantwortlich ist, eine starke Heterogenität im Vergleich zum hH1 aufweist, könnte auf einen Wechsel von G_q zu G_s vermittelten Signalwegen beim eH1 hindeuten (Meszaros et al., 2000).

5.8 REGULATION DES EH1 IM KONFOKALEN MIKROSKOP

Die Untersuchungen des eH1 am konfokalen Mikroskop zeigten, dass der klonierte Rezeptor in die Zellmembran integriert und nach Stimulation mit Histamin internalisiert wird. Des weiteren konnten wir zeigen, dass die beiden Antihistaminika Diphenhydramin und Chlorpheniramin die Rezeptorinternalisierung vor, nicht aber nach der Gabe von Histamin aufheben konnten. Diese Befund stimmt mit der klinischen Beobachtung überein (Rose et al., 2000), die eine prophylaktische Verabreichung von Antihistaminika als wirksam beschreiben. Wurden Antihistaminika allerdings erst nach Ausbildung von klinischen Krankheits-erscheinungen verabreicht, so waren sie wirkungslos.

Für die inhibitorische Wirkung von Diphenhydramin am konfokalen Mikroskop waren sehr hohe Wirkstoffkonzentrationen (100 µM) notwendig. Dies entspricht einem 500-fach molaren Überschuss an Diphenhydramin. Umso erstaunlicher erscheint es, dass an „Precision Lung Cut Slices“ (PCLS) des Pferdes Diphenhydramin bereits bei einer Konzentration von 1 µM die histaminvermittelte Bronchokonstriktion aufheben konnte (Vietmeier, 2004). Dies weist darauf hin, dass im Zellverband zusätzliche Faktoren zur Wirkung von Antihistaminika beitragen müssen.

Obwohl die Aktivierung des eH1 mit Histamin nach kurzer Zeit (5-10 Min.) eine vollständige Internalisierung des Rezeptors bewirkte, kehrten die Rezeptoren trotz der weiteren Anwesenheit von Histamin innerhalb von 30 Min. wieder vollständig an die Zelloberfläche zurück. Als mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte eine Cointernalisierung mit nachfolgendem intrazellulären Abbau von Histamin herangezogen werden, was eine Abnahme der extrazellulären Histamin-konzentrationen bewirken könnte. Wahrscheinlicher ist jedoch ein schnelles „Recycling“ der internalisierten Rezeptoren zur Zelloberfläche. In der Tat konnten Miyoshi et al. (2004) eine langfristige Phosphoyrylierung des hH1 nach kurzzeitiger

Histaminzugabe (5 Min.) über den Zeitraum von 40 Min. hinweg beobachten. Dies würde bedeuten, dass die an die Zelloberfläche zurück gekehrten Rezeptoren nach wie vor phosphoryliert und demnach funktionell inaktiv sind. Die Anwesenheit desensibilisierter Rezeptoren könnte die klinische Beobachtung erklären, dass die Verabreichung von Antihistaminika nach starker Histaminausschüttung nur eingeschränkt wirksam ist.

5.9 AUSBLICK

Um die mangelnde Wirksamkeit von Antihistaminka beim Pferd zu erklären, müssen speziesspezifische Besonderheiten in der Pathogenese von Hypersensibilitätsreaktionen vom Typ I und der pharmakologischen Eigenschaften der eingesetzten Substanzen berücksichtigt werden. Pharmakologische Unterschiede können dabei pharmakodynamischer oder pharmakinetischer Art sein. Der H1R stellt dabei den zentralen Angriffspunkt für Histamin und Antihistaminika dar. Durch die Klonierung des eH1 ist eine wesentliche Voraussetzung dafür geschaffen worden, speziesspezifische Unterschiede in der Wirkung von Antihistaminika aufzuklären. Erste Ergebnisse aus der funktionellen Charakterisierung weisen in der Tat darauf hin, dass der eH1 im Vergleich zum hH1 eine deutlich niedrigere Affinität zu den therapeutisch eingesetzten Antihistaminika aufweist. Durch die Verfügbarkeit des klonierten Rezeptors können nun höher affine Antihistaminka am eH1 identifiziert und charakterisiert werden. Darüber hinaus ermöglicht der klonierte eH1 erstmals Studien zur Rezeptorverteilung in den einzelnen Geweben und zur Beteiligung des eH1 beim Allergiegeschehen des Pferdes. Da die Bindung von Antihistaminika an den Rezeptor pH-abhängig ist, kann nunmehr die Wirksamkeit von Antihistaminika im entzündeten Gewebe *in vitro* untersucht werden. Dies ist insofern von klinischem Interesse, da es im Verlauf eines allergischen Geschehens zur pH-Wert-Absenkung und somit zu einem Wirkverlust von Antihistaminika kommen könnte. Der klonierte eH1 liefert weiterhin die Grundlage dafür, mögliche Polymorphismen im eH1-Gen zu identifizieren, die in Analogie zum Menschen (Janeway et al., 2002) auch beim Pferd für individuelle Wirkunterschiede von Antihistaminika von Bedeutung sein könnten. Aus pharmakologischer Sicht könnte die signifikant stärkere cAMP-Stimulation des eH1 im Vergleich zum hH1 schließlich

wertvolle Hinweise für mögliche Unterschiede in der Signaltransduktion beider Rezeptoren liefern.

6. Zusammenfassung

Histamin nimmt in der Pathogenese der Hypersensibiliätsreaktion vom Typ I eine zentrale Rolle ein. Zur Behandlung allergischer Krankheiten werden Antihistaminika eingesetzt, sie zeigen jedoch beim Pferd oftmals nur eine eingeschränkte Wirksamkeit. In der vorliegenden Arbeit wurde der equine Histamin H1 Rezeptor (eH1) mittels PCR-Klonierung isoliert. Hierfür wurde mRNA aus Pferdeblut gewonnen, durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und eine homologe Teilsequenz des Rezeptors mittels degenerierter Primer vervielfältigt. Die kodierende Sequenz des Rezeptors wurde durch anschließende 3'- und 5'-RACE-PCR vervollständigt und sequenziert. Der Rezeptor wurde einer molekularen und biochemischen Charakterisierung unterzogen.

Die pharmakologische Charakterisierung wurde nach stabiler Expression der eH1-cDNA in HEK293-Zellen durchgeführt. In Radioligandenbindungsstudien wurde die Affinität von ^{3}H-Pyrilamin, Histamin sowie der klinisch eingesetzten Antihistaminika Diphenhydramin und Chlorpheniramin am eH1 und humanen Histamin H1 Rezeptor (hH1) vergleichend ermittelt. Die Selektivität des eH1 wurde in Radioligandenbindungsstudien mit dem Histamin H2 Rezeptor-Antagonisten Cimetidin und dem Histamin H3-Rezeptor-Antagonisten Thioperamid demonstriert. Obwohl für Histamin keine Unterschiede in der Affinität zwischen beiden Rezeptoren nachweisbar waren, zeigten die Antihistaminika Chlorpheniramin und Diphenhydramin eine 2,2- bzw. 3,8-fach niedrigere Affinität zum eH1 im Vergleich zum hH1. Die funktionelle Aktivität des eH1 wurde in der intrazellulären cAMP-Produktion bestimmt. Dabei resultierte die Stimulation des eH1 in einem signifikant stärkeren Anstieg (15-fach) der intrazellulären cAMP-Konzentration im Vergleich zum hH1. Die Membranlokalisation und funktionelle Regulation des Rezeptors wurde am konfokalen Mikroskop untersucht. Durch Vorinkubation der Zellen mit den inversen Agonisten Diphenhydramin und Chlorpheniramin konnte dabei die Histamin-vermittelte Internalisierung des eH1 nach Stimulation mit Histamin unterbunden werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein voll funktionsfähiger eH1 kloniert wurde. Die im Vergleich zum hH1 gefundene niedrigere Affinität von Antihistaminika könnte zu ihrer eingeschränkten klinischen Wirksamkeit beim Pferd beitragen.

7. Summary:
CLONING AND PHARMACOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE EQUINE HISTAMINE H1 RECEPTOR

Histamine plays a crucial role in the pathogenesis of type I hypersensitivity. Antihistamines are therapeutically used in allergy, but in horses they often show little or no effect. In this paper we describe the cloning of the equine histamine H1 receptor (eH1). mRNA was isolated from equine blood to receive, by Reverse transcription, the cDNA. Afterwards, a homologous part of the sequence was amplificated using degenerated primer. The 3'- and 5'-ends were detected through 3'- and 5'-RACE-PCR. The receptor was pharmacologically and biochemically characterized.

The pharmacological characterization was conducted with HEK293 cell lines, stably expressing the eH1 and human histamine H1 receptor (hH1).

In comparative radioligand receptor binding studies the affinity of ^{3}H-Pyrilamin, Histamine and the clinically used antagonists diphenhydramine and chlorpheniramine were determined. The selecitivity of eH1 was demonstrated in radioligand binding studies using the histamine H2 receptor antagonist cimetidine and the histamine H3 receptor antagonist thioperamide. Although the endogenous ligand histamine did not show differences in affinity, the antihistamines chlorpheniramine and diphenhydramine were approximately 2,2/3,8 times less affine on eH1 than on hH1. The functional activity was defined through intracellular cAMP accumulation. Hereby, the stimulation of eH1 with histamine resulted in a 15 times greater increase in intracellular cAMP in eH1 than in hH1.

The localization of the receptor on the cell surface as well as its functional regulation was examined with the confocal microscope. Pre-incubation with the inverse agonists diphenhydramine and chlorpheniramine resulted in a lack of internalization when histamine was added afterwards. These results show that a fully functional receptor was cloned. In addition, the comparative studies indicate that the lower affinity of antihistamines to eH1 may contribute to their weak clinical effectiveness in horse.

8. Literaturverzeichnis

Adams H.R. (2001)
Veterinary pharmacology and therapeutics
8th edition, Blackwell Publishing Edition

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

Aktories K., Förstermann U., Hofmann F., Forth W. (2005)
Allgemeine und spezielle Pharmakologie, 9. Auflage
Elsevier

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002)
The molecular biology of the cell, Fourth Edition
Garland Science

Ash, A.S.F., and Schild, H.O. (1966)
Receptors mediating some actions of histamine
Br J Pharmacol, 27, 427-439

Baudry M., Martres M.P., Schwartz J.C. (1973)
Histidine decarboxylase in rat brain: studies on subcellular localization
Agents Actions, 3, 175-176

Best C.G., Dale H.H., Dudley H.W., Thorpe W.V. (1927)
The natur of the vasodilator constituents of certain tissue extracts
J Physiol, 62, 397-417

Birnboim H.C., Doly J. (1979)
A rapid alkaline Extraktion procedure for screening recombinant plasmid DNA
Nucleic Acids Research, 7, 1513-1523

Bommer M., Liebisch D., Kley N., Herz A., Noble E. (1987)
Histamine affects release and biosynthesis of opioid peptides primarily via H1-receptors in bovine chromaffin cells
J Neurochem, 49, 1688-1696

Booth R.G., Moniri N.H. (2005)
Ligand-directed multifunctional signaling of histamine H1 receptors
Inflamm Res, 54, Supplement 1, 44-45

Bovet D. & Staub A. (1937)
Action protectrice des éthers phenoliques au cours l'intoxication histaminique
Cr Soc Biol, 124, 547-549.

