
Funktion und Pharmakologie des Histamin H₁- und H₄-Rezeptors in der Maus

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Dipl.-Biochem. Silke Beermann
geboren am 08.11.1983,
in Hannover

Hannover 2012

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2009 bis September 2012 unter der Leitung von Prof. Dr. Detlef Neumann im Institut für Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt.

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Detlef Neumann
Institut für Pharmakologie
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Walter Müller
Institut für Physiologische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 28.11.2012

*Gehe nicht, wohin der Weg führen mag,
sondern dorthin, wo kein Weg ist und
hinterlasse eine Spur.*

Jean Paul

Zusammenfassung

Histamin ist ein biogenes Amin, welches im Körper von einer Reihe von Zellen synthetisiert wird. Neben verschiedenen pathologischen und physiologischen Prozessen spielt es vor allem bei Entzündungsreaktionen, bei der adaptiven Immunantwort und bei allergischen Erkrankungen, wie auch beim Asthma, eine wichtige Rolle. Beim allergischen Asthma können H₁R-Antagonisten, die typischerweise zur Behandlung von anderen IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen eingesetzt werden, keine Verbesserung des Krankheitsverlaufs erzielen. Dennoch scheint Histamin bei der Pathogenese von allergischem Asthma eine entscheidende Rolle zu spielen, da es bei erneutem Allergenkontakt nach erfolgter Sensibilisierung durch Degranulation von Mastzellen zu einer massiven Histaminfreisetzung im Lungengewebe kommt. Die Blockade des H₄R verbessert deutlich die Symptome im murinen experimentellen Asthma, unabhängig davon, ob die Behandlung während der Sensibilisierung oder in der Provokationsphase durchgeführt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Gabe von einem H₁R-Antagonisten zusätzlich zu dem H₄R-Antagonisten in dem murinen Asthmodell die Wirkung des H₄R-Antagonisten moduliert, und zwar abhängig vom Behandlungszeitpunkt. Bei der Applikation während der Sensibilisierung verstärkt der H₁R-Antagonist den Effekt des H₄R-Antagonisten, während er bei der Applikation in der Provokationsphase diesen abschwächt. Also scheint sowohl der H₁R als auch der H₄R an der Pathogenese des murinen Asthmas beteiligt zu sein, wobei der H₁R die Funktion des H₄R zu regulieren scheint.

Anschließend wurden die Signalwege von mH₁R und mH₄R, auch in der Hinsicht der möglichen Interaktion, näher analysiert. Dazu wurden HEK293-Zellen stabil entweder mit dem mH₁R, mit dem mH₄R oder mit beiden Rezeptoren in Kombination transfiziert. In den mH₁R-transfizierten Zellen bewirkt eine Stimulation mit Histamin einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration und eine vermehrte cAMP-Akkumulation. Die mH₄R-transfizierten Zellen reagieren auf Stimulation mit Histamin mit einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration, wohingegen die intrazelluläre cAMP-Konzentration reduziert wird. In den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen kommt es nach Stimulation mit Histamin zum Anstieg der intrazellulären Calcium- und der cAMP-Konzentration. Durch den Einsatz selektiver Antagonisten wurde gezeigt, dass die Auswirkungen auf die Calcium-Konzentration nur über den H₁R vermittelt werden, während die intrazelluläre cAMP-Konzentration über den H₁R und den H₄R reguliert wird. Zusätzlich wurde nach Stimulation mit Histamin eine Phosphorylierung von Komponenten des MAPK-Signalwegs und des

Transkriptionsfaktors CREB nachgewiesen. Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen kann nach Histamin-Stimulation über den mH₁R eine erhöhte Expression von IL-8, c-Fos, EGR-1 und COX-2 detektiert werden, die hauptsächlich über den ERK MAPK-Signalweg vermittelt wird. Über den mH₄R kommt es dagegen nach Stimulation zu keiner veränderten Expression der hier analysierten Gene.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollten drei verschiedene kommerziell erhältliche H₄R-Antikörper bezüglich ihrer Spezifität und Selektivität für den Rezeptor charakterisiert werden. Es ist ein hinlänglich bekanntes Problem, dass kommerziell erhältliche GPCR-Antikörper oftmals keine ausreichende Spezifität aufweisen. Die H₄R-Antikörper wurden an rekombinanten Rezeptoren in zwei verschiedenen Zellsystemen sowohl mittels Durchflusszytometrie als auch im Western-Blot analysiert, aber auch an endogenen Rezeptoren auf murinen Milzzellen und auf humanen Leukozyten. Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt, dass keiner der drei verwendeten Antikörper eine ausreichende Spezifität für den H₄R aufweist.

Die hier vorliegende Arbeit zeigt also, dass sowohl der H₁R als auch der H₄R entscheidend an der Pathogenese des murinen Asthmas beteiligt ist und sich beide Rezeptorsubtypen in ihrer Wirkung gegenseitig beeinflussen. Anhand der Untersuchungen in dem HEK-Zellmodell konnten erste Hinweise dafür gefunden werden, dass es möglicherweise zu einer Interaktion der Signalwege von H₁R und H₄R kommt.

