
**Aus dem
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. H. Potschka)

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

**Funktionelle Besonderheiten des equinen Histamin
H1 Rezeptors**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Cornelia Katharina Hildegard Völzke
aus Emmerich

München 2008

Gedruckt mit Genehmigung der tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. J. Braun
Referent: Univ.-Prof. Dr. H. Ammer
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. R. Müller

Tag der Promotion: 8. Februar 2008

*Für Severin
und
meine Eltern*

1 Inhaltsverzeichnis

1	<u>Inhaltsverzeichnis</u>	1
2	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	5
3	<u>Literatur</u>	8
3.1	Histamin	10
3.1.1	Struktur	10
3.1.2	Biosynthese und Abbau	11
3.1.3	Physiologische und Pathophysiologische Bedeutung	12
3.2	Die Histaminrezeptoren	15
3.2.1	Der Histamin H1 Rezeptor	16
3.3	Der G-Protein gekoppelte Rezeptor	17
3.3.1	G-Protein vermittelte Signaltransduktion	17
3.3.2	Effektoren	19
3.3.2.1	Phospholipase C	19
3.3.2.2	Adenylatcyclase	20
3.3.2.3	Mitogen aktivierte Proteinkinase	22
3.3.3	Regulation der Rezeptorsensitivität	23
3.3.3.1	Konstitutive Aktivität des G-Protein gekoppelten Rezeptors	23
3.3.3.2	Desensibilisierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren	24
3.3.3.3	Internalisierungswege des G-Protein gekoppelten Rezeptors	25
3.3.3.4	Clathrinabhängige Internalisierung	26
3.3.3.5	Clathrinunabhängige Internalisierung	28
3.4	Antihistaminika	29
3.4.1	Struktur	31
3.4.2	Pharmakokinetik	31
3.4.3	Antihistaminika der 1. Generation	33
3.4.3.1	Pyrilamin	33
3.4.3.2	Diphenhydramin	34
3.4.3.3	Chlorpheniramin	35
3.4.4	Antihistaminika der 2. Generation	36
3.4.4.1	Loratadin	36

3.5 Fragestellung	37
4 <u>Material und Methoden</u>	38
4.1 Material	38
4.1.1 Geräte	38
4.1.2 Verbrauchsgegenstände	39
4.1.3 Chemikalien	39
4.1.4 Verwendete DNA und Antikörper	44
4.2 Methoden	45
4.2.1 Zellmodell	45
4.2.1.1 HEK 293	45
4.2.1.2 Verwendete Zellklone	46
4.2.1.3 Zellkultur	46
4.2.1.4 Kultivierung der HEK 293-Zellen	46
4.2.1.5 Kryokonservierung der Zellen	47
4.2.1.6 Transfektion von HEK 293-Zellen	48
4.2.1.7 Gewinnung von Zellpellets zur Membranpräparation	49
4.2.2 Membranpräparation	50
4.2.3 Proteinbestimmung nach LOWRY	51
4.2.4 Charakterisierung der Histaminrezeptor-EGFP Fusionsproteine	52
4.2.4.1 Radioligandenbindung	52
4.2.4.2 Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d im Sättigungsexperiment	53
4.2.4.3 Bestimmungen der Rezeptoraffinität der EGFP Fusionsproteine mithilfe heterologer Verdrängungsexperimente	55
4.2.5 Regulation des Histaminrezeptors	56
4.2.5.1 Bestimmung der Oberflächenrezeptoren an intakten Zellen (Internalisierung)	56
4.2.5.2 Konfokale Mikroskopie	57
4.2.6 Bestimmung der Rezeptor-G-Protein-Interaktion	58
4.2.6.1 $GTP\gamma^{35}S$ -Bindung	58
4.2.7 Regulation von Effektoren	60
4.2.7.1 Nachweis der Umverteilung von GRK 2 und β -Arrestin 1 im Western Blot (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)	60
4.2.7.2 Nachweis der Regulation der extrazellulär signalregulierten Kinasen (ERK 1/2) im Western Blot	61
4.2.7.3 Herstellung von Polyacrylamidgelen	62

4.2.7.4	Auftrennung der Proteine in der SDS-Gelelektrophorese	63
4.2.7.5	Elektrophoretischer Transfer der Proteine	64
4.2.7.6	Detektion der Proteine mittels Antikörper	65
4.2.7.7	Chemilumineszenz	66
4.2.7.8	Regulation der Adenylatcyclase	66
4.2.7.9	Bestimmung der Adenylatcyclaseaktivität	67
4.2.7.10	Intrazelluläre cAMP-Akkumulation	69
4.2.7.11	Bestimmung von cAMP im ELISA	70
4.3	Auswertung der Ergebnisse	73
5	<u>Ergebnisse</u>	74
5.1	Regulation des equinen Histamin H1 Rezeptors	74
5.1.1	Radioligandenbindung an intakten Zellen	74
5.1.1.1	Bestimmung der Oberflächenrezeptoren an intakten Zellen	74
5.1.1.2	Internalisierung des Histamin H1 Rezeptors	76
5.1.2	Histamin H1 Rezeptor-EGFP Fusionsproteine	78
5.1.2.1	Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d im Sättigungsexperiment	78
5.1.2.2	Heterologes Verdrängungsexperiment	80
5.1.2.3	Darstellung der Internalisierung des Histamin H1-Rezeptors mittels konfokaler Mikroskopie	81
5.1.2.4	Darstellung des Recyclings des Histamin H1-Rezeptors mittels konfokaler Mikroskopie	82
5.2	Rezeptor G-Protein-Interaktion	87
5.3	Umverteilung von G-Protein gekoppelter Rezeptorkinase 2 und β-Arrestin 1	88
5.3.1	Umverteilung von GRK 2	89
5.3.2	Umverteilung von β -Arrestin 1	91
5.3.3	Rekrutierung von β -Arrestin 1 im konfokalen LSM	93
5.4	Effektorensysteme	94
5.4.1	Extrazellulär signalregulierte Proteinkinasen 1 und 2	94
5.4.2	Adenylatcyclase	97
5.4.2.1	Aktivität der Adenylatcyclase an isolierten Plasmamembranen	97
5.4.2.2	Intrazelluläre cAMP-Akkumulation	98
5.4.2.3	Regulation der intrazellulären cAMP-Akkumulation durch Antihistaminika	99
5.4.2.4	Einfluss der Proteinkinase C und A auf die histamininduzierte cAMP-Produktion	100
5.4.2.5	Einfluss der Phospholipase C auf die histamininduzierte cAMP-Produktion	102

5.4.2.6	Beteiligung inhibitorischer G-Proteine an der cAMP-Produktion	104
5.4.2.7	Beteiligung von $\beta\gamma$ -Untereinheiten an der histamininduzierten cAMP-Produktion	104
6	<u>Diskussion</u>	<u>106</u>
6.1	Regulation des equinen Histamin H1 Rezeptors	106
6.2	Aktivität der Antihistaminika	109
6.3	Rolle der Effektorensysteme	112
6.3.1	Phospholipase C	112
6.3.2	Adenylatcyclase	112
6.3.3	Extrazellulär signalregulierte Proteinkinase 1/2	115
6.4	Bedeutung für die Tiermedizin	116
7	<u>Zusammenfassung</u>	<u>118</u>
8	<u>Summary</u>	<u>119</u>
9	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>120</u>
10	<u>Abbildungsverzeichnis</u>	<u>132</u>
11	<u>Danksagung</u>	<u>134</u>
12	<u>Lebenslauf</u>	<u>135</u>

2 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatcyclase
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Arr	Arrestin
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua bidest.	Doppelt destilliertes Wasser
BSA	bovines Serumalbumin, Fraktion V
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
Chlor	Chlorpheniramin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cpm	counts per minute
CTC	Kupfersulfat-Tatrat-Natriumcarbonat-Lösung
CP	Creatinphosphat
DAG	Diacylglycerol
dBcAMP	dibuturyl-cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEH	DMEM mit HEPES
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPH	Diphenhydramin
DTT	Threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol
EAH	Essiganhydrid
EC ₅₀	halbmaximal wirksame Konzentration
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor)
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
eH1	equiner Histamin H1 Rezeptor
ELISA	enzymgekoppelter Immunbindungsassay
ERK	extrazellulär signalregulierte Kinase

Abkürzungsverzeichnis

FKS	fetales Kälberserum
For	Forskolin
GDP	Guanosindiphosphat
Glut	L-Glutamin
G-Proteine	Guaninnukleotidbindendes Protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor (G-protein coupled receptor)
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
GTP γ S	Guanosin-5'-O-(3-Thiotriphosphat)
h	Stunde
HB	Homogenisierungspuffer
HCl	Salzsäure
HEK	human embryonic kidney cells
Hepes	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
H1	Histamin H1 Rezeptor
hH1	humaner Histamin H1 Rezeptor
His	Histamin
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC ₅₀	Halbmaximale Hemmkonzentration
IL	Interleukin
InsP ₃	Inositoltriphosphat
K _d	Dissoziationskonstante
K _i	inhibitorische Konstante
Lora	Loratadin
m/m	Gewicht-Gewicht-Prozent
m/v	Gewicht-Volumen-Prozent
mAb	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
min	Minute
MG	Molekulargewicht
PAA	Polyacrylamid
PBE	Phorbolester

Abkürzungsverzeichnis

PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PC	Phosphocreatinin
PEG	Polyethylenglykol
Pen	Penicillin
PIP ₂	Phosphatidylinositolbiphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C oder calciumabhängige Proteinkinase
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTX	Pertussistoxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Pyr	Pyrilamin (Mepyramin)
RGS	regulators of G-protein signalling
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SD	Standardabweichung (standard deviation)
Sec	Sekunden
SEM	Standardfehler (standard error)
Strep	Streptomycin
TBS/T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TEA	Triethylamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzamidin
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
v/v	Volumen-Volumen-Prozent

3 Literatur

Als Allergie wird eine „veränderte Fähigkeit des Körpers, auf eine Fremdsubstanz zu reagieren“ (Clemens von Pirquet) bezeichnet. Im engeren Sinn ist damit eine „Krankheit gemeint, die aufgrund einer Immunreaktion gegenüber einem ansonsten harmlosen Antigen ausgelöst wird“ (JANEWAY et al. 2002). Es entwickelt sich eine Überempfindlichkeit, auch Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I (nach Coombs und Gell) oder Allergie vom Soforttyp genannt, gegenüber bestimmten Allergenen aus der Umwelt. Diese werden in der Immunologie als Antigene bezeichnet. Allergene stellen dabei meist kleine, gut lösliche Proteine dar, die auf Pollenkörnern, Milbenkot oder ähnlichem in die Atemwege transportiert oder mit der Nahrung aufgenommen werden. Dort können sie aufgrund ihrer Eigenschaften sehr schnell durch die Schleimhaut diffundieren oder ihre eventuellen enzymatischen Eigenschaften entfalten. Dabei reicht eine Menge im Nanogrammbereich aus, um eine Hypersensibilitätsreaktion auszulösen. Die übertrieben starke Immunantwort äußert sich in einer vermehrten Bildung von Immunglobulin E, das bei einem Zweitkontakt die Allergie vom Soforttyp vermittelt. Etwa 40 % aller Menschen leiden an solch einer *Atopie*. Auch in der Tiermedizin, insbesondere bei Pferden, nimmt die Tendenz Atopien zu entwickeln stetig zu. Bereits seit 1950 wird sie in der Pferdepraxis beschrieben und ist mittlerweile Ursache für jede siebte Hauterkrankung. Eine Atopie ist mit einer Gesamterhöhung des IgE-Spiegels im Organismus und einer Zunahme von eosinophilen Granulozyten im Blut charakterisiert. Beim Menschen sind für die Veranlagung zur Ausbildung von Allergien wie Heuschnupfen, Asthma oder Ekzembildung bestimmte Genloci nachgewiesen worden (JANEWAY et al. 2002). Für Überempfindlichkeitsreaktionen gegenüber Medikamenten wie Penicillin existieren solche Nachweise dagegen nicht. Beim Pferd stehen vor allem Allergien wie die RAO („recurrent airway obstruction“), Urtikaria und das Sommerexzem als Hypersensibilitätsreaktion auf den Speichel so genannter Gnitzen (Gattung: *Culicoides*) im Vordergrund.

Bei der Ausbildung von Hypersensibilitätsreaktionen ist Histamin maßgeblich beteiligt. In gesunden und an Allergie erkrankten Individuen sind Unterschiede im Histaminspiegel festzustellen. Zudem variiert die individuelle Empfindlichkeit gegenüber Histamin oftmals bis zum 100fachen (MIRBAHAR et al. 1985).

Vergleichbare Symptome, die anaphylaktoiden Reaktionen, können durch die exogene Aufnahme von Histamin über die Nahrung entstehen. Dieses befindet sich in besonders hohen Konzentrationen für den Menschen in Rohwurst, Käse, Quark und Fisch und für das Pferd in Silage, verdorbenem oder angegorenem Getreide und faulem Obst.

Da es bei der Manifestation einer Anaphylaxie beim Pferd zu einem Anstieg der Histaminkonzentration im Plasma kommt (EYRE u. LEWIS 1973), scheinen Antihistaminika das Mittel der Wahl bei der Behandlung der Symptomatik zu sein. Doch bei ihrer Anwendung wird sehr schnell deutlich, dass beim Pferd ein weit weniger guter Erfolg mit diesen Medikamenten erreicht werden kann wie beim Menschen. Aus diesem Grunde erfolgt die Behandlung von anaphylaktischen Reaktionen in der Pferdepraxis hauptsächlich mit Glucocorticoiden, die allerdings mit dem Risiko unerwünschter Nebenwirkungen wie Polyurie, Polydipsie, Infektionsanfälligkeit, Erhöhung der Leberenzymwerte und Verhaltensänderungen (ROBINSON 2003) verbunden sind. Eine Langzeitbehandlung ist aufgrund der Gefahr einer glucocorticoidinduzierten Hufrehe nicht angezeigt.

Einen weiteren therapeutischen Ansatzpunkt stellt die Desensibilisierung dar. Auch diese ist beim Pferd nur bedingt erfolgreich, da bisher nur eine begrenzte Anzahl der zu testenden Allergene zur Verfügung steht. Bei Identifizierung der gesuchten Allergene kann eine Desensibilisierung auch nur dann erfolgreich verlaufen, wenn der Besitzer die oft zeitintensive Betreuung und Änderungen der Haltungsbedingungen bereitwillig umsetzt.

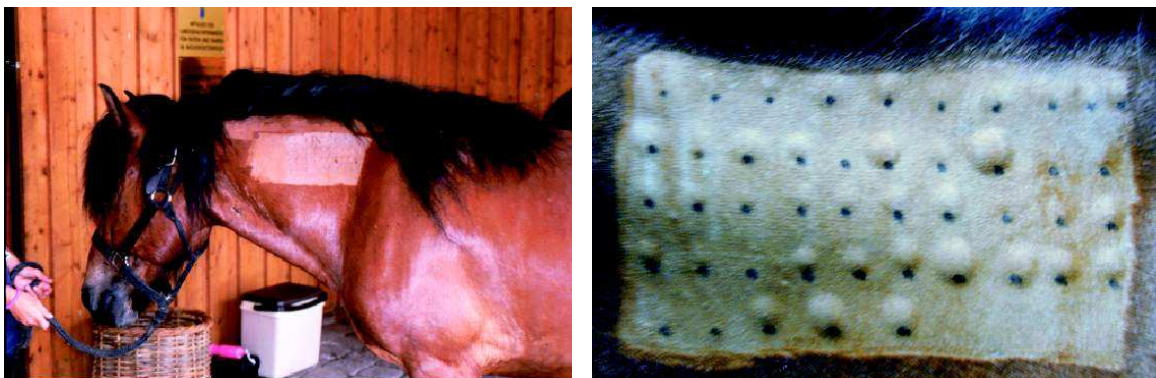


Abbildung 3-1 Allergietest

Am Hals wird eine entsprechend große Fläche geschoren und die verschiedenen Allergene aufgetragen. Rechts ist die Quaddelbildung wie man sie auch bei Urtikaria findet beim Ablesen des Testes sichtbar. © Laboklin Rat&Tat: „Was Sie über Allergien beim Pferd wissen sollten“

Daraus ergibt sich die Notwendigkeit besser wirksame Antihistaminika für den Einsatz in der Pferdepraxis zu entwickeln. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die funktionellen Besonderheiten des Histamin H1 Rezeptor des Pferdes als Ursache für die unzureichende Wirksamkeit näher untersucht.

3.1 Histamin

Histamin ist ein Gewebshormon und Neurotransmitter im Säugetierorganismus. Dort übernimmt es vielfältige Funktionen im Allergiegesehen, im Immunsystem, aber auch im Magen zur Regulation der Säuresekretion und im ZNS als Transmitter spezifischer histaminerner Neurone auf den Schlaf-Wach-Rhythmus. Doch auch Pflanzen und weniger hoch entwickelte Organismen bilden Histamin als Abwehrsubstanz oder während des Verderbs (z.B.: bei Fischen).

1907 wurde Histamin zuerst als „chemische Kuriosität“ von den Chemikern A. Windaus und W. Vogt als Imidazoläthylamin synthetisiert (WINDAUS 1907). Kurz darauf gelang es Henry H. Dale und G. Barger Histamin aus Mutterkorn zu isolieren, was sich später allerdings als bakterielle Kontamination herausstellte. Somit wurde der Ursprung des Histamins als Naturstoff aufgeklärt (BARGER u. DALE 1910). Im gleichen Jahr konnte Henry H. Dale zusammen mit P. P. Laidlaw die grundlegenden Funktionen von Histamin auf den Blutdruck und die Kontraktion der glatten Muskulatur nachweisen (DALE u. LAIDLAW 1910). Dabei hoben sie vor allem den Zusammenhang mit den Symptomen eines allergischen Schocks hervor. Erst 1927 konnte Histamin in Lungen- und Leberextrakten als körpereigene Substanz identifiziert werden (BEST et al. 1927).

3.1.1 Struktur

Die chemische Bezeichnung von Histamin (MG: 111,15) lautet 2-(4-Imidazolyl)-ethylamin. Es besteht aus einem fünfgliedrigen Kohlenstoffring mit zwei substituierten Stickstoffatomen, einem sogenannten Imidazolring (C₅H₉N₃) mit einer Ethylamin-Seitenkette.

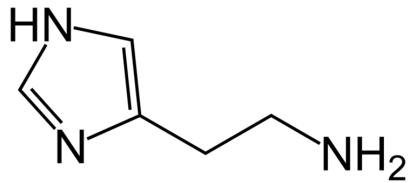


Abbildung 3-2 **Strukturformel von Histamin**

3.1.2 Biosynthese und Abbau

Die *Biosynthese* des biogenen Amins Histamin erfolgt aus L-Histidin über oxidative Decarboxylierung mithilfe des cytoplasmatischen Enzyms L-Histidin-Decarboxylase.

Diese Biosynthese erfolgt im Körper in Mastzellen, basophilen Granulozyten, Zellen der Epidermis, der Magenschleimhaut und des ZNS, insbesondere im Hypothalamus. Gespeichert wird es in Vesikeln, so genannte Granula, durch Bindung an das saure Mucopolysaccharid Heparin über eine ionische Bindung, was eine hohe Konzentration in den speichernden Zellen ermöglicht.

Damit ist der Histamingehalt im Vollblut wesentlich höher als im Plasma, wo seine Konzentration beim Menschen nicht mehr als 1 ng/ml betragen sollte. Im anaphylaktischen Schock kann die Histaminkonzentration im Plasma auf das 100fache ansteigen.

Der *Abbau* erfolgt gewebespezifisch im ZNS über eine Methylierung des Histamins mittels Histamin-N-Methyltransferasen und in der Peripherie über eine oxidative Desaminierung des Stickstoffatoms in Position 1 des Imidazolringes mithilfe von Diaminoxidasen und Aldehydoxidasen. Es entsteht Imidazolylessigsäure, die über die Nieren ausgeschieden wird. Bei pathophysiologischen Prozessen wie z. B. Urtikaria ist eine Ausscheidung von Histamin und seinen Metaboliten über den Urin nachweisbar. Außerdem ist ein Anstieg der Histaminplasmakonzentration bei Manifestation einer systemischen Anaphylaxie beim Pferd messbar (EYRE u. LEWIS 1973).

3.1.3 Physiologische und Pathophysiologische Bedeutung

Die Freisetzung von Histamin erfolgt über Degranulation histaminspeichernder Vesikel. Es erfolgt eine Exocytose, bei der die Vesikelmembranen mit der Zellmembran verschmelzen und so ihren Inhalt in die Umgebung abgeben. Dies geschieht beispielsweise bei einer anaphylaktischen Reaktion vom Soforttyp (Typ I), die über Immunglobulin E (IgE) vermittelt ist. Die Histaminfreisetzung kann bei einem Endotoxinschock auch über Komplementfaktoren und in den enterochromaffin ähnlichen Zellen im Magen durch Hormone und Gewebshormone wie Acetylcholin und Gastrin hervorgerufen werden. Andere basische Histaminliberatoren sind in Insektengiften (z. B.: Mastoparan) oder auch in Arzneimitteln bzw. in deren Lösungsvermittlern (z. B.: Cremophor®) enthalten und wirken über eine direkte Aktivierung des inhibitorischen G-Proteins (G_i) in der Mastzellmembran. Die freiwerdende $\beta\gamma$ -Untereinheit kann so die Phospholipase C (PLC) aktivieren und damit eine Exocytose einleiten (AKTORIES et al. 2005). Diese nicht-allergischen Reaktionen werden auch anaphylaktoide Reaktionen genannt.

Bei der Allergie des Typ I erfolgt zuerst eine Sensibilisierung des Immunsystems mit einem Allergen, das eingeatmet, mit der Nahrung aufgenommen oder auch direkt über Medikamente oder einen Insektenstich ins Blut gelangt. Dazu kann ein einziger Kontakt genügen. Über antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen, dendritische Zellen, Langerhans- und B-Zellen wird das Allergen aufgenommen und nach seiner Aufspaltung zusammen mit einem MHC-II-Protein („major histocompatibility complex“) präsentiert. Über T-Zellen, die sich je nach Reiz durch Interleukin (IL) 4 oder IL 12 von T_H0 (T-Helferzellen) zu T_H1 - oder T_H2 -Zellen differenzieren, wird die Information mithilfe von IL 4 und IL 10 an B-Lymphozyten und Plasmazellen weitergegeben. Dort wird schließlich durch T_H2 -Zellen die IgE (Immunglobulin E) Produktion und durch T_H1 -Zellen die IgG Produktion (IgG ist verantwortlich für die Hypersensitivitätsreaktion vom Typ II), aber auch die Interferon γ -Produktion induziert. Über Interferon γ kann die humorale Immunantwort blockiert werden (SIMONS 2004).

Über den hochaffinen IgE-Rezeptor ($Fc\epsilon RI$) liegen die IgE auf der Oberfläche von Mastzellen, eosinophilen und basophilen Zellen bereit. Werden zwei dieser Immunglobuline durch Allergenkontakt miteinander verbunden, kommt es zu einer Kaskade chemischer Reaktionen in der Zelle, wobei Tyrosinkinasen,

Phospholipase C, Proteinkinase C (PKC) und Ca^{2+} -Freisetzung beteiligt sind. Dies endet in der Mastzelldegranulation (KAGEY-SOBOTKA et al. 1982), bei der histamin- und andere chemische Mediatoren speichernde Vesikel entleert werden. Typisch ist solch eine Reaktion bei allergischer Rhinitis, Asthma oder systemischen Anaphylaxien. Die Mastzelldegranulation kann durch den $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$ Rezeptor verstärkt werden, der niedrigaffin an IgE bindet. Im Allgemeinen wird er nur als CD23 bezeichnet und spielt vor allem beim Pferd eine große Rolle bei der Hypersensitivitätsreaktion I (REED 2004). In Mäuseexperimenten konnte gezeigt werden, dass bei vorliegendem Antigen-IgE-Komplex der CD23 beteiligt ist und die Antikörperreaktion verstärkt (JANEWAY et al. 2002).

Im weiteren Verlauf einer Hypersensibilitätsreaktion kommt es zu einer gesteigerten Gefäßdurchlässigkeit, Vasodilatation der kleinen Gefäße, Kontraktion der glatten Muskulatur und Sekretion von Schleimdrüsen. Dies geschieht bereits ca. 15 Minuten nach der Allergenexposition (Frühphase). Nach etwa sechs bis zwölf Stunden kommt es zur Spätphase der IgE-Antwort. Daran beteiligt sind über den $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ -Rezeptor freigesetzte Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine und Leukotriene. Durch sie werden Entzündungszellen wie neutrophile und basophile Granulozyten sowie mononukleäre Zellen des Immunsystems angelockt. Auffällig ist, dass sich bei der Mediatorenfreisetzung die Histaminkonzentration lokal (pro eine Million Zellen) in den Mikrogrammbereich erhöht, wobei die anderen Entzündungsmediatoren wie die Leukotriene nur in Pikogramm vorliegen (SIMONS 2004).

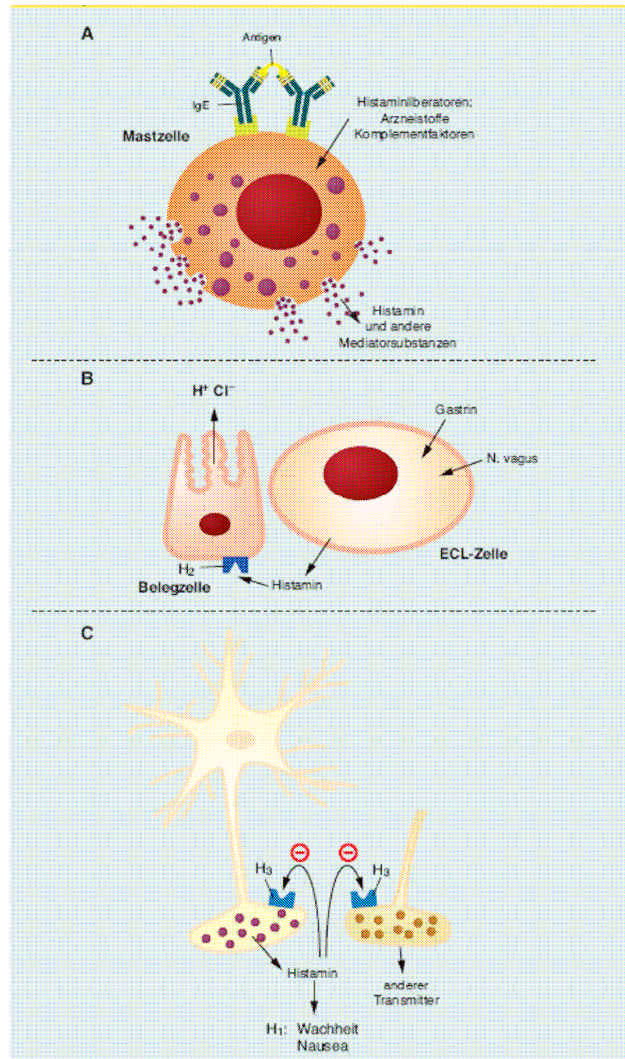


Abbildung 3-3 Freisetzung von Histamin (DITTMANN u. MOHR 2004)

A) Histamin wird durch Allergene oder so genannte Histaminliberatoren aus Mastzellen und basophilen Granulozyten freigesetzt.

B) Nach einer Stimulation durch Gastrin oder durch das von vagalen Nervenendigungen freigesetzte Acetylcholin wird Histamin aus den enterochromaffin ähnlichen Zellen (ECL-Zellen) freigesetzt. Dadurch wird an den benachbarten Belegzellen die Salzsäureproduktion über H₂-Rezeptoren angeregt.

C) In bestimmten Hirngebietern kann aus den Nervenendigungen freigesetztes Histamin über den H₁-Rezeptor Wachheit, Übelkeit und Erbrechen regulieren. Die Freisetzung aus dem Neuron wird über eine H₃-Rezeptor vermittelte negative Rückkopplung gehemmt. Dies gilt auch für Neuronen, die andere Überträgerstoffe freisetzen.

3.2 Die Histaminrezeptoren

Die Histaminrezeptoren sind ubiquitär im Organismus vorhanden. Nachdem 1972 eine pharmakologische Unterscheidung zwischen dem Histamin H1- und H2-Rezeptor erfolgte (BLACK et al. 1972), wurde 1983 der H3-Rezeptor (ARRANG et al. 1983) und schließlich im Jahr 2000 nach der Entschlüsselung des humanen Genoms der H4-Rezeptor (NAKAMURA et al. 2000) beschrieben.

Im Körper sind die einzelnen Rezeptortypen unterschiedlich verteilt. Während der H1- und H2-Rezeptor ubiquitär, insbesondere im Blutgefäßsystem, im Gehirn, Magen und der Haut vorkommen, sind die H3-Rezeptoren hauptsächlich als Autoregulatoren am Ort der Histaminsynthese zu finden. Der Rezeptor vom H4-Typ ist dagegen auf Leukocyten zu finden (SIMONS 2003). Im Folgenden wird die Funktion der einzelnen Rezeptoren in tabellarischer Form dargestellt:

Funktionen der verschiedenen Histaminrezeptoren (soweit bekannt)

Histamin H1 Rezeptor (HILL et al. 1997)	Histamin H2 Rezeptor (HILL et al. 1997)	Histamin H3 Rezeptor (HILL et al. 1997)	Histamin H4 Rezeptor (ODA et al. 2000)
Kontraktion der glatten Muskulatur	Relaxation der glatten Muskulatur	Steuerung der Histaminsynthese in präsynaptischen Nervenzellen und dessen Freisetzung	Vorkommen in der Peripherie, vor allem in Leukocyten und Eosinophilen
Stimulation der NO-Bildung	Stimulation der Magensäuresekretion	Inhibition der parasymphatischen Nervenaktivität und Hemmung der Mediatorfreisetzung wie Somastatin	Chemotaktische Wirkung auf Eosinophile?
Kontraktion von endothelialen Zellen	Stimulation der Pepsinsekretion	Aktivierung von Lungenmastzellen	Interleukin 16-Freisetzung
Erhöhung der vaskulären Permeabilität	Epithelpermeabilität der Bronchien	Ileumkontraktion und Magensäuresekretion beim Meerschweinchen	

Histamin H1 Rezeptor (HILL et al. 1997)	Histamin H2 Rezeptor (HILL et al. 1997)	Histamin H3 Rezeptor (HILL et al. 1997)	Histamin H4 Rezeptor (ODA et al. 2000)
Stimulation der Hormonfreisetzung		Bronchokonstriktion?	
Negativ inotrop	Positiv inotrop und chronotrop am Herzmuskel		
Depolarisation und erhöhte neuronale Erregungsweiterleitung	Hemmung der Erregungsweiterleitung, Hyperpolarisation, Förderung der Signaltransduktion im ZNS		
Inositolphospholipid- Hydrolyse	Stimulation der Adenylatcyclase		
Ca ²⁺ Mobilisierung	B-Zell Differenzierung Antikörpersekretion von Plasmazellen		
	Inhibition der Lymphocytenfunktion		
	Neutrophilensekretion, Basophilensekretion		
Hyperpolarisation über Ca ²⁺ -abhängigen Kaliumstrom	Block des Ca ²⁺ - abhängigen Kaliumstromes		

3.2.1 Der Histamin H1 Rezeptor

Der Histamin H1-Rezeptor kommt weit verbreitet im Körper vor, so ist er sowohl im Gehirn von Säugetieren als auch in der glatten Muskulatur des Atmungs-, Magen-Darm- und Urogenitaltraktes und des kardiovaskulären Systems zu finden (HILL et al. 1997). Seine Signalwege beeinflussen hauptsächlich die Kontraktion der glatten Muskulatur, also der Bronchien, des Darms und der Gefäße. Außerdem hat der H1-Rezeptor Einfluss auf die Kontraktion von endothelialen Zellen, stimuliert die Stickstoffmonoxidbildung, über die indirekt eine Gefäßweitstellung erfolgt, und die

Hormonfreisetzung (Catecholamine). Es kommt zu einer Depolarisation der Zelle und damit zu einer negativ ionotropen Wirkung. Der H1-Rezeptor spielt demnach eine große Rolle im Allergie- und Entzündungsgeschehen.

Im zentralen Nervensystem reguliert der H1-Rezeptor die Erregungsweiterleitung über Kaliumkanäle und Calciumausschüttung vor allem im Hippocampus, Hypothalamus, Hirnstamm, Thalamus und in den kortikalen Neuronen.

Diese Wirkungen werden über G-Proteine vermittelt, womit sich der Histamin H1 Rezeptor in die große Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren einreicht (HILL 1990; HILL et al. 1997; BAKKER et al. 2002).

3.3 Der G-Protein gekoppelte Rezeptor

3.3.1 G-Protein vermittelte Signaltransduktion

Der Histaminrezeptor gehört zu den *G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR)*. Diese bilden die größte Familie von Zelloberflächenrezeptoren in Säugerzellen und den anteilmäßig häufigsten Angriffspunkt für Pharmaka.

G-Protein gekoppelte Rezeptoren werden auch als heptahelikale Rezeptoren bezeichnet. Dieser Name beschreibt ihre Eigenschaft, die Plasmamembran siebenmal zu durchqueren, wobei das aminoternale Ende extrazellulär und der Carboxylterminus intrazellulär liegen. Zwischen diesen Domänen befinden sich je drei intra- und drei extrazelluläre Schleifen. Dabei bildet die dritte intrazelluläre Schleife einen besonders großen Teil, der mit dem G-Protein interagiert. Kleine hydrophobe Liganden binden innerhalb der Lipidschicht an Taschen, die durch die Helices gebildet werden. Stark hydrophile Liganden dagegen müssen an den extrazellulären Teil binden.

G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind an heterotrimere Proteine gekoppelt, die aus drei Untereinheiten, den α -, β - und γ -Untereinheiten bestehen. Die Eigenschaft, durch die intrinsische Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit Guanosintriphosphat (GTP) zu Guanosindiphosphat (GDP) zu hydrolysieren, hat diesen Proteinen ihren Namen,

GTP-hydrolysierende Proteine, kurz *G-Proteine*, gegeben. Dabei bilden die verschiedenen Subtypen (CLAPHAM u. NEER 1997) eine große Anzahl heterogener G-Proteine, deren Klassifizierung nach der jeweiligen α -Untereinheit definiert ist. Die bekanntesten α -Untereinheiten sind $G\alpha_s$, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_i$. Daneben gibt es noch eine Vielzahl sogenannter kleiner, monomerer G-Proteine.

Im inaktiven Zustand bindet an der α -Untereinheit das GDP, wodurch der Rezeptor im hochaffinen Zustand für seinen Liganden vorliegt. Dabei wird die Bindung eines Agonisten begünstigt. Nach der Rezeptoraktivierung ändert sich die Konformation des G-Proteins, wodurch das GDP durch Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht wird. Die Signalübertragung kann jetzt durch die beiden dissoziierten Anteile des G-Proteins, die α - und $\beta\gamma$ -Untereinheit, erfolgen. Es werden verschiedene membranständige Effektoren aktiviert, wie zum Beispiel die Adenylatcyclase (AC) und die Phospholipase C (PLC), die daraufhin cAMP, $InsP_3$ und DAG bilden, Ca^{2+} freisetzen und verschiedene Phosphatkinasen rekrutieren. Diese aktivieren G-Protein-abhängig verschiedene Signalwege. Diese Informationsübertragung wird innerhalb von wenigen Sekunden bis Minuten durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit (COLEMAN et al. 1994; SONDEK et al. 1994) gestoppt, wodurch diese GTP zu GDP hydrolysiert. Die Hydrolyse kann zusätzlich durch Vertreter der Familie der *Regulatoren der G-Protein-Signaltransduktion (RGS)* beschleunigt werden. Ein aktivierter Rezeptor kann dabei bis zu zehn G-Proteine aktivieren und dadurch nicht nur Signale vermitteln, sondern diese auch verstärken.

Verschiedene Typen von Rezeptoren können entweder unterschiedliche G-Proteine, aber auch identische G-Proteine koppeln. Ebenso kann ein und derselbe Rezeptor unterschiedliche G-Proteine aktivieren. Es gibt also verschiedene Klassen von G-Proteinen, die nach den Eigenschaften ihrer α -Untereinheiten eingeteilt werden. Die zuerst bekannt gewordene Klasse der $G\alpha_T$ -Proteine ist wohl das bekannteste Beispiel für G-Proteine. Dabei aktiviert Transducin die nachfolgende Hydrolyse von cGMP über eine Phosphodiesterase, wodurch ein elektrisches Signal entsteht, das im Sehzentrum der Großhirnrinde als Bild wahrgenommen werden kann. Die zweite, sehr bekannte Klasse der G-Proteine ist die der $G\alpha_{olf}$ -Proteine. Diese stimulieren die Adenylatcyclase des Riechepithels und ermöglichen die Geruchswahrnehmung über gebildetes cAMP. Die drei in dieser Arbeit hauptsächlich behandelten G-Proteine ist zum einen die Klasse der stimulierenden $G\alpha$ -Untereinheiten ($G\alpha_s$), die, außer in Seh-

und Riechepithel, über die Adenylatcyclase allgemein die intrazelluläre Konzentration von cAMP erhöht. Zum anderen gehören dazu die Klasse der inhibitorischen $G\alpha_i$ -Untereinheiten ($G\alpha_i$), die pertussistoxin-sensitiv (PTX-sensitiv) die Adenylatcyclase hemmt und die Klasse der Phospholipase C aktivierenden $G\alpha$ -Untereinheiten ($G\alpha_{q/11}$), die Phosphatidylinositolbiphosphat zu Inositoltriphosphat ($InsP_3$) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. $InsP_3$ erhöht die intrazelluläre Calciumkonzentration und DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Die großen Unterschiede dieser drei G-Proteinklassen liegen in ihrer Häufigkeit und der Zeit, die sie benötigen, um aktiviert zu werden. Dabei gilt vor allem, dass $G\alpha_s$ sehr schnell hydrolysiert, aber nur in geringer Zahl exprimiert wird. Dagegen sind $G\alpha_{q/11}$ in großen Mengen vorhanden. Auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit kann Effektoren wie die AC, Phospholipasen, Ionenkanäle, GRKs und Calmodulin regulieren. In ihrer Gesamtheit rufen diese Mechanismen eine Zellantwort auf das ankommende Signal hervor, die über Proteinphosphorylierung, Membrandepolarisation, Gentranskription bis hin zur Reorganisation des Cytoskeletts vermittelt werden.