Brooker, G., J.F. Harper, W.L. Terasaki, R.D. Moylan (1979)
Radioimmunoassay of cyclic AMP and cyclil GMP
Adv Cyclic Nucl Res, 10, 1-33

Brunton L.L., Lazo J.S., Parker K.L. (2006)
Goodman & Gilman's
Histamine, Bradykinin and their antagonists, In: The Pharmacological Basis of Therapeutics
11th edition, B & T

Bruysters M., Pertz H.H., Teunissen A., Bakker R.A., Gillard M., Chatelain P., Schunack W., Timmerman H., and Leurs R. (2004)
Mutational analysis of the histamine H1-receptor binding pocket of histaprodifens
Eur J Pharmacol, 487, 55-63

Bunn S.J., Sim A.T.R., Herd L.M., Austin L.M., Dunkling P.R. (1995)
Tyrosine-hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of intracellular Ca^{2+} in the histamine H1-receptor-stimulated phosphorylation of Ser (8), Ser (19), Ser (31) and Ser (40)
J Neurochem, 64, 1370-1378

Chang R.S.L., Tran V.T., Snyder S.H. (1978)
Heterogeneity of histamine H1-receptors: species variations in ^{3}H-Mepyramine binding of brain membranes
Journal of Neurochemistry, 32, 1653-1663

Chen C., Okayama H. (1987)
High-efficiency Transformation of mammalian cells by plasmid DNA
Mol Cel Biol, 7, 2745-2752

Chen C., Hanson E., Watson J.W., Lee J.S. (2003)
P-glycoprotein limits the brain penetration of nonsedating but not sedating H1-antagonists.
Drug Metab Dispos, 31, 312-8

Cheng Y.-C., Prusoff W.H. (1973)
Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction
Biochem Pharmacol, 22, 2745-3108

Chomczynski P., Sacchi, N. (1987)
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction
Anal Biochem, 162, 156-9

Chubet R.G., Brizzard B.L. (1996)
Vectors for expression and secretion of FLAG-epitope tagged proteins in mammalian cells
Biotechniques, 20, 136-41

Collier C. (1984)
Epinephrine and epidural narcotics
Anesthesiology, 60(2),168-169

Daum P.R., Hill S.J., Young J.M., (1982)
Histamine H1-agonist potentiation of adensoine-stimulated cyclic AMP accumulation in slices of guinea-pig cerebral cortex: comparison of response and binding parameters.
Br J Pharmacol, 77, 347-357

De Backer M.D., Gommeren W., Moereels H., Nobels G., Van Gompel P., Leysen J.E., and Luyten W.H. (1993)
Genomic cloning, heterologous expression and pharmacological characterization of a human histamine H1 receptor
Biochem Biophys Res Commun, 197, 1601-1608

Donaldson J., Hill S.J., Brown A.M. (1988)
Kinetic studies on the mechanism by which histamine H1 receptors potentiate cyclic AMP accumulation in guinea pig cerebral cortical slices
Mol Pharmacol, 33, 626-633

Doucet M.Y., Jones T.R., Ford-Hutchinson A.W. (1990)
Response of equine trachealis and lung parenchyma to methacholine, histamine, serotonine, prostanoids and leukotrienes *in vitro*
Can J Physiol Pharmacol, 68, 379-383

Ferguson S.S.G., Barak L.S., Zhang J., Caron M.G. (1996)
G-protein coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptorkinases and arrestins
Com J Physiol Pharmacol, 74, 1095-1110

Fleckenstein A.E., Lookingland K.E., Moore K.E. (1993)
Activation of mesolimbic dopaminergic neurons following central administration of histamine is mediated by H1 receptors.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 327, 50-54

Foster A.P., Cunningham F.M. (1998)
Histamine-induced adherence and migration of equine eosinophils
Am J Vet Res, 59,1153-9

Frohmann M.A., Dush M.K., Martin G.R. (1988)
Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplificatin using a single gene-specific oligonucleotide
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 8998-9002

Frohmann M.A., Martin G.R. (1989)
Rapid amplification of cDNA ends using nested primers
Techniques 1, 165-170

Fukui H., Fujimoto K., Mizuguchi H., Sakamoto K., Horio Y., Takai S., Yamada K., Ito S. (1994)
Molecular cloning of the human histamine h1 receptor gene
Biochem biophys res commun, 201, 2, 894-901

Gaboury J.P., Johnston B., Niu X.-F., Kubes P. (1995)
Mechanisms underlying acute mast cell-induced leukocyte rolling and adhesion *in vivo*
J Immunol, 154, 804-813

Garbarg M. und Schwartz J.C. (1988)
Synergism between histamine H1 and H2-receptors in the cAMP responses in guinea pig brain slices: effects of phorbol ester and calcium.
Mol Pharmacol, 33, 38-42

Hall I.P., Hill S.J. (1988)
$ß_2$-adrenoceptor stimulation inhibits histamine-stimulated inositol phospholipid hydrolysis in bovine tracheal smooth muscle
Br J Pharmacol, 95, 1204-1212

Hamilton K.K., Sims P.J. (1987)
Changes in cytosolic Ca 2+ associated with von Willebrand factor release in human endothelial cells exposed to histamine. Study of microcarrier cell monolayers using the fluorescent probe indo-1
J Clin Invest, 79, 600-608

Han S.K., Mancino V., Simon M.I. (2006)
Phospholipase $C_{ß3}$ mediates the scratching response activated by the histamine H1 receptor on C-fiber nociceptive neurons
Neuron, 52, 691-703

Hausdorff W.P., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1990)
Turning off the signal : desensitization of ß-adrenergic receptor function
FASEB, 4, 2881-2889

Hegstrand L.R., Simon J.R. (1985)
Histidine transport into rat brain synaptosomes
J Neurochem, 45, 407-414

Hellevou K., Yoshimura M., Kao M., Hoffman P.L., Cooper D.M.F., Tabakoff B. (1993)
A novel adenylyl cyclase sequence cloned from the human erythroleukemia cell line
Biochem Biophys Res Commun, 192, 311-318

Hill S.J., Young J.M., Marrian D.M. (1977)
Specific binding of ^{3}H-Mepyramine to histamine H1-receptors in intestinal smooth muscle
Nature (Lond.), 270, 361-363

Hill S.J., Ganellin C.R., Timmerman H., Schwartz J.C., Shankley N.P., Young J.M., Schunack W., Levi R., and Haas H.L. (1997)
International Union of Pharmacology
XIII. Classification of histamine receptors
Pharmacol Rev, 49, 253-278

Hishinuma S., Naiki A., Tsuga H., Young J.M. (1998)
Ca^{2+} /calmodulin-mediated regulation of agonist-induced sequestration of Gq protein-coupled histamine H1 receptors in human U373 MG astrocytoma cells
J Neurochem, 71, 2626-33

Hishinuma S., Kazum O. (2000)
Ca $^{2+}$/Calmodulin-mediated regulation of the Desensitizing process in Gq protein-coupled histamine H1-receptor mediated Ca^{2+} responses in Human 373 MG Astrocytoma cells
J Neurochem, 75, 772-81

Horio S., Kato T., Ogawa M., Fujimoto K., Fukui H. (2004)
Two threonine residues and two serine residues in the second and third intracellular loops are both involved in histamine H1 receptor downregulation
FEBS Lett, 573, 226-30

Ishiguro N., Nozawa T., Tsujihata A., Saito A., Kishimoto W., Yokoyama K., Yotsumoto T., Sakai K., Igarashi T., Tamai I. (2004)
Influx and efflux transport of H1-antagonist epinastine across the blood-brain barrier
Drug Metab Dispos, 32, 519-24

Iwata K., Jiansong L., Penn R.B., Benovic J.L. (2005)
Bimodal Regulation of the Human H1 Histamine Receptor by G Protein-coupled Receptor Kinase 2
J Biol Chem, 280, 2197-2204

Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. (2002)
Allergie und Hypersenibilität, In: Immunologie, S. 505-536
Spektrum Akademischer Verlag, 5. Aufl.

Jarisch R., Götz M., Hemmer W., Missbichler A., Raithel M., Wantke F. (2004)
Histamin-Intoleranz, Histamin und Seekrankheit
Thieme Verlag, 2. Aufl.

Johnson, S.M., W.W. Fleming (1989)
Mechanisms of cellular adaptive sensitivity changes: applications to opioid tolerance and dependence
Pharmacol Rev, 41, 435-488

Kawakami N., Myisoshi K., Horio S., Fukui H. (2004)
β2-adrenergic receptor-mediated histamine H1 receptor down-regulation: another possible advantage of β2-agonists in asthmatic therapy
J Pharmacol Sci, 94, 449-58

Kitamura Y., Arima T., Kitayama Y., Nomura Y. (1996)
Regulation of $[Ca^{2+}]_i$ rise activated by doxepin-sensitive H1-histamine receptors in jurkat cells, cloned human T lymphocyctes
Gen Pharmacol, 27, 298-291

Kotlikoff M.I., Murray R.K., Reynolds E.E. (1987)
Histamine-induced calcium release and phorbol antagonism in cultured airway smooth muscle cells
Am J Physiol, 253, C561-C566

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

Langerhans (1896)
Tod durch Heilserum
Berl klin Wochenschr, 27

Leurs R., Traiffort E. Arrang J.M., Tardivel-Lacombe J., Ruat M., Schwartz J.C. (1994a)
Guinea pig histamine H1 receptor. II. Stable expression in Chinese hamster ovary cells reveals the interaction with three major signal transduction pathways
J Neurochem, 62, 519-527

Leurs R., Smit M.J., Tensen C.P., Ter Laak A.M., and Timmerman H. (1994b)
Site-directed mutagenesis of the histamine H1-receptor reveals a selective interaction of asparagine207 with subclasses of H1-receptor agonists
Biochem Biophys Res Commun, 201, 295-301

Leurs R., Smit M.J., Meeder R., Ter Laak A.M., and Timmerman H. (1995)
Lysine200 located in the fifth transmembrane domain of the histamine H1-receptor interacts with histamine but not with all H1-agonists
Biochem Biophys Res Commun, 214, 110-117

Leurs R., Watanabe T., Timmerman H. (2001)
Histamine receptors are finally « coming out »
Trends Pharmacol Sci, 22, 337-339

Leurs R., Church M.K., Taglialatela M. (2002)
H1-antihistaines: inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects
Clin Exp All, 32, 489-498