Schlagwörter: Asthma, Histamin, Histaminrezeptor-Signalwege

Abstract

Histamine is a biogenic amine which is produced by various cells in the body. Among different pathological and physiological processes it plays a decisive role in inflammation, adaptive immunity, and allergic disease, as in asthma. In allergic asthma, H₁R antagonists typically used for treatment of IgE-mediated allergic disease do not improve asthma symptoms. However, histamine seems to play a crucial role in pathogenesis of allergic asthma as a second exposure to the antigen after initial sensitisation leads to increased histamine release in the lung tissue due to degranulation of mast cells. Blocking of the H₄R in a mouse model of asthma provides beneficial effects independent of whether the treatment was performed during provocation- or sensitisation phase. In the present study it was shown that administration of an H₁R antagonist along with an H₄R antagonist modulates the effect of the H₄R antagonist depending on the timing of the treatment. Upon application during sensitisation, the H₁R antagonist enhances the effect of the H₄R antagonist, while it is reduced upon application during provocation. Thus, the H₁R as well as the H₄R are apparently involved in the pathogenesis of experimental asthma and their functions may interact with each other.

Afterwards, signalling pathways of mH₁R and mH₄R were analysed and checked for possible interactions. Therefore, HEK293 cells were stably transfected with plasmids encoding either mH₁R, mH₄R or both receptors in combination. In mH₁R-transfected cells, histamine causes enhanced intracellular calcium and cAMP levels. In mH₄R-transfected cells, stimulation with histamine increases intracellular calcium concentrations whereas it decreases intracellular cAMP concentrations. Stimulation of mH_{1/4}R-transfected cells with histamine leads to an enhancement of intracellular calcium concentrations and cAMP concentrations. Using selective antagonists, it was shown that only the mH₁R influences calcium concentrations while cAMP concentrations are regulated by mH₁R and mH₄R. In addition, phosphorylation of members of the MAPK-signalling pathway and of the transcription factor CREB were analysed after stimulation with histamine. Gene expression analysis demonstrates an increased expression of IL-8, c-Fos, EGR-1 and COX-2 mediated by mH₁R upon histamine stimulation which is mainly mediated by the ERK-signalling pathway. Stimulation *via* mH₄R does not influence the expression of genes analysed in this study.

In a further part of this study three commercially available H₄R antibodies were characterised concerning their specificity and selectivity. For a series of commercially available GPCR antibodies, lack of specificity has been described. In this study the H₄R antibodies were

analysed by flow cytometry and western blot, using recombinant receptors in two different cellular systems and endogenous receptors on murine splenocytes and human leucocytes. The conclusion of this study is that none of the analysed antibodies recognised the H₄R with sufficient specificity.

The present study shows that H₁R as well as H₄R are decisively involved in pathogenesis of murine asthma and that both receptor subtypes functionally interact. Analysis in the HEK cell model provides first evidence for an interaction between the signalling pathway of H₁R and H₄R.

Key words: asthma, histamine, histamine receptor signalling pathways

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	13
1. Einleitung	18
1.1 Asthma.....	18
1.1.1. Pathogenese des Asthma bronchiale.....	19
1.1.2. Therapie von allergischem Asthma	24
1.2 Histamin	26
1.2.1. Biosynthese von Histamin	26
1.2.2. Metabolisierung von Histamin	27
1.3 Histaminrezeptoren.....	28
1.3.1. Vorkommen und Funktion von Histaminrezeptoren.....	30
1.3.1.1. <i>Histamin-1-Rezeptor</i>	32
1.3.1.2. <i>Histamin-2-Rezeptor</i>	33
1.3.1.3. <i>Histamin-3-Rezeptor</i>	34
1.3.1.4. <i>Histamin-4-Rezeptor</i>	36
1.3.2. Liganden der Histaminrezeptoren	37
1.3.2.1. <i>Mepyramin</i>	37
1.3.2.2. <i>JNJ7777120</i>	37
1.3.2.3. <i>5-Methylhistamin</i>	38
1.4 MAPK-Signalweg	38
1.4.1. ERK 1/2-Signalweg.....	40
1.4.2. p38 MAPK-Signalweg	40
1.4.3. SAPK/JNK-Signalweg	41
1.4.4. ERK 5-Signalweg.....	42
1.4.5. CREB-Signalweg	42
1.4.6. MAPK-Aktivierung durch GPCRs.....	43
1.5 Antikörper gegen den H ₄ R und andere GPCRs.....	45
1.6 Fragestellung	46
2. Material und Methoden	48
2.1. Material.....	48
2.1.1. Versuchstiere	48
2.1.2. Chemikalien.....	48
2.1.3. Medikamente für Tierversuche.....	50