Eine Signalverstärkung kommt durch Wechselwirkung des aktivierten G-Proteins mit mehreren $G\alpha$ -Untereinheiten, eine Signalselektivität dagegen durch unterschiedliche Affinitäten eines Rezeptors zu bestimmten G-Proteinen zustande. Abhängig von Gewebe- und Zelltyp können Signale divergieren und damit verschiedene G-Proteine aktivieren.

3.3.2 Effektoren

3.3.2.1 Phospholipase C

Nach seiner Aktivierung durch einen Agonisten leitet der H1-Rezeptor über PTX-insensitive $G\alpha_{q/11}$ (HILL 1990; LEURS et al. 1995) die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphat zu Inositol-1,4,5-Triphosphat ($InsP_3$) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) (HILL 1990; HILL et al. 1997) mithilfe der Phospholipase C (PLC) ein. Anschließend wird durch $InsP_3$ Calcium (Ca^{2+}) aus seinem intrazellulären Speicher, dem endoplasmatischen Retikulum, freigesetzt. DAG dagegen aktiviert die calciumabhängige Proteinkinase, die PKC (HILL 1990). Dadurch wird eine Vielzahl von Calcium/Calmodulinabhängigen Signalkaskaden reguliert. Somit kann Histamin die Aktivität der Stickstoffmonooxidsynthase über einen Ca^{2+} /Calmodulinabhängigen

Signalweg steigern und die Freisetzung von Arachidonsäure und seinen Metaboliten stimulieren (RESINK et al. 1987; CARTER et al. 1988; LEURS et al. 1994).

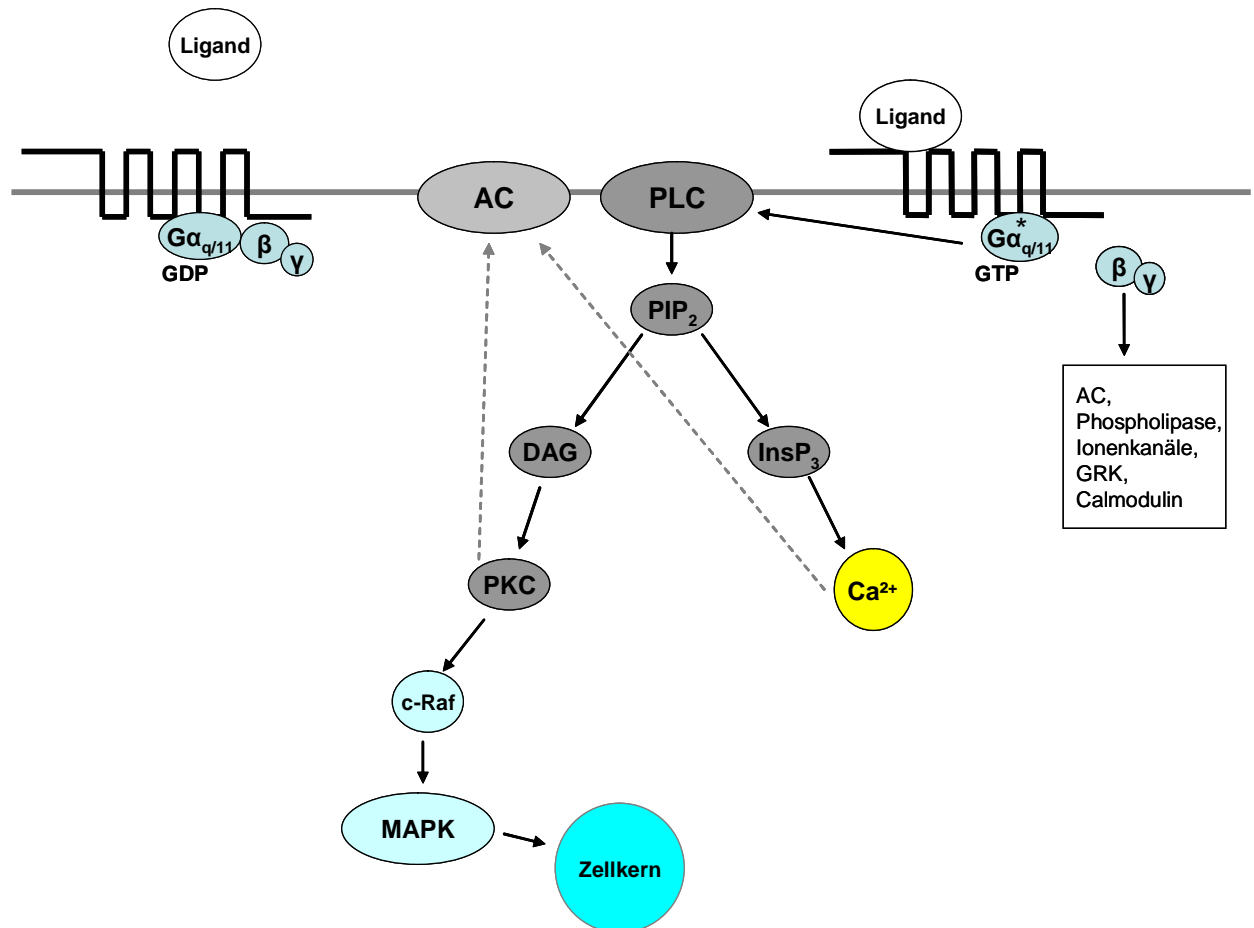


Abbildung 3-4 Gα_{q/11} vermittelte Signaltransduktion

3.3.2.2 Adenylatcyclase

Die Adenylatcyclase (AC) ist ein integrales Membranprotein, das über eine Katalyse Adenosin triphosphat (ATP) in den „second messenger“ cyclisches Adenosin-3′-5′-monophosphat (cAMP) umwandelt (TAUSSIG u. GILMAN 1995). In Säugerzellen sind bisher neun verschiedene Isoformen der Adenylatcyclase beschrieben worden. Diese Isoformen unterscheiden sich vor allem in ihrer Selektivität gegenüber sekundären Regulatoren wie Gα_i, βγ-Untereinheiten, PKA, PKC, Raf-1 und Calcium/Calmodulin (HANOUNE u. DEFER 2001; SUNAHARA u. TAUSSIG 2002). Die direkte Stimulation erfolgt über die aktive Gα_s-Untereinheit oder über das

Diterpen Forskolin. Der freien $\beta\gamma$ -Untereinheit ist es in Anwesenheit von $G\alpha_s$ möglich, die AC II und IV zu stimulieren (DEFER et al. 2000).

In dem hier verwendeten Zellmodell HEK 293 befinden sich die AC I, II, III, VI und VII. Von Interesse ist dabei außerdem, dass $G\alpha_i$ die AC I und VI hemmt. Die Proteinkinasen A und C haben hemmenden Einfluss auf die AC VI. PKC allein stimuliert dagegen AC I, II, III und VII (HANOUNE u. DEFER 2001).

In der neueren Literatur beschreiben Moniri und Booth, dass im Säugerhirn und in adrenergen Geweben neben dem bekannten PLC vermittelten Signalweg über Histamin eine direkte Interaktion des H1-Rezeptors mit der Adenylatcyclase und damit eine Stimulation der Bildung von cAMP erfolgt (MONIRI u. BOOTH 2004). Ob dies über die Aktivierung der PKC und damit abhängig von der intra- und extrazellulären Calciumkonzentration (GARBARG u. SCHWARTZ 1988; MARLEY et al. 1991) erfolgt oder G-Protein vermittelt ist, ist noch unklar (HILL et al. 1997). Auch wenn dieser Stoffwechselweg noch unvollständig charakterisiert ist, wird davon ausgegangen, dass dieser duale Signalweg für G-Protein gekoppelte Rezeptoren physiologisch ist.

Dies kann mit Hilfe des „three state receptor model“ der GPCR-Aktivierung erklärt werden (LEFF et al. 1997). Hierbei entwickelt sich ein Gleichgewicht zwischen der inaktiven Form und der konstitutiv aktiven Form des Rezeptors (KENAKIN 2001). Es entstehen also abhängig vom Liganden mehrere aktivierte, isomere Rezeptorformen, die nach der multifunktionellen Theorie mit unterschiedlichen $G\alpha$ -Untereinheiten (MILLIGAN 1993) interagieren können. Der Histamin-H1-Rezeptor kann somit sowohl $G\alpha_{q/11}$ als auch $G\alpha_s$ rekrutieren. Damit ist sowohl ein direkter als auch indirekter Einfluss auf die Adenylatcyclase und damit ein Anstieg des cAMP möglich.

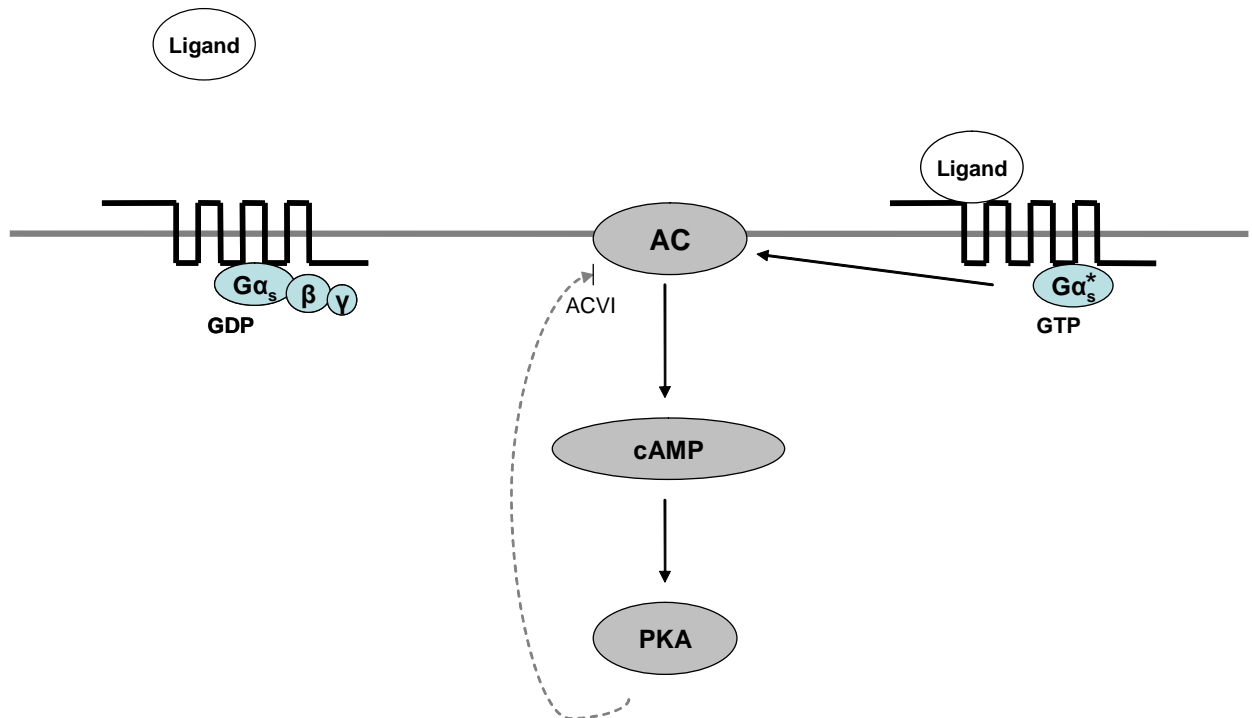


Abbildung 3-5 G α_s vermittelte Signalkaskade

3.3.2.3 Mitogen aktivierte Proteinkinase

Die Mitogen aktivierten *Proteinkinasen* bilden eine Gruppe von cytosolischen Tyrosinkinasen, die nach ihrer Aktivierung in den Zellkern wandern und dort Einfluss auf die verschiedenen Transkriptionsfaktoren nehmen.

Daraus ergibt sich die bei den β -Arrestinen beschriebene grundlegende Rolle des G-Protein gekoppelten Rezeptors in der Zellphysiologie und -differenzierung bei Hypertrophie, Migration, Proliferation und Apoptose (PIERCE et al. 2001). Dies sind letztendlich die Effekte, die über die drei Unterfamilien der MAPKinasen vermittelt werden. So sind die ERK 1/2 (auch p42/p44 MAPK nach ihrer Größe in kDa genannt) für Proliferation und Differenzierung mitverantwortlich. Die JNK (c-Jun-N-terminale Kinasen, auch stressaktivierte Proteinkinase, SAPK, genannt) und die p38 sind dagegen für Apoptose, Entzündung und Antwort auf Umgebungsstress (PAUL et al. 1997; ONO u. HAN 2000) verantwortlich. Der p42/p44 MAPK-Signalweg wird primär durch Rezeptortyrosinkinasen induziert. Hingegen werden die anderen beiden MAPK-Familien entweder direkt durch UV-Licht und osmotischen Stress oder durch Entzündungsmediatoren wie den Cytokinen aktiviert (MALARKEY et al. 1995; PAUL

et al. 1997). Deshalb sind mehrere Aktivierungswege der MAP Kinasen in einer Zelle möglich (SEGER u. KREBS 1995). Bei der Stimulation von ERK 1/2 spielen vor allem Wachstumsfaktoren wie der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) über die Aktivierung von Tyrosinkinase-assoziierten Rezeptoren (RTK) eine entscheidende Rolle (PAWSON 1994). Die Aktivierung von ERK 1/2 durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren erfolgt über PKC, Src (tyrosinspezifische Proteinkinase) oder eine Transaktivierung der RTKs, die schließlich über das kleine G-Protein Ras (LIEBMANN 2001) die Kaskade in Gang setzen. Die RTKs phosphorylieren die c-Raf-1 Kinase, die wiederum die MAPKinase-Kinase MEKK und MEK aktiviert. Die MEK aktiviert schließlich die ERK 1/2 durch Phosphorylierung (CRESPO et al. 1994). Für den Histamin H1 Rezeptor wurde zuerst 2001 von einer ERK 1/2 und p38-Aktivierung berichtet (A. J. ROBINSON u. DICKENSON 2001). Hierbei handelt es sich für ERK 1/2 um einen Ca^{2+} -unabhängigen und nur teilweise PKC-sensitiven Signalweg. Gleichzeitig wird eine PTX-Sensitivität der Aktivierung sowohl von ERK 1/2 als auch für p38 (DUDLEY et al. 1995) für den H1-Rezeptor beschrieben. Da $G\alpha_{q/11}$ als PTX-insensitiv gilt, muss eine Beteiligung von $G\alpha_{i/o}$ vorliegen (LOPEZ-ILASACA 1998). Somit können beim Histamin H1 Rezeptor zwei alternative Signalwege für die MAPK-Stimulation verantwortlich sein. Zum einen durch $G\alpha_{q/11}$ vermittelt über PKC und Raf (SUGDEN u. CLERK 1997) und zum anderen durch $G\alpha_{i/o}$ über $\beta\gamma$, c-Src, Phosphatidylinositol-3-kinasen (PI-3K) (VAN BIESEN et al. 1996; SUGDEN u. CLERK 1997) und über Ras (LUTTRELL et al. 1996; IGISHI u. GUTKIND 1998).

3.3.3 Regulation der Rezeptorsensitivität

3.3.3.1 Konstitutive Aktivität des G-Protein gekoppelten Rezeptors

Die Sensitivität eines G-Protein gekoppelten Rezeptors ist unter anderem abhängig von seiner basalen Aktivität. Das bedeutet, dass der Rezeptor ohne Stimulation durch einen Agonisten bzw. über Heterodimerisierung seine aktive, G-Protein gekoppelte Konformation annimmt. Zugleich liegt aber auch die abgekoppelte, inaktive Form des Rezeptors vor. Beide Rezeptorzustände kommen gleichzeitig in einer Zelle vor und bilden ein dynamisches Gleichgewicht.

Die konstitutive Aktivität des Rezeptors spielt eine besondere Rolle, wenn inverse Agonisten (WU et al. 2004), wie die Antihistaminika an den Rezeptor binden. In der Literatur werden drei Modelle für die Wirkung inverser Agonisten beschrieben:

Die erste Möglichkeit eines inversen Agonisten die Rezeptoraktivität zu verringern besteht darin, dass er eine selektive Affinität zu der inaktiven Konformation des Rezeptors besitzt. Dadurch wird das Gleichgewicht zur inaktiven Konformation verschoben, wodurch der Anteil an spontan aktiven Rezeptoren abnimmt.

Die zweite Erklärung beruht auf der Theorie, dass der inverse Agonist den inaktiven Rezeptor vom G-Protein abkoppelt.

Im sogenannten „Cubic Ternary Complex Model“ (CTC) wird eine hohe Affinität zum G-Protein gekoppelten, aber inaktiven Rezeptor beschrieben. Die spontane Aktivität nimmt also ab. Die zur Verfügung stehenden G-Proteine werden blockiert, wodurch insgesamt weniger G-Proteine für die Signaltransduktion zur Verfügung stehen (MONCZOR et al. 2003; FITZSIMONS et al. 2004).

Für alle drei Modelle sind in der Literatur Vertreter unter den inversen Agonisten beschrieben und im Versuch nachgewiesen worden. Das bedeutet also, dass inverse Agonisten auf unterschiedliche Art und Weise die Rezeptorfunktion herabsetzen können.

3.3.3.2 Desensibilisierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Die *Desensibilisierung* eines GPCR erfolgt als Antwort auf eine längerfristige Stimulation durch einen Agonisten. Dieser Prozess wird als *homologe Desensibilisierung* bezeichnet. Außerdem existiert auch die Form einer *heterologen Desensibilisierung* (LOHSE et al. 1990b; ROTH et al. 1991), bei der ein Rezeptor nach Aktivierung eines anderen GPCRs indirekt in seiner Funktion abgeschwächt wird. Bei der Desensibilisierung handelt es sich um eine Abkopplung vom G-Protein vermittelten Signalweg (FERGUSON 2001). Ein Vorgang der auch als *Sequestrierung* bezeichnet wird. Die Desensibilisierung ist also nicht gleichbedeutend mit der Endocytose oder der Degradierung des Rezeptors. Besonders gut untersucht wurden die Mechanismen der Desensibilisierung am β_2 -adrenergen Rezeptor. Die homologe Desensibilisierung beginnt mit einer

Phosphorylierung des Rezeptors mit Hilfe so genannter G-Protein gekoppelter Rezeptorkinasen (siehe unten), an den nachfolgend β -Arrestine binden. Nach länger anhaltendem Stimulus wird der β -Arrestin gebundene Rezeptor in der Regel über clathrinabhängige Mechanismen internalisiert. Bei der heterologen Desensibilisierung erfolgt die Phosphorylierung über die Proteinkinasen A und C oder die Calmodulinkinase an spezifischen Serinresten in der dritten intrazellulären Schleife und am C-terminalen Ende des Rezeptors (SEIBOLD et al. 2000; LUTTRELL u. LEFKOWITZ 2002). Dadurch wird die Interaktion vom G-Protein mit dem Rezeptor beeinträchtigt.

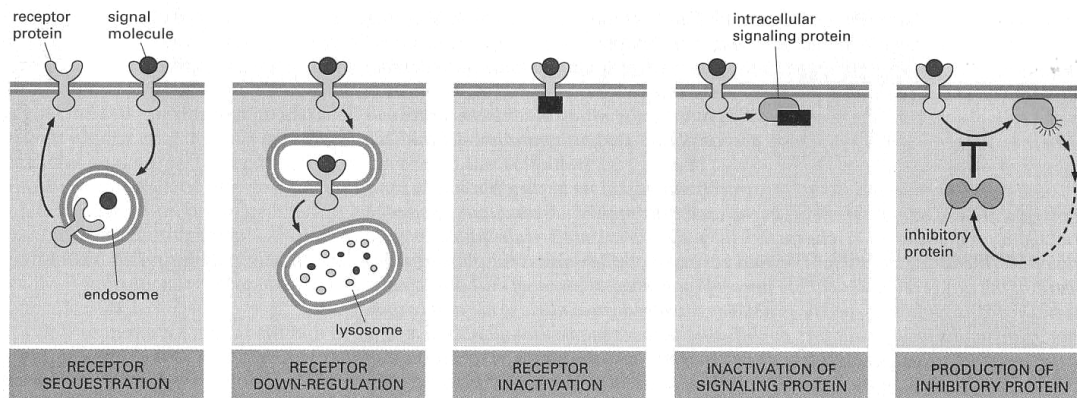


Abbildung 3-6 Desensibilisierung des Rezeptors aus “Molecular biology of the cell”, (ALBERTS et al. 2002)

3.3.3.3 Internalisierungswege des G-Protein gekoppelten Rezeptors

Membranständige Rezeptoren liegen nicht starr in der Plasmamembran vor, sondern weisen eine temperaturabhängige Mobilität auf. Sie sind daher zur Lateralbewegung innerhalb der Zellmembran und auch zur vertikalen Diffusion zwischen Membran und Cytosol befähigt (SZEKERES et al. 1998). Dabei entsteht ein kontinuierliches Gleichgewicht zwischen der Aufnahme von Rezeptoren in das Zellinnere (*Endocytose*) und seinem Transport zur Zelloberfläche (*Recycling*).

Ein großer Teil der G-Protein gekoppelten Rezeptoren zeigt nach kurzzeitiger Aktivierung (je nach Rezeptor zwischen wenigen Minuten bis Stunden) eine Verschiebung dieses Gleichgewichtes zugunsten der endocytierten Rezeptoren

(BUNEMANN u. HOSEY 1999). Überwiegt die Aufnahme von Rezeptoren ins Zellinnere gegenüber dem Recycling kommt es zu einer Abnahme der Rezeptorenzahl an der Zelloberfläche. Dieser Nettoeffekt wird als *Internalisierung* bezeichnet (SZEKERES et al. 1998). Wird die Rezeptoraktivierung beendet, verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung Rezeptorrecycling, bis der Ursprungszustand wieder erreicht wird. Hält dieser Aktivierungszustand jedoch über Stunden bis Tage an, werden die internalisierten Rezeptoren degradiert. Dieser Vorgang wird auch als „*Down-Regulation*“ (SIBLEY u. LEFKOWITZ 1985; BOHM et al. 1997) bezeichnet.

Die Internalisierung von Rezeptoren ist ein komplexer Mechanismus, an dem eine Vielzahl cytosolischer Komponenten und Signalwege beteiligt sind. Man unterscheidet generell die clathrinabhängige und die clathrinunabhängige Endocytose von Rezeptoren.

3.3.3.4 Clathrinabhängige Internalisierung

Die einzelnen Schritte des clathrinabhängigen Internalisierungsprozesses sind in der Literatur am Modell des β 2-adrenergen Rezeptors (VON ZASTROW u. KOBILKA 1992; FERGUSON et al. 1996; GOODMAN et al. 1996; MENARD et al. 1997) näher beschrieben. Diese Erkenntnisse gelten als allgemeingültig und können somit auf den H1-Rezeptor übertragen werden.

Die *clathrinabhängige Internalisierung* erfolgt in mehreren Schritten. Nach der Aktivierung des Rezeptors werden *G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK)* aus dem Cytosol zur Plasmamembran hin umverteilt (STERNE-MARR u. BENOVIC 1995). Die G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase 2 (GRK 2) ist wie alle Mitglieder ihrer Familie eine Serin-Threonin-Kinase, die mit dem G-Protein gekoppelten Rezeptor nach dessen Aktivierung interagiert und durch Wechselwirkungen mit der Plasmamembran aktiviert wird. Dort bindet sie an den G-Protein gekoppelten Rezeptor und phosphoryliert diesen an spezifischen Serin- und Threoninresten (PREMONT et al. 1995). Durch diesen Vorgang wird die darauf folgende Bindung von β -Arrestin begünstigt. Die GRK 2 hat also auch einen endocytotischen Einfluss. Desweiteren kann diese Kinase mit einer Vielzahl regulatorischer Komponenten, wie

$\beta\gamma$ -Untereinheiten, Phospholipiden, Calmodulin, Caveolin, Actin, ERK 1/2, Proteinkinase C und Src direkt oder indirekt interagieren (PITCHER et al. 1998). Der phosphorylierte Rezeptor wird nun durch das aus dem Cytosol rekrutierte β -Arrestin gebunden. Wie auch die Kinasen der GRK-Familie werden die Arrestine bei Rezeptoraktivierung aus dem Cytoplasma an die Membran umverteilt. Nachdem GRK 2 den Rezeptor aufgrund von einer Agonisteninduktion an den Serin- und Threoninresten der 3. intrazellulären Schleife und am Carboxylende phosphoryliert hat, binden β -Arrestine an den Rezeptor und vermitteln damit eine physische Abkopplung des Rezeptors von seinen G-Proteinen (BENOVIC et al. 1987; LOHSE et al. 1990a; PIPPIG et al. 1993). Hiermit wird die Endocytose des Rezeptors eingeleitet (FERGUSON et al. 1996). Diese wird über Assoziation des Adapterproteins AP-2 in der Membran (LAPORTE et al. 1999) und der schweren Kette des Clathrins durch sogenannte „clathrin-coated pits“ vermittelt. Die Clathrine bilden ein zur cytosolischen Seite gerichtetes, dichtes Netzwerk von aneinander gelagerten Proteinen (GOODMAN et al. 1996). Die sich bildenden, grubenförmigen Membranausstülpungen dehnen sich nach Innen aus und werden über eine Interaktion mit Dynamin von der Membran abgeschnürt (HINSHAW u. SCHMID 1995). In manchen Fällen internalisieren β -Arrestine zusammen mit dem Rezeptor. Es folgt eine Interaktion mit den Src-Kinasen, die über β -Arrestin rekrutiert und aktiviert werden (LUTTRELL et al. 1999). Dadurch wird eine Aktivierung der *extrazellulär signalregulierten Kinase* (ERK) vermittelt, woraufhin der desensitisierte Rezeptor an die aktivierte *MAP Kinase* koppelt. Die *Mitogen aktivierte Proteinkinase* hat durch eine Phosphorylierung des Serin 412 des β -Arrestins 1 zusätzlich einen regulatorischen Einfluss auf diese Multiproteinkomplexe (DEFEA et al. 2000; FERGUSON 2001). Somit stellt β -Arrestin nicht nur ein Adapterprotein zur Vermittlung der Internalisierung dar, sondern es agiert tatsächlich als „Scaffolding Protein“ für verschiedene MAP Kinase Kaskaden (siehe oben).

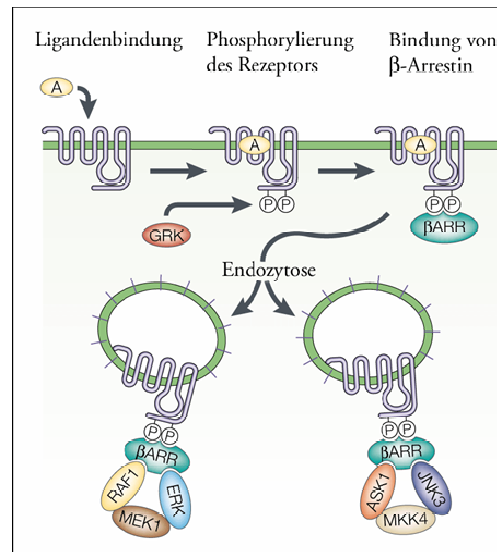


Abbildung 3-7 β -Arrestin als Gerüst

für die Aktivierung der MAPK-Kaskade im Komplex mit dem endocytisierten G-Protein gekoppelten Rezeptor nach Pierce und Lefkowitz, 2001 (PIERCE et al. 2001).

Im Cytosol wird der Clathrinmantel des Plasmamembranvesikels entfernt, wodurch primäre Endosomen entstehen. Durch den jetzt erfolgenden Abfall des pH-Wertes im Endosom wird der Rezeptor von seinem Liganden befreit und nach Aktivierung saurer Phosphatasen (KRUEGER et al. 1997) dephosphoryliert. Ist die akute Stimulierung des Rezeptors beendet, kann der dephosphorylierte Rezeptor wieder zur Zellmembran zurückkehren (Recycling). Hält die Aktivierung jedoch für längere Zeit an, werden die primären Endosomen zu sekundären Endosomen, die mit Lysosomen verschmelzen und den Rezeptor durch lysosomale Proteasen abbauen (Degradierung).

3.3.3.5 Clathrinunabhängige Internalisierung

Bei der *clathrinunabhängigen Internalisierung* erfolgt die Endocytose des Rezeptors über Caveolae oder Lipidvesikel (HAASEMANN et al. 1998; GINES et al. 2001; MUELLER et al. 2002). Beide bilden clathrinfreie Mikrodomänen der Plasmamembran aus, die mit Cholesterol und Sphingolipiden angereichert sind. So können kleine Moleküle internalisiert werden (ANDERSON et al. 1992). Dabei dienen die einzelnen Mitglieder der Familie der Caveoline ähnlich wie das Clathrin als Gerüst, um in Mikrodomänen Rezeptoren, G-Proteine und Effektoren anzureichern.

Dadurch wird die Signalübermittlung in der Zelle koordiniert (SMART et al. 1999; ANDERSON u. JACOBSON 2002; HALL u. LEFKOWITZ 2002). Im Gegensatz zur clathrinabhängigen wird die clathrinunabhängige Rezeptorendocytose durch Phosphorylierung des Rezeptors mit Proteinkinase A (PKA) (RAPACCIUOLO et al. 2003) induziert. In diesem Zusammenhang beschreibt Self et al. in CHO-Zellen die Internalisierung des humanen Histamin-H1-Rezeptors über einen clathrinunabhängigen Weg (SELF et al. 2005), der sehr wahrscheinlich über Lipidvesikel erfolgt. Dabei bleibt aber ungeklärt, ob und von welcher Kinase der Rezeptor phosphoryliert wird.

3.4 Antihistaminika

Als Antihistaminika werden Pharmaka bezeichnet, die am H1-Rezeptor als Antagonisten bzw. neu deklariert als inverse Agonisten wirken (BAKKER et al. 2000). Sie blockieren nicht nur die Aktivierung des Rezeptors über Histamin, sondern können neueren Erkenntnissen entsprechend zudem auch die konstitutive Aktivität des Rezeptors (siehe Beschreibung der Wirkungsmöglichkeiten) („*Downregulation*“) (BAKKER et al. 2002) aufgrund ihrer höheren Affinität zur inaktiven Rezeptorkonformation hemmen. Antihistaminika hemmen die durch den H1-Rezeptor vermittelten Effekte wie den Juckreiz auf Haut und Schleimhaut und die Kontraktion der glatten Muskulatur, vor allem in den Bronchien (SIMONS 2003). Beim Menschen werden sie mit gutem Erfolg bei allergisch bedingter Rhinitis, Konjunktivitis und Urtikaria eingesetzt (LEURS et al. 2002). Als pathophysiologische Grundlage wurde ein Anstieg der mRNA des Histamin-H1-Rezeptors bei der allergisch bedingten Rhinitis des Menschen festgestellt (IRIYOSHI et al. 1996; HAMANO et al. 1998). Beim Meerschweinchen konnte dagegen bei induzierter Allergie keine vermehrte Rezeptordichte auf Schleimhäuten nachgewiesen, sondern eine verstärkte Signaltransduktion durch erhöhte G-Protein Rekrutierung erklärt werden (CHIBA et al. 2002). Antihistaminika besitzen nicht nur antiallergische sondern auch antientzündliche Wirkung (LEURS et al. 2002). So weisen sie einen hemmenden Effekt auf NFκB und die Bildung von Cytokinen und Adhäsionsmolekülen auf. Der

hemmende Effekt von H1-Antihistaminika auf die Gefäßpermeabilität ist nur unvollständig ausgeprägt. Er kann aufgrund einer Beteiligung von peripheren H2-Rezeptoren nur durch Kombination mit einem H2-Rezeptor-Antagonisten wie Cimetidin vervollständigt werden.

Beim Pferd werden Antihistaminika nur bedingt eingesetzt. Es existieren kaum ausreichend begründete wissenschaftliche Arbeiten, die ihre Wirksamkeit belegen. In der Literatur ist die Therapie mit Antihistaminika bei Urtikaria, Atopie, Kontaktdermatitis, Insektenhypersensitivität und bei obstruktiven Atemwegserkrankungen wie der RAO („recurrent airway obstruction“), insofern diese nicht mit zu starker Schleimentwicklung verbunden ist (PLUMB 1999), beschrieben. Der Erfolg einer Behandlung scheint aber je nach Individuum und eingesetztem Antihistaminikum sehr zu variieren. So sollte eine Behandlung mindestens zwei Wochen durchgeführt werden, bevor die Wirksamkeit beurteilt werden kann. Auch sollte bei ungenügender Wirksamkeit erst ein anderer Wirkstoff eingesetzt werden, bevor die ganze Arzneistoffgruppe als unwirksam deklariert wird. Da Antihistaminika bei einer Allergie vom Typ 1 den Glucocorticoiden meist unterlegen sind (SIMONS 2003), sollen diese nur als Weiterbehandlung oder zur Vorbeugung erneut auftretender Symptome verwendet werden (ROSE 2000). Insgesamt werden in der Tiermedizin hauptsächlich Antihistaminika der ersten Generation wie das Diphenhydramin, Chlorpheniramin, aber auch Pyrilamin, Tripelenamin, Clemastin und Hydroxyzin eingesetzt. Die zusätzlichen Wirkungen wie Sedation und Juckreizstillung sind teilweise erwünscht. Von zusätzlicher Bedeutung ist die Fähigkeit von Antihistaminika der ersten Generation die Mediatorenfreisetzung aus Mastzellen und Basophilen zu unterbinden (SCOTT u. MILLER 2003). Cetrizin, als Antihistaminikum der zweiten Generation, wirkt vor allem in der Spätphase der Anaphylaxie. Es blockiert dadurch die antigeninduzierte Hautreaktion und reduziert die Zahl der einwandernden Eosinophilen. Allerdings ist für den Hund eine bisher noch ungeklärte Unwirksamkeit von Antihistaminika der zweiten Generation beschrieben (SCOTT u. MILLER 2003). Die Effekte der Entzündung werden beim Kleintier hauptsächlich über Leukotriene, Prostaglandine und Cytokine vermittelt, so dass ein H1-Antagonist nur eine unzureichende Wirkung entfalten kann (FREY u. LÖSCHER 2002).

Bei der RAO des Pferdes ist der Effekt von Antihistaminika sehr begrenzt (SMITH 2002). Als Erklärung hierfür wird angeführt, dass bei der Pathogenese der durch Asthma induzierten Bronchokonstriktion hauptsächlich Leukotriene und andere Mediatoren beteiligt sind und Histaminrezeptoren nur eine kleine Rolle spielen.

Die Nebeneffekte von Antihistaminika wie Sedation und den anticholinergen Wirkungen werden vor allem beim Mensch, Hund und Katze beobachtet. Beim Pferd sind dagegen Sedation, Lethargie und Verhaltensänderungen ausgeprägt (SCOTT u. MILLER 2003). Selten kann es auch zu einer zentralen Erregung kommen, die sich in Nervosität, Konvulsionen, Tremor und Ataxie äußert. Zudem besteht beim Pferd die Gefahr von gastrointestinalen Symptomen (PLUMB 1999).

3.4.1 Struktur

Die Struktur aller Antihistaminika ist sehr heterogen. Deshalb hat man früher versucht sie über ihre Struktur in Gruppen zu unterteilen. Heute unterscheidet man nur zwischen der ersten und zweiten Generation der Antihistaminika.

3.4.2 Pharmakokinetik

Da in der Literatur nur unzureichende Hinweise über die pharmakokinetischen Eigenschaften der Antihistaminika beim Pferd existieren, werden hier einige beim Menschen bekannte Mechanismen kurz dargestellt:

Um Nebenwirkungen zu umgehen oder besondere Eigenschaften eines Antihistaminikums zu nutzen, können verschiedene Applikationsarten in Betracht gezogen werden. Um unerwünschte zentrale Wirkungen zu vermeiden, werden Antihistaminika in der Tiermedizin meist intramuskulär oder topisch angewendet. So gibt es Wirkstoffe wie Azelastin und Levocabastin, die sehr gut topisch einsetzbar sind, da sie gut in Schleimhäute, Augen und obere Luftwege eindringen (AKTORIES et al. 2005). Ebenso effektiv kann die orale Applikation von Antihistaminika sein. Nach etwa ein bis drei Stunden ist meist eine therapeutisch wirksame Plasmakonzentration erreicht. Für die Bioverfügbarkeit der Antihistaminika spielen neben ihrer Lipophilie insbesondere Transportsysteme, z. B. ATP-abhängige Transporter, organische Anionen Transportsysteme und das P-Glycoprotein eine

Rolle. Entscheidend ist auch, mit welchem Anteil das verabreichte Medikament eine Proteinbindung eingeht. Denn umso höher der an Protein gebundene Anteil, desto geringer ist der Anteil des Antihistaminikums der frei, also pharmakologisch wirksam vorliegt.