Lowry O.H., Rosebrough, N.J., Fass, A.L., Randall, R.J. (1951)
Protein measurement with the Folin phenol reagent
Journal of Biological Chemistry, 193, 265-275

Marley P.D., Thomson K.A., Jachno K., Jonhnston M.J. (1991)
Histamine-induced increases in cyclic AMP levels in bovine adrenal medullary cells
Br J Pharmacol, 104, 839-846

Maruko T., Nakahara T., Sakamoto K., Saito M., Sugimoto N., Takuwa Y., Ishii K. (2005)
Involvement of the βγ-subunits of G proteins in the cAMP response induced by stimulation of the histamine H1-receptor
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 372, 153-159

Matsumoto J., Kanaide H., Nishimura J., Shogakiuchi Y., Kobayashi S. Nakamura M. (1986)
Histamine activates H1-receptors to induce cytosolic free calcium transients in cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta
Biochem Biophys Res Commun, 135, 172-177

McGorum B.C., Dixon P.M., Halliwell R.E.W. (1993)
Quantification of histamine in plasma and pulmonary fluids from horses with chronic obstructive pulmonary disease, before and after "natural (hay and straw) challenges"
Vet Immun Immunopath, 36, 223-237

McIntyre T.M, Zimmerman G.A., Satoh K., Prescott S.M. (1985)
Cultured endothelial cells synthesize both platelet-activating factor and prostacyclin in response to histamine, bradykinin and adenosine triphosphate
J Clin Invest, 76, 271-280

Meszaros J.G., Gonzalez A.M., Endo-Mochizuki Y. (2000)
Identification of G protein-coupled pathways in cardiac fibroblasts:
Cross-talk between G_q and G_s
Am J Physiol, 278, C154-162

Miyoshi K., Kawakami N., Wakayama Y., Izumi N., Horio S., Fukui H. (2004)
Histamine H1 receptor down-regulation mediated by M3 muscarinic Acetylcholine receptor subtype
J Pharmacol Sci, 95, 426-434

Mochizuki T., Yamatodani A., Okakura K., Horii A., Inagaki N., Wada H. (1992)
Circadian rhythm of histamine release from the hypothalamus of freely moving rats
Physiol Behav, 51, 391-394

Moguilevsky N., Varsalona F., Noyer M., Gillard M., Guillaume J.-P., Garcia L., Szpirer C., Szpirer J., Bollen A. (1994)
Stable expression of human H1-histamine-receptor cDNA in chinese hamster ovary cells
Eur J Biochem, 224, 489-495

Moguilevsky N., Varsalona F. Guillaume J.P., Noyer M., Gillard M., Daliers J., Henichart J.P., and Bollen A. (1995)
Pharmacological and functional characterisation of the wild-type and site-directed mutants of the human H1 histamine recpeptor stably expressed in CHO cells
J Recept Signal Transduct Res, 15, 91-102

Moguilevsky N., Differding E., Gillard M., and Rollen A. (1998)
Rational drug design using mammalian cell lines expressing site-directed mutants of the human H1-histaminic receptor
Anim Cell Technol: Basic Appl Asp, 9, 65-69

Molloy S.S., Thomas L., Van Slyke J.K., (1994)
Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface
EMBO J, 13, 18-33

Moniri N.H., Booth R.G. (2006)
Role of PKA and PKC in histamine H1 receptor-mediated activation of catecholamine neurotransmitter synthesis
Neurosci Lett, 407, 249-53

Nonaka H., Otaki S., Ohshima E., Kono M., Kase H., Ohta K., Fukui H., Ichimura M. (1998)
Unique binding pocket for KW-4679 in the histamine receptor stably expressed in CHO cells
J Recept Signal Transduct Res, 15, 91-102

Ohta K., Hayashi H., Mizuguchi H., Kagamiyama H., Fujimoto K., and Fukui H. (1994)
Site-directed mutagenesis of the histamine H1 receptor: roles of aspartic acid107, asparagine198 and threonine194
Biochem Biophys Res Commun, 203, 1096-1101

Olsén L., Ingvast-Larsson C., Larsson P., Broström H., Bondesson U., Sudqvist M., Tjälve H. (2006)
Fexofenadine in horses: pharmacokinetics, pharmacodynamics and effect of ivermectin treatment
J Vet Pharmacol Therap, 29, 129-135

Ookuma K., Sakata T., Fukagawa K. (1993)
Neuronal histamine in the hypothalamus suppresses food intake in rats
Brain Res, 628, 235-242

Paniettieri R.A., Murray R.K., Depalo L.R., Yadvish P.A., Kotlikoff M.I. (1989)
A human airway smooth muscle cell line that retains physiological responsiveness
Am J Physiol, 256, C329-C335

Pirquet C. (1906)
Allergie
Münchener Medizinische Wochenschrift

Premont R.T. (1994)
Identification of adenylyl cyclases by amplification using degenerate primers
Methods Enzymol, 238, 116

Reed S.M., Bayly W.M., Sellan D.C. (2004)
Equine Internal Medicine
Elsevier Verlag, 2. Aufl.

Robinson N.E. (2003a)
Arthropod Hypersensitivity, in: Current Therapy in Equine Medicine
Elsevier / Saunders Verlag, 5. Aufl.

Robinson N.E. (2003b)
Heaves, RAO, IAD, COPD: Just what do we know about horse airway disease?
BEVA Congress, John Hickman Memorial Lecture

Rose R.J., Hodgson D.R. (2000)
Skin Immune System and Allergic Skin Diseases in: Manual of Equine Practice
W.B. Saunders Company, 2. Aufl.

Salomon Y. (1991)
Cellular responsiveness to hormones and neurotransmitters: conversion of [^{3}H]-Adenine to [^{3}H]-cAMP in cell monolayers, cell suspensions, and tissue slices
Methods Enzymol, 195, 22-28

Scatchard G. (1949)
The attractions of Proteins for small molecules and ions
Ann N Y Acad Sci, 51, 660 - 672

Scott D.W., William H.M.Jr. (2003)
Dermatologic Therapy, in: Equine Dermatology
Saunders / Elsevier Verlag

Seifert R., Wenzel-Seifert K., Bürckstümmer T., Perz H.H., Schunack W., Dove S., Buschauer A., Elz S. (2003)
Multiple Differences in Agonist and Antagonist Pharmacology between Human and Guinea Pig Histamine H1-Receptor
J Pharmacol Exp Ther, 305, 1104-1115

Shaw G., Morse S., Ararat M., Graham F.L. (2002)
Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK293 cells
FASEB J, 16, 869-871

Shi L., Javitch J.A. (2002)
The binding site of aminergic G protein-coupled receptors: the transmembrane segments and second extracellular loop
Annu Rev Pharmacol Toxicol, 42, 437-467

Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. (1962)
Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein, from the luminous hydromedusan Aequorea
J Cell Comp Physiol, 59, 223-239

Siebert P. (1991)
RT-PCR: Methods and applications
Clontech Laboratories Inc., Palo Alto

Simons F.E. (2003)
H1-Antihistamines: More relevant than ever in the treatment of allergic disorders
J Allergy Clin Immunol, 112, S42-S52

Simons F.E. (2004)
Advances in H1-antihistamines
N Engl J Med, 351, 2203-17

Smit M.J., Hoffmann M., Timmerman H., Leurs R. (1999)
Molecular properties and signalling pathways of the histamine H1 receptor
Clin Exp Allergy, 22, 19-28

Smith B.P. (2002)
Diseases of the Respiratory System in: Large Animal Internal Medicine
Mosby Inc., 3.Aufl.

Steiner A.L. (1972)
Assay of cyclic nucleotids by radioimmunoassay methods
Methods Enzymol, 38, 96-105

Steiner A.L., Parker C.W., Kipnis D.M. (1974)
Radioimmunoassay for cyclic nucleotids I. Preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides
J Biol Chem, 247, 1106-1113

Szerkeres P.G., Koenig J.A., Edwardson J.M. (1998)
The relationship between agonist intrinsic activity and the rate of endocytosis of muscarinic receptors in a human neuroblastoma cell line
Mol Pharmacol, 53, 759-765

Takuwa Y., Takuwa N., Rassmussen H. (1987)
Measurement of cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in bovine tracheal smooth muscle using aequorin
Am J Physiol, 253, C817-C827

Thomas P., Smart T.G. (2005)
HEK293 cell line: A vehicle for the Expression of recombinant Proteins
J Pharmacol Toxicol Met, 51, 187-2000

Toda N. (1987)
Is histamine a human coronary vasospastic substance?
Trends Pharmacol Sci, 8, 289-290

Torneke K., Ingvast-Larsson C., Pettersson K., Bergvall K., Hedeland M., Bondesson U., Brostrom H. (2003)
Pharmacokinetics and pharmacodynamics of clemastine in healthy horses
J Vet Pharmacol Ther, 26, 151-7

Vachon L., Costa T., Herz A. (1987)
Opioid receptor desensitization in NG 108-15 cells
Biochem Pharmacol, 36, 2889-2897

Van Amsterdam R.G.M., Meurs H., Brouver F., Postema J.B., Timmermans A., Zaagsma J. (1989)
Role of phosphoinositide metabolism in functional antagonism of airway smooth muscle contraction by ß-adrenoceptor agonists
Eur J Pharamcol Mol Pharmacol Sect, 172, 175-183

Vernier P., Cardinaud B., Valdenaire O. Philippe H., Vincent J.P. (1995)
An evolutionary View of drug-receptor interaction: the bioamine receptor familiy
Trends Pharmacol Sci, 16, 375-381

Vietmeier J. (2004)
Pharmakologische Beeinflussung der Bronchokonstriktion an « Precision Cut Lung Slices » beim Pferd
Deutsche Nationalbibliothek, Netzpublikation

Weill C., Galzi J.-L., Chasserot-Golaz S., Goeldner M., Ilien B. (1999)
Functional Characterization and potential applications for Enhanced Green Fluorescent Protein and Epitope-Fused human M1 muscarinic receptors
J Neurochem, 73, 791-801

White M.V. (1990)
The role of histamine in allergic diseases
J Allergy Clin Immunol, 86, 599-605

Wieland K., Laak A.M., Smit M.J., Kuhne R., Timmerman H., Leurs R. (1999)
Mutational analysis of the antagonist-binding site of the histamine H1 receptor
J Biol Chem, 274, 29994-30000.

