

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Pharmakologische Charakterisierung
der murinen Histamin H₁ und H₄ Rezeptoren**

INAUGURAL– DISSERTATION
Zur Erlangung des Grades einer Doktorin
der Veterinärmedizin
-Doctor medicinae veterinariae-
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von
Kaula Saad
Albeida-Libyen

Hannover 2013

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Wolfgang Bäumer,
Institut für Pharmakologie,
Toxikologie und Pharmazie,
Tierärztliche Hochschule Hannover

Prof. Dr. Detlef Neumann,
Institut für Pharmakologie,
Medizinische Hochschule Hannover

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Bäumer

2. Gutachter: P. D. Dr. Stern

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Mai 2013

Die Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium der Libyschen Botschaft gefördert.

*Für Mohamed
und
meine lieben Eltern*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren	3
2.1.1	Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.....	3
2.1.2	GPCR-Signaltransduktion	5
2.2	Histamin	7
2.2.1	Struktur und Biosynthese	7
2.2.2	Histaminrezeptoren	8
2.3	Histamin H ₄ Rezeptor	9
2.3.1	Vorkommen.....	9
2.3.2	Signaltransduktion über den H ₄ R.....	10
2.3.3	Liganden	11
2.3.4	Biologische Funktion des H ₄ R	14
2.4	Allergischentzündliche Hauterkrankungen	16
2.5	Juckreiz.....	18
3	Material und Methoden	20
3.1	Material.....	20
3.1.1	Geräte für molekularbiologische Versuche	20
3.1.2	Reagenzien für molekularbiologische Versuche.....	20
3.1.3	Geräte für Versuche in der Zellkultur	22
3.1.4	Reagenzien für Versuche in der Zellkultur	23
3.1.5	Geräte für <i>In-vivo</i> -Versuche.....	23
3.1.6	Reagenzien für <i>In-vivo</i> -Versuche.....	24
3.1.7	Geräte für die real time RT-PCR	24
3.1.8	Reagenzien für die real time RT-PCR	24
3.1.9	Hergestellte Puffer und Lösungen	25

3.1.10	Histaminrezeptoragonisten/-antagonisten	27
3.1.11	Versuchstiere	27
3.2	Molekularbiologische Methoden	28
3.2.1	Herstellung von hitzekompetenten <i>E. coli</i> -Bakterien	28
3.2.2	Transformation der Plasmide der murine H ₁ R, H ₃ R und pVL1392-murinen H ₄ R in <i>E. coli</i>	28
3.2.3	Reinigung der Plasmide mH ₁ R, mH ₃ R, pVL1392-mH ₄ R aus <i>E-coli</i> (Maxi- DNA-Präparation)	29
3.2.4	Amplifikation von mH ₁ R, mH ₃ R durch Polymerase- Kettenreaktion.....	29
3.2.5	Amplifikation von Signal-Peptid und Flag-Tag durch die PCR	30
3.2.6	Auftrennung der DNA in Agarosegelen	31
3.2.7	Extraktion der DNA aus Agarosegelen	32
3.2.8	Klonierung von PCR-Produkten mit dem pGEM-T Easy Vektorsystem.....	32
3.2.9	Die DNA-Methylierung.....	33
3.2.10	Spaltung der Plasmide pGEM-T-mH ₁ R, pGEM-T-mH ₃ R und pGEM-T-SF Fragmente mit Restriktionsendonukleasen	34
3.2.11	Prinzip des Sf9/Baculovirus-Expressionssystems	35
3.2.12	Restriktionsverdau und Dephosphorylierung vom Vektor pVL1392.....	37
3.2.13	Ligation von DNA-Fragmenten in den Vektor pVL1392	37
3.2.14	Überprüfen des Klonierungserfolgs.....	38
3.2.15	Ligationen der Plasmid pVL1392-SF _{Fragmente} mit mH ₁ R, mH ₃ R	38
3.2.16	Kultivierung der Sf9-Zellen	39
3.2.17	Konservieren der Sf9-Zellen	39
3.2.18	Auftauen der Sf9-Zellen.....	40
3.2.19	Herstellung von rekombinanten Baculoviren durch co-Transfektion in Sf9- Zellen.....	40
3.2.20	Amplifikation rekombinanter Baculoviren	40
3.2.21	Membranpräparation aus Sf9-Zellen	41
3.3	Proteinchemische Methoden	42

3.3.1	Proteinkonzentrationsbestimmung (Biorad)	42
3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	42
3.3.3	Western-Blot	43
3.3.4	Radioligandbindungsstudien an mH ₁ R, mH ₃ R	44
3.4	Zellbiologische Methoden.....	46
3.4.1	Kultivierung von NIH-3T3-Zellen.....	46
3.4.2	Konservieren von NIH-3T3-Zellen.....	46
3.4.3	Transfektion der NIH-3T3-Zellen.....	47
3.4.4	Proteinanalytik	48
3.4.5	SDS-PAGE und Western-Blot	48
3.4.6	RT-PCR (Reverse Transcription PCR).....	49
3.4.7	Migrations-Assay	50
3.5	<i>In-vivo</i> -Versuche an Mäusen.....	51
3.5.1	Versuche zum Kratzverhalten nach Histamin, ST1006 und 4-Methylhistamin Injektion	51
3.5.2	Murine Kontaktallergiemodelle	52
3.5.2.1	Toluen-2,4-diisocyanat (TDI)-Kontaktallergiemodell	52
3.5.3	Versuche zum Kratzverhalten im TDI-Modell	53
3.6	Statistische Auswertung	54
4	Ergebnisse.....	55
4.1	Klonierung der Rezeptoren	55
4.1.1	Amplifikation des mH ₁ R, mH ₃ R, Signal-Peptid und Flag-Tag (SF _{Fragment}) durch PCR	55
4.1.2	Überprüfung des Klonierungserfolges.....	57
4.2	Expression des mH ₁ R und mH ₃ R in Sf9-Zellen	59
4.3	Radioligandenbindungsstudien an mH _x R.....	61
4.4	<i>In-vitro</i> -Versuche.....	61
4.4.1	Überprüfung der Transfektion von NIH-3T3-Zellen.....	61

4.4.2	Expression der Plasmide GFP-mH ₁ R oder GFP-mH ₄ R in transfizierten NIH-3T3-Zellen.....	62
4.4.3	Nachweis des H ₄ R auf mRNA-Ebene in transfizierten NIH-3T3-Zellen	63
4.4.4	Einfluss von Histamin und H ₁ R- und H ₄ R-Liganden auf die Migration der transfizierten NIH-3T3-Zellen.....	64
4.5	<i>In-vivo</i> -Versuche.....	69
4.5.1	Untersuchung des Einflusses von Histamin, 4-Methylhistamin und ST1006 auf das Kratzverhalten von H ₄ R-Knockout- und Wildtyp-Mäusen	69
4.5.2	Einfluss des H ₄ R-Agonisten auf den Hapten-induzierten Juckreiz	72
4.5.2.1	H ₄ R-Agonist ST1006.....	73
4.5.2.2	H ₄ R-Agonist 4-Methylhistamin	73
5	Diskussion.....	75
5.1	Klonierung des murinen H ₁ R und H ₃ R	75
5.2	Expression des murinen H ₁ R und H ₃ R unter Verwendung des Sf9-Zell/Baculovirus-Expressionssystems	76
5.3	Expression von mH ₄ R in transfizierten NIH-3T3-Zellen.....	77
5.4	Einfluss des H ₄ R auf die Migration der transfizierten NIH-3T3-Zellen	78
5.5	Einfluss von Histamin, 4-Methylhistamin und ST1006 auf das Kratzverhalten der Maus	81
5.6	Rolle des H ₄ R in der Allergen-induzierten Juckreizentstehung im Mausmodell	82
6	Zusammenfassung.....	84
7	Summary	86
8	Literaturverzeichnis.....	88
9	Tabellenanhang	105
	Danksagung.....	118

Abkürzungsverzeichnis

±	Plus/Minus
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µmol	Mikromol
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AD	Atopische Dermatitis
ACD	Allergische Kontaktdermatitis
Aqua bidest	Aqua bidestillata
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungweise
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
DC	dendritische Zellen
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	deoxyribonucleotide
GAPDH	Glycerinaldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase
DNCB	Dinitrochlorobenzol
et al.	et alii, und andere
FKS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm oder Erdschwerebeschleunigung
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde(en)

HTMT	Histamin-Trifluoromethyl-Toluidin Dimaleat
H ₁ R	Histamin H ₁ -Rezeptor
H ₂ R	Histamin H ₂ -Rezeptor
H ₃ R	Histamin H ₃ -Rezeptor
H ₄ R	Histamin H ₄ -Rezeptor
His.	Histamin
IP3	Inositoltriphosphat
JNJ	JNJ7777120
KD	Dissoziationskonstante
Ki	Inhibitionskonstante
l	Liter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MAPKinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minuten
MoDC	Monocyte derived dendritic cells
N	Anzahl der Versuche
NaCl	Natriumchlorid
Nmol	Nanomol
PBS	Phosphat puffered saline
PCR	Polymerase chain reaction. Polymerasekettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
RT-	Reverse Transkriptase
sec.	Sekunde(en)
SEM	Standard error of the mean/standardfehler
SDS	Natriumdodecylsulfat
Th	T-Helferzellen

TM

Transmembrane Domäne

z.B.

zum Beispiel

ZNS

Zentralnervensystem

1 Einleitung

Nach der Isolierung des Histamins aus Mutterkorn im Jahre 1910 wurden einige Funktionen dieses biogenen Amins im Körper aufgeklärt, insbesondere die Wirkung von Histamin auf die glatte Muskulatur, auf das Herz und auf den Blutdruck (DALE u. LAIDLAW, 1910).

Durch Interaktionen des Histamins mit den vier Histaminrezeptoren entfaltet es seine Wirkung. Die Histaminrezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Der Histamin H₁ Rezeptor (H₁R) kommt im ZNS, den Zellen des Immunsystems wie Mastzellen, Endothelzellen und in glatter Muskulatur vor. H₁R-Antagonisten werden zur Behandlung von allergischen Entzündungen verwendet. Der Histamin H₂ Rezeptor (H₂R) ist wie der H₁R im ZNS und in nahezu allen peripheren Geweben vorzufinden. Die H₂R-Antagonisten hemmen die Magensäureproduktion und werden in der Humanmedizin zur Behandlung von Magenulzera eingesetzt. Der Histamin H₃ Rezeptor (H₃R) ist hauptsächlich im ZNS lokalisiert. Die Antagonisten des H₃R haben vermutlich einen positiven Einfluss auf die Behandlung von kognitiven Störungen, Schlafstörungen und Alzheimer (LEURS et al. 2005). Seit der Entdeckung des Histamin H₄ Rezeptors (H₄R) im Jahre 2000 (ODA et al. 2000) muss die Rolle von Histamin an der Mechanismenentstehung der (allergischen) Entzündung neu untersucht werden. Der H₄R wird von Zellen des Immunsystems z.B. Mastzellen, dendritischen Zellen und basophilen Granulozyten exprimiert. Die Bedeutung von H₄R-Antihistaminika bei der Behandlung von allergischen Erkrankungen ist Gegenstand aktueller Forschungen. Die Klonierung und Sequenzaufklärung der Histaminrezeptoren ermöglichen eine wirksame Entwicklung von Antihistaminika, die zukünftig synthetisch hergestellt werden können. Die pharmakologischen Eigenschaften verschiedener Histaminrezeptoren können unter Verfügbarkeit von Histaminrezeptoren-cDNA durch Verwendung der rekombinanten Systeme untersucht und verglichen werden. In der vorliegenden Arbeit sollen die Histaminrezeptoren H₁R und H₃R der Maus kloniert und ihre Eigenschaften in rekombinanten Systemen unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen betrachtet werden. Die H₁R-, H₃R-Bindungsaffinitäten für [³H] Histamin und [³H] Meypramin werden an der Sf9-Zellmembransuspension bestimmt. Außerdem sollen mithilfe von *In-vitro*-Versuchen Expressionen des murinen H₁R und H₄R durch

Verwendung von transfizierten NIH-3T3-Zellen und pharmakologische Eigenschaften untersucht werden. Der Einfluss von Histamin via H₁R und H₄R auf die chemotaktische Aktivität dieser Zellen ist ebenfalls Gegenstand der Betrachtung. Neben *In-vitro*-Versuchen gehören auch *In-vivo*-Untersuchungen zur Histamin-induzierten Juckreizentstehung sowie die Effekte des H₄R auf den Allergie-induzierten Juckreiz durch Verwendung eines H₄R-Agonisten zu dieser Arbeit. Der Effekt der Blockade des H₄R auf die Allergen-induzierte Juckreizentstehung wurde bereits untersucht. Die aktuellen Forschungen zeigen, dass der Allergie-induzierte Juckreiz im Mausmodell durch Behandlung mit einem H₄R-Antagonisten signifikant gehemmt werden konnte. In dieser Arbeit wird gezeigt, ob ein Agonist des H₄R einen Einfluss auf die Allergie-induzierte Juckreizentstehung hat.

2 Literaturübersicht

2.1 G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren

Etwa 50 % der bekannten Arzneimittel wirken über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Durch die Bindung der Arzneistoffmoleküle an GPCRs werden Signale in das Zellinnere weitergeleitet und die Wirkung des Medikaments vermittelt.

GPCRs sind die größte und vielseitigste Gruppe der Membranrezeptoren. Sie werden auf der Zelloberfläche exprimiert und beinhalten mehr als tausend unterschiedliche Mitglieder, inklusive der Histaminrezeptorfamilie (BOCKAERT J u PIN JP, 1999; HOUGH, 2001; HILL et al. 1997).

GPCRs können durch unterschiedlich Liganden z.B. biogene Amine, Hormone, Neurotransmitter und Nukleotide stimuliert werden. Infolgedessen sind sie für eine Vielfalt biologischer Funktionen wie z.B. Geruch, Sehen, Geschmack, Zellwachstum und Differenzierung, Chemotaxis und Blutdruck-Kontrolle verantwortlich (KOLAKOWSKI, 1994).

2.1.1 Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

GPCRs bestehen aus heptahelikalen Transmembranproteinen, welche die Zellmembran siebenfach durchspannen. Zwischen diesen transmembranären Helices befinden sich drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen. Die transmembranären Helices sind durch diese Schleifen miteinander verbunden (STRADER et al. 1994; BALDWIN, 1993) (siehe Abb. 1).

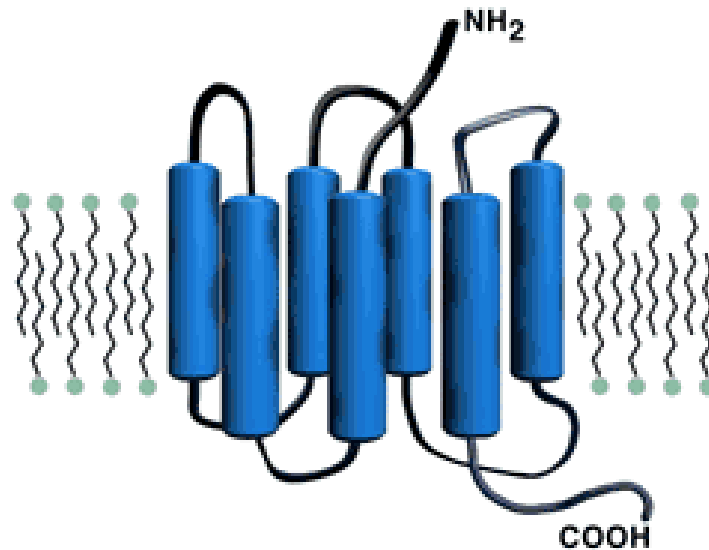


Abbildung 1: Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCRs).

Bildquelle: <http://www.sciencemag.org/content/278/5338/615.full>

Der N-Terminus des Rezeptorproteins liegt extrazellulär und der C-Terminus ist im Inneren der Zelle lokalisiert. Dabei gestaltet die dritte intrazelluläre Schleife einen besonders großen Teil. Dieser spielt eine entscheidende Rolle bei der Kopplung der G-Proteine. Eine Disulfidbrücke, welche die erste und zweite extrazelluläre Schleife kovalent miteinander verbindet, ist bei vielen GPCRs konserviert und dient zur Fixierung der räumlichen Struktur des Rezeptors (BOCKAERT J u PIN JP, 1999).

Aufgrund von Sequenzhomologien werden GPCRs in drei Unterfamilien eingeteilt (STRADER et al. 1994; STRADER et al. 1995):

Familie A:

Die Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren sind die größte Unterfamilie. Deren Mitglieder zeichnen sich durch eine hoch konservierte Disulfidbrücke zwischen der ersten und zweiten extrazellulären Schleife aus und sie sind an der G-Protein-Aktivierung beteiligt. An Rezeptoren dieser Familie binden die unterschiedlichsten Liganden wie biogene Amine, Peptide, Glykoproteine, Lipide, Proteasen oder Chemokine.

Familie B:

Die peptidergen Rezeptoren der Familie B bestehen aus ungefähr 20 verschiedenen Rezeptoren. Diese zeichnen sich durch einen großen extrazellulären N-terminalen Bereich von 100 bis 170 Aminosäuren aus. Alle Peptidhormone wie Glucagon, Calcitonin oder Neuropeptide sowie das Growth Hormon können sich an Rezeptoren der Familie B binden.

Familie C:

Die metabotropen Glutamat-Rezeptoren umfassen eine geringe Anzahl von Mitgliedern. Diese Rezeptoren verfügen über einen sehr langen N-Terminus (500 bis 600 Aminosäuren). Es wird vermutet, dass die Ligandenbindungsstellen der Rezeptoren innerhalb des N-Terminus liegen.

2.1.2 GPCR-Signaltransduktion

Die Signalübertragung von GPCRs wird im Wesentlichen durch heterotrimere G-Proteine vermittelt, die aus drei Untereinheiten (α -, β - und γ) bestehen.

Die Rezeptor-vermittelte Aktivierung eines G-Proteins erfolgt in einer zyklischen Reaktion, die im Folgenden näher beschrieben wird.

1. In der inaktiven Form ist ein Guanosindiphosphat-Molekül (GDP) an die α -Untereinheit gebunden, und die β -, γ -Untereinheit des G-Proteins ist an der Membran verankert (CONKLIN UND BOURNE, 1993; VAN RHEE UND JACOBSON, 1996).

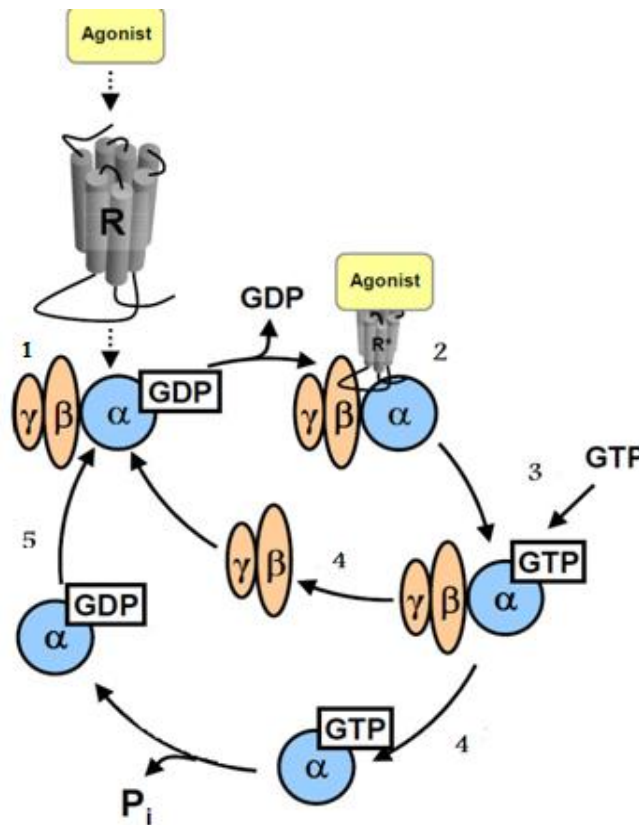


Abbildung 2: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Signaltransduktion (SEIFERT UND WENZEL SEIFERT, 2003).

2. GPCRs beinhalten auf der extrazellulären Seite der Membran eine Bindungsstelle für ein spezifisches Signalmolekül. Die Bindung des Signalmoleküls an den Rezeptoren führt zu einer Konformationsänderung des intrazellulären Anteils des Rezeptors. Diese Veränderung ermöglicht die Bindung und Aktivierung eines G-Proteins über die α -Untereinheit.
3. Die Aktivierung eines G-Proteins über die α -Untereinheit hat den Austausch des GDP durch Guanosintriphosphat (GTP) zur Folge. Dadurch wird die Affinität zwischen Rezeptor und G-Protein wieder herabgesetzt.
4. Nach der Bindung von GTP dissoziiert die α -Untereinheit vom β -, γ -Komplex und wird dadurch aktiviert. Die dissoziierte Untereinheit α , β , γ stimulieren oder blockieren intrazelluläre Effektorproteine. Dabei beeinflussen sie entweder Enzyme wie z.B. die Adenylatcyclase oder Phospholipase C, Guanylatcyclase, cyclisches Adenosinmonophosphat

(cAMP)-Phosphodiesterase, cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP)-Phosphodiesterase oder selektive Ionenkanäle. Weiterhin führt die Aktivierung dieser Effektorproteine zu einer Änderung der Konzentration von intrazellulären sekundären Signalmolekülen wie cAMP, Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) oder Diacylglycerol (DAG). Die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit stoppt in wenigen Sekunden bis Minuten diese Informationsübertragung, wodurch GTP zu GDP hydrolysiert wird.

5. Nachdem das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert wurde, reassoziieren die α -Untereinheit und die β - γ -Untereinheit wieder. Dadurch kommt es zur Wiederherstellung der ursprünglichen inaktiven Form.

2.2 Histamin

2.2.1 Struktur und Biosynthese

Histamin oder 2-(4-Imidazolyl)-Ethylamin ist ein biogenes Amin, welches aus der Aminosäure L-Histidin gebildet wird und als Gewebshormon und Neurotransmitter fungiert.

Histamin kommt in nahezu allen Geweben des Körpers vor und seine Wirkungen sind vielfältig.

Eine zentrale Rolle spielt Histamin bei allergischen Entzündungen und im Immunsystem. Histamin ist als Auslöser von typischen Symptomen der Typ I Reaktion wie Urtikaria, Asthma und Rhinitis bekannt und ist an der Regulation der Magensäureproduktion beteiligt. Im ZNS wirkt Histamin als Transmitter spezifischer histaminerge Neuronen u.a. auf den Schlaf-Wach-Rhythmus, das Gedächtnis und die Appetitkontrolle.

Histamin besteht aus einem fünfgliedrigen Kohlenstoffring mit zwei substituierten Stickstoffatomen, einem Imidazolring mit einer Ethylamin-Seitenkette (siehe Abb. 3).

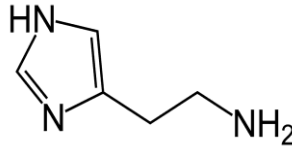


Abbildung 3: Struktur von Histamin

Histamin wird aus der Aminosäure L-Histidin durch oxidative Decarboxylierung mithilfe des Enzyms Histidindecaboxylase gebildet (WEISSBACH et al. 1961).

Dieser Mechanismus kommt in Mastzellen, basophilen Granulozyten, Zellen der Epidermis und der Magenschleimhaut und auch in Nervenzellen vor. In Mastzellen, Endothelzellen und basophilen Granulozyten wird Histamin zu 50 % in Vesikeln durch Bindung an das saure Mucopolysaccharid Heparin als inaktive Form gespeichert (RILEY u. WEST, 1952). Die Freisetzung von Histamin aus diesen Vesikeln ergibt sich aus unterschiedlichen Faktoren, welche die Gewebsmastzellen zerstören, z.B. Gewebshormone oder Arzneistoffe wie Muskelrelaxantien oder Röntgenkontrastmittel (RILEY u. WEST, 1953). Die Histaminfreisetzung durch Stimulation der Mastzellen erfolgt als immunologische Antwort im Entzündungsgeschehen und bei allergischen Reaktionen.

2.2.2 Histaminrezeptoren

Es ist bekannt, dass die verschiedenen Wirkungen von Histamin über die Histaminrezeptoren vermittelt werden. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Verteilung, Funktionen und Signaltransduktion werden die Histaminrezeptoren in vier Gruppen eingeteilt H_1R , H_2R , H_3R und H_4R . In der folgenden Tabelle gibt es einen kurzen Überblick über die Charakteristika der vier verschiedenen humanen Histaminrezeptoren.

Tabelle 1: Überblick über humane Histaminrezeptoren.

Rezeptor	H ₁ R	H ₂ R	H ₃ R	H ₄ R
Aminosäuren	487	359	445	390
G-Protein	Gαq/11	Gαs	Gαi/o	Gαi/o
Physiologische Funktion	Kontraktion glatter Muskulatur, Erhöhung der Kapillarpermeabilität, Regulierung Schlaf-Wach-Zustand	Drüsensekretion, Relaxation glatter Muskulatur, positiv chronotrope und inotrope Effekte	als Autorezeptor (Freisetzung von Histamin), als Heterorezeptor (Regulation der Freisetzung von Neurotransmittern)	Chemotaxis /Zytokin-Chemokin-Produktion von Immunzellen
Pathologische Relevanz	Klassische Symptome einer allergischen Entzündung wie Juckreiz Schmerz, Ödeme, allergische Rhinitis und Asthma	säurebedingte Gastritis, Magen-Darm-Ulzera	kognitive Störungen, Adipoitas, Schlafstörungen, Alzheimer	Entzündung, Juckreiz
Agonisten (Beispiel)	Histaprodifen	Amthamin	(R)-α-Methylhistamin	4-Methylhistamin
Antagonisten (Beispiel)	Dimetinden	Cimetidin	Pitolisant	JNJ7777120

2.3 Histamin H₄ Rezeptor

2.3.1 Vorkommen

Der Histamin H₄ Rezeptor (H₄R) des Menschen wurde in den Jahren 2000 und 2001 erstmals beschrieben (ODA et al. 2000; NGUYEN et al. 2001). Im Laufe der Zeit wurde der H₄R von Maus, Ratte, Hund, Meerschwein und Schwein von verschiedenen Forschergruppen kloniert (LIU et al. 2001b; ODA et al. 2002; ODA et al. 2005; JIANG et al. 2008).

Der H₄R wird aus 390 Aminosäuren gebildet und ist zu etwa 37 bis 43 % mit dem H₃R identisch (LIU et al. 2001a; MORSE et al. 2001). Dieser Rezeptor wird auf Zellen des peripheren Immunsystems wie eosinophilen Granulozyten, T-Lymphozyten, Mastzellen, dendritischen Zellen und Monozyten exprimiert und befindet sich in hoher Konzentration im Knochenmark (ODA et al. 2000b; ZUH et al. 2001; LIU et al. 2001a; HOFSTRA et al. 2003; LING et al. 2004; GUTZMER et al. 2005). Bei der atopischen Dermatitis wird eine hohe Dichte von H₄R auf CD4+T-Zellen exprimiert (GUTZMER et al. 2009). Dem H₄R wird eine wichtige pathogenetische Rolle bei Immunreaktionen, insbesondere bei allergischen Reaktionen und bei Entzündungsgeschehen, zugesprochen. So führt die Stimulation des H₄R zu einer Chemotaxis der Mastzellen und eosinophilen Zellen und zur Kalziummobilisation (HOFSTRA et al. 2003; LING et al. 2004). Bei der Behandlung von allergischen Hauterkrankungen wie der atopischen Dermatitis zeigen der H₁R-Antihistaminika keinen ausreichenden klinischen Effekt. Daher ist der Einfluss des H₄R auf Zellen des Immunsystems, insbesondere auf Zellen, die an der Mechanismusentstehung der (allergischen) Entzündung eine Rolle spielen, und seine Rolle bei allergischen Hauterkrankungen, ein Schwerpunkt aktueller Forschungen.

Der H₄R wurde in niedrigen Expressionsraten in vielen unterschiedlichen Geweben wie Milz, Thymus, Lunge, Herz, Dünn- und Dickdarm nachgewiesen (AKDIS u. SIMONS, 2006).

Im Jahre 2009 konnte die Expression des H₄R im Gehirn von Ratten und Menschen nachgewiesen werden (STRAKHOVA et al. 2009). MORSE et al. (2001) zeigten, dass der H₄R im gesunden Gewebe kaum exprimiert wird. Gleichzeitig wies COGE et al. (2001) mittels RT-PCR eine hohe Expression von H₄R-mRNA im entzündeten Gewebe der Lunge, Leber und Milz nach.

2.3.2 Signaltransduktion über den H₄R

Der Mechanismus der Signalübertragung über den H₄R fängt mit der Bindung des Liganden an den H₄R an. So führt eine seine Stimulation zu einer Aktivierung der Gi/o-Proteine, was über die α -Untereinheit eine reduzierte Aktivität der Adenylatcyclase zur Folge hat. Über die β - γ -Untereinheit der Gi/o-Proteine aktiviert der H₄R die Phospholipase C, was in einem

interzellulären Kalzium-Anstieg resultiert oder die Phosphorylierung der MAP-Kinase aktivieren kann (ODA et al. 2000; MORSE et al. 2001; NGUYEN et al. 2001; HOFSTRA et al. 2003; GUTZMER et al. 2005).

2.3.3 Liganden

Liganden werden in der Pharmakologie als Substanzen definiert, die sich an einen Rezeptor binden können.

Es steht fest, dass die Homologie von H₃R und H₄R je nach Spezies zwischen 37 und 43 % betragen kann (LIU et al. 2001). Infolgedessen wird der H₄R von verschiedenen H₃R-Liganden gebunden. So wirken H₃R-Agonisten wie Imepip, Imetit und (R)- α -Methylhistamin an beiden Rezeptoren als Agonisten, während Thioperamid am H₃R und auch am H₄R als Antagonist wirkt. Im Gegensatz dazu wirkt Clobenpropit am H₃R als Antagonist und am humanen H₄R partiell agonistisch. Burimamid fungiert am H₃R als Antagonist und als ein schwacher Agonist am humanen H₄R. Aber es ist inaktiv am H₄R anderer Spezies (LIU et al. 2001).