Die sedative Wirkung von Antihistaminika ist abhängig von ihrer Eigenschaft, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Sind sie Substrat für das P-Glykoprotein (2. Generation), so werden sie nach Diffusion ins ZNS sofort wieder ins Blut zurücktransportiert (ISHIGURO et al. 2004).

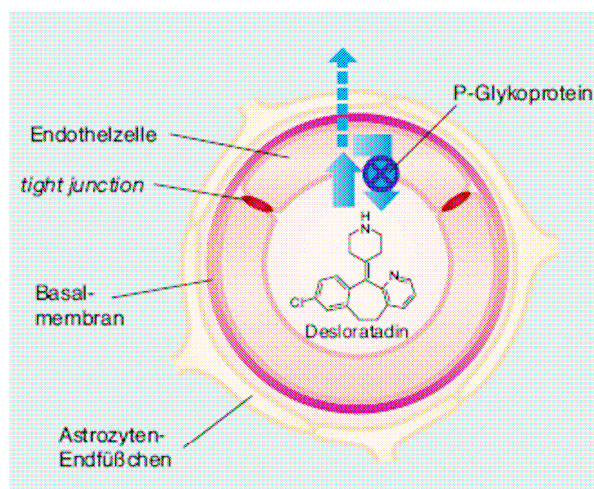


Abbildung 3-8 P-Glykoprotein

Das in den Endothelzellen der Gehirnkapillaren vorhandene P-Glykoprotein befindet sich an der blutseitigen Zellmembran, wo es eingedrungene Wirkstoffmoleküle, hier ein Antihistaminikum, in das Blut zurückpumpt. Kommt es bei hoher Dosierung zu einer Sättigung dieser Pumpe, können auch Antihistaminika der 2. Generation einen sedierenden Effekt entfalten.

Beim Einsatz von Antihistaminika ist auch beim Pferd auf das Vorliegen einer Leber- oder Niereninsuffizienz zu achten, welche die Elimination der Wirkstoffe entscheidend beeinflussen können. So werden Loratadin, Azelastin und Terfenadin über Cytochrom-P450-3A4 metabolisiert. Dadurch kann Terfenadin Wechselwirkungen mit dem Herzen eingehen. Andere Antihistaminika hingegen werden fast unverändert über Kot und Urin ausgeschieden (AKTORIES et al. 2005). Je nach Generation gibt es auch Unterschiede in der Eliminationshalbwertszeit der Pharmaka, so dass bei den Antihistaminika der zweiten Generation eine längere

Wirksamkeit nachzuweisen ist. Damit reicht eine täglich einmalige Gabe meist völlig aus. Insgesamt gibt es je nach Eigenschaften des Antihistaminikums Schwankungen zwischen 2 und 27 Stunden. In der Tiermedizin rechnet man je nach Substanz mit einer Wirkungsdauer von 8 bis 12 Stunden.

3.4.3 Antihistaminika der 1. Generation

Die älteren Antihistaminika bilden die H₁-Antagonisten der 1. Generation. Charakteristisch für diese Gruppe ist ihre Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Diese ist nicht nur von ihrer Lipophilie und ihrem Ionisierungsgrad abhängig, sondern auch von ihrer Eigenschaft nicht durch das P-Glykoprotein transportiert zu werden (ISHIGURO et al. 2004). Die Antihistaminika 2. Generation dienen dagegen diesem System als Substrat (CHEN et al. 2003). Hierdurch wird der sedative Effekt der älteren Antihistaminika bedingt. Außerdem wirken sie nicht selektiv am Histamin H₁ Rezeptor, sondern können verschieden stark cholinerge, adrenerge und serotoninerge Rezeptoren blockieren. Dies hängt auch mit der näheren phylogenetischen Verwandtschaft des Histamin H₁ Rezeptors zu den muskarinischen Acetylcholinrezeptoren als zum Histamin H₂-Rezeptor zusammen. Zusätzlich zum Schlaf-Wach-Rhythmus beeinflussen Antihistaminika der zweiten Generation auch das Brechzentrum, so dass sie oft als Antiemetika zum Einsatz kommen. Hierzu sind aber nur nicht selektive H₁-Antagonisten geeignet, die zusätzlich den Muskarinrezeptor blockieren (z.B.: Meclozin). Dieser zentrale Effekt wurde in einer Studie mit H₁-„knock-out“ Mäusen anschaulich dargestellt, wobei die Mäuse ohne Histamin H₁-Rezeptor Aggressionen, Bewegungsschwierigkeiten und Gedächtnisdefizite entwickelten (SIMONS 2003).

Zu den Antihistaminika der ersten Generation zählen das hier verwendete Pyrilamin, Diphenhydramin und Chlorpheniramin.

3.4.3.1 Pyrilamin

Das Pyrilamin gehört zur Gruppe der Ethylendiamine:

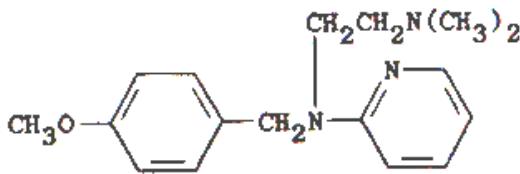


Abbildung 3-9 Strukturformel von Pyloramin (© Merck Index)

Pyloramin ist ein hochaffiner, inverser Agonist für die $G_{\alpha_{q/11}}$ -Protein gekoppelte Form des H1-Rezeptors. Als inverser Agonist scheint es ein Vertreter des CTC-Modelles zu sein (BAKKER et al. 2000). Pyloramin blockiert somit die in der Zelle zur Verfügung stehenden G-Proteine (FITZSIMONS et al. 2004). Durch eine Überexpression von G_{α_q} ist dieser Effekt hemmbar. Außerdem wurde eine Hemmung von G_{α_q} vermittelten Signalwegen in COS Zellen beschrieben (BAKKER et al. 2000). Dies bedeutet, dass Pyloramin einen wesentlichen Einfluss auf die Stöchiometrie der für einen Signalweg vorliegenden G-Proteine besitzt (KENAKIN 2001).

3.4.3.2 Diphenhydramin

Das Diphenhydramin gehört zu den Ethanolaminen:

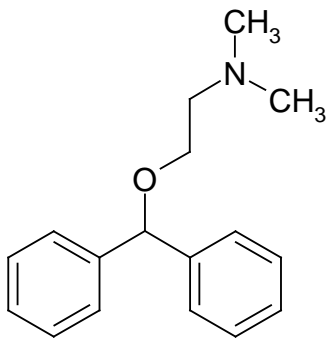


Abbildung 3-10 Strukturformel von Diphenhydramin

Seine Hauptwirkung beruht auf der Vorbeugung der kapillären Dilatation und Permeabilität. Außerdem wirkt es antiallergisch, antitoxisch und spasmolytisch (WASFI et al. 2003). Aufgrund seiner starken sedierenden Wirkung wird Diphenhydramin auch als Hypnotikum (AKTORIES et al. 2005) und als

Lokalanästhetikum bei Juckreiz (LÖSCHER et al. 2006) eingesetzt. In der Humanmedizin wird es vor allem als Mittel gegen Übelkeit, Erbrechen, Schwindel und Reisekrankheit eingesetzt. Die Gabe von Diphenhydramin wird auch in der Veterinärmedizin beim Transport von Kleintieren empfohlen. Beim Pferd wird es bei allergischen Dermatosen und Rhinitis, Urtikaria, Serumschock und Bronchialasthma (LÖSCHER et al. 2006) eingesetzt. In der Pferdepraxis ist zudem der Einsatz bei paroxysmaler Myoglobinurie, Azoturie, periodischer Konjunktivitis und pulmonalem Emphysem beschrieben (ADAMS 2001). Die Metabolisierung von Diphenhydramin ist nur im humanen Organismus beschrieben. Diphenhydramin unterliegt bei oraler Gabe mit einem großen Anteil dem „first pass“ Effekt und wird in der Leber abgebaut. Nur 50-60% können noch eine systemische Wirkung entfalten (PLUMB 1999).

3.4.3.3 Chlorpheniramin

Chlorpheniramin gehört zu der Gruppe der Alkylaminen. Es wird sowohl in der Humanmedizin als auch in der Pferdepraxis eingesetzt:

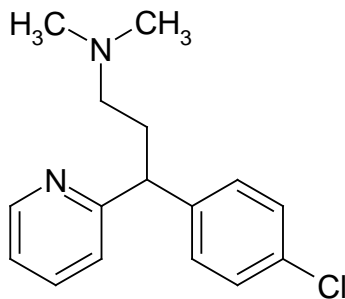


Abbildung 3-11 Strukturformel von Chlorpheniramin

Chlorpheniramin wird im menschlichen Organismus bei oraler Gabe gut resorbiert, unterliegt aber einer starken Verstoffwechslung in der Darmschleimhaut und der Leber. Nur 25 bis 60 % der verabreichten Dosis können systemisch wirken. Auch die intravenöse Gabe erzielt eine gleichmäßige Verteilung des Wirkstoffes im Organismus. Seine Metabolisierung erfolgt beim Menschen in der Leber und wird fast komplett über die Nieren ausgeschieden (PLUMB 1999). Über die Pharmakokinetik beim Tier ist bisher nichts bekannt.

3.4.4 Antihistaminika der 2. Generation

Die 2. Generation der Antihistaminika hebt sich in ihren pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften von der ersten Generation ab. Die Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu permeieren ist über das P-Glykoprotein nahezu ausgeschaltet und ihre Wirkung ist fast ausschließlich auf den Histamin H1 Rezeptor begrenzt.

In dieser Arbeit wurde lediglich ein Antihistaminikum der zweiten Generation verwendet, das Loratadin.

3.4.4.1 Loratadin

Loratadin gehört zur Gruppe der Piperidine:

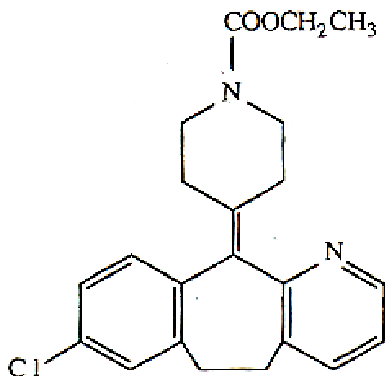


Abbildung 3-12 Strukturformel von Loratadin (© Merck Index)

Loratadin unterliegt einer intensiven Metabolisierung. Der Hauptmetabolit Desloratadin übernimmt dabei einen bedeutsamen Anteil der klinischen Wirkung. Beim Mensch weist er eine höhere Wirkstärke und –dauer auf. Für den Einsatz in vitro ist Loratadin wenig geeignet, da es nur in DMSO (Dimethylsulfoxid) löslich ist.

3.5 Fragestellung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Aufklärung der Ursachen der mangelhaften therapeutischen Wirksamkeit von Antihistaminika beim Pferd. Die Klonierung des equinen Histamin H1 Rezeptors erbrachte im Vergleich mit dem humanen Rezeptor wesentliche Sequenzunterschiede der dritten intrazellulären Domäne, die für die G-Protein Kopplung verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurde in einem ersten Schritt der equine Histamin H1 Rezeptor einer umfassenden pharmakologischen Charakterisierung unterzogen und die Ergebnisse mit denjenigen vom humanen Rezeptor verglichen.

Insbesondere wurden bei der Untersuchung der Regulation des Rezeptors die folgenden drei Schwerpunkte gesetzt:

- 1) Wie wird die Sensitivität des equinen Histamin H1 Rezeptors reguliert? Zeigen sich im Vergleich mit dem humanen Rezeptor Unterschiede in der konstitutiven Aktivität und der agonistinduzierten Rezeptorinternalisierung bzw. im Recycling?
- 2) Weisen die in der Praxis verwendeten H1-Antihistaminika erster und zweiter Generation auch beim Pferd eine inverse Aktivität auf?
- 3) Existieren Unterschiede in der intrazellulären Signaltransduktion und welche Rolle spielen dabei verschiedene G-Protein Familien und deren Effektoren?

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Geräte	Firma
Brutschrank, Modell 6000	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammer, Mini-protean II	Bio-Rad, München
-80°C Gefrierschrank	GFL [®] , Burgwedel
Laminar Flow, Modell 6.12 S	BDK, Sonnenbühl
LSM CM 510	Zeiss, Jena
Minifuge	Heraeus, Hanau
Polytron	Bachofer, Reutlingen
Power Supply, Modell 1000/500	Bio-Rad, München
Sorvall [®] Rotor SS 34	DuPont Instruments, Mechelen, Belgien
Spektralphotometer, Modell U-3200	Hitachi Scientific Instruments, Schwäbisch Gmünd
Szintillationsmeßgerät, Modell LS 6500	Beckmann-Coulter, Krefeld
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vakuum Filtrationseinheit	Millipore, Schwalbach
Video-Imager, Modell E.A.S.Y. RH-3	Herolab, Wiesloch

4.1.2 Verbrauchsgegenstände

Materialien	Firma
Mikrotiterplatten, Maxisorp®	Nunc, Wiesbaden
Deckplättchen	Roth, Karlsruhe
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran, Immobilon-P®	Millipore Corporation, Bedford, MA, USA
Röntgenfilm, Hyperfilm™	Amersham-Biosciences, Freiburg
Röhrchen, 5 ml, steril	Greiner-bio-one GmbH, Frickenhausen
Schraubgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Silikatglasfaserfilter (Whatmann® GF/B)	Munktell, Callenberg Schleicher&Schuell, Maidstone, England
Zählfläschchen, Minis® 2000	Zinsser Analytic, Frankfurt
Zellkulturgefäß, Multi Dish mit 8 Vertiefungen	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturgefäße (25, 75, 150 cm² Flaschen, Rundschalen, mit 12 oder 24 Vertiefungen)	TPP®, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen (50, 15 ml)	TPP®, Trasadingen, Schweiz

4.1.3 Chemikalien

Chemikalien	Abkürzung	Firma
Acrylamid (30 %); Bisacrylamid (0,8 %) (Rotiphorese®-Gel 30)		Roth, Karlsruhe
Adenosin-5´-Triphosphat	ATP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Adenosin-5´-Diphosphat	ADP	Boehringer-Mannheim GmbH
Adenosin-3´,5´-cyclic-Monophosphat	cAMP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Chemikalien	Abkürzung	Firma
2-O-succinyl-cAMP gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase	Konjugat	Am Institut hergestellt
cAMP-Phosphodiesterase-Inhibitor , 4-[(3-Butoxy-4-methoxyphenyl)-methyl]-2-imidazolidinon	RO 20/1724	Research Biochemical International, Natick, MA, USA
Ammoniumperoxodisulfat	APS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Albumin Fraktion V, proteasefrei (bovin)	BSA	Roth, Karlsruhe
Benzamidin-HCl	Benzamidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chelerythrin – Chlorid	Chel	Calbiochem, Schwalbach am Taunus
Creatinphosphat	CP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Citronensäure x 1 H ₂ O		Roth, Karlsruhe
S-(+)-Chlorpheniramin-Maleat	Chlor	Sigma-Aldrich, Steinheim
N ⁶ ,O ² -Dibutyryladenosen-3',5'-Monophosphat, Natriumsalz	dBcAMP	Calbiochem, Schwalbach am Taunus; Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid	DMSO	Roth, Karlsruhe
Diphenhydramin-HCl	DPH	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithiotreitol	DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Chemikalien	Abkürzung	Firma
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	Merck-Bioscience GmbH, Schwalbach am Taunus
Dulbecco´s Modified Eagle Medium	DMEM	PAA, Cölbe
ε-Aminocaprylsäure		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Effectene		Quiagen, Hilden
Enrofloxacin		ICN Biochemicals, Aurora, Ohio, USA
Ethylenglycol-bis(β-Aminoethylether)- N, N, N', N'-Tetraessigsäure	EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure, wasserfrei	EAH	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fetales Kälberserum	FKS	PAA, Cölbe
Forskolin	For	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Folin-Ciocalteu`s Phenol Reagenz	Folin-Reagenz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gentamicin	G 418	Roth, Karlsruhe,
Guanosin-5´-Diphosphat	GDP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Guanosin-5´-Triphosphat	GTP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Guanosin-5´-O-(3-Thiotriphosphat)	GTPγS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Guanosin-5´-O-(3-[³⁵ S]Thio)-triphosphat	GTPγ ³⁵ S	Amersham-Biosciences, Freiburg
Glycerol		Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Chemikalien	Abkürzung	Firma
Glycin		Roth, Karlsruhe
Histamin	His	Calbiochem, Schwalbach am Taunus
3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin	IBMX	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kupfer-II-sulfat x 5 H ₂ O	CuSO ₄	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	KCl	Roth, Karlsruhe
Kaliumnatriumtetrat	K ⁺ /Na ⁺ -Tatrat	Merck-Bioscience GmbH, Schwalbach am Taunus
L-Glutamin	Glut	PAA, Cölbe
Loratadin	Lora	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Luminol		Fluka, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	Roth, Karlsruhe
Methanol		Roth, Karlsruhe
Natriumacetat x 3 H ₂ O	Na-Acetat	Calbiochem, Schwalbach am Taunus
Natriumcarbonat, wasserfrei	Na ₂ CO ₃	Merck-Bioscience GmbH, Schwalbach am Taunus
Natriumchlorid	NaCl	Calbiochem, Schwalbach am Taunus
Natriumhydroxid	NaOH	Calbiochem, Schwalbach am Taunus

Chemikalien	Abkürzung	Firma
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	Roth, Karlsruhe
Natrium-Laurylsulfat	SDS	Roth, Karlsruhe
N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]	HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
p-Cumarsäure		Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin	Pen	PAA, Cölbe
Pertussistoxin	PTX	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phospholipase C Aktivator, 2,4,6,-Trimethyl-N-(m-3-trifluoromethylphenyl)benzensulfonamid	m-3M3FBS	Calbiochem, Schwalbach am Taunus
Phospholipase C Inhibitor, 1-[6-((17β-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl]-1H-pyrrol-2,5-dion	U 73122	Calbiochem, Schwalbach am Taunus
Phosphocreatin	PC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phorbolester-12-Myristat-13-Acetat	PBE	Calbiochem, Darmstadt
PKA-Inhibitor, N-[2-(p-Promocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamid x 2 HCL	H89	Calbiochem, Schwalbach am Taunus
Polyethylenglykol 6000	PEG	Merck-Bioscience GmbH, Schwalbach am Taunus
Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20)	Tween	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Chemikalien	Abkürzung	Firma	
Pyrilamin-Maleat	Pyr	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
³ H-Pyrlamin		Amersham- Biosciences, Freiburg	
Rotiszint® EcoPlus		Roth, Karlsruhe	
SDS Page Standards, Broad Range		Bio-Rad, München	
Streptomycin		Strep	PAA, Cölbe
Triethylamin		TEA	Roth, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan-HCl		Tris	Roth, Karlsruhe
Tetramethylbenzamidin		TMB	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin		TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid-Harnstoff		H ₂ O ₂	Merck-Bioscience GmbH, Schwalbach am Taunus

4.1.4 Verwendete DNA und Antikörper

Plasmide	Abkürzung	Firma
EGFP („enhanced green fluorescent protein“)-Vektor	EGFP	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
pcDNA-hH1-EGFP	hH1-EGFP	Am Institut hergestellt
pcDNA-eH1-EGFP	eH1-EGFP	Am Institut hergestellt
pcDNA-β-Arrestin 1-EGFP	β-Arr1	Am Institut hergestellt
pcDNA-C2ACII	C2ACII	Am Institut hergestellt
pcDNA-Phosducin	Phosducin	Prof. Dr. M. Lohse, Würzburg

Primäre Antikörper	Herkunftsspezies	Firma
Anti-Phospho-p44/42-MAPK	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
Anti-p44/42-MAPK	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
Anti-G $\beta_{1/2}$ -GRK 2	Kaninchen	Am Institut hergestellt
Anti- β -Arrestin 1	Maus, mAb	BD Transduction Lab., Heidelberg
Sekundäre Antikörper mit Meerettich-Peroxidase gekoppelt	Herkunftsspezies	Firma
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Promega, Mannheim
Anti-Maus-IgG	Ziege	Promega, Mannheim
Anti-Biotin	Ziege	Cell-Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA

4.2 Methoden

4.2.1 Zellmodell

4.2.1.1 HEK 293

Die Untersuchung der Histamin H1 Rezeptoren erfolgte nach ihrer heterologen Expression in HEK 293 Zellen („Human Embryonic Kidney Cells“). HEK 293 sind besonders effizient bei der Transfektion und der nachfolgenden Proteinproduktion. Ebenso sind sie schnell und einfach zu vermehren. Die biochemischen Prozesse in dieser Zelllinie ermöglichen die Umsetzung der meisten posttranslationalen Faltungen und Verarbeitungsvorgänge von Säugerproteinen, um ihre Funktionalität zu gewährleisten. Außerdem enthalten sie sämtliche, für die funktionelle Charakterisierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren erforderlichen Komponenten (THOMAS u. SMART 2005).

4.2.1.2 Verwendete Zellklone

Die am Institut vorhandenen, stabil exprimierenden Zellklone HEK-hH1 J3 (1429 fmol/mg Membranprotein), HEK-eH1 9 (1304 fmol/mg) und HEK-hH1-EGFP 12 standen den Versuchen zur Verfügung. Die das eH1-EGFP-Konstrukt exprimierende Zelllinie HEK-eH1-EGFP 7 wurde im Rahmen dieser Dissertation hergestellt. Die das EGFP-Konstrukt tragende Zelllinie wurde aufgrund ihrer Fluoreszenzintensität, die nur den Rezeptor exprimierenden Zelllinien aufgrund ihrer der physiologischen Situation entsprechenden Rezeptordichte ausgewählt.

4.2.1.3 Zellkultur

Die in der Zellkultur verwendeten Kulturflaschen mit Ventilationsdeckel weisen eine Bodenfläche von 25, 75 und 150 cm² auf und die Rundschalen von 60 cm². Für die cAMP-Akkumulation, die ERK 1/2-Aktivierung, die Subklonierung und zur konfokalen Mikroskopie wurden die Zellen in Platten mit 8, 12 bzw. 24 Vertiefungen angezchtet.

4.2.1.4 Kultivierung der HEK 293-Zellen

Wachstumsmedium:

500 ml	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM)
10 %	Fetales Kälberserum (FKS), hitzeinaktiviert (56°C, 30 min)
4 mmol/l	L-Glutamin
100 IU/ml	Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin
3 µg/ml	Enrofloxacin

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):

8 g NaCl
0,2 g KCl
2,145 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O
ad 1 l H₂O bidest., pH 7,43

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen unter der Laminar Flow Werkbank durchgeführt. Die HEK-Zellen wurden als Monolayer im Brutschrank bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ in Luft und gesättigtem Wasserdampf kultiviert. Um die Zellen unter optimalen Wachstumsbedingungen zu halten, wurden sie zwei- bis dreimal pro Woche im Verhältnis 1/2 bis 1/10, je nach Wachstumsintensität und Versuchsansatz, subkultiviert. Dazu wurden die Zellen durch Abklopfen vom Gefäßboden abgelöst, die Zellsuspension in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 x g 10 min abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in Wachstumsmedium aufgenommen und wie oben beschrieben in neue Zellkulturgefäße verteilt.

4.2.1.5 Kryokonservierung der Zellen

Einfriermedium:

20% (v/v) FKS
10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)
in Wachstumsmedium gelöst

Da sich mit zunehmender Passagezahl die Eigenschaften der HEK 293-Zellen ändern können, wurden die Zellen nach 15 bis 20 Passagen verworfen und neue

Ausgangszellen aufgetaut. Dazu wurde zu Beginn der Versuche ein Vorrat angelegt und in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

Zur Vermeidung der Auskristallisierung von Wasser während des Einfriervorganges und somit zur Vorbeugung einer Zellschädigung wurde dem Einfriermedium 10 % DMSO hinzugefügt. Nach Abklopfen der Zellen und Abzentrifugieren des Zellpellets ($300 \times g$, 10 min, 4°C) wurde dies in 1 ml eisgekühltem Einfriermedium resuspendiert. In ein Kryoröhrchen überführt wurde die Zellsuspension in einer mit Eis gefüllten Styroporbox über Nacht bei -70°C langsam heruntergekühlt. Nach 24 h wurden die Zellen in Stickstoff bei -196°C umgelagert.

Zum Auftauen und Entfernen des cytotoxischen DMSO wurden die Zellen in 10 ml eiskaltes Wachstumsmedium aufgenommen, resuspendiert und für 10 min bei $300 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Daraufhin wurde das Zellpellet in 37°C warmen Wachstumsmedium aufgenommen und in eine Gewebekulturflasche überführt.

4.2.1.6 Transfektion von HEK 293-Zellen

Prinzip:

Als Transfektion wird das Einbringen fremder DNA in Säugerzellen mittels geeigneter Vektoren bezeichnet.

Das hier verwendete Transfektionsreagenz Effectene ist eine nicht liposomale Lipidformulierung. Der zugeführte Enhancer kondensiert zuerst die DNA-Moleküle. Anschließend werden an die gebildeten DNA-Polymere die in Effectene enthaltenen kationischen Lipide angelagert. Es bilden sich also keine Liposome, die nur ein oder zwei DNA-Moleküle enthalten und mit der Zellmembran verschmelzen. Die kationischen Lipide interagieren einzeln mit der Zellmembran und schleusen so die komplexierte DNA in die Zelle ein. Die Plasmide werden transient im Cytosol translatiert oder bei einer stabilen Transfektion zufällig in das Genom der Zelle eingebaut. Die Effizienz hierbei ist wesentlich höher als mit liposomalen Transfektionsreagenzien.

Durchführung:

Die Zellen wurden entweder in Petrischalen mit einer Bodenfläche von 60 cm², Kulturflaschen (75 cm²) oder Kulturplatten mit 8 Vertiefungen bis etwa 40 % Konfluenz kultiviert und mit 2 µg DNA in 200 µl Puffer (im Effectene-Kit enthalten) transfiziert. Zu dem DNA-Puffer-Gemisch wird 16 µl Enhancer zugegeben. Die Ansätze wurden für 1 sec gemischt, nach zwei bis fünf Minuten Einwirkzeit 20 µl Effectene zugefügt und sofort für 10 sec gemischt. Nach weiteren fünf bis zehn Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze mit Wachstumsmedium verdünnt und auf die Zellen verteilt.

Zur Transfektion wurde ein Konstrukt des equinen Histamin H1 Rezeptors und EGFP („Enhanced Green Fluorescent Protein“) verwendet. Das EGFP ist eine Sequenzvariante des GFP-Proteins der biolumineszenten Qualle *Aequorea victoria* (SHIMOMURA et al. 1962), das eine intensivere Fluoreszenz aufweist. Mit diesem Konstrukt wurde ein stabil exprimierender Klon, der mit dem Selektivantibiotikum G 418 gewonnen wurde, isoliert. Außerdem wurden die Zellen mit bovinen β -Arrestin 1-EGFP zur Untersuchung im konfokalen Lasermikroskop transient transfiziert.

4.2.1.7 Gewinnung von Zellpellets zur Membranpräparation

Die Zellen wurden vom Gefäßboden der Zellkulturflasche abgeklopft, die Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 10 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Das Pellet wurde entweder sofort zu einer Membransuspension weiterverarbeitet (siehe dort) oder bei -80°C (2 bis 3 Wochen) eingefroren.

4.2.2 Membranpräparation

Materialien:

Homogenisierungspuffer (HB):

- 5 mmol/l Tris-HCl
 - 1 mmol/l Ethylenglycol-bis(β -Aminoethylether)- N, N, N', N'-Tetraessigsäure (EGTA)
 - 1 mmol/l Dithiotreitol (DTT)
- gelöst in H₂O bidest., eingestellt auf pH 7,4

Bei der Herstellung von Western Blot Proben wurden dem Homogenisierungspuffer zusätzlich die Proteasehemmer Benzamidin (Endkonzentration: 1 mmol/l) und PMSF (Endkonzentration: 10 nmol/l) aus einer 1000fach konzentrierten Stammlösung zugegeben, um einem Abbau der Proteine vorzubeugen.

Bindungspuffer:

- 50 mmol/l Tris-HCl
 - 5 mmol/l MgCl₂
- gelöst in H₂O bidest., eingestellt auf pH 7,4

Durchführung:

Das Zellpellet wurde in 10 ml eiskaltem HB resuspendiert und für 10 sec homogenisiert (Polytron, Stufe 6). Die Sedimentation intakter Zellen und der Zellkerne erfolgte für 10 Minuten bei 300 x g und 4°C. Die Plasmamembranfraktion wurde anschließend durch Zentrifugation bei 29500 x g und 4°C in 30 Minuten gewonnen. Das Membranpellet wurde in 5 ml HB resuspendiert und nochmals für 20 min wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Pellet wurde entweder in Tris-Mg-

Puffer (Bindungsexperimente) oder HB resuspendiert und die Proteinmenge für den Einsatz im jeweiligen Versuch bestimmt.

4.2.3 Proteinbestimmung nach LOWRY

Materialien:

Reagenzien:

Kupfersulfat-Tartrat-Natriumcarbonat (CTC-Lösung):

0,1 % (m/v) $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$

0,2 % (m/v) Na^+/K^+ -Tartrat

10 % (m/v) Na_2CO_3

gelöst in H_2O bidest.

Lowry A:

10 ml CTC-Lösung

10 ml 0,8 M NaOH

20 ml 5 % (m/v) SDS-Lösung

Lowry B:

1 ml Folin-Ciocalteu's Phenol Reagenz (Folin-Reagenz)

gelöst in 5 ml H_2O bidest.

Standardreihe:

Std. A: H_2O bidest.

Std. B: 2,5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ bovines Serumalbumin (BSA)

Std. C:	5 µg/100 µl BSA
Std. D:	7,5 µg/100 µl BSA
Std. E:	10 µg/100 µl BSA

Prinzip:

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Lowry (LOWRY et al. 1951) beruht auf der Ausbildung eines Kupfer-Protein-Komplexes, der anschließend über eine Farbreaktion bestimmt werden kann. Hierbei wird zweiwertiges Kupfer (Cu^{2+}) von den Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan komplexiert und zu Cu^{1+} reduziert. Einwertiges Kupfer bildet daraufhin einen tiefblauen Farbkomplex mit dem Folin-Reagenz.

Durchführung:

In Doppelbestimmung wurden je 3 µl der Membransuspension mit 97 µl Wasser bidest. verdünnt. Nach Zugabe von 200 µl Lowry A Reagenz wurden die Proben gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl Lowry B Reagenz zugegeben, gemischt und bei Raumtemperatur für weitere 30 min inkubiert. Bei den Standardproben wurde entsprechend verfahren. Die Farbintensität wurde im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 750 \text{ nm}$ bestimmt. Der Proteingehalt einer Probe wird anhand der linearen Standardkurve und unter Berücksichtigungen eventuell vorausgegangener Verdünnungsschritte ermittelt.

4.2.4 Charakterisierung der Histaminrezeptor-EGFP Fusionsproteine

4.2.4.1 Radioligandenbindung

Die Zelloberflächenrezeptoren werden in der Radioligandenbindung an isolierten Plasmamembranen (VACHON et al. 1987) bestimmt. Das hier verwendete radioaktiv

markierte ^3H -Pyrilamin ist ein Antagonist am H1-Rezeptor, der folglich eine vergleichbare Affinität zu G-Protein gekoppelten und ungekoppelten Rezeptoren aufweist.

4.2.4.2 Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d im Sättigungsexperiment

Prinzip:

Die Dissoziationskonstante K_d beschreibt die Konzentration eines Liganden, bei der 50 % der Rezeptoren besetzt sind. Im Sättigungsexperiment kann diese über das Verhältnis von freiem zu gebundenem Radioliganden ermittelt werden. Ist die Rezeptorenzahl konstant, nähert sich bei steigender Ligandenkonzentration der Anteil des gebundenen Radioliganden in Form einer hyperbolen Funktion einem Plateau an, das der maximalen Bindungskapazität (B_{\max}) entspricht. Aus einem Sättigungsexperiment können somit die Werte für K_d und B_{\max} graphisch abgeleitet werden. Nach der Transformation von Scatchard kann bei bekannter K_d aus jeder beliebigen Ligandenkonzentration auf die B_{\max} geschlossen werden (SCATCHARD 1949). Diese Auswertung wurde mit dem Computerprogramm GraphPad Prism[®] erstellt. Die Bestimmung der spezifischen Bindung (B_0) erfolgte in Anwesenheit eines hohen molaren Überschusses an Histamin.

Die spezifische Bindung von ^3H -Pyrilamin wurde nach folgender Gleichung ermittelt:

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

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

Materialien:

^3H -Pyrilamin, spezifische Aktivität = 32 Ci/mmol

Histamin

Szintillationsflüssigkeit

Blocklösung für Glasfaserfilter:

0,1% (m/m) Polyethylenglycol 6000 (PEG)

gelöst in H₂O bidest.

Bindungspuffer:

50 mmol/l Tris-HCl

5 mmol/l MgCl₂

gelöst in H₂O bidest., eingestellt auf pH 7,4

Durchführung:

Jede Bestimmung erfolgt im Doppelansatz an frisch präparierten HEK 293 Zellmembranen, die je nach Untersuchung das equine oder humane Histamin H1-Rezeptor-EGFP Fusionsprotein tragen. Alle Arbeitsschritte sowie das Auftauen erfolgten im Eisbad.

Zur Erstellung der Sättigungskurve wurden die Reaktionsansätze mit acht aufsteigenden Konzentrationen von ³H-Pyriamin (0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 und 15 nmol/l) versetzt. In 200 µl Gesamtvolumen pro Ansatz wurden 20 µl ³H-Pyriamin in 10facher Konzentration, 20 µl Bindungspuffer mit oder ohne Histamin und 160 µl Membransuspension mit 60 bis 100 µg Protein pipettiert. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 10 µmol/l Histamin bestimmt. Nach Mischen der Bindungsansätze wurden diese für 90 Minuten bei 25°C im Wasserbad bis zum Erreichen des Equilibriums inkubiert. Die Reaktion wird im Eisbad unter Zugabe von 1 ml eiskaltem Bindungspuffer gestoppt. Das jetzt an der Plasmamembran gebundene ³H-Pyriamin wurde über Filtration durch Silikatglasfaserfilter mit Hilfe einer Vakuum Filtrationseinheit von dem noch frei vorhandenen getrennt. Um unspezifische Bindungen in den Glasfaserfiltern abzudecken, wurden diese in PEG-Blocklösung eingelegt und einmal mit

Bindungspuffer durchgespült. Nach dreimaligem Waschgang mit je 3 ml eiskaltem Bindungspuffer wurden die Filter in Zählfläschchen überführt und mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die gebundene Radioaktivität wurde im Szintillationsmeßgerät bestimmt und zur Erstellung der Sättigungskurve verwendet.

4.2.4.3 Bestimmungen der Rezeptoraffinität der EGFP Fusionsproteine mithilfe heterologer Verdrängungsexperimente

Prinzip:

Um die Bindungseigenschaften des Rezeptor-EGFP Fusionsproteins mit denjenigen des Histamin H1 Rezeptors zu vergleichen, wurde repräsentativ für sämtliche, verwendete Liganden ein heterologes Verdrängungsexperiment mit Histamin als Kompetitor durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Konkurrenz zweier unterschiedlicher, markierter und nicht markierter Liganden um eine spezifische Bindungsstelle. Der Agonist Histamin wurde als „Displacer“ in aufsteigenden Konzentrationen zu einer konstanten Menge des Antagonisten ³H-Pyrlamin zugegeben. Da der Agonist eine höhere Affinität zur G-Protein gekoppelten als zur ungekoppelten Rezeptorkonformation aufweist, kann unter den gegebenen experimentellen Bedingungen diejenige Konzentration des Displacers ermittelt werden, bei der die Hälfte des Radioliganden aus seiner Bindung an den hochaffinen Rezeptoren verdrängt wurde (IC₅₀). Mit Hilfe der Formel nach Cheng und Prusoff (CHENG u. PRUSOFF 1973) kann über die eingesetzte Konzentration des Radioliganden (L), seiner K_d und der IC₅₀ die inhibitorische Konstante (K_i) des Displacers berechnet werden:

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

Legende: K_i = inhibitorische Konstante des Displacers
IC₅₀ = halbmaximale Hemmkonzentration des Displacers
L = Konzentration des Radioliganden
K_d = Dissoziationskonstante des Radioliganden

Durchführung:

In den Bindungsansätzen waren je 160 µl Membransuspension mit mindestens 60 µg Protein, 20 µl des ³H-Pyrlamin in einer Konzentration von etwa 1,9 nmol/l und 20 µl aufsteigende Histaminkonzentration (0; 0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 100; 1000 µmol/l Endkonzentration) enthalten. Die totale ³H-Pyrlamin-Bindung wurde in Abwesenheit von Histamin bestimmt. Die Reaktionsansätze wurden für 90 Minuten bei 25°C inkubiert und wie oben beschrieben weiter verarbeitet. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal an unterschiedlichen Membranpräparationen in Doppelbestimmung wiederholt.