2.1.4.	Gebrauchsfertige Lösungen und Kits	50
2.1.5.	Kulturmedien	51
2.1.6.	Puffer	51
2.1.7.	Zusätze für Zellkultur	53
2.1.8.	Stimuli	53
2.1.9.	Enzyme und Zytokine.....	53
2.1.10.	Antikörper.....	54
2.1.11.	Primer und Taq-Man Sonden	55
2.1.12.	Plasmide	55
2.1.13.	Baculovirus Überstände.....	55
2.1.14.	DNA- und Proteinstandards.....	56
2.1.15.	Eukaryotische Zelllinien und Bakterien	56
2.1.16.	Sonstige Verbrauchsmaterialien	56
2.1.17.	Geräte.....	57
2.1.18.	Computerprogramme.....	58
2.2.	Methoden	59
2.2.1.	Tierversuche	59
2.2.1.1.	<i>Akutes Ovalbumin-induziertes Asthmamodell</i>	59
2.2.1.2.	<i>Bronchoalveoläre Lavage und differenzierte Zellzählung</i>	60
2.2.1.3.	<i>Bestimmung der anti-OVA IgE Konzentration im Serum</i>	60
2.2.1.4.	<i>Zytokinanalyse mittels Multiplex Fluoreszent Bead Immunoassay (FBI)</i>	61
2.2.1.5.	<i>Histologische Untersuchungen der Lunge</i>	61
2.2.2.	Molekularbiologische Methoden.....	62
2.2.2.1.	<i>RNA-Extraktion aus Zellen</i>	62
2.2.2.2.	<i>Reverse Transkription</i>	62
2.2.2.3.	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	63
2.2.2.4.	<i>Elektrophoretische Auftrennung mittels Agerosegelelektrophorese</i>	64
2.2.2.5.	<i>Quantitative Real-Time PCR</i>	64
2.2.2.6.	<i>Extraktion von DNA aus Agarosegelen</i>	64
2.2.2.7.	<i>Ligation von aufgereinigten PCR-Produkten in Blunt-end Klonierungsvektor</i>	65
2.2.2.8.	<i>Lagerung und Kultivierung von E.coli Bakterien</i>	65
2.2.2.9.	<i>Herstellung hitzekompetenter Bakterien</i>	65

2.2.2.10.	<i>Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien (Hitzeschock-Methode)</i>	66
2.2.2.11.	<i>Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien</i>	66
2.2.2.12.	<i>Restriktionsschnitte</i>	67
2.2.2.13.	<i>Ligation</i>	68
2.2.2.14.	<i>Klonierungsstrategien der verwendeten Plasmide</i>	68
2.2.3.	<i>Zellbiologische Methoden</i>	74
2.2.3.1.	<i>Kultivierung von HEK293-Zellen</i>	74
2.2.3.2.	<i>Zellzählung</i>	74
2.2.3.3.	<i>Lagerung von HEK293-Zellen und stabilen mH₂R-Zellklonen</i>	74
2.2.3.4.	<i>Transfektion von HEK293-Zellen</i>	75
2.2.3.5.	<i>Stabile HEK293-Zelllinien</i>	75
2.2.3.6.	<i>Stimulation und Herstellung von Totallysaten aus HEK293-Zellen</i>	76
2.2.3.7.	<i>Stimulation von HEK293-Zellen für Real-Time PCR-Untersuchungen</i>	76
2.2.3.8.	<i>Inkubation von HEK293-Zellen mit Pertussis-Toxin</i>	77
2.2.3.9.	<i>Kultivierung von Sf9-Zellen</i>	77
2.2.3.10.	<i>Baculovirus Expression in Sf9-Zellen und Membranpräparation</i>	78
2.2.3.11.	<i>Infektion von Sf9-Zellen</i>	78
2.2.3.12.	<i>Isolation von peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC) aus Vollblut</i>	78
2.2.3.13.	<i>Herstellung einer Einzelzellsuspension aus der Milz von Mäusen</i>	79
2.2.3.14.	<i>Extrazelluläre FACS-Färbung</i>	79
2.2.3.15.	<i>Intrazelluläre FACS-Färbung</i>	80
2.2.4.	<i>Biochemische Methoden</i>	80
2.2.4.1.	<i>Proteinbestimmung nach Bradford</i>	80
2.2.4.2.	<i>Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	80
2.2.4.3.	<i>Western-Blot</i>	82
2.2.4.4.	<i>MAPK-Array</i>	83
2.2.4.5.	<i>Bestimmung der intrazellulären Calcium-Konzentration in HEK293-Zellen</i>	84
2.2.4.6.	<i>Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration in HEK293-Zellen</i>	85
2.2.4.7.	<i>Proteinbestimmung mit BCA-Assay</i>	86