Die ersten selektiven Agonisten am H₄R waren OUP16 und VUF8430, die eine moderate Affinität und Spezifität zum H₄R aufweisen. VUF8430 gilt als hochselektiver Agonist für den humanen H₄R (LIM et al. 2006), aber er ist kein hoch selektiver Agonist am murinen H₄R (ROSSBACH, 2009; LIM et al. 2010). VUF8430 weist eine hohe Affinität zum humanen H₄R ($pK_i = 7.5 \pm 0.1$) und zum H₄R des Affen ($pK_i = 7.3 \pm 0.1$) auf, aber nur eine geringe Affinität zum caninen H₄R ($pK_i = 5.9 \pm 0.1$) sowie zum murinen H₄R ($pK_i = 6.7 \pm 0.1$) (LIM et al. 2010). Ein weiterer starker und selektiver Agonist am H₄R ist 4-Methylhistamin, der nicht nur eine hohe Affinität zum humanen H₄R ($pK_i = 7.3 \pm 0.1$) besitzt, sondern auch über eine 100-fach höhere Selektivität gegenüber dem humanen H₁R, H₂R und H₃R aufweist (LIM et al. 2005). ST1006 ist ein H₄R-Agonist und gilt am humanen H₄R als Partial-Agonist. ST1006 zeigt eine hohe Affinität zum humanen H₄R ($pK_i = 7.94$) gegenüber dem humanen H₁R, H₂R und H₃R (SANDER et al. 2009). So zeigt ST1006 eine über 80-fach höhere Selektivität zum humanen H₄R gegenüber dem humanen H₁R und H₂R. Die Bindungsaffinität von ST1006 zu anderen Spezies wurde bislang noch nicht untersucht.

Hinsichtlich H₄R-Antagonisten wurden JNJ7777120 und sein Benzimidazolanalogen VUF6002 im Jahre 2003 als erste hochselektive H₄R-Antagonisten beschrieben (JABLONOWSKI et al. 2003; TERZIOGLU et al. 2004). JNJ7777120 weist dabei eine hohe Affinität zum humanen H₄R ($pK_i = 7.54 \pm 0.13$) im Vergleich zum caninen H₄R ($pK_i = 6.94 \pm 0.06$) auf (SCHNELL et al. 2011). Außerdem wird ihm eine fast 4-fach höhere Affinität zum humanen H₄R im Vergleich zum H₄R-Antagonisten VUF6002 zugeschrieben.

Klassische H₁R-Antagonisten wie Diphenhydramin, Ceterizin und H₂R-Antagonisten wie Cimetidin und Ranitidin binden nicht an den H₄R (FUNG-LEUNG et al. 2004). LIU et al. (2001) und JIANG et al. (2008) untersuchten die Bindungsaffinität des H₄R für Histamin (K_D). Sie konnten bestätigen, dass der H₄R signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies aufweist. So besitzen die Rezeptoren von Menschen und Meerschweinchen eine hohe Affinität zu Histamin im Gegensatz zu den Rezeptoren von Mäusen und Ratten (Tabelle 2). Der H₄R-Agonist Clobenpropit hat eine hohe Affinität zu den H₄R von Menschen, Mäusen und Meerschweinchen, während die Affinität zu den H₄R der Ratten deutlich geringer ist (LIU et al. 2001). Mittlerweile zeigen neuere Studien die Expression des H₄R von Menschen, Hunden, Mäusen und Ratten in Sf9-Zellen und es stellte sich heraus, dass nur die Rezeptoren von Menschen und Hunden eine hohe Affinität zu Histamin besitzen, im Gegensatz zu Rezeptoren von Mäusen und Ratten. In diesen Studien wird deutlich, dass der canine H₄R eine niedrigere Affinität zu Histamin ($pK_i = 5.5 \pm 1.1$) als der humane H₄R ($pK_i = 9.8 \pm 0.9$) besitzt (SCHNEIDER et al. 2009; SCHNEIDER u. SEIFERT, 2010; SCHNELL et al. 2011).

Tabelle 2: Affinitäten der H₄R zu Histamin (nach JIANG et al., 2008)

Spezies	H-Histamin KD [nmol/l] ± SD
Hund	17,8 ± 0,8
Mensch	4,8 ± 2,5
Affe	3,0 ± 0,3
Schwein	4,4
Meerschweinchen	6,0 ± 1,2
Ratte	136 ± 41
Maus	42 ± 6

Tabelle 3: Die Affinitäten gebräuchlicher Agonisten und Antagonisten am humanen H₄R

Ligand und Wirkung	<i>pKi</i>	Referenz
JNJ7777120 Antagonist	8.3 ± 0.1 7.54 ± 0.13	(LIM et al. 2010) (SCHNELL et al. 2011)
Clobenpropit Agonist	7.5 ± 0.1	(LIM et al. 2010)
Thioperamid Antagonist	7.1 ± 0.1 6.28 ± 0.12	(LIM et al. 2010) (SCHNELL et al. 2011)
VUF 6002 Antagonist	7.5 ± 0.1	(LIM et al. 2010)
Histamin Agonist	9.8 ± 0.9 7.9 ± 0.1	(SCHNEIDER und SEIFERT et al. 2010) (LIM et al. 2010)
4-Methylhistamin Agonist	7.3 ± 0.1	(LIM et al. 2010)

2.3.4 Biologische Funktion des H₄R

Die Rolle des H₄R im Rahmen des Entzündungsgeschehens bei Allergien und in der Immunantwort ist noch immer Gegenstand laufender pharmakologischer Untersuchungen.

In *In-vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des H₄R durch Histamin oder den H₄R-Agonisten 4-Methylhistamin die Migration von humanen Langerhans-Zellen aus der Epidermis induziert. Durch Vorinkubation mit dem H₄R-Antagonisten JNJ7777120 wurde die Migration von Langerhans-Zellen geblockt (GSCHWANDTNER et al. 2009).

Die Stimulation von Mastzellen mit Histamin induzierte eine gesteigerte Migration. Auf murinen und caninen Mastzellen führt die Stimulation des H₄R zu einer intrazellulären Kalzium (Ca²⁺)-Mobilisation (HOFSTRA et al. 2003; ROSSBACH, 2009).

Die Behandlung der murinen Mastzellen mit dem H₃R/H₄R-Antagonisten Thioperamid konnte diese Effekte aufheben. Auch durch die Behandlung mit JNJ7777120 wird dieser Effekt in murinen Mastzellen sowie caninen Mastocytom-Zellen (C2-Zellen) blockiert (THURMOND et al. 2004; ROSSBACH, 2009). Keinen Einfluss auf die Chemotaxis von Mastzellen hatten hingegen der H₁R-Antagonist Diphenhydramin und der H₂R-Antagonist Ranitidin. Durch die Behandlung humaner eosinophiler Zellen und humaner MoDC (monocyte-derived dendritic cells) mit JNJ7777120 und Thioperamid konnten wichtige Effekte blockiert werden. Diese Effekte sind durch die Aktivierung des H₄R in diesen Zellen hervorgegangen. So wirkt z.B. der H₄R auf die Eosinophilen chemotaktisch, verändert dabei die Zell-Form und induziert die intrazelluläre G-Actin- zu F-Actin-Polymerisation. Diese F-Actin-Polymerisation wird durch den H₃R/H₄R-Antagonisten Thioperamid blockiert (LING et al. 2004). Gleichzeitig wird die F-Actin-Polymerisation auch bei humanen MoDC durch die Aktivierung des H₄R induziert, die durch die Behandlung mit JNJ7777120 unterbunden werden kann (GUTZMER et al. 2005). Auch bei Monozyten führt eine Stimulation des H₄R durch die H₄R-Agonisten Clobenpropit und 4-Methylhistamin zu einer intrazellulären Kalzium (Ca²⁺)-Mobilisation. Der H₄R-Antagonist JNJ7777120 konnte diese Effekte blockieren (DIJKSTRA et al. 2007). Diese Versuche verdeutlichen, dass der H₄R ein wichtiger Modulator der Immunantwort ist.

In verschiedenen *In-vivo*-Versuchen wurde bereits die Rolle des H₄R bei Entzündungen und in Asthmodellen untersucht. FUNG-LEUNG et al. (2004) befassten sich mit der Rolle des H₄R in einem murinen Modell für akutes Entzündungsgeschehen. Hierfür wurde den Mäusen Zymosan intraperitoneal injiziert, um eine Peritonitis auszulösen. Diese Studie zeigte, dass durch die Behandlung dieser Mäuse mit dem H₄R-Antagonisten JNJ7777120 die Zahl der eingewanderten Neutrophilen gesenkt werden konnte. Zusätzlich konnte in einem murinen Asthmodell, welches Ähnlichkeit zum humanen Asthma aufweist, durch JNJ7777120 die Zahl der eingewanderten Mastzellen, Leukozyten und Eosinophilen in der bronchioalveolären Lavage (BAL) gehemmt werden (DUNFORD et al. 2006). Der H₁R-Antagonist Loratadin hatte keinen Effekt auf die Anzahl der Eosinophilen in der BAL. TAKESHITA et al. (2003) zeigten dagegen, dass JNJ7777120 im mastzellunabhängigen Thioglycollat-Peritonitismodell keinen Einfluss hatte.

Auch wurde die Rolle des H₄R bei entzündlichen Erkrankungen der Haut bereits untersucht. Bei BALB/c-Mäusen induzierte der H₄R-Agonist Clobenpropit ein Kratzenverhalten, welches durch Behandlung mit Thioperamid reduziert werden konnte (BELL et al. 2004). Histamin-induzierter Juckreiz bei CD-1-Mäusen wurde durch die Behandlung mit JNJ7777120 blockiert (DUNFORD et al. 2007). COWDEN et al. (2010) stellten die Wirkung des H₄R-Antagonisten JNJ7777120 auf die durch das Hapten Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-induzierte Ohrschwellung bei BALB/c-Mäusen und H₄R-Knockout-Mäusen fest. Sowohl bei JNJ7777120-behandelten BALB/c-Mäusen als auch bei H₄R-Knockout-Mäusen war die FITC-induzierte Ohrschwellung reduziert. In unserer Arbeitsgruppe wurde die Wirkung von JNJ7777120 auf die Hapten-induzierte Ohrschwellung an zwei murinen Kontaktallergiemodellen untersucht. Sowohl im TDI-Modell als auch im DNCB-Modell konnte JNJ7777120 die Ohrschwellung nicht reduzieren (ROSSBACH et al. 2009). COWDEN et al. (2010) konnten auch zeigen, dass ein Anstieg von Neutrophilen, Mastzellen und Eosinophilen in der Haut durch Behandlung mit JNJ7777120 verringert werden konnte. Daraus kann geschlossen werden, dass der H₄R eine neue und wichtige therapeutische Zielstruktur bei allergischen Entzündungen sein kann.

2.4 Allergischentzündliche Hauterkrankungen

Allergien und entzündliche Hauterkrankungen sind ein weitverbreitetes Problem sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin. Die wichtigsten Dermatitisen stellen die allergische Kontaktdermatitis (ACD) und die atopische Dermatitis (AD) dar. In der Tierarztpraxis spielt insbesondere die atopische Dermatitis beim Hund eine wichtige Rolle. So leiden etwa 10 % der Tiere an atopische Dermatitis. Die atopische Dermatitis wird vor allem Hunde im Alter von sechs Monaten bis drei Jahre beobachtet (GRIFFIN u. DEBOER, 2001). Sie ist durch eine typische lokalisierte Dermatitis und intensiven Juckreiz gekennzeichnet. Die Läsionen sind hauptsächlich im Bereich des Kopfes, der Pfoten, der Armbeugen und des Bauches zu finden (HILLIER, 2002). Diese führen zu Haarausfall sowie geröteter, entzündeter und verdickter Haut. Die Erkrankung wird über eine allergische Reaktion vom Sofort-Typ, bei den sich Typ I und IV mischen, ausgelöst. In der betroffenen Haut wurden eine erhöhte Anzahl zirkulierender T-Zellen und dendritischen Zellen sowie ein erhöhter IgE-Spiegel im Blut beobachtet (OLIVRY u. HILL, 2001; RING et al. 2001). Dabei spielen dendritischen Zellen und T-Zellen bei der AD eine wichtige Rolle. Durch die Aktivierung von B- und T-Zellen werden IgE- Antikörper produziert, wodurch schließlich die Freisetzung von Histamin, Serotonin und anderen entzündlichen und juckreizfördernden Faktoren induziert wird. Th2-Zellen werden in akuten Läsionen exprimiert, welche die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren (THEPEN et al. 1996; GUTERMUTH et al. 2004).

Die ACD wird hauptsächlich durch niedermolekulare Proteine ausgelöst. Die als Haptene bezeichneten Substanzen können erst in Verbindung mit einem Protein (carrier) in der Haut zum eigentlichen Allergen werden. Die ACD entwickelt sich in zwei Phasen: Sensibilisierungsphase und Challengephase.

In der ersten Phase, der sogenannten Sensibilisierungsphase, in welcher noch keine Symptome auftreten, nehmen die Langerhans-Zellen und die dendritischen Zellen der Dermis das Allergen (Antigen) auf und transportieren dieses in die Lymphknoten, in denen es zur Ausbildung von antigenspezifischen T-Gedächtnis-Zellen kommt, die im Blut zirkulieren. Ein späterer Kontakt mit dem Antigen wird als Challengephase bezeichnet.

Wieder wird das Antigen von den dendritischen Zellen und Langerhans-Zellen transportiert und diesmal eine Vielzahl von Zytokinen abgesondert. Durch die Aktivierung von Entzündungszellen treten Symptome eines Kontaktekzems auf (KRASTEVA et al. 1999). Die allergische Kontaktdermatitis kann als IgE-vermittelte Reaktion vom Typ I oder als zellvermittelte Reaktion vom Spät-Typ (Typ IV) in Erscheinung treten sowie als Mischform zwischen Typ I und Typ IV. Die Typ 1-Allergie (Sofort-Typ) kann innerhalb von Sekunden oder Minuten klinische Symptome ausbilden. Wohingegen es bei der Typ IV Reaktion zwischen 24 und 48 Stunden dauern kann. In der Sensibilisierungsphase wird IL-4 von TH2-Helferzellen produziert. IL-4 aktiviert die B-Zellen, welche daraufhin Antikörper produzieren.

IgE-Antikörper binden sich an die Mastzellen und basophilen Granulozyten. Der erneute Allergenkontakt mit dem spezifischen IgE führt zur Degranulierung der Mastzellen. Entzündungsmediatoren wie Histamin, Prostaglandine und Leukotriene werden freigesetzt, was sich in Erkrankungen wie Konjunktivitis, Asthma oder Urtikaria manifestiert (JANEWAY u. TRAVERS, 2001).

Geeignete Tiermodelle, zur Studie allergischer Hauterkrankungen und zur Evaluierung neuer Angriffspunkte zur Behandlung der ACD oder AD, sind Mausmodelle. Verwendete Kontaktallergene in Mausmodellen sind Oxazolon, Toluol-2, 4-diisocyanat (TDI), 2,4-Dinitrochlorbenzen (DNCB) und FITC. Sie werden aufgrund ihrer Sensibilisierungsstärke von nahezu 100 % der Individuen als „strong haptens“ bezeichnet (KRASTEVA et al. 1999). Die Applikation von TDI im Mausmodell führt zu einem sechs- bis zwölffachen Anstieg der antigenspezifischen IgE-Antikörper im Blut von BALB/c-Mäusen. Während das DNCB-Modell nicht zu einem erhöhten IgE-Spiegel im Blut von BALB/c-Mäusen beiträgt (POTTER u. WEDERBRAND, 1995). Bei AD und bei der ACD finden sich in entzündeten Hautarealen neben dendritischen Zellen T-Zellen vom Typ T-Helferzellen (CD4). In akuten Läsionen treten vor allem Th2-spezifische Zellen auf, während bei einer chronischen Läsion vor allem Th1-spezifische Zellen vorkommen. Das TDI-Modell und FITC-Modell sind Th2-dominierte Modelle, wohingegen das DNCB-Modell Th1 dominiert ist (BÄUMER et al. 2004).

2.5 Juckreiz

Juckreiz, der auch als Pruritus bezeichnet wird, kann durch unterschiedliche Substanzen, die Histamin freisetzen, z.B. Medikamente, Nahrungsmittel, Pflanzen- oder Insektengifte, ausgelöst werden. Seit 1927 ist bekannt, dass Histamin beim Menschen als Juckreiz-Mediator fungiert (LEWIS, 1927). Bei Mäusen löst die intradermale Injektion von Histamin Juckreiz aus. BELL et al. (2004) haben gezeigt, dass der Histamin-induzierte Juckreiz bei Mäusen über den H₁R und den H₄R vermittelt wird. Neben BELL et al. (2004) wurde bei DUNFORD et al. (2007) der Histamin-induzierte Juckreiz bei CD-1-Mäusen, Wildtyp- und H₄R-Knockout-Mäusen (auf Basis von C57BL/6-Mäusen) untersucht. Diese Studie hat bestätigt, dass intradermale Injektionen von Histamin Juckreiz in diesen Mausstämmen verursachen. Die Wildtyp-Mäuse zeigten, verglichen mit den H₄R-Knockout-Mäusen, ein starkes Kratzverhalten nach den Histamin-Injektionen. Dieser Histamin-induzierte Juckreiz konnte bei CD-1-Mäusen durch orale Gabe des H₄R-Antagonisten JNJ7777120 signifikant reduziert werden. Während der H₁R-Antagonist Fexofenadin und der H₂R-Antagonist Ranitidin den Histamin-induzierten Juckreiz nicht hemmen konnten (DUNFORD et al. 2007). Bei BELL et al. (2004) wurde die Rolle von H₁R und H₄R bei der Juckreizentstehung in BALB/c-Mäusen durch Behandlung mit dem H₄R-Agonisten/H₃R-Antagonisten Clobenpropit und dem H₁R-Agonisten Histamin-Trifluoromethyl-Toluidin Dimaleat (HTMT) untersucht. Sowohl Clobenpropit als auch HTMT induzierten bei BALB/c-Mäusen Juckreiz. Durch die Behandlung mit dem H₄R/H₃R-Antagonisten Thioperamid wurde der Clobenpropit-induzierte Juckreiz reduziert (WENDORFF, 2008). Thioperamid konnte den HTMT-induzierten Juckreiz nicht reduzieren. Der H₁R-Antagonist Mepyramin konnte den HTMT-induzierten Juckreiz signifikant verringern. Auch durch die Behandlung mit dem H₁R-Antagonisten Terfenadin wurde der HTMT-induzierte Juckreiz gehemmt (BELL et al. 2004). Im Gegensatz dazu konnte der H₂R-Antagonist Cimetidin den Histamin-induzierten Juckreiz nicht hemmen und der H₂R-Agonist Dimaperit verursachte bei Mäusen keinen Juckreiz (BELL et al. 2004). Der H₄R-Agonist VUF8430 verursachte bei BALB/c- und NMRI-Mäusen keinen Juckreiz (LIM et al. 2005; ROSSBACH, 2009). Rossbach et al. (2009) untersuchten die Effekte eines H₄R-Antagonisten auf den Hapten-induzierten Juckreiz in zwei murinen Kontaktallergiemodellen (TDI-Modell und DNCB-Modell) bei BALB/c- und NMRI-Mäusen. Sie konnten bestätigen, dass

der Kontaktallergen-induzierte Juckreiz durch die Behandlung mit JNJ7777120 als auch mit den H₁R-Antagonisten Cetirizin und Diphenhydramin dosisabhängig gehemmt werden kann. Im Gegensatz dazu konnte der H₂R-Antagonist Ranitidin den Kontaktallergen-induzierten Juckreiz nicht hemmen. Intradermale Injektionen der beiden H₃R inversen Agonisten Pitolisant und ST889 führten in Abhängigkeit von der Dosis zu einem gesteigerten Kratzverhalten bei BALB/c-Mäusen, während der H₃R inverse Agonist Ciproxifan bei diesen Mausstämmen keinen Juckreiz verursachte. Durch die Behandlung mit dem H₁R-Antagonisten Cetirizin konnte der Pitolisant-induzierte Juckreiz bis zu 85 % gehemmt werden. Die kombinierte Gabe von Cetirizin und JNJ7777120 führten zu einer vollständigen Hemmung des Pitolisant-induzierten Juckreizes. JNJ7777120 allein wies dagegen nur eine moderate Hemmung auf. Der H₂R-Antagonist Ranitidin konnte das gesteigerte Kratzverhalten durch Pitolisant nicht aufheben (ROSSBACH et al. 2011).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte für molekularbiologische Versuche

Agarosegel Kammer Horizon	Life Technologies, Darmstadt
Bakterienschtüttler Certomat S	Braun Biotech International, Ziegra, Isernhagen
Eismaschine	Protec, Oberstenfeld
Filmentwickler Optimax	Biometra, Göttingen
Geldokumentation BioDoc Analyse	Thermo Scientific, Langenselbold
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	peqlab, Erlangen
PCR-Thermocycler primus 96 advanced	Bio-Rad, München
Protein-Gel Apa	Neolab, Heidelberg
Rotationsinkubator	New Brunswick Scientific, USA
Schüttelinkubator Innova 40	Heraeus, Hanau
Sicherheitswerkbank	Heraeus, Hanau
Sicherheitwerkbank Laminar Air	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	peqlab, Erlangen
Western-Blot Apparatur, Semi Dry Blotter	Neubauer, VWR, Mannheim
Neubauer-Zählkammer	Eppendorf, Nürnberg
Multipette	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Real-Time PCR System One-St	Eppendorf, Hamburg
Pipetten 0.5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl	Heidolph, Nürnberg
Plattformschtüttler Duomax 1030	Heraeus, Hanau
Zellinkubator	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifuge Avanti J-26 XP	

3.1.2 Reagenzien für molekularbiologische Versuche

Ampicillin	Sigma, Steinheim
Agarose	Qiagen, Hilden

Glycerol	Serva, Heidelberg
Isopropanol	J .T. Baker.Griesheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merk, Steinheim
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ 6 H ₂ O)	Merk, Steinheim
Methanol	J.T.Baker, Griesheim
Milchpulver	Sucofin, Zeven
Tris	Appllichem, Darmstadt
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Trypan-Blau	Sigma, Steinheim
dNTPs	Fermentas Life Sciences, St.Leon-Rot
DMEM-Medium	PAA, Cölbe
OPTI-MEM Medium	Gibco, Darmstadt
L-Glutamine	PAA, Cölbe
Penicillin / Streptomycin (P/S)	PAA, Cölbe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethanol	J. T. Baker, Griesheim
Ethidiumbromid	Biorad, München
Reverse Transkriptase	Fermentas Life Sciences,St.Leon-Rot
T4-Ligase	Fermentas Life Sciences,St.Leon-Rot
10 x T4 Ligase Puffer	Fermentas Life Sciences,St.Leon-Rot
Taq-Polymerase	Fermentas Life Sciences,St.Leon-Rot
LB-Medium	Gibco BRL, Eggenstein
EB-Puffer	Qiagen, Hilden
APS	Serve, Heidelberg
TEMED	Pierce, Bonn
Acrylamid 30%	Biorad, München
Bis-Acrylamid	Biorad, München
SDS	Roth, Karlsruhe

10 X Ex-Taq™-Puffer	Fermentas Life Sciences,St.Leon-Rot
1X Tango Puffer	Fermentase. Life Sciences,St.Leon-Rot
1Kb-DNA-Standard	Gibco BRL, Eggenstein
Low Molecular Weight Standard	Amersham Phramacia Biotech, Freiburg

Enzyme

BamHI, CIAP, HindII, EcoRI, XbaI, PstI	Fermentas.Life.Sciences,St.Leon-Rot
PCR-Primer	Fermentas.Life.Sciences, St.Leon-Rot

Vektors

pGEM-T-Eassy	Promega, Madison, USA
pVL1392	BD Biosciences, USA

Kit's

Maxi-DNA-Präparation Kit	Qiagen, Hilden
Mini-DNA-Präpeation Kit	Qiagen, Hilden
NucleoSpin® Kit	Macherey-Nagel, Düren
TA-Cloning® Kit	Promega, Madison, USA
BaculoGold™ transfection Kit	BD Biosciences, USA
DC-Protein Assay Kit	Biorad, Mannheim

Antikörper

Anti-FlagBio M2-Biotin, Clone M2	Sigma, Aldrich, St.Louis, USA
Anti-Maus-HRB	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-GFP-Antikörper	Roch, Mannheim

3.1.3 Geräte für Versuche in der Zellkultur

Steril Bank	Dynatech Laboratories, Denkendorf
Sterilfilter	Minisart, Sartorius, Göttingen

Brutschrank	US AutoFlow, Zapf, Sarstedt
Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss, Jena
Digitalkamera	PowerShot A70, Canon Inc., Malaysia
Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Einmal-Injektions-Kanüle, Nr.14	Terumo, Leuven, Belgien
Einmal-Injektions-Kanüle, Nr.20	Omnifix, Braun, Melsungen
Einmalspritzen, 1/ 10 ml	Omnifix, Braun, Melsungen
Polypropylen-Röhrchen (15 ml / 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Vortex: REAX top	Heidolph, Nürnberg
12-Well-Platten mit Einsätzen (8.0 µm Porengröße)	Greiner, Frickenhausen

3.1.4 Reagenzien für Versuche in der Zellkultur

Lipofectamins 2000	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DMEM / Ham 's F-12 Medium	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Trypan-Blau	Sigma, Steinheim
Penicillin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Glutamin	Biochrom, Berlin
5 % Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.1.5 Geräte für *In-vivo*-Versuche

Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Folienstift	Staedtler, Nürnberg
Tesafilm	Beiersdorf, Hamburg
Kanülen, 26 G	Omnifix, Braun, Melsungen
Kanülen, 30 G	Becton Dickinson GmbH, USA

3.1.6 Reagenzien für *In-vivo*-Versuche

Toluol-2,4-diisocyanat (TDI)	Sigma, Steinheim
Aceton	Merck, Steinheim
Veet®-Enthaarungscreme	Reckitt Benckiser, Mannheim

3.1.7 Geräte für die real time RT-PCR

Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Frickenhausen
Minizentrifuge DW 41	Qualitron Inc., USA
MSI Minihaker	LKA GmbH, Staufen
Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research, Massachusetts, USA
Kühlblock	Roche, Mannheim
Biosphere Filter Tips 10, 100, 1000 µl	Eppendorf, Frickenhausen
Gelgießform	Biorad, München
Gelkammer	Biorad, München

3.1.8 Reagenzien für die real time RT-PCR

RT-PCR-Primer:	
H ₁ R: QT01161300	Qiagen, Hilden
H ₂ R: QT01039157	Qiagen, Hilden
H ₃ R: QT00158375	Qiagen, Hilden
H ₄ R: QT00135884	Qiagen, Hilden
GAPDH: QT01192646	Qiagen, Hilden
DNA-Leiter Gene Ruler™100 bp	
DNA Ladder Plus	Fermentas Lif Scienc, St. Leon-Rot
TBE-Puffer	Karl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose 2 %	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Karl Roth GmbH, Karlsruhe

3.1.9 Hergestellte Puffer und Lösungen

PBS-Puffer

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ PO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g

Aqua bidest ad 1000 ml, Einstellung von pH 7,2 mit 1 mol/l HCl

TAE-Puffer (50 fache Stocklösung):

Tris	242 g
Essigsäure	57.1 ml
EDTA pH 8.0	100 ml

4 x Leammli-Auftragspuffer (25 ml)

Tris/ HCl, pH 6,8	312mM
SDS	10 %
β-Mercaptoethanol	4 %
Glycerol	50 %
Bromphenolblau	5 mg

Auf 25 ml mit Aqua bidest auffüllen

Blot-puffer:

Tris	25 mM
Glycin	150 mM
(v/v) Methanol, pH 8,5	1 %

10 x TBST

Tris/HCl	100 mM
NaCl pH =7,4	1,5 M

Tween 20 0,05 %

ECL (Lösung A):

Tris 0,1 M, pH 8,6

Luminol 1,41 mM

ECL (Lösung B):

para-Hydroxyconumarinsäure in DMSO 6,7 mM

10 x Bindungspuffer:

Tris 750 mM

MgCl₂·6 H₂O 125 mM

EDTA 10 mM

TSS-Puffer

PEG 8000 (3350,6000) 10 %

MgCl 50mM

DMSO 5 %

In LB-Medium lösen

10 x Elektrophoreselaufpuffer:

Tris 250 Mm

Glycin 1,92 M

SDS 0,1 %

Zell-Lysepuffer

M-PER Mammalian Protein 990 µl

Protease α Phosphatase 10 µl

3.1.10 Histaminrezeptoragonisten/-antagonisten

JNJ7777120	Prof. H. Stark, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt/ Main
ST1006	Prof. H. Stark, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt/ Main
4-Methylhistamin	Tocris Bioscience, UK
Pyridylthylamin	Tocris Bioscience, USA
Mepyramin	Sigma, Aldrich, St. Louis, USA
Histamindihydrochlorid	Sigma, Steinheim
Thioperamid	Sigma, Steinheim

3.1.11 Versuchstiere

Die Tierversuche sind durch die Bezirksregierung Hannover genehmigt worden (Aktenzeichen 33.12-42502-04-09/1633). Für die Untersuchungen wurden weibliche H₄R-Knockout-Mäuse mit BALB/c Hintergrund verwendet. Die H₄R-Knockout-Mäuse wurden vor einigen Jahren mit der Unterstützung von Johnson&Johnson Pharmaceutical Research and Development, La Jolla, USA, zur Verfügung gestellt. Der Firma Janssen entwickelte Lexicon Pharmaceuticals die H₄R-Knockout-Mäuse. Die Wildtyp-Mäuse wurden über mehrere Generationen aus den H₄R-Knockout-Mäusen und BALB/c-Mäusen rückgekreuzt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Herstellung von hitzekompetenten *E. coli*-Bakterien

Die Bestimmung der Zelldichte der Bakterienkulturen wurde photometrisch durch Messen der optischen Bakteriendichte gegen LB-Medium in einem Wellenbereich von 600 zu 590 nm durchgeführt. Nach Animpfung aus einer Übernachtskultur wurden die Bakterien bei 37 °C und 160 rpm bis zu einer OD 600 = 0.4 inkubiert. Nach Erreichen dieses Wertes wurde die Bakteriensuspension auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden in zwei 500 ml-Zentrifugenbecher überführt und 10 min bei 4.000 rpm und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde autoklaviert und verworfen. Die Pellets wurden im eiskalten 1 x TSS-Puffer resuspendiert und 2 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurden je 200 µl mit Multipipettenaufsatz in Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80 °C zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.2 Transformation der Plasmide der murine H₁R, H₃R und pVL1392-murinen H₄R in *E. coli*

Zur Transformation der Plasmide der murine H₁R, H₃R (mH₁R, mH₃R), pVL1392-murinen H₄R (pVL1392-mH₄R) sowie der ligierten Plasmide-mH₁R und mH₃R wurde nach den Klonierungen die Hitzeschock-Methode durchgeführt. Für eine Transformation in *E. coli* Bakterien wurden 200 µl transformationskompetente Bakterien (XL1-Blue) auf Eis aufgetaut und mit 1 µl der Plasmide mH₁R oder mH₃R oder pVL-mH₄R gemischt. Die Ansätze wurden auf Eis 30 min inkubiert. Nachfolgend wurden die Ansätze für 45 sec in einem Wasserbad bei 42 °C erhitzt. Nach 5 min erneuter Inkubation auf Eis wurden 500 µl LB-Medium dazugegeben. Die Ansätze wurden eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde je ein Transformationsansatz in 200 ml LB-Medium unter Zugabe von Ampicillin bei 37 °C über Nacht unter Schütteln kultiviert.