4.2.5 Regulation des Histaminrezeptors

4.2.5.1 Bestimmung der Oberflächenrezeptoren an intakten Zellen (Internalisierung)

Prinzip:

Die Regulation von Zelloberflächenrezeptoren wurde in intakten HEK 293-Zellen, die den hH1- oder eH1-Rezeptor enthalten, nach 0, 5, 15, 30 und 60 minütiger Histaminbehandlung untersucht. Die unspezifische Bindung wurde unter Zugabe eines Überschusses an Pyrlamin bestimmt. Die Gesamtanzahl der Rezeptoren wurde in Abwesenheit von Histamin bestimmt. Das Prinzip des Versuches beruht darauf, dass Histamin als quartäre Ammoniumverbindung die Plasmamembran intakter Zellen nicht passieren kann. Pyrlamin hingegen ist auch in der Lage intrazellulär liegende, also konstitutiv oder aktiv internalisierte Rezeptoren, zu besetzen. Über die drei im Bindungsversuch bestimmten Werte konnte somit der prozentuale Anteil der internalisierten bzw. Oberflächenrezeptoren zeitabhängig bestimmt werden:

Oberflächenrezeptoren = Gesamtzahl der Rezeptoren ($B_{\text{total}} - B_{\text{unspez.}}$) – in der Zelle vorhandenen Rezeptoren ($B_{\text{His}} - B_{\text{unspez.}}$)

Materialien

Siehe Radioligandenbindung

Durchführung:

Die zu untersuchende Zelllinie wurde in fünf Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von 75 cm² bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Vor der Zellernte wurde das Wachstumsmedium durch FKS-freies Medium ersetzt und für 60 Minuten inkubiert. Nach Abklopfen der Zellen und Zentrifugation in einem 50 ml Zentrifugationsröhrchen (300 x g, 10 min) wurden die Zellen in je 10 ml 37°C warmen PBS resuspendiert. Vier von fünf Ansätzen wurden mit Histamin in einer Endkonzentration von 10 µmol/l behandelt und im Wasserbad für die angegebene Zeit inkubiert. Die Reaktion wurde im Eisbad gestoppt, die Zellen wie oben beschrieben dreimal mit PBS gewaschen und die abzentrifugierten Zellen in je 1 ml eiskaltem Bindungspuffer resuspendiert. Je ein Ansatz wurde in sechs Portionen geteilt. Die Gesamtzahl der Rezeptoren wurde in Abwesenheit von Histamin (B_0), die noch auf der Zellmembran vorhandenen Rezeptoren in Anwesenheit eines Histaminüberschusses und die unspezifischen Bindungen in Anwesenheit eines Überschusses an nicht markiertem Pyrilamin bestimmt. Zu jedem Reaktionsansatz wurde ³H-Pyrilamin in einer Konzentration zugegeben, die etwa seiner K_d entsprach. Nach vorsichtiger Durchmischung, um die Zellen zu schonen, wurden die Ansätze bei 4°C für 2 h bis zum Erreichen eines Equilibriums inkubiert. Gestoppt und weiterverarbeitet wurden die Proben wie bereits in der Radioligandenbindung beschrieben.

4.2.5.2 Konfokale Mikroskopie

Prinzip:

Die Laserrastermikroskopie basiert auf der Anfertigung virtueller optischer Schnitte des zu untersuchenden Objektes mithilfe eines punktwise angelegten Rasters. In

der gewünschten Schnittebene wird der Laserstrahl maximal fokussiert, wodurch hier die Fluoreszenz des EGFP-markiertem Rezeptors angeregt wird.

Durchführung:

Zur Untersuchung der HEK-hH1-EGFP und HEK-eH1-EGFP Zellklone am konfokalen Laserscanningmikroskop (LSM) wurden diese auf Objektträgern in entsprechenden Zellkulturschalen mit 8 Vertiefungen ausgesät. Die Untersuchungen erfolgten bei einer Konfluenz von etwa 80 %. Die zu beobachtenden Zellen wurden nach Morphologie und Stärke der Fluoreszenz ausgewählt.

Die Regulation des Histamin-H1-Rezeptors wurde durch Zugabe von Histamin und verschiedenen inversen Agonisten dargestellt.

4.2.6 Bestimmung der Rezeptor-G-Protein-Interaktion

4.2.6.1 GTP γ ³⁵S-Bindung

Materialien:

Waschpuffer:

50 mmol/l Tris-HCl

5 mmol/l MgCl₂

gelöst in H₂O bidest., eingestellt auf pH 7,4

Puffer zur Membranpräparation:

Waschpuffer mit Zusatz von

10 μ mol/l Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

10 mmol/l Benzamidin

Bindungspuffer:

Membranpuffer mit Zusatz von

200 mmol/l EGTA

50 μ mol/l Guanosindiphosphat (GDP)

GTP γ ³⁵S; spezifische Aktivität 1000 Ci/mmol:

1 mCi/ml Stammlösung in Bindungspuffer

Liganden:

Histamin

Pyrilamin-Maleat

Diphenhydramin-HCl

Loratadin

S-(+)-Chlorpheniramin-Maleat

Prinzip:

In der GTP γ ³⁵S-Bindung wird die durch eine Stimulation des Agonisten induzierte G-Protein-Aktivierung gemessen. Das Prinzip beruht auf dem durch Aktivierung angeregten Austausch des an G $\alpha\beta\gamma$ gebundenen Guanosindiphosphats (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP). Dies bindet an G α , das nachfolgend von G $\beta\gamma$ abkoppelt. Beide Komponenten des heterotrimeren G-Proteins können jetzt einzeln als Effektoren in der Zelle dienen. Mithilfe dieses Experimentes kann die Funktionalität eines Rezeptors (Potenz, Effizienz und Affinität eines Agonisten, Antagonisten oder inversen Agonisten) bestimmt werden (HARRISON u. TRAYNOR 2003). Durch die Zuführung des Guanosin-5'-O-(γ -[³⁵S]Thio)-triphosphat, dessen tertiäre Phosphatgruppe durch eine radioaktiv markierte Schwefelgruppe ersetzt wurde, konkurriert dieses mit dem endogenen GTP der Zelle. Da aber das γ -[³⁵S]Thio-

triphosphat für die intrinsische GTPase-Aktivität der G α -Untereinheit nicht hydrolysierbar ist, wird das G-Protein in seinem aktiven Zustand gehalten. Die aktivierte, GTP γ ³⁵S gebundene G α -Untereinheit akkumuliert und kann später mit Hilfe des Szintillationszählers anhand seiner radioaktiven Markierung gemessen werden.

Durchführung:

Die Membranen wurden wie oben beschrieben präpariert. Allerdings wurde dem Waschpuffer PMSF, ein irreversibler Inhibitor von Serin- und Thiol-Proteasen, und der unspezifische Proteasehemmer Benzamidin zugesetzt. Nachdem im LOWRY-Assay die Proteinmenge bestimmt wurde, konnten pro Ansatz 20 μ g Protein eingesetzt werden. Jede Probe wurde in einer Dreifachbestimmung untersucht und jeder Versuch wurde an mindestens drei unabhängigen Membranpräparationen wiederholt. Ein Ansatz hatte ein Gesamtvolumen von 200 μ l, die je 20 μ l Membransuspension, 20 μ l zehnfach konzentrierten Liganden, 20 μ l Radioliganden und 140 μ l Assaypuffer beinhalteten. Die Proben wurden auf Eis pipettiert, durchmischt und für 30 Minuten bei 25°C im Wasserbad inkubiert. Die Abtrennung des ungebundenen GTP γ ³⁵S erfolgte über GF/B Filtration (siehe Radioligandenbindungsversuche).

4.2.7 Regulation von Effektoren

4.2.7.1 Nachweis der Umverteilung von GRK 2 und β -Arrestin 1 im Western Blot (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Materialien zur Herstellung der SDS-Proben:

Probenpuffer nach Laemmli:

62 mmol/l Tris-HCl

10 % (v/v) Glycerol

1 % (m/m) SDS

6 % (v/v) 10%ige (m/m) Bromphenolblaulösung in Ethanol

350 mmol/l DTT

in H₂O bidest., pH 7,25

Prinzip:

Nach Aktivierung des Histamin-H1-Rezeptors werden cytosolische Proteine wie G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen und β -Arrestine zur Membran hin transloziert. Dort können sie nach Präparation von Plasmamembranen im Western Blot nachgewiesen werden.

Durchführung:

Zur Probengewinnung wurde je Versuch in vier Zellkulturrundgefäßen die jeweilige Zelllinie bis zu einer Konfluenz von 90 % gezogen und sieben Minuten mit 10 μ mol/l Histamin, 100 μ mol/l Diphenhydramin alleine oder in Kombination behandelt. Unbehandelte Zellen eines Ansatzes dienten der Basalwertbestimmung (CN). Nach Bestimmung des Membranproteins wurden die Proben im Probenpuffer nach Lämmli (LAEMMLI 1970) in einer Konzentration von 2 μ g Membranprotein pro 1 μ l Puffer angesetzt. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Proteine für zehn Minuten bei 62°C denaturiert. Nach dem Abkühlen wurde diese nochmals kurz abzentrifugiert und nach Durchmischung sofort auf das Gel aufgetragen.

4.2.7.2 Nachweis der Regulation der extrazellulär signalregulierten Kinasen (ERK 1/2) im Western Blot

Prinzip:

Histamin-H1-Rezeptoren können über komplexe Signalkaskaden die Phosphorylierung spezifischer Threonin- und Tyrosinreste der extrazellulär signalregulierten Proteinkinasen induzieren (SUGDEN u. CLERK 1997). Mittels

phosphospezifischer Antikörper kann die Aktivierung von ERK 1/2 im Western Blot nachgewiesen werden.

Durchführung:

In Zellkulturplatten mit 12 Vertiefungen wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Vor der Behandlung wurden diese für eine Stunde serumfrei inkubiert und nachfolgend die zehnfach konzentrierten Liganden (10 µmol/l Histamin, Diphenhydramin, Loratadin und Chlorpheniramin, zusätzlich den 100 mol/l konzentrierten Antagonisten Pyrilamin) hinzugegeben. Die MAP-Kinase-Stimulation erfolgte für fünf Minuten bei 37°C im Wasserbad. Die Reaktion wurde im Eisbad gestoppt, das Medium abgesaugt und die Zellen mit je 250 µl Probenpuffer nach Lämmli lysiert. Das Zelllysate wurde in 1,5 ml Schraubgefäße überführt und fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Je 10 µl wurden für die Gelelektrophorese verwendet.

4.2.7.3 Herstellung von Polyacrylamidgelen

Für 2 Gele benötigt man:

Trenngel (A):

5 ml	Rotiphorese [®] -Gel 30
3,75 ml	1,5 mol/l Tris-HCl, pH 8,8
0,1 % (m/m)	SDS
6,1 ml	Aqua bidest.
15 µl	N, N, N', N',-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
75 µl	Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Sammelgel (B):

1,7 ml	Rotiphorese [®] -Gel 30
--------	----------------------------------

1 ml	1,25 mmol/l Tris-HCl, pH 6,8
0,1 % (m/m)	SDS
7 ml	Aqua bidest.
20 µl	N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin (TEMED)
100 µl	Ammoniumperoxodisulfat (APS)

In einer nach Vorschrift zusammengebauten Gelkammer wurde zuerst das Trenngel A in einer Größe von 5 x 8 cm² gegossen. Um die Polymerisation zu starten, wurde dem Polyacrylamidgemisch TEMED und APS hinzugefügt. Nach 30 Minuten wurde ein 3 x 8 cm² Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm für 15 Taschen in das Sammelgel eingefügt. Um eine vollständige Polymerisation zu gewährleisten, wurden die Gele über Nacht im Kühlraum gelagert und erst am nächsten Tag zur SDS-Gelelektrophorese verwendet.

4.2.7.4 Auftrennung der Proteine in der SDS-Gelelektrophorese

Materialien:

Laufpuffer:

25 mmol/l Tris-HCl

190 mmol/l Glycin

0,1 % (m/m) SDS

gelöst in H₂O bidest., keine pH-Werteinstellung nötig

Zur Auftrennung von Proteinen wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer überführt. Erst wenn der Elektrophoresepuffer den Zwischenraum der Gelkassette

komplett und die beiden Platinelektroden außen bedeckt hat, wurde der Kamm entfernt und je 10 µl der vorgefertigten Proben in die Taschen pipettiert. Je Gel wurde ein biotinylierter Proteinstandard mit bekanntem Molekulargewicht aufgetragen. Um das Sammelgel zu durchwandern, betrug die angesetzte Spannung zunächst 120 V für 20 min. Ist das Trenngel erreicht, wurde die Spannung für weitere 35 min auf 200 V erhöht. Hier fand die Proteinauftrennung statt.

4.2.7.5 Elektrophoretischer Transfer der Proteine

Materialien:

Anodenpuffer I:

250 mmol/l Tris-HCl

20 % (v/v) Methanol

gelöst in H₂O bidest.

Anodenpuffer II:

25 mmol/l Tris-HCl

20 % (v/v) Methanol

gelöst in H₂O bidest.

Kathodenpuffer:

40 mmol/l ε-Aminocaprylsäure

20 % (v/v) Methanol

gelöst in H₂O bidest.

Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween (TBS/T):

25 mmol/l Tris-HCl

190 mmol/l NaCl

1 % (v/v) Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween-20)

gelöst in H₂O bidest., eingestellt auf pH 8,0

Blocklösung:

5 % (m/m) BSA

gelöst in TBS/T, pH 8,0

Im Semidryverfahren mithilfe eines diskontinuierlichen Puffersystems wurden die Proteine vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Dieses Verfahren gewährleistet einen möglichst quantitativen Transfer der Proteine. Für jedes Gel wurde eine 5 x 8 cm² große Membran für 10 Minuten in Methanol aktiviert, anschließend in Aqua bidest. hydratisiert und bis zur weiteren Verwendung in Anodenpuffer II aufbewahrt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele gekennzeichnet und in Anodenpuffer II eingelegt. Auf einer hydratisierten Graphitplatte wurden sechs, in Anodenpuffer I getränkte Filterpapiere ohne Luftblasen aufeinander gelegt. Nach drei weiteren in Anodenpuffer II getränkten Filterpapieren wurden die Membran und anschließend das Gel aufgebracht. Der Sandwichblot wurde mit neun Blatt in Kathodenpuffer getränktem Filterpapier vervollständigt. Der Proteintransfer fand bei 116 V und 0,8 mA pro cm² Membranfläche für 2 h statt. Zur Absättigung der nicht besetzten Bindungsstellen wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur mit Blocklösung inkubiert.

4.2.7.6 Detektion der Proteine mittels Antikörper

Die Antikörperlösungen wurden in TBS/T und 0,1 % BSA angesetzt. Der erste Antikörper wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde fünf Mal für 10 Minuten mit TBS/T bei Raumtemperatur gewaschen. Für den zweiten Antikörper wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten wieder fünf

Waschgänge für je zehn Minuten mit TBS/T bevor die Immunkomplexe detektiert wurden.

4.2.7.7 Chemilumineszenz

Substratlösung:

2,5 mmol/l Luminol (3-Aminophtalhydrazid) in DMSO

400 µmol/l p-Cumarsäure in DMSO

100 mmol/l Tris-HCl

2,7 mmol/l 30 % H₂O₂

gelöst in H₂O bidest., eingestellt auf pH 8,5

Die gebundenen Antikörper wurden mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. Dieses Prinzip beruht darauf, dass die an den zweiten Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase das in der Substratlösung vorhandenen H₂O₂ katalytisch spaltet, wodurch nachfolgend Luminol oxidiert wird. Die durch Rückführung in den Grundzustand frei werdende Energie des Luminols wird über Belichtung eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht.

Die PVDF-Membran wurde hierfür eine Minute in der Substratlösung inkubiert. Anschließend wurde in einer Röntgenkassette ein Röntgenfilmstreifen für ein bis fünf Minuten belichtet. Nach Entwicklung konnte die Schwärzung mithilfe eines Video-Imagers ausgewertet werden.

4.2.7.8 Regulation der Adenylatcyclase

Nach Stimulation von Histamin-H1-Rezeptoren wird cyclisches Adenosin-3'-5'-monophosphat (ROTH et al. 1991) als „second messenger“ freigesetzt. Um den zugrunde liegenden Signalweg näher zu untersuchen, wird die Aktivität der AC

indirekt über die Menge des produzierten cAMP bestimmt. Dieser Signalweg kann entweder direkt über die Stimulation der Adenylatcyclase in Plasmamembranen, also einem direkten Substratumsatzes von ATP zu cAMP (JOHNSON u. SALOMON 1991), oder über die intrazelluläre cAMP-Akkumulation an intakten Zellen erfolgen. Bei letzterer Methode spielen zusätzliche intrazelluläre Regulationsmechanismen eine Rolle. Um diese näher zu bestimmen, werden die Ansätze mit verschiedenen Stimulatoren und Inhibitoren behandelt. Die Proteinkinase C wird mithilfe von Phorbol ester (10 $\mu\text{mol/l}$) aktiviert bzw. mit Chelerythrin (10 bzw. 100 $\mu\text{mol/l}$) inhibiert. Gleiches gilt für die Wirkung von dBcAMP (1 mmol/l bzw. 100 $\mu\text{mol/l}$) und H89 (10 bzw. 100 $\mu\text{mol/l}$) auf die Proteinkinase A. Mit U-73122 (10 $\mu\text{mol/l}$) und m-3M3FBS (25 $\mu\text{mol/l}$) wird die Phospholipase C stimuliert und inhibiert. Eine Behandlung mit Pertussistoxin (PTX) (10 pmol/l) lässt auf einen Einfluss von $G\alpha_i$ schließen. Eine Transfektion mit dem am Institut hergestellten $\beta\gamma$ -Scavenger C2ACII sowie mit Phosducin blockieren $G\beta\gamma$ vermittelte Signalprozesse. Um die Unterschiede deutlicher zu machen, wird je nach Fragestellung die Produktion von cAMP mit Forskolin (1 $\mu\text{mol/l}$) stimuliert. Außerdem wird der Einfluss der inversen Agonisten Diphenhydramin (100 $\mu\text{mol/l}$) und Pyrilamin (100 $\mu\text{mol/l}$) im Vergleich zum Agonisten Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$) auf die cAMP-Akkumulation untersucht.

Die Quantifizierung von cAMP erfolgt mithilfe eines am Institut etablierten, kompetitiven ELISA.

4.2.7.9 Bestimmung der Adenylatcyclaseaktivität

Materialien:

AC-Assay-Puffer:

Tris-HCL	1 mol/l	700 μl
NaCL	1 mol/l	1400 μl
MgCl ₂	1 mg/l	140 μl

Material und Methoden

Phosphocreatin	1 mol/l	100 µl
Creatinphosphat	1000 U/ml	100 µl
RO 20/1724	100 mmol/l	14 µl
GTP	10 mmol/l	20 µl
ATP	100 mmol/l	100 µl
BSA	1 %	200 µl
IBMX	1 mol/l	100 µl

in H₂O bidest. auf 10 ml auffüllen, eingestellt mit HCl auf pH 7,4

Durchführung:

Nach erfolgter Membranpräparation wurden die AC-Assay-Ansätze im Eisbad pipettiert. 50 µl Assaypuffer wurden je 10 µl zehnfach konzentrierte Ligandenverdünnung (in Endkonzentration von 1 µmol/l Forskolin, Histamin 1 nmol/l, 10 nmol/l, 100 nmol/l, 100 µmol/l, 10 µmol/l, 1 µmol/l), 10 µl Aqua dest. und 30 µl Membransuspension mit 10 µg Protein zugesetzt, so dass ein Gesamtvolumen von 100 µl erreicht wurde. Die basale AC-Aktivität wurde mit 50 µl Assaypuffer, 20 µl H₂O und 30 µl Membransuspension bestimmt. Inkubiert wurden die Ansätze für zehn Minuten bei 32°C im Wasserbad. Gestoppt wurde die Reaktion im Eisbad und durch Zusatz von 500 µl 10 mmol/l HCl. Alle Ansätze wurden in Doppelbestimmung durchgeführt und jeder Versuch dreimal wiederholt.

Die gebildete cAMP wurde anschließend im ELISA bestimmt.

4.2.7.10 Intrazelluläre cAMP-Akkumulation

Materialien:

Versuchsmedium:

25 mmol/l N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure] (Hepes)

500 µmol/l 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)

0,01 % (m/m) BSA

gelöst in DMEM

Acetylierung der Proben mit:

Triethylamin

Essigsäureanhydrid

im Verhältnis 4:1 mischen

Durchführung:

Die zu untersuchende Zelllinie wurde auf eine Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Die Zellen wurden auf ein Eisbad überführt, das Wachstumsmedium abgesaugt und durch je 250 µl, eiskaltes Versuchsmedium ersetzt. Die jeweiligen Liganden befanden sich bereits in gewünschter Konzentration in diesem Medium gelöst. Hierbei wurden zum einen die Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit und zum anderen der Einfluss verschiedener Effektoren auf die cAMP-Produktion bestimmt. Die cAMP-Akkumulation wurde für 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad durchgeführt. Unter Zugabe von 750 µl 50 mmol/l HCl wurde der Versuch im Eisbad gestoppt und die Zellen lysiert. Nach dreißigminütiger Ruhe auf Eis wurden die Proben mit 30 µl eines TEA-EAH-Gemisches unter Schütteln acetyliert und danach zehn Minuten bei 300 x g abzentrifugiert. Das acetylierte cAMP sammelt sich somit im sauren Überstand an und konnte dort im ELISA bestimmt werden.

Damit cAMP während des Versuches nicht abgebaut wird, wurde dem Versuchsmedium IBMX, ein wenig selektiver Phosphodiesterasehemmer, der die hydrolytische Spaltung des cAMP verhindert, zugesetzt.

4.2.7.11 Bestimmung von cAMP im ELISA

Prinzip:

Der verwendete Enzym-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA) beruht auf einer kompetitiven Verdrängung von zugesetztem Markerenzym-konjugierten cAMP durch das gebildete cAMP an einem selektiven cAMP-Antikörper. Dieser wird über einen affinitätsgereinigten anti-Kaninchen Antikörper an den Boden einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen gebunden. Der Antigen-Antikörperkomplex wird über eine enzymatische Farbreaktion detektiert. Dabei katalysiert die als Markerenzym dienende Meerrettich-Peroxidase mit H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff, wobei Sauerstoff mit dem farblosen $TMBH_2$ zum blau gefärbten TMB und Wasser reagiert. Je mehr intrazellulär freigesetztes cAMP gebunden wird, desto geringer ist die bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ im Photometer bestimmte Farbintensität.

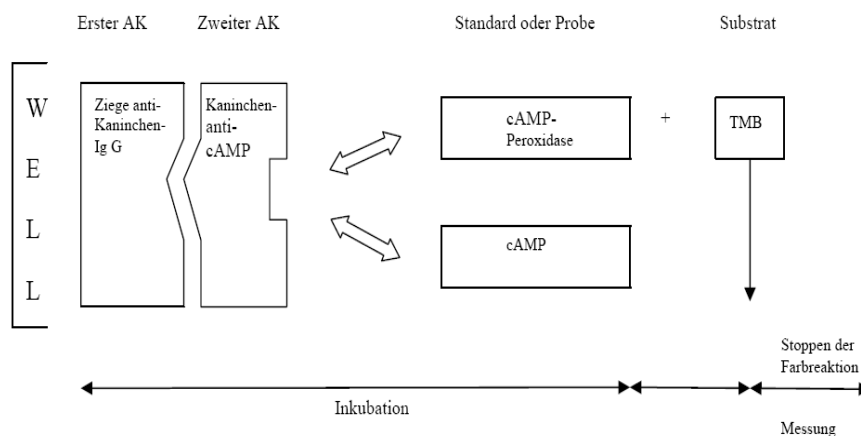


Abbildung 4-1 Prinzip des ELISA

Materialien:

Beschichtungspuffer:

1,59 g NaHCO₃

2,93 g Na₂CO₃

in 1 l H₂O bidest. lösen, einstellen auf pH 9,4

Blockpuffer:

0,05 mol/l NaAcetat

1 % BSA

mit Essigsäure eingestellt auf pH 6,0

Probenpuffer:

0,05 mol/l NaAcetat (pH 6,0)

0,1 % BSA

Waschlösung:

0,01 % Tween-20

in H₂O bidest.

Konjugat:

2-O-succinyl-cAMP gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase

in Verdünnung 1:20000 eingesetzt

Substratlösung:

Lösung A.

1 g/l Wasserstoffperoxid-Harnstoff

18 g/l	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
10,3 g/l	Citronensäure x 1 H ₂ O

Lösung B:

500 mg	Tetramethylbenzidin
40 ml	DMSO (als Lösungsmittel für TMB)
960 ml	Aqua bidest.
10,3 g/l	Citronensäure x 1 H ₂ O

vor Gebrauch Lösung A und B im Verhältnis 1:1 mischen

Erstellung der Standardreihe (aus cAMP-Stammlösung):

1 mmol/l cAMP, gelöst in H₂O bidest.

Im Verhältnis 1:1000 Standard I herstellen:

1 nmol/l (10 µl cAMP-Stammlösung + 990 µl Assaypuffer)

Verdünnung erfolgt im Assaypuffer:

<u>Standard</u>	<u>Konzentration (cAMP in 100 µl)</u>
0 = Puffer	0 mol
1 = 1/10 aus Standard I	100 pmol
2 = 1/10 aus 1	10 pmol
3 = 1/10 aus 2	1 pmol
4 = 1/10 aus 3	100 fmol
5 = 1/10 aus 4	10 fmol
6 = 1/10 aus 5	1 fmol
7 = 1/10 aus 6	0,1 fmol

Durchführung:

Die Platten wurden mit 100 µl anti-Kaninchen IgG (1 µg pro Vertiefung) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, danach die Flüssigkeit abgegossen und die Platten ausgeklopft. Um unspezifische Bindungen abzusättigen, wurden 200 µl Blockpuffer pro Vertiefung aufgetragen, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dann wieder abgegossen und ausgeklopft. Nach zweimaligem Waschen wurde der erste Antikörper AS22 in einer Konzentration von 2,5 µg/ml Assaypuffer und einem Volumen von 100 µl in die Vertiefung pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abkippen und sechs Waschgängen konnten die Proben und die Standardreihe aufgetragen werden. Je nach Höhe der cAMP-Endkonzentration wurden der Überstand der Proben 1:10 oder weniger mit Assaypuffer verdünnt. Dazu wurden je 100 µl Konjugat in einer Verdünnung von 1:20000 gegeben und bis zum Einstellen eines Equilibriums über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach sechs Waschgängen und Ausklopfen der Platten wurde mit Zugabe von je 150 µl Substrat die Farbreaktion gestartet. Bei genügender Farbentwicklung wurde der Versuch mit 100 µl 1 N HCl gestoppt. Sämtliche Inkubationen erfolgten unter Schütteln.

4.3 Auswertung der Ergebnisse

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt mithilfe des Computerprogramms GraphPad Prism™ (Fa. GraphPad Software Inc.).

Die Auswertung der Ergebnisse innerhalb einer Versuchsreihe aus mindestens $n = 3$ unabhängigen Experimenten erfolgte über Berechnung des arithmetischen Mittels unter Angabe des Standardfehlers.

Signifikante Unterschiede zwischen zwei und mehreren Proben wurden mithilfe von „Student's t-Test“ bzw. „ANOVA“ berechnet.

5 Ergebnisse

5.1 Regulation des equinen Histamin H1 Rezeptors

5.1.1 Radioligandenbindung an intakten Zellen

Um die Zahl von Oberflächenrezeptoren in der Radioligandenbindung experimentell zu bestimmen, wird die Eigenschaft verschiedener Liganden ausgenutzt, die Plasmamembran zu passieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Membrangängigkeit von ^3H -Pyrilamin/Pyrilamin ausgenutzt, um die Gesamtzeptorenzahl in intakten HEK-hH1/eH1-Zellen zu bestimmen. Der Anteil an Oberflächenrezeptoren wurde durch Verdrängung mit Histamin, das als quartäre Ammoniumverbindung nicht in der Lage ist, die Plasmamembran zu durchqueren, erfasst. Das Ausmaß der Rezeptorinternalisierung wurde nach unterschiedlich langer Behandlung der Zellen mit Histamin (B_{His}) untersucht. Die unspezifische Bindung (B_{unspez}) wurde in Anwesenheit eines molaren Überschusses an nicht-radioaktiv markiertem Pyrilamin bestimmt. Die spezifische Bindung der Rezeptoren auf der Plasmamembran ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$\text{Oberflächenrezeptoren} = \text{Gesamtzahl der Rezeptoren } (B_{\text{total}} - B_{\text{unspez}}) - \text{in der Zelle vorhandenen Rezeptoren } (B_{\text{His}} - B_{\text{unspez}})$$

Die gewonnenen Ergebnisse werden auf zwei verschiedene Arten ausgewertet, um einerseits die Abnahme der Rezeptoren auf der Zelloberfläche und andererseits die Zunahme der endocytierten Rezeptoren ins Zellinnere darzustellen.

5.1.1.1 Bestimmung der Oberflächenrezeptoren an intakten Zellen

Zunächst wurde nach verschieden langer Aktivierung der Rezeptoren mit Histamin (10 $\mu\text{mol/l}$) die Anzahl der Oberflächenrezeptoren bestimmt. In unbehandelten Zellen (Kontrolle) befindet sich etwa die Hälfte der humanen H1 Rezeptoren an der Zellmembran. Im Gegensatz dazu sind nur knapp 40 % der equinen H1 Rezeptoren auf der Zelloberfläche lokalisiert.

Bereits nach 5 Minuten Histaminbehandlung ist eine deutliche Rezeptorinternalisierung in beiden Zellklonen zu erkennen. Die Abnahme von

Zelloberflächenrezeptoren setzt sich mit zunehmender Behandlungsdauer weiter fort. Der maximale Effekt wird nach einer Inkubation von 30 Minuten erreicht. Bei HEK-hH1 befinden sich zu diesem Zeitpunkt nur noch 25 % der Gesamtanzahl der Histaminrezeptoren in der Zellmembran. Das heißt, die Zahl der Rezeptoren an der Zellmembran hat um die Hälfte abgenommen. Bei HEK-eH1 sind dagegen noch etwa 30 % der Gesamtrezeptoren an der Zelloberfläche lokalisiert. Beim equinen Histamin H1 Rezeptor hat sich also die Zahl der Oberflächenrezeptoren nur um ein Viertel erniedrigt. Bei längerfristiger Exposition steigt in HEK-hH1-Zellen die Oberflächenrezeptorenzahl bereits nach einer Zeitspanne von 60 Minuten wieder leicht an, bei HEK-eH1 dagegen nicht.

Histamin H1 Oberflächenrezeptoren in HEK-hH1 und -eH1

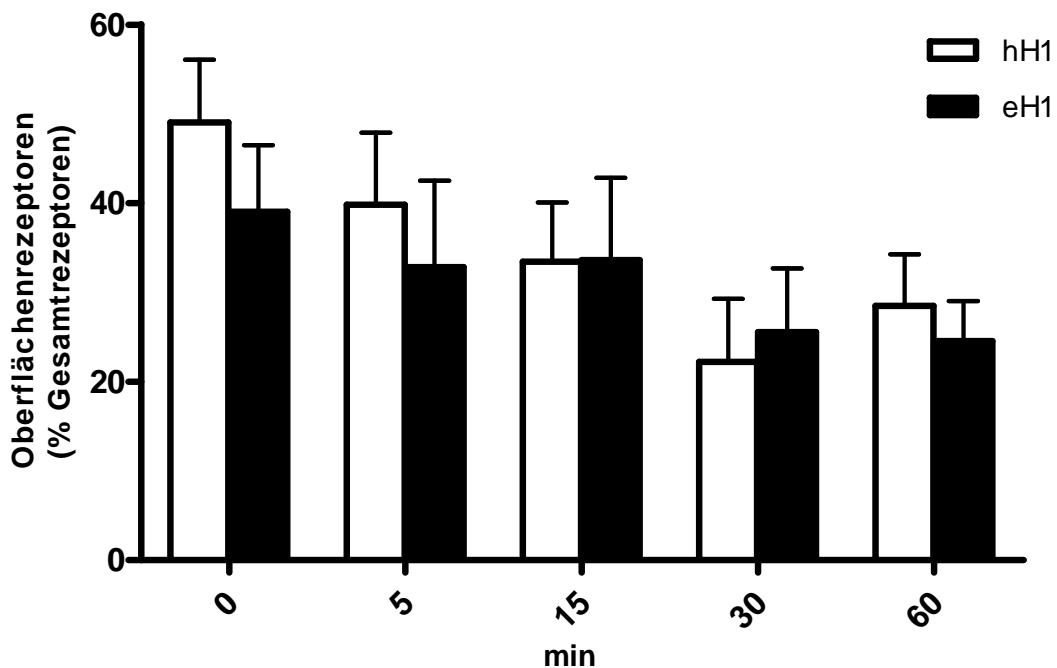


Abbildung 5-1 Regulation von Oberflächenrezeptoren nach Histaminbehandlung

An intakten Zellen wurde nach unterschiedlicher Zeitdauer der Histaminbehandlung ($10 \mu\text{mol/l}$) die Anzahl der Oberflächenrezeptoren in der Radioligandenbindung bestimmt. Die Abbildung stellt die Mittelwerte \pm SEM aus vier bis sechs, unabhängigen Versuchen dar.

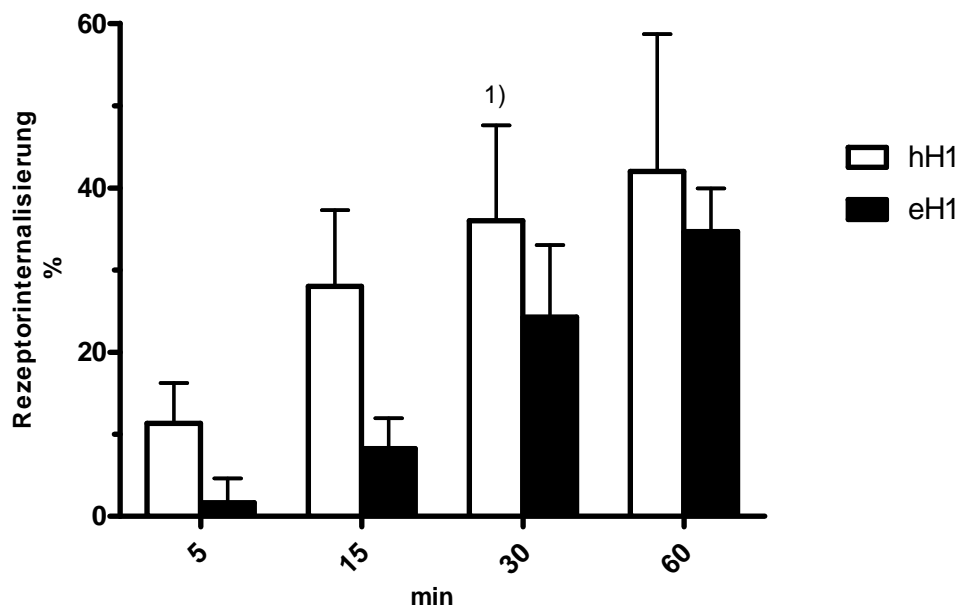
5.1.1.2 Internalisierung des Histamin H1 Rezeptors

Die Internalisierung des Histamin H1 Rezeptors wurde zum einen in der Radioligandenbindung an intakten Zellen ermittelt und zum anderen im konfokalen Mikroskop bildlich dargestellt.

Aus der Differenz der Gesamtzeptorenzahl und der unter 5.1.1 berechneten Fraktion von Zelloberflächenrezeptoren ergibt sich der Anteil an Rezeptoren, die im Zellinneren liegen. Nach Normalisierung dieser Werte auf den Kontrollwert kann die zunehmende Rezeptorinternalisierung im zeitlichen Verlauf der Histaminbehandlung dargestellt werden.

Dabei wird ersichtlich, dass der equine Histaminrezeptor zeitlich verzögert und weniger stark internalisiert (35 versus 43 %) als sein humanes Gegenstück. Somit ist erst nach 30 bis 60 Minuten ein deutlicher Anstieg der Internalisierungsrate zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigt der humane Histamin H1 Rezeptor bereits nach fünfminütiger Stimulation mit Histamin eine deutliche Internalisierung, die in gleichmäßigen Schritten zunimmt.

Internalisierung des humanen und equinen Histamin H1 Rezeptors



1) * Basalwert versus 30 Minuten Histaminbehandlung

Abbildung 5-2 Internalisierung des Histamin H1 Rezeptors

Die Rezeptorinternalisierung wurde in Abhängigkeit der Zeitdauer der Histaminbehandlung ($10 \mu\text{mol/l}$) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Im statistischen Vergleich, der mithilfe eines Anova-Testes vorgenommen wurde, liegt zwischen Basalwert und 30-Minuten-Wert ein signifikanter Unterschied (P -Wert: $0,01-0,05$) vor.

Beim Vergleich der beiden Abbildungen wird klar, dass die im Vergleich zum hH1 deutlich langsamer ablaufende Internalisierung des eH1 in der zweiten graphischen Darstellung hervorgehoben wird. In der ersten Darstellung wird deutlich, dass der equine Histamin H1 Rezeptor unter Kontrollbedingungen in HEK-Zellen zu einem geringeren Anteil an der Zelloberfläche exprimiert wird als der humane H1 Rezeptor. Darüber hinaus ist in Bezug auf die Oberflächenrezeptoren die maximale Internalisierungsrate des equinen Histamin H1 Rezeptors mit 35 % geringer als die des humanen Rezeptors mit 54 %.

5.1.2 Histamin H1 Rezeptor-EGFP Fusionsproteine

Die Untersuchung der Rezeptorinternalisierung unter dem konfokalen Mikroskop wurde mithilfe von Fusionsproteinen des humanen und equinen Histamin H1 Rezeptors mit dem aus der biolumineszenten Qualle *Aequorea victoria* stammenden „EGFP“ durchgeführt. Diese wurden zunächst einer pharmakologischen Charakterisierung unterzogen und die Ergebnisse anschließend mit denjenigen der nativen Rezeptoren verglichen.