3. Ergebnisse.....	87
3.1. Asthamamodell: Behandlung mit Mepyramin und JNJ7777120	87
3.1.1. Differenzierte Zellzählung in der BAL	87
3.1.2. Histologische Untersuchungen der Lunge.....	89
3.1.3. Bestimmung der anti-OVA IgE Titer und der Zytokin-Konzentrationen im Serum.....	92
3.2. Interaktion von mH ₁ R und mH ₄ R in einem HEK293-Zellmodell.....	94
3.2.1. Expression der rekombinanten Histaminrezeptoren in HEK293-Zellen.....	94
3.2.2. Einfluss von mH ₁ R und mH ₄ R auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration in HEK293-Zellen.....	97
3.2.3. Einfluss von mH ₁ R und mH ₄ R auf die Forskolin-induzierte intrazelluläre cAMP-Konzentration in HEK293-Zellen.....	100
3.2.4. Inhibition mit Pertussis-Toxin.....	103
3.2.4.1. Einfluss von Pertussis-Toxin auf die intrazelluläre Calcium- Konzentration	104
3.2.4.2. Einfluss von Pertussis-Toxin auf die Forskolin-induzierte intrazelluläre cAMP-Konzentration	105
3.2.5. Histamin-abhängige Phosphorylierung von Komponenten des MAPK- Signalwegs über den mH ₁ R und mH ₄ R.....	107
3.2.6. Histamin-abhängige Genexpression	110
3.2.6.1. Expression von <i>IL-8</i>	111
3.2.6.2. Expression von <i>EGR-1</i>	113
3.2.6.3. Expression von <i>c-Fos</i>	115
3.3. Spezifität von H ₄ R-Antikörpern	116
3.3.1. Evaluation der Spezifität von H ₄ R-Antikörpern mittels Durchflusszytometrie an infizierten SF9-Zellen	117
3.3.2. Evaluation der Spezifität von H ₄ R-Antikörpern im Western-Blot an infizierten Sf9-Zellen	118
3.3.3. Evaluation der Spezifität von H ₄ R-Antikörpern mittels Durchflusszytometrie an transfizierten HEK293-Zellen.....	119
3.3.4. Evaluation der Spezifität von H ₄ R-Antikörpern im Western-Blot an transfizierten HEK293-Zellen	121

3.3.5.	Evaluation der Spezifität von H ₄ R-Antikörpern mittels Durchflusszytometrie an Milzzellen von Wildtyp- und H ₄ R ^{-/-} -Mäusen	122
3.3.6.	Evaluation der Spezifität von H ₄ R-Antikörpern mittels Durchflusszytometrie an humanen B-Zellen	123
4.	Diskussion	125
4.1.	Asthmamodell: Behandlung mit Mepyramin und JNJ7777120	125
4.2.	Interaktion von mH ₁ R und mH ₄ R im HEK293-Zellmodell	131
4.2.1.	Expression von mH ₁ R und mH ₄ R im Zellmodell und funktionelle Analysen	131
4.2.2.	Aktivierung des MAPK-Signalwegs über mH ₁ R und mH ₄ R	137
4.2.3.	MAPK-vermittelte Genexpression über den mH ₁ R und mH ₄ R	144
4.3.	Spezifität von H ₄ R-Antikörpern	154
5.	Literaturverzeichnis	159
6.	Anhang	178
6.1.	Erklärung zur Dissertation	178
6.2.	Danksagung	179
6.3.	Lebenslauf	181
6.4.	Publiationsliste	182
6.5.	Veröffentlichte Abstracts von Postern und Vorträgen	183
6.6.	Qualifikationen und Fortbildungen	184
6.7.	Daten im Anhang	185

Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calcium-Konzentration
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
5-MH	5-Methylhistamin
AC	Adenylylzyklase
AcN	Acetonitril
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit/Hyperaktivitätsstörung
ALUM	Aluminiumhydroxid
AO	Aldehydoxidase
AP-1	activator protein 1
ASK	apoptosis signal regulating kinase
ATF	activating transcriptionfactor
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALf	BAL-Flüssigkeit
BMK	big MAPK
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calciumionen
CaM	Calmodulin
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Protein-Kinasen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-binding protein
CDC42	cell division control protein 42
CHOP oder GADD153	growth arrest and DNA damage inducible gene 153
CIAP	Calf intestinal alkaline phosphatase
CRE	cAMP-responsive element
CREB	cAMP responsive element-binding protein
DAG	Diacylglycerol
DAO	Diaminoxidase

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL-Zellen	enterochronaffine Zellen
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
ECP	eosinophil cationic protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGR-1	early growth response protein 1
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Elk-1	Ets-like transcription factor
EP	eosinophil peroxidase
Epac	exchange protein activated by cAMP
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FcεRI	Fcε-Rezeptor 1
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAP	GTPase-aktivierende Proteine
GEF	guanine-nucleotide exchange factor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	GPCR-Kinasen
GUS-β	β-Glucuronidase
h	Stunde
H ₁ R	Histamin-1-Rezeptor
H ₂ R	Histamin-2-Rezeptor
H ₃ R	Histamin-3-Rezeptor
H ₄ R	Histamin-4-Rezeptor
HA	Histamin
HDC	Histidindecaboxylase
hH _x R	humaner H _x R
HNMT	Histamin-N-Methyltransferase

HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase)
H _x R	Histaminrezeptor (allgemein)
i.p.	intraperitoneal
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IS	interner Standard
JAK	Janus-Kinasen
JNJ	JNJ7777120
JNK	c-jun-N-terminal kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molare Masse
MAO	Monoaminoxidase
MAP2K oder MKK	MAPK kinase
MAP3K	MAPK kinase kinase
MAP4K	MAPK kinase kinase kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKAPK	MAPK-activated protein kinase
MBP	major basic protein
MEF	monocyte enhancer factor
MEK	MAPK/ERK kinase
MEKK	MEK kinase
MeOH	Methanol
MEP	Mepyramin
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
mH _x R	muriner H _x R
min	Minute
ml	Milliliter
MLK	mixed-lineage kinase

mM	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MNK	MAPK-interacting kinase
mRNA	messenger RNA
MSK	MAPK/SAPK-activated kinase
NEA	nicht essentielle Aminosäuren
NGF	nerve growth factor
OVA	Ovalbumin
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PI	Protease-Inhibitor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PRAK	p38-regulated/activated kinase
PTX	Pertussis-Toxin
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
RAP1	Ras-related protein 1
Ras	rat sarcoma
RAS-GAP	RAS-GTPase-activating protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RSK	ribosomal S6 kinase
s	Sekunde
s.c.	subkutan
SAPK	stress-activated protein kinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
SRF	serum response factor

STAT	signal transducer and activator of transcription
TCF	ternary complex factor
TCR	T-Zellrezeptor
T _H -Zelle	T-Helfer Zelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TPL 2	tumor progression locus-2
WHO	World Health Organisation
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Asthma

Asthma bronchiale ist eine chronische entzündliche Erkrankung der Atemwege. Neben einer akuten und chronischen Entzündung geht diese mit einer bronchialen Hyperreagibilität und einer Atemwegsobstruktion einher. Weitere Kennzeichen sind eine massive Entzündung der Bronchialschleimhaut mit Ödembildung und die Hypersekretion von viskösem Schleim. Außerdem kommt es zu einer Infiltration von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und T-Lymphozyten in die Lunge (34, 144, 145). Man unterscheidet beim Asthma zwischen zwei Formen: dem allergischen (extrinsischen) und dem nicht allergischen (intrinsischen) Asthma (227). In den meisten Fällen kann diese Klassifizierung jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden, da Mischungen aus beiden Formen auftreten. Das extrinsische Asthma tritt häufig schon in der Kindheit auf. Dabei handelt es sich um eine durch Allergene ausgelöste Atemwegserkrankung, die sich bei entsprechender genetischer Veranlagung zur Atopie manifestiert. Charakteristisch für diese Form der Erkrankung ist ein Anstieg des antigenspezifischen Immunglobulintiters vom IgE Isotyp im Blut und eine erhöhte Eosinophilenzahl im Blut und in der bronchoalveolären Lavage (132). Der intrinsischen Form, die sich meist erst im mittleren Lebensalter entwickelt, geht häufig eine Infektion der Atemwege voraus (z.B. mit Staphylococcus, Rhinovirus, Adenovirus) (48). Reize, die die Erkrankung auslösen, können kalte Luft, chemische Reize, die Einnahme von Analgetika oder körperliche- oder psychische Belastungen sein.

Nach Schätzungen der World Health Organisation (WHO) leiden weltweit 235 Millionen Menschen unter Asthma. Bei Kindern ist Asthma die am häufigsten auftretende chronische Erkrankung. Trotz der immer besser werdenden medizinischen Versorgung nehmen allergische Erkrankungen der Atemwege weltweit stetig zu. In Deutschland leiden ca. 5 % der Erwachsenen und sogar 7 - 10 % der Kinder an Asthma; das macht zusammen mehr als 3 Millionen Menschen aus, die von der Erkrankung betroffen sind. Etwa ein Drittel von ihnen ist unter 15 Jahre alt. Im Kindesalter sind mehr Jungen betroffen als Mädchen, wobei sich diese geschlechtsspezifische Verteilung mit zunehmendem Alter wieder aufhebt (295). Obwohl Asthma mittlerweile sehr gut behandelbar ist, sterben in Deutschland jährlich etwa 5000 Menschen an den Folgen der Erkrankung. Ein häufiger Grund dafür ist die nicht ordnungsgemäße Einnahme der verordneten Medikamente. Auffallend ist, dass Asthma häufiger in westlichen Ländern auftritt und in Entwicklungsländern dagegen nicht so stark

verbreitet ist (11, 107, 159). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Asthma in ländlichen Gebieten nicht so häufig auftritt wie in Großstädten (286).

Die Erkrankung kann sich zu ganz unterschiedlichen Zeitpunkten des Lebens entwickeln. Zum einen kann Asthma schon im frühen Kindesalter auftreten, wobei es in vielen Fällen zu einem Rückgang der Erkrankung während der Pubertät kommt. In anderen Fällen treten bei Menschen, die in der Kindheit nicht betroffen waren, die ersten Symptome der Erkrankung erst im erwachsenen Alter auf (297). Außerdem wird vermutet, dass pränatale Faktoren bei der Entwicklung von Asthma eine Rolle spielen. Es konnte eine erhöhte Zahl an Asthmaerkrankungen bei Kindern festgestellt werden, deren Mütter während der Schwangerschaft geraucht haben (109). Auf der anderen Seite können der Aufenthalt in landwirtschaftlichen Betrieben und der Kontakt zu Tieren, Heu und Getreide während der Schwangerschaft die Prävalenz für die spätere Entwicklung von Asthma reduzieren (68).