Wong Y.H. (1994)
G_i assays in transfected cells
Meth Enzymol, 238, 81-94

Yamashita M., Fukui H., Sugama K., Horio Y., Ito S., Mizuguchi H. and Wada H. (1991)
Expression cloning of a cDNA endoding the bovine histamine H1 receptor
Proc Natl Acad Sci, 88, 11515-11519

9. Anhang

9.1 ALIGNMENT DER H1R-PROTEINSEQUENZEN

Vergleich der H1R-Proteinsequenzen, die zur Auswahl der degnerierten Primer herangezogen wurden.

```
Pferd           MTCLNSSSDLEDKMCEGNKTTIAS-PQLMPLVVVLSTISLVTVALNLLVLYAVRSERKLH 59
Rind            MTCPNSSCVFEDKMCQGNKTAPANDAQLTPLVVVLSTISLVTVGLNLLVLYAVRSERKLH 60
Mensch          MSLPNSSCLLEDKMCEGNKTTMAS-PQLMPLVVVLSTICLVTVGLNLLVLYAVRSERKLH 59
Maus            MSLPNTSSASEDKMCEGNRTAMAS-PQLLPLVVVLSSISLVTVGLNLLVLYAVRSERKLH 59
Ratte           MSFANTSSTFEDKMCEGNRTAMAS-PQLLPLVVVLSSISLVTVGLNLLVLYAVHSERKLH 59
                *:  *:*.  *****:**:*: *. .** *******:*.****.*********:******

Pferd           TVGNLYIVSLSVADLIVGAVVMPMNILYLFTSKWPLGRPLCLFWLSMDYVASTASIFSVF 119
Rind            TVGNLYIVSLSVADLIVGVVVMPMNILYLLMSRWSLGRPLCLFWLSMDYVASTASIFSVF 120
Mensch          TVGNLYIVSLSVADLIVGAVVMPMNILYLLMSKWSLGRPLCLFWLSMDYVASTASIFSVF 119
Maus            TVGNLYIVSLSVADLIVGAVVMPMNILYLIMTKWSLGRPLCLFWLSMDYVASTASIFSVF 119
Ratte           TVGNLYIVSLSVADLIVGAVVMPMNILYLIMTKWSLGRPLCLFWLSMDYVASTASIFSVF 119
                ******************.**********: ::*.*************************

Pferd           ILCIDRYRSVQQPLRYLRYRTKTRASATILGAWFLSFLWVIPIWGWHHFVSQTWNRQEDK 179
Rind            ILCIDRYRSVQQPLKYLRYRTKTRASITILAAWFLSFLWIIPILGWRHFQPKTPEPREDK 180
Mensch          ILCIDRYRSVQQPLRYLKYRTKTRASATILGAWFLSFLWVIPILGWNHFMQQTSVRREDK 179
Maus            ILCIDRYRSVQQPLRYLRYRTKTRASATILGAWFLSFLWVIPILGWHHFTPLAPELREDK 179
Ratte           ILCIDRYRSVQQPLRYLRYRTKTRASATILGAWFFSFLWVIPILGWHHFMPPAPELREDK 179
                **************:**:******** ***.***:****:*** **.**   :   :***

Pferd           CETDFYDVTWFKIMTAIINFYLPTLLMLWFYTKIYKAVRQHCQHRDLINGSLPSFSDVKL 239
Rind            CETDFYNVTWFKVMTAIINFYLPTLLMLWFYAKIYKAVRQHCQHRELINGSFPSFSDMKM 240
Mensch          CETDFYDVTWFKVMTAIINFYLPTLLMLWFYAKIYKAVRQHCQHRELINRSLPSFSEIKL 239
Maus            CETDFYNVTWFKIMTAIINFYLPTLLMLWFYVKIYKAVRRHCQHRQLTNGSLPTFLEIKL 239
Ratte           CETDFYNVTWFKIMTAIINFYLPTLLMLWFYVKIYKAVRRHCQHRQLTNGSLPSFSELKL 239
                ******:*****:******************.*******:*****:* * *:*:* ::*:

Pferd           KPENPKVDAKKS-EESPWEVLKRKPKDAGGGSVLKLPSEDPKEMKSPAVFSQEE---VGE 295
Rind            KPENLQVGAKKPGKESPWEVLKRKPKDTGGGPVLKPPSQEPKEVTSPGVFSQEKEEKDGE 300
Mensch          RPENPKGDAKKPGKESPWEVLKRKPKDAGGGSVLKSPSQTPKEMKSPVVFSQED---DRE 296
Maus            RSEDAKEGAKKPGKESPWGVQKRPSRDPTGGLDQKSTSEDPK-VTSPTVFSQEG---ERE 295
Ratte           RSDDTKEGAKKPGRESPWGVLKRPSRDPSVGLDQKSTSEDPK-MTSPTVFSQEG---ERE 295
                :.:: : .***. .**** * ** .:*.  *   * .*: ** :.** *****     *

Pferd           VDNLHCFPLNTVQMHTEAEGNDRGYVAINQSQSQLEMGEQGLN-MREANEMPEDQILGDS 354
Rind            LGKFYCFPLDTVQAQPEAEGSGRGYATINQSQNQLEMGEQGLS-MPGAKEALEDQILGDS 359
Mensch          VDKLYCFPLDIEHMQAAAEGSSRDYVAVNRSHGQLKTDEQGLN-THGASEISEDQMLGDS 355
Maus            TVTRPCFRLDVMQTQPVPEGDARGSKANDQTLSQPKMDEQSLSTCRRISETSEDQTLVDR 355
Ratte           --TRPCFRLDIMQKQSVAEGDVRGSKANDQALSQPKMDEQSLNTCRRISETSEDQTLVDQ 353
                  .  ** *:  : :. .**. *.  : ::: .* : .**.*.     .*  *** * *

Pferd           PSFSQ-TDLDTPPEPASGKGKPRGGSNTGLDYIKFTWKRLRSHSRQCVSGLHMNRERKAA 413
Rind            QSFSR-TDSDTPAEPAPAKGKSRSESSTGLEYIKFTWKRLRSHSRQYVSGLHMNRERKAA 418
Mensch          QSFSR-TDSDTTTETAPGKGKLRSGSNTGLDYIKFTWKRLRSHSRQYVSGLHMNRERKAA 414
Maus            QSFSRTTDSDTSIEPGLGKVKARSRSNSGLDYIKVTWKRLRSHSRQYVSGLHLNRERKAA 415
Ratte           QSFSRTTDSDTSIEPGPGRVKSRSGSNSGLDYIKITWKRLRSHSRQYVSGLHLNRERKAA 413
                 ***: ** **. *.. .: * *. *.:**:***.********** *****:*******
```

```
Pferd           KQLGFIMAAFILCWIPYFIFFMVIAFCKSCCNEHVHMFTIWLGYINSTLNPLIYPLCNEN 473
Rind            KQLGFIMAAFIICWIPYFIFFMVIAFCESCCNQHVHMFTIWLGYINSTLNPLIYPLCNEN 478
Mensch          KQLGFIMAAFILCWIPYFIFFMVIAFCKNCCNEHLHMFTIWLGYINSTLNPLIYPLCNEN 474
Maus            KQLGCIMAAFILCWIPYFIFFMVIAFCNSCCSEPVHMFTIWLGYINSTLNPLIYPLCNEN 475
Ratte           KQLGFIMAAFILCWIPYFIFFMVIAFCKSCCSEPMHMFTIWLGYINSTLNPLIYPLCNEN 473
                **** ******:***************:.**.: :************************

Pferd           FKKTFKKILHIRS 486
Rind            FKKTFKKILHIRS 491
Mensch          FKKTFKRILHIRS 487
Maus            FKKTFKKILHIRS 488
Ratte           FKKTFKKILHIRS 486
                ******:******
```