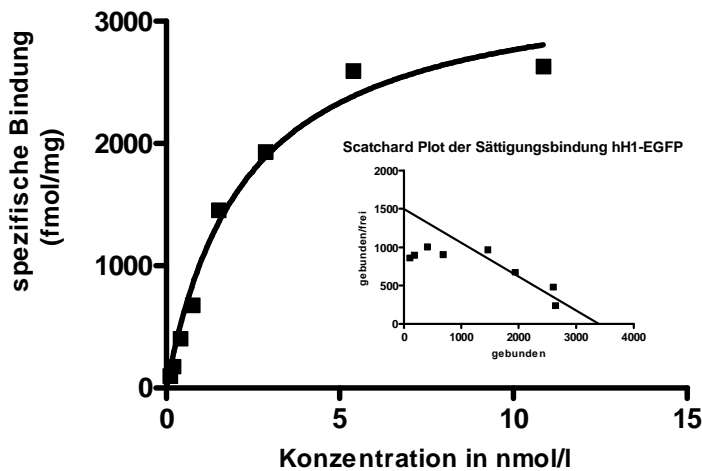
5.1.2.1 Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d im Sättigungsexperiment

Mit aufsteigenden Konzentrationen von ^3H -Pyrilamin, einem in verschiedenen Zellmodellen charakterisierten inversen Histaminrezeptoragonisten, wurden die Bindungseigenschaften der eH1- und hH1-Rezeptor-EGFP-Konstrukte untersucht. In der Sättigungskurve ist eine hyperbole Annäherung an die maximale Bindungskapazität von ^3H -Pyrilamin an das jeweilige Rezeptorkonstrukt zu erkennen. Die spezifische Bindung (B_0) wurde in Anwesenheit eines hohen molaren Überschusses von Histamin aus der Differenz der im Szintillationszähler gemessenen Radioaktivität für die totale und für die unspezifische Bindung ermittelt. Die Rezeptorendichte wurde über nichtlineare Regression mit dem Computerprogramm GraphPadPrism[®] ermittelt. Der Zellklon HEK-hH1-EGFP weist eine maximale Bindungskapazität (B_{max}) von $3395,0 \pm 244,8$ fmol/mg, der eH1-EGFP eine Rezeptorendichte von $732,2 \pm 51,7$ fmol/mg auf.

In der Scatchard Transformation ergibt sich eine lineare Darstellung, deren Steigung den negativ reziproken Wert der K_d bildet. Diese stellt ein Maß für die Affinität des Radioliganden zum Fusionsprotein dar. Deshalb gilt nach dem Massenwirkungsgesetz: Je kleiner die K_d , desto höher die Affinität. Außerdem ist die B_{max} als Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse direkt ablesbar.

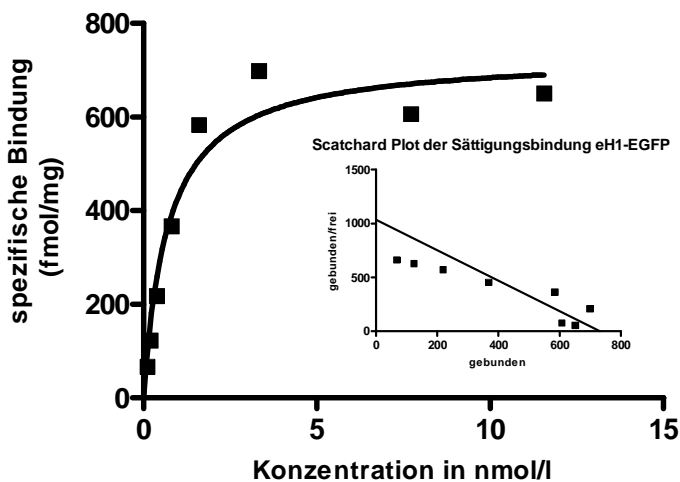
Hierbei ist auffällig, dass die Affinität des Radioliganden zum equinen Histamin H1 Rezeptor mit einer K_d von $0,71 \pm 0,19$ nmol/l wesentlich höher ist als die zum humanen ($K_d = 2,27 \pm 0,44$ nmol/l).

Sättigungsbindung hH1-EGFP in HEK 293



B_{\max} : 3395 fmol/mg
 K_d : 2,268 nmol/l

Sättigungsbindung eH1-EGFP in HEK 293



B_{\max} : 732,2 fmol/mg
 K_d : 0,7065 nmol/l

Abbildung 5-3 Sättigungsbindung an hH1/eH1-EGFP in HEK-Zellen

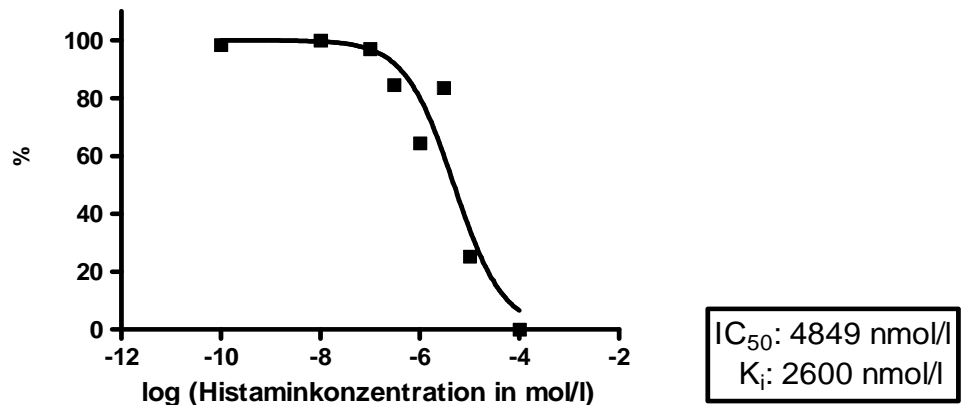
Die Sättigungsbindungen wurden an isolierten Plasmamembranen von HEK-hH1-EGFP und -eH1-EGFP (Präparation siehe Materialien und Methoden) durchgeführt. Um die maximale Bindungskapazität zu bestimmen, wurde der Versuch mit aufsteigenden Konzentrationen von ^3H -Pyrilamin (0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 15 nmol/l) in Anwesenheit von 10 $\mu\text{mol/l}$ Histamin im Wasserbad für 90 min bei 25°C inkubiert und anschließend auf Eis unter Zugabe von Bindungspuffer (Tris-Mg-Puffer) gestoppt. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen dar.

5.1.2.2 Heterologes Verdrängungsexperiment

In Anwesenheit von aufsteigenden Konzentrationen von Histamin wurde seine Bindungsaffinität für das Rezeptor-EGFP-Fusionsprotein bestimmt.

Histamin besitzt als Agonist eine höhere Affinität zur G-Protein gekoppelten Form als zur abgekoppelten Form des Rezeptors. Die inhibitorische Konstante K_i beschreibt unter den gewählten experimentellen Bedingungen, die Konzentration des Displacers Histamin, bei der 50 % des ^3H -Pyrilamin ($K_d = 1,9 \text{ nmol/l}$) aus seiner hochaffinen Bindung am Rezeptor verdrängt wird (IC_{50}). Die K_i beträgt für hH1-EGFP 2600 nmol/l und für eH1-EGFP 597,1 nmol/l. Die IC_{50} liegt für hH1-EGFP bei 4849 nmol/l und für eH1-EGFP bei 2239 nmol/l. Die angegebenen Werte wurden aus je drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

Heterologe Verdrängung hH1-EGFP Klon 12 in HEK 293



Heterologe Verdrängung eH1-EGFP Klon 7 in HEK 293

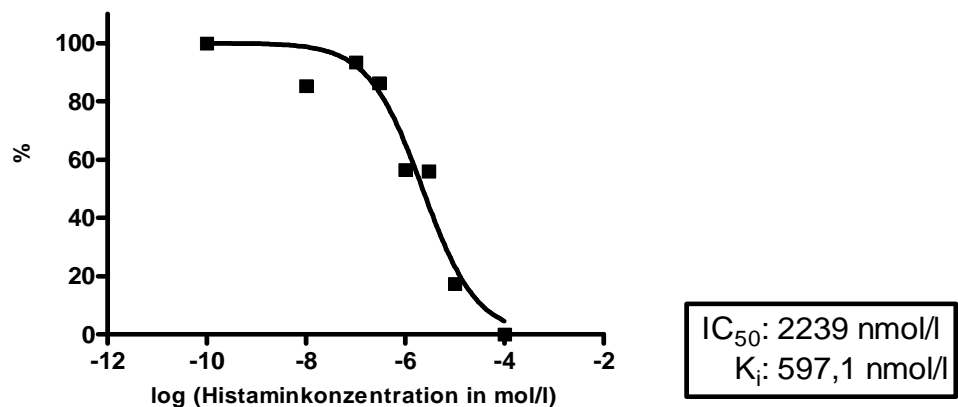


Abbildung 5-4 Heterologe Verdrängung von ³H-Pyrilamin an hH1/eH1-EGFP in HEK-Zellen

Die heterologen Verdrängungsexperimente wurden an isolierten Plasmamembranen, wie oben beschrieben präpariert, mit aufsteigenden Konzentrationen des „Displacers“ Histamin (0; 0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 100; 1000 µmol/l) und ³H-Pyrilamin (1,9 nmol/l) für 90 min bei 25°C durchgeführt und auf Eis mit Zugabe von eiskaltem Bindungspuffer (Tris-Mg-Puffer) gestoppt.

Für beide Fusionsproteine dient Histamin als Agonist. Im Vergleich zu früher am Institut durchgeführten heterologen Verdrängungsexperimenten zeigen sich für Histamin an nativen hH1 und eH1 Rezeptoren niedrigere K_i-Werte (hH1 3957 nmol/l; eH1 3901 nmol/l). Die Affinität von Histamin an den Fusionsproteinen nimmt demnach leicht zu.

Insgesamt weisen beide Zellklone eine ausreichend hohe Zahl an Histamin H1 Rezeptor-EGFP Fusionproteinen auf, die eine den nativen H1-Rezeptoren entsprechende Affinität für Histamin und Pyrilamin aufweisen.

5.1.2.3 Darstellung der Internalisierung des Histamin H1-Rezeptors mittels konfokaler Mikroskopie

Um die Endocytose der Rezeptoren zusätzlich zum experimentellen Nachweis auch bildlich darzustellen, wurde mithilfe der Histamin H1 Rezeptor-EGFP Fusionsproteine der zeitliche Verlauf der Internalisierung dargestellt.

In unbehandelten Kontrollen ist die Fluoreszenz gleichmäßig an der Zellmembran lokalisiert. Dagegen sind kaum Rezeptoren im Zellinneren beider Zellklone zu erkennen. Nach Zugabe von Histamin treten bei HEK-hH1-Zellen bereits nach 1 min vereinzelt H1-Rezeptoren im Cytosol punktförmig auf, bei HEK-eH1-Zellen jedoch erst nach 3 min. Die langsamer eintretende Internalisierung des eH1-EGFP Fusionsproteins ist auch nach 5 min noch deutlich erkennbar. Sind in den HEK-Zellen mit hH1-EGFP bereits Rezeptoren als einzeln leuchtende Punkte im Inneren der Zelle wahrzunehmen, beginnen die eH1-EGFP erst langsam, sich von der Zellmembran zu entfernen. Die Internalisierung nimmt bis zu 10 min nach Histamingabe noch weiter zu, wie auf den für das Recycling angefertigten Bildern dargestellt wird. Eine länger andauernde Exposition mit dem Agonisten konnte wegen technisch bedingtem Nachlassen der Fluoreszenz nicht ausgewertet werden.

Zusätzlich reagieren die Zellen bei zu häufiger Anregung durch den Laserstrahl empfindlich. Dennoch konnte bei einer Vielzahl an Wiederholungen der Internalisierungsexperimente keine weitere Zunahme der endocytierten Rezeptoren im Zellinneren nach mehr als 10 min beobachtet werden. Dies steht im Gegensatz zu den Bindungsexperimenten an intakten Zellen, in denen eine weitere Zunahme der Internalisierungsrate bis zu 30 min nachgewiesen wurde.

Die vorne bereits dargestellte langsamere Internalisierung des eH1 im Vergleich zum hH1 konnte dagegen auch im konfokalen Mikroskop beobachtet werden.

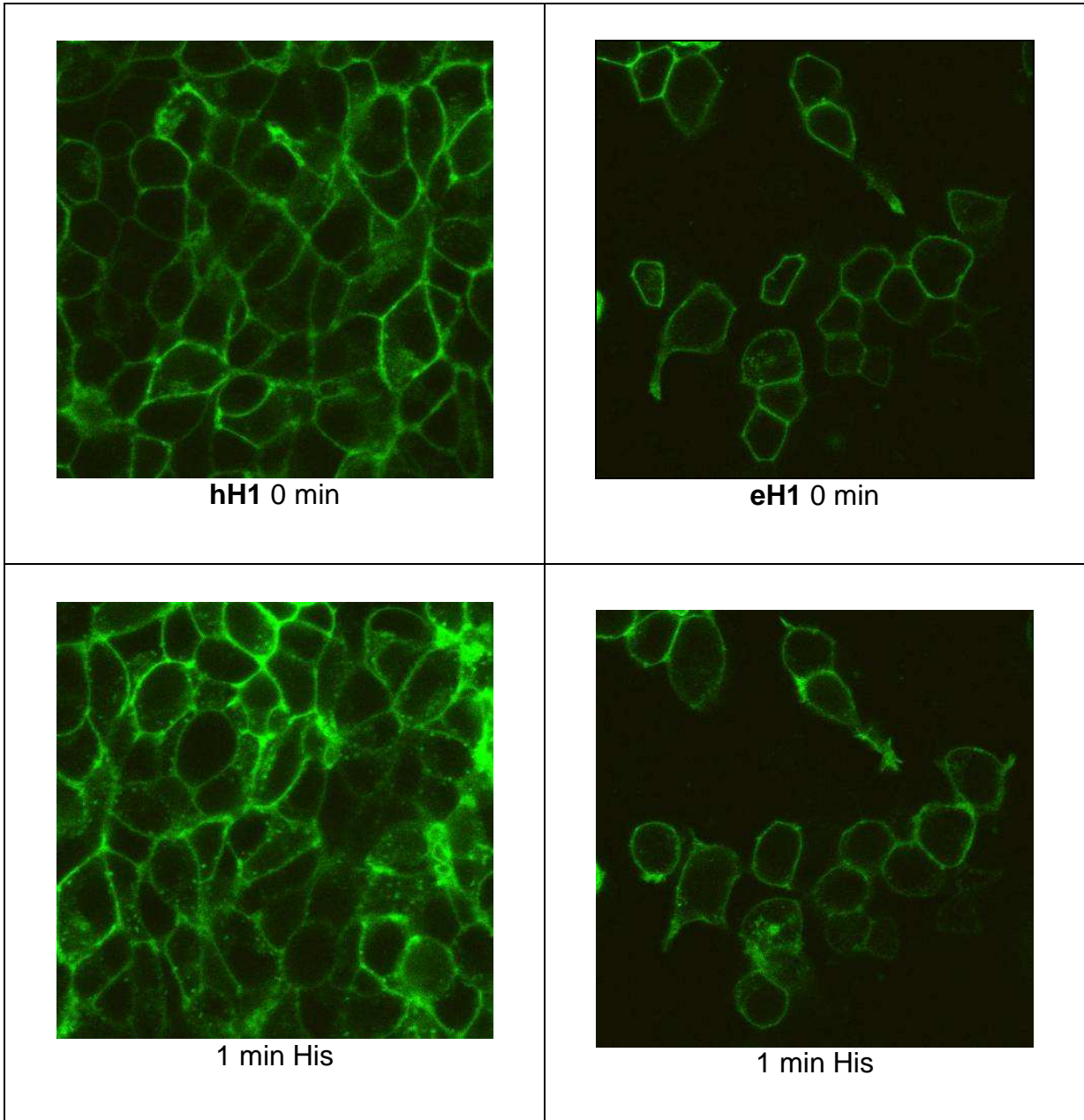
5.1.2.4 Darstellung des Recyclings des Histamin H1-Rezeptors mittels konfokaler Mikroskopie

Die Geschwindigkeit des Recyclings endocytierter Histamin H1 Rezeptoren wurde ebenfalls im konfokalen Laserscanningmikroskop untersucht. Dazu wurden nach histamininduzierter (10 $\mu\text{mol/l}$; 10 min) Internalisierung die Zellen entweder gewaschen oder für verschiedene Zeitspannen mit dem inversen Agonisten Diphenhydramin (100 $\mu\text{mol/l}$) behandelt. Das Ziel dieses Experimentes ist es darzustellen, ob ein inverser Agonist die Fähigkeit besitzt, internalisierte Rezeptoren wieder an die Zelloberfläche zu verlagern. Dies würde sich in einer Umverteilung der Fluoreszenz vom Cytosol zur Membran hin zeigen. Der Effekt auf die Umverteilung wurde im zeitlichen Verlauf dokumentiert.

Die Abbildung 5-6 zeigt den equinen Histamin H1 Rezeptor nach Internalisierung und nachfolgendem Auswaschen mit Medium oder Behandlung mit Diphenhydramin. Dabei wird deutlich, dass die Fluoreszenz sich nur nach dem Auswaschen mit Medium vom Cytosol an die Zelloberfläche verlagert, nicht jedoch bei Behandlung mit dem inversen Agonisten Diphenhydramin.

Im Gegensatz dazu konnte beim humanen Histamin H1 Rezeptor eine Abnahme der internalisierten Rezeptoren sowohl nach dem Auswaschen des Agonisten als auch nach Zugabe von Diphenhydramin beobachtet werden.

Diphenhydramin scheint demnach beim eH1 das Recycling zu blockieren.



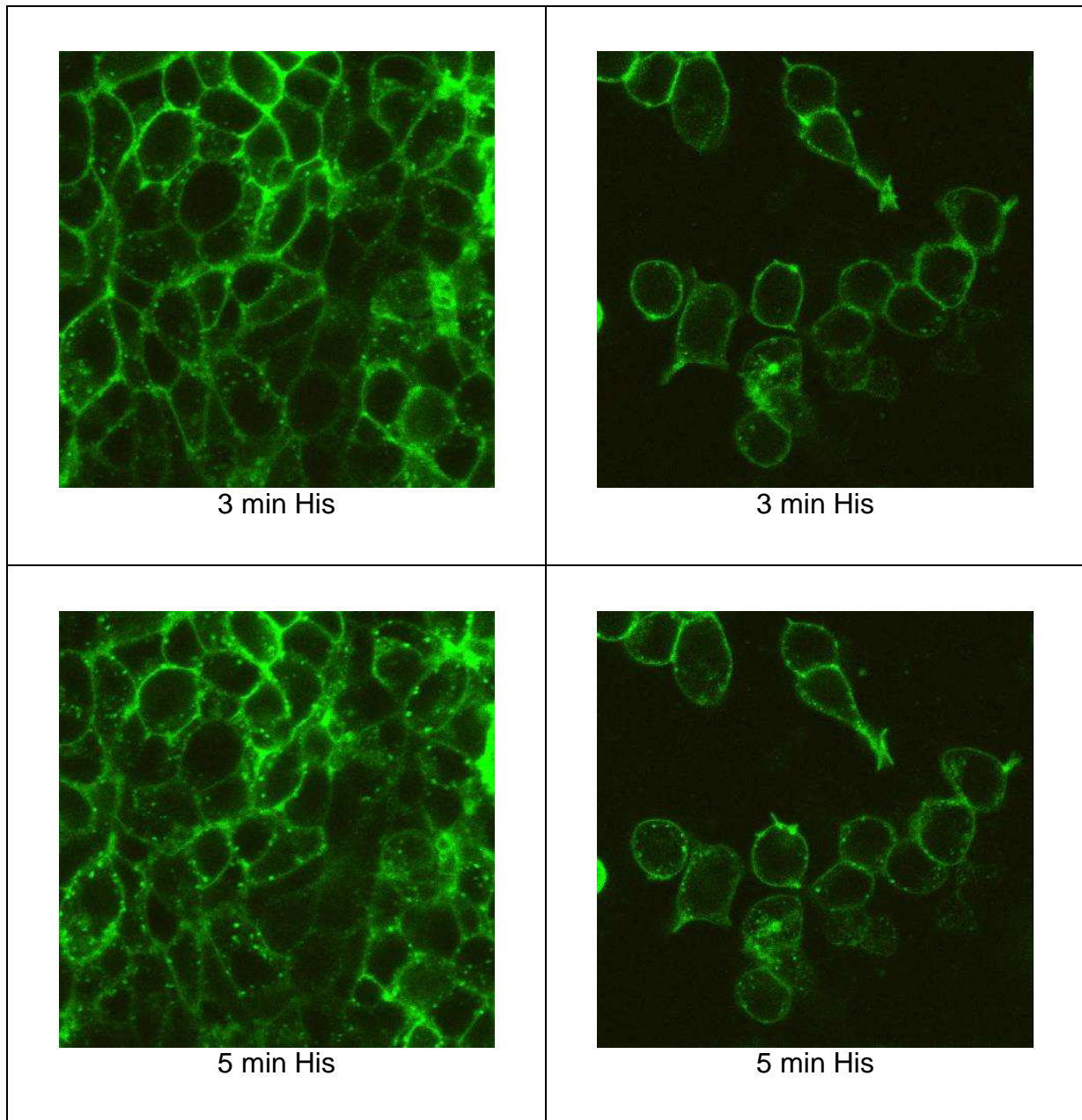
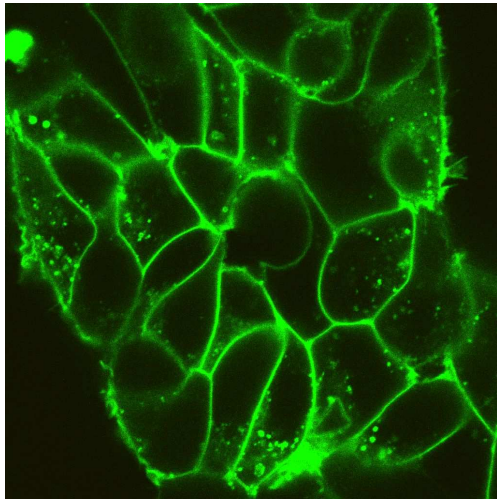
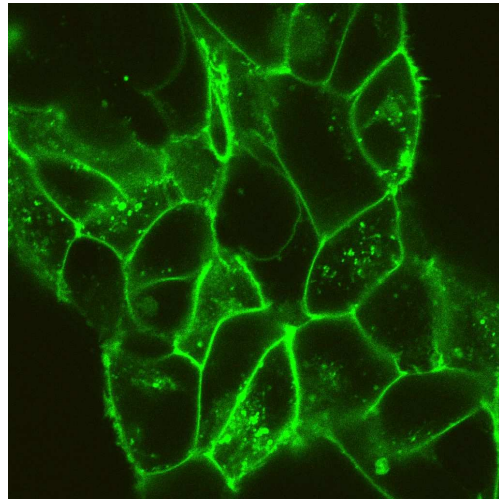


Abbildung 5-5 Internalisierung des Histamin H1 Rezeptors im LSM

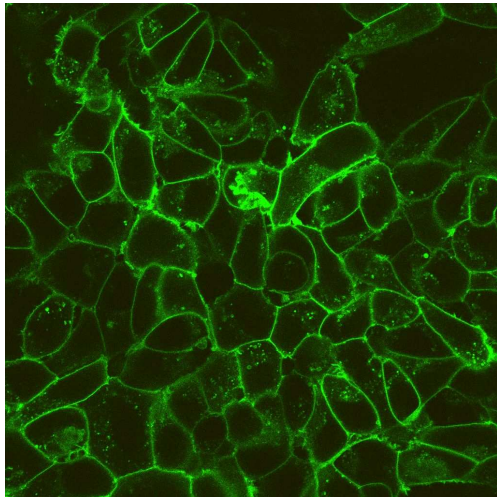
Diese Abbildung zeigt den humanen Histamin H1 Rezeptor links im Vergleich zum equinen Histamin H1 Rezeptor rechts in zeitlicher Reihenfolge vom Ausgangszustand (0 min) und nach 1-; 3- und 5minütiger Histaminstimulation (1 μ mol/l). Die Bilder wurden bei 37°C und 5 % CO₂-Begasung erstellt.



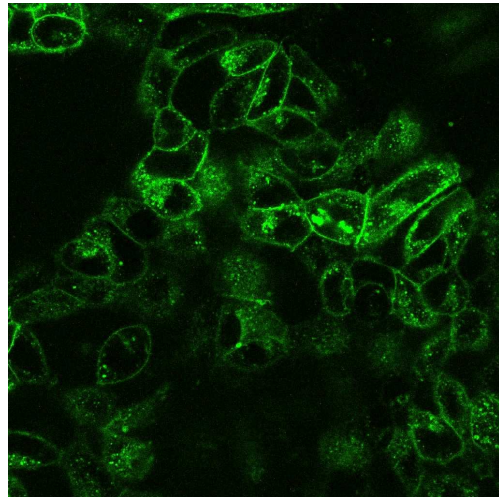
eH1 0 min



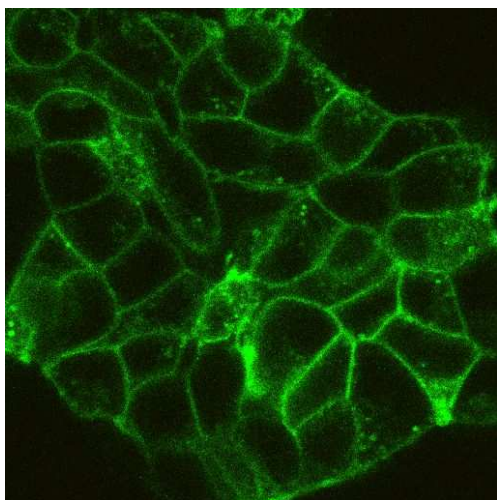
10 min His



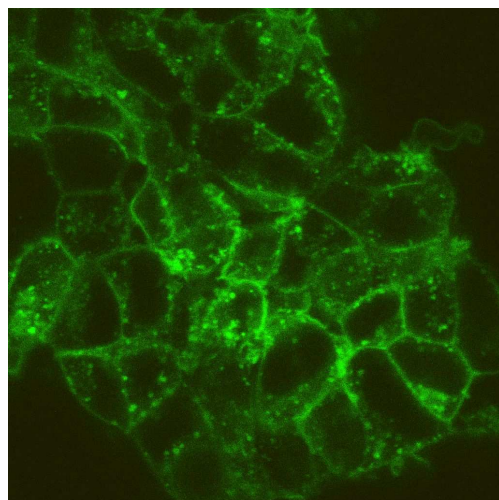
eH1 0 min



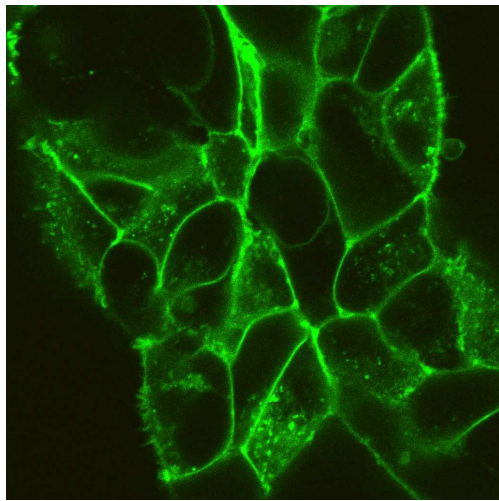
10 min His



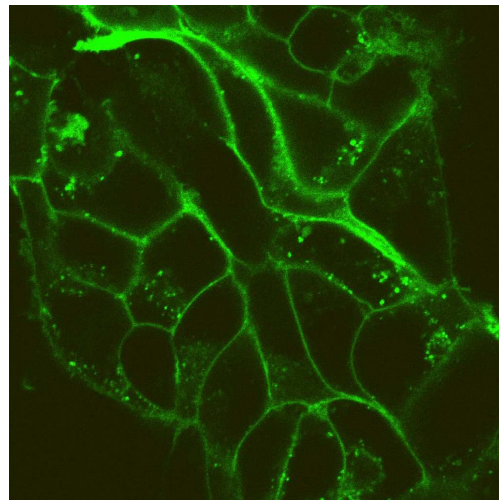
hH1 0 min



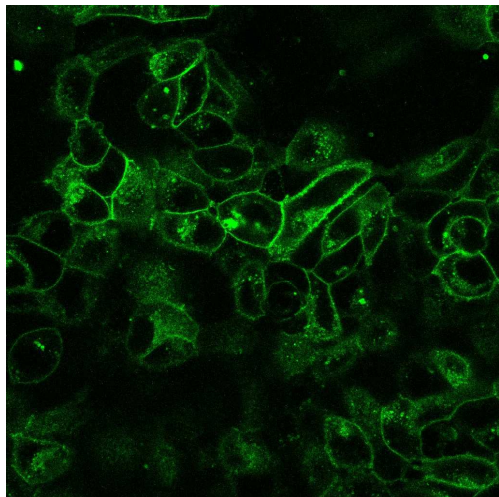
10 min His



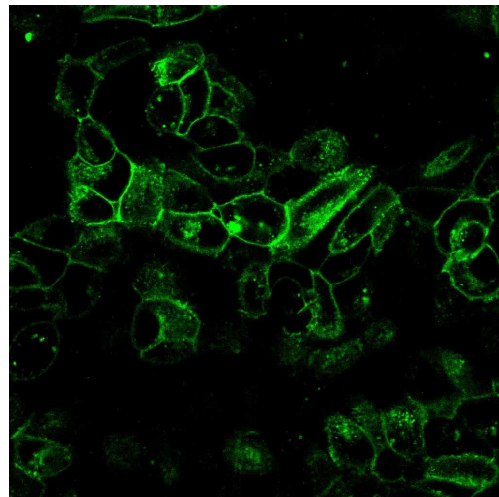
eH1 10 min ausgewaschen



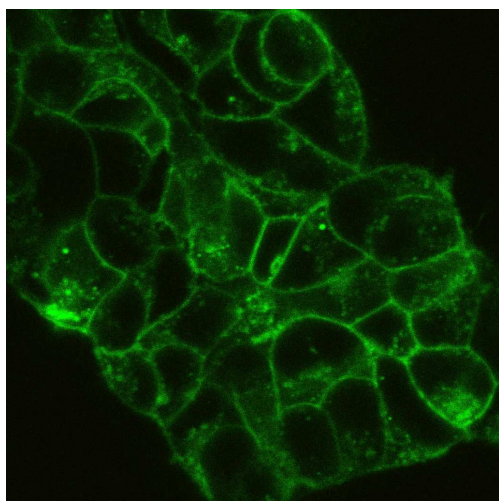
20 min ausgewaschen



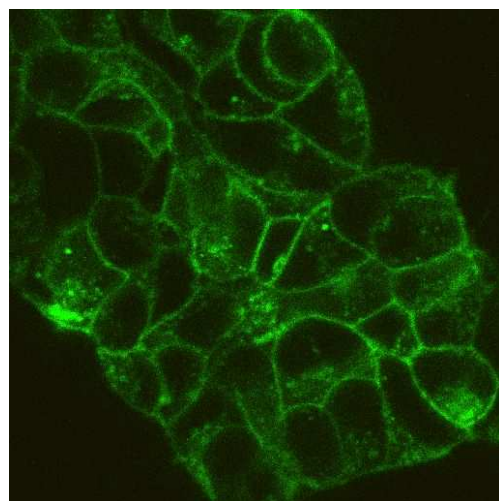
eH1 10 min DPH



20 min DPH



hH1 10 min DPH



20 min DPH

Abbildung 5-6 Recycling des Histamin H1 Rezeptors im LSM

Dargestellt ist das Recycling des eH1 nach dem Auswaschen des Agonisten mit Medium (obere Reihe) und nach Zugabe des inversen Agonisten Diphenhydramin (DPH) in der Konzentration von 10 µmol/l (mittlere Reihe) im Vergleich mit dem hH1 nach Zugabe von Diphenhydramin (untere Reihe).

5.2 Rezeptor G-Protein-Interaktion

Nach Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors kommt es zur Dissoziation der G α - und G $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Dabei bindet Guanosintriphosphat (GTP) an die G α -Untereinheit. Besitzt dieses ein γ -[³⁵S]Thio-triphosphat, kann GTP nicht mehr durch die intrinsische GTPase-Aktivität zu GDP (Guanosindiphosphat) hydrolysiert werden. Deshalb kann die Zahl der pro Zeiteinheit aktivierten G-Proteine mit einer GTP γ ³⁵S-Bestimmung gemessen werden. Hieraus kann die Potenz und die Effizienz eines Liganden zum Rezeptor abgeleitet und damit auf seine Funktionalität geschlossen werden. In der folgenden Darstellung wird die Regulation der Basalaktivität nach Aktivierung oder Inhibition von Histamin H1 Rezeptoren mit einem Agonisten bzw. mehreren inversen Agonisten dargestellt.

Der humane Histamin H1 Rezeptor zeigt erwartungsgemäß eine Aktivierung der G-Proteine nach Stimulation mit dem Agonisten Histamin. Alle eingesetzten inversen Agonisten koppeln dagegen den Rezeptor vom G-Protein ab bzw. begünstigen die abgekoppelte Form des Rezeptors. Pylramin hat kaum einen Effekt auf die Bindung von GTP γ ³⁵S an Zellmembranen von HEK-hH1. Alle Antihistaminika besitzen somit inverse Aktivität, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung am humanen Histamin H1 Rezeptor. Die basale Aktivität der G-Proteine ist beim hH1 um etwa die Hälfte höher als beim eH1.

Im Gegensatz zum hH1 führt die Aktivierung des equinen Histaminrezeptors mit Histamin zu einer Abkopplung von seinen G-Proteinen. Darüber hinaus stimuliert der inverse Agonist Diphenhydramin die G-Protein Kopplung. Alle anderen getesteten Antihistaminika bewirken dagegen auch am eH1 eine Abkopplung der G-Proteine. Diphenhydramin, das eigentlich einen inversen Agonisten darstellt, verhält sich in HEK-eH1-Zellen als partieller Agonist.

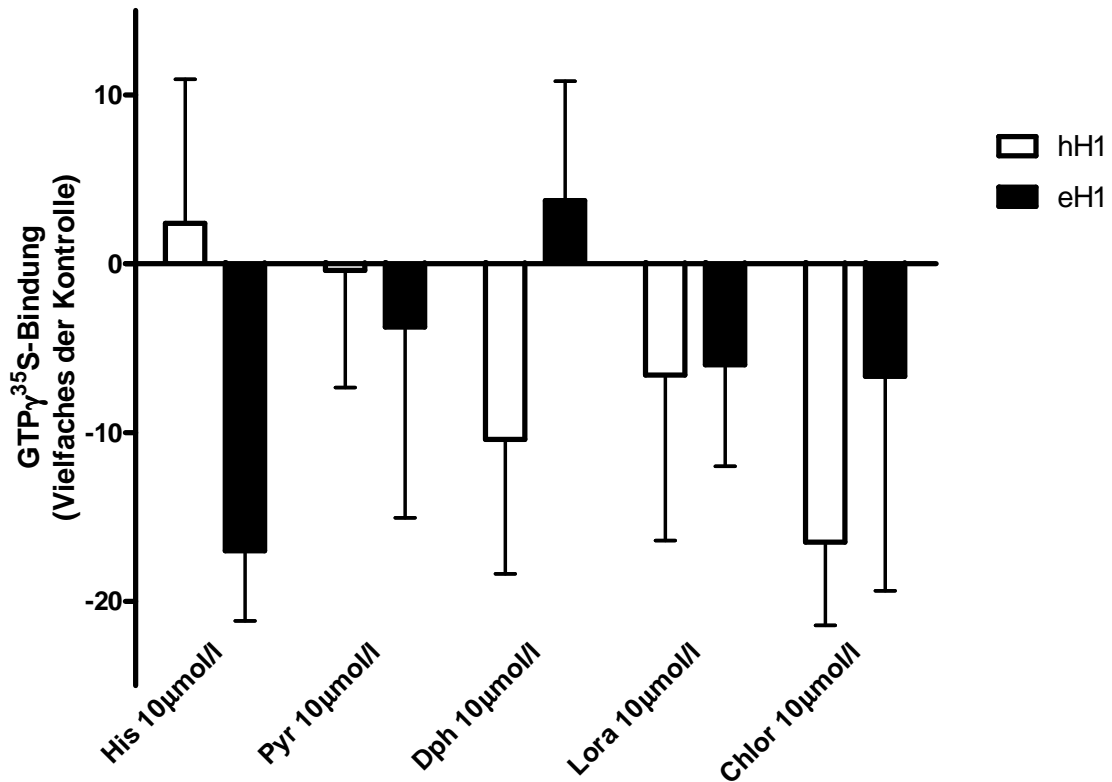
Bestimmung der G-Protein-Aktivierung mithilfe der $GTP\gamma^{35}S$ -Bindung

Abbildung 5-7 Abbildung 2-7 G-Protein-Kopplung in HEK-hH1/eH1-Zellen

Isolierte Plasmamembranen wurden in Anwesenheit von $0,1 \text{ nmol/l } GTP\gamma^{35}S$ für 30 min bei 25°C im Wasserbad inkubiert. Wiederum auf Eis gestoppt wurden die Proben über GF/B Filter vom ungebundenen $GTP\gamma^{35}S$ abgetrennt und anschließend unter Zugabe von Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler gemessen. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte \pm SEM von 4-5 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen in Dreifachbestimmung dar.

5.3 Umverteilung von G-Protein gekoppelter Rezeptorkinase 2 und β -Arrestin 1

G-Protein gekoppelte Rezeptoren werden nach Aktivierung durch einen Agonisten phosphoryliert, desensibilisiert und internalisiert. Dieser Vorgang wird durch cytosolische Proteine vermittelt, die nach Rezeptoraktivierung an die Zellmembran translozieren. Dort wird der Rezeptor von Vertretern der Familie der G-Protein

gekoppelten Rezeptorkinasen phosphoryliert, wodurch die Bindung von weiteren cytosolischen Proteinen wie den Arrestinen ermöglicht und die Endocytose eingeleitet wird. In HEK 293-Zellen trägt die Umverteilung von GRK 2 und β -Arrestin 1 wesentlich zur Charakterisierung der Regulation des Histamin H1 Rezeptors bei.