1.1.1. Pathogenese des Asthma bronchiale

Bei der Pathogenese des Asthma bronchiale spielt die Lunge eine entscheidende Rolle. Über die Lunge werden täglich durchschnittlich zwischen 9000 und 12000 l Luft aufgenommen. Die Atemluft gelangt über die Trachea, die sich in die beiden Hauptbronchien teilt, weiter in kleinere Bronchien und Bronchiolen und schließlich in die Alveolen. Die Alveolen sind von einem Kapillarnetz durchzogen, wodurch der Gasaustausch mit dem Blut stattfinden kann. Durch die Verästelungen weist die Lunge eine sehr große respiratorische Oberfläche von etwa 150-200 m² auf. Diese riesige Fläche kommt bei der Atmung mit der Umgebungsluft und auch mit möglicherweise darin enthaltenen Allergenen in Kontakt. Allergene, die in die Lunge gelangen, können entzündliche Prozesse hervorrufen.

Die Entstehung des Asthma bronchiale kann in zwei Phasen unterteilt werden: die Sensibilisierungs- und die Provokationsphase. Die Sensibilisierung (Abbildung 1) beschreibt den ersten Kontakt mit dem inhalierten Allergen und ist abhängig von der Fähigkeit des Allergens, eine T_H2-Zellantwort auszulösen (83). Das Allergen wird von dendritischen Zellen, die in der Bronchialschleimhaut lokalisiert sind, aufgenommen und prozessiert (104, 285). Dabei wird es in den dendritischen Zellen von dem Enzym Cathepsin S in kurze Peptide gespalten, die anschließend an MHC II Moleküle gebunden werden und so auf der Zelloberfläche erscheinen (233). Die dendritischen Zellen wandern daraufhin mit dem Allergenpeptid in den drainierenden Lymphknoten und präsentieren es dort naiven T-Lymphozyten. Um eine entsprechende T-Zelle zu aktivieren, sind zwei Signale

erforderlich. Zum einen muss die T-Zelle das MHC-gebundene Peptid auf der Oberfläche der dendritischen Zelle mithilfe ihres T-Zellrezeptors als fremd erkennen. Nur eine von 10^4 bis 10^6 T-Zellen hat einen spezifischen T-Zellrezeptor für das entsprechende Allergen. Zum anderen ist eine Aktivierung über co-stimulatorische Moleküle erforderlich. Hierfür spielt die Interaktion des CD 86 Moleküls auf der dendritischen Zelle mit dem CD 28 Molekül auf der T-Zelle eine entscheidende Rolle (117, 161). Die Aktivierung der T-Zelle durch dendritische Zellen in Gegenwart des Zytokins IL-4 bewirkt zum einen eine Polarisation zu T_H2 -Zellen und zum anderen eine Proliferation der T-Zellen. Polarisierte T_H2 -Zellen sezernieren hauptsächlich die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 (145), die für den weiteren Prozess von entscheidender Bedeutung sind.

Eine weitere wichtige Rolle bei der Immunantwort spielen die B-Zellen. Naive B-Zellen zirkulieren im Blut und in der Lymphe und können dort Allergene erkennen. B-Zellen erkennen und binden komplette Allergene mithilfe ihrer spezifischen B-Zellrezeptoren. Es ist keine Prozessierung zu kleineren Peptidstücken und keine Präsentation über MHC-Moleküle erforderlich, wie es bei T-Zellen der Fall ist. Durch die Allergenbindung und das von aktivierten T_H2 -Zellen gebildete IL-4 werden die B-Zellen aktiviert und wandern in die Keimzentren der Lymphknoten. Außerdem bilden die B-Zellen allergenspezifische Antikörper und es kommt zu einer klonalen Expansion. Die von den T_H2 -Zellen sezernierten Zytokine regen die aktivierten B-Zellen zur Differenzierung zu sogenannten Plasmazellen an. Plasmazellen bilden kontinuierlich allergenspezifische Immunglobuline, wodurch die allergenspezifische Immunantwort aktiviert wird. Naive B-Zellen bilden vor allem Immunglobuline vom Typ IgM und IgD, die hauptsächlich als Membran-integrierte Proteine exprimiert werden. Durch die von der T_H2 -Zelle gebildeten Zytokine und ein Co-stimulatorisches über CD 40 und CD 40 Ligand vermitteltes Signal, kommt es zu einer sogenannten „class switch recombination“. Dadurch werden hauptsächlich Immunglobuline vom IgE-Typ sezerniert (244). Das allergenspezifische IgE zirkuliert eine gewisse Zeit im Blut und kann dann in das periphere Gewebe diffundieren. Dort bindet es mit seinem Fc-Teil an Fcε-Rezeptoren I (FcεRI) auf der Oberfläche von Mastzellen (83). Die aktivierten T_H2 -Zellen und die mit Antikörpern beladenen Mastzellen können über die Blutbahn ins Lungengewebe einwandern. Die gesamte Sensibilisierung verläuft ohne erkennbare Symptome.