3.2.3 Reinigung der Plasmide mH₁R, mH₃R, pVL1392-mH₄R aus *E-coli* (Maxi-DNA-Präparation)

Die Aufreinigung der Plasmide mH₁R, mH₃R und pVL1392-mH₄R aus Über-Nacht-Bakterienkulturen wurde mittels des Plasmid Maxi Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Verwendung des Herstellerprotokolls wurde die DNA über die mitgelieferten Ionenaustauschersäulen aufgereinigt. Nach Zugabe von 12,5 ml Isopropanol und Zentrifugation bei 12.000 rpm 30 min wurde die DNA pelletiert. Das Pellet wurde mit 2 ml 70 % Ethanol gewaschen und noch einmal bei 15.000 rpm, 10 min zentrifugiert. Nachfolgend wurde das Pellet 5 min bei 37 °C getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 100-200 µL EB-Puffer aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde mithilfe des Nanodrop Spectrophotometers bestimmt. Die Plasmidlösung wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.4 Amplifikation von mH₁R, mH₃R durch Polymerase- Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Methode. Mithilfe der PCR werden definierte DNA-Fragmente amplifiziert. Dabei werden synthetische Oligonukleotide (Primer) verwendet. Diese Primer können zusätzliche 5'-Sequenzen zusätzliche Restriktionsschnittstellen enthalten. In dieser Arbeit wurden die plasmide mH₁R und mH₃R aus Schritt 3.2.3 als Templets mit der Taq-Polymerase und folgenden Primern verwendet.

Primer-mH₁R-F: 5'-GAC GAT GAT GAC GCC ATG AGC GCC TTC CCA ACA CC-3'

Primer-mH₁R-RV: 5'-GA TCC TCT AGA TTA GTG ATG GTG ATG ATG GTGGGA ACG AAT GTG CAG-3'

Primer-mH₃R-F: 5'-GAC GAT GAT GAC GCC ATG GAG CGC GCG CCG CCC-3'

Primer-mH₃R-RV: 5'-GA TCC TCT AGA TTA GTG ATG GTG ATG ATG GTG CTT CCA GCA CTG CTC CAG-3'

Die Amplifikation von mH₁R, mH₃R durch PCR wurde mit folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

DNA (<i>aufgereinigt mH₁R oder mH₃R Plasmid</i>)	1 µl
10 x EX-Taq™-Puffer	2.5 µl
dNTP (2,5 mM)	0.25 µL
50 mM MgCl ₂	0.75 µL
Primer mH _x RF	0.25 µL
Primer mH _x RR	0.25 µL
5 U/ML Tag-Polymerase	0.2 µL
H ₂ O auf	25 µL

Die Amplifikation von mH₁R, mH₃R wurde mit folgendem PCR Programm durchgeführt:

95 °C	5 min	
95 °C	1 min	} x 30 Zyklen
50-65 °C	1 min	
72 °C	2 min	
72 °C	10 min	

3.2.5 Amplifikation von Signal-Peptid und Flag-Tag durch die PCR

Das Plasmid pVL1392-mH₄R (hergestellt durch Herrn David Schnell, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV-Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg) diente als Template, um in einem PCR Versuch Signal-Peptid und Flag-Taq (SF_{Fragmente}) Genabschnitte zu amplifizieren. SF_{Fragmente} wurden mit dem pVL1392 Vektor ligiert. pVL1392 ist ein Transferplasmid, das für die Herstellung geeigneter rekombinanter Baculoviren zur Expression des mH₁R, mH₃R in Sf9-Zellen-System verwendet wird. So fungiert das Signal-Peptid als Startpunkt für die Ablesung eines Gens, während ein Antikörper gegen Flag-Tag bei dem Nachweis eines Proteins mittels Western-Blot genutzt wird. Die Amplifikation von SF_{Fragmente} erfolgte in folgendem Ansatz:

PCR Reaktion in 25 µl Reaktionsvolumen:

DNA (pVL1392-mH ₄ R)	1 µl
10 x Ex-Taq-Puffer	2.5 µl
50 Mm MgCl ₂	0.75 µl
Primer F1 (5'-GCT CAC TCA TTA GGC ACC-3')	0.25 µl
Primer C3 (5'-CAT GGC GTC ATC ATC GTC-3')	0.25 µl
5U/µl Taq-Polymerase	0.2 µl
H ₂ O auf	25 µl

PCR Programm:

95 °C	5 min	} x 30 Zyklen
95 °C	1 min	
55 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

3.2.6 Auftrennung der DNA in Agarosegelen

Die Auftrennung der mH₁R, mH₃R und pVL1392-mH₄R Fragmente erfolgte durch Elektrophorese. Dazu wurde ein Gel mit 0,7 – 2 % (w/v) Agarose eingewogen und in 100 ml 1 x TAE Puffer aufgekocht. Danach wurde Agarose mit Ethidiumbromid (0.1 µg/ml) eingesetzt. Die Agaroseslösung wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen und polymerisiert. Nach dem Erkalten der Agarose wurde es vorsichtig in die Elektrophorese-Apparatur eingelegt und die Proben wurden aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 1 x TAE als Laufpuffer bei 110 – 200 mA durchgeführt.

3.2.7 Extraktion der DNA aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese wurden die entsprechenden DNA-Bande, die unter UV-Licht sichtbar waren, aus dem Gel herausgeschnitten und mithilfe des NucleoSpin Extract II Kit's nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.2.8 Klonierung von PCR-Produkten mit dem pGEM-T Easy Vektorsystem

Zuerst wurden die PCR-Produkte aus Kapitel 3.2.7 in den pGEM-T Vektor kloniert. Diese Methode wurde zur direkten Klonierung von PCR-Produkten, die mithilfe der Taq-Polymerase amplifiziert wurden, verwendet (SCHARF et al. 1986). Wie in Abbildung 4 dargestellt, wurden unter Verwendung der Taq-Polymerase keine Fragmente mit glatten Enden produziert, sondern ein unspezifischer Überhang von einem Adenosinnukleotid am 3'-Ende des PCR-Produktes angehängt. Der pGEM-T Easy Vektor (T/A-Klonierung, pGEM-T Vector System) besitzt an seinen 5'-Enden einen Thymidin-Überhang, welcher eine effiziente Ligation mit den PCR-Produkten ermöglicht. Dazu wurden die aufgereinigten PCR-Produkte mithilfe des TA-Kloning Kit in den pGEM-T Easy Vektor ligiert und in kompetente *E. coli*-Bakterien transformiert.

pGEM-TEasy Vektor-Klonierung in 10 µl Volumen:

2 x Puffer	5 µl	} bei 4 °C über Nacht inkubiert
pGEM-T Vektor	1 µl	
PCR Produkt	3 µl	
T4 DNA Ligase	1 µl	

Am folgenden Tag wurden 10 µl des Klonierungsansatzes zu den kompetenten *E. coli*-Bakterien gegeben und gemischt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde er 45 sek in einem Wasserbad bei 42 °C erhitzt und wieder 3 min auf Eis gestellt. 500 µL LB-Medium wurden dazugegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei 160 rpm und 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden 100 µL des Transformationsgemisches auf Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und über

Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden zwei bis fünf einzelne Kolonien von den Ligationsplatten mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und mit 3 ml LB Medium mit Ampicillin in 15 ml Falcon-Tubes beimpft. Diese Falcon-Tubes wurden über Nacht bei 37 °C im Bakterienschüttler inkubiert. Die Extraktion der Plasmide pGEM-T-mH₁R, pGEM-T-mH₃R, pGEM-T-SF Fragmente aus den *E.coli*-Bakterien wurden am folgenden Tag mittels dem Plasmid Mini Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

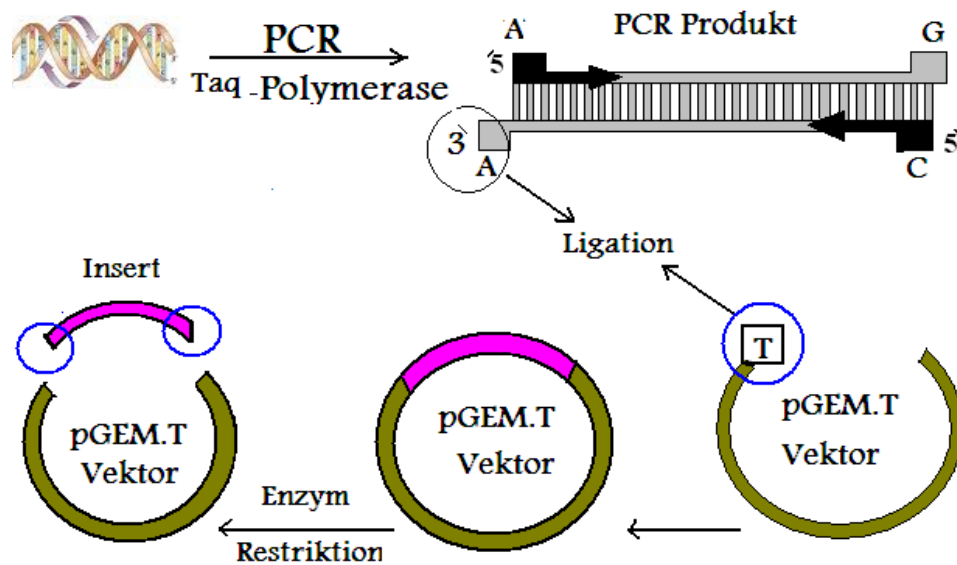


Abbildung 4: Klonierung von PCR-Produkten in den pGEM-T-Easy Vektor

3.2.9 Die DNA-Methylierung

Unter Methylierung versteht man eine Übertragung von Methylgruppen auf Nukleobasen einer DNA-Sequenz. Diese Übertragung erfolgt an der Sequenz CC^A/TGG der inneren Cytosine des Enzyms DNA-Cytosin-Methyltransferase (dcm), welche zur Entstehung eines Methylierungsmusters führt. Dadurch mussten die Plasmide pGEM-T-mH₁R, pGEM-T-mH₃R vor dem Verdau mit Restriktions-Endonukleasen in einen dcm-negativen Bakterienstamm wie den *E. coli*-Stamm (GM48) transformiert werden. Dieser Bakterienstamm wurde verwendet, wenn Restriktions-Erkennungssequenzen methyliert waren. Damit beträgt der Gehalt der DNA an

5-Methylcytosin in *E. coli* GM48. Für die Transformation der Plasmide in *E. coli* und die Reinigung der Plasmide siehe Kapitel 3.2.2, 3.2.3.

3.2.10 Spaltung der Plasmide pGEM-T-mH₁R, pGEM-T-mH₃R und pGEM-T-SF Fragmente mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung der Plasmide-mH₁R oder mH₃R oder Plasmid-SF_{Fragmente} (aus Kapitel 3.2.9) aus den pGEM-T-Easy Vektor wurde mit den Restriktions-Endonukleasen unter Verwendung der Puffer und Temperaturbedingungen (siehe unten) durchgeführt. Diese Methode wurde auch für die Überprüfung der Plasmide nach der Klonierung verwendet.

Ansatz zum Doppelverdau transformierter Klone

Plasmid pGEM-T-mH ₁ R oder pGEM-T-mH ₃ R	5 µl
BamHI	0.5 µl
XbaI	0.5 µl
1 x Tango Puffer	2 µl
Auf 20 µl H ₂ O bidest	

Ansatz zum Verdau transformierter Klone

pGEM-T-FS _{Fragmente}	5 µl
EcoR I	0.5 µl
1 x TangoPuffer	2 µl
Auf 20 µl H ₂ O bidest	

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. 5 µl wurden danach auf ein DNA Agarosegel aufgetragen. Anschließend wurden die Restriktionsfragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten und eluiert (siehe 3.2.7).

3.2.11 Prinzip des Sf9/Baculovirus-Expressionssystems

Die Herstellung rekombinanter Proteine ermöglicht die Untersuchung molekularpharmakologischer Eigenschaften der Histaminrezeptoren der Maus unter gleichen experimentellen Bedingungen.

Als Voraussetzung für Untersuchungen in rekombinanten Systemen müssen die Histaminrezeptoren der Maus in einer Membran exprimiert werden.

In dieser Arbeit wurde das Sf9-Zell/Baculovirus-Expressionssystem verwendet. Baculoviren sind doppelsträngige DNA-Viren mit einem Genom von ca. 130 kb Länge. Für Menschen und Wirbeltiere sind Baculoviren ungefährlich, da ihr Promotor in Säugetierzellen inaktiv ist. Für die Herstellung der Sf9-Zellmembranen wurden Sf9-Zellen mit Baculoviren transfiziert. Sf9-Zellen sind Insektenzellen (Schmetterling-Zellen von *Spodoptera frugiperda*). Nach Transfektion der Sf9-Zellen konnte eine hohe Menge an Histaminrezeptorproteinen erzeugt werden. Sf9-Zellen haben selbst keine konstitutiv aktiven GPCRs und wurden als hohe GPCR_S-Expressionssysteme sowie als hohe G-Protein-Expressionssysteme dargestellt. Für die Herstellung rekombinanter Proteine mussten die codierenden-Sequenzen des mH₁R und mH₃R in einem Baculovirus-Transfer-Vektor (pVL-1392) kloniert werden. Die Sf9-Zellen wurden mit dem Plasmid pVL-1392-mH₁R oder Plasmid pVL1392-mH₃R und mit unvollständiger linearisierter Baculovirus-DNA co-transfiziert. Die Zellen wurden ein Woche inkubiert. Der Überstand von Baculovirus-infizierten Sf9-Zellen wurde isoliert und für weitere Infektionen eingesetzt. Ein Beispiel für die Verwendung dieses Expressionssystems ist in Abbildung 6 dargestellt.

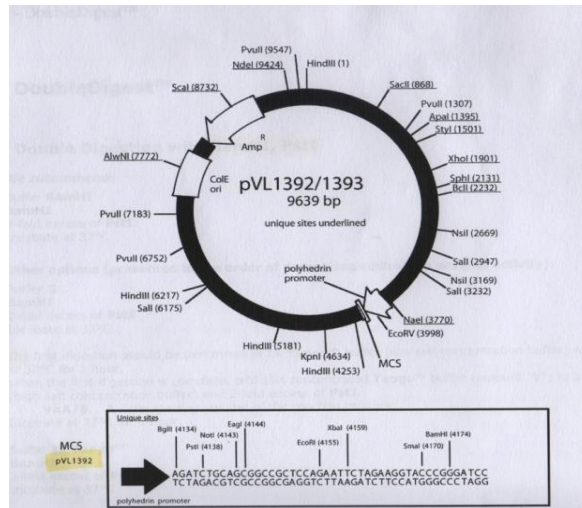


Abbildung 5: Struktur des pVL1392-Vektors.

Bildquelle: http://www.springerimages.com/Images/LifeSciences/1-10.1385_1-59259-117-5_119-2

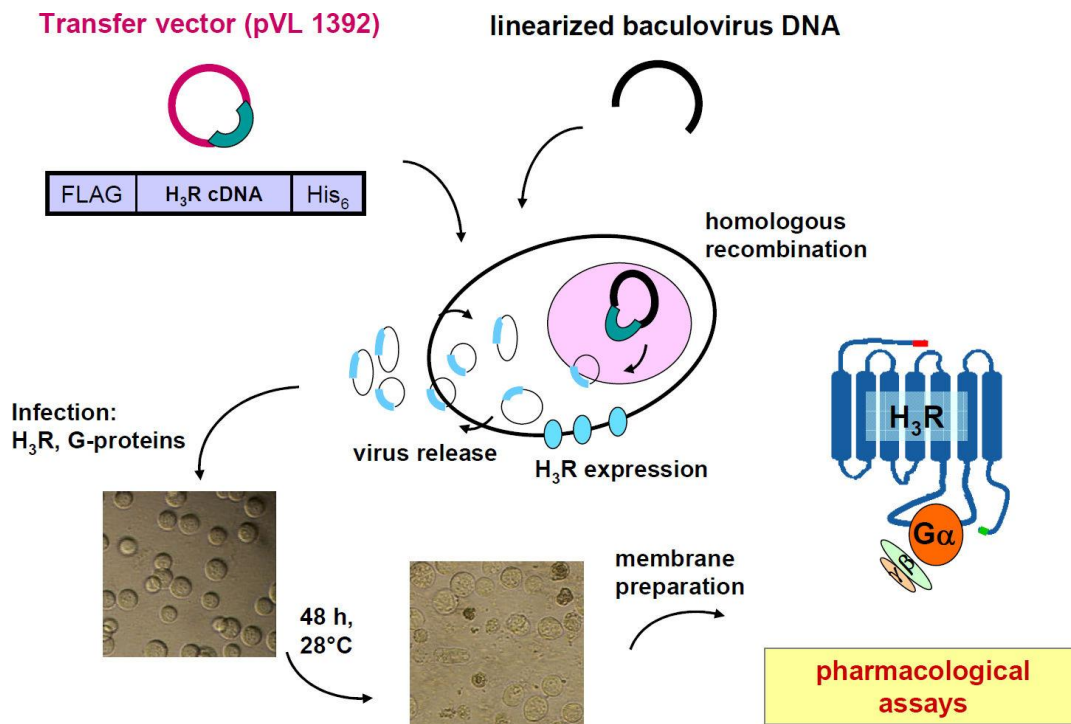


Abbildung 6: Herstellung rekombinanter H₃R Baculoviren, Proteinexpression, Membranpräparation aus Sf9-Zellen (SCHNELL, 2009)

3.2.12 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung vom Vektor pVL1392

Bevor pVL1392 mit dem Plasmid-mH₁R oder mH₃R ligiert wurde, fand eine Transformation in *E.coli*- Bakterien statt. Danach wurde pVL1392 mittels EcoRI-Restriktionsverdau ausgeschnitten. Der linearisierte pVL1392 Vektor wurde nicht sofort ligiert, sondern es mussten zuerst die 5'-Enden des pVL1392 Vektors mittels der CIAP-Phosphatase dephosphoryliert werden, um eine Religation der Vektor-Enden zu vermeiden. Dazu wurde pro 1 µg DNA 1 U CIAP und 1 µl Tang-Puffer hinzugegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C, danach 10 min bei 85 °C inkubiert und im Anschluss für die Ligation verwendet.

3.2.13 Ligation von DNA-Fragmenten in den Vektor pVL1392

Nach der Auftrennung der Restriktionsfragmente über Gel-Elektrophorese und Extraktion der DNA aus den Agarosegelen wurde das Insert-Fragment aus dem Restriktionsschritt 3.2.10 und der Vektor pVL1392 aus dem Dephosphorylierungsschritt 3.2.12 ligiert. Bei der ersten Ligation wurde der Vektor pVL1392 aus Kapitel 3.2.12 mit dem SF_{Fragmente} (Signal Peptid/Flag-Tag) aus Kapitel 3.2.10 verknüpft. Dazu wurden das Insert-Fragment und der Vektor in einem Volumen von 20 µl mit T4-DNA-Ligase (5 U/µl) in einem 10 x T4-Ligase Puffer über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Ligationsansatz in 20 µl Volumen:

dephosphorylierter pVL1392 Vektor	50 ng	} über Nacht bei 16 °C
geschnittenes SF _{Fragmente}	150 ng	
10 x T4 Ligase Puffer	2 µl	
T4 DNA Ligase (5U/µl)	2 µl	
Auf 20 µL H ₂ O		

Am nächsten Tag wurden 10 µl des Ligationsansatzes mit 200 µl *E.coli*-Bakterien vermischt. Die weitere Durchführung entspricht der in Kapitel 3.2.8 beschriebenen Transformation.

Die Reinigung des Plasmids pVL1392-SF_{Fragmente} von den Kolonien auf den Agarplatten erfolgte mittels des Plasmid Mini Kit nach Herstellerangaben.

3.2.14 Überprüfen des Klonierungserfolgs

Zur Bestimmung einer erfolgreichen Ligationen der Insert-SF_{Fragmente} mit dem pVL1392 Vektor wurde das Plasmid pVL1392-SF_{Fragmente} mit den Restriktionsenzymen EcoRI verdaut (DNA-Fragmente: 9600 bp und 280 bp). Um größere Menge des Plasmids pVL 1392-SF_{Fragmente} zu erhalten, wurde von einem positiven Bakterienklon Maxi-Präp mittels des Plasmid Maxi Kit nach den entsprechenden Protokollen durchgeführt. Dieses Plasmid wurde mit den beiden Restriktionsenzymen BamHI und XbaI geschnitten und durch Gelelektrophorese mit anschließender Aufreinigung (Kapitel 3.2.7) wiedergewonnen.

3.2.15 Ligationen der Plasmid pVL1392-SF_{Fragmente} mit mH₁R, mH₃R

Für die Herstellung eines geeigneten Konstrukts zur Expression des murinen H₁R , H₃R in Sf9-Zellen wurden die Plasmide mH₁R, mH₃R aus Schritt 3.2.10, die mittels BamHI und XbaI-Restriktionsverdau ausgeschnitten wurden, mit dem aufgereinigten Plasmid pVL1392-SF_{Fragmente} aus Schritt 3.2.14 mittels T4-Ligase miteinander verknüpft.

Ligationsansatz in 20 µl Volumen:

geschnittenes pVL1392-SF _{Fragmente}	5 µl	} über Nacht bei 16 °C
geschnittenes mH _x R	5 µl	
10 x T4 Ligase Puffer	2 µl	
T4 DNA Ligase (5 U/µl)	2µl	
Auf 20 µl H ₂ O		

Anschließend wurden 10 µl des Ligationsansatzes für die Transformation in *E.coli*-Bakterien verwendet (Kapitel 3.2.8).

Zur Kontrolle des Klonierungserfolges des Plasmids pVL1392-SF-mH₁R wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und PstI verdaut (DNA-Fragmente: 9600 bp und 1780 bp). Während das Plasmid pVL1392-SF-mH₃R mit den Restriktionsenzymen BamHI und NotI verdaut wurde (DNA-Fragment: 9600 bp und 1607 bp). Positive Klone wurden über Nacht in LB-Medium weiterkultiviert. Am nächsten Tag wurden die Plasmide mittels des Plasmid Maxi Kit gewonnen.

3.2.16 Kultivierung der Sf9-Zellen

Der Vorteil der Verwendung der Sf9-Zellen ist, dass sie in Adhärenz- oder Suspensionskultur wachsen können.

Die Sf9-Zellen wurden mit TNM-FH-Medium angereichert mit 5 % (v/v) FKS, 1 % Pen-Strep, 1 % Glutamin bei 28 °C ohne CO₂-Begasung kultiviert. Um eine große Menge des Virus-Überstandes zu erhalten, wurden Sf9-Zellen in Suspension kultiviert. Hier müssen die Zellmembranen vor Schwerkraft in der Schüttelkultur geschützt werden. Deshalb gibt man zusätzlich zum TNM-FH-Medium ein 1 % Lipid-Supplement hinzu. Die Zellen wurden auf eine Dichte von 0,5 bis 1 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt und bei 90 Umdrehungen / min geschüttelt. Die Zellen wurden jeden zweiten Tag passagiert. Hierzu wurden die Zellen 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und mit neuem TNM-FH-Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.2.17 Konservieren der Sf9-Zellen

Zur Konservierung der Sf9-Zellen wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und bei 1000 rpm 5 min abzentrifugiert. Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in 1 ml Einfriermedium, bestehend aus 45 % (v/v) TNM-FH-Medium, 45 % (v/v) FKS und 10 % (v/v) DMSO, resuspendiert. Die Kryoröhrchen wurden für 24 h bei -70 °C gelagert. Anschließend wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2.18 Auftauen der Sf9-Zellen

Die Kryoröhrchen mit den Sf9-Zellen wurden in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. 5 ml TNM-FH-Medium angereichert mit 10 % FKS, 1 % Pen-Strep, 1 % Glutamin wurden zu den Zellen hinzugegeben. Nach 5 min bei 1000 rpm Zentrifugation wurde das Zellsediment in neuem TNM-FH-Medium (5 % FKS , 1 % Pen-Strept, 1 % Glutamin) resuspendiert. Die Zellen wurden in einer 25 cm² Zellkulturflasche mit TNM-FH-Medium (5 % FKS, 1 % Pen-Strep, 1 % Glutamin) ausgesät und bei 28 °C ohne CO₂ kultiviert.

3.2.19 Herstellung von rekombinanten Baculoviren durch co-Transfektion in Sf9-Zellen

Zur Konstruktion rekombinanter Baculoviren wurde das BD BaculoGold Transfection Kit verwendet. Für die Transfektion mussten die Sf9-Zellen adhärent kultiviert werden. Dazu wurden 4 x 10⁶ Zellen im 3 ml TMH-FH-Medium in eine 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät und bei 28 °C ohne CO₂ inkubiert. Nach 15 bis 20 min wurde das Medium abgenommen und 1 ml Puffer A (im Kit vorhanden) zu den Zellen hinzugegeben. 2 µg des rekombinanten Plasmid pVL1392-mH₁R oder Plasmid pVL1392-mH₃R aus Schritt 3.2.15 und 0.5 µg der Baculovirus DNA wurden miteinander vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde 1 ml Puffer B (im Kit vorhanden) zum DNA-Gemisch gegeben und vorsichtig gemischt. Diese Lösung wurde langsam in die Zellkulturflasche getropft. Die Zellen wurden 4 h bei 28 °C ohne CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Transfektionslösung abgenommen und die Zellen einmal mit dem TNM-FH-Medium gewaschen. Anschließend wurden 3 ml neues TMN-FH-Medium zu den Zellen hinzugegeben. Die Zellen wurden 7 Tage bei 28 °C unter Abwesenheit von CO₂ inkubiert.

3.2.20 Amplifikation rekombinanter Baculoviren

Nach Transfektion der Sf9-Zellen und nach 7 Tagen Inkubationszeit wurden die Viren von den Zellen freigesetzt. Dazu wurden die transfizierten Sf9-Zellen bei 3000 rpm 15 min abzentrifugiert. Der Überstand P1 wurde abgenommen und bei 4 °C gelagert. In einem 50 ml

Schüttelkulturkolben wurden neue Sf9-Zellen mit 3×10^6 Zellen/ml eingestellt. Mit 1 ml des Überstandes P1 wurden die Zellen infiziert und wieder 7 Tage bei 28 °C inkubiert. Nach einer Woche wurden die Zellen bei 3000 rpm 15 min abzentrifugiert. Der Überstand P2 wurde abgenommen und auch bei 4 °C gelagert. Zur Amplifikation rekombinanter Baculoviren wurde eine neue 100 ml Kultur mit 3×10^6 Zellen/ml angesetzt. Dazu wurden 5 ml des P2 Überstandes zu den Kulturkolben hinzugegeben und die Zellen 48 h bei 28 °C inkubiert. Nach 48 h wurden die Zellen 15 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, der Überstand P3 abgenommen und bei 4 °C gelagert. Die Pellets können für den Western-Blot verwendet werden. Der Überstand P3 wurde für weitere Infektionen und Membranpräparationen verwendet.

3.2.21 Membranpräparation aus Sf9-Zellen

Zur Erzeugung von Membranen wurden 100 ml Sf9-Zellenkultur mit 3×10^6 Zellen/ml angesetzt. Die Zellen wurden mit 1 ml einer Virusstocklösung infiziert. Die Zellen wurden 48 h inkubiert. Danach wurde die Infektion mikroskopisch überprüft. Die Zellen wurden 5 min bei 4 °C und 1000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 50 ml 10 x PBS Puffer gewaschen. Nach 5 min Zentrifugation bei 1000 rpm wurden die Pellets durch Zugabe von 15 ml Lysispuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Pellets im Dounce-Homogenisator 25 Mal auf Eis homogenisiert. Die Suspension wurde bei 4°C und 500 rpm 5 min zentrifugiert.

Der Überstand (Membranen) wurde vorsichtig abpipettiert und in einem Beckmann-Zentrifugenröhrchen bei 4 °C und 18.000 rpm 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wieder in 20 ml Lysispuffer resuspendiert und in der Beckmann-Zentrifuge nochmal 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und die Pellets in 10 ml 1 x Bindungspuffer resuspendiert.