In dieser Arbeit wurden die Zellen mit Histamin, dem inversen Agonisten Diphenhydramin und einer Kombination beider Liganden für 7 min im Brutschrank behandelt. Die Aktivierung des Rezeptors wurde auf Eis gestoppt und nach Isolierung der Plasmamembran konnte der Gehalt von GRK 2 und β -Arrestin 1 im Western Blot bestimmt werden. Die Auswertung der Immunreaktivität erfolgte am Densitometer.

5.3.1 Umverteilung von GRK 2

Mithilfe eines spezifischen Antikörpers wurde die Umverteilung der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinase 2 an die Plasmamembran bestimmt. Hierbei wurde bei HEK-hH1-Zellen nach 7 Minuten Histaminstimulation (10 $\mu\text{mol/l}$) eine Abnahme der GRK 2 um etwa 20 % der Ausgangsaktivität gemessen. Bei der Stimulation mit Diphenhydramin (100 $\mu\text{mol/l}$) allein konnte keine Eigenwirkung, aber eine Blockierung der histaminvermittelten Umverteilung beobachtet werden.

Auch der equine Histamin H1 Rezeptor induziert eine Abnahme der GRK 2 um etwa 20 % nach Agonistenstimulation. In Anwesenheit des inversen Agonisten Diphenhydramin ist eine leichte Reduktion der GRK-Menge erkennbar. Außerdem kann die durch Histamin induzierte Abdissoziation von GRK 2 nicht vollständig aufgehoben werden.

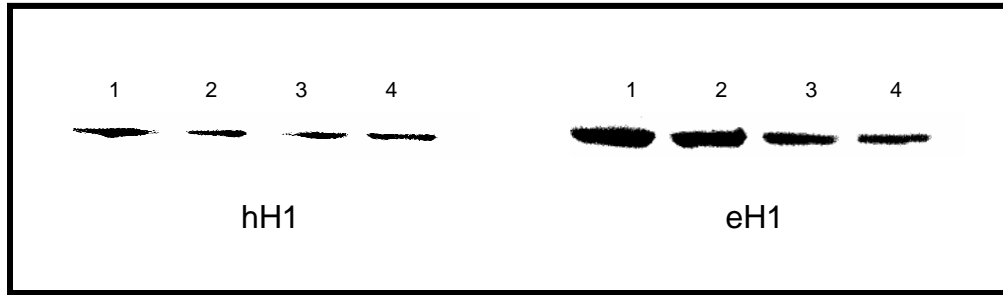


Abbildung 5-8 Darstellung der GRK 2 Umverteilung im Western Blot

Repräsentativer Western Blot von Membranen aus HEK-hH1/eH1-Zellen, die wie folgt vorbehandelt wurden:

- 1) Kontrolle (CN)
- 2) Histaminstimulation (10 µmol/l)
- 3) Diphenhydramin (100 µmol/l)
- 4) Diphenhydramin + Histamin

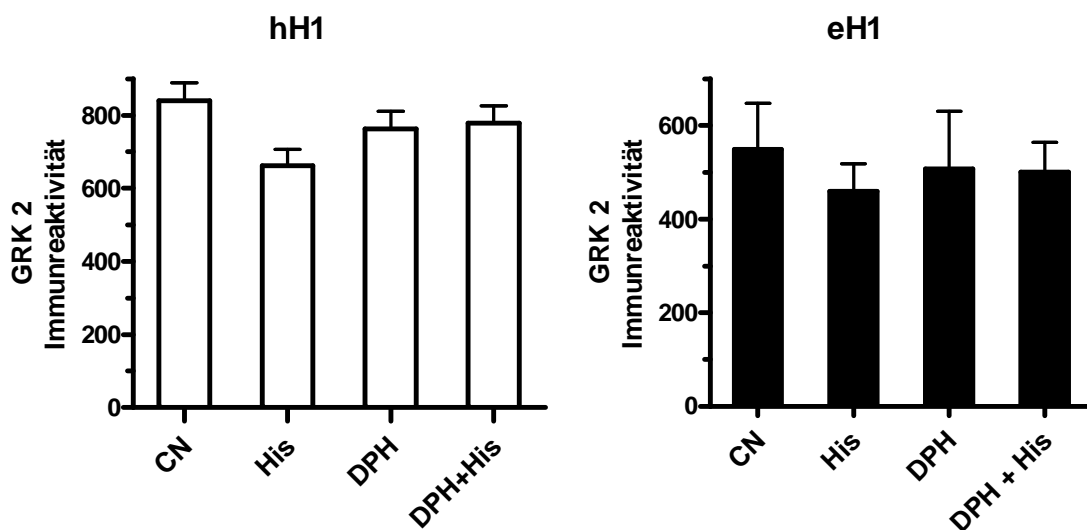


Abbildung 5-9 GRK 2 Umverteilung

Diese Abbildung stellt die Mittelwerte \pm SEM aus der densitometrischen Auswertung der Immunreaktivität aus mindestens drei, unabhängigen Versuchen dar.

5.3.2 Umverteilung von β -Arrestin 1

Entsprechend der GRK 2 wurde auch die Umverteilung des β -Arrestin 1 an die Zellmembran mithilfe des Western Blots bestimmt.

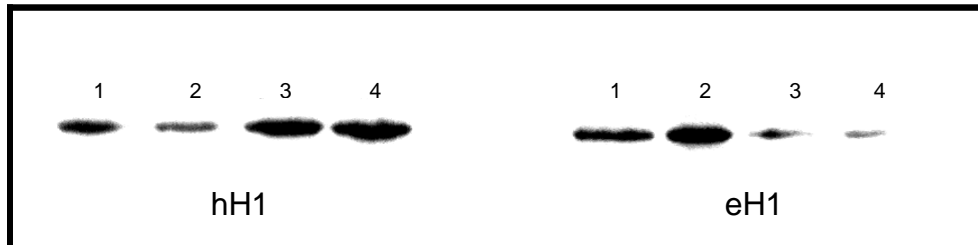


Abbildung 5-10 Darstellung der β -Arrestin 1 Umverteilung im Western Blot

Repräsentativer Western Blot von Membranen aus HEK-hH1/eH1-Zellen, die wie folgt behandelt wurden:

- 1) Basalwert
- 2) Histaminstimulation (10 $\mu\text{mol/l}$)
- 3) Diphenhydraminbehandlung (100 $\mu\text{mol/l}$)
- 4) Diphenhydramin + Histamin

Nach Aktivierung des humanen Histamin H1 Rezeptors dissoziiert β -Arrestin 1 von der Membran ab (30 % Abnahme). Dagegen rekrutiert der equine Histamin H1 Rezeptor nach Stimulation mit einem Agonisten β -Arrestin 1 an der Plasmamembran (20 % Zunahme). Nach Inkubation der HEK-hH1-Zellen mit einem inversen Agonisten erfolgt eine Anreicherung von β -Arrestin 1 an die Plasmamembran (10 % Zunahme), während in HEK-eH1-Zellen eine Abnahme um 25 % des β -Arrestin 1 induziert wird. Diphenhydramin besitzt demnach einen hemmenden Effekt auf die Arrestinumverteilung.

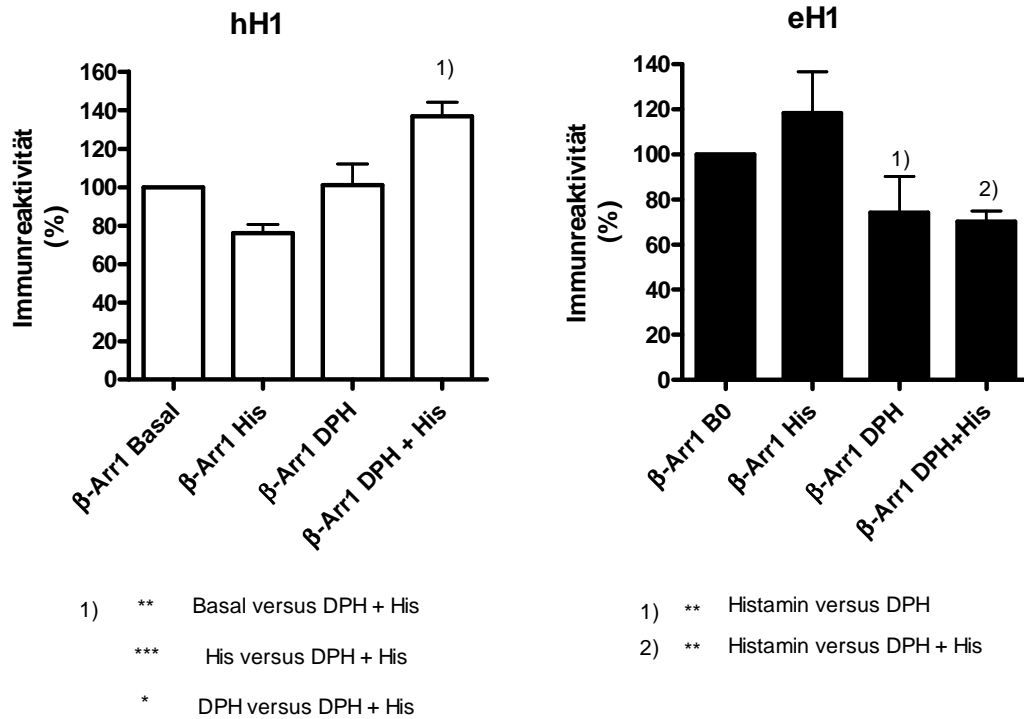


Abbildung 5-11 β-Arrestin 1 Umverteilung

Die Abbildung basiert auf den Mittelwerten aus der densitometrischen Auswertung von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die signifikanten Unterschiede wurden im „Anova“-Test berechnet:

- * signifikant, P-Wert: 0,01 – 0,05
- ** sehr signifikant, P-Wert: 0,001 – 0,01
- *** extrem signifikant, P-Wert: < 0,001

5.3.3 Rekrutierung von β -Arrestin 1 im konfokalen LSM

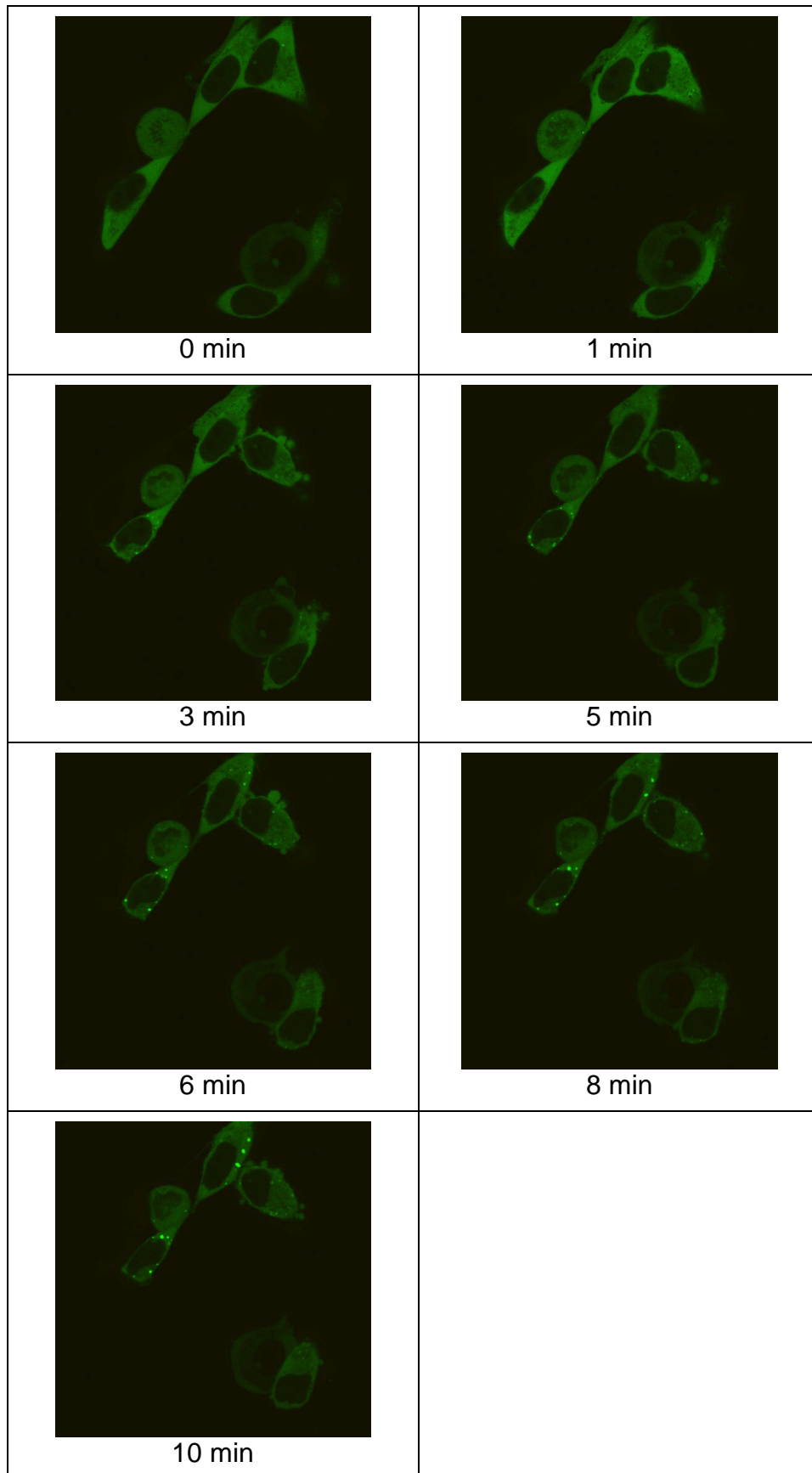


Abbildung 5-12 β -Arrestin 1 Umverteilung im LSM

Diese Bilderfolge zeigt HEK-eH1, transfiziert mit β -Arrestin 1-EGFP nach Stimulation mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Histamin.

Das Fusionsprotein β -Arrestin 1-EGFP ist im ersten Bild gleichmäßig im Cytosol verteilt. Deutlich zu erkennen ist, wie sich bereits 1 Minute nach Aktivierung des Rezeptors β -Arrestin 1-EGFP aus dem Cytosol an der Plasmamembran anreichert, wodurch die Fluoreszenz im Cytosol abnimmt. Nach 5 bis 10 Minuten werden die vereinzelt β -Arrestin 1-EGFP Fusionsproteine in der Zellmembran eindeutig sichtbar.

5.4 Effektorensysteme

5.4.1 Extrazellulär signalregulierte Proteinkinasen 1 und 2

Über Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPKinasen) werden vielfältige Zellfunktionen wie Proliferation, Hypertrophie, Migration und Apoptose reguliert. Somit kann ein direkter Zusammenhang zwischen G-Protein-Aktivierung und der Zellphysiologie abgeleitet werden.

Die Regulation der ERK 1 und 2 nach Behandlung mit Histamin und diversen Antihistaminika ist in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit phosphospezifischen Antikörpern nachweisbar. Als Kontrolle dient dazu die Bestätigung der Anwesenheit vergleichbarer ERK 1/2 Mengen, die in denselben Proben mit einem nicht-phosphospezifischen Antikörper dargestellt werden. Mithilfe dieser Methode konnten deutliche Unterschiede in der Regulation der ERK 1/2 durch die beiden zu untersuchenden Rezeptoren nachgewiesen werden. Während der equine Histamin H1 Rezeptor nur nach Histaminstimulation eine starke Aktivierung der ERK 1/2 induziert, aktiviert der humane Histamin H1 Rezeptor auch über Antihistaminika diese Tyrosinkinasen.

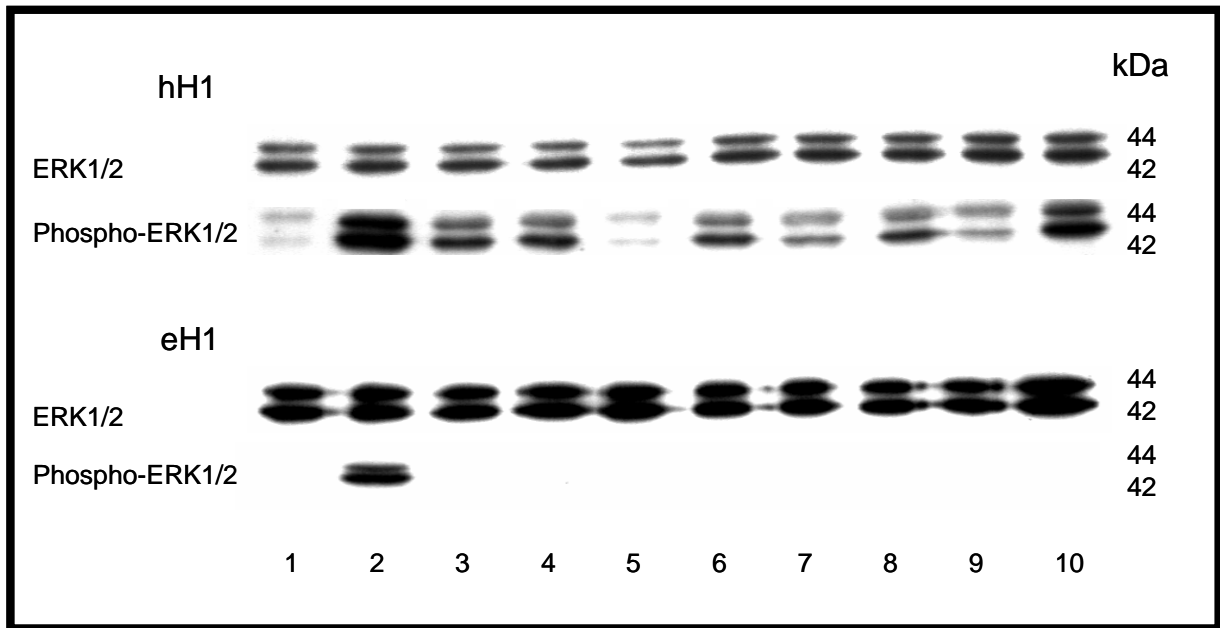


Abbildung 5-13 MAPKinase im Western Blot

Repräsentativer Versuch an HEK-hH1/eH1 aus mindestens drei, voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten:

- 1) Kontrolle (CN)
- 2) Histamin
- 3) Histamin + Pyrilamin
- 4) Pyrilamin
- 5) Diphenhydramin
- 6) Diphenhydramin + Pyrilamin
- 7) Loratadin
- 8) Loratadin + Pyrilamin
- 9) Chlorpheniramin
- 10) Chlorpheniramin + Pyrilamin

In HEK-hH1-Zellen ist bereits unter basalen Bedingungen eine leichte Aktivität der ERK 1/2 zu beobachten. Die Zugabe von Histamin führt in diesen Zellen zu einer besonders starken Phosphorylierung der ERK 1/2. Diese Stimulation wird durch die Anwesenheit von Pyrilamin fast vollkommen aufgehoben. Pyrilamin induziert allein eine leichte Aktivierung der ERK 1/2. Auch die anderen Antihistaminika Loratadin und Chlorpheniramin zeigen alleine nur eine geringe Aktivierung der MAPK, die sich in Anwesenheit eines molaren Überschusses an Pyrilamin leicht erhöht. Diphenhydramin dagegen hat keinen Effekt auf die basale Aktivität.

In HEK-eH1-Zellen ist keine basale Aktivität nachweisbar. Die durch Histamin induzierte MAPKinase Aktivität wird in Anwesenheit von Pyrilamin wieder vollkommen geblockt, so dass hier wie beim Kontrollwert und allen anderen mit Antihistaminika behandelten Ansätzen keine Phosphorylierung messbar ist.

Die Unterschiede in der basalen und durch Antihistaminika induzierten ERK 1/2 Aktivität weisen darauf hin, dass der humane Histamin H1 Rezeptor sehr viel stärker an die Regulation der MAPKinase gekoppelt ist als der equine Rezeptor.

MAPKinase Stimulation in HEK-hH1

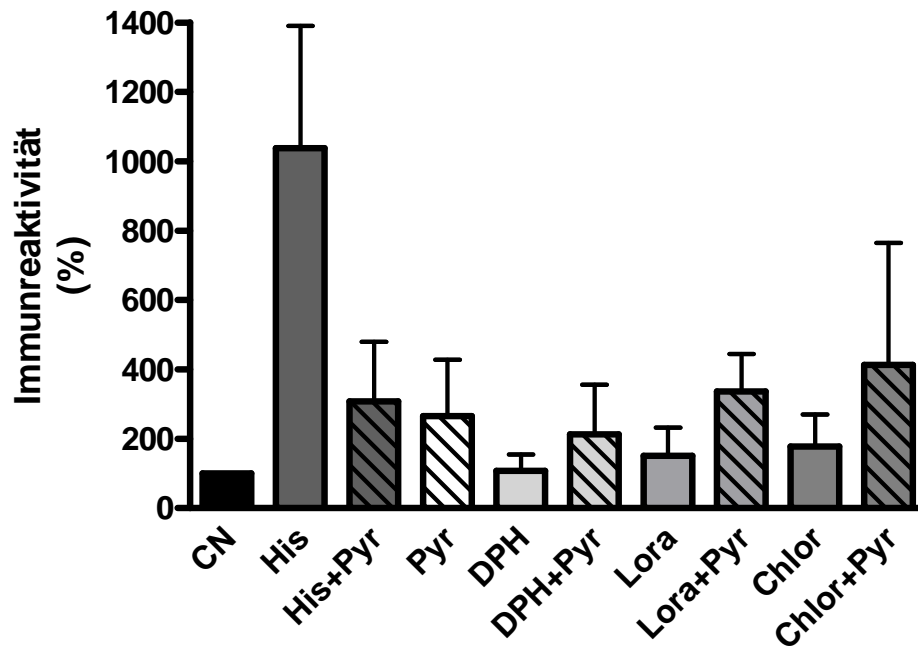


Abbildung 5-14 Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Stimulation

Die graphische Darstellung der MAPK-Stimulation von HEK-hH1 erfolgte durch Mittelwerte und Standardfehler nach densitometrischer Auswertungen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Schraffierung stellt die Pyrilaminbehandlung dar.

5.4.2 Adenylatcyclase

Histamin H1 Rezeptoren können über eine Aktivierung der G-Protein-Untereinheit $G_{\alpha_{q/11}}$ die Phospholipase C stimulieren, die eine Hydrolyse von Phosphatidylinositolbiphosphat zu Inositoltriphosphat ($InsP_3$) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert. Damit wird eine PKC-abhängige Signalkaskade eingeleitet. Das nachfolgend freigesetzte Calcium (Ca^{2+}) kann dabei bestimmte Isoformen der Adenylatcyclase aktivieren und somit den Substratumsatz von ATP zu cAMP induzieren. Andererseits wird auch ein alternativer Signalweg über die G_{α_s} -Untereinheit beschrieben. In diesem Fall wird die Adenylatcyclase direkt vom G-Protein aktiviert.

Um den Signalweg in HEK-hH1/eH1-Zellen besser zu verstehen, wurden mithilfe verschiedener Substanzen die intrazellulären Regulationsmechanismen stimuliert und inhibiert.

5.4.2.1 Aktivität der Adenylatcyclase an isolierten Plasmamembranen

Die Regulation der Adenylatcyclase (AC) kann über den direkten Substratumsatz von ATP zu cAMP oder über die Akkumulation von cAMP in intakten Zellen bestimmt werden.

In HEK-Zellen sind die Adenylatcyclasen I, II, III, V, VI, VII und IX vorhanden. Die Stimulation kann entweder über G_{α_s} oder den von G_i - bzw. $G_{q/11}$ freigesetzten $\beta\gamma$ -Untereinheiten vermittelt werden (MARUKO et al. 2005). Die stimulierte Aktivität kann dabei isoformspezifisch über eine Vielzahl von sekundären Regulatoren beeinflusst werden (DEFER et al. 2000).

Die Aktivität der Adenylatcyclase wurde zuerst an isolierten Plasmamembranen untersucht, um eine direkte Regulation der AC über G_s oder $G\beta\gamma$ ohne Beteiligung intrazellulärer, sekundärerer Regulatoren zu erfassen.

Dosis-Wirkungskurve von Histamin an isolierten Plasmamembranen

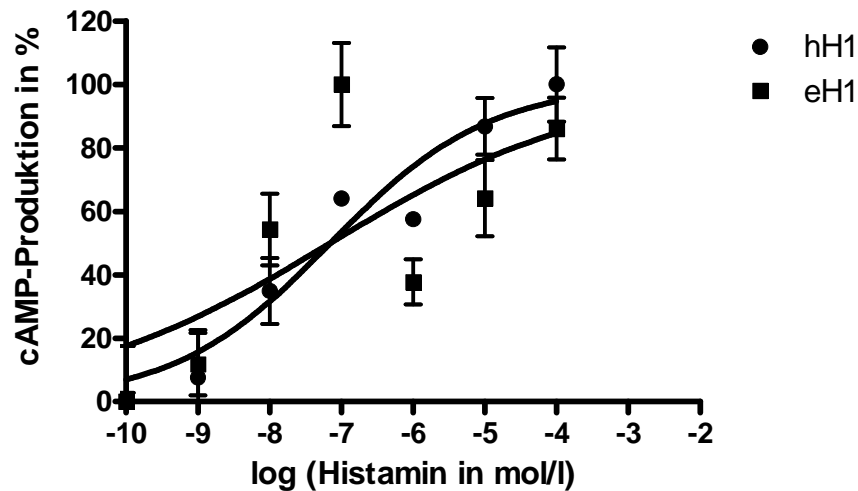


Abbildung 5-15 AC-Assay

Diese Abbildung zeigt einen repräsentativen Versuch die Adenylatcyclase in isolierten Plasmamembranen von HEK-hH1/eH1 zu stimulieren. Die Membranpräparation und der Versuchsablauf erfolgten wie in Materialien und Methoden beschrieben.

Die Aktivierung des Histamin H1 Rezeptors mit aufsteigenden Konzentrationen von Histamin (1, 10 und 100 nmol/l; 1, 10 und 100 µmol/l) führt zu einer dosisabhängigen Stimulation der AC-Aktivität.

Die absoluten Messwerte ergaben allerdings bei beiden Rezeptoren eine cAMP-Produktion um lediglich das zweifache. Die EC_{50} ist für beide Rezeptoren ebenfalls vergleichbar, so liegt diese für den hH1 bei 83,3 nmol/l und für den eH1 bei 51,5 nmol/l. Die EC_{50} beschreibt diejenige Konzentration des Liganden, die einen halbmaximalen Effekt auslöst.

5.4.2.2 Intrazelluläre cAMP-Akkumulation

Im Gegensatz zur Bestimmung der AC-Aktivität in Plasmamembranen führt die Aktivierung des eH1 im Vergleich zu der vom hH1 zu einer etwa 20fach stärkeren Stimulation der cAMP-Produktion. Die Auswertung der Dosis-Wirkungskurve ergibt für den hH1 eine EC_{50} von 0,598 µmol/l, für den eH1 eine EC_{50} von 4,087 µmol/l. Somit benötigt der eH1 eine wesentlich höhere Konzentration von Histamin, um seinen halbmaximalen Effekt auf die Adenylatcyclase zu entfalten. Gleichzeitig ist

aber seine Wirkung auf die Menge des produzierten cAMP um ein Vielfaches höher als die vom humanen Histamin H1 Rezeptor (20 versus 2fache Stimulation).

Dosis-Wirkungskurve von Histamin an intakten Zellen

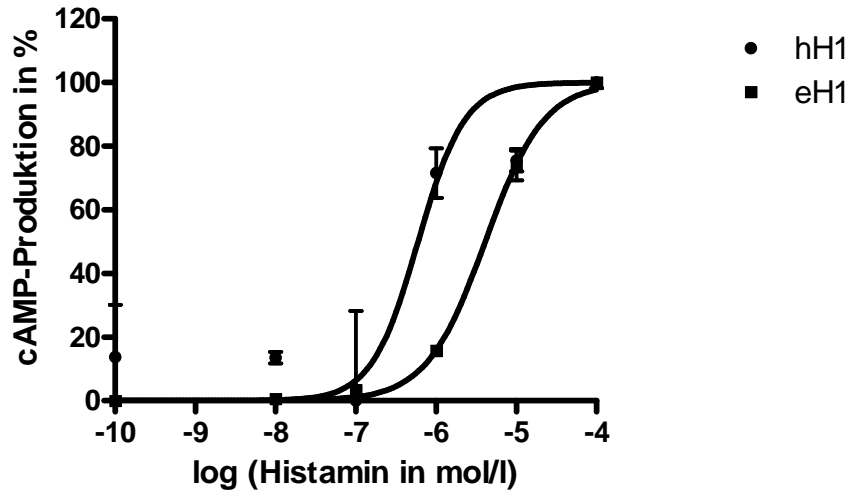


Abbildung 5-16 Dosis-Wirkungskurve im Zelllysate

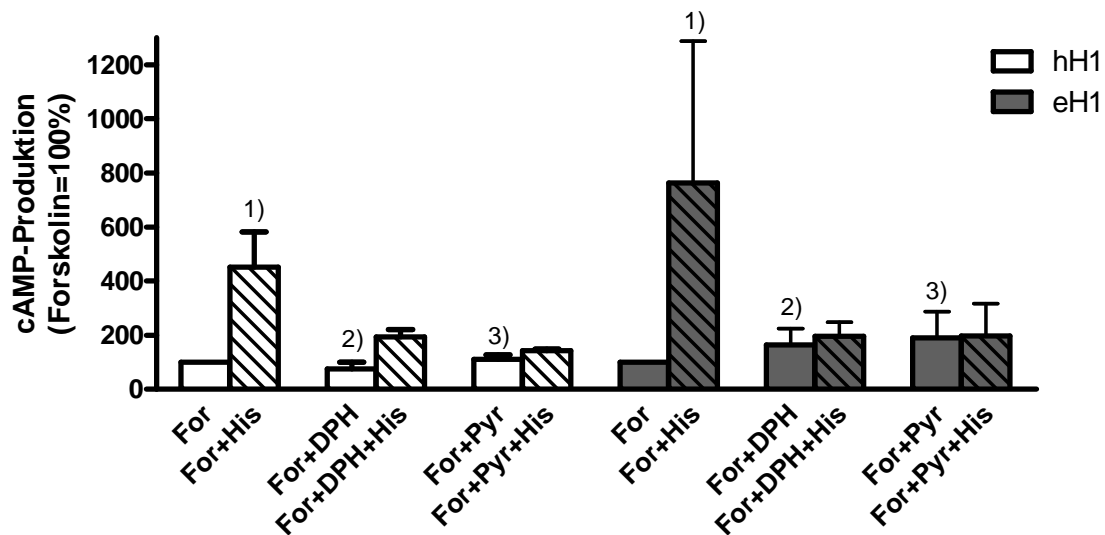
Nach Anzucht der Zellen auf Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen wurden diese im Versuchsmedium (HEPES+IBMX) mit aufsteigenden Konzentrationen von Histamin (10 und 100 nmol/l; 1, 10 und 100 μ mol/l) im Wasserbad bei 37°C inkubiert, auf Eis mit HCL gestoppt, acetyliert und im Zellüberstand der cAMP-Gehalt im ELISA (s. Materialien und Methoden) bestimmt. Die oben dargestellte Abbildung zeigt einen repräsentativen von insgesamt drei Versuchen.

5.4.2.3 Regulation der intrazellulären cAMP-Akkumulation durch Antihistaminika

Zur weiteren Untersuchung der vom equinen Histamin H1 Rezeptor induzierten starken Aktivierung der Adenylatcyclase wurde die Akkumulation von cAMP in Anwesenheit von Antihistaminika bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit Forskolin (1 μ mol/l) stimuliert und anschließend mit den Antihistaminika alleine oder in Kombination mit Histamin behandelt. Auch in Anwesenheit von Forskolin stimuliert Histamin die cAMP-Produktion über den equinen Rezeptor wesentlich stärker als über den humanen. Die Antihistaminika Diphenhydramin und Pyrilamin hemmen bei beiden Rezeptoren die durch Histamin induzierte cAMP-Produktion, zeigen aber

auch alleine eine im Vergleich zur Kontrolle leichte Anreicherung von cAMP. In diesem Experiment zeigen beide Antihistaminika daher leichte agonistische Aktivität.

cAMP-Akkumulation in Anwesenheit von Diphenhydramin und Pyrilamin



- 1) * Forskolin versus Forskolin+Histamin
 2) * Forskolin+Histamin versus Forskolin+Diphenhydramin
 3) * Forskolin+Histamin versus Forskolin+Pyrilamin

Abbildung 5-17 cAMP-Akkumulation in Anwesenheit von Antihistaminika

Vorbereitung und Versuchsdurchführung erfolgten wie bereits oben beschrieben. Die Behandlung wurde mit den Antihistaminika Diphenhydramin und Pyrilamin (100 $\mu\text{mol/l}$) und mit Histamin in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ durchgeführt. Die Schraffierung deutet die Histaminstimulation an.

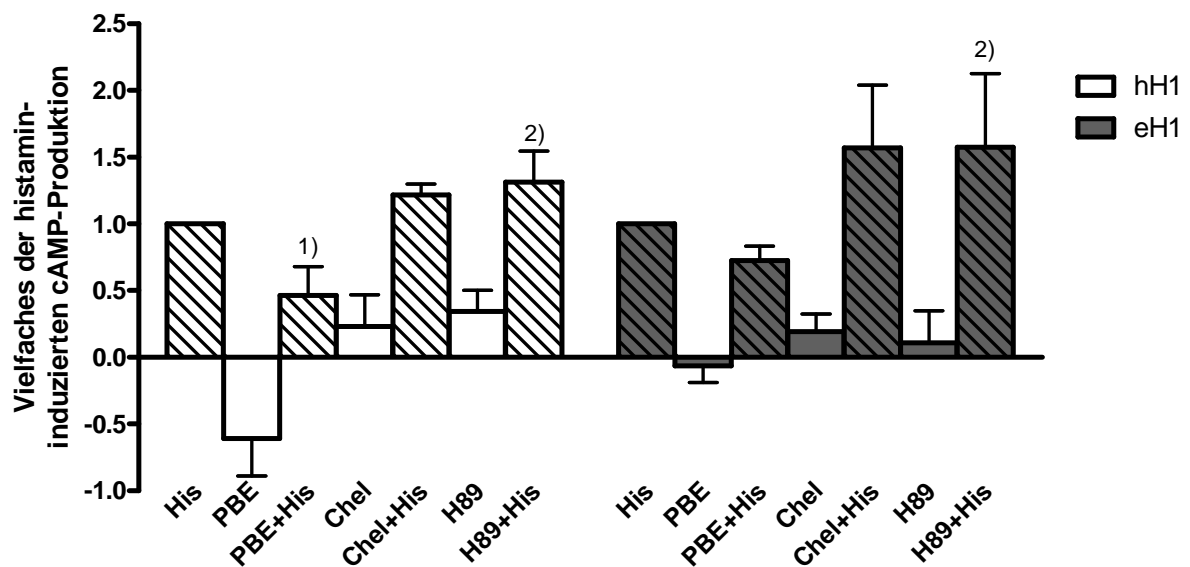
* signifikant, P-Wert: 0,01 – 0,05

5.4.2.4 Einfluss der Proteinkinase C und A auf die histamininduzierte cAMP-Produktion

Um die Ursache für die starke cAMP-Produktion durch den equinen Histamin H1 Rezeptor aufzuklären, wurde der Einfluss der beiden für den Histamin H1 Rezeptor beschriebenen Signalwege untersucht. Dazu wurde in einem ersten Schritt die Proteinkinase C (PKC), die über die Phospholipase C (PLC) die Hydrolyse von Phosphatidylinositolbiphosphat zu InsP_3 und DAG katalysiert, entweder

rezeptorunabhängig aktiviert oder inhibiert. Außerdem wurde der Einfluss der Proteinkinase A (PKA) auf die Adenylatcyclase durch Aktivatoren und Inhibitoren studiert. Beide Proteinkinasen beeinflussen einige der in HEK-Zellen vorhandenen Isoformen der Adenylatcyclase und können somit Hinweise auf ihre Beteiligung an der histaminvermittelten Stimulation der cAMP-Produktion in intakten Zellen liefern. Die PKC wurde mit Phorbol ester (PBE; 10 $\mu\text{mol/l}$) stimuliert und mit Chelerythrin (10 $\mu\text{mol/l}$) inhibiert. Die Aktivität der PKA wurde entsprechend mit Dibutyryl-cAMP (dBcAMP, 1 mmol/l) und H 89 (10 $\mu\text{mol/l}$) reguliert.

Einfluss der PKC und PKA auf die cAMP-Akkumulation



1) * PBE versus PBE+Histamin

2) * H89 versus H89+Histamin

Abbildung 5-18 Regulation der histamininduzierten cAMP-Akkumulation durch PKC und PKA

In einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ wurden die beiden Zelllinien für 15 min mit den jeweiligen Aktivatoren und Inhibitoren der Proteinkinasen vorbehandelt und anschließend die cAMP-Produktion in Ab- oder Anwesenheit von Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$) stimuliert (Schraffierung). Die Abbildung zeigt den Mittelwert \pm SEM von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Das Experiment wurde mit zehnfach höheren Konzentrationen der Proteinkinasestimulatoren und -inhibitoren mit quantitativ vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

* signifikant, P-Wert: 0,01 – 0,05

Die Aktivierung der PKC über PBE (10 $\mu\text{mol/l}$) führt sowohl in HEK-hH1 als auch in HEK-eH1-Zellen zu einer Hemmung der basalen cAMP-Akkumulation. Auch eine zusätzliche Stimulation der AC mit Histamin wird in beiden Zellklonen gehemmt, jedoch bei hH1 wesentlich stärker als bei eH1. Dagegen führt die Hemmung der PKC mit Chelerythrin (10 $\mu\text{mol/l}$) zu einer Verstärkung der histaminvermittelten Stimulation der cAMP-Akkumulation. Dieser Effekt ist in HEK-hH1-Zellen nur leicht und in HEK-eH1-Zellen dagegen deutlich ausgeprägt.