9.2 ALIGNMENT DER H1R-NUKLEINSÄURESEQUENZEN

Vergleich der H1R-Aminosäurensequenzen, die zur Auswahl der degenerierten Primer dienten.

```
Pferd           ------------------------------------------------------------
Mensch          ------------------------------------------------------AGTATT 6
Hund            ------------------------------------------------------------
Rind            ------------------------------------------------------------
Maus            GGCCTCCGCCACCGCACCGAGCAGTCTGGCCGCCGCCGCCAAACTTTCCCCGGAGCTGGC 60
Ratte           ------------------------------------------------------------

Pferd           ------------------------------------------------------------
Mensch          GGAGTGTTACAGGGAGACATACAGGATTTAAGAAGCCCATCATGGAGAAGACCTTCAAT- 65
Hund            --------------------------------ATGGACAGTTTGGAGCTGGAGGAGAATA 28
Rind            ------------------------------------------------------------
Maus            GCGGGTCATCCTGTTTGCTCAGCCACTTGGGGAGGTGAGCGTTCGTGCACCCACGGAGGC 120
Ratte           ------------------------------------------------------------

Pferd           ------------------------------------------------------------
Mensch          TACAGAGATAAAAAGTTTTTCTTGTGAACAAGTTACAC-TAGATGGAAGATAACAGACTG 124
Hund            TGGAAAAATGCCTAAAGCAGACTCTAAATAGGATA-AC-TGGAAAAGCCTTGAGAGATCA 86
Rind            ----------CCATTGTCCTCTTGAGGGACGTTTCTGC-TGTTTCTATTCCTGGCTATTG 49
Maus            TGGAGGTGGTGGCTGACACATCAGAGGCATGGACAGACATGGGAAAACTGCTGTGGAGAT 180
Ratte           ------------------------------------------------------------

Pferd           ------------------------------------------------------------
Mensch          AGGAGTGAGCTGCTTCTGACTCGATTAAAAAGGGAGTGAGCCATAACTGGCGGCTGCTCT 184
Hund            C---CTGTGCCACCTTTCAC---GTTTGACCCGGAGGGAACCACAGCTGGAGGCTGCTCT 140
Rind            A--ATAAGACTGCTGTGAACT---CTTGA----GAGTGAGCCGTAGCTGGAGGCTACACT 100
Maus            CCAGGCAAGGGGGTGCAGCCACGGAGAGGA-GGGAGGGAGCCATCACTGGAGGCTGCCCT 239
Ratte           ------------------------------------------------------------

                                                    Primer fwd bp222
Pferd           -------ATGACCTGTCTCAATTCCTCCTCCGACTTAGAAGACAAGATGTGTGAGGGGAA 53
Mensch          TGCGCCAATGAGCCTCCCCAATTCCTCCTGCCTCTTAGAAGACAAGATGTGTGAGGGCAA 244
Hund            TGTGCCAATGAACCTTCCCAATTCTTCCTGCATCTTCGAAGACAAGATGTGTGAGGGGAA 200
Rind            TGTGCCAATGACCTGTCCCAACTCCTCCTGCGTCTTCGAAGACAAGATGTGTCAGGGGAA 160
Maus            TGTGCCAATGAGCCTTCCCAACACCTCTTCTGCCTCCGAAGACAAGATGTGTGAGGGGAA 299
Ratte           -------ATGAGCTTTGCCAATACCTCCTCTACCTTCGAAGACAAGATGTGTGAGGGGAA 53
                       **** *     ***  * ** *    **  ************** **** **
```

```
Pferd          CAAGACCACCATAGCCAGTC---CCCAACTGATGCCCCTGGTGGTAGTCCTGAGCACCAT 110
Mensch         CAAGACCACTATGGCCAGCC---CCCAGCTGATGCCCCTGGTGGTGGTCCTGAGCACTAT 301
Hund           CAAGACCACCATAGCCAACC---CCAAACTGATGCCCCTTGTGGTGTTCCTGAGTGCCAT 257
Rind           TAAGACTGCCCCTGCCAACGATGCCCAGCTGACGCCCCTGGTGGTGGTCCTGAGCACCAT 220
Maus           CAGGACAGCCATGGCCAGCC---CTCAGCTGCTGCCCCTGGTGGTGGTTCTAAGTAGTAT 356
Ratte          CAGGACAGCCATGGCCAGCC---CTCAGCTGCTGCCCCTGGTGGTGGTTCTCAGTAGTAT 110
                * ***  *    ****      *  * ***  ****** *****  * ** **    **

                                  Primer fwd bp321
Pferd          CTCCTTGGTCACAGTGGCGCTCAACCTGCTGGTCCTGTATGCTGTGCGGAGCGAGCGGAA 170
Mensch         CTGCTTGGTCACAGTAGGGCTCAACCTGCTGGTGCTGTATGCCGTACGGAGTGAGCGGAA 361
Hund           CTCCTTGGTCACAGTGGGACTCAACCTGCTGGTCCTGTATGCTGTGCGGAGCGAGCGAAA 317
Rind           CTCCTTGGTCACAGTGGGACTCAACCTGCTGGTCCTGTATGCTGTGCGCAGCGAGCGGAA 280
Maus           CTCCCTGGTCACAGTGGGCCTCAACCTGCTGGTGCTGTATGCAGTGCGCAGTGAGCGCAA 416
Ratte          CTCCCTGGTCACAGTGGGCCTCAACCTGCTGGTGCTGTACGCTGTGCACAGTGAACGCAA 170
               ** * ********** *  ************** ***** ** ** *  ** ** ** **

Pferd          GCTACACACTGTGGGGAACCTGTACATCGTCAGCCTCTCGGTGGCAGACCTGATTGTGGG 230
Mensch         GCTCCACACTGTGGGGAACCTGTACATCGTCAGCCTCTCGGTGGCGGACTTGATCGTGGG 421
Hund           GCTACACACCGTGGGGAACCTGTACATTGTCAGCCTCTCTGTGGCAGACCTGATCGTGGG 377
Rind           ACTACACACCGTGGGGAACCTCTACATCGTCAGCCTCTCAGTGGCCGACCTGATCGTGGG 340
Maus           GCTACACACCGTGGGCAACCTGTACATTGTCAGCCTGTCGGTAGCAGACCTGATTGTAGG 476
Ratte          GCTACACACCGTGGGCAACCTATACATTGTCAGCCTGTCTGTGGCAGACCTGATTGTAGG 230
                ** ***** ***** ***** ***** ******** ** ** ** *** **** ** **

Pferd          AGCTGTTGTCATGCCCATGAACATCCTCTACCTCTTCACGTCCAAGTGGCCCCTGGGCCG 290
Mensch         TGCCGTCGTCATGCCTATGAACATCCTCTACCTGCTCATGTCCAAGTGGTCACTGGGCCG 481
Hund           AGCTGTTGTCATGCCCATGAACATCCTTTACCTCCTCATGTCCAGGTGGTCCCTAGGCCA 437
Rind           GGTGGTCGTCATGCCCATGAACATCCTCTACCTCCTCATGTCTAGGTGGTCCCTGGGGCG 400
Maus           GGCAGTCGTCATGCCCATGAACATCCTCTATCTTATCATGACCAAGTGGTCCCTGGGCCG 536
Ratte          GGCAGTTGTCATGCCCATGAACATCCTCTATCTCATCATGACTAAGTGGTCCTTGGGCCG 290
                *  ** ******** ********** ** **  *** * * * **** *  * ** *

Pferd          GCCTCTCTGCCTCTTTTGGCTTTCCATGGACTACGTGGCCAGCACAGCATCCATTTTCAG 350
Mensch         TCCTCTCTGCCTCTTTTGGCTTTCCATGGACTATGTGGCCAGCACAGCGTCCATTTTCAG 541
Hund           GCCTCTCTGCCTATTTTGGCTTTCTATGGACTATGTGGCCAGTACAGCATCCATTTTCAG 497
Rind           TCCTCTCTGCCTCTTCTGGCTTTCCATGGACTATGTGGCCAGCACGGCATCCATTTTCAG 460
Maus           CCCCCTCTGCCTCTTTTGGCTCTCTATGGATTATGTGGCCAGCACGGCATCCATCTTTAG 596
Ratte          CCCCCTCTGCCTCTTTTGGCTTTCTATGGATTATGTGGCCAGCACAGCATCCATCTTTAG 350
                ** ******** ** ***** ** ***** ** ******** ** ** ***** ** **

                                                Primer rev bp375
Pferd          TGTCTTCATCTTGTGCATTGATCGCTATCGCTCGGTCCAGCAGCCCCTCAGATACTTGAG 410
Mensch         TGTCTTCATCCTGTGCATTGATCGCTACCGCTCTGTCCAGCAGCCCCTCAGGTACCTTAA 601
Hund           TGTCTTCATCTTGTGCATTGATCGTTACCGCTCTGTCCGGCAGCCCCTCAGATACCTGAA 557
Rind           CGTCTTCATCTTGTGCATTGACCGCTACCGTTCTGTGCAGCAGCCCCTCAAGTACCTGCG 520
Maus           TGTCTTCATCCTGTGTATTGATCGCTACCGCTCTGTCCAGCAACCCCTCCGGTACCTGAG 656
Ratte          CGTCTTCATCCTGTGTATTGATCGCTACCGCTCCGTCCAGCAACCCCTCCGGTACCTGAG 410
                ********* **** ***** ** ** ** ** ** * *** ******   *** *

                        Primer rev bp423
Pferd          GTATCGTACCAAGACCCGAGCATCAGCCACCATCTTGGGGGCCTGGTTTCTGTCCTTCCT 470
Mensch         GTATCGTACCAAGACCCGAGCCTCGGCCACCATTCTGGGGGCCTGGTTTCTCTCTTTTCT 661
Hund           GTATCGTACCAAGACCCGAGCATCAGCCACCATCTTGGGGGCCTGGTTTCTCTCCTTCTT 617
Rind           GTATCGTACCAAGACCCGAGCATCCATCACCATCCTAGCCGCCTGGTTTCTCTCCTTCCT 580
Maus           GTATCGAACCAAGACCCGTGCTTCAGCTACCATCCTGGGGGCCTGGTTTCTCTCCTTCCT 716
Ratte          GTACCGAACCAAGACCCGGGCTTCCGCTACCATCCTGGGGGCCTGGTTCTTCTCCTTCCT 470
               *** ** ********** ** **    *****  * *  ********  * ** **  *

Pferd          GTGGGTTATTCCCATTTGGGGCTGGCATCACTTCGTGTCACAGACCTGGAATCGCCAGGA 530
Mensch         GTGGGTTATTCCCATTCTAGGCTGGAATCACTTCATGCAGCAGACCTCGGTGCGCCGAGA 721
Hund           GTGGATTATTCCCATTCTGGGATGGCATCACTTTATGTCACAGACCTCAGGACACCGGGA 677
Rind           GTGGATTATCCCCATTCTGGGCTGGCGTCACTTCCAGCCAAAGACCCCAGAGCCCCGGGA 640
Maus           GTGGGTTATACCTATACTTGGCTGGCATCACTTCACGCCCCTGGCCCCAGAGCTTCGGGA 776
Ratte          GTGGGTTATACCCATACTTGGCTGGCATCACTTCATGCCCCCAGCCCCAGAGCTTCGGGA 530
               **** **** ** **    ** ***  ******   *       **      *  *  **
```