Anschließend wurden die Pellets mit einer gelben Kanüle und einer 10 ml Spritze 15 Mal homogenisiert. Die Membransuspension wurde in 1 ml aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung (Biorad)

Für die Konzentrationsbestimmung der Proteinproben (präparierte Membranen) wurde der DC-Protein Assay Kit durchgeführt. Als Proteinstandard wurde eine BSA (Bovines Serum Albumin)-Lösung verwendet. Die BSA-Lösung wurde in 1 x Bindungspuffer mit einer Konzentration von 250 µg/ml bis 2000 µg/ml angesetzt und bei 4 °C gelagert. In eine 96 Well-Platte wurden 1 x Bindungspuffer und die Standards in aufsteigender Proteinkonzentration 250 µg/ml; 500 µg/ml; 750 µg/ml; 1000 µg/ml; 1250 µg/ml; 1500 µg/ml; 2000 µg/ml pipettiert. Danach wurden die zu bestimmenden Membranproben pipettiert. Mit einer Multipipette wurde je 25 µl Reagent A Lösung zu allen Standards und Proben gegeben. Nachfolgend wurden 200 µl Reagent B Lösung mit der Multipipette zugegeben. Die Platte wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, ihre Extinktion wird bei 750 nm am Biotek Plattenleser bestimmt.

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung des Proteins nach ihrem Molekulargewicht wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Die SDS-PAGE wurde mit Sammelgelen von 5 % Acrylamid und Trenngelen 10 % Acrylamid durchgeführt. Die Proben wurden in 4 x Laemmli-Auftragspuffer gelöst und 5 min bei 95 °C denaturiert. In einer Tasche wurden 5 µl Low Molecular Weight Standard aufgetragen. Die Elektrophoresekammer wurde mit Elektrophoreselaufpuffer aufgefüllt. Die Proben wurden langsam (20 mA) durch das Sammelgel und im Anschluss durch das Trenngel bei 40 mA laufen gelassen. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Membran transferiert (siehe Western-Blot 3.3.3).

Sammelgele (5 %)

Sammelgelpuffer (1M Tris/HCL, pH 6,8)	630 µl
PAA (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	840 µl
H ₂ O bidest	3255 µl

2 % SDS	250 µl
TEMED	10 µl
40 % APS	15 µl

Trenngele 10 %

Trenngelpuffer (1.5 M Tris/HCL, pH 8,8)	4,6 ml
PAA (30 % Acrylamid,0.8 % Bisacrylamid)	4 ml
H ₂ O bidest	2,74 ml
2 % SDS	0,6 ml
TEMED	24 µl
40% APS	36 µl

3.3.3 Western-Blot

Durch die Verwendung der Western-Blot-Methode wurden aufgetrennte Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran transferiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Dazu wurden zwei Filterpapiere auf die Kathode der Blotkammer gelegt. Auf die unteren zwei Filterpapiere wurde vorsichtig Gel und die Membran und dann wieder zwei Filterpapiere wie ein Sandwich gelegt und mit der Anode der Blotkammer bedeckt. Die vier Filterpapiere wurden im Blotpuffer eingeweicht, während die Membran zuerst in 100 % Methanol äquilibriert wurde. Dann wurde sie in Bidest eingeweicht und danach im Blotpuffer äquilibriert. Der Proteintransfer erfolgte bei 0,75-1 mA/cm² und dauerte 1 bis 2,5 h. Die Membran wurde 1 h in 5 % Magermilchpulver in TBST-Puffer auf einem Schüttler abgesättigt. Anschließend wurde die Blocklösung entfernt und der Erst-Antikörper in 5 % Milchpulver im TBST-Puffer auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die ungebundenen Antikörper auf der Membran nach dreimal Waschen mit TBST-Puffer entfernt. Im Anschluss wurde die Membran für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit dem entsprechenden zweiten Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer wurden die ECL-Reagenzien im Verhältnis 1:1 gut gemischt und auf die Proteinseite des

Blots getropft und 2 min einwirken lassen. Die Chemilumineszenz wurde mit einem Röntgenfilm exponiert.

Eingesetzte Antikörper

- Erster Antikörper: Anti-Flag Biotinylated M2 1:1000 verdünnt.
- Zweiter Antikörper: Anti-Maus-HRP 1:2000 verdünnt.

3.3.4 Radioligandbindungsstudien an mH₁R, mH₃R

Die Radioligandbindung ist ein Verfahren, mit dem man die Rezeptoren quantitativ bestimmen kann. In dieser Arbeit erfolgten die Bindungsstudien unter Verwendung des radioaktiv markierten Agonisten [³H] Histamin und des Antagonisten [³H] Meypramin. Man verwendet für die Untersuchung der Bindungseigenschaften von mH_xR eine Sf9-Zellmembransuspension. Um die Rezeptorkonzentration quantitativ bestimmen zu können, benutzt man vorrangig Sättigungsbindungsstudien. Um dies zu erreichen, inkubiert man Sf9-Zellenmembranen (eingestellt auf eine definierte Proteinkonzentration in mg/ml) mit steigenden Konzentrationen des entsprechenden Radioliganden. Dies hat zur Folge, dass sich ein Ligand-Rezeptor-Komplex bildet. Nach einer definierten Inkubationszeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen dem Liganden-Rezeptor-Komplex und den freien, nicht gebundenen Liganden und den Rezeptoren ein. Nach Erreichen der Inkubationszeit wird die Reaktion mithilfe eines Filtrationsverfahrens gestoppt.

Durch Filtration werden die freien radioaktiv markierten Liganden über Glasfaserfilter abgetrennt. Die an den Rezeptoren gebundenen Liganden bleiben im Filter zurück und können durch Detektion der Radioaktivität unter Verwendung eines Counters gemessen werden. Nun können die Rezeptordichte B_{max} (maximale Sättigung) und die Dissoziationskonstante K_D aus dem Sättigungsverlauf der spezifischen Ligand-Rezeptor-Bindung bestimmt werden.

Unter der Dissoziationskonstante (K_D) versteht man die Konzentration eines Liganden, bei der 50 % der Rezeptoren durch einen Liganden besetzt worden sind.

Außer diesem spezifischen Bindungsverhalten des Radioliganden tritt noch eine zweite, unspezifische Bindung auf. Sie hängt von der Höhe der Ligandenkonzentration ab und ist nicht sättigbar. Die Bestimmung der unspezifischen Bindung (B_{unspez}) ist durch die Anwesenheit eines Kompetitors (Histamin oder Meypramin oder Thioperamid) möglich. Die absolute Radioligandenbindung-Bestimmung erfolgt in Abwesenheit eines Kompetitors. Sie setzt sich aus der Summe der spezifischen und unspezifischen Bindung zusammen:

$$B_{\text{total}} = B_0 + B_{\text{unspez}}$$

B_{total} = Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Kompetitors

B_0 = spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Kompetitors

B_{unspez} = Bindung des Radioliganden in Anwesenheit des Kompetitors

Die markierten Radioliganden [^3H] Histamin und [^3H] Meypramin werden mit dem Bindungspuffer auf 100 nM verdünnt.

Histamin oder Meypramin oder Thioperamid wurden als Kompetitoren in den Konzentrationen von 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M eingesetzt.

Die Reaktionsansätze wurden für 60 min auf dem Thermomixer bei 25 C° und 750 rpm geschüttelt. Dabei band sich das radioaktiv markierte [^3H] Histamin oder [^3H] Meypramin an die H_xR in der Membran und es kam zur Einstellung eines Gleichgewichts zwischen freiem und gebundenen Radioliganden sowie dem Kompetitor. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Bindungspuffer gestoppt. Danach wurde der Filter mit der Multipipette mit 2 ml Bindungspuffer gespült.

Die GFC-Filter wurden mit einer Pinzette von der Absauganlage entfernt und in Szintillationsröhrchen gegeben. Dann füllte man in jedes Röhrchen mit der Dispensette 5 ml Szintillator Rotiszint Eco Plus und pipettierte 50 μl der Radioaktivitätsvorlage. Man ließ die Proben für 1 h stehen. Anschließend konnte man unter Verwendung des Szintillationsmessgerätes die gebundene Radioaktivität bestimmen und zur Konstruktion der Sättigungskurven verwenden.

3.4 Zellbiologische Methoden

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde mit zwei adhärenenten eukaryotischen Zelllinien gearbeitet. Zur Expression der murinen H₁- und H₃-Rezeptoren unter Verwendung des Baculovirus-Expressionssystems wurden Sf9-Zellen verwendet (siehe Schritt 3.2.19). Zur weiteren Expression und Untersuchung der pharmakologischen Eigenschaften der murinen H₁R und H₄R wurde die Fibroblaste Zelllinie NIH-3T3 als eukaryotisches Expressionssystem genutzt. Dazu wurden diese Zellen mit dem Plasmid mH₁R oder dem Plasmid mH₄R, welche an ein GFP (Green Fluorescent Protein) fusioniert wurden, mithilfe von Lipofectamin 2000 transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für weitere pharmakologische Folgeversuche eingesetzt.

3.4.1 Kultivierung von NIH-3T3-Zellen

NIH-3T3-Zellen wurden in einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen pro 25 oder 75 cm² Zellkulturflasche bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das DMEM-Medium der NIH-3T3-Zellen war mit 10 % FKS, 1 % Glutamin und 1 % Pen-Strep angereichert worden. Das Zellenmedium wurde alle 48 h gewechselt. Die Zellen besitzen eine Verdopplungszeit von 24 h, deshalb werden sie alle drei bis vier Tage auf eine neue Zellkulturflasche ausgesät. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit warmen PBS gewaschen. Durch Zugabe des Trypsin wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgelöst. 3 ml DMEM-Medium wurde zu den Zellen gegeben und diese im Anschluss 8 min bei 1500 rpm abzentrifugiert. Schließlich wurden 5 bis 10 ml DMEM-Medium hinzugegeben und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Kammer bestimmt. Danach wurden die Zellen erneut ausgesät.

3.4.2 Konservieren von NIH-3T3-Zellen

Zum Konservieren der NIH-3T3-Zellen wurden 80 % konfluente Zellen abgelöst und pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml kaltem Einfriermedium (70 % DMEM-Medium, 20 % FKS, 10 % DMSO) resuspendiert. Die Kryoröhrchen wurden bei -80 °C oder im Stickstofftank gelagert.

Zum Auftauen der NIH-3T3-Zellen wurden die Kryoröhrchen im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und in 15 ml Röhrchen mit 5 ml DMEM-Medium überführt. Die Zellen wurden 8 min bei 1500 rpm abzentrifugiert. Das Medium wurde verworfen. In 3 ml DMEM-Medium wurden die Zellen resuspendiert, in eine 25 cm² Kulturfasche überführt und bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert.

3.4.3 Transfektion der NIH-3T3-Zellen

Die Transfektion der NIH-3T3-Zellen mit dem Plasmid GFP-mH₁R oder dem Plasmid GFP-mH₄R wurde mithilfe des Lipofectamins 2000 durchgeführt. Bei diesem Verfahren bildet die Plasmid-DNA mit einer kationischen Lipid-Reagenz einen Komplex. Dabei werden die positiv geladenen Lipide mit der negativ geladenen DNA verbunden. Dieser neu entstandene lipophile und positiv geladene Komplex kann sich nun an die negativ geladene und hydrophobe Zellmembran binden.

Hierzu wurden die Zellen vom Vortag in einer 12-Well Kulturplatte mit einer Zahl von 300.000 Zellen pro Welle ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden diese mit serumfreiem DMEM-Medium gewaschen und anschließend mit 1 ml serumfreiem DMEM-Medium überschichtet.

Zur Transfektion wurden zwei Lösungen hergestellt:

- Lösung A: 2 µg Plasmid GFP-mH₁R oder Plasmid GFP-mH₄R in 100 µl Transfektionsmedium (Opti-MEM Medium oder serumfreies DMEM Medium)
- Lösung B: 4 µl Lipofectamin 2000 Reagent in 100 µl Transfektionsmedium (Opti-MEM Medium oder serumfreies DMEM Medium). 5 min in Raumtemperatur inkubiert.

Die DNA und Lipofectamin-Lösungen wurden vorsichtig gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Transfektionsmedium wurde das Gemisch langsam und tropfenweise zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen 3 bis 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde das Transfektionsgemisch abgenommen. Nach

Zugabe von 1 ml DMEM-Medium (mit 10 % FKS, 2 Mm Glutamin und 1 % Pen-Strep) wurden die Zellen 48 h kultiviert. Sie können bereits nach 24 h für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet werden.

3.4.4 Proteinanalytik

Zum Proteinnachweis der Plasmide GFP-mH₁R oder GFP-mH₄R in transfizierten NIH-3T3-Zellen wurde die Western-Blot-Methode unter Verwendung von Antikörpern gegen das fluoreszierende Protein GFP durchgeführt. Dazu wurde nach Transfektion der NIH-3T3-Zellen in einer 6-Well Kulturplatte und einer Inkubationszeit von 48 h das Medium abgenommen. Die Zellen wurden zweimal mit warmem PBS gewaschen. Nachfolgend wurde die Kulturplatte auf Eis gestellt und pro Well 200 µl Zell-Lysepuffer zugegeben. Die Platte wurde 5 min auf Eis geschüttelt. Dann konnten die abgelösten Zellen in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min in einem Ultraschall-Bad weiter lysiert werden. Durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 20.000 g und 4 °C wurden die Zellkerne sedimentiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

3.4.5 SDS-PAGE und Western-Blot

Nach der Bestimmung der Proteinkonzentrationen (siehe Kapitel 3.3.1) wurden Proteine nach ihrem Molekulargewicht durch das SDS-Gel aufgetrennt. Nachfolgend wurden die aufgetrennten Proteine in einer Transferapparatur auf eine Trägermembran transferiert. Der Proteintransfer erfolgte bei 0,75-1 mA/cm² und dauerte 1-2,5 h. Die Arbeitsschritte wurden bereits in Kapitel 3.3.2 und 3.3.3 beschrieben. Anschließend wurden diese Proteine mithilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. Dazu wurde die Membran über Nacht auf dem Schüttler mit 5 % Magermilchpulver und im TBST Puffer bei 4 °C blockiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mit einem Antikörper gegen GFP (1:1000) in 5 % Milchpulver im TBST Puffer 1 bis 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Membran mit einem sekundären Antikörper eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die ungebundenen Antikörper wurden durch dreimal Waschen entfernt. Die Membran wurde in eine lichtgeschützte Kassette

gelegt. Die ECL-Reagenzien wurden im Verhältnis 1:1 gut gemischt und auf die Membran getropft. Dann wurde ein Röntgenfilm nach einer Expositionszeit von 5 sec bis 2 min entwickelt.

Eingesetzte Antikörper

- Erster Antikörper: Anti-GFP Antikörper 1:1000 verdünnt.
- Zweiter Antikörper: Anti-Maus-HRP 1:2000 verdünnt.

3.4.6 RT-PCR (Reverse Transcription PCR)

Die Rezeptor-spezifische RNA in transfizierten NIH-3T3-Zellen wurde durch RT-PCR nachgewiesen. Für die RT-PCR wurde die Gesamt-RNA in transfizierten NIH-3T3-Zellen mithilfe des RNeasy Mini Kit isoliert. Nach der Transfektion der NIH-3T3-Zellen mit dem Plasmid GFP-mH₁R oder dem Plasmid GFP-mH₄R (siehe Schritte 3.4.3) wurden die transfizierten Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 37 °C mit 600 µl RLN Puffer lysiert. Der Zell-Überstand wurde nach 2 min Zentrifugation bei 14000 g abgenommen. Nach Zugabe von 600 µl 70 % Ethanol wurde die Lösung auf RNeasy-Säulen gegeben und bei 8000 g für 15 sek zentrifugiert. Mithilfe des RW1 Puffers und RPE Puffers wurde die Säule mehrmals gewaschen. Danach wurde die Säule durch 2 min Zentrifugation bei 8000 g getrocknet. Nach Zugabe von 30 bis 50 µl RNase-freiem Wasser wurde die Gesamt-RNA durch 1 min Zentrifugation bei 8000 g eluiert. 1 µg-1 µg der Gesamt-RNA-Präparation wurde für die Durchführung der reversen Transkriptionsreaktion eingesetzt. Weitere Schritte wurden nach der Anleitung des SuperScript One-Step RT-PCR Systems mit Platinum *Taq* durchgeführt. Zur relativen Quantifizierung der mRNA des H₄R wurde der Rezeptor mit dem Referenzgen GAPDH verglichen.

Die PCR-Programm lautet wie folgt:

50 °C	30 min	
95 °C	15 min	} x 39 Zyklen
94 °C	30 sec	
55°C	1 min	
68 °C	2 min	
72 °C	10 min	

Anschließend wurde die Rezeptor-spezifische RNA der Proben durch die Agarose-Gel-Elektrophorese mithilfe einer DNA-Leiter (100 bp DNA Leiter Plus) nachgewiesen.

3.4.7 Migrations-Assay

Nach der Transfektion der NIH-3T3-Zellen mit dem Plasmid GFP-mH₁R oder dem Plasmid GFP-mH₄R (siehe Schritte 3.4.3) und nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 37 °C wurden die transfizierten Zellen für den Migrations-Assay verwendet. Unter Verwendung des Migrations-Assay wurde die Migration der transfizierten NIH-3T3-Zellen und der Einfluss von Histamin via H₁R und H₄R gemessen.

Der Migrations-Assay wurde unter Verwendung des Transwell-Systems durchgeführt. Das Transwell-System besteht aus einer Polystyrol-Platte mit 12 Wells, in welche Inserts mit einer Kapillarporenmembran (8 µm Porengröße) eingeführt wurden. Die Wells wurden mit 1 ml DMEM-Medium befüllt. H₁R- oder H₄R- Liganden wurden in verschiedenen Konzentrationen (siehe Tab.4) hinzugegeben. Die transfizierten NIH-3T3-Zellen wurden in einer Dichte von 300.000 Zellen in 300 µl DMEM-Medium auf die Kapillarporenmembran pipettiert. Die Platte wurde 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium von dem Wells abgenommen und in Eppendorfgefäße überführt. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 1000 g wurde der Überstand abpipettiert. Die Zellpellets wurden in dem verbleibenden Restvolumen resuspendiert. Die Anzahl der migrierten transfizierten NIH-3T3-Zellen wurde mithilfe der Neubauer-

Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Daraus ergab sich die Anzahl der ausgewanderten transfizierten NIH-3T3-Zellen.

$$\frac{\text{Gezählte Zellzahl} \times 3 \times 10000 \times \text{Restvolumen [ml]}}{4} = \text{ausgewanderte transfizierten NIH-3T3-Zellen/ml}$$

Der Einfluss des H₄R-Antagonisten JNJ7777120 auf die chemotaktische Aktivität der transfizierten NIH-3T3-Zellen wurde durch 30 min Präinkubation einiger Ansätze mit JNJ7777120, bevor sie mit H₄R-Agonisten Histamin oder 4-Methylhistamin stimuliert wurden, untersucht.

Tabelle 4: Konzentrationen der für die Versuche verwendeten Substanzen:

Histamin	1 mmol/l
4-Methylhistamin	10 µmol/l
Pyridylethylamin	10 µmol/l
ST1006	1 µmol/l, 10 µmol/l
JNJ7777120	10 µmol/l

3.5 *In-vivo*-Versuche an Mäusen

3.5.1 Versuche zum Kratzverhalten nach Histamin, ST1006 und 4-Methylhistamin Injektion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des H₄R bei der Entstehung von Juckreiz bei Wildtyp-Mäusen und H₄R-Knockout-Mäusen untersucht. Die Mäuse wurden einen Tag vor Beginn der Versuche mit Veet®-Enthaarungscreme im seitlichen Nackenbereich enthaart. Die

Mäuse wurden jeweils in Gruppen von sechs Tieren aufgeteilt. Es wurde je 50 µl Histamin, 4-Methylhistamin oder ST1006 in verschiedenen Dosierungen (siehe Tabelle 5) in den enthaarten Bereich intradermal injiziert. Die Vehikelgruppe wurde mit PBS injiziert. Nach der Behandlung wurden die Tiere in die Käfige zurückgebracht und ihr Kratzverhalten an der Injektionsstelle über einen Zeitraum von 1 h beobachtet. Die Beobachtung erfolgte per Videoanalyse mit einer Videokamera (Canon UC-X45 Hi). Das Kratzverhalten wurde nachfolgend statistisch ausgewertet.

Tabelle 5: Verwendete Substanzen und Dosierungen für die Vorversuche zum Kratzverhalten.

Substanz	Dosierung pro Injektion	Injizierte Menge in µl
Histamin	0,25 µmol	50
4-Methylhistamin	5 nmol, 50 nmol	50
ST1006	5 nmol, 50 nmol	50

3.5.2 Murine Kontaktallergiemodelle

3.5.2.1 Toluol-2,4-diisocyanat (TDI)-Kontaktallergiemodell

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der H₄R-Agonisten ST1006 und 4-Methylhistamin in murinen Kontaktallergiemodellen festgestellt. Die Untersuchungen wurden mit sensibilisierten Wildtyp-Mäusen im TDI-Modell durchgeführt. Dazu wurden Wildtyp-Mäuse im Alter von acht Wochen in der Abdominalregion enthaart. Um die Hornschichtzellen der Haut zu entfernen, wurden am folgenden Tag (vor der Behandlung mit TDI) adhäsive Klebestreifen mehrmals auf den enthaarten Bereich aufgesetzt und wieder abgezogen. Danach wurden 100 µl TDI 5 % (in Aceton) auf die Bauchhaut aufgetragen. Die Behandlung mit TDI 5 % auf der Bauchhaut wurde an vier aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. An den Tagen zwei bis vier wurden nur eine Dosis von 50 µl TDI 5 % aufgetragen. Nach der Sensibilisierungsphase wurden die Tiere am 14. Tag durch eine topische Behandlung mit 50 µl TDI 0,5 % auf die Bauchhaut geboostert. Danach erfolgte die erste Challenge am 21. Tag mit 20 µl TDI 1 % auf den enthaarten Nackenbereich und

wurde in den nächsten drei bis vier Wochen mit zweimaliger topischer Behandlung von jeweils 20 µl TDI 1 % pro Woche durchgeführt.

3.5.3 Versuche zum Kratzverhalten im TDI-Modell

Die TDI-Mäuse aus Schritt (3.5.2.1) wurden einen Tag vor Beginn des Versuches mit Veet®-Enthaarungscreme im seitlichen Nackenbereich enthaart. H₄R-Agonisten ST1006 oder 4-Methylhistamin wurde im enthaarten Bereich intradermal injiziert. Die H₄R- Agonisten ST1006 oder 4-Methylhistamin wurden in PBS gelöst, ST1006 wurde zusätzlich in DMSO vorgelöst. Den Vehikelmäusen wurde PBS appliziert. Danach wurden die Tiere topisch mit 20 µl TDI 1 % im Nacken behandelt. Nach Applikation des Haptens wurden die Mäuse über einen Zeitraum von 1 h beobachtet und die Kratzattacken, wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, gemessen.

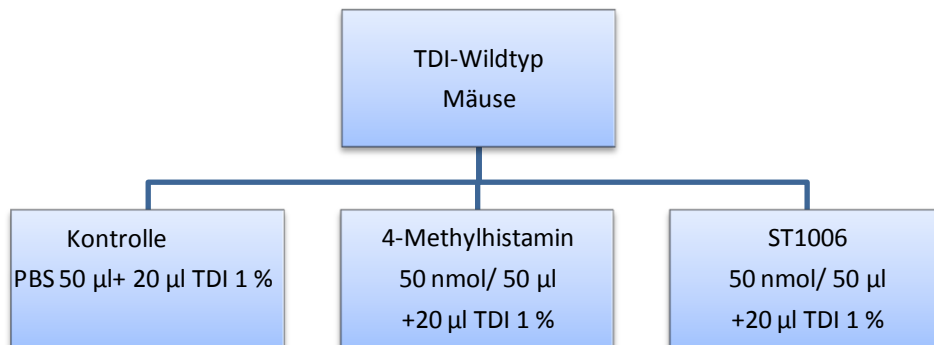


Abbildung 7: Verwendete Substanzen und Dosierungen für die Untersuchungen der Allergen- induzierten Juckreizentstehung im Mausmodell.

3.6 Statistische Auswertung

Die Daten sind als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPadPrism (Version 4.01, GraphPad Software, Inc.).

Bei den *In-vivo*-Versuchen, in denen nur eine Kontrollgruppe mit einer behandelten Gruppe verglichen wurde, wurde ein ungepaarter T-Test verwendet. Für die übrigen Auswertungen, bei denen die Kontrollgruppe mehreren Versuchsgruppen gegenübergestellt wurde, wurde eine parametrische Varianz-Analyse (One-way-Anova) mit nachfolgenden Tukey's Multiple Comparison-Test gewählt. Bei den *In-vitro*-Versuchen, bei denen die Kontrollgruppe mehreren Vergleichsgruppen gegenübergestellt wurde, wurde eine parametrische Varianz-Analyse (One-way-Anova) mit nachfolgendem Dunnetts-Test als post-hoc-Test gewählt. Es wurden Irrtumswahrscheinlichkeiten von 5 %, 1 % und 0.1 % bestimmt. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) wurden mit (*), $p < 0.01$ wurden mit (**) und hochsignifikante Unterschiede ($p < 0.001$) mit (***) gekennzeichnet. Die entsprechenden Einzelwerte der durchgeführten Versuche sind in den Anhangstabellen aufgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung der Rezeptoren

4.1.1 Amplifikation des mH₁R, mH₃R, Signal-Peptid und Flag-Tag (SF_{Fragment}) durch PCR

Um eine größere Menge der Plasmiden-mH₁R, mH₃R, pVL1392-mH₄R zu erhalten, wurde jedes Plasmid in *E.coli*-Bakterien transformiert und mit dem Plasmid Maxi Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Diese aufgereinigten Plasmide wurden als Template für die Amplifizierung und Klonierung des mH₁R, mH₃R oder der SF_{Fragmente} im pVL1392 Transfervektor verwendet. Die verwendeten Primer enthielten die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und XbaI oder EcoRI. Mittels PCR wurden die mH₁R, mH₃R oder SF_{Fragmente} mit den entsprechenden terminalen Schnittstellen amplifiziert. Wie in Abbildung 8 dargestellt, konnten 1500 bp (mH₁R), 1327 bp (mH₃R) und 280 bp (SF_{Fragmente}) lange Fragmente vervielfältigt werden.

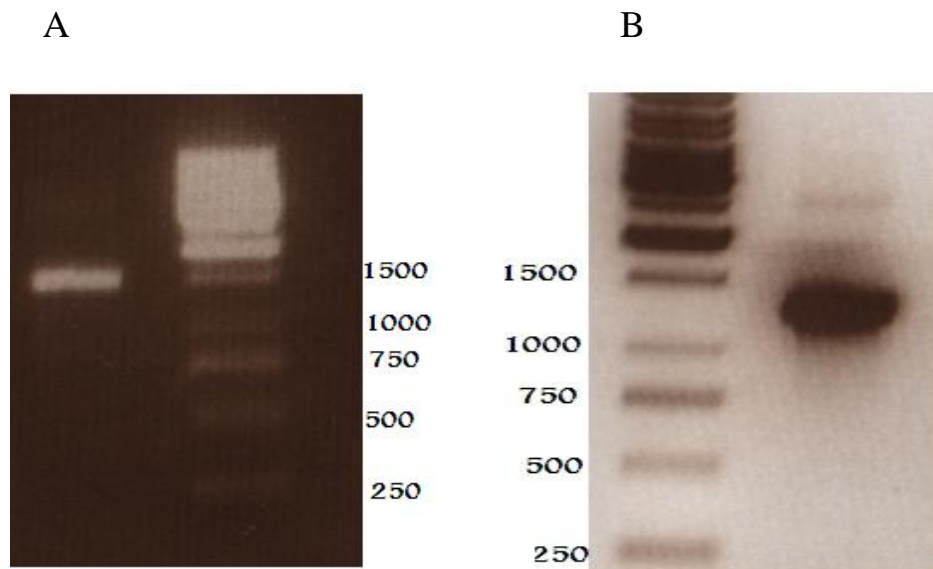


Abbildung 8: Gelelektrophoretische Darstellung der mH₁R, mH₃R Fragmente nach Durchführung einer PCR mit gut sichtbaren Banden in Höhe von 1500 bp-mH₁R (A), 1327 bp-mH₃R (B).

Die gereinigten PCR-Fragmente wurden anschließend in den pGEM-T.Easy Vektor subkloniert und in kompetente *E. coli* transformiert. Nach der Plasmid-Aufreinigung wurden die Plasmid mH₁R oder mH₃R mittels Restriktionsverdau mit BamHI und XbaI aus den pGEM-T.Easy Vektor gespalten, während SF_{Fragmente} mit EcoRI aus den pGEM.T.Esay Vektor geschnitten wurde.