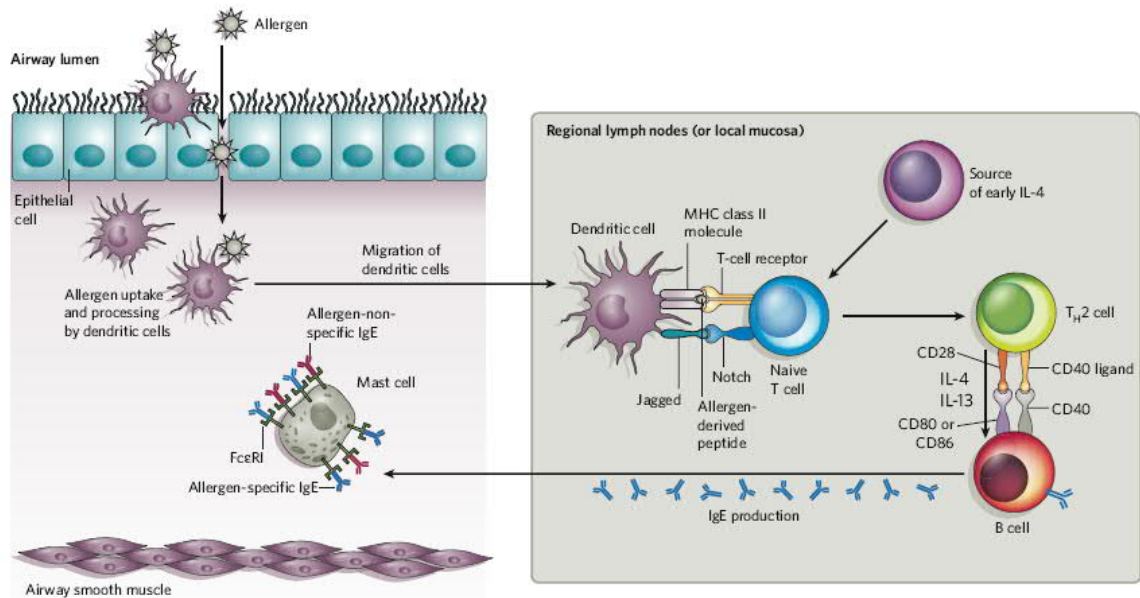


Abbildung 1: Sensibilisierungsreaktion mit einem Allergen in der Lunge. (83)

Als Provokation wird der erneute Kontakt mit dem Allergen nach erfolgter Sensibilisierung bezeichnet (Abbildung 2). Das Allergen bindet an die spezifischen IgE-Moleküle auf der Oberfläche der Mastzellen und quervernetzt diese. In dieser akuten Sofortreaktion, die innerhalb von wenigen Minuten abläuft, werden Mediatoren wie Prostaglandine, Bradykinin, Histamin und verschiedene Leukotriene aus den Granula der Mastzellen freigesetzt (22). Histamin ist dabei maßgeblich an den frühen klinischen Symptomen beteiligt. Es bewirkt eine Kontraktion in der glatten Muskulatur der Bronchien (Bronchiokonstriktion), sodass der Durchmesser der Bronchien verengt wird. Außerdem kommt es zur Gefäßerweiterung (Vasodilatation) und zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität, die wiederum zur Ödembildung in der Bronchialschleimhaut führt. Eine weitere Ursache der Histaminfreisetzung ist die vermehrte Bildung von zähem Schleim, der kaum abgehustet werden kann. Durch all diese Parameter wird der Durchmesser der Bronchien deutlich verringert, wodurch es zur Kurzatmigkeit kommt (25). Mastzellen leiten ebenfalls den Übergang in die späte Phase ein (Abbildung 3). Sie begünstigen das Einwandern von Leukozyten aus dem Blut in das Lungengewebe, indem sie einerseits die Anzahl an Adhäsionsmoleküle auf den Gefäßendothelzellen hochregulieren (90) und auf der anderen Seite chemotaktische Mediatoren und Zytokine sezernieren, die das Einwandern von anderen Immunzellen steuern (83).