Primer rev bp550

```
Pferd          GGACAAGTGTGAGACAGACTTCTATGATGTCACCTGGTTCAAGATCATGACCGCCATCAT 590
Mensch         GGACAAGTGTGAGACAGACTTCTATGATGTCACCTGGTTCAAGGTCATGACTGCCATCAT 781
Hund           AGACAAGTGTGAGACAGACTTCTATGATGTCACCTGGTTCAAGATCATGACTGCCATCAT 737
Rind           GGACAAGTGTGAGACGGACTTCTACAACGTCACGTGGTTCAAAGTCATGACCGCCATCAT 700
Maus           AGATAAGTGTGAGACAGATTTCTACAATGTCACTTGGTTCAAGATCATGACCGCCATCAT 836
Ratte          AGACAAGTGTGAGACAGACTTCTACAATGTCACTTGGTTCAAGATCATGACTGCTATTAT 590
                ** ********** ** *****  * ***** ********  ******* ** ** **

Pferd          CAACTTCTACCTGCCCACCTTGCTCATGCTATGGTTCTACACCAAGATCTACAAGGCTGT 650
Mensch         CAACTTCTACCTGCCCACCTTGCTCATGCTCTGGTTCTATGCCAAGATCTACAAGGCCGT 841
Hund           CAACTTCTATCTGCCCACCTTGCTCATGCTCTGGTTCTATGCCAGGATCTACAAGGCTGT 797
Rind           CAACTTCTACTTGCCCACCTTGCTCATGCTCTGGTTCTATGCCAAGATCTACAAGGCTGT 760
Maus           CAACTTCTACCTCCCCACTTTGCTCATGCTGTGGTTCTATGTGAAGATCTACAAGGCTGT 896
Ratte          TAACTTCTACCTCCCCACTTTGCTTATGCTGTGGTTCTATGTGAAGATCTACAAGGCTGT 650
                ********  * ***** ***** ***** ********    * ************ **

Pferd          ACGGCAGCACTGTCAGCACCGAGATCTCATCAACGGATCCCTCCCTTCCTTCTCTGACGT 710
Mensch         ACGACAACACTGCCAGCACCGGGAGCTCATCAATAGGTCCCTCCCTTCCTTCTCAGAAAT 901
Hund           ACGGCAGCACTGTCAGCACCGAGAACTCATCAATGGATCCCTCCCTTCCTTCTCTGAACC 857
Rind           GCGGCAGCACTGCCAGCACCGGGAGCTCATCAACGGGTCCTTCCCCTCCTTCTCTGACAT 820
Maus           GCGGCGACACTGTCAGCACCGCCAGCTCACCAACGGGTCCCTCCCTACCTTTTTAGAAAT 956
Ratte          GCGGCGACACTGTCAGCACCGCCAGCTCACCAACGGGTCCCTCCCTTCCTTTTCAGAACT 710
                ** *  ***** ********  * **** ***  * *** ****  **** *  **

Pferd          TAAGCTGAAGCCAGAGAATCCCAAGGTGGATGCTAAGAAATCAG---AGGAGTCTCCCTG 767
Mensch         TAAGCTGAGGCCAGAGAACCCCAAGGGGGATGCCAAGAAACCAGGGAAGGAGTCTCCCTG 961
Hund           TAAGCTGAAGCCAGAGAACCCCAAGGCAGGGGCCAAGAAACCAGGGAAGGAGTCTCCTTG 917
Rind           GAAGATGAAGCCGGAGAACCTCCAGGTGGGCGCTAAGAAACCGGGGAAGGAGTCCCCCTG 880
Maus           CAAGCTGAGGTCGGAGGATGCCAAAGAGGGTGCCAAGAAACCTGGGAAAGAGTCTCCCTG 1016
Ratte          CAAGCTGAGGTCAGACGATACCAAGGAAGGTGCCAAGAAACCTGGGAGAGAGTCTCCCTG 770
                *** *** * * **  *   * * *  *  ** ****** * *     ***** ** **

Pferd          GGAGGTTCTGAAAAGGAAGCCAAAAGATGCTGGTGGTGGATCTGTCTTGAAGCTACCATC 827
Mensch         GGAGGTTCTGAAAAGGAAGCCAAAAGATGCTGGTGGTGGATCTGTCTTGAAGTCACCATC 1021
Hund           GGAATTTCTGAAAAGGAAGTCAAAAGATGCCAGTGGTGAGCCTGTCTTGAAGCCACCATC 977
Rind           GGAGGTTCTGAAAAGGAAGCCAAAAGACACCGGGGGTGGACCTGTCTTGAAGCCACCATC 940
Maus           GGGGGTCCAGAAGAGGCCGTCAAGAGACCCTACTGGAGGTCTGGATCAGAAGTCAACATC 1076
Ratte          GGGGGTTCTGAAAAGGCCATCAAGAGACCCCAGTGTAGGACTGGATCAGAAGTCAACATC 830
                **   * * *** ***    *** ***  *    *  *     *    ****  * ****

Pferd          TGAAGACCCAAAGGAGATGAAGTCCCCAGCTGTTTTCAGCCAAGAGGAGGT--------- 878
Mensch         CCAAACCCCCAAGGAGATGAAATCCCCAGTTGTCTTCAGCCAAGAGGATGA--------- 1072
Hund           CCAAGATTCAGAGGAGATGAAATCCCCAAGTGTCTTCCGTCAAGAGGAGGA--------- 1028
Rind           TCAAGAGCCAAAAGAGGTGACATCTCCAGGTGTCTTCAGCCAAGAGAAGGAAGAGAAGGA 1000
Maus           TGAAGACCCCAAGG---TGACCTCTCCGACTGTCTTCAGCCAAGAGGGGGA--------- 1124
Ratte          TGAAGACCCCAAGA---TGACCTCTCCAACTGTCTTCAGCCAAGAGGGGGA--------- 878
                  **    *  *     ***  ** **   *** *** * ******   *

Pferd          TGGAGAAGTAGACAACCTCCACTGCTTCCCACTTAACACTGTGCAGATGCACACTGAGGC 938
Mensch         TAGAGAAGTAGACAAACTCTACTGCTTTCCACTTGATATTGAGCACATGCAGGCTGCGGC 1132
Hund           CAGAGAGGTGGACAAACTCCAGTGCTTTCCACTTAACATTGTGCAGGTGCAGACTGAGGC 1088
Rind           TGGAGAACTGGGCAAATTCTACTGCTTCCCGCTTGACACTGTGCAGGCGCAGCCGGAGGC 1060
Maus           AAGGGAAACAGTCACACGCCCCTGTTTCCGTCTTGACGTCATGCAGACACAGCCTGTGCC 1184
Ratte          AAGGGAAACA------CGTCCCTGTTTCCGTCTCGACATCATGCAGAAACAGTCTGTGGC 932
                  * **               ** ** *  **  *      ***    **  * * * *

Pferd          AGAGGGGAATGACAGGGGCTACGTAGCCATCAACCAGAGCCAGAGCCAGCTTGAGATGGG 998
Mensch         AGAGGGGAGTAGCAGGGACTATGTAGCCGTCAACCGGAGCCATGGCCAGCTCAAGACAGA 1192
Hund           AGAGGGGAGTGTCAGGAGTTACGTAGCTATCAACCAGAGCCAGAGCATGCTTGAGATGGA 1148
Rind           AGAGGGGAGTGGCAGGGGCTACGCAACCATCAACCAGAGCCAGAACCAGCTTGAGATGGG 1120
Maus           TGAGGGAGATGCCAGGGGCTCAAAGGCCAATGACCAGACCTTGAGCCAGCCCAAAATGGA 1244
Ratte          TGAGGGAGATGTCAGGGGCTCAAAGGCCAATGATCAGGCCTTGAGCCAGCCCAAAATGGA 992
                *****   *  ****   *      *     * * *  *     *  **   * *  *
```

```
Pferd          TGAGCAGGGCCTGAACATG---CGTGAGGCCAACGAGATGCCAGAGGATCAGATCCTGGG 1055
Mensch         TGAGCAGGGCCTGAACACA---CATGGGGCCAGCGAGATATCAGAGGATCAGATGTTAGG 1249
Hund           TGAACAGGGTCTGAACATG---CGTGGGGCCAATGAGACATCAGAGGATCAGATCCTAGG 1205
Rind           TGAGCAGGGCCTGAGCATG---CCTGGGGCTAAGGAGGCCTTAGAGGATCAGATCCTAGG 1177
Maus           TGAGCAGAGCCTGAGTACTTGCCGGCGGATCAGTGAGACATCAGAGGACCAGACCTTGGT 1304
Ratte          TGAGCAGAGCCTGAATACTTGTCGGCGGATCAGTGAGACATCAGAGGATCAGACCTTGGT 1052
               *** *** * ****  *     *    *   *  ***     ****** ****   * *

                        Primer fwd bp1063
Pferd          TGACAGCCCATCCTTCTCCCAGAC---AGACTTAGACACCCCCCCAGAGCCAGCATCTGG 1112
Mensch         TGATAGCCAATCCTTCTCTCGAAC---GGACTCAGATACCACCACAGAGACAGCACCAGG 1306
Hund           TGATAGCCAGTCTTTCTCTCGGAC---AGACTCAGACACCCCCACAGAGTCAGGATCAGG 1262
Rind           TGACAGCCAGTCCTTCTCCCGGAC---AGACTCGGACACCCCCGCAGAGCCGGCACCAGC 1234
Maus           GGATCGACAGTCCTTCTCCCGGACCACAGACTCAGACACCAGCATAGAGCCAGGGCTGGG 1364
Ratte          GGATCAACAGTCCTTCTCCCGGACCACAGACTCAGACACAAGCATAGAGCCAGGGCCGGG 1112
                **    *  ** ***** *  **    ****  ** **   *  **** * *     *

Pferd          GAAAGGCAAACCGAGAGGTGGGTCTAACACAGGCCTGGATTACATCAAGTTCACTTGGAA 1172
Mensch         CAAAGGCAAATTGAGGAGTGGGTCTAACACAGGCCTGGATTACATCAAGTTTACTTGGAA 1366
Hund           GAAAGGGAAACCTAGAAGTGAGTCTAGCACAGGCCTGGATTATATCAAGTTCACTTGGAA 1322
Rind           GAAAGGCAAGTCGCGAAGCGAGTCTAGCACAGGCCTGGAGTACATCAAGTTCACTTGGAA 1294
Maus           CAAAGTCAAAGCGAGAAGCAGGTCTAACAGTGGCCTGGACTACATCAAAGTCACCTGGAA 1424
Ratte          CAGAGTCAAATCGAGAAGCGGGTCTAACAGTGGCCTGGATTACATCAAAATCACCTGGAA 1172
                * **  **     *  *   ***** **  ******** ** *****  * ** *****

                                                        Primer fwd bp1214
Pferd          GAGGCTCCGCTCACATTCGAGACAGTGCGTGTCTGGGTTGCACATGAACCGAGAACGGAA 1232
Mensch         GAGGCTCCGCTCGCATTCAAGACAGTATGTATCTGGGTTGCACATGAACCGCGAAAGGAA 1426
Hund           GAGGCTCCGCTCACATTCAAGACAATATGTGTCTGGGTTACACATGAACCGAGAACGAAA 1382
Rind           GAGGCTCCGCTCGCATTCGAGACAGTACGTGTCTGGCTTGCACATGAACCGAGAGCGGAA 1354
Maus           GAGGCTTCGCTCACATTCCAGACAGTATGTGTCCGGGTTGCACTTGAACCGAGAGCGGAA 1484
Ratte          GAGGCTCCGCTCACACTCCAGACAGTATGTGTCCGGGCTGCACTTGAACCGAGAGCGGAA 1232
               ****** ***** ** ** ***** *  ** ** **  * *** ******* **  * **

                                        Primer fwd bp1259
Pferd          GGCTGCCAAACAATTGGGGTTTATCATGGCAGCCTTCATCCTTTGCTGGATTCCTTACTT 1292
Mensch         GGCCGCCAAACAGTTGGGTTTTATCATGGCAGCCTTCATCCTCTGCTGGATCCCTTATTT 1486
Hund           GGCTGCCAAACAATTGGGTTTTATTATGGCGGCCTTCATCCTTTGCTGGATTCCTTACTT 1442
Rind           GGCCGCCAAGCAGTTGGGTTTTATCATGGCGGCCTTCATCATCTGCTGGATTCCTTACTT 1414
Maus           GGCAGCCAAGCAGTTGGGTTGTATCATGGCAGCATTCATTCTCTGCTGGATTCCCTATTT 1544
Ratte          GGCAGCCAAGCAGTTGGGTTTTATCATGGCGGCCTTCATTCTCTGCTGGATTCCCTATTT 1292
               *** ***** ** ***** * *** ***** ** *****  * ******** ** ** **

                 Primer rev bp1488
Pferd          CATCTTCTTCATGGTTATTGCCTTCTGTAAGAGCTGTTGCAATGAGCATGTACACATGTT 1352
Mensch         CATCTTCTTCATGGTCATTGCCTTCTGCAAGAACTGTTGCAATGAACATTTGCACATGTT 1546
Hund           CATCTTCTTCATGGTCATTGCTTTCTGCAAGAGCTGTTGCAATGAGCGTGTGCACATGTT 1502
Rind           CATCTTCTTCATGGTCATTGCCTTCTGTGAGAGCTGCTGCAACCAGCATGTGCACATGTT 1474
Maus           CATCTTCTTCATGGTCATTGCCTTCTGCAACAGCTGCTGCAGCGAACCTGTGCACATGTT 1604
Ratte          CATCTTCTTCATGGTCATTGCCTTCTGCAAGAGCTGCTGCAGTGAACCCATGCATATGTT 1352
               *************** ***** *****  * * *** ****   * *   * ** *****

Pferd          CACCATCTGGCTGGGCTACATTAACTCCACACTGAATCCCCTCATTTACCCTTTGTGCAA 1412
Mensch         CACCATCTGGCTGGGCTACATCAACTCCACACTGAACCCCCTCATCTACCCCTTGTGCAA 1606
Hund           CACCATCTGGCTGGGCTATATCAACTCCACGCTGAACCCCCTCATTTATCCCTTATGCAA 1562
Rind           CACCATCTGGCTGGGCTACATCAACTCCACGCTGAACCCCCTCATCTACCCCTTGTGCAA 1534
Maus           CACCATTTGGCTGGGCTACATCAACTCCACGCTGAACCCCCTCATCTACCGCTGTGCAA 1664
Ratte          CACCATTTGGCTGGGCTACATCAACTCCACGCTGAACCCCCTCATCTACCCCCTGTGCAA 1412
               ****** *********** ** ******** ***** ******** ** **  * *****

                    Primer rev 1611
Pferd          TGAGAACTTCAAGAAGACGTTCAAGAAAATCCTGCACATTCGCTCCTAA---------- 1461
Mensch         TGAGAACTTCAAGAAGACATTCAAGAGAATTCTGCATATTCGCTCCTAAGGGAGGCTCTG 1666
Hund           TGAAAACTTCAAGAAGACATTCAAGAAAATTCTGCACATTCGCTCCTAAGGGAGGCGACC 1622
Rind           TGAGAACTTCAAGAAGACCTTCAAGAAAATTCTGCACATTCGTTCCTAGGAGAGACTCCC 1594
Maus           CGAGAACTTCAAGAAGACATTCAAAAAAATTCTGCACATTCGTTCCTAAGGGC-ATGTCC 1723
Ratte          CGAGAACTTCAAGAAGACATTCAAAAAGATTCTGCACATTCGTTCCTAA---------- 1461
               ** ************** ***** *  ** ***** ***** *****
```

```
Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         AGGGGATGCAAC-AAAATGATCCTTA-----TGATGTCCAACAAGGAAATAGAGGACGAA 1720
Hund           AGGGGTTGCAACCAAAGTGACACTTA-----GGATGGTCCCGAAGAAAACAGAGGATGAA 1677
Rind           AGGGGATGCAGC-CAAGTGACGCTTAC----TGATGTCCCTGAAGGAAGTGAAGGAGGAA 1649
Maus           AAAGGATGCCACATGGTGGATAGACAACGTCTGATGTCCAAGAGGGAGCCAGAGGAAGAA 1783
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         GGCCTGTGTGTTGCCAGGCAGGCACCTGGGCTTTCTGGAATCCAAACCACAGTCTTAGGG 1780
Hund           GGCCTGTGAGTTGCCAGGCA----CCTGGGCTTTCTGGAGTCAGAAGAATAGTCTTAAAG 1733
Rind           GCCTGTTGCGTTGCCAGGCA----CCTGGGCCTTCTGGAGTCGGAAGAATGGTCTTAGGG 1705
Maus           AGCATGGGCGTCGCTAGACC----CCTGAGCCTTAGGAAGTGGAATCGAAGGTCCT--GG 1837
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         GCTTGGTAGTTTGGAAA-GTTCTTAGGCACCATAGA-AGAACAGCAGATGGCGGTGATCA 1838
Hund           ACTAGGTAACTTAGAAA-GTTCTTAGGCACCATTGACAGAACAGCAGATGGCAGTGGTCA 1792
Rind           GCTGGGGAGTTTGGAAG-GTTCGTAGGCGCAGTGGGAAGAACAGCAGATGGTGGTGGTCA 1764
Maus           GCTGAGCAGTGTGAAGGCATTCCCAGGGTCTGTCAGAAGGAAAGCAGG----------CA 1887
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         GCAGAGAGATTGAACTTTGAGGAGGAAGCAGAATCTTTGCAAGAAAGTCAGACCTGTTTC 1898
Hund           ACAGAGAGA-----------------GCAGGATGTATCCAAGAC--------------- 1819
Rind           GCAGAGAGATTGTACTCTGAG-----AGCCGAATGTTTGCAAGAG--------------- 1804
Maus           GCAGAGCAATTGTACCCTGGGTAGAAAGCAGAGCATCTGAAAGA---------------- 1931
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         TTGTAACTGGGTTCAAAAAGAAAAAAATAATAAAAATAAAAGAGAGAGAGAATCAGACCT 1958
Hund           ----------------------------------------------AATCGGATCT 1829
Rind           ----------------------------------------------ACTCAGATCT 1814
Maus           ------------------------------------------------------GACCC 1936
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         GGGTGGAACTCTCCTGCTCCTCAGGAACTATGGGAGCCTCAGACTC--ATTGTAATTCAA 2016
Hund           GGATG-AGTTCTCCTGCTCCTCAGGAAATGTGAGAGCCTCAGACTCTCAATGTAATTCAA 1888
Rind           GTCCA-AGCTCTCCTGTTTCTCGGGAA-TGTGGGGGCCTCAGGCTCACACTCTAATTCCA 1872
Maus           AGGCAGAGCACGCCTGGCCCTCAGGGACTGTGGGAGTCTCAGATACTCCTTGGAAGTCAA 1996