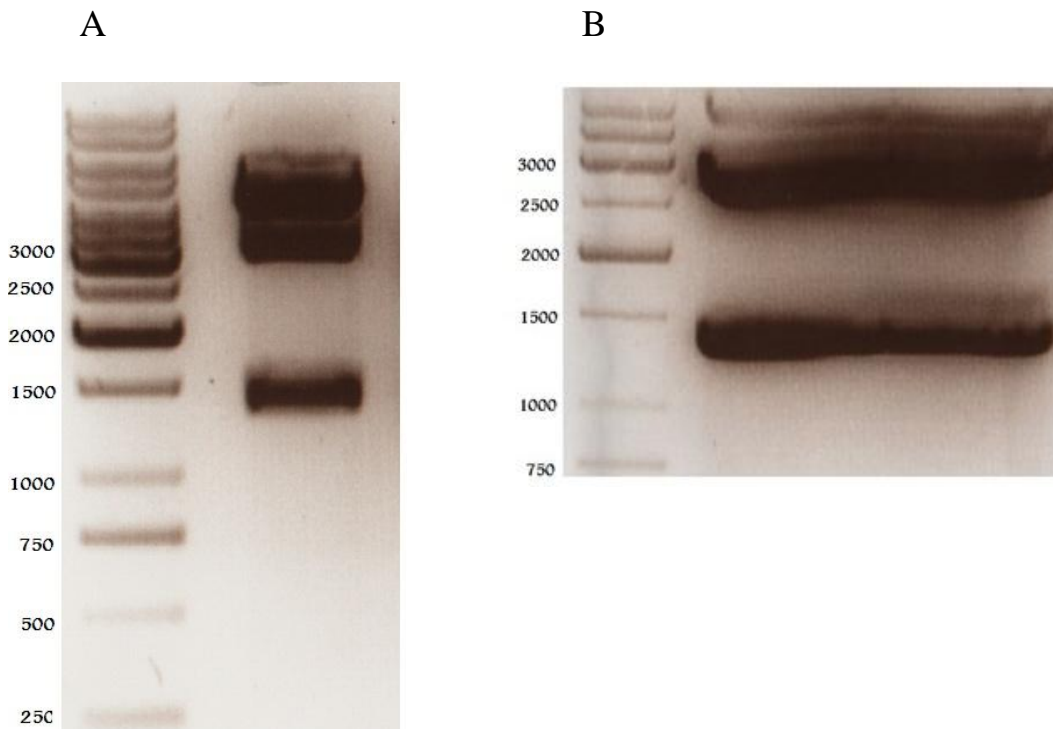


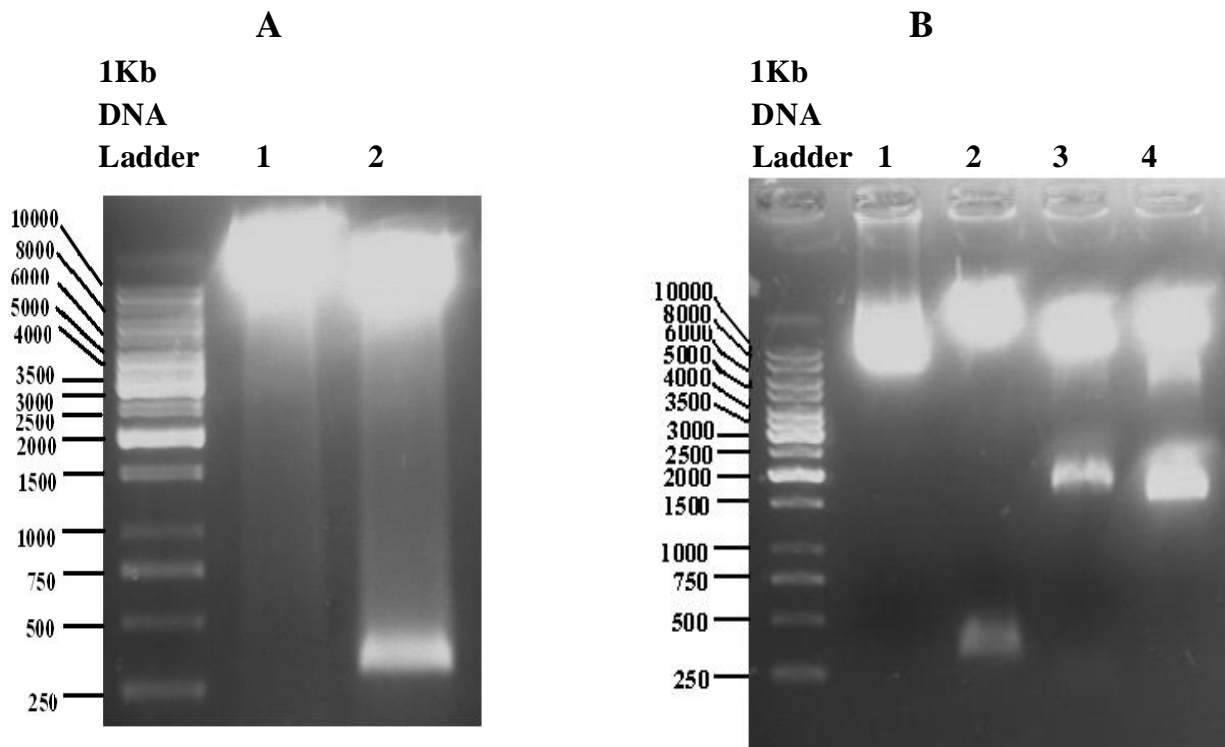
Abbildung 9: Gelelektrophoretische Darstellung des Restriktionsverdau des pGEM-T-mH₁R, pGEM-T-mH₃R mit BamHI und XbaI nach Subklonierung von PCR-Produkt in pGEM-T-Easy Vektor. A: Das geschnittene Insert von pGEM-T-mH₁R wurde bei 1500 bp dargestellt. B: Das geschnittene Insert von pGEM-T-mH₃R wurde bei 1327 bp dargestellt, die pGEM-T-Easy Vektor-Bande bei 3000 bp. Bei 1Kb ist der linearisierte Vektor abgebildet.

4.1.2 Überprüfung des Klonierungserfolges

Die isolierten, aufgereinigten Plasmide wurden sequenziert und in den Transfektor pVL1392 kloniert.

Bei der ersten Ligation wurde der Vektor pVL1392 mit dem SF_{Fragmente} verknüpft. Nach erfolgreicher Transformation wurden einzelne *E.-coli*-Kolonien mit den Restriktionsenzymen EcoRI getestet (DNA-Fragmente: 9600 bp und 280 bp). Dieses aufgereinigte Plasmid wurde mit BamHI und XbaI geschnitten und durch Gelelektrophorese mit anschließender Aufreinigung wiedergewonnen. Die Plasmide mH₁R und mH₃R, die mittels BamHI und XbaI ausgeschnitten wurden, wurden mit dem aufgereinigten Plasmid pVL1392-SF_{Fragment} verknüpft und kompetente *E.-coli* transformiert.

Danach wurden einzelne *E.-coli*-Kolonien mittels entsprechender Restriktionsenzyme auf das Vorhandensein der Plasmide pVL1392-mH₁R oder pVL1392-mH₃R getestet. Dazu wurde das Plasmid pVL1392-mH₁R mit den Restriktionsenzymen EcoRI (DNA-Fragmente: 11100 bp und 280 bp), BamHI + PstI (DNA-Fragmente: 9600 bp und 1780 bp), BamHI + XbaI (DNA-Fragmente: 9880 bp und 1500 bp) verdaut. Das Plasmid pVL1392-mH₃R wird mit den Restriktionsenzymen EcoRI (DNA-Fragment: 10927 bp und 280 bp), BamHI + NotI (DNA-Fragmente: 9600 bp und 1607 bp), BamHI + XbaI (DNA-Fragmente: 9880 bp und 1327 bp) verdaut.



A

Reihe	1	2
Res-Enzym	∅	EcoRI
Erwartete	9880 bp	9600 bp
Bande		280 bp

B

	1	2	3	4
Res-Enzym	∅	EcoRI	BamHI + PstI	BamHI + XbaI
Erwartete	9600 bp	11100 bp 280 bp	9600 bp 1780 bp	9880 bp 1500 bp

Abbildung 10: Überprüfung der Plasmide mittels Restriktionsverdau. A: Plasmid pVL1392-SF_{Fragment} wurde mit EcoRI getestet, die SF_{Fragmente} bei 280 bp dargestellt. Der linearisierte pVL1392 Vektor wurde bei 9600 bp abgebildet. B: Plasmid pVL 1392-mH₁R wurde mit EcoRI, BamHI+XbaI, BamHI+PstI verdaut.

Reihe	1	2	3
Res-Enzym	BamHI + NotI	BamHI + XbaI	EcoRI
Erwartete Bande	9600 bp 1607 bp	9880 bp 1327 bp	10927 bp 280 bp

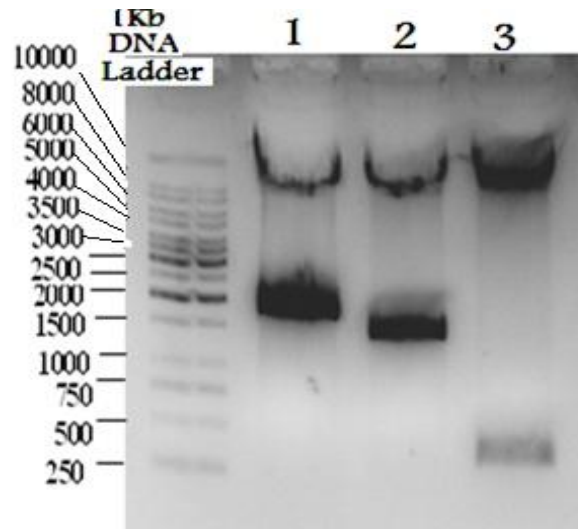


Abbildung 11: Überprüfung des Plasmids pVL1392-mH₃R mittels Restriktionsverdau.

4.2 Expression des mH₁R und mH₃R in Sf9-Zellen

Für die Herstellung eines geeigneten Konstrukts zur Expression des murinen H₁R, H₃R wurde das Sf9-Zell/Baculovirus-Expressionssystem verwendet. Dazu wurden die Sf9-Zellen mit dem Baculovirus und dem Plasmid pVL1392-mH₁R oder Plasmid pVL1392-mH₃R co-transfiziert. Die Infektion wurde mikroskopisch überprüft. Wie in Abbildung 12 dargestellt, sind die Zellen nicht tot. Sie haben nicht mehr die runde Form wie sonst, sondern sind länglich.

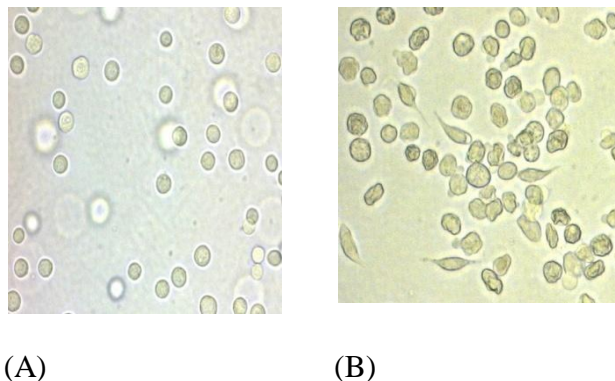


Abbildung 12: Untransfizierte Sf9-Zellen (A) und Sf9-Zellen nach der Transfektion mit rekombinanten Baculovirus (B). Die Bilder stammen aus dem Institut für Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover, Arbeitsgruppe Prof. Roland Seifert.

Zum Nachweis des Molekulargewichts der Rezeptoren wurden die Membranen von transfizierten Sf9-Zellen im Western-Blot untersucht. Die Membranproteine wurden zuerst mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach unterschiedlichen Molekulargewichten aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Mit spezifischen Antikörpern gegen eines dieser Proteine (Anti-Flag-Antikörper) konnten diese als Bande dargestellt werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 13 zu sehen.

Aufgrund der sichtbaren Banden in Abbildung 13 (47 kDa) konnte festgestellt werden, dass die Sf9-Zellen mit dem Baculovirus und dem Plasmid pVL-1392-mH₁R oder Plasmid pVL1392-mH₃R transfiziert wurden. Die erste und zweite Bande stellen den Proteinnachweis von mH₁R in der Sf9-Zellmembran bei 25 µg/ml und 50 µg/ml dar. In der ersten Bande war keine mH₁R-Expression nachweisbar, während bei der zweiten Bande ein Nachweis nicht deutlich zu erkennen war. Die dritte und vierte Bande stellt den Proteinnachweis von mH₃R bei 25 µg/ml und 50 µg/ml dar. Sie waren jedoch auch nicht deutlich zu erkennen.

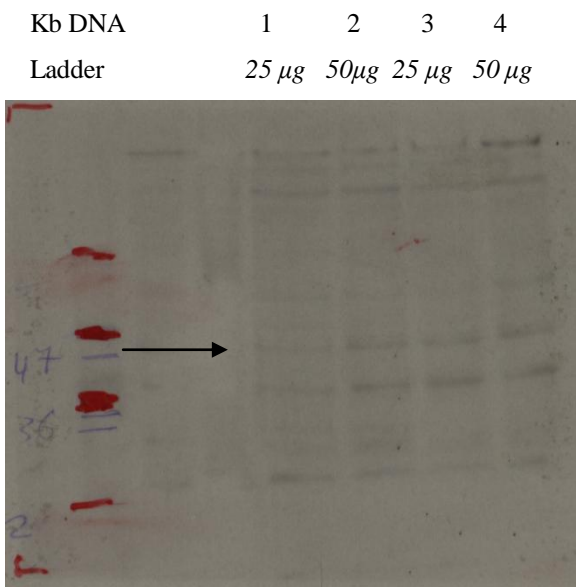


Abbildung 13: Western-Blot-Analyse des Plasmids pVL1392-mH₁R und des Plasmids pVL1392-mH₃R in Sf9-Zellen unter Verwendung des Anti-Flag-Antikörpers.

4.3 Radioligandenbindungsstudien an mH_xR

Die Radioligandenbindungsuntersuchungen zur Bestimmung der Affinität von Histamin und den ausgewählten Antagonisten Mepyramin oder Thioperamid an mH₁R und mH₃R wurden durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten unter Verwendung des radioaktiv markierten Agonisten [³H] Histamin und des Antagonisten [³H] Mepyramin und einer Sf9-Zellenmembransuspension, die mit mH₁R oder mH₃R transfiziert wurden. Um die Rezeptorkonzentration quantitativ bestimmen zu können, wurde vorrangig die Sättigungsbindungsstudie verwendet. Die Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde durch die Anwesenheit eines Kompetitors (Histamin, Mepyramin oder Thioperamid) durchgeführt. Die Radioligandenbindungsbestimmung erfolgte in Abwesenheit eines Kompetitors. Die gebundene Radioaktivität wurde im Szintillationsmessgerät bestimmt. Im Zuge dieser Arbeit konnte keine spezifische Bindung von mH₁R oder mH₃R an ihre Liganden unter Verwendung des Sf9-Zellen-Expressionssystems beobachtet werden. Diese Ergebnisse entsprechen den Ergebnissen von Schnell et al. (2011), die eine niedrige Bindungsaffinität von Maus-H₄R und Ratten-H₄R im Gegensatz zu dem humanen H₄R und dem caninen H₄R im Sf9-Zellen-Expressionssystem beobachtet hatten.

4.4 *In-vitro*-Versuche

4.4.1 Überprüfung der Transfektion von NIH-3T3-Zellen

Zur Expression und Untersuchung der pharmakologischen Eigenschaften der murinen H₁R und H₄R wurden NIH-3T3-Zellen verwendet. Diese Zellen wurden mit den Plasmiden GFP-mH₁R oder GFP-mH₄R mithilfe von Lipofectamin 2000 transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h konnten die NIH-3T3-Zellen mittels Fluoreszenz-mikroskopie überprüft werden. Wie in Abbildung 15 dargestellt, zeigten die NIH-3T3-Zellen eine moderate Transfektionseffizienz.

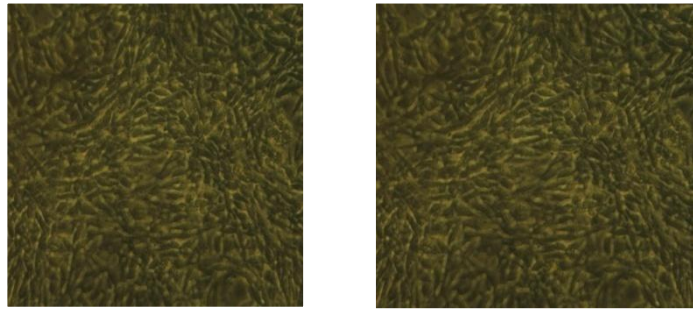


Abbildung 14: Untransfizierte NIH-3T3-Zellen.

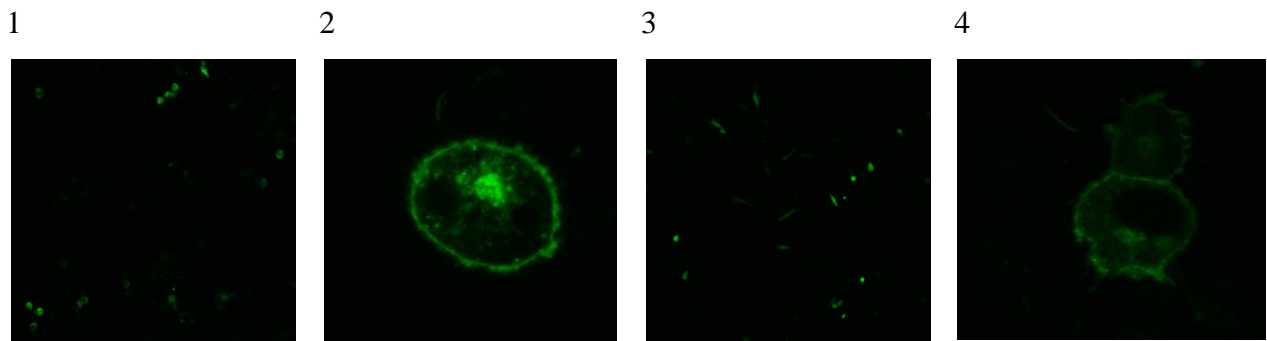


Abbildung 15: NIH-3T3-Zellen nach der Transfektion mit Lipofektamin 2000.
 1: GFP-transfizierte NIH-3T3-Zellen, 2 und 3 GFP-mH₄R-transfizierte NIH-3T3-Zellen (Nummer 2 ist in 650-facher Vergrößerung). 4: GFP-mH₁R-transfizierte NIH-3T3-Zellen (in 650-facher Vergrößerung).

4.4.2 Expression der Plasmide GFP-mH₁R oder GFP-mH₄R in transfizierten NIH-3T3-Zellen

Die Expression der Plasmide GFP-mH₁R oder GFP-mH₄R in transfizierten NIH-3T3-Zellen wurde mittels Western-Blot untersucht. Dabei wurden NIH-3T3-Zellen mit dem Plasmid GFP (das als Kontrolle verwendet wurde) oder dem Plasmid GFP-mH₁R oder dem Plasmid GFP-mH₃R getrennt transfiziert. Der Western-Blot wurde mit Antikörpern gegen GFP durchgeführt. Die Plasmide GFP-mH₁R oder GFP-mH₄R sowie Plasmid GFP wurden als Banden dargestellt.

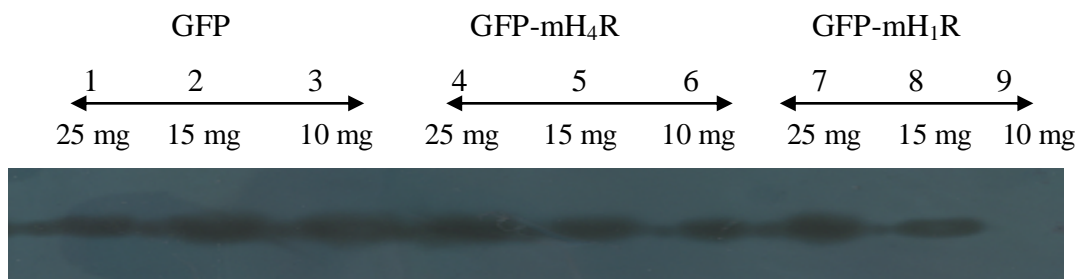


Abbildung 16: Western-Blot-Analyse des Plasmids GFP, GFP-mH₁R und GFP-mH₄R in transfizierten NIH-3T3-Zellen unter Verwendung des Anti-GFP-Antikörper.

Aufgrund der sichtbaren Banden in Abbildung 16 konnte festgestellt werden, dass die NIH-3T3-Zellen mit dem Plasmid GFP, GFP-mH₁R oder GFP-mH₄R transfiziert wurden. Die erste, zweite und dritte sichtbare Bande, welche das GFP-Protein nach Auftragen des Lysats in den Mengen von 25 mg, 15 mg, 10 mg enthält, übernimmt eine Kontrollfunktion. Während die vierte, fünfte und sechste sichtbare Bande des Molekulargewichts des Produkts des Plasmids GFP-mH₄R in Konzentrationen von 25 mg/ml, 15 mg/ml und 10 mg/ml darstellt. Sie waren sehr deutlich zu erkennen. Die Expression des Plasmids GFP-mH₁R in transfizierten NIH-3T3-Zellen war in einer Konzentrationen von 25 mg/ml und 15 mg/ml nachweisbar, während bei 10 mg/ml keine GFP-mH₁R Expressionen zu erkennen waren.

4.4.3 Nachweis des H₄R auf mRNA-Ebene in transfizierten NIH-3T3-Zellen

Nach der Transfektion der NIH-3T3-Zellen und nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden 1×10^6 Zellen entnommen und daraus die RNA isoliert. Der Nachweis der Rezeptor-spezifischen mRNAs wurde mittels RT-PCR durchgeführt. Wie aus Abbildung 17 ersichtlich, wurde die H₄R-spezifische mRNA in H₄R-transfizierten NIH-3T3-Zellen nachgewiesen. Die spezifische mRNA für die H₁R, H₂R und H₃R in H₁R- und H₄R-transfizierten NIH-3T3-Zellen konnten hingegen nicht ermittelt werden.

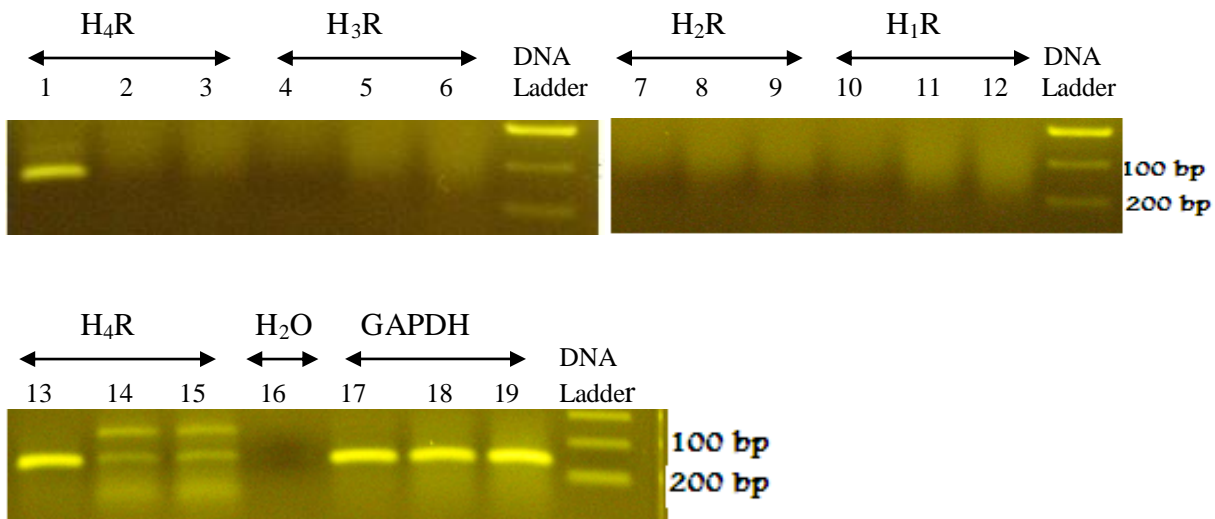


Abbildung 17: Gelelektrophoretische Darstellung der Amplifikation der mRNA der Histaminrezeptoren in H₁R-, H₄R-transfizierten NIH-3T3-Zellen. Die aufgetragenen Proben mit den Nummern 1, 4, 7, 10, 13, und 17 waren H₄R-transfizierte Zellen und mit den Nummern 2, 5, 8, 11, 14 und 18 H₁R-transfizierte Zellen, während die aufgetragenen Proben 3, 6, 12, 15 und 19 untransfizierte NIH-3T3-Zellen waren. Die Probe 16 war H₂O. Die Banden des H₄R wurden bei ca. 150 bp dargestellt. H₂R und H₃R zeigten in H₁R- und H₄R-transfizierte NIH-3T3-Zellen keine spezifischen Banden. Der H₁R konnte in H₁R-transfizierte Zellen nicht nachgewiesen werden.

4.4.4 Einfluss von Histamin und H₁R- und H₄R-Liganden auf die Migration der transfizierten NIH-3T3-Zellen

Nach der Transfektion der NIH-3T3-Zellen mit dem Plasmid GFP-mH₁R oder Plasmid GFP-mH₄R wurden die transfizierten Zellen für den Migrations-Assay verwendet. Im Migrations-Assay wurde der Einfluss von Histamin und verschiedenen H₁R- und H₄R-Liganden (Pyridylethylamin, 4-Methylhistamin, ST1006 und JNJ7777120) auf die chemotaktische Aktivität der transfizierten NIH-3T3-Zellen sowie untransfizierten NIH-3T3-Zellen untersucht. Die Abbildung 18 zeigt, dass die Stimulation der transfizierten NIH-3T3-Zellen mit Histamin (1 mmol/l) zu einer signifikant gesteigerten Auswanderungsrate der H₁R- und H₄R-transfizierten Zellen führt. Während die ausgewanderte Zellzahl in den Negativ-Kontrollen sehr gering war. Auf die chemotaktische Aktivität der untransfizierten NIH-3T3-Zellen hat Histamin kein Effekt. (Daten siehe Tab. 9.1 im Tabellenanhang). In den H₄R-transfizierten NIH-3T3-Zellen kann die Histamin-induzierte Migration durch Präinkubation mit H₄R-Antagonisten JNJ7777120 (10 µmol/l) aufgehoben werden (Abb. 19).

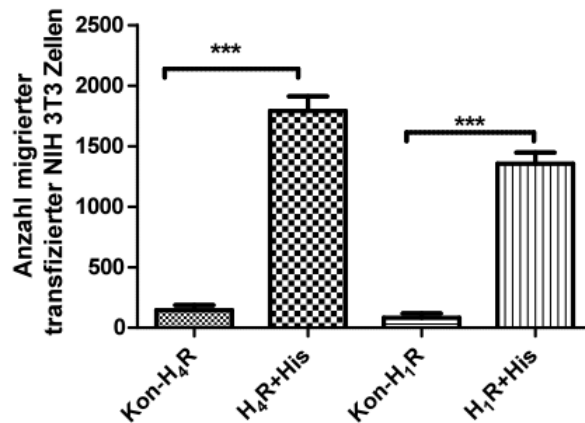


Abbildung 18: Migration der transfizierten NIH-3T3-Zellen nach Stimulation mit Histamin (His; 1 mmol/l). Darstellung der Mittelwerte \pm SEM; gepoolte Daten aus vier unabhängigen Versuchen mit jeweils drei Ansätzen pro Testsubstanz bzw. Kontrolle (Kon); ***P < 0.001.

Histamin hat kein Effekt auf die Migration der untransfizierten NIH-3T3-Zellen. (Daten siehe Tab. 9.1).

Kon-H₄R = unstimulierte H₄R-transfizierte NIH-3T3-Zellen.

H₄R+His = stimulierte H₄R-transfizierte NIH-3T3-Zellen mit Histamin.

Kon-H₁R = unstimulierte H₁R-transfizierte NIH-3T3-Zellen.

H₁R+His = stimulierte H₁R-transfizierte NIH-3T3-Zellen mit Histamin.

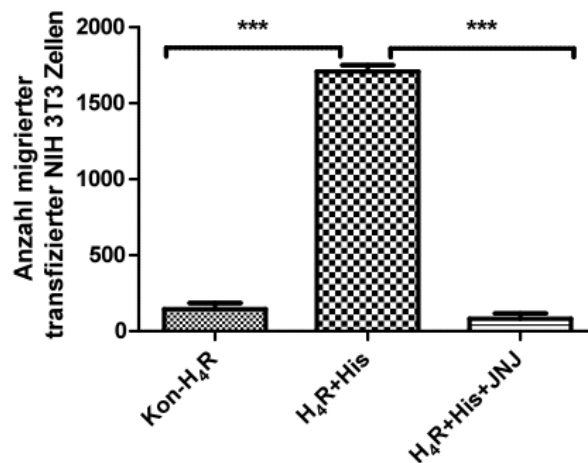


Abbildung 19: Migration der H₄R-transfizierten NIH-3T3-Zellen nach Stimulation mit Histamin (His; 1 mmol/l) und unter Einfluss einer Präinkubation dieser Zellen mit JNJ777120 (JNJ; 10 μ mol/l). Darstellung der Mittelwerte \pm SEM; gepoolte Daten aus vier unabhängigen Versuchen mit jeweils drei Ansätzen pro Testsubstanz bzw. Kontrolle (Kon); ***P < 0.001.

Kon-H₄R = unstimulierte H₄R-transfizierte NIH-3T3-Zellen.

H₄R+His = stimulierte H₄R-transfizierte NIH-3T3-Zellen mit Histamin.

H₄R+His+JNJ = stimulierte H₄R-transfizierte NIH-3T3-Zellen mit Histamin und JNJ777120.

Der selektive H₄R-Agonist 4-Methylhistamin erhöhte im Vergleich zur Negativ-Kontrolle und zu H₁R-transfizierten NIH-3T3-Zellen die Anzahl der ausgewanderten H₄R-transfizierten NIH-3T3-Zellen (Abb. 20). Auf die chemotaktische Aktivität der untransfizierten NIH-3T3-Zellen hat 4-Methylhistamin kein Effekt (Tab. 9.3 im Tabellenanhang). Der Einfluss von 4-Methylhistamin auf die chemotaktische Aktivität der transfizierten NIH-3T3-Zellen kann wiederum durch den H₄R-Antagonisten JNJ7777120 (10 µmol/l) in den H₄R-transfizierten NIH-3T3-Zellen aufgehoben werden (Abb. 21).

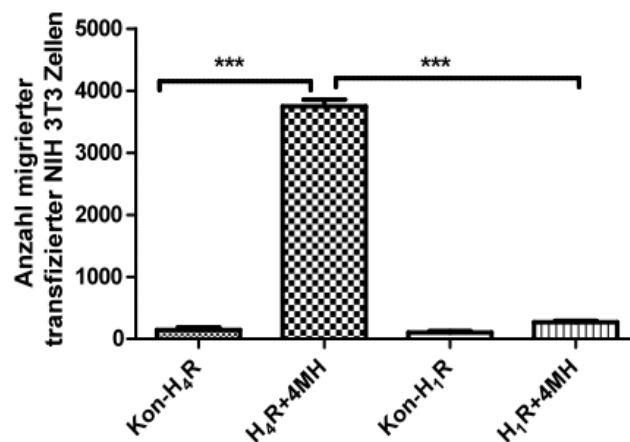


Abbildung 20: Migration der H₁R- und der H₄R-transfizierten NIH-3T3-Zellen nach Stimulation mit 4-Methylhistamin (4 MH; 10 µmol/l). Darstellung der Mittelwerte ± SEM; gepoolte Daten aus vier unabhängigen Versuchen mit jeweils drei Ansätzen pro Testsubstanz bzw. Kontrolle (Kon); ***P < 0.001. 4-Methylhistamin hat kein Effekt auf die Migration der untransfizierten NIH-3T3-Zellen. (Daten siehe Tab. 9.3) im Tabellenanhang.