Nach Aktivierung der PKA mit dBcAMP (100 $\mu\text{mol/l}$) kommt es beim humanen und equinen Histamin H1 Rezeptor zu einer knapp 40fachen Zunahme der basalen und Histamin stimulierten cAMP-Akkumulation (nicht dargestellt). Der PKA Inhibitor H 89 (10 $\mu\text{mol/l}$) besitzt in beiden Zellklonen einen stimulatorischen Effekt auf die Histamin induzierte cAMP-Akkumulation, der bei HEK-eH1-Zellen sehr deutlich ausgeprägt ist. Somit sind beide Proteinkinasen an der Signaltransduktion der beiden Histamin H1 Rezeptoren beteiligt. Die stimulierenden Effekte nach Hemmung der Proteinkinase C und A sind jedoch beim equinen Histaminrezeptor deutlicher ausgeprägt.

5.4.2.5 Einfluss der Phospholipase C auf die histamininduzierte cAMP-Produktion

Da die PKC in der Signalkaskade erst von DAG aktiviert wird, ist es noch von Interesse, die Rolle der vorgeschalteten Phospholipase C zu untersuchen. Die Funktion der PLC wurde entweder mit dem spezifischen Inhibitor U 73122 (10 $\mu\text{mol/l}$) gehemmt oder mit dem spezifischen Aktivator m-3M3FBS (25 $\mu\text{mol/l}$) stimuliert. Mit beiden Substanzen wurden die Zellen für je 15 Minuten im Wasserbad vorbehandelt und anschließend die histaminvermittelte Aktivierung der cAMP-Produktion bestimmt.

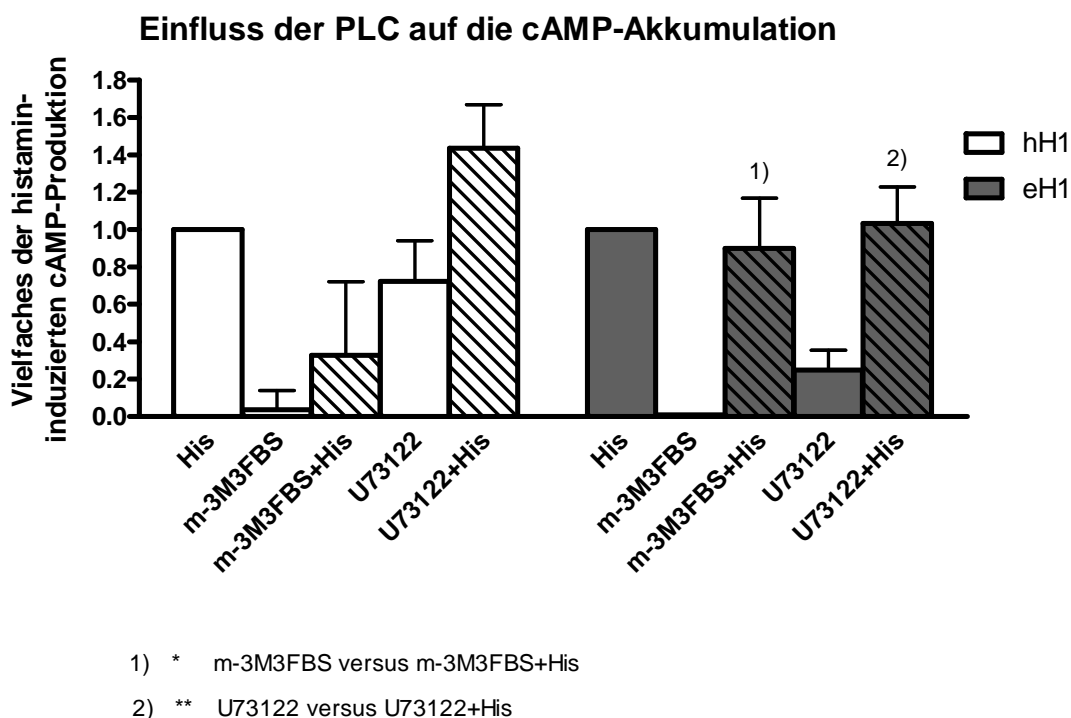


Abbildung 5-19 Einfluss der PLC auf die histamininduzierte cAMP-Akkumulation

Die beiden Zelllinien wurden für 15 min mit dem PLC-Aktivator und -Inhibitor vorbehandelt und anschließend die cAMP-Produktion in Ab- oder Anwesenheit von Histamin (100 $\mu\text{mol/l}$) stimuliert (Schraffierung). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Der PLC-Aktivator wurde in einer Endkonzentration von 25 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt, der PLC-Inhibitor von 10 $\mu\text{mol/l}$.

* signifikant, P-Wert: 0,01 – 0,05

** sehr signifikant, P-Wert: 0,001 – 0,01

Der PLC-Inhibitor U 73122 erhöht in HEK-hH1-Zellen bereits ohne Histaminstimulation die basale cAMP-Produktion. Bei zusätzlicher Histaminstimulation verdoppelt sich dieser Effekt. Dagegen ist bei einer PLC-Aktivierung mit dem spezifischen PLC Aktivator m-3M3FBS eine Hemmung der histamininduzierten cAMP-Produktion erkennbar.

Bei HEK-eH1-Zellen ist weder bei Aktivierung noch bei Hemmung der PLC ein deutlicher Effekt auf die basale und die histamininduzierte Stimulation der AC zu erkennen.

5.4.2.6 Beteiligung inhibitorischer G-Proteine an der cAMP-Produktion

Histamin H1 Rezeptoren können die cAMP-Produktion über die Freisetzung von $\beta\gamma$ -Untereinheiten aus $G_{i/q}$ -Proteinen stimulieren. Um die beiden G-Protein Familien zu unterscheiden, wurden die Zellen für 12 Stunden mit Pertussistoxin behandelt. Die histamininduzierte Stimulation der Adenylatcyclase wird beim humanen Histamin H1 Rezeptor nach PTX-Vorbehandlung deutlich gehemmt. Dagegen ist eine Beteiligung inhibitorischer G-Proteine in HEK-eH1-Zellen nicht nachweisbar.

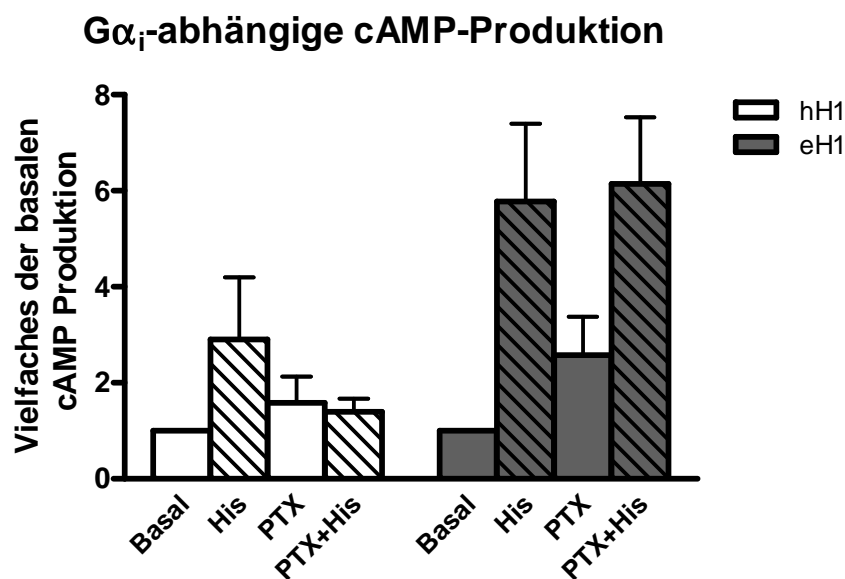


Abbildung 5-20 cAMP-Akkumulation in $G\alpha_i$ -Abhängigkeit

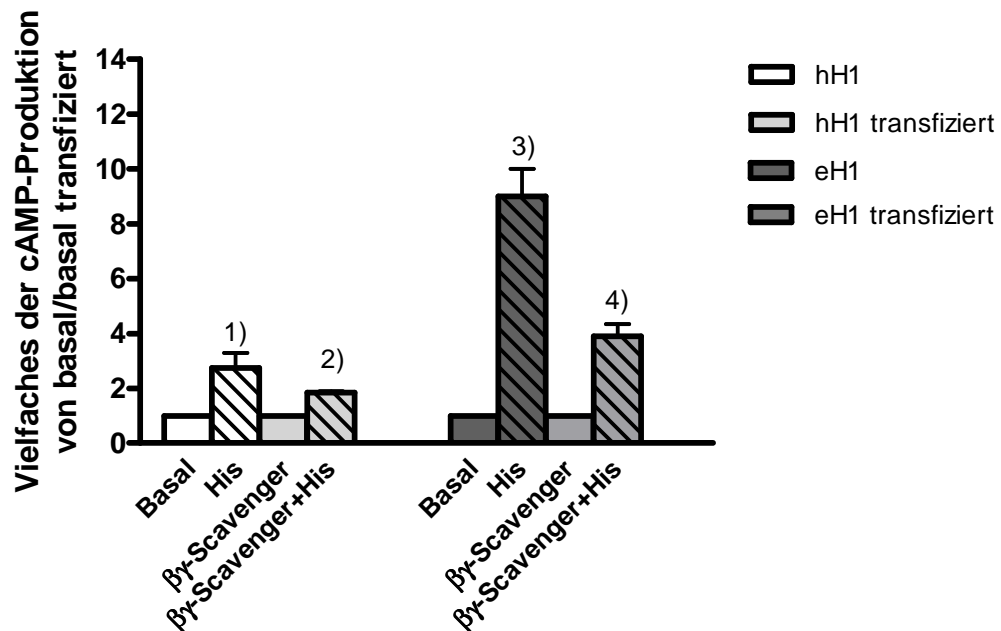
Die Zellen wurden für 12 Stunden mit Pertussistoxin (PTX) in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ vorbehandelt. Im Anschluss daran wurde die cAMP-Produktion in Ab- und Anwesenheit von 100 $\mu\text{mol/l}$ Histamin (Schraffierung) bzw. PTX wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Die Abbildung stellt die Mittelwerte \pm SEM für drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen dar.

5.4.2.7 Beteiligung von $\beta\gamma$ -Untereinheiten an der histamininduzierten cAMP-Produktion

Die von $G_{i/q}$ Proteinen freigesetzten $\beta\gamma$ -Untereinheiten können über bestimmte AC Isoformen direkt oder indirekt über zwischengeschaltete Regulatoren wie zum Beispiel Calcium/Calmodulin zur Stimulation der cAMP-Akkumulation durch den Histamin H1 Rezeptor führen.

Mithilfe der $\beta\gamma$ -bindenden Proteine Phosducin und ACIIC2, die durch Transfektion in die zu untersuchenden Zellen eingebracht wurden, soll die Beteiligung dieser Untereinheiten auf die cAMP-Produktion untersucht werden. Nach Expression der $\beta\gamma$ -bindenden Domäne der AC Isoform II (ACIIC2) wird die histaminvermittelte cAMP-Produktion sowohl über den humanen als auch equinen Histamin H1 Rezeptor gehemmt. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit dem $\beta\gamma$ -Scavenger Phosducin gewonnen.

cAMP-Akkumulation in $\beta\gamma$ -Abhängigkeit



- 1) * Basal versus Histamin
- 2) * $\beta\gamma$ versus $\beta\gamma$ +Histamin
- 3) *** Basal versus Histamin
- 4) * $\beta\gamma$ versus $\beta\gamma$ +Histamin

Abbildung 5-21 Rolle der $\beta\gamma$ -Untereinheit bei der cAMP-Akkumulation

HEK-hH1/eH1-Zellen wurden mit ACIIC2 transfiziert und der Effekt des $\beta\gamma$ -Scavengers auf die histaminvermittelte cAMP-Produktion bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Dreifachbestimmung eines repräsentativen Experiments. Die schraffierten Säulen stellen die Histaminbehandlung dar.

* signifikant, P-Wert: 0,01 – 0,05

*** extrem signifikant, P-Wert: < 0,001

6 Diskussion

Grundlegendes Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Ursachen für die ungenügende therapeutische Wirksamkeit von Antihistaminika beim Pferd. Hierfür wurde der equine Histamin H1 Rezeptor einer umfassenden pharmakologischen Charakterisierung unterzogen und die Ergebnisse mit dem humanen Histamin H1 Rezeptor verglichen.

Im Vordergrund stand dabei die Regulation der Rezeptorsensitivität und der Signalübertragung nach Exposition mit Histamin und Antihistaminika.

Die vorliegende Studie wurde an stabil mit der equinen und humanen H1 Rezeptor cDNA transfizierten HEK 293-Zellen („human embryonic kidney cells“) durchgeführt. Diese Zellen verfügen über alle für die durchgeführten Experimente notwendigen Komponenten der Signaltransduktion (THOMAS u. SMART 2005).

6.1 Regulation des equinen Histamin H1 Rezeptors

Zur pharmakologischen Charakterisierung der Histaminrezeptoren wurden stabile Zellklone mit vergleichbarer Rezeptorendichte gewählt. Die Untersuchung unter dem konfokalen Mikroskop wurden mit H1 Rezeptor-EGFP Fusionsproteinen durchgeführt. Ihre Funktionalität wurde mittels Radioligandenbindung im Sättigungsexperiment und im heterologen Verdrängungsexperiment überprüft und mit den nativen Rezeptoren verglichen.

Die Fraktion der unter Kontrollbedingungen vorliegenden Oberflächenrezeptoren betrug beim equinen Histamin H1 Rezeptor lediglich 40 %, beim humanen Histamin H1 Rezeptor dagegen 50 % der gesamten Rezeptorpopulation. Dies spiegelt sich auch im Vergleich der basalen G-Protein Kopplung wieder, die in der GTP γ ³⁵S Bindung bestimmt wurde. Auch hier weist der humane Histamin H1 Rezeptor eine höhere spontane oder konstitutive Aktivität auf als sein equines Äquivalent. Dies deutet darauf hin, dass nach Expression in HEK 293 Zellen nur ein vergleichbar geringer Anteil der equinen Histamin H1 Rezeptoren funktionell an der Zelloberfläche lokalisiert ist.

Ein weiterer Unterschied wurde bei der agonistinduzierten Internalisierung des Histamin H1 Rezeptors beobachtet. Dabei erfolgt die Internalisierung des equinen

Histamin H1 Rezeptors bei vergleichbarer Histaminstimulation langsamer und weniger stark ausgeprägt als die des humanen Rezeptors. Dessen Internalisierung wird bereits nach 5 Minuten in der Radioligandenbindung und unter dem konfokalen Mikroskop sichtbar (s. Abb. 5-5). Zudem ist eine konstante Zunahme der internalisierten Rezeptoren in der Radioligandenbindung an HEK-hH1-Zellen bis zu einer Behandlungsdauer von 30 Minuten zu finden. Im Gegensatz dazu beginnen die equinen Histamin H1 Rezeptoren erst ab dieser Zeitspanne effektiv von der Zelloberfläche abzu dissoziieren. Neben der Geschwindigkeit ist auch die absolute Internalisierungsrate des equinen Histamin H1 Rezeptors deutlich geringer (35 %) als die des humanen Rezeptors (54 %). HEK-eH1-Zellen besitzen demnach weniger Rezeptoren an der Oberfläche, die einer agonistinduzierten Regulation weniger stark zugänglich sind.

Die Beteiligung cytosolischer Proteine an der Internalisierung wurde im Western Blot untersucht. Dabei scheint die G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase 2 (GRK 2) beide Rezeptoren gleichermaßen zu regulieren. Beide Rezeptoren induzieren bereits nach 7 Minuten Histaminstimulation eine deutliche Abnahme der GRK 2 von der Zellmembran. Kurz nach der Rezeptoraktivierung wandert GRK 2 an die Zellmembran, um den Histamin H1 Rezeptor zu phosphorylieren (IWATA et al. 2005). Im Anschluss daran kann GRK 2 entweder wieder in das Cytosol abgegeben oder zusammen mit dem Rezeptor internalisiert werden (SCHULZ et al. 2002). Da die Internalisierung des equinen Histamin H1 Rezeptors erst mit Verzögerung eintritt und die GRK 2 bereits nach 7 Minuten von der Plasmamembran abdissoziiert ist, lässt dies darauf schließen, dass der equine H1 Rezeptor nicht mit der GRK 2 co-internalisiert. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass der equine Histamin H1 Rezeptor zu diesem Zeitpunkt bereits β -Arrestin 1 rekrutiert hat, wie mit zwei unabhängigen Methoden im Western Blot und unter dem konfokalen Laserscanningmikroskop gezeigt werden konnte. Die Internalisierung des eH1 wird demnach über die Phosphorylierung durch GRK 2 und Bindung von β -Arrestin 1 eingeleitet. Es folgt die physische Abkopplung des Rezeptors vom G-Protein (BENOVIC et al. 1987; LOHSE et al. 1990a; PIPPIG et al. 1993). Da β -Arrestin 1 direkt mit Clathrin interagiert und mithilfe des Adapterproteins AP-2 die Bildung der „clathrin-coated pits“ einleitet (LAPORTE et al. 1999), scheint die Internalisierung des

equinen Histamin H1 Rezeptors in Abhängigkeit von Clathrin zu erfolgen. Diese Annahme ist in weiterführenden Studien mit Filipin, welches die Bildung von Lipidvesikeln unterbindet, näher zu untersuchen (GINES et al. 2001). Beim humanen Histamin H1 Rezeptor ist dagegen keine Anreicherung von β -Arrestin 1 nach Histamingabe zu beobachten. Dies kann einerseits mit der sehr schnell eintretenden Internalisierung des humanen Histamin H1 Rezeptors erklärt werden. So könnte β -Arrestin 1 zum Zeitpunkt der Bestimmung entweder bereits in das Cytosol zurückgekehrt oder zusammen mit dem Rezeptor co-internalisiert worden sein. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass die Endocytose des humanen Histamin H1 Rezeptors über clathrinunabhängige Mechanismen vermittelt wird. Diese Vermutung wird durch Arbeiten am humanen Histamin H1 Rezeptor in CHO-Zellen (SELF et al. 2005) gestützt. Die Phosphorylierung des Rezeptors erfolgt in diesen Zellen über die Proteinkinase A. Es ist auch möglich, dass der Rezeptor abhängig vom Zelltyp über verschiedene Proteinkinasen phosphoryliert wird. Dadurch können unterschiedliche Internalisierungswege eingeschlagen werden (RAPACCIUOLO et al. 2003). Ein solcher Mechanismus könnte die in dieser Arbeit beobachtete Beteiligung von GRK 2 bei der Regulation des humanen Histamin H1 Rezeptors erklären (IWATA et al. 2005).

Nach dem Auswaschen des Agonisten Histamin konnte unter dem konfokalen Mikroskop das Recycling beider Rezeptoren beobachtet werden. Dabei konnte in Anwesenheit des Antihistaminikums Diphenhydramin das Recycling allerdings nur beim equinen, nicht aber beim humanen Rezeptor blockiert werden. Miyoshi et al. zeigten, dass der hH1 nach kurzzeitiger Histaminstimulation in CHO-Zellen bis zu 40 Minuten später noch phosphoryliert vorliegt (MIYOSHI et al. 2004). Diese Beobachtung stimmt mit der über einen Zeitraum von 60 Minuten beobachteten Zunahme von Oberflächenrezeptoren in HEK-hH1-Zellen überein. Die Tatsache, dass Diphenhydramin das Recycling des endocytierten, equinen Histamin H1 Rezeptors verhindert, deutet darauf hin, dass dieses Antihistaminikum am phosphorylierten equinen Rezeptor agonistische Aktivität besitzt. Diphenhydramin kann daher den aktivierten Rezeptor nicht mehr in seinen Ausgangszustand zurückführen. Somit scheint die Wirksamkeit von Diphenhydramin an Rezeptoren des Pferdes, die mit Histamin vorstimuliert wurden, eingeschränkt zu sein. Dies wird

auch in der veterinärmedizinischen Literatur beschrieben, wobei Antihistaminika oftmals einen sehr guten vorbeugenden Effekt besitzen, nach erfolgter Mastzelldegranulation aber nur noch unbefriedigende Wirkung zeigen (ROSE 2000).

Die Rezeptor G-Protein Interaktion wurde mithilfe der $GTP\gamma^{35}S$ -Bindung bestimmt. Unter Kontrollbedingungen zeigte der hH1 eine deutlich stärkere konstitutive Aktivität als der eH1. Diese setzt sich aus der Summe aller unter den gegebenen Versuchsbedingungen in HEK-Zellen spontan aktivierten G-Proteinen zusammen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass in HEK 293 verschiedenen Mengen an G-Proteinen (G_i , $G_{q/11}$ und G_s) vorhanden sind und diese zudem rezeptorabhängig rekrutiert werden müssen. Außerdem zeigen diese G-Proteine wesentliche Unterschiede in ihrer intrinsischen GTPase Aktivität. So liegen G_i Proteine in großer Zahl vor und besitzen einen schnellen GTPase Zyklus, $G_{q/11}$ dagegen weisen eine wesentlich langsamere GTPase Aktivität auf. Die Stimulation des humanen Histamin H1 Rezeptors mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Histamin führt zu einer Aktivierung seiner assoziierten G-Proteine. Histamin wirkt an diesem Rezeptor wie erwartet als Agonist. Dagegen bewirkt der aktivierte equine Histaminrezeptor eine deutliche Abnahme der basalen Kopplungsrate. Auf den ersten Blick scheint es sich also um eine Inaktivierung des Rezeptors zu handeln. Dieser Effekt kann aber auch durch Abkopplung von G-Proteinen mit schneller GTPase Aktivität vermittelt sein, gestützt wird diese Theorie über die im Western Blot und konfokalen Mikroskop eindeutig nachgewiesene Rekrutierung von β -Arrestin 1, die auf eine Aktivierung und nachfolgende Abkopplung des Rezeptors hinweist.

6.2 Aktivität der Antihistaminika

Nach der heute geltenden Rezeptortheorie (HOYER u. BODDEKE 1993; KENAKIN 2001) wird ein Agonist über seine intrinsische Aktivität von 1,0 am Rezeptor definiert. Diese erzeugt einen maximal auslösbaren Effekt. Dagegen hat ein partieller Agonist eine intrinsische Aktivität kleiner 1. Das bedeutet, dass der maximale Effekt auch in höchsten Konzentrationen nicht erreicht wird. Liegt der partielle Agonist in hoher Konzentration vor kommt es zu einer partiell antagonistischen Wirkung. Ein voller

Antagonist (intrinsische Aktivität = 0) konkurriert mit dem Agonisten kompetitiv um die Bindung am Rezeptor und hebt dessen Wirkung auf. Zusätzlich existieren inverse Agonisten, die nicht nur den agonistvermittelten Effekt, sondern auch die konstitutive Aktivität des Rezeptors hemmen (KENAKIN 2001). In Bezug auf die Rezeptorregulation äußert sich die inverse Aktivität in einer Beschleunigung des Recyclings (LETERRIER et al. 2004). Darüber hinaus wird immer öfter von einer „funktionellen Selektivität“ von Wirkstoffen berichtet, wobei sich diese je nach Signalweg in ihrer intrinsischen Aktivität unterscheiden können. Somit kann keine allgemeingültige Aussage über einen Liganden und seine Wirkungen auf alle durch seinen Rezeptor vermittelten Signalwege gemacht werden (HOYER u. BODDEKE 1993; URBAN et al. 2007). Als kompetitiver Antagonist kann mit Diphenhydramin die Internalisierung der beiden in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren mit Histamin verhindert werden. Beim Versuch die internalisierten Histamin H1 Rezeptoren in Anwesenheit von Antihistaminika wieder zur Zelloberfläche hin umzuverteilen fiel auf, dass Diphenhydramin das Recycling des equinen Histamin H1 Rezeptors verhindert. Dies deutet darauf hin, dass Diphenhydramin in Anwesenheit von Histamin über eine partielle agonistische Aktivität verfügt. Die intrinsische Aktivität von Diphenhydramin variiert demnach zwischen beiden Rezeptoren. Unterstützt wird diese Aussage über die Ergebnisse der heterologen Verdrängungsexperimente am nativen Rezeptor. Dabei stellte sich heraus, dass die Affinität von Diphenhydramin und Chlorpheniramin zum Histamin H1 Rezeptor größer ist als diejenige von Histamin. Allerdings besitzt der klonierte equine Histamin H1 Rezeptor eine deutlich niedrigere Affinität zu Diphenhydramin (4fach) und Chlorpheniramin (2fach) als der humane Rezeptor (WELLMANN 2007). Das bedeutet einerseits, dass für Diphenhydramin höhere Dosierungen notwendig sind, um beim Pferd vergleichbare Wirkungen zu erzielen. Andererseits könnte die mangelhafte Wirkung von Antihistaminika beim Pferd auch mit unterschiedlicher intrinsischer Aktivität am equinen Rezeptor erklärt werden.

Nach dem aktuell gültigen Rezeptormodell besitzen Liganden unterschiedliche Affinität zu bestimmten Rezeptorkonformationen. Für inverse Agonisten wurden folgende Effekte auf die Rezeptor-G-Protein Interaktion (MONCZOR et al. 2003) beschrieben:

- 1) Begünstigung des inaktiven Rezeptorzustandes
- 2) Abkopplung des Rezeptors vom G-Protein (vorgekoppelter Zustand)
- 3) Beibehaltung des G-Protein gekoppelten Zustandes mit nachfolgender Blockade der Anzahl der verfügbaren G-Proteine für die Signaltransduktion

Die vorliegende Arbeit zeigt auf verschiedenen Ebenen der Signalkaskade deutliche Besonderheiten in der Funktionalität des equinen Rezeptors auf. In der $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ -Bindung konnte mit Diphenhydramin beim eH1 eine Erhöhung der G-Protein Kopplung gefunden werden. Dagegen wird diese beim hH1 gehemmt. Diphenhydramin scheint somit beim humanen Histamin H1 Rezeptor inverse Aktivität zu besitzen, da es die Abkopplung des Rezeptors von seinen G-Proteinen begünstigt. Die Bindung von Diphenhydramin führt daher zu einer Blockade der assoziierten G-Proteine im Sinne der CTC-Theorie, die nachfolgend nicht mehr zur Signaltransduktion zur Verfügung stehen (MONCZOR et al. 2003). Ein vergleichbares Modell für inverse Agonisten wurde für Pylrilamin am Histamin H1 Rezeptor des Meerschweinchens beschrieben (FITZSIMONS et al. 2004). Dagegen scheint Diphenhydramin am equinen Histamin H1 Rezeptor als partieller Agonist zu wirken. Wie es aber in der Lage ist, das G-Protein zu aktivieren, kann damit nicht erklärt werden.

Beim humanen Histamin H1 Rezeptor kann die von Diphenhydramin induzierte Abkopplung von seinen G-Proteinen auch im Western Blot bestätigt werden. Diese geht mit einer Zunahme von β -Arrestin 1 an der Zellmembran einher. Diese erhöht sich bei zusätzlicher Histaminstimulation deutlich. Diphenhydramin bedingt demnach über β -Arrestin 1 eine physische Abkopplung des Rezeptors von seinen G-Proteinen (BENOVIC et al. 1987).

Die Aktivität der extrazellulär signalregulierten Proteinkinase 1/2 konnte aufgrund der geringen spontanen Aktivität des equinen Histamin H1 Rezeptors nicht über Antihistaminika beeinflusst werden. Die histamininduzierte Phosphorylierung der ERK 1/2 konnte bei beiden Rezeptoren mit Pylrilamin geblockt werden. Demgegenüber zeigen HEK-hH1-Zellen eine basale ERK 1/2 Aktivität, die mit den Antihistaminika Pylrilamin, Chlorpheniramin und Loratadin leicht gesteigert werden

konnte. Sie zeigen also in diesem Experiment schwache partielle agonistische Aktivität. Einzig Diphenhydramin weist inverse Aktivität in HEK-hH1-Zellen auf, da es die basale Aktivität der ERK 1/2 blockiert.

Bezogen auf die basale Regulation der Adenylatcyclase konnte für die Antihistaminika Pyrilamin und Diphenhydramin eine leichte partiell agonistische Wirkung dargestellt werden. Dennoch konnte die histamininduzierte cAMP-Produktion durch eine Gabe von Antihistaminika blockiert werden.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Antihistaminika in verschiedenen Effektorsystemen eine unterschiedliche Eigenwirkung besitzen können. Es ist daher zu vermuten, dass die Hypothese der „funktionellen Selektivität“ auch beim Histamin H1 Rezeptor anzuwenden ist.

6.3 Rolle der Effektorensysteme

6.3.1 Phospholipase C

Die Phospholipase C katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositolbiphosphat zu Inositoltriphosphat (InsP₃) und Diacylglycerol (DAG). Aktiviert wird sie von der G-Protein Untereinheit $G\alpha_{q/11}$. In der vorliegenden Arbeit führte die Blockade der PLC zu einer Verstärkung der Histamin vermittelten cAMP-Produktion. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in einer dualen Signalvermittlung des humanen Histamin H1 Rezeptors liegen (MONIRI et al. 2004): So kann der humane Histamin H1 Rezeptor entweder an $G\alpha_{q/11}$ oder an $G\alpha_s$ koppeln. Wird die Aktivierung der PLC über $G\alpha_{q/11}$ blockiert, verstärkt sich der Einfluss des stimulatorischen G-Proteins auf die Adenylatcyclase. Demgegenüber ist der equine Histamin H1 Rezeptor offensichtlich über PLC unabhängige Wege an die Adenylatcyclase gekoppelt, wie beispielsweise direkt über $G\alpha_s$ oder indirekt über von G_i bzw. $G_{q/11}$ -Proteinen freigesetzten $\beta\gamma$ -Untereinheiten.

6.3.2 Adenylatcyclase

Die Adenylatcyclase (AC) katalysiert die Bildung von cAMP aus ATP. Ihre enzymatische Aktivität wird direkt über aktivierte $G\alpha_s$ Untereinheiten stimuliert. Die

stimulierte Aktivität kann über mehrere co-stimulatorische Faktoren weiter verstärkt oder über inhibitorische Regulatoren gehemmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die direkten Einflüsse der Histaminrezeptoren auf die Stimulation der Adenylatcyclase über die Bestimmung der enzymatischen Aktivität in Membranpräparation untersucht. Eine mögliche sekundäre, über intrazelluläre Komponenten vermittelte Stimulation wurde dagegen mithilfe der intrazellulären Akkumulation von cAMP in intakten Zellen bestimmt. Es fällt auf, dass beide Rezeptoren nur eine schwache Stimulation der AC Aktivität in Membranen vermitteln. Eine G_s vermittelte Stimulation der Adenylatcyclase durch den Histamin H1 Rezeptor scheidet damit aus. Dagegen führt besonders die Aktivierung des equinen Histamin H1 Rezeptors in intakten Zellen zu einer beträchtlichen cAMP-Produktion.

In intakten Zellen konnte sowohl über den hH1 als auch über den eH1 dosisabhängig die cAMP-Produktion stimuliert werden. Dabei fällt auf, dass die EC_{50} für Histamin am eH1 (4 $\mu\text{mol/l}$) niedriger ist als die am hH1 (0,6 $\mu\text{mol/l}$). Dagegen weist der eH1 eine signifikant höhere Effizienz auf (20fach versus 2fach). Dies deutet darauf hin, dass der eH1 einen unterschiedlichen intrazellulären Signalweg aktiviert, der schließlich zu einer Co-Stimulation der Adenylatcyclase führt. Beispielsweise könnte dies über Calcium, das durch InsP_3 freigesetzt wird, oder über die Proteinkinasen A und C vermittelt werden (MONIRI u. BOOTH 2006). Um eine Beteiligung unterschiedlicher G-Protein Familien zu identifizieren, wurde der Einfluss der beiden Untereinheiten (α und $\beta\gamma$) untersucht (MARUKO et al. 2005).

Die PKC spielt im nachgeschalteten Mechanismus über die PLC vermittelte Aktivierung der DAG eine wichtige Rolle. Über die PKC können bestimmte Isoformen der Adenylatcyclase (AC I, II, III und VII) direkt stimuliert bzw. inhibiert (AC VI) werden (HANOUNE u. DEFER 2001). In den hier durchgeführten Versuchen konnte eine deutliche Hemmung der cAMP-Produktion bei Aktivierung der PKC gefunden werden (SANCHEZ-YAGUE et al. 1995). Dieser Effekt ist in den humanen Histamin H1 Rezeptor tragenden Zellen besonders deutlich ausgeprägt. Auch die histamininduzierte cAMP-Produktion konnte über den hH1 stärker als über den eH1 gehemmt werden. Somit scheint der hH1 eine über PKC sensitive AC Isoform zu regulieren, die für die cAMP-Stimulation verantwortlich ist. In HEK-Zellen erfüllt diese

Eigenschaft die AC VI, deren Aktivität durch PKC vermittelte Phosphorylierung gehemmt wird (LAI et al. 1997). Ein nachgeschalteter Einfluss durch intra- und extrazelluläres Calcium bzw. Calcium/Calmodulin ist noch zu klären.

Bei den Untersuchungen der Funktion der PKA, die nachgeschaltet von cAMP aktiviert wird, konnten nur diejenigen Experimente ausgewertet werden, bei denen die PKA durch H 89 gehemmt wurde. Der PKA-Aktivator dBcAMP induzierte eine sehr starke Erhöhung der cAMP-Produktion, so dass die über die beiden Rezeptoren vermittelte Wirkung überlagert wurde. Die Hemmung der PKA führt vor allem über den eH1 zu einer deutlichen Erhöhung der cAMP-Konzentration. Dies ist mit einer negativen Rückkopplung auf die Adenylatcyclase zu erklären. Dabei ist die PKA in der Lage, die in HEK 293-Zellen vorhandene AC VI zu phosphorylieren und damit die enzymatische Aktivität zu hemmen. Umgekehrt bedeutet dies, dass die Hemmung der PKA eine indirekte Aktivierung der AC VI bedingen kann (IWAMI et al. 1995; CHEN et al. 1997).

$\beta\gamma$ -Untereinheiten können über G_i und G_q Aktivierung freigesetzt werden und entweder direkt die in HEK-Zellen vorhandenen AC-Isoformen II und VII stimulieren, I und VI inhibieren oder indirekt über weitere Regulatoren beeinflussen. Aufgrund der nur geringen Effizienz von Histamin die AC Aktivität in Membranpräparation zu steigern, scheinen $\beta\gamma$ -Untereinheiten keinen direkten stimulatorischen Effekt auf die Adenylatcyclase in den beiden Zellklonen zu bewirken. Die indirekten Effekte wurden nach Expression von „ $\beta\gamma$ -Scavengern“ bestimmt. Dabei wurde über beide Rezeptoren eine Hemmung der Histamin vermittelten Stimulation der cAMP-Produktion beobachtet. Im Modell mit CHO-Zellen ist ein starker Einfluss von $\beta\gamma$ -Untereinheiten auf die vom humanen Histamin H1 Rezeptor vermittelte AC-Hemmung beschrieben worden (MARUKO et al. 2005), die in diesem Zellklon über eine direkte Stimulation der AC II vermittelt wird (DEFER et al. 2000).

Um die Herkunft der freigesetzten $\beta\gamma$ -Untereinheiten zu untersuchen, wurden die inhibitorischen G-Proteine mit Pertussistoxin inaktiviert. Dabei konnte lediglich die Stimulation von cAMP über den hH1 blockiert werden. Damit ist für den equinen Histamin H1 Rezeptor in HEK-Zellen eine Beteiligung von $G\alpha_{i/o}$ bei der cAMP-

Akkumulation unwahrscheinlich. Der humane Histamin H1 Rezeptor scheint dagegen in HEK 293-Zellen über G_i zu koppeln. Eine entsprechende G-Protein Selektivität wurde bereits für den Histamin H1 Rezeptor vom Meerschweinchen in CHO-Zellen für die Produktion von Arachidonsäure beschrieben (LEURS et al. 1994).

Für den Histamin H1 Rezeptor des Meerschweinchens wurden in CHO-Zellen drei unterschiedliche Signalwege über G_i , $G_{q/11}$ und G_s beschrieben (LEURS et al. 1994). Für den humanen Histamin H1 Rezeptor wurden ebenfalls in CHO-Zellen zwei Signalwege über $G_{q/11}$ und G_s beschrieben (MONIRI u. BOOTH 2004). In HEK 293-Zellen scheinen der humane und equine Histamin H1 Rezeptor die cAMP-Produktion über mehrere unterschiedliche G-Proteine und intrazelluläre Signalwege zu vermitteln. Erste Hinweise dafür liefert die unterschiedliche Potenz und Effizienz von Histamin, die cAMP-Akkumulation in HEK-hH1- und -eH1-Zellen zu steigern. Im Vergleich zum hH1 stimuliert der equine Histamin H1 Rezeptor in HEK-Zellen die cAMP-Produktion wesentlich stärker. Diese ist zudem nicht G_i vermittelt. Die starke Stimulation der Adenylatcyclase lässt hier auf eine Beteiligung von G_{α_s} schließen. Dies wird durch die Ergebnisse der $GTP\gamma^{35}S$ Bindung unterstützt. Denn die Anzahl der aktivierten G_{α_s} -Untereinheiten ist weitaus geringer als die in HEK-Zellen verfügbaren $G_{\alpha_{q/11}}$, die bei der Aktivierung des eH1 markiert werden (LEFKOWITZ et al. 2002).