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         GCTTTCCGAGTC-AA-GTGATTGACAACTGAAG---AGACACGTGGCTAGGGTTCCACTG 2071
Hund           GCTTGCAGACTGGAA-TTAATTGGAAACTG------------------------------ 1917
Rind           GCTTTCACACTCAAA-TTATTGGGCGACTCAAG---GGACCTGTGGGTAGAGTTCCAGTG 1928
Maus           AGTCTCTGACTTGAAGTTCCTTAGTAACCGAAGTGGGAATGTGTGGCTACAGTTCTTCTG 2056
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         GAGAATTGAAAAGGACTCTTGAGCCCTCCTGGAATGGAGCTGTATAACTGTG---CAGAG 2128
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           GA-------------CTCTGGAGCCTTCTTCAAATGGAGCTCCACGTCTGTGGAGCAGAG 1975
Maus           GAGAGTTAGCCTGGACTC---AGACTTCCTGAACAAAAGCTATGTGACTG-----CAGAG 2108
Ratte          ------------------------------------------------------------
```

```
Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         ACTTTATCCATGCCAATAGTTGCTGTCCCCTTCCAGGGGTCACCTTGAGAGGCATGACAG 2188
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           ACCTTAGACATGCAGATAGATGCTGTCCCTGACC-GGGGTCACCTTGAAAGGCAGGACAG 2034
Maus           G-------CAGGTATACGGATGCTGTCCCCTTCCAGTGGTCACCTGGAGAGGTATGGCAG 2161
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         CTGTTCCACAGGGGCTATCCCTTCTCAGAAAACTTCTCTTCTGAGCCTC-----TTTAAC 2243
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           CTACTCCACTGTGACTGCCACATCTCAGAACACCTCTCTTCTGAGCCTC-----TTTTGC 2089
Maus           CTATTCCATTGCAGCCG-CACTTCTTAAAACACAGTCCTTCTGAGCCTCGCCTCTCTTAG 2220
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         AGCTTTCTCCAGAACCAGTGTCTGAACCACCCTGGA-AATTCTGCCTTATTATTTCTTAC 2302
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           AGCTTTCTCCAGATCCAGTGCCTGAACCACCGTGGCTGATTCCACTGTATTATTTCTCAC 2149
Maus           AGCTTTGTCCGGAGC---TGTCTGCCCCACCGTGG---AACCTGCCTTACCCGTGTCT-- 2272
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         TCAA--ACATGTTTAGAGTGGATAGAAAATTATGCAGCTTGCACACCCATCGTCTTTAAC 2360
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           TCATGCACATCTTAAGAGTTGATGGGAAATGATGCAGTCTGCACATCCATCATTTTCAAA 2209
Maus           -------------CAGAGTTGCTAGGAAATTAGGCAGCTTGTGAGTCCATCATTTTCAAC 2319
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         CCCAAATTTCCTTTGGCTATTAAAAAAGTGG-----TGGCAAAAGGCATCCTCAAA---- 2411
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           CCCAAATTCCATTCTCCTATTAAAGAAGAGG-----T--TAAATGCCTCCCTCAAA---- 2258
Maus           CCTTAGTTCTTTTGGCTTTTTAAAATGGTGGCACAGTAACAAAACCTGTCCTCAAGTGTC 2379
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         AGAAAGAGAAATGAAATATTTTTGAATGGTTGCACGTTAA---AAATTAAAAGA-AGGAA 2467
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           GAGAAAAGGAATAT----TTTTTAGATGGTTGTATATTAG---AAACGAAAAAAGAGGAG 2311
Maus           AAGAAGGGGAGGAAGTGGTTTCTCCACGGTTGTATTTTAAGCAAAGGTGAGGCAAGAGAG 2439
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         TGGGG-GCAGAATGCCATATTTTTGAGGGCTGTACTAGGTTTATCTCATTTAAGCCCCAC 2526
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           TGGGGAGAAGAAAGCCAATTGCTTGAGGGCTGTGCCAGGTTGATGTCATTTAAGCCCCAT 2371
Maus           CCTTGTTTCTTAAGACTCCACCAGGGCACTCTCACTCCAGGCCTCACATGACAAGCGGGT 2499
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         AACACCCCACAGGAGGGTAATTTTCTAACTCTAGTTTGCAGAGGAGCAAATTGAGGTTCA 2586
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           GACACCCCACAACAGGAGAATGGT---------GTTATGAGAAAAGCAAAG-GAGGAACA 2421
Maus           AACAGCCAAGGGAAAAGAAGGTTCCTGGGATCATTTGACACTTGGAAACTTGGGATGAGA 2559
Ratte          ------------------------------------------------------------
```

```
Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         GCAAGGTGAGAGA-GGTACCCAAGGTCACATAGCTAGTTATGTGAGAAAGTTAGA----- 2640
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           GCGAGGTGCAAGAAGGGACCTGAGATCACACAACTAGTTATA--AGAAAGCTGGA----- 2474
Maus           ACTTTGTATGGTC-CCAACTCCTTGTCACTCGCCTTCTCCAAAAAGGAAGAAATGACCCC 2618
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         ------------GTACAGATCCTCTGGGGTTTTCAGCTTATTGTAGCATATTT------- 2681
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           ------------GCAAACATCCTGTGG---CTTCAACTCACTGTAACACATTT------- 2512
Maus           TGTCATGTACTCGCAATGTTCCCCGGGAGACGTGACTGTCACGAAGCACATCTGTCCACA 2678
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         --------TCTCCGAAAGGCAAAAATGTGCCCTTTTGGCCGGGCATGGTAGC-------T 2726
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           --------TCTCCAAAAGGCAAAAATTTGTTCTATTCAGTATACACACACAC-------A 2557
Maus           GAGGGTGACCTTCAGAAGGGACACATGTGCTTTTCTCTGTGAGACTGTGTGGCTTCTAGT 2738
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         CAAGCCTATAATCCCA-GCATGTTGAGAGGCTGA-GGTGG--GCAGATCATTTGAGGCCA 2782
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           CACACACACACACACACACATTCATAATGCCTGACAGTGGTGGCAGTTCACAGGAGTATA 2617
Maus           CACACATGCTAAGTGAATCCTGTTGAAGGCATGGGAGCGTCCAGTTTTATTTATGCCACA 2798
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         G-GAGTTCAAGACCAGT----CTGGCCAATATGGAGAAACCTTGTCTCTACTAAAAACAC 2837
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           TTGAGAGGAAGAACAGC----TGACATAGAATGTGGCCACAGAGGTGATACTTGAAGAAG 2673
Maus           GTTGGGTTGTGATTTGTGTTTTAAAATGTAATGTTAAACATCTATGTGTGTCACAAGTAG 2858
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         AAAAATTATCTGGGCATGGTGGGGCATGCCTGTAGTCCCACTTACTTGGGAGGCCGAGGC 2897
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           GAACAGTATACTTTTTCATCTGGGAATTCTGCTGTGTTTATCCAAGAAACATCATCATGT 2733
Maus           GAACCCCTGTAAAAGCTGGTCTTTTGTGTCTGTGTTCCTGTTTGCATGATCTGTCCAAAC 2918
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         ACGAGAATCGCTTGAACCCGGGAGGTGGAGGTTGCCGTGA-GCCAAGATCACGCCACTGC 2956
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           ACTTTTATGGTCATACTTTTTAAGTCAAAACTTACAAAGG-AATGGGAACAGGCAGTTTT 2792
Maus           GAGATATTTTTGCTTACCTAAAACATGACATTCGGAAGGATACTGTTACAGGGCTGCTTT 2978
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         ACTCCAGCCTGGGCAACAGAGCAAGACTCTGTCTCAAAAAAAAAAAATACAATATTTTAA 3016
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           AG-CTGGTGTTTATGTTGCAATCTGGTTGTGATTTATATGCTAAAACTGGAT--GTTAAA 2849
Maus           CTGTCTACTTTTCTGAGTCTCAAAGGCTGGGGG--AACAGGTGGAAATGAAAGCCTGACA 3036
Ratte          ------------------------------------------------------------
```

```
Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         CAATGTGCCCTCTTAAGTGTGCACAGATACACATACACGGTATTCCCAAGAGTGGTGG-C 3075
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           CTGTAATACATGTAGCCAGTGGGAGTGTCTGTACAAGCTGGTGTTTTATGTCTCGTGTTC 2909
Maus           AGGATTTCTCTCTGGTTTCTACTCAAATTTATAAATGTC-CTCTAAAAGGACTTTTGTAC 3095
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         AGCTCAAA-ATGATATGTTTGAGTAGACGAACAGCCGACATGGAGTTCCCGTGCACCTAC 3134
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           CTGTTTGC-ATGATCTGTTAAAATGAGAGATTTTTACCTACTAAAATATGAT-------- 2960
Maus           GGGATGGCCATGGCCAACCCTCAGCTTCTGCCCCTGGTGGTGGTTCTAAGAAGCATCTTA 3155
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         GGAAGGGGACGCTTTGAAGGAACCAAGTGCATTTTTATCTGTGAGTTCTGTTGTGTTTGT 3194
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           ------------------------------------------------------------
Maus           CTCCTTCTTGCATCCTGGGACACTCTTTATGCTCAAGCTTGGGGGGTCTTTGGGCTATGC 3215
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         CAAAAAGTCATTGTAATCTTTCATAGCCATACCTGGTAAGCAAAAACTAGTAAAGACATA 3254
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           ------------------------------------------------------------
Maus           TGAGAAAGGAGCTTTGACTTGGGT--CTGACAAGGACAAAGAGGGATCAGTGAATACAAG 3273
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         GGAACATGCAGTTTTACTTGGTGTTTATGTTGCAATCTGGTTGTGATTTATATTTTAAAG 3314
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           ------------------------------------------------------------
Maus           TCTTCCGCTAAGGAACATATGATGCCCTGTGACAATGCTCAGAGTTTCCAACTCTTACAA 3333
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         CTTGGTGCTAAACCACAATATGTATAGCACATGGAGTGCCTGTACAAGCTGATGTTTTGT 3374
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           ------------------------------------------------------------
Maus           AGGAGGCTTTCACGTGAACCTAAAAATAA----AGACATTGGGCTGGGGTGATGGCTTGG 3389
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         ATTTTGTGTTCCTCTTTGCATGATCTGTCAAAGTGAGATATTTTTACCTGCCTAAAATAT 3434
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           ------------------------------------------------------------
Maus           TGGTTAAGCGCATTGCTTAATCATATAGAGGACCCAGGTTCAGTTCCCACCTCCTACATA 3449
Ratte          ------------------------------------------------------------

Pferd          ------------------------------------------------------------
Mensch         GATGTTTAAAAGCATAAAAAAAAAAAAAAAA---------------------------- 3465
Hund           ------------------------------------------------------------
Rind           ------------------------------------------------------------
Maus           GCAACTCACAAGTATTTATAACACTAGTTCCAGGGGATCCAACCCCTTCTTCTAGTCTCC 3509
Ratte          ------------------------------------------------------------
```

```
Pferd           ------------------------------------------------------------
Mensch          ------------------------------------------------------------
Hund            ------------------------------------------------------------
Rind            ------------------------------------------------------------
Maus            TCAGGCACAAGGCACACAGTTGGTATACATGCATACCTAAAGGTAACACACACACACACA 3569
Ratte           ------------------------------------------------------------

Pferd           ------------------------------------------------------------
Mensch          ------------------------------------------------------------
Hund            ------------------------------------------------------------
Rind            ------------------------------------------------------------
Maus            CACACACATGAAATAAATATAAAAGGTAAAGTTGGGACTGGAGAGATAGCTCAGTAATTA 3629
Ratte           ------------------------------------------------------------

Pferd           ------------------------------------------------------------
Mensch          ------------------------------------------------------------
Hund            ------------------------------------------------------------
Rind            ------------------------------------------------------------
Maus            CGAACCCTGGCTGCTCTTGTAGAAGATCCAGGTATGGCTTTAGCACACACATGGCAGCTC 3689
Ratte           ------------------------------------------------------------

Pferd           ------------------------------------------------------------
Mensch          ------------------------------------------------------------
Hund            ------------------------------------------------------------
Rind            ------------------------------------------------------------
Maus            ACACCAGTTCCTGAGGATCAGATGCTCTCTTCTGGCCCTGTGGGGAACACACACACACAC 3749
Ratte           ------------------------------------------------------------

Pferd           ----------------------------------
Mensch          ----------------------------------
Hund            ----------------------------------
Rind            ----------------------------------
Maus            ACAGTGCACATACATACAAGGAAAACACTCATAT 3783
Ratte           ----------------------------------
```