Kon-H₄R = unstimulierte H₄R-transfizierte NIH-3T3-Zellen.

H₄R+4MH = stimulierte H₄R-transfizierte NIH-3T3-Zellen mit 4-Methylhistamin.

Kon-H₁R = unstimulierte H₁R-transfizierte NIH-3T3-Zellen.

H₁R+4MH = stimulierte H₁R-transfizierte NIH-3T3-Zellen mit 4-Methylhistamin.

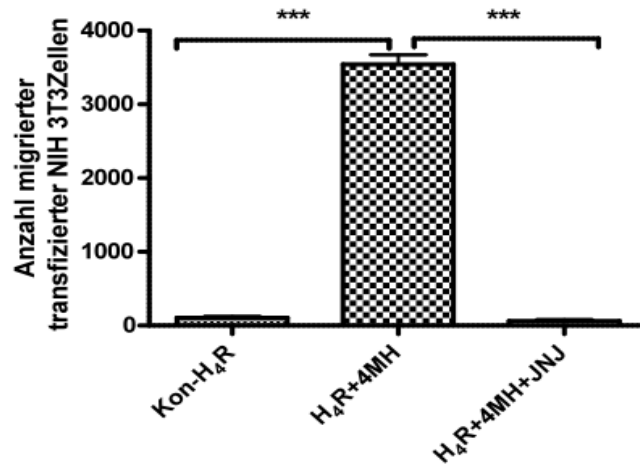


Abbildung 21: Migration der H₄R-transfizierten NIH-3T3-Zellen nach Stimulation mit 4-Methylhistamin (4 MH; 10 µmol/l) und unter Einfluss einer Präinkubation dieser Zellen mit JNJ7777120 (JNJ; 10 µmol/l). Darstellung der Mittelwerte ± SEM; gepoolte Daten aus vier unabhängigen Versuchen mit jeweils drei Ansätzen pro Testsubstanz bzw. Kontrolle (Kon); ***P < 0.001.

Kon-H₄R = unstimulierte H₄R-transfizierte NIH-3T3-Zellen.

H₄R+4MH = stimulierte H₄R-transfizierte NIH-3T3-Zellen mit 4-Methylhistamin.

H₄R+4MH+JNJ = stimulierte H₄R-transfizierte NIH-3T3-Zellen mit 4-Methylhistamin und JNJ7777120.

Der H₄R-Agonist ST1006 erhöhte dosisabhängig die Anzahl der ausgewanderten H₄R-transfizierten NIH-3T3-Zellen im Gegensatz zur Kontrolle und zu H₁R-transfizierten Zellen (Abb.22). Auf die Migration der untransfizierten NIH-3T3-Zellen hat der H₄R-Agonist ST1006 kein Effekt (Daten siehe Tab. 9.6, 9.7 im Tabellenanhang).

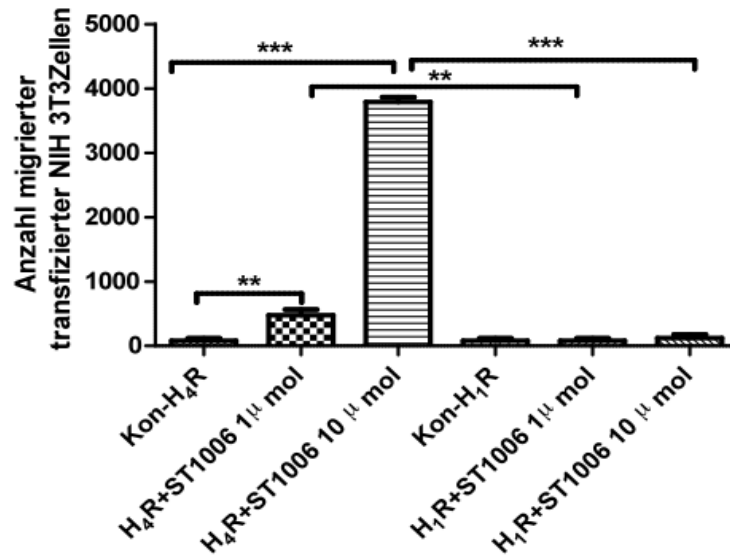


Abbildung 22: Migration der H₁R- und H₄R-transfizierten NIH-3T3-Zellen nach Stimulation mit dem H₄R-Agonisten ST1006 (1 µmol/l, 10 µmol/l). Darstellung der Mittelwerte ± SEM; gepoolte Daten aus vier unabhängigen Versuchen mit jeweils drei Ansätzen pro Testsubstanz bzw. Kontrolle (Kon); **P < 0.01; ***P < 0.001. ST1006 hat kein Effekt auf die Migration der untransfizierten NIH-3T3-Zellen. (Daten siehe Tab. 9.6, 9.7) im Tabellenanhang.

Kon-H₄R = unstimulierte H₄R-transfizierte NIH-3T3-Zellen.

H₄R+ST1006 1 µmol = stimulierte H₄R-transfizierte NIH-3T3-Zellen mit ST1006 1 µmol/l.

H₄R+ST1006 10 µmol = stimulierte H₄R-transfizierte NIH-3T3-Zellen mit ST1006 10 µmol/l.

Kon-H₁R = unstimulierte H₁R-transfizierte NIH-3T3-Zellen.

H₁R+ST1006 1 µmol = stimulierte H₁R-transfizierte NIH-3T3-Zellen mit ST1006 1 µmol/l.

H₁R+ST1006 10 µmol = stimulierte H₁R-transfizierte NIH-3T3-Zellen mit ST1006 10 µmol/l.

Auch Pyridylethlamin, ein H₁R-Agonist, induziert gegenüber der Kontrolle und den H₄R-transfizierten NIH-3T3-Zellen eine gesteigerte Migration der H₁R-transfizierten NIH-3T3-Zellen (Abb. 23). Pyridylethlamin hatte kein Einfluss auf die chemotaktische Aktivität der untransfizierten NIH-3T3-Zellen (Tab.9.5 im Tabellenanhang).

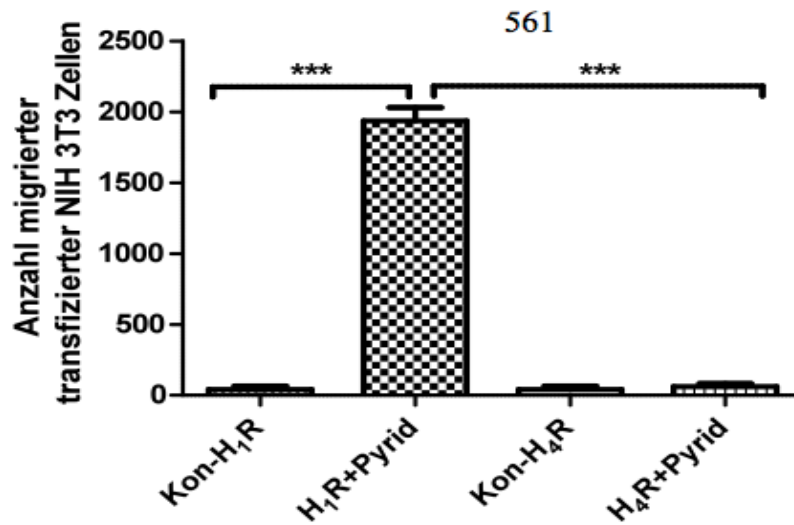


Abbildung 23: Migration der H₁R- und H₄R-transfizierten NIH-3T3-Zellen nach Stimulation mit Pyridylethylamin (Pyrid; 10 µmol/l). Darstellung der Mittelwerte ± SEM; gepoolte Daten aus vier unabhängigen Versuchen mit jeweils drei Ansätzen pro Testsubstanz bzw. Kontrolle (Kon); ***P<0.001. Pyridylethylamin hat kein Effekt auf die Migration der untransfizierten NIH-3T3-Zellen. (Daten siehe Tab. 9.5) im Tabellenanhang.

Kon-H₁R = unstimulierte H₁R-transfizierte NIH-3T3-Zellen.

H₁R+Pyrid = stimulierte H₁R-transfizierte NIH-3T3-Zellen mit Pyridylthylamin.

Kon-H₄R = unstimulierte H₄R-transfizierte NIH-3T3-Zellen.

H₄R+Pyrid = stimulierte H₄R-transfizierte NIH-3T3-Zellen mit Pyridylthylamin.

4.5 *In-vivo*-Versuche

4.5.1 Untersuchung des Einflusses von Histamin, 4-Methylhistamin und ST1006 auf das Kratzverhalten von H₄R-Knockout- und Wildtyp-Mäusen

In diesem Versuch wurde das Kratzverhalten nach intradermaler Injektion von Histamin, der H₄R-Agonisten 4-Methylhistamin und ST1006 vergleichend in H₄R-Knockout- und Wildtyp-Mäusen getestet (als Vehikelgruppe wurde den Mäusen PBS injiziert). In einem ersten Versuch wurde die Wirkung des Histamins auf das Kratzverhalten bei Wildtyp-Mäusen und H₄R-Knockout-Mäusen untersucht. Wie aus Abbildung 24 ersichtlich, kratzten sich die Wildtyp-Mäuse deutlich häufiger als H₄R-Knockout-Mäuse nach intradermaler Gabe des Histamins.

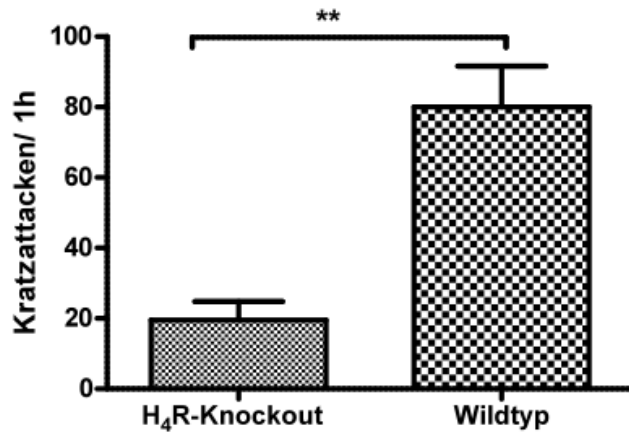


Abbildung 24: Kratzverhalten nach intradermaler Injektion von Histamin (0,25 µmol/50 µl) vergleichend bei Wildtyp- und H₄R-Knockout-Mäusen. Beobachtungszeitraum: 60 min. Darstellung von Mittelwerten ± SEM; **P < 0.01. n = 6 Mäuse pro Gruppe.

Abbildung 25 zeigt das starke Kratzverhalten bei Wildtyp-Mäusen nach intradermaler Injektion von 4-Methylhistamin (50 nmol/50µl) verglichen mit den Vehikel-behandelten Tieren. Das Kratzverhalten nach intradermaler Injektion von 4-Methylhistamin bei Wildtyp-Mäusen verglichen mit H₄R-Knockout-Mäusen wird in Abbildung 26 gezeigt. Wildtyp-Mäuse zeigten starke Kratzattacken nach Injektion des H₄R-Agonisten 4-Methylhistamin (50 nmol/50µl), während die H₄R-Knockout-Mäuse sich nur vereinzelt an der Injektionsstelle kratzten.

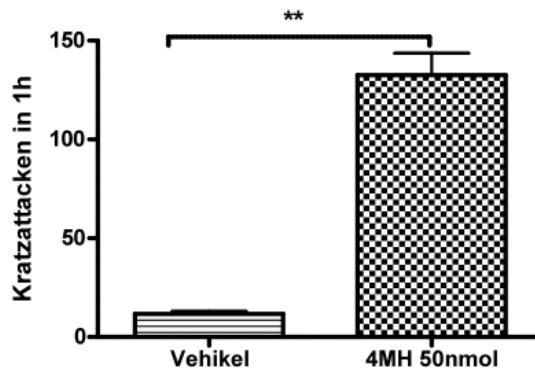


Abbildung 25: Kratzverhalten bei Wildtyp-Mäusen nach intradermaler Injektion von 4-Methylhistamin (50 nmol/50 µl) verglichen mit den Vehikel-behandelten Tieren. Beobachtungszeitraum: 60 min; Darstellung von Mittelwerten ± SEM; **P < 0.01; n = 6 Mäuse pro Gruppe.

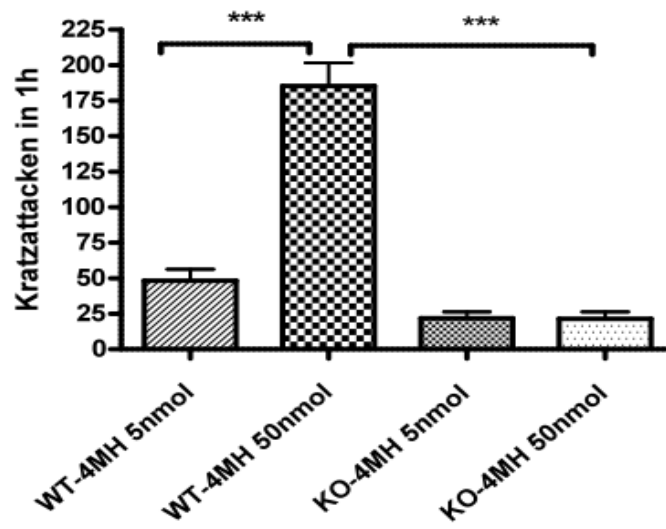


Abbildung 26: Kratzverhalten nach intradermaler Injektion von 4-Methylhistamin (4MH) (5 und 50 nmol/50 μ l) vergleichend bei Wildtyp (WT)- und H₄R-Knockout (KO)-Mäusen. Beobachtungszeitraum: 60 min; Darstellung von Mittelwerten \pm SEM; ***P < 0.001; n = 6 Mäuse pro Gruppe.

Abbildung 27 zeigt die Anzahl an Kratzattacken der Wildtyp-Mäuse nach intradermaler Injektion des H₄R-Agonisten ST1006 (50 nmol/50 μ l). Bei den mit ST1006-behandelten Mäusen waren im Beobachtungszeitraum signifikant stärkere Kratzattacken als bei den Vehikel-behandelten Tieren festzustellen.

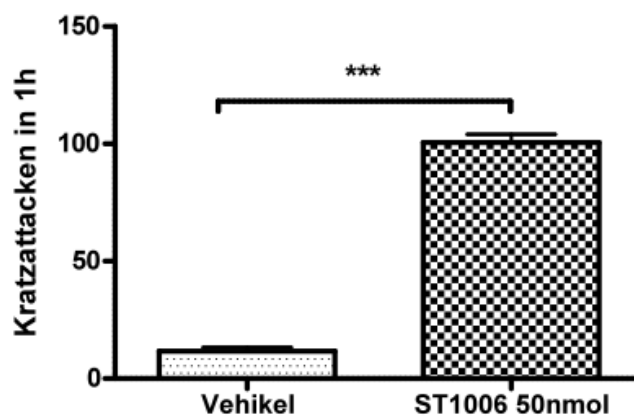


Abbildung 27: Kratzverhalten bei Wildtyp-Mäusen nach intradermaler Injektion von ST1006 (50 nmol/50 μ l) verglichen mit den Vehikel-behandelten Tieren. Beobachtungszeitraum: 60 min; Darstellung von Mittelwerten \pm SEM; ***P < 0.001; n = 6 Mäuse pro Gruppe.

Im folgenden Versuch wurde die Wirkung des H₄R-Agonisten ST1006 in verschiedenen Dosierungen auf das Kratzverhalten bei Wildtyp-Mäusen und H₄R-Knockout-Mäusen untersucht. Wie aus Abbildung 28 ersichtlich, führt die intradermale Gabe des H₄R-Agonisten ST1006 dosisabhängig zu einer Verstärkung der Kratzattacken bei Wildtyp-Mäusen, während die H₄R-Knockout-Mäuse im Beobachtungszeitraum deutlich weniger Kratzattacken zeigten.

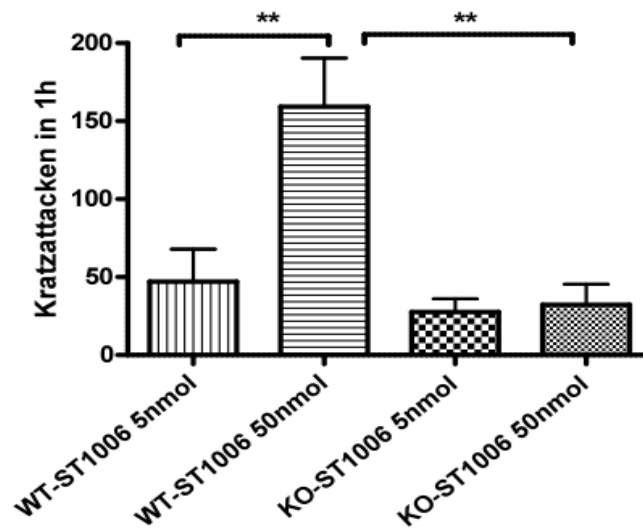


Abbildung 28: Kratzverhalten nach intradermaler Injektion des H₄R-Agonisten ST1006 (5 und 50 nmol/50µl) vergleichend bei Wildtyp (WT)- und H₄R-Knockout (KO)-Mäusen. Beobachtungszeitraum: 60 min; Darstellung von Mittelwerten ± SEM; **P<0.001; n = 6 Mäuse pro Gruppe.

4.5.2 Einfluss des H₄R-Agonisten auf den Hapten-induzierten Juckreiz

In einem murinen Kontaktallergiemodell wurde der Einfluss der H₄R-Agonisten ST1006 und 4-Methylhistamin auf den Hapten-induzierten Juckreiz untersucht. Die Untersuchungen wurden mit TDI-sensibilisierten Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Die H₄R-Agonisten ST1006 und 4-Methylhistamin wurden den Mäusen jeweils vor topischer Kontaktallergen-Gabe intradermal injiziert und das Kratzverhalten nachfolgend über einen Zeitraum von 1 h beobachtet.

4.5.2.1 H₄R-Agonist ST1006

In einem ersten Vorversuch wurde die Wirkung des H₄R-Agonisten ST1006 auf den Allergie-induzierten Juckreiz im TDI-Modell bei Wildtyp-Mäusen untersucht. Wie in Abbildung 29 ersichtlich, kratzten sich die mit dem H₄R-Agonisten ST1006 (50 nmol/50 µl) behandelten Mäusen deutlich häufiger nach der TDI-Gabe als die Vehikel- behandelten Tiere.

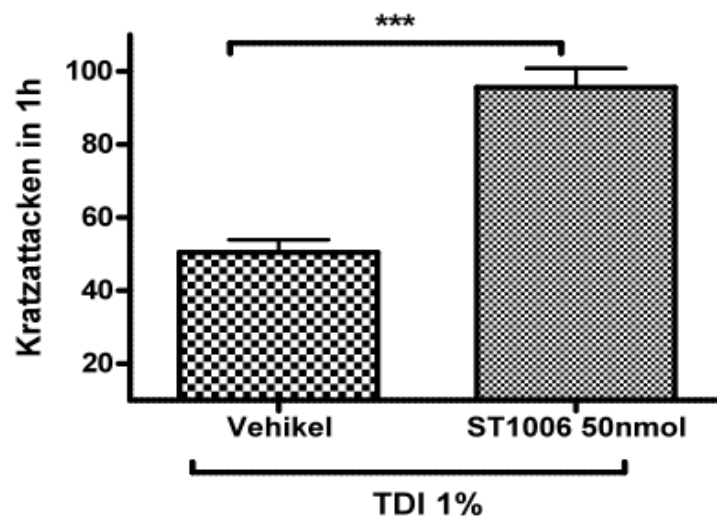


Abbildung 29: Wirkung des H₄R-Agonisten ST1006 (50 nmol/50 µl) auf den TDI-induzierten Juckreiz. Beobachtungszeitraum: 60 min; Darstellung von Mittelwerten ± ESM; ***P < 0.001; n = 6 Mäuse pro Gruppe.

4.5.2.2 H₄R-Agonist 4-Methylhistamin

Von weiterem Interesse war der Einfluss des H₄R-Agonisten 4-Methylhistamin auf den Allergie-induzierten Juckreiz im TDI-Modell bei Wildtyp-Mäusen. Abbildung 30 zeigt die Anzahl der Kratzattacken der Mäuse nach Hapten-Challenge und Behandlung mit 4-Methylhistamin (50 nmol/50 µl). Bei den 4-Methylhistamin behandelten Mäuse konnten im Beobachtungszeitraum ebenfalls stärkere Kratzattacken als bei den Vehikel-behandelten Tiere nachgewiesen werden.

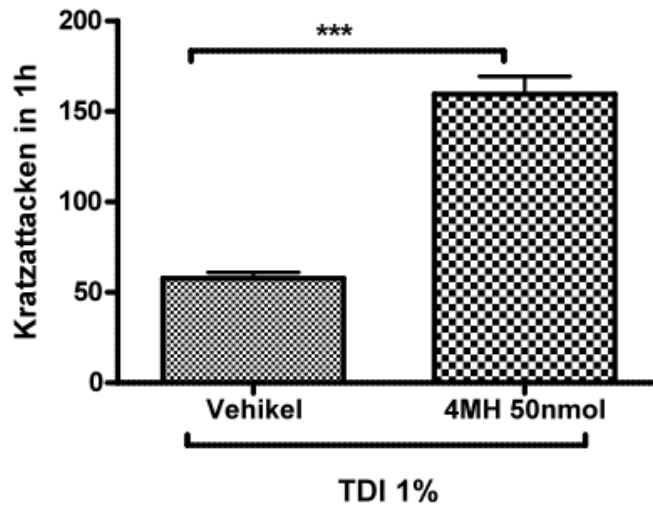


Abbildung 30: Wirkung des H₄R-Agonisten 4-Methylhistamin (4MH) (50 nmol/50 µl) auf den TDI-induzierten Juckreiz. Beobachtungszeitraum: 60 min; Darstellung von Mittelwerten ± SEM; *P<0.001; n = 6 Mäuse pro Gruppe.**

5 Diskussion

Durch die Bindung des Histamins an die bisher bekannten Histaminrezeptoren H₁R-H₄R werden die Effekte des biogenen Amins vermittelt. Die vier Histaminrezeptoren gehören zu der Gruppe der GPCRs (GANTZ et al. 1991; YAMASHITA et al. 1991) und sie unterscheiden sich in ihrem Expressionsprofil, ihrer Funktion, ihrem Signaltransduktionsweg und ihrer Affinität zu Histamin. Deshalb war das Ziel des molekularbiologischen Teils dieser Dissertation eine vergleichende Analyse von zwei der vier bekannten Histaminrezeptoren der Maus auf molekularer Ebene unter Verwendung des Sf9-Zell/Baculovirus-Expressionssystems. Das Ziel des pharmakologischen Teils war die Expression und Untersuchung der pharmakologischen Eigenschaften der murinen H₁R und H₄R unter Verwendung der NIH-3T3-Zellen als eukaryotisches Expressionssystem. Als funktionelle Untersuchung schloss sich eine Migrationsanalyse an, um den Einfluss von Histamin via H₁R und H₄R auf die chemotaktische Aktivität dieser Zellen zu testen und zu untersuchen, ob sich diese transfizierten Zellen für ein Screening-Testverfahren eignen. Neben *In-vitro*-Versuchen wurden auch *In-vivo*-Untersuchungen zur Histamin-induzierten Juckreizentstehung sowie der Wirkung von H₄R-Agonisten, insbesondere des selektiven H₄R-Agonisten ST1006, bei der Entstehung von allergischem Juckreiz bei Wildtyp-Mäusen und H₄R-Knockout-Mäusen durchgeführt.

5.1 Klonierung des murinen H₁R und H₃R

Durch die Klonierung kann man eine große DNA-Menge für ein Experiment gewinnen. Dies ermöglicht nachfolgend eine speziesspezifische Untersuchung der murinen H_xR-Sequenzen. Es wurden auch die speziesspezifischen Bindungseigenschaften der murinen Histamin-Rezeptoren untersucht. Der humane H₁R wurde 1993 kloniert (DE BACKER et al. 1993) und der humane H₂R erstmals 1991 (GANTZ et al. 1991). Die humanen H₃R und H₄R wurden 1999 und 2000 kloniert (LOVENBERG et al. 1999 ; ODE et al. 2000). Bisher konnte der H₄R des Menschen sowie der des Hundes, der Maus, der Ratte, des Javeaffen, des Meerschweinchens und des Schweins kloniert und charakterisiert werden (LIU et al. 2001, ODA et al. 2002; ODA et al.

2005; JIANG et al. 2008). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der mH₁R und mH₃R in einen Baculovirus kloniert und damit der Grundstein für weiterführende pharmakologische Studien bei der Maus geschaffen. Für die Identifizierung der mH₁R- oder mH₃R-Sequenz wurde die PCR als Klonierungsstrategie verwendet. Sie besitzt den Vorteil einer hohen Sensitivität und kann mithilfe von degenerierten Primern, die von bekannten H₁R- oder H₃R-Sequenzen anderer Spezies abgeleitet wurden, durchgeführt werden. Unter Verwendung der Taq-Polymerase kann man keine Fragmente mit glatten Enden produzieren, sondern man schafft einen unspezifischen Überhang von einer Base (CLARK, 1988). Diese Base ist in der Mehrzahl ein Adenosin (COSTA u. WEINER, 1994). Hier muss man seine PCR-Produkte mit einem Vektor mit Thyamin-Überhang ligieren (TA-Klonierung). Für die Herstellung rekombinanter Viren wurden die kodierten Aminosäuresequenzen des mH₁R und mH₃R in einen Baculovirus-Transfer-Vektor (pVL-1392-Plasmid) kloniert. Ein Transfer-Vektor besteht aus einem Replikationsstart, einem Selektionsgen und einer Klonierungsstelle, um fremde DNA in den Vektor einschleusen zu können. Die Klonierungsstelle enthält Schnittstellen, die den Vektor für die Klonierung schneiden. Der linearisierte pVL1392 Vektor wurde mittels der BamHI und XbaI-Restriktionsenzymen ausgeschnitten; die Plasmide mH₁R und mH₃R auch mit den Restriktions-Endonukleasen BamHI und XbaI. Durch die Ausbildung des vier Nukleinbasen umfassenden 5'-Überhangs beim pVL1392 Vektor und bei den mH₁R- und mH₃R Plasmiden werden mH₁R und mH₃R, wie schon für den mH₄R gezeigt (SCHNELL et al. 2011), mit dem pVL1392 Vektor erfolgreich verbunden.

5.2 Expression des murinen H₁R und H₃R unter Verwendung des Sf9-Zell/Baculovirus-Expressionssystems

Das Vorhandensein von murinen Histaminrezeptor-cDNAs ermöglicht die Untersuchung der pharmakologischen Eigenschaften von mH_xR in rekombinanten Systemen unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen. Damit kann man die Unterschiede zwischen Histaminrezeptor-Liganden untersuchen. Als Voraussetzung für Untersuchungen in rekombinanten Rezeptorproteinen ist, dass die Histaminrezeptoren der Maus in der Membran exprimiert werden.

In dieser Arbeit wurde das Sf9-Zell/Baculovirus-Expressionssystem verwendet. Der Vorteil dieses rekombinanten Systems ist, dass sowohl eine hohe Ausbeute von Rezeptorproteinen als auch an G-Proteinen erreicht wurde. Außerdem haben Sf9-Zellen selbst keine konstitutiv aktiven GPCRs und auch keine endogenen G-Proteine, die mit exogen exprimierten G-Protein gekoppelten Rezeptoren effektiv interagieren. Dadurch werden die Untersuchungen von GPCRs und die Rekonstitution von GPCRs und G-Proteinen ermöglicht.

Diese rekombinanten Baculoviren wurden mit den cDNAs verschiedener Rezeptoren, z.B. humanen H₁R, H₄R, des caninen H₄R, des ratten H₄R und murinen H₄R herangezogen und zur heterologen Expression für pharmakologische Studien dieser Rezeptoren verwendet. Die Expression des humanen H₄R und des caninen H₄R im Sf9-Zell/Baculovirus-Expressionssystem war erfolgreich (SCHNEIDER et al. 2010), während bei den murinen H₄R und ratten H₄R keine spezifische Bindung an ihre Liganden unter Verwendung des Sf9-Zell-Expressionssystem beobachtet werden konnte (SCHNELL u. SEIFERT et al. 2010).

Aufgrund der niedrigen Expressionsrate in Sf9-Zellen konnte die Affinität des mH₁R und des mH₃R in der vorliegenden Arbeit auch nicht bestimmt werden. Die Bindungsaffinität von [³H] Histamin und [³H] Meypramin an mH₁R und mH₃R in den Versuchen der vorliegenden Arbeit waren unzureichend. Diese Ergebnisse entsprechen den Ergebnissen von SCHNELL und SEIFERT (2010) für den murinen H₄R. Es scheint, dass die murinen Histaminrezeptoren, wenn sie rekombinant in Sf9-Zellen exprimiert werden, eine unnatürliche Konformation annehmen, die eine effektive Bindung des Liganden nicht erlaubt. Eventuell sind posttranslationale Modifikationen, wie etwa Glykosylierungen, die in Sf9-Zellen anders als in Säugetierzellen geschehen, entscheidend für die Ligandbindung des murinen H₄R.