6.3.3 Extrazellulär signalregulierte Proteinkinase 1/2

Die Expression der Rezeptoren in HEK-Zellen führte nur beim humanen Histamin H1 Rezeptor zu einer deutlichen Stimulation der basalen MAPKinase Aktivität. Neben der $GTP\gamma^{35}S$ Bindung ist dies als weiterer Hinweis für die im Vergleich zum equinen Histamin H1 Rezeptor höhere konstitutive Aktivität dieses Rezeptors zu werten. Die Exposition der Zellen mit Histamin führte bei beiden Rezeptoren zu einer deutlichen Aktivierung der MAPKinase. Die Untersuchung einer möglichen inversen Aktivität der verwendeten Antihistaminika konnte deshalb nur beim humanen H1 Rezeptor überprüft werden. In HEK-hH1-Zellen reagierte Ppyrilamin als partieller Agonist, da es die basale Aktivität der Mitogen aktivierten Proteinkinase leicht erhöhte. Ein vergleichbarer Effekt wurde auch schon von Robinson und Dickenson beschrieben

(A. J. ROBINSON u. DICKENSON 2001). Eine partielle agonistische Aktivität für Pylamin konnte in HEK-eH1-Zellen nicht beobachtet werden. Die Antihistaminika Loratadin und Chlorpheniramin hatten in HEK-hH1-Zellen keinen nennenswerten Einfluss auf die basale MAPKinase Aktivität. Im Gegensatz dazu zeigte Diphenhydramin als einziges Antihistaminikum inverse Aktivität, da es die basale ERK 1/2 Aktivität erniedrigt.

Über die Regulation der ERK 1/2 Aktivität können Histamin und Antihistaminika Einfluss auf die Zellproliferation und Gentranskription nehmen. Die vollständige Blockade der Histamin vermittelten MAPKinase Aktivierung könnte die Beobachtung aus der Pferdepraxis erklären, dass die prophylaktische Gabe von Antihistaminika eine überschießende Immunantwort unterbinden kann (ROSE 2000). Die niedrigere konstitutive Aktivität des eH1 weist zudem darauf hin, dass das Pferd unempfindlicher auf Histamin reagiert als der Mensch.

6.4 Bedeutung für die Tiermedizin

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit tragen wesentlich zur Aufklärung der Ursachen für die mangelnde klinische Wirksamkeit der Antihistaminika beim Pferd bei. Die Unterschiede in der Rezeptorsequenz, insbesondere in der dritten intrazellulären Schleife, gehen dabei mit Veränderungen in der spontanen Rezeptoraktivität und der G-Protein vermittelten Signalübertragung einher. Die dritte intrazelluläre Schleife ist maßgeblich für die Interaktion des Rezeptors mit seinen assoziierten G-Proteinen verantwortlich und kann die Unterschiede der Histamin H1 Rezeptor vermittelten GTP γ ³⁵S Bindung und cAMP-Produktion erklären. In HEK 293-Zellen ist demnach der equine Histamin H1 Rezeptor in der Lage, im Vergleich zum humanen Rezeptor unterschiedliche intrazelluläre Signalwege und Wirkungen zu induzieren. Darüber hinaus weist das in der Praxis therapeutisch eingesetzte Antihistaminikum Diphenhydramin neben seiner Histamin blockierenden Eigenschaft auch eine partielle agonistische Aktivität am equinen Histamin H1 Rezeptor auf. Dies könnte erklären, warum nach erfolgter Ausschüttung von Histamin die Gabe von Diphenhydramin wirkungslos bleibt. Auch diese Besonderheit des Diphenhydramins

kann auf die niedrige konstitutive Aktivität des equinen Histamin H1 Rezeptors zurückgeführt werden.

Einen weiteren Hinweis für die unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften der beiden Rezeptoren ergab die agonistvermittelte Regulation von Oberflächenrezeptoren. Während der equine Histamin H1 Rezeptor über clathrinabhängige Mechanismen internalisiert wird, findet die Endocytose des humanen Histamin H1 Rezeptors in ein und derselben Zelllinie clathrinunabhängig statt. Es ist somit vorstellbar, dass der equine Histamin H1 Rezeptor im Vergleich zum humanen Rezeptor unterschiedliche Funktionen im Gewebe einnehmen kann. In diesem Zusammenhang ist der nächste Schritt die Verteilung des equinen Histamin H1 Rezeptors in verschiedenen Geweben des Pferdes zu studieren und pharmakologisch zu charakterisieren. Hierbei könnten sich ähnliche Unterschiede im Verteilungsmuster wie für die muskarinergen Acetylcholinrezeptoren beim Pferd ergeben (TORNEKE et al. 2002).

Schließlich weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Untersuchungen zur Rolle des Histamin H1 Rezeptors im Rahmen der Allergie des Typ I nicht vom Menschen auf das Pferd übertragen werden können. Auch muss die Suche nach neuen, besser geeigneten Antihistaminika der zweiten Generation am klonierten equinen Histamin H1 Rezeptor aufgenommen werden. Nur so kann eine Vorauswahl viel versprechender Alternativen für das Pferd getroffen werden, die anschließend als Medikament für die Pferdemedizin weiterentwickelt werden könnten.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden funktionelle Besonderheiten des klonierten equinen Histamin H1 Rezeptors (eH1) aufgeklärt. Insbesondere wurde die agonist-vermittelte Regulation von Oberflächenrezeptoren sowie die intrazelluläre Signaltransduktion im Vergleich zum humanen Histamin H1 Rezeptor (hH1) dargestellt. Die Studie erfolgte an stabil die nativen eH1 bzw. hH1 oder die entsprechenden EGFP-Fusionsproteine exprimierenden HEK 293-Zellen. Die verwendeten Zellklone (HEK-hH1 und HEK-eH1) wiesen eine vergleichbare Rezeptordichte auf.

Im Vergleich zum hH1 induziert Histamin am eH1 nur eine geringe Internalisierung des Rezeptors, ein Effekt der sowohl mittels Radioligandenbindung an intakten Zellen als auch im konfokalen Mikroskop (LSM) nachgewiesen wurde. Die Internalisierung des eH1 erfolgt clathrinabhängig unter Beteiligung der GRK 2 und β -Arrestin 1. Dagegen scheint die Internalisierung des hH1 clathrinunabhängig mittels Lipidvesikel abzulaufen.

Die klinische Wirksamkeit von Antihistaminika korreliert stark mit ihrer negativ intrinsischen Aktivität. Dabei zeigt der eH1 im Vergleich zum hH1 eine deutlich geringere spontane oder konstitutive Aktivität. Diese spiegelt sich in einer niedrigeren basalen GTPy³⁵S Bindung (Rezeptor/G-Protein Kopplung) wieder, die in Anwesenheit von Diphenhydramin zunimmt. Das Antihistaminikum weist demnach am eH1 eine partielle agonistische Aktivität auf.

Aufgrund seiner niedrigen konstitutiven Aktivität wird über den equinen Histamin H1 Rezeptor in HEK 293-Zellen keine basale ERK 1/2 Aktivierung induziert, so dass in diesem System keine dem Diphenhydramin am hH1 entsprechende inverse Aktivität bestimmt werden kann.

Im Gegensatz zu hH1 führt die Aktivierung des eH1 mit Histamin zu einer sehr starken Stimulation der intrazellulären cAMP-Akkumulation. Diese ist im Vergleich zum hH1 nicht PTX- und PLC-abhängig, während beide Rezeptoren über PKA- und PKC-abhängige Mechanismen an die Adenylatcyclase (AC) gekoppelt sind.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse auf vielfältige funktionelle und regulatorische Besonderheiten des equinen Histamin H1 Rezeptors hin, die bei der klinischen Anwendung und Entwicklung neuer Antihistaminika beim Pferd berücksichtigt werden müssen.

8 Summary

Functional characteristics of the equine histamine H1 receptor

The present study investigates into the functional characteristics of the cloned equine histamine H1 receptor (eH1). In particular, agonist induced regulation of cell surface receptors and intracellular signal transduction mechanisms were analysed and compared to the human histamine H1 receptor (hH1). Experiments were conducted on HEK 293 cells stably expressing either native eH1 and hH1 or the respective EGFP-fusion proteins. The cell clones used (HEK-hH1; HEK-eH1) showed comparable receptor densities.

Histamine internalizes the eH1 to a lesser extent than the hH1, shown in radioligand receptor binding studies and confocal microscopy. Endocytosis of eH1 is Clathrin dependent and involves GRK 2 and β -arrestin 1. In contrast internalization of hH1 is Clathrin independent and mediated by lipid rafts.

Clinical effectiveness of antihistamines is correlated with their inverse intrinsic activity. In this respect, the eH1 displays lower spontaneous or constitutive activity than the hH1. This observation is accompanied by a reduction in basal $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ binding (receptor/G protein coupling). Addition of diphenhydramine increases basal $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ binding indicating that this antihistamine acts as a partial agonist at eH1.

Due to its weak constitutive activity expression of eH1 in HEK 293-cells fails to induce basal ERK 1/2 activity. Hence we were not able to investigate inverse activity of diphenhydramine in HEK-eH1 as shown in HEK-hH1.

Compared to hH1 histamine induced activation of eH1 results in effective stimulation of intracellular cAMP accumulation. In contrast to hH1 stimulation of adenylyl cyclase by eH1 is insensitive to PTX and PLC, whereas both receptors are coupled to cAMP production by PKA and PKC dependent mechanisms.

In conclusion our results demonstrate the existence of important functional and regulatory characteristics of the eH1 which have to be considered in clinical use and introduction of new antihistamines in equine medicine.

9 Literaturverzeichnis

ADAMS (2001):

Histamine, Serotonin and Their Antagonists.

In: Veterinary Pharmacology and Therapeutics

8. Auflage, Blackwell Publishing Edition, Iowa State University Press, Ames (USA), S. 403-412

AKTORIES, FÖRSTER, HOFMANN u. STARKE (2005):

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.

In: 9. Auflage, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, S. 223-230

ALBERTS, JOHNSON, LEWIS, RAFF, ROBERTS u. WALTER (2002):

Molecular biology of the cell.

Garland Science, Taylor and Francis Group, New York

ANDERSON, R. G. u. K. JACOBSON (2002):

A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains.

Science 296, 1821-1825

ANDERSON, R. G., B. A. KAMEN, K. G. ROTHBERG u. S. W. LACEY (1992):

Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae.

Science 255, 410-411

ARRANG, J. M., M. GARBARG u. J. C. SCHWARTZ (1983):

Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor.

Nature 302, 832-837

BAKKER, R. A., H. TIMMERMAN u. R. LEURS (2002):

Histamine receptors: specific ligands, receptor biochemistry, and signal transduction.

Clin Allergy Immunol 17, 27-64

BAKKER, R. A., K. WIELAND, H. TIMMERMAN u. R. LEURS (2000):

Constitutive activity of the histamine H(1) receptor reveals inverse agonism of histamine H(1) receptor antagonists.

Eur J Pharmacol 387, R5-7

BARGER, G. u. H. H. DALE (1910):

Chemical structure and sympathomimetic action of amines.

J Physiol 41, 19-59

BENOVIC, J. L., H. KUHN, I. WEYAND, J. CODINA, M. G. CARON u. R. J. LEFKOWITZ (1987):

Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein).

Proc Natl Acad Sci U S A 84, 8879-8882

BEST, C. H., H. H. DALE, H. W. DUDLEY u. W. V. THORPE (1927):
The nature of the vaso-dilator constituents of certain tissue extracts.
J Physiol 62, 397-417

BLACK, J. W., W. A. DUNCAN, C. J. DURANT, C. R. GANELLIN u. E. M. PARSONS
(1972):
Definition and antagonism of histamine H₂-receptors.
Nature 236, 385-390

BOHM, S. K., E. F. GRADY u. N. W. BUNNETT (1997):
Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors.
Biochem J 322 (Pt 1), 1-18

BUNEMANN, M. u. M. M. HOSEY (1999):
G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling.
J Physiol 517 (Pt 1), 5-23

CARTER, T. D., T. J. HALLAM, N. J. CUSACK u. J. D. PEARSON (1988):
Regulation of P₂y-purinoceptor-mediated prostacyclin release from human
endothelial cells by cytoplasmic calcium concentration.
Br J Pharmacol 95, 1181-1190

CHEN, C., E. HANSON, J. W. WATSON u. J. S. LEE (2003):
P-glycoprotein limits the brain penetration of nonsedating but not sedating H₁-
antagonists.
Drug Metab Dispos 31, 312-318

CHENG, Y. u. W. H. PRUSOFF (1973):
Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor
which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction.
Biochem Pharmacol 22, 3099-3108

CHIBA, Y., N. SAITOH, K. MATSUO u. M. MISAWA (2002):
Elevated nasal mucosal G protein levels and histamine receptor affinity in a guinea
pig model of nasal hyperresponsiveness.
Int Arch Allergy Immunol 127, 285-293

CLAPHAM, D. E. u. E. J. NEER (1997):
G protein beta gamma subunits.
Annu Rev Pharmacol Toxicol 37, 167-203

CRESPO, P., N. XU, W. F. SIMONDS u. J. S. GUTKIND (1994):
Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta
gamma subunits.
Nature 369, 418-420

DALE, H. H. u. P. P. LAIDLAW (1910):
The physiological action of beta-aminazolyethylamine.
J Physiol 41, 318-344

DEFEA, K. A., J. ZALEVSKY, M. S. THOMA, O. DERY, R. D. MULLINS u. N. W. BUNNETT (2000):

beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2.

J Cell Biol 148, 1267-1281

DEFER, N., M. BEST-BELPOMME u. J. HANOUNE (2000):

Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase.

Am J Physiol Renal Physiol 279, F400-416

DITTMANN, A. u. K. MOHR (2004):

[H1 antihistamines: pharmacologic basis and action].

Pharm Unserer Zeit 33, 100-105

DUDLEY, D. T., L. PANG, S. J. DECKER, A. J. BRIDGES u. A. R. SALTIEL (1995):

A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade.

Proc Natl Acad Sci U S A 92, 7686-7689

EYRE, P. u. A. J. LEWIS (1973):

Acute systemic anaphylaxis in the horse.

Br J Pharmacol 48, 426-437

FERGUSON, S. S. (2001):

Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling.

Pharmacol Rev 53, 1-24

FERGUSON, S. S., W. E. DOWNEY, 3RD, A. M. COLAPIETRO, L. S. BARAK, L. MENARD u. M. G. CARON (1996):

Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization.

Science 271, 363-366

FITZSIMONS, C. P., F. MONCZOR, N. FERNANDEZ, C. SHAYO u. C. DAVIO (2004):

Mepyramine, a histamine H1 receptor inverse agonist, binds preferentially to a G protein-coupled form of the receptor and sequesters G protein.

J Biol Chem 279, 34431-34439

FREY u. LÖSCHER (2002):

Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.

Enke Verlag,

GARBARG, M. u. J. C. SCHWARTZ (1988):

Synergism between histamine H1- and H2-receptors in the cAMP response in guinea pig brain slices: effects of phorbol esters and calcium.

Mol Pharmacol 33, 38-43

GINES, S., F. CIRUELA, J. BURGUENO, V. CASADO, E. I. CANELA, J. MALLOL, C. LLUIS u. R. FRANCO (2001):

Involvement of caveolin in ligand-induced recruitment and internalization of A(1) adenosine receptor and adenosine deaminase in an epithelial cell line.

Mol Pharmacol 59, 1314-1323

GOODMAN, O. B., JR., J. G. KRUPNICK, F. SANTINI, V. V. GUREVICH, R. B. PENN, A. W. GAGNON, J. H. KEEN u. J. L. BENOVIC (1996):

Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor.

Nature 383, 447-450

HAASEMANN, M., J. CARTAUD, W. MULLER-ESTERL u. I. DUNIA (1998):

Agonist-induced redistribution of bradykinin B2 receptor in caveolae.

J Cell Sci 111 (Pt 7), 917-928

HALL, R. A. u. R. J. LEFKOWITZ (2002):

Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins.

Circ Res 91, 672-680

HAMANO, N., N. TERADA, K. MAESAKO, T. IKEDA, S. FUKUDA, J. WAKITA, T. YAMASHITA u. A. KONNO (1998):

Expression of histamine receptors in nasal epithelial cells and endothelial cells--the effects of sex hormones.

Int Arch Allergy Immunol 115, 220-227

HANOUNE, J. u. N. DEFER (2001):

Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms.

Annu Rev Pharmacol Toxicol 41, 145-174

HARRISON, C. u. J. R. TRAYNOR (2003):

The [³⁵S]GTPgammaS binding assay: approaches and applications in pharmacology.

Life Sci 74, 489-508

HILL, S. J. (1990):

Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor.

Pharmacol Rev 42, 45-83

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

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

Pharmacol Rev 49, 253-278

HINSHAW, J. E. u. S. L. SCHMID (1995):

Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding.

Nature 374, 190-192

HOYER, D. u. H. W. BODDEKE (1993):

Partial agonists, full agonists, antagonists: dilemmas of definition.
Trends Pharmacol Sci 14, 270-275

IGISHI, T. u. J. S. GUTKIND (1998):

Tyrosine kinases of the Src family participate in signaling to MAP kinase from both Gq and Gi-coupled receptors.
Biochem Biophys Res Commun 244, 5-10

IRIYOSHI, N., K. TAKEUCHI, A. YUTA, K. UKAI u. Y. SAKAKURA (1996):

Increased expression of histamine H1 receptor mRNA in allergic rhinitis.
Clin Exp Allergy 26, 379-385

ISHIGURO, N., T. NOZAWA, A. TSUJIHATA, A. SAITO, W. KISHIMOTO, K. YOKOYAMA, T. YOTSUMOTO, K. SAKAI, T. IGARASHI u. I. TAMAI (2004):

Influx and efflux transport of H1-antagonist epinastine across the blood-brain barrier.
Drug Metab Dispos 32, 519-524

IWATA, K., J. LUO, R. B. PENN u. J. L. BENOVIC (2005):

Bimodal regulation of the human H1 histamine receptor by G protein-coupled receptor kinase 2.
J Biol Chem 280, 2197-2204

JANEWAY, TRAVERS, WALPORT u. SHLOMCHIK (2002):

Immunologie.

In: 5, Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, S. 503-536

JOHNSON, R. A. u. Y. SALOMON (1991):

Assay of adenylyl cyclase catalytic activity.
Methods Enzymol 195, 3-21

KAGEY-SOBOTKA, A., D. W. MACGLASHAN u. L. M. LICHTENSTEIN (1982):

Role of receptor aggregation in triggering IgE-mediated reactions.
Fed Proc 41, 12-16

KENAKIN, T. (2001):

Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation.
FASEB J 15, 598-611

KRUEGER, K. M., Y. DAAKA, J. A. PITCHER u. R. J. LEFKOWITZ (1997):

The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification.
J Biol Chem 272, 5-8

LAEMMLI, U. K. (1970):

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685

LAI, H. L., T. H. YANG, R. O. MESSING, Y. H. CHING, S. C. LIN u. Y. CHERN (1997):

Protein kinase C inhibits adenylyl cyclase type VI activity during desensitization of the A2a-adenosine receptor-mediated cAMP response.

J Biol Chem 272, 4970-4977

LAPORTE, S. A., R. H. OAKLEY, J. ZHANG, J. A. HOLT, S. S. FERGUSON, M. G. CARON u. L. S. BARAK (1999):

The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis.

Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3712-3717

LEFF, P., C. SCARAMELLINI, C. LAW u. K. MCKECHNIE (1997):

A three-state receptor model of agonist action.

Trends Pharmacol Sci 18, 355-362

LEFKOWITZ, R. J., K. L. PIERCE u. L. M. LUTTRELL (2002):

Dancing with different partners: protein kinase a phosphorylation of seven membrane-spanning receptors regulates their G protein-coupling specificity.

Mol Pharmacol 62, 971-974

LETERRIER, C., D. BONNARD, D. CARREL, J. ROSSIER u. Z. LENKEI (2004):

Constitutive endocytic cycle of the CB1 cannabinoid receptor.

J Biol Chem 279, 36013-36021

LEURS, R., M. K. CHURCH u. M. TAGLIALATELA (2002):

H1-antihistamines: inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects.

Clin Exp Allergy 32, 489-498

LEURS, R., M. J. SMIT u. H. TIMMERMAN (1995):

Molecular pharmacological aspects of histamine receptors.

Pharmacol Ther 66, 413-463

LEURS, R., E. TRAIFFORT, J. M. ARRANG, J. TARDIVEL-LACOMBE, M. RUAT u. J. C. SCHWARTZ (1994):

Guinea pig histamine H1 receptor. II. Stable expression in Chinese hamster ovary cells reveals the interaction with three major signal transduction pathways.

J Neurochem 62, 519-527

LIEBMANN, C. (2001):

Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity.

Cell Signal 13, 777-785

LOHSE, M. J., J. L. BENOVIC, M. G. CARON u. R. J. LEFKOWITZ (1990a):

Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors.

J Biol Chem 265, 3202-3211

LOHSE, M. J., J. L. BENOVIC, J. CODINA, M. G. CARON u. R. J. LEFKOWITZ (1990b):

beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function.
Science 248, 1547-1550

LOPEZ-ILASACA, M. (1998):

Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades.
Biochem Pharmacol 56, 269-277

LÖSCHER, UNGEMACH u. KROKER (2006):

Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren.
Parey in MVS Medizinverlage Stuttgart gMmbH & Co.KG, Stuttgart

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR u. R. J. RANDALL (1951):

Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J Biol Chem 193, 265-275

LUTTRELL, L. M., S. S. FERGUSON, Y. DAAKA, W. E. MILLER, S. MAUDSLEY, G. J. DELLA ROCCA, F. LIN, H. KAWAKATSU, K. OWADA, D. K. LUTTRELL, M. G. CARON u. R. J. LEFKOWITZ (1999):

Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes.
Science 283, 655-661

LUTTRELL, L. M., B. E. HAWES, T. VAN BIESEN, D. K. LUTTRELL, T. J. LANSING u. R. J. LEFKOWITZ (1996):

Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases.
J Biol Chem 271, 19443-19450

MALARKEY, K., C. M. BELHAM, A. PAUL, A. GRAHAM, A. MCLEES, P. H. SCOTT u. R. PLEVIN (1995):

The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors.
Biochem J 309 (Pt 2), 361-375

MARLEY, P. D., K. A. THOMSON, K. JACHNO u. M. J. JOHNSTON (1991):

Histamine-induced increases in cyclic AMP levels in bovine adrenal medullary cells.
Br J Pharmacol 104, 839-846

MARUKO, T., T. NAKAHARA, K. SAKAMOTO, M. SAITO, N. SUGIMOTO, Y. TAKUWA u. K. ISHII (2005):

Involvement of the betagamma subunits of G proteins in the cAMP response induced by stimulation of the histamine H1 receptor.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 372, 153-159

MENARD, L., S. S. FERGUSON, J. ZHANG, F. T. LIN, R. J. LEFKOWITZ, M. G. CARON u. L. S. BARAK (1997):

Synergistic regulation of beta2-adrenergic receptor sequestration: intracellular complement of beta-adrenergic receptor kinase and beta-arrestin determine kinetics of internalization.

Mol Pharmacol 51, 800-808

MILLIGAN, G. (1993):

Mechanisms of multifunctional signalling by G protein-linked receptors.

Trends Pharmacol Sci 14, 239-244

MIRBAHAR, K. B., W. N. MCDONELL, W. BIGNELL u. P. EYRE (1985):

Effects of aerosolized histamine and carbachol in the conscious horse.

Can J Comp Med 49, 211-218

MIYOSHI, K., N. KAWAKAMI, S. HORIO u. H. FUKUI (2004):

Homologous and heterologous phosphorylations of human histamine H1 receptor in intact cells.

J Pharmacol Sci 96, 474-482

MONCZOR, F., N. FERNANDEZ, B. L. LEGNAZZI, M. E. RIVEIRO, A. BALDI, C. SHAYO u. C. DAVIO (2003):

Tiotidine, a histamine H2 receptor inverse agonist that binds with high affinity to an inactive G-protein-coupled form of the receptor. Experimental support for the cubic ternary complex model.

Mol Pharmacol 64, 512-520

MONIRI, N. H. u. R. G. BOOTH (2004):

Functional heterogeneity of histamine H(1) receptors.

Inflamm Res 53 Suppl 1, S71-72

MONIRI, N. H. u. R. G. BOOTH (2006):

Role of PKA and PKC in histamine H1 receptor-mediated activation of catecholamine neurotransmitter synthesis.

Neurosci Lett 407, 249-253

MONIRI, N. H., D. COVINGTON-STRACHAN u. R. G. BOOTH (2004):

Ligand-directed functional heterogeneity of histamine H1 receptors: novel dual-function ligands selectively activate and block H1-mediated phospholipase C and adenylyl cyclase signaling.

J Pharmacol Exp Ther 311, 274-281

MUELLER, A., E. KELLY u. P. G. STRANGE (2002):

Pathways for internalization and recycling of the chemokine receptor CCR5.

Blood 99, 785-791

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

- 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
- ONO, K. u. J. HAN (2000):
The p38 signal transduction pathway: activation and function.
Cell Signal 12, 1-13
- PAUL, A., S. WILSON, C. M. BELHAM, C. J. ROBINSON, P. H. SCOTT, G. W. GOULD u. R. PLEVIN (1997):
Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function.
Cell Signal 9, 403-410
- PAWSON, T. (1994):
Signal transduction. Look at a tyrosine kinase.
Nature 372, 726-727
- PIERCE, K. L., L. M. LUTTRELL u. R. J. LEFKOWITZ (2001):
New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades.
Oncogene 20, 1532-1539
- PIPPIG, S., S. ANDEXINGER, K. DANIEL, M. PUZICHA, M. G. CARON, R. J. LEFKOWITZ u. M. J. LOHSE (1993):
Overexpression of beta-arrestin and beta-adrenergic receptor kinase augment desensitization of beta 2-adrenergic receptors.
J Biol Chem 268, 3201-3208
- PITCHER, J. A., N. J. FREEDMAN u. R. J. LEFKOWITZ (1998):
G protein-coupled receptor kinases.
Annu Rev Biochem 67, 653-692
- PLUMB (1999):
Veterinary Drug Handbook.
Iowa State University Press, Iowa
- PREMONT, R. T., J. INGLESE u. R. J. LEFKOWITZ (1995):
Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors.
FASEB J 9, 175-182
- RAPACCIUOLO, A., S. SUVARNA, L. BARKI-HARRINGTON, L. M. LUTTRELL, M. CONG, R. J. LEFKOWITZ u. H. A. ROCKMAN (2003):
Protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways.
J Biol Chem 278, 35403-35411

REED, B., SELLAN (2004):
Equine Internal Medicine.
In: 2, Elsevier, S. 29-32

RESINK, T. J., G. GRIGORIAN, A. K. MOLDABAEVA, S. M. DANILOV u. F. R. BUHLER (1987):
Histamine-induced phosphoinositide metabolism in cultured human umbilical vein endothelial cells. Association with thromboxane and prostacyclin release.
Biochem Biophys Res Commun 144, 438-446

ROBINSON (2003):
Current Therapy in Equine Medicine.
In: 5. Auflage, Saunders, Elsevier Science, St. Louis, Missouri, S. 181-183

ROBINSON, A. J. u. J. M. DICKENSON (2001):
Activation of the p38 and p42/p44 mitogen-activated protein kinase families by the histamine H(1) receptor in DDT(1)MF-2 cells.
Br J Pharmacol 133, 1378-1386

ROSE, H. (2000):
Skin Immune System and Allergic Diseases.
In: Manual of Equine Practice
2. Auflage, W.B. Saunders Company, S.

ROTH, N. S., P. T. CAMPBELL, M. G. CARON, R. J. LEFKOWITZ u. M. J. LOHSE (1991):
Comparative rates of desensitization of beta-adrenergic receptors by the beta-adrenergic receptor kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase.
Proc Natl Acad Sci U S A 88, 6201-6204

SANCHEZ-YAGUE, J., M. C. RODRIGUEZ, A. HERNANDEZ-HERNANDEZ u. M. LLANILLO (1995):
Inhibition of prostaglandin E2-responsive adenylyl cyclase in embryonal human kidney 293 cells by phorbol esters.
J Lipid Mediat Cell Signal 11, 25-39

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

SCOTT u. MILLER (2003):
Equine Dermatology.
Saunders & Elsevier Science,

SEGER, R. u. E. G. KREBS (1995):
The MAPK signaling cascade.
FASEB J 9, 726-735

- SELF, T. J., S. M. OAKLEY u. S. J. HILL (2005):
Clathrin-independent internalization of the human histamine H1-receptor in CHO-K1 cells.
Br J Pharmacol 146, 612-624
- SHIMOMURA, O., F. H. JOHNSON u. Y. SAIGA (1962):
Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea.
J Cell Comp Physiol 59, 223-239
- SIBLEY, D. R. u. R. J. LEFKOWITZ (1985):
Molecular mechanisms of receptor desensitization using the beta-adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model.
Nature 317, 124-129
- SIMONS, F. E. (2003):
H1-Antihistamines: more relevant than ever in the treatment of allergic disorders.
J Allergy Clin Immunol 112, S42-52
- SIMONS, F. E. (2004):
Advances in H1-antihistamines.
N Engl J Med 351, 2203-2217
- SMART, E. J., G. A. GRAF, M. A. MCNIVEN, W. C. SESSA, J. A. ENGELMAN, P. E. SCHERER, T. OKAMOTO u. M. P. LISANTI (1999):
Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction.
Mol Cell Biol 19, 7289-7304
- SMITH (2002):
Large Animal Internal Medicine.
Mosby Inc.,
- STERNE-MARR, R. u. J. L. BENOVIC (1995):
Regulation of G protein-coupled receptors by receptor kinases and arrestins.
Vitam Horm 51, 193-234
- SUGDEN, P. H. u. A. CLERK (1997):
Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors.
Cell Signal 9, 337-351
- SZEKERES, P. G., J. A. KOENIG u. J. M. EDWARDSON (1998):
The relationship between agonist intrinsic activity and the rate of endocytosis of muscarinic receptors in a human neuroblastoma cell line.
Mol Pharmacol 53, 759-765
- TAUSSIG, R. u. A. G. GILMAN (1995):
Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases.
J Biol Chem 270, 1-4

THOMAS, P. u. T. G. SMART (2005):

HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins.

J Pharmacol Toxicol Methods 51, 187-200

TORNEKE, K., C. INGVAST-LARSSON, A. BOSTROM u. L. E. APPELGREN (2002):

Muscarinic receptors in equine airways.

Vet Res Commun 26, 637-650

URBAN, J. D., W. P. CLARKE, M. VON ZASTROW, D. E. NICHOLS, B. KOBILKA, H. WEINSTEIN, J. A. JAVITCH, B. L. ROTH, A. CHRISTOPOULOS, P. M. SEXTON, K. J. MILLER, M. SPEDDING u. R. B. MAILMAN (2007):

Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology.

J Pharmacol Exp Ther 320, 1-13

VACHON, L., T. COSTA u. A. HERZ (1987):

Opioid receptor desensitization in NG 108-15 cells. Differential effects of a full and a partial agonist on the opioid-dependent GTPase.

Biochem Pharmacol 36, 2889-2897

VAN BIESEN, T., L. M. LUTTRELL, B. E. HAWES u. R. J. LEFKOWITZ (1996):

Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors.

Endocr Rev 17, 698-714

VON ZASTROW, M. u. B. K. KOBILKA (1992):

Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors.

J Biol Chem 267, 3530-3538

WASFI, I. A., A. A. ABDEL HADI, M. ELGHAZALI, N. A. ALKATEERI, M. M. HUSSAIN u. A. M. HAMID (2003):

Comparative pharmacokinetics of diphenhydramine in camels and horses after intravenous administration.

Vet Res Commun 27, 463-473

WELLMANN, B. (2007)

Klonierung und pharmakologische Charakterisierung des equinen Histamin H1 Rezeptors.

München, Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der tierärztlichen Fakultät, LMU,

WINDAUS, A. U. V., W. (1907):

Synthese des Imidazoläthylamins.

Chem. Berichte 40, 3691-3695

WU, R. L., J. C. ANTHES, W. KREUTNER, A. G. HARRIS u. R. E. WEST, JR. (2004):

Desloratadine inhibits constitutive and histamine-stimulated nuclear factor-kappaB activity consistent with inverse agonism at the histamine H1 Receptor.

Int Arch Allergy Immunol 135, 313-318

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1	Allergietest	9
Abbildung 3-2	Strukturformel von Histamin	11
Abbildung 3-3	Freisetzung von Histamin (DITTMANN u. MOHR 2004)	14
Abbildung 3-4	$G\alpha_{q/11}$ vermittelte Signaltransduktion	20
Abbildung 3-5	$G\alpha_s$ vermittelte Signalkaskade	22
Abbildung 3-6	Desensibilisierung des Rezeptors aus "Molecular biology of the cell", (ALBERTS et al. 2002)	25
Abbildung 3-7	β -Arrestin als Gerüst	28
Abbildung 3-8	P-Glykoprotein	32
Abbildung 3-9	Strukturformel von Pyrilamin (© Merck Index)	34
Abbildung 3-10	Strukturformel von Diphenhydramin	34
Abbildung 3-11	Strukturformel von Chlorpheniramin	35
Abbildung 3-12	Strukturformel von Loratadin (© Merck Index)	36
Abbildung 4-1	Prinzip des ELISA	70
Abbildung 5-1	Regulation von Oberflächenrezeptoren nach Histaminbehandlung	75
Abbildung 5-2	Internalisierung des Histamin H1 Rezeptors	77
Abbildung 5-3	Sättigungsbindung an hH1/eH1-EGFP in HEK-Zellen	79
Abbildung 5-4	Heterologe Verdrängung von ^3H -Pyrilamin an hH1/eH1-EGFP in HEK-Zellen	81
Abbildung 5-5	Internalisierung des Histamin H1 Rezeptors im LSM	84
Abbildung 5-6	Recycling des Histamin H1 Rezeptors im LSM	87
Abbildung 5-7	Abbildung 2-7 G-Protein-Kopplung in HEK-hH1/eH1-Zellen	88
Abbildung 5-8	Darstellung der GRK 2 Umverteilung im Western Blot	90
Abbildung 5-9	GRK 2 Umverteilung	90
Abbildung 5-10	Darstellung der β -Arrestin 1 Umverteilung im Western Blot	91
Abbildung 5-11	β -Arrestin 1 Umverteilung	92
Abbildung 5-12	β -Arrestin 1 Umverteilung im LSM	94
Abbildung 5-13	MAPKinase im Western Blot	95
Abbildung 5-14	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Stimulation	96
Abbildung 5-15	AC-Assay	98

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 5-16</i>	<i>Dosis-Wirkungskurve im Zellysat</i>	99
<i>Abbildung 5-17</i>	<i>cAMP-Akkumulation in Anwesenheit von Antihistaminika</i>	100
<i>Abbildung 5-18</i>	<i>Regulation der histamininduzierten cAMP-Akkumulation durch PKC und PKA</i>	101
<i>Abbildung 5-19</i>	<i>Einfluss der PLC auf die histamininduzierte cAMP-Akkumulation</i>	103
<i>Abbildung 5-20</i>	<i>cAMP-Akkumulation in $G\alpha_i$-Abhängigkeit</i>	104
<i>Abbildung 5-21</i>	<i>Rolle der $\beta\gamma$-Untereinheit bei der cAMP-Akkumulation</i>	105

11 Danksagung

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer möchte ich mich für die Überlassung des Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft und die hilfreichen Hinweise, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, besonders bedanken.

Frau Univ.-Prof. Dr. Potschka danke ich für den am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Herzlich danken möchte ich Frau Inge Sautter, Frau Andrea Wehmeyer, besonders für die zur Verfügung gestellten EGFP-Fusionsproteine, und Herrn Thomas Christ für ihre Hilfsbereitschaft und Geduld, wenn es galt technische Fragen zu klären.

Bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich für allzeit gewährte Bereitschaft, Fragen des Laboralltags zu klären oder wissenschaftliche Themen zu diskutieren, bedanken.

Auch danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Seifert und Frau Dr. Strasser aus Regensburg für die Bereitstellung der cDNA des humanen Histamin H1 Rezeptors.

Zuletzt danke ich von Herzen meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern und Brüdern, die immer für mich da sind, meinem Freund für die Kraft und Zuversicht, die er mir gegeben hat und meinen Freunden, die mich jederzeit während meines Studiums und der Doktorarbeit unterstützt haben.

12 Lebenslauf

	Cornelia Katharina Hildegard Völzke
21.01.1981	geboren in Emmerich <i>Eltern:</i> Kinderkrankenschwester Karin Völzke, geb.: Toepsch Diplom-Ingenieur für technische Chemie Manfred Völzke <i>Geschwister:</i> Matthias Völzke (geb. Dez. '74) Florian Völzke (geb. Aug. '77)
	Ausbildung
September 1987 bis Juli 1991	Besuch der Grundschule „Marienschule“ in Materborn/Kleve
September 1991 bis Juni 2000	Besuch des „Freiherr vom Stein“-Gymnasiums in Kleve <i>Abschluss:</i> Abitur
ab Oktober 2000	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität in München
März 2006	Tierärztliche Prüfung
Mai 2006	Tierärztliche Approbation
Juni 2006 bis Oktober 2007	Promotionsstudium und wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Fakultät für Tiermedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität in München