9.3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aa	*amino acid(s)*, Aminosäure(n)
Abb	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
bp	*base pairs*, Basenpaare
bidest.	Zweifach destilliert
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat
cDNA	Komplementäre-DNA
cds	*coding sequence*, kodierende Sequenz
Ci	Curie
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eH1	Equiner Histamin H1-Rezeptor
ER	Endoplasmatische Reticulum
FKS	Fötales Kälberserum
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GPCR	Guaninnukleotid
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
h	Stunde
H1R	Histamin H1 Rezeptor(en)
HCl	Salzsäure
HEK	Human Embryonic Kidney cells

HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
IBMX	3-Isobuthyl-1-methylxanthin
hH1	Humaner Histamin H1-Rezeptor
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC_{50}	Halbmaximale Hemmkonzentration
IP_2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
IP_3	Inositoltrisphosphat
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
K_i	Inhibitorische Konstante
LB	Lucia-Bertoni Medium
Lys	Lysin
Min.	Minute
mRNA	*messenger-ribonucleic acid*, Boten-Ribonukleinsäure
m/v	Masse-Volumen-Prozent
NCBI	National Center of Biotechnology Information
PCR	*Polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion
Phe	Phenylalanin
PKC	Proteinkinase C
PLCβ	Phospholipase Cβ
RIA	Radioimmunosassay
RT	*Reverse transcription*, Reverse Transkription
Rt	Raumtemperatur
RNA	*ribonucleic acid,* Ribonukelinsäure
Ser	Serin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TdT	Terminale Deoxynucleotidyltransferase
Thr	Threonin
TM	Transmembraner Bereich
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
v/v	Volumen-Volumen-Prozent
wt	*wildtype*, Wildtyp

9.4 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Ammer für die Bereitstellung des Themas sowie die allzeit gewährte Hilfe sowohl in wissenschaftlichen als auch organisatorischen Fragen.

Herrn Dr. Kuppinger und Elke Fischer danke ich für die Einarbeitung in die Labortechniken, die zur Identifikation der genetischen Sequenz des eH1 notwendig waren.

Vielen Dank an Herrn Thomas Christ und Andrea Wehmeyer, die mich bei den Arbeiten zur pharmakologischen Charakterisierung unterstützt und für Fragen immer ein offenes Ohr hatten.

Bei Herrn Prof. Dr. Seifert und Frau Dr. Strasser aus Regensburg möchte ich mich für die Bereitstellung des humanen Histamin H1 Rezeptors bedanken.

Auch bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Pferdeklinik unserer Fakultät sowie Herrn Univ.-Prof. Gerhards für die freundliche Zusammenarbeit.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Schulz danke ich für die Bereistellung des Arbeitsplatzes.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts bedanke ich mich für die freundliche Zusammenarbeit.

9.5 LEBENSLAUF

BIRGIT WELLMANN

PERSÖNLICHE DATEN

Geboren am 3. Mai 1977 in 73614 Schorndorf (Bad.-Württ.)

Geschwister:	Jochen Wellmann, geb. 1972 Bernd Wellmann, geb. 1974
Eltern:	Karin Wellmann, Kinderkrankenschwester Volkmar Wellmann, Ingenieur für Klimakältetechnik

AUSBILDUNG

08/05 – 02/07	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tiermedizinischen Fakultät LMU München Anfertigung der Dissertationsarbeit
10/99 - 05/05	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilian Universität München Auslandssemester in Lyon Praxissemester am Institut für Mikrobiologie, FU Berlin Und bei Tierärzte ohne Grenzen in Kenia Tierärztliche Prüfung : 12. Mai 2005 Tierärztliche Approbation : 1. Juni 2005
09/97 - 09/99	Ausbildung zur Europa-Sekretärin, European schools for business administration and management Abschluss: Diplom
10/96 - 06/97	Studium der Germanistik und Anglistik Universität Stuttgart
1993 - 1996	Staatliches Internat Schloßgymnasium Künzelsau, Abitur, Scheffelpreis
1987 – 1993	Gottlieb-Daimler Realschule, Schorndorf