5.3 Expression von mH₄R in transfizierten NIH-3T3-Zellen

Zur Untersuchung der pharmakologischen Eigenschaften des H₄R wurden verschiedene Zelllinien verwendet. Sf9-Zellen wurden erfolgreich zur Expression des humanen H₄R und caninen H₄R verwendet (SCHNEIDER et al. 2010). Von JIANG et al. (2008) wurden COS-7-

Zellen zur Expression des caninen H₄R genutzt. Neben Sf9-Zellen war die Expression des humanen H₄R in HEK293-Zellen auch erfolgreich (VAN RIJN et al. 2006). In den Versuchen der vorliegenden Arbeit war die Expression der Plasmide GFP-mH₁R oder GFP-mH₄R in transfizierten NIH-3T3-Zellen mittels Western-Blot nachweisbar. Außerdem wurde die spezifische mRNA des H₄R in H₄R-transfizierten NIH-3T3-Zellen nachgewiesen. Die spezifische mRNA des H₁R konnte durch RT-PCR in H₁R-transfizierten NIH-3T3-Zellen nicht nachgewiesen werden. Die spezifische mRNA des H₂R und H₃R konnten durch RT-PCR in H₁R- und H₄R transfizierten NIH-3T3-Zellen ebenfalls nicht ermittelt werden. Nach diesen Ergebnissen kann man vermuten, dass H₄R-transfizierte NIH-3T3-Zellen für pharmakologische Charakterisierungsstudien des H₄Rs mithilfe der Radioligandenbindung erfolgreich sein werden.

5.4 Einfluss des H₄R auf die Migration der transfizierten NIH-3T3-Zellen

Die Rolle des H₄R im Rahmen des Entzündungsgeschehens, der Allergien und in der Immunantwort ist noch immer Gegenstand laufender Untersuchungen. So versuchten z. B. HOFSTRA et al. (2003) und THURMOND et al. (2004) den Einfluss von Histamin via H₄R auf die chemotaktische Aktivität der murinen Mastzellen nachzuweisen. Sie konnten zeigen, dass die Stimulation der murinen Mastzellen mit Histamin zu einer Mastzellchemotaxis führt. LING et al. (2004) wiesen nach, dass Histamin über den H₄R chemotaktisch auf humane Eosinophile wirkt und zudem die chemotaktische Aktivität anderer Faktoren wie Eotaxin auf diese erhöht. Dieser Effekt konnte durch den H₄R-Antagonisten JNJ7777120 und den H₃R/H₄R-Antagonisten Thioperamid aufgehoben werden. BÄUMER et al. (2008) zeigten, dass Histamin in einer Konzentration von 1 mmol/l zu einer Steigerung der Migration von murinen dendritischen Zellen führt. Diese induzierte Migration konnte sowohl durch den H₄R-Antagonisten JNJ7777120 als auch durch den H₁R Antagonisten Diphenhydramin aufgehoben werden. Außerdem wurde durch ROSSBACH et al. (2009) der Einfluss von Histamin auf die Migration von caninen Mastocytomzellen (C2-Zellen) untersucht. Es konnte bestätigt werden, dass die Stimulation der C2-Zellen mit Histamin im Vergleich zu den Negativ-Kontrollen zu einer gesteigerten Migration

führt. Diese Effekte konnten ebenfalls durch Präinkubation mit dem H₄R-Antagonisten JNJ7777120 wieder aufgehoben werden (ROSSBACH et al. 2009).

Zur weiteren Untersuchung der Rolle des H₄R im Rahmen des Entzündungsgeschehens wurde in dieser Arbeit der Einfluss von H₄R auf die chemotaktische Aktivität der transfizierten NIH-3T3-Zellen betrachtet. Diese Zellen wurden mit dem H₁R oder dem H₄R transfiziert und für funktionelle Untersuchungen verwendet. Die ersten Ergebnisse der Migrationsversuche dieser Arbeit bestätigen, dass Histamin über den H₄R chemotaktisch auf H₄R-transfizierte NIH-3T3-Zellen wirkt. Diese gesteigerte Chemotaxis war H₄R-spezifisch, da sie durch den hochselektiven H₄R-Antagonisten JNJ7777120 zu blockieren war. Histamin bewirkt ebenfalls über den H₁R eine gesteigerte Chemotaxis, wie durch H₁R-exprimierende NIH-3T3-Zellen gezeigt werden konnte. So wanderten nach Stimulation der transfizierten NIH-3T3-Zellen mit Histamin mehr Zellen aus und diese Effekte ließen sich durch Inkubation mit dem H₁R-Agonisten Pyridylethylamin ebenfalls induzieren. Aber die spezifische mRNA des H₁R konnte durch RT-PCR in H₁R-transfizierte NIH-3T3-Zellen nicht nachgewiesen werden. Dies mag durch die relativ geringe Expression des H₁R erklärbar sein, da auch der Rezeptornachweis mittels Western-Blot und Immunfluoreszenz erheblich schwächer ausfiel als für NIH-3T3-Zellen, die mit dem H₄R transfiziert worden sind. Außerdem bestätigen die Ergebnisse der Migrationsversuche dieser Arbeit, dass die Stimulation der transfizierten NIH-3T3-Zellen mit dem H₄R-Agonisten ST1006 (10 µmol/l) den stärksten Effekt auf die Migration der H₄R-transfizierten NIH-3T3-Zellen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle und den H₁R-transfizierten NIH-3T3-Zellen hat. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchung ergänzen bisher publizierte Studien der pharmakologischen Eigenschaften von ST1006 am humanen H₄R unter Verwendung des Sf9-Zell Expressionssystems. Im humanen System ist ST1006 ein Partialagonist des H₄R. ST1006 zeigt eine hohe Affinität zum humanen H₄R ($pK_i = 7.94$, $K_i = 0.012 \pm 0.003$), während die Affinität von ST1006 zu den humanen H₁R und H₂R niedrig waren ($pK_i < 6.0$) (SANDER et al. 2009). Daraus ergibt sich für den H₄R-Agonisten ST1006 eine über 80-fach höhere Selektivität zum humanen H₄R gegenüber den humanen H₁R und H₂R (SANDER et al. 2009). Von STEGAEV et al. (2012) wurde die Wirkung des H₄R-Agonisten ST1006 auf humane Speicheldrüsenzellen (*Healthy Salivary Gland cells*) getestet. Nach der Stimulation der Speicheldrüsenzellen mit

ST1006 kommt es dosisabhängig zur Produktion von Interleukin-8 (IL-8) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (STEGAEV et al. 2012). Die Bindungsaffinität von ST1006 zum murinen H₄R wurde bislang noch nicht untersucht. Aber die verstärkte Auswanderung der H₄R-transfizierten NIH-3T3-Zellen durch ST1006 zeigt eindrucksvoll, dass ST1006 auch als Agonist auf den murinen H₄R wirkt. Dies sind wichtige Erkenntnisse, da es eine große Spezifität von H₄R-Liganden gibt und daher alle neuen Substanzen im jeweiligen Testmodell validiert werden müssen (LIM et al. 2005).

4-Methylhistamin (10 µmol/l) zeigte vergleichbar zu ST1006 den stärksten Effekt auf die Migration in H₄R-transfizierten NIH-3T3-Zellen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle und den H₁R-transfizierten NIH-3T3-Zellen. Diese Effekte ließen sich durch Präinkubation mit dem H₄R-Antagonisten JNJ7777120 wieder aufheben. 4-Methylhistamin hat nicht nur eine hohe Affinität zum humanen H₄R ($pKI = 7.3 \pm 0.1$) im Gegensatz zum murinen H₄R ($pKi = 6.8 \pm 0.1$) (LIM et al. 2010), sondern weist auch eine 100-fach höhere Selektivität zum humanen H₄R gegenüber humanen H₁R auf (LIM et al. 2005). Durch LIM et al. (2005) wurde der Einfluss von 4-Methylhistamin auf die Migration von humanen Monozyten und dendritischen Zellen untersucht. 4-Methylhistamin führte in einer Konzentration von 10 µmol/l zu einer Steigerung der Migration von Monozyten und dendritischen Zellen.

Die Ergebnisse der Migrationsversuche dieser Arbeit zeigen, dass die H₄R-Liganden sowie Liganden von H₁R kein Einfluss auf die Migration von untransfizierten NIH-3T3-Zellen haben.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass die Transfektion der NIH-3T3-Zellen mit dem murinen H₁R als auch H₄R erfolgreich war, da sich der Rezeptor im Western-Blot, in der RT-PCR und durch funktionelle Untersuchungen nachweisen ließ.

Am Beispiel des noch wenig untersuchten H₄R-Agonisten ST1006 konnte dargelegt werden, dass das Expressionssystem zur ersten Charakterisierung von möglichen neuen Liganden gut geeignet ist, da der Migrationsassay mit recht geringem technischen Aufwand durchführbar ist.

5.5 Einfluss von Histamin, 4-Methylhistamin und ST1006 auf das Kratzverhalten der Maus

Für die Entstehung von Juckreiz wurde die Rolle der H₄R-Agonisten ST1006 und 4-Methylhistamin bei Wildtyp-Mäusen und H₄R-Knockout-Mäusen untersucht.

Histamin ist seit langer Zeit als Auslöser von Juckreiz bekannt (STÄNDER u. STEINHOFF, 2002; IKOMA et al. 2003a; 2003b). Die Ergebnisse von *In-vivo*-Versuchen im Rahmen dieser Arbeit konnten bestätigen, dass Histamin und der H₄R-Agonist 4-Methylhistamin nach intradermaler Injektion einen dosisabhängigen Juckreiz bei den Mäusen induzieren. Dieser Juckreiz war bei Wildtyp-Mäusen wesentlich stärker ausgeprägt als bei den H₄R-Knockout-Mäusen. Entsprechende Ergebnisse sind auch von DUNFORD et al. (2007) publiziert worden. In der Studie von DUNFORD et al. (2007) wurde die Rolle des Histamins und des H₄R-Agonisten 4-Methylhistamin bei der Entstehung des Juckreizes in CD-1-Mäusen untersucht. Diese Studie zeigte, dass Histamin einen starken Juckreiz bei CD-1-Mäusen verursacht. Dieser Histamin-induzierte Juckreiz konnte durch die vorherige systemische Behandlung mit dem H₄R-Antagonisten JNJ777120 und dem H₁R-Antagonisten Diphenhydramin wieder gehemmt werden. Die H₁R-Antagonisten Fexfenadin und Desloratadin konnten interessanterweise den Histamin-induzierten Juckreiz nicht hemmen.

Der H₄R-Agonist 4-Methylhistamin induzierte nach intradermaler Injektion einen dosisabhängigen Juckreiz bei CD-1-Mäusen. 4-Methylhistamin induzierter Juckreiz wurde bei CD-1-Mäusen durch die Behandlung mit dem H₄R-Antagonisten JNJ777120 wieder blockiert. Als weiteres Kontrollexperiment wurde 4-Methylhistamin Wildtyp-Mäusen und H₄R-Knockout-Mäusen injiziert. Der Juckreiz war wie bei den eigenen Untersuchungen bei den Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu den H₄R-Knockout-Mäusen sehr viel stärker ausgeprägt (DUNFORD et al. 2007).

Das bereits *in vivo* als H₄R-Agonist charakterisierte ST1006 verursachte wie Histamin und 4-Methylhistamin ein wesentlich stärkeres Kratzverhalten bei den Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu den H₄R-Knockout-Mäusen. Diese Ergebnisse unterstützen die *In-vitro*-Befunde, dass der H₄R-Agonist ST1006 auch ein Agonist für den murinen H₄R ist.

In unserer Arbeitsgruppe wurde die Rolle von Histamin und der H₄R-Agonisten Clobenpropit und VUF8430 bei der Entstehung des Juckreizes bei BALB/c-Mäusen und NMRI-Mäusen untersucht. Bei BALB/c-Mäusen verursachte Histamin und Clobenpropit nach intradermaler Injektion einen sehr viel stärkeren dosisabhängigen Juckreiz im Vergleich zu NMRI-Mäusen. Der Clobenpropit-induzierte Juckreiz konnte durch die Behandlung mit dem H₄R-/H₃R-Antagonisten Thioperamid wieder gehemmt werden (WENDORFF, 2008; ROSSBACH, 2009).

Zusammenfassend belegen die eigenen Untersuchungen, dass der H₄R bei der Mediiierung von Juckreiz bei Mäusen eine zentrale Rolle spielt. ST1006 konnte auch *In vivo* als H₄R-Agonist bei der Maus charakterisiert werden und könnte nun für Folgeuntersuchungen *In vivo* beispielsweise in Mausmodellen der Allergie genutzt werden.

5.6 Rolle des H₄R in der Allergen-induzierten Juckreizentstehung im Mausmodell

Die Effekte der H₄R-Antagonisten wie JNJ7777120 und Thioperamid auf den Hapten-induzierten Juckreiz und die Entzündungsreaktion wurden bereits z.B. von WENDORFF (2008); ROSSBACH et al. (2009); COWDEN et al. (2010) und BUNK (2011) beschrieben. Die Effekte von H₄R-Agonisten auf die Allergen-induzierte Entzündung und die Allergen-induzierte Juckreizentstehung wurden bisher jedoch noch nicht untersucht.

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Effekte der H₄R-Agonisten ST1006 und 4-Methylhistamin auf den Hapten-induzierten Juckreiz in einem murinen Kontaktallergenmodell (TDI-Modell) betrachtet. Insgesamt weisen die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine wesentliche Rolle des H₄R in der Allergen-induzierten Juckreizentstehung hin. Das TDI-Modell ist gut in der Arbeitsgruppe etabliert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Applikation der Haptene auf die enthaarte Nackenhaut sensibilisierter Tiere innerhalb weniger Minuten zu einem gesteigerten Kratzverhalten führt. Diese Ergebnisse entsprechen den Ergebnissen von ROSSBACH et al. (2009). Interessanterweise zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die intradermale Gabe des H₄R-Agonisten ST1006 das durch TDI-induzierte Kratzverhalten

steigert. Ähnliche Beobachtungen waren mit dem H₄R-Agonisten 4-Methylhistamin zu machen. So kann also im murinen Kontaktallergenmodell der TDI-induzierte Juckreiz durch systemische Gabe des H₄R-Antagonisten JNJ7777120 dosisabhängig signifikant gehemmt werden (ROSSBACH et al. 2009), aber auch durch H₄R-Agonisten noch weiter gesteigert werden.

Der H₁R-Antagonist Diphenhydramin besitzt im TDI-Modell eine hemmende Eigenschaft auf den Juckreiz, während der H₂R-Antagonist Ranitidin die Kratzattacken nicht hemmt (ROSSBACH et al. 2009). Die stärkste antipruritogene Wirkung wurde mit einer kombinierten Gabe von JNJ7777120 und Cetirizin erzielt, wodurch der Juckreiz im TDI-Modell sogar um über 90 % reduziert werden konnte (ROSSBACH et al. 2009). Diese und die aktuellen eigenen Untersuchungen zeigen auf, dass sowohl der H₁R als auch der H₄R am Allergen (Hapten)-induzierten Juckreiz zumindest bei der Maus beteiligt ist.

6 Zusammenfassung

Kaula Saad

Pharmakologische Charakterisierung der murinen Histamin H₁- und H₄-Rezeptoren

Das Ziel dieser Dissertation war die Etablierung von *In-vitro* und *In-vivo*-Modellen zur Untersuchung von Histaminrezeptor-Liganden in der Maus.

Im ersten Teil sollten die Eigenschaften der Histaminrezeptoren H₁R und H₃R der Maus in rekombinanten Systemen unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen untersucht werden. Auf diese Weise können rezeptorabhängige Unterschiede und molekulare Grundlagen von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen festgestellt werden. Voraussetzung für derartige Untersuchungen an rekombinanten Testmodellen ist die Expression des H₁- und des H₃-Rezeptorproteins in einer Membran, die durch Verwendung des Sf9-Zell/Baculovirus-Expressionssystems erzeugt wird. Zunächst musste die cDNA des mH₁R und mH₃R kodiert und in einen Baculovirus-Transfer-Vektor integriert werden. In dem verwendeten System wurde auf den Baculovirus-Transfer-Vektor pVL-1392 zugegriffen. Sf9-Zellen (von *Spodoptera frugiperda*) werden mit dem pVL-Plasmid und mit unvollständiger linearisierter Baculovirus-DNA co-transfiziert. Die Bindungseigenschaften der mH₁R und mH₃R wurden in der Radioligandenbindungsstudie mit dem Agonisten [³H] Histamin und den Antagonisten [³H] Meypramin als Radioliganden bestimmt. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Bindungsaffinität von [³H] Histamin und [³H] Meypramin am mH₁R und mH₃R unzureichend war. Die Affinität des mH₁R und mH₃R zu den Liganden konnte aufgrund der niedrigen Expressionsrate in Sf9-Zellen nicht bestimmt werden. Diese Ergebnisse bestätigen diejenigen, die bereits für den mH₄R bekannt sind. Auch für mH₄R war die Expressionsrate in Sf9-Zellen so gering, dass Ligandenbindungsstudien nicht möglich waren.

Daher wurde ein anderes Transfektionssystem gewählt und Untersuchungen am murinen H₁R und H₄R durchgeführt, da diese beiden Rezeptoren am Juckreizgeschehen der Maus involviert sind. So erfolgte die Expression und Untersuchung der pharmakologischen Eigenschaften der murinen H₁R und H₄R unter Verwendung der NIH-3T3-Zellen als eukaryotisches

Expressionssystem. NIH-3T3-Zellen wurden mit dem mH₁R oder mH₄R unter Verwendung der Lipofectamin 2000-Methode transfiziert.

Als Voraussetzung für die weiteren Versuche wurde die erfolgreiche Transfektion des mH₁R und mH₄R in den NIH-3T3-Zellen zunächst mittels Western-Blot bestätigt. Außerdem wurde der Nachweis des mH₄R mittels RT-PCR auf der mRNA-Ebene durchgeführt. *In vitro* wurde der Einfluss der H₄R-Agonisten ST1006 und 4-Methylhistamin sowie Histamin und des H₁R-Agonisten Pyridylethylamin auf die chemotaktische Aktivität der H₁R- und H₄R-transfizierten NIH-3T3-Zellen untersucht. Sowohl ST1006 als auch 4-Methylhistamin führten zu einer signifikant gesteigerten Migration von H₄R-transfizierten NIH-3T3-Zellen. Die Hemmung der Migration durch JNJ7777120 spricht für eine hauptsächliche Beteiligung des mH₄R an der Migration. Der H₁R-Agonist Pyridylethylamin führte dagegen zu einer gesteigerten Migration von H₁R-transfizierten NIH-3T3-Zellen.

In vivo wurde die Wirkung der H₄R-Agonisten ST1006 und 4-Methylhistamin auf die Juckreizentstehung bei der Maus geprüft. Diese Ergebnisse haben zunächst gezeigt, dass sowohl die intradermale Injektion von ST1006 (5 nmol/l und 50 nmol/l) und 4-Methylhistamin (5nmol/l und 50 nmol/l) bei Wildtyp-Mäusen dosisabhängigen Juckreiz auslösen, wohingegen der bei H₄R-Knockout-Mäusen signifikant geringer ausfiel.

Bei den *In-vivo*-Untersuchungen in den murinen Kontaktallergiemodellen war von besonderem Interesse, ob der H₄R-Agonist ST1006 einen Einfluss auf die Juckreizentstehung hat. Darüber hinaus wurde ein Vergleich mit 4-Methylhistamin angestellt. In murinen Modellen der allergischen Kontaktdermatitis, ausgelöst durch das Hapten Toluylendiisocyanat, konnte der Allergen-induzierte Juckreiz durch intradermale Gabe von ST1006 signifikant gesteigert werden. Sowohl die *In-vitro*- als auch die *In-vivo*-Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass der H₄R-Agonist ST1006 ein selektiver Agonist am murinen H₄R ist.

Abschließend konnten die durchgeführten Untersuchungen bestätigen, dass der H₄R bei der Allergen-induzierten Juckreizentstehung eine wesentliche Rolle spielt.

7 Summary

Kaula Saad

Pharmacological characterization of murine histamine H₁ and H₄ receptors

The aim of this thesis was the establishment of *In-vitro* and *In-vivo* models for the examination of histamine receptor ligands in mice.

In the first part, the properties of histamine receptors H₁R and H₃R of mice in recombinant systems under similar experimental conditions were examined. This enables the investigation of receptor-dependent differences and the molecular foundation of ligand-receptor interactions. A prerequisite for such a study on recombinant test models is the expression of the H₁ and H₃ receptor proteins in a membrane, which is produced using the Sf9-cell/baculovirus-expression system. To start with the cDNA of mH₁R and mH₃R had to be coded and incorporated into a baculovirus transfer vector. In the utilised system the baculovirus transfer vector pVL1392 was accessed. Sf9 cells (from *Spodoptera frugiperda*) were co-transfected with the pVL-plasmid and with incompletely linearised baculovirus DNA. The binding properties of mH₁R and mH₃R were determined in the radioligand-binding study with the agonist [³H] histamine and the antagonist [³H] mepramin as radioligands. The results have shown that the binding affinity of [³H] histamine and [³H] mepramin was inadequate at recombinant mH₁R and mH₃R. The affinity of the ligand to mH₁R and mH₃R could not be determined because of the low rate of expression in Sf9 cells. These results confirm findings that are already known for the mH₄R. For mH₄R the expression rate in Sf9 cells was so low that ligand binding studies were not possible.

Therefore another transfection system was selected and studies on murine H₁R and H₄R were conducted because these two receptors are involved in processes leading to itching in mice, which allowed translation of *in vitro* findings to an *in vivo* setting in mice. As a result the extraction and analysis of the pharmacological properties of the murine H₁R and H₄R using NIH-3T3-cells as a eukaryotic expression system was conducted. NIH-3T3-cells were transfected with mH₁R or mH₄R using the Lipofectamine 2000 method.

As a prerequisite for subsequent experiments, the successful transfection of mH₁R and mH₄R in the NIH-3T3-cells was confirmed by Western-blot. In addition, the detection of the mH₄R by RT-PCR was carried out at the mRNA level. *In vitro* the effect of the putative mH₄R agonists ST1006 and 4-methylhistamine, as well as histamine and H₁R agonists pyridylethylamin on the chemotactic activity of the H₁R and H₄R-transfected NIH-3T3-cells was examined. Both ST1006 and 4-methylhistamin led to a significant increase in migration of H₄R-transfected NIH-3T3-cell. The inhibition of migration by JNJ7777120 suggests a major involvement of the mH₄R in the migration. The H₁R agonist pyridylethylamin however led to an increased migration of H₁R-transfected NIH- 3T3-cells.

In the *in vivo* trials the effect of the H₄R agonists ST1006 and 4-methylhistamine on the formation of contact dermatitis in mice was examined. These results have initially shown that both the intradermal injection of ST1006 (5 nmol/site and 50 nmol/site) and 4-methylhistamine (5 nmol/site and 50 nmol/site) triggered dose-related itching in wild-type mice, which was significantly lower in the H₄R knockout mice.

In the *in vivo* studies of murine models of contact allergy it was of particular interest whether the H₄R agonist ST1006 has an influence on the emergence of itching. Moreover, a comparison with 4-methylhistamine was made. In murine models of allergic contact dermatitis caused by the hapten toluendiisocyanate, the allergen-induced itch could be significantly increased by intradermal administration of ST1006. Both the *in vitro* and *in vivo* results of this study indicate that the human H₄R agonist ST1006 is also a selective agonist on the murine histamine H₄R. Finally, the tests carried out confirm that the histamine H₄R plays an important role in allergen-induced itch formation.

8 Literaturverzeichnis

AKDIS, C. A. u. F. E. SIMONS (2006):

Histamine receptors are hot in immunopharmacology

Eur. J. Pharmacol. 533, 69-76

BALDWIN, J. M. (1993):

The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors.

EMBO J. 12, 1693–1703.

BÄUMER, W., U. SEEGRES, M. BRAUN, T. TSCHERNIG u. M. KIETZMANN (2004):

TARC and RANTES, but not CTACK, are induced in two models of allergic contact dermatitis.

Effects of cilomilast and diflorasone diacetate on T-cell-attracting chemokines.

Br. J. Dermatol. 151, 823-830

BÄUMER, W., S. WENDORFF, R. GUTZMER, T. WERFEL, D. DIJKSTRA, P. CHAZOT, H. STARK u. M. KIETZMANN (2008):

Histamine H4 receptors modulate dendritic cell migration through skin immunomodulatory

Role of histamine.

Allergy 63, 1387-94

BELL, J. K., D. S. MCQUEEN u. J. L. REES (2004):

Involvement of histamine H4 and H1 receptors in scratching induced by histamine receptor agonists in Balb C mice.

Br. J. Pharmacol. 142, 374-380

BOCKAERT J, PIN JP (1999):

Molecular tinkering of G Protein-coupled receptor: an evolutionary success.

EMBO. J. 18(7): 1723-1729

BUNK, H. (2011):

Einfluss des Histamin-H4-Rezeptors auf die T-Zell-Aktivierung bei allergischen Hauterkrankungen.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

CLARK. J M. (1988):

Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eukaryotic DNA polymerases.

Nucleic Acids. Res. 1988 Oct 25; 16(20): 9677-86

COGE, F., S. P. GUENIN, H. RIQUE, J. A. BOUTIN u. J. P. GALIZZI (2001):

Structure and expression of the human histamine H4-receptor gene.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 284, 301-309

CONKLIN. B .R. and BOURNE. H. R. (1993):

Structural elements of Ga subunits that interact with Gbg receptors, and effectors.

Cell 73: 631-641

CORUZZI, G., M. ADAMI, E. GUAITA, I. J. DE ESCH u. R. LEURS (2007):

Antiinflammatory and antinociceptive effects of the selective histamine H4-receptor antagonists JNJ7777120 and VUF6002 in a rat model of carrageenan-induced acute inflammation.

Eur. J. Pharmacol. 563, 240-244

COSTA GL, WEINER MP, (1994):
Increased cloning efficiency with the PCR Polishing Kit.
Strategie 7/2, 48

COWDEN J. M., ZHANG M., DUNFORD P. J., THURMOND R. L. (2010):
The histamine H4 receptor mediates inflammation and pruritus in Th2-dependent dermal inflammation.
J. Invest. Dermatol. 130, 1023-1033

DALE, H.H. u. P. P. LAIDLAW (1910):
The Physiological actions of β -iminazothylamine.
J. Physiol. 41, 318-344

DE BACKER MD, GOMMEREN W, MOEREELS H, NOBELS G, VAN GOMPEL P, LEYSENJE and LUYTEN W. H. (1993):
Genomic cloning, heterologousexpression and pharmacological characterization of a human histamine H1 receptor.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 197, 1601-1608

DIJKSTRA, D., R. LEURS, P. CHAZOT, F. C. SHENTON, H. STARK, T. WERFEL u. R. GUTZMER (2007):
Histamine downregulates monocyte CCL2 production through the histamine H(4) receptor.
J. Allergy Clin. Immunol. 120, 300-307

DUNFORD P., O'DONNELL N., RILEY J., WILLIAMS K., KARLSSON L., THURMONDR
(2006):

The histamine H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells.

J. Immunol. 176, 7062-7070

DUNFORD, P. J., K. N. WILLIAMS, P. J. DESAI, L. KARLSSON, D. MCQUEEN u. R. L.
THURMOND (2007):

Histamine H4 receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus.

J. Allergy. Clin. Immunol. 119, 176-183

FREY, H-H. u. LÖSCHER W. (2009):

Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.

7. Auflage Enke, Stuttgart

FUNG-LEUNG, W. P., R. L. THURMOND, P. LING u. L. KARLSSON (2004):

Histamine H4 receptor antagonists: the new antihistamines?

Curr. Opin. Investing. Drugs. 5, 1174-1183

GANTNER, F., K. SAKAI, M. W. TUSCHE, W. W. CRUIKSHANK, D. M. CENTER u. K. B.
BACON (2002):

Histamine h(4) and h(2) receptors control histamine-induced interleukin-16 release from human CD8(+) T cells.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 303, 300-307

GANTZ I., MUNZERT G., TASHIRO T., SCHAFFER M., WANG L., DEL VALLE j., YAMADA T. (1991a):

Molecular cloning of the human histamine H2 receptor.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 1386-1392

GANTZ I, SCHÄFFER M, DELVALLE J, LOGSDON C, CAMPBELL V, UHLERM, et al (1991b):

Molecular cloning of a gene encoding the histamine H2 receptor.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Jan 15; 88(2): 429-33

GRIFFING, C. E. u. D. J. DEBOER (2001):

The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis.

Vet. Immunol. Immunopathol. 81, 255-269

GSCHHWANDTNER M, ROSSBACH K, DIJKSTRA D, BÄUMER W, KIETZMANN M, STARK H, WERFEL T, GUTZMER R (2010):

Murine and human Langerhans cells express a functional histamine H4 receptor: modulation of cell migration and function.

Allergy 2010; 65: 840-840

GUTERMUTH, J., M. OLLERT, J. RING, H. BEHRENDT u. T. JAKOB (2004):

Mouse models of atopic eczema critically evaluated.

Int. Arch. Allerge Immunol. 135, 262-276

GUTZMER, R., C. DIESTEL, S. MOMMERT, B. KOTHER, H. STARK, M. WITTMANN u. T. WERFEL (2005):

Histamine H4 receptor stimulation suppresses IL-12p70 production and mediates chemotaxis in human monocyte-derived dendritic cells.

J. Immunol. 174, 5224-5232

GUTZMER, R., MOMMERT, S., GSCHWANDTNER, M., ZWINGMANN, K., STARK, H., WERFEL, T., (2009):

The histamine H4 receptor is functionally expressed on TH2-cell.

J. Allergy Clin. Immunol. 123, 619-625

HILL, S. J., C. R. GANELLIN., H. TIMMERMAN., J. C. SCHWARTZ., N. P. SCHANKLEY., J. M. YOUNG., W. SCHUNACK., R. LEVI u. H. L. HASS (1997):

International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors.

Pharmacol Rev. 49(3): 253-278

HILLIER A. (2002):

Definitively diagnosing atopic dermatitis in dogs.

Veterinary Medicine, 198-209

HOFSTRA, C. L., P. J. DESAI, R. L. THURMOND u. W. P. FUNG-LEUNG (2003):

Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 305, 1212-1221

HOPPMANN, J., W. BAUMER, C. GALETZKA, N. HOFGEN, M. KIETZMANN u. C. RUNDFELDT (2005):

The phosphodiesterase 4 inhibitor A WD 12-281 is active in a new guineapig model of allergic skin inflammation predictive of human skin penetration and suppresses both Th1 and Th2 cytokines in mice.

J. Pharm. Pharmacol. 57, 1609-1617

HOUGH, L. B. (2001):

Genomics meets histamine receptors: new subtypes, new receptors.

Mol Pharmacol 59(3): 415-419

JABLONOWSKI, J. A., C. A. GRICE, W. CHAI, C. A. DVORAK, J. D. VENABLE, A. K. KWOK, K. S. LY, J. WEI, S. M. BAKER, P. J. DESAI, W. JIANG, S. J. WILSON, R. L. THURMOND, L. KARLSSON, J. P. EDWARDS, T. W. LOVENBERG u. N. I. CARRUTHERS (2003):

The first potent and selective non-imidazole human histamine H4 receptor antagonists.

J. Med. Chem. 46, 3957-3960

JANEWAY C. A., TRAVERS P., WALPORT M., SHLOMCHIK M. (2001):

Immunologie 5. Auflage.

Spektrum Akademischer Verlage, Gustav Fischer

JIANG, W., H. D. LIM, M. ZHANG, P. DESAI, H. DAI, P. M. COLLING, R. LEURS u. R. L. THURMOND (2008):

Cloning and pharmacological characterization of the dog histamine H4 receptor.

Eur. J. Pharmacol. 592, 26-32

KOHKA, H., M. NISHIBORI, H. IWAGAKI, N. NAKAYA, T. YOSHINO, K. KOBASHI, K. SAEKI, N. TANAKA u. T. AKAGI (2000):

Histamine is a potent inducer of IL-18 and IFN-gamma in human peripheral blood mononuclear cells.

J. Immunol. 164, 6640-6646

KOLAKOWSKI, L. F. (1994):

a G-protein-coupled receptor database.

Receptors Channels. 2, 1-7

KRASTEVA, M., J. KEHREN, M. T. DUCLUZEAU, M. SAYAG, M. CACCIAPUOTI, H. AKIBA, J. DESCOTESu. J. F. NICOLAS (1999):

Contact dermatitis I. Pathophysiology of contact sensitivity.

Eur. J. Dermatol. 9, 65-77

LEURS, R., R. A. BAKKER, H. TIMMERMAN u. I. J. DE ESCH (2005):

The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drugs.

Nat. Rev. Drug. Discove. 4, 107-120

LEWIS, T. (1927):

The blood vessels of the human skin and their responses.

London: Shaw & Sons, 1927

LIM, H. D., R. A. SMITS, R. A. BAKKER, C. M. VAN DAM, I. J. DE ESCH u. R. LEURS (2006):

Discovery of S-(2-guanidylethyl)-isothiourea (VUF 8430) as a potent nonimidazole histamine H4 receptor agonist. J. Med. Chem. 49, 6650-6651

LIM, H. D., R. M. VAN RIJN, P. LING, R. A. BAKKER, R. L. THURMOND u. R. LEURS (2005):

Evaluation of histamine H1-, H2-, and H3-receptor ligands at the human histamine H4 receptor: identification of 4-methylhistamine as the first potent and selective H4 receptor agonist.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 314, 1310-1321

LIM, H. D., C. DE GRAAF, et al. (2010):

Molecular determinants of ligand binding to H4R species variants.

Mol. Pharmacol. 77(5): 734-743

LING, P., K. NGO, S. NGUYEN, R. L. THURMOND, J. P. EDWARDS, L. KARLSSON u. W. P. FUNG-LEUNG (2004):

Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation.

Br. J. Pharmacol. 142, 161-171

LIU, C., X. MA, X. JIANG, S. J. WILSON, C. L. HOFSTRA, J. BLEVITT, J. PYATI, X. LI, W. CHAI, N. CARRUTHERS u. T. W. LOVENBERG (2001a):

Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H(4)) expressed in bone marrow.

Mol. Pharmacol. 59, 420-426

LIU, C., S. J. WILSON, C. KUEI u. T. W. LOVENBERG (2001b):

Comparison of human, mouse, rat, and guinea pig histamine H4 receptors reveals substantial pharmacological species variation.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 299, 121-130

LOVENBERG T. W, ROLAND B. L, WILSON S. J, JIANG X et al (1999):

Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor.

Mol. Pharmacol. 55(6): 1101-7

MORSE, K. L., J. BEHAN, T. M. LAZ, R. E. WEST, JR., S. A. GREENFEDER, J. C. ANTHES,
S. UMLAND, Y. WAN, R. W. HIPKIN, W. GONSIOREK, N. SHIN, E. L. GUSTAFSON, X.

QIAO, S. WANG, J. A. HEDRICK, J. GREENE, M. BAYNE u. F. J. MONSMA, JR. (2001):

Cloning and characterization of a novel human histamine receptor.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 296, 1058-1066

MORGAN R., MC ALLISTER B., CROSS L., GREEN D., KORNFELD H., CENTER D.,
CRUIKSHANK W. (2007):

Histamine 4 receptor activation induces recruitment of FoxP3+ T cells and inhibits allergic
asthma in a murine model.

J. Immunol. 178, 8081-8089

NAKAMURA, T., H. ITADANI, Y. HIDAKA, M. OHTA u. K. TANAKA (2000):

Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 279, 615-620

NGUYEN, T., D. A. SHAPIRO, S. R. GEORGE, V. SETOLA, D. K. LEE, R. CHENG, L.
RAUSER, S. P. LEE, K. R. LYNCH, B. L. ROTH u. B. F. O'DOWD (2001):

Discovery of a novel member of the histamine receptor family.

Mol. Pharmacol. 59, 427-433

ODA, T., N. MORIKAWA, Y. SAITO, Y. MASUHO u. S. MATSUMOTO (2000):
Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes.
J. Biol. Chem. 275, 36781-36786

ODA, T., S. MATSUMOTO. Y. MASUHO, J. TAKASKI, M. MATSUMOTO,
M.KAMOHARA, T. SAITO, T. OHISHI, T. SOGA, H. HIYAMA, H. MATSUSHIME u. K.
FURUICHI (2002):
cDNA cloning and characterization of porcine histamine H4 receptor.
Biochim. Biophys. Acta 1575, 135-138

ODA, T., S. MATSUMOTO, M. MATSUMOTO, J. TAKASAKI, M. KAMOHARA, T. SOGA,
H. HIYAMA, M. KOBORI u. M. KATOH (2005):
Molecular cloning of monkey histamine H4 receptor.
J. Pharmacol. Sci. 98, 319-322

OLIVRY, T. u. P. B. HILL (2001):
The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVIII): histopathology of skin lesions.
Vet. Immunol. Immunopathol. 81, 305-309

PAUS, R., M. SCHMELZ, T. BIRO u. M. STEINHOFF (2006):
Frontiers in pruritus research: scratching the brain for more effective itch therapy.
J. Clin. Invest. 116, 1174-1186

POTTER D. W. u. WEDERBRAND K. S. (1995):
Total IgE antibody production in BALB/c mice after dermal exposure to chemicals.
Fundam. Appl. Toxicol. 26, 127-135

RING J., DARSOW U., BEHRENDT H. (2001):

Atopic eczema and allergy.

Curr. Allergy Rep. 1, 39-43

RILEY J. F. u. WEST G. B. (1952):

Histamine in tissue mast cells.

J. Physiol. 117, 72-73

RILEY J. f. u. WEST G. B.(1953):

The presence of histamine in tissue mast cells.

J. Physiol. 120, 528-537

ROSSBACH K., WENDORFF S., SANDER K., STARK H., GUTZMER R., WERFEL T., KIETZMANN M., BÄUMER W. (2009a):

Histamine H4 receptor antagonist reduces hapten-induced scratching behaviour but not inflammation.

Exp. Dermatol. 18, 57-63

ROSSBACH, K. (2009):

Bedeutung des Histamin-H4-Rezeptors bei allergischer Entzündung und Juckreiz.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

ROSSBACH K., NASSENSTEIN C., GSCHWANDTNER M., SCHNELL D., SANDER K., SEIFERT R., STARK H., KIETZMANN M., BÄUMER W (2011):

Histamin H1, H2, H3 and H4 receptors are involved in pruritus.

Neuroscienc. 190 (2011) 89-102

SANDER K, KOTTKE T, TANRIKULU Y, PROSHAK E, WENZEL L, SCHNEIDER EH, SEIFERT R. (2009):

2,4-Diaminopyrimidines as histamine H4 receptor ligands-Scaffold optimization and pharmacological characterization.

Bioorg Med Chem. 2009 Oct 15; 17(20): 7186-96

SEIFRET R and WENZEL-SEIFRET K (2003):

The human formyl peptide receptor as model system for constitutively active G-protein-coupled receptors.

Life Sci. 73: 2263-2280

SCHNEIDER, E. H. u. R. SEIFRET (2010):

Sf9 cell: A versatile model system to investigate the pharmacological properties of G protein-coupled receptors.

pharmacol Ther. 128(3): 387-418

SCHNEIDER, E. H., D. SCHNELL (2010):

Impact of the DRY motif and the missing “ionic lock” on constitutive activity and G-protein coupling of the human histamine H4 receptor.

J. Pharmacol Exp Ther. 333(2): 382-392

SCHNEIDER E. H., SCHNELL D., PAPA D., SEIFERT R. (2009):

High constitutive activity and a G-protein-independent high-affinity state of the human histamine H4-receptor.

Biochemistry. 48, 1424-1438

SCHNELL D., BRUNSKOLE I., LADOVA K., SCHNEIDER E. H., IGEL P., DOVE S.,
BUSCHAUER A., SEIFERT R. (2011):

Expression and functional properties of canine, rat and murine histamine H(4) receptors in Sf9
insect cells.

Arch. Pharmacol. 383(5): 457-70

SCHNELL D. (2009):

Molecular Analysis of Histamine H3-Receptor.

Fakultät IV-Chemie und Pharmazie-der Universität Regensburg-Diss.

STÄNDER, S. u. M. STEINHOFF (2002):

Pathophysiology of pruritus in atopic dermatitis: an overview.

Exp. Dermatol. 11, 12-24

STEGAEV V, SILLATT, POROLA P, HÄNNENE A, FALUS A, MIELIAUSKAITE D,
ROTAR Z, MACKIEWICZ Z, STARKK H, CHAZOT PL (2012):

first identification of H4 histamine receptor in healthy salivary glands and in focal sialadenitis in
sjögren´s syndrome.

Arthritis Rheum. 64(8): 2663-8

STRADER, C. D., FONG, T. M., TOTA, M. R., UNDERWOOD, D. & DIXON, R. A. F. (1994):

Structure and function of G protein-coupled receptors.

Annual Review of Biochemistry. 63, 101-132

STRADER, C. D., FONG, T. M., GRAZIANO, M. P., and TOTA, M. R. (1995):

The family of G-Protein-coupled receptors.

FASEB J., 9, 745-754

STRAKHOVA, M. I., A. L. NIKKEL, A. M. MANELLI, G. C. HSIEH, T. A. ESBENSHADE, J. D. BRIONI u. R. S. BITNER (2009):

Localization of histamine H4 receptors in the central nervous system of human and rat.

Brain Res. 1250, 41-48

TAKESHITA, K., K. SAKAI, K. B. BACON u. F. GANTNER (2003):

Critical role of histamine H4 receptor in leukotriene B4 production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan in vivo.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 307, 1072-1078

TERZIOGLU, N, R. M. VANRIJN, et al. (2004):

Synthesis and structure-activity relationships of indole and benzimidazole piperazines as histamin H4 receptor antagonists.

Bioorog. Med. Chem. Lett. 14(21): 5251-5256

THEPEN, T., E. G. LANGEVELD-WILDSCHUT, I. C. BIHARI, D. F. VAN WICHEN, F. C. VAN REIJSEN, G. C. MUDDE u. C. A. BRUIJNZEEL-KOOMEN (1996):

Biphasic response against aeroallergen in atopic dermatitis showing a switch from an initial TH2 response to a TH1 response in situ: an immunocytochemical study.

J. Allergy Clin. Immunol. 97, 828-837

THURMOND, R. L., P. J. DESAI, P. J. DUNFORD, W. P. FUNG-LEUNG, C. L. HOFSTRA, W. JIANG, S. NGUYEN, J. P. RILEY, S. SUN, K. N. WILLIAMS, J. P. EDWARDS u. L. KARLSSON (2004):

A potent and selective histamine H4 receptor antagonist with anti-inflammatory properties.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 309, 404-413

THURMOND, R. L., E. W. GELFAND u. P. J. DUNFORD (2008):

The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines.

Nat. Rev. Drug. Discov. 7, 41-53

VAN RHEE A. M. and JACOBSON K. A. (1996):

Molecular architecture of protein-coupled receptors.

Drug. Dev. Res. 37: 1-38

VAN RIJN, R. M., A. VAN MARLE, et al (2008):

Cloning and characterization of dominant negative splice variants of the human histamine H4 receptor.

Biochem. J. 414 (1): 121-131

WEISSBACH, H., W. LOVENBERG u. S. UDENFRIEND (1961):

Characteristics of mammalian histidine decarboxylating enzymes.

Biochim. Biophys. Acta 50, 177-179

WENDORFF, S. (2008):

Untersuchungen zum Histamin H4-Rezeptor auf dendritischen Zellen und in Modellen der allergischen Dermatitis.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

YAMASHITA M., FUKUI H., SUGAMA K., HORIO Y., ITO S., MIZUGUCHI H., WADAH. (1991):

Expression cloning of a cDNA encoding the bovine histamine H1 receptor.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 11515-11519

ZHU, Y., D. MICHALOVICH, H. WU, K. B. TAN, G, M. DYTOKO, I. J. MANNAN, R. BOYCE, J. AISTON, L. A. TIERNEY, X. LI, N. C. HERRITY, L. VAWTER, H. M. SARAU, R. S. AMES, C. M. DAVENPORT, J. P. HIEBLE, S. WILSON, D. J. BERGSMA u. L. R. FITZGERALD (2001):

Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor.

Mol. Pharmacol. 59, 434-441

9 Tabellenanhang

In-vitro-Versuche

Migrations-Assay mit den transfizierten NIH-3T3-Zellen

Tabellen 9.1: Anzahl migrierter transfizierter sowie untransfizierter NIH-3T3-Zellen nach Stimulation mit Histamin (Hist) (1 mmol). Ergebnisse aus 4 Versuchen. n = 3.

Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +Hist	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +Hist	Untransfizierte NIH-3T3-Zellen +Hist
0	1500	0	1500	0
0	1000	0	2000	0
0	1250	250	1750	0

Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +Hist	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +Hist	Untransfizierte NIH-3T3-Zellen +Hist
0	2250	250	2250	0
250	1000	0	2000	0
0	1500	0	2000	0

Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +Hist	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +Hist	Untransfizierte NIH-3T3-Zellen +Hist
0	750	250	750	0
250	1250	500	2500	0
250	1500	0	1250	0

Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +Hist	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +Hist	Untransfizierte NIH-3T3-Zellen +Hist
250	1250	250	1750	0
0	1250	250	1500	0
0	1750	0	2250	0

Tabelle 9.2: Anzahl migrierter H₄R-transfizierter NIH-3T3-Zellen nach Stimulation mit Histamin (Hist) und Präinkubation mit JNJ7777120 (JNJ) (10 µmol). Ergebnisse aus 4 Versuchen. n=3.

Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + Hist	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3Zellen + Hist+ JNJ
250	1250	0
0	1500	250
0	2250	0

Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + Hist	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + Hist+ JNJ
500	1750	0
250	1250	0
0	2000	0

Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + Hist	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + Hist+ JNJ
250	2000	250
0	1500	0
0	1500	0

Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + Hist	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + Hist+ JNJ
0	1500	250
250	2250	250
250	1750	0

Tabellen 9.3 : Anzahl migrierter transfizierter sowie untransfizierter NIH-3T3-Zellen nach Stimulation mit 4-Methylhistamin (4MH) (10 µmol). Ergebnisse aus 4 Versuchen. n=3.

Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +4MH	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +4MH	Untransfizierte NIH-3T3-Zellen +4MH
250	250	250	3000	0
0	500	0	3500	0
0	250	0	4000	0

Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +4MH	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +4MH	Untransfizierte NIH-3T3-Zellen +4MH
250	250	0	4000	0
0	0	250	4500	0
0	500	0	3500	0

Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +4MH	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +4MH	Untransfizierte NIH-3T3-Zellen +4MH
0	500	0	4000	0
250	250	250	3500	0
250	0	250	3500	0

Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + 4MH	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + 4MH	Untransfizierte NIH-3T3-Zellen +4MH
0	750	250	4000	0
250	0	250	3500	0
0	0	250	4000	0

Tabelle 9.4 : Anzahl migrierter transfizierter NIH-3T3-Zellen nach Stimulation mit 4-Methylhistamin (4MH) (10 μ mol) und Präinkubation mit JNJ7777120 (JNJ) (10 μ mol). Ergebnisse aus 4 Versuchen. n=3.

Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + 4MH	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + 4MH+ JNJ
250	4000	0
0	3500	0
0	3500	250

Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + 4MH	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + 4MH+ JNJ
250	3250	0
250	4000	0
0	4000	0

Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + 4MH	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + 4MH+ JNJ
0	4500	250
250	3000	0
0	3250	0

Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + 4MH	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + 4MH+ JNJ
0	3000	250
250	3250	0
0	3250	0

Tabelle 9.5: Anzahl migrierter transfizierter, untransfizierter NIH-3T3-Zellen nach Stimulation mit Pyridylethylamin (Pyrid) (10 μ mol). Ergebnisse aus 4 Versuchen. n=3.

Untransfizierte NIH-3T3-Zellen +Pyrid	Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +Pyrid	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +Pyrid
0	0	2000	0	0
0	0	1750	0	0
0	0	1500	0	250

Untransfizierte NIH-3T3-Zellen +Pyrid	Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +Pyrid	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +Pyrid
0	250	2250	0	0
0	0	1750	0	250
0	0	2000	0	0

Untransfizierte NIH-3T3-Zellen +Pyrid	Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +Pyrid	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +Pyrid
0	0	1750	250	0
0	0	1500	0	0
0	250	2250	0	0

Untransfizierte NIH-3T3-Zellen +Pyrid	Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +Pyrid	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen +Pyrid
0	0	2500	250	0
0	0	1750	0	0
0	0	2250	0	250

Tabelle 9.6: Anzahl migrierter transfizierter NIH-3T3-Zellen sowie untransfizierter NIH-3T3-Zellen nach Stimulation mit ST1006 (10 µmol). Ergebnisse aus 4 Versuchen. n=3.

Untransfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (10 µmol)	Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (10 µmol)	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (10 µmol)
0	0	0	0	3500
0	0	0	250	4000
0	0	250	0	4000

Untransfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (10 µmol)	Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (10 µmol)	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (10 µmol)
0	0	0	0	4500
0	250	0	0	3500
0	250	0	0	3500

Untransfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (10 µmol)	Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (10 µmol)	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (10 µmol)
0	250	250	0	3250
0	0	250	0	4000
0	0	250	250	3500

Untransfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (10 µmol)	Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006(10 µmol)	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (10 µmol)
0	0	250	250	4250
0	0	250	250	3500
0	250	0	0	4000

Tabelle 9.7: Anzahl migrierter transfizierter NIH-3T3-Zellen sowie untransfizierter NIH-3T3-Zellen nach Stimulation mit ST1006 (1 µmol). Ergebnisse aus 4 Versuchen. n=3.

Untransfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (1 µmol)	Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (1 µmol)	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (1 µmol)
0	0	250	0	500
0	0	0	0	750
0	250	250	0	750

Untransfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (1 µmol)	Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (1 µmol)	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (1 µmol)
0	0	250	250	0
0	0	0	0	500
0	0	0	0	500

Untransfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (1 µmol)	Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (1 µmol)	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (1 µmol)
0	0	0	250	750
0	0	0	0	250
0	250	0	250	750

Untransfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (1 µmol)	Kontrolle-H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₁ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (1 µmol)	Kontrolle-H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen	H ₄ R-transfizierte NIH-3T3-Zellen + ST1006 (1 µmol)
0	0	0	250	250
0	0	250	0	500
0	250	0	250	250

In-vivo-Versuche

Einfluss von Histamin, 4-Methylhistamin und ST1006 auf das Kratzverhalten von Wildtyp- und H4R-Knockout-Mäusen

Tabelle 9.8: Anzahl an Kratzattacken nach Injektion von Histamin (0,25 µmol/50 µl). In einem Beobachtungszeitraum von 60 min.

Wildtyp-Mäuse							H ₄ R-Knockout-Mäuse					
Maus	0-10 min	10- 20 min	20- 30 min	30- 40 min	40- 50 min	50- 60 min	0-10 min	10- 20 min	20- 30 min	30- 40 min	40- 50 min	50- 60 min
1	20	29	32	8	15	9	3	0	0	3	3	0
2	30	15	5	5	3	12	12	32	0	0	0	0
3	46	19	6	5	14	14	9	0	0	0	0	0
4	9	4	15	7	21	31	5	7	0	2	0	5
5	22	10	10	8	20	3	3	0	0	0	10	7
6	0	3	13	7	7	3	5	0	5	0	0	6

Tabelle 9.9: Anzahl an Kratzattacken nach Injektion von 4-Methylhistamin (50 nmol/50 µl) bzw. Vehikel bei Wildtyp-Mäusen in einem Beobachtungszeitraum von 60 min.

Vehikel							4-Methylhistamin 50 nmol/50 µl					
Maus	0-10 min	10- 20 min	20- 30 min	30- 40 min	40- 50 min	50- 60 min	0-10 min	10- 20 min	20- 30 min	30- 40 min	40- 50 min	50- 60 min
1	2	8	0	0	3	1	25	17	13	22	5	16
2	5	3	2	0	0	2	13	30	37	38	22	19
3	3	6	2	0	2	1	40	32	14	18	16	12
4	0	0	4	3	1	0	24	27	16	18	19	10
5	3	0	0	2	0	2	33	38	19	31	27	22
6	1	0	3	3	2	6	18	32	31	16	15	10

Tabelle 9.10: Anzahl an Kratzattacken nach Injektion von 4-Methylhistamin (50 nmol/50 µl) bei Wildtyp-Mäusen und H₄R-Knockout-Mäusen in einem Beobachtungszeitraum von 60 min.

Wildtyp-Mäuse							H ₄ R-Knockout-Mäuse					
Maus	0-10 min	10- 20 min	20- 30 min	30- 40 min	40- 50 min	50- 60 min	0-10 min	10- 20 min	20- 30 min	30- 40 min	40- 50 min	50- 60 min
1	67	30	33	45	30	25	10	7	0	0	5	0
2	72	50	30	34	30	10	13	0	10	10	0	5
3	30	33	27	10	33	26	4	6	0	0	5	0
4	60	50	25	10	30	30	0	0	4	0	0	0
5	10	15	33	25	33	23	5	0	5	7	0	4
6	35	40	33	25	10	10	8	5	3	5	6	2

Tabelle 9.11: Anzahl an Kratzattacken nach Injektion von 4-Methylhistamin (5 nmol/50 µl) bei Wildtyp-Mäusen und H₄R-Knockout-Mäusen in einem Beobachtungszeit von 60 min.

Wildtyp-Mäuse							H ₄ R-Knockout-Mäuse					
Maus	0-10 min	10- 20 min	20- 30 min	30- 40 min	40- 50 min	50- 60 min	0-10 min	10- 20 min	20- 30 min	30- 40 min	40- 50 min	50- 60 min
1	10	12	0	0	4	0	3	5	0	0	5	2
2	20	13	12	0	5	6	6	3	4	0	7	3
3	12	4	6	3	0	0	5	7	8	5	9	3
4	5	17	16	8	5	5	4	10	6	7	4	0
5	19	12	18	11	9	7	0	0	4	3	0	0
6	5	7	13	16	6	4	5	0	6	7	0	0

Tabelle 9.12: Anzahl an Kratzattacken nach Injektion von ST1006 (50 nmol/50 μ l) bzw. Vehikel bei Wildtyp-Mäusen in einem Beobachtungszeitraum von 60 min.

Maus	Vehikel						ST1006 50 nmol/50 μ l					
	0-10 min	10- 20 min	20- 30 min	30- 40 min	40- 50 min	50- 60 min	0-10 min	10- 20 min	20- 30 min	30- 40 min	40- 50 min	50- 60 min
1	1	2	0	0	5	6	17	25	19	21	15	13
2	0	7	8	2	0	0	27	25	10	15	25	8
3	0	1	0	5	8	0	17	15	18	22	11	6
4	3	0	0	2	0	1	27	21	18	11	14	10
5	6	2	0	0	2	0	23	16	17	12	10	14
6	3	0	0	2	0	4	28	22	15	12	16	8

Tabelle 9.13: Anzahl an Kratzattacken nach Injektion von ST1006 (50 nmol/50 μ l) bei Wildtyp-Mäusen und H₄R-Knockout-Mäusen in einem Beobachtungszeitraum von 60 min.

Maus	Wildtyp-Mäuse						H ₄ R-Knockout-Mäuse					
	0-10 min	10- 20 min	20- 30 min	30- 40 min	40- 50 min	50- 60 min	0-10 min	10- 20 min	20- 30 min	30- 40 min	40- 50 min	50- 60 min
1	75	30	30	17	53	66	25	5	0	0	0	0
2	60	20	90	10	10	15	17	10	0	0	0	0
3	57	58	30	10	0	0	58	0	10	5	0	20
4	60	25	10	5	0	0	3	0	0	0	0	0
5	10	15	0	20	10	0	0	10	3	0	0	22
6	35	20	40	50	25	0	5	0	0	0	0	0

Tabelle 9.14: Anzahl an Kratzattacken nach Injektion von ST1006 (5 nmol/50 μ l) bei Wildtyp-Mäusen und H₄R-Knockout-Mäusen in einem Beobachtungszeitraum von 60 min.

Maus	Wildtyp-Mäuse						H ₄ R-Knockout-Mäuse					
	0-10 min	10- 20 min	20- 30 min	30- 40 min	40- 50 min	50- 60 min	0-10 min	10- 20 min	20- 30 min	30- 40 min	40- 50 min	50- 60 min
1	10	20	0	0	0	0	3	5	5	5	7	7
2	32	20	25	20	20	30	9	15	13	10	10	2
3	12	5	12	0	5	0	0	0	0	3	0	0
4	5	0	0	0	0	0	17	7	3	12	3	0
5	10	8	3	13	12	2	15	2	0	0	0	0
6	2	7	3	0	0	6	12	0	0	0	0	0

Einfluss von Histaminagonisten auf den Hapten-induzierten Juckreiz

Tabelle 9.15: TDI-Modell. Kratzattacken bei Wildtyp-Mäusen nach systemischer Behandlung mit ST1006 (50 nmol/50 µl) in einem Beobachtungszeitraum von 60 min.

Vehikel							ST1006 50 nmol/50 µl					
Maus	0-10 min	10- 20 min	20- 30 min	30- 40 min	40- 50 min	50- 60 min	0-10 min	10- 20 min	20- 30 min	30- 40 min	40- 50 min	50- 60 min
1	10	13	10	10	8	11	13	25	5	22	19	10
2	12	17	12	10	10	5	28	20	12	19	16	10
3	15	15	10	10	4	0	17	24	20	10	10	4
4	6	18	16	9	3	7	11	16	10	20	16	18
5	10	4	6	7	3	0	23	20	15	18	10	12
6	10	10	12	7	4	5	22	15	15	12	0	4

Vehikel							ST1006 50 nmol/50 µl					
Maus	0-10 min	10- 20 min	20- 30 min	30- 40 min	40- 50 min	50- 60 min	0-10 min	10- 20 min	20- 30 min	30- 40 min	40- 50 min	50- 60 min
1	10	10	14	10	6	3	23	16	15	33	20	20
2	15	7	17	12	8	0	30	20	20	15	17	18
3	10	4	5	8	2	7	25	15	17	22	18	11
4	2	8	10	12	6	0	17	19	22	5	20	10
5	12	16	8	13	12	2	17	17	10	3	10	8
6	6	12	4	8	7	0	18	12	23	17	13	10

Tabelle 9.16: TDI-Modell. Kratzattacken bei Wildtyp-Mäuse nach systemischer Behandlung mit 4-Methylhistamin (50 nmol/50 µl) in einem Beobachtungszeitraum von 60 min.

Vehikel							4-Methylhistamin 50 nmol/50 µl					
Maus	0-10 min	10-20 min	20-30 min	30-40 min	40-50 min	50-60 min	0-10 min	10-20 min	20-30 min	30-40 min	40-50 min	50-60 min
1	10	7	6	6	10	8	36	32	22	44	71	26
2	13	8	5	6	14	9	30	24	20	23	23	13
3	14	17	13	15	6	5	75	25	25	25	27	17
4	17	19	16	8	15	4	42	33	22	40	17	21
5	8	17	15	7	0	11	38	30	27	17	24	9
6	9	13	8	6	3	7	18	25	27	13	19	5

Vehikel							4-Methylhistamin 50 nmol/50 µl					
Maus	0-10 min	10-20 min	20-30 min	30-40 min	40-50 min	50-60 min	0-10 min	10-20 min	20-30 min	30-40 min	40-50 min	50-60 min
1	17	10	7	12	5	2	30	37	44	34	16	20
2	15	12	10	9	5	3	56	33	30	17	20	10
3	19	15	13	12	10	8	25	33	37	10	26	17
4	18	13	10	9	3	2	33	35	41	33	17	12
5	10	12	10	4	8	2	26	30	10	23	18	13
6	13	11	10	10	6	4	41	33	18	27	12	10

Danksagung

Zunächst gilt mein herzlicher Dank Herrn Prof. Dr. Wolfgang Bäumer und Herrn Prof. Dr. Detlef Neumann für die Themenstellung, die Betreuung der Arbeit mit fachlich sehr fundierten Ratschlägen und Hilfestellungen in schwierigen Situationen.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Manfred Kietzmann für die freundliche Unterstützung.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter des Labors für ihre immerwährende Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern und Schwiegereltern möchte ich für ihre Liebe und Unterstützung danken. Sie haben mir alles ermöglicht und immer an mich geglaubt.

Ein großes Dankeschön an meine Schwestern Eman und Arwa, meine Freunde Aziza und Tahanie, die immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Am Ende möchte ich meinem Mann Mohamed danken, der mit mir während des gesamten Studiums alle Höhen und Tiefen meisterte und mich immer unterstützt hat. Danke für alles.