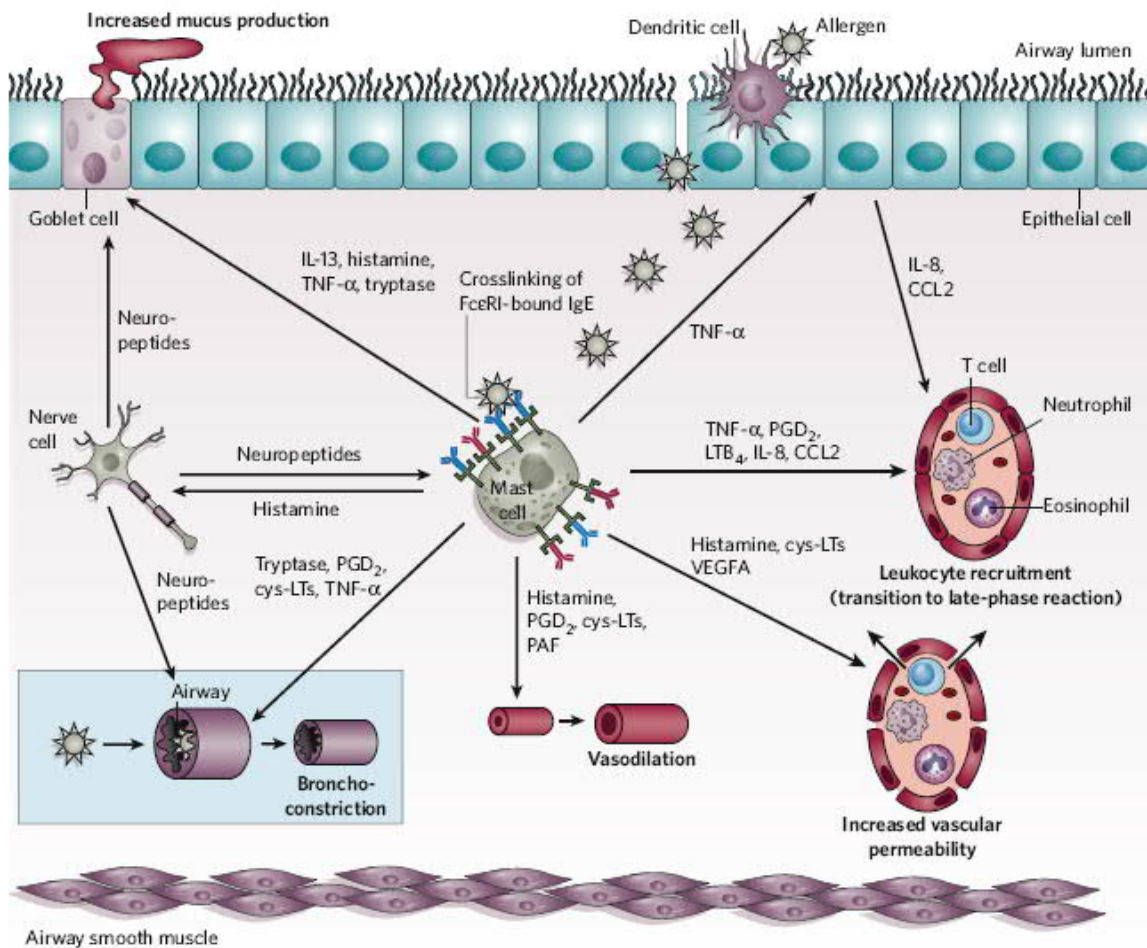


Abbildung 2: Frühe Phase der Allergen-induzierten Atemwegentzündung (83).

Durch die Aktivierung der Mastzellen über FcεRI werden weiterhin Zytokine wie TNF-α, IL-4 und IL-5 und IL-6 aus den Granula der Mastzellen freigesetzt. Chemokine wie IL-8 konnten ebenfalls in aktivierten Mastzellen nachgewiesen werden (23, 24, 154). Außerdem wird die Transkription und Synthese dieser Zytokine induziert, die im weiteren Verlauf über einen Zeitraum von 72 h abgegeben werden können (216, 234). In der Lunge wird das Allergen aber auch erneut von antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen, Monozyten und B-Zellen aufgenommen, in Form von kurzen Peptiden über MHC-Moleküle auf der Oberfläche präsentiert und kommt so mit den proliferierten antigenspezifischen T_H2-Zellen in Kontakt. Für die T_H-Zellaktivierung über B-Zellen ist ein zweites Signal über CD40 und CD40 Ligand erforderlich. Die T_H2-Zellen sezernieren nach Aktivierung in der sogenannten Spätphase Zytokine wie IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 und granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (145) und können zusammen mit den Mastzellmediatoren eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten und Monozyten

rekrutieren, die aus der Blutbahn in das Lungengewebe einwandern (22). Mediatoren, die von diesen Zellen gebildet werden, lösen ebenfalls eine Bronchialobstruktion, eine Ödembildung und eine Dyskrie aus. Eosinophile Granulozyten geben unter anderem toxische Mediatoren wie major basic protein (MBP), eosinophil peroxidase (EP) und eosinophil cationic protein (ECP) ab, die zusätzlich eine Zerstörung des Bronchialepithels, eine Hyperplasie der glatten Muskel- und Drüsenzellen, sowie eine Verdickung der Basalmembran verursachen (140). Basophile Granulozyten werden über ähnliche Mechanismen wie eosinophile Granulozyten in das Gewebe rekrutiert. Ihre genaue Funktion in der akuten und chronischen Phase ist allerdings bisher nicht bekannt. Monozyten differenzieren zu Makrophagen und dendritischen Zellen unter Stimulation mit GM-CSF, welches von den aktivierten T_H2-Zellen gebildet wird. Makrophagen spielen bei der Pathogenese der Erkrankung ebenfalls eine entscheidende Rolle, da sie durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies eine Schädigung des Lungengewebes hervorrufen (117). Die Freisetzung von Elastasen durch neutrophile Granulozyten aktiviert Matrix-Metalloproteasen (MMP), die zur Degradierung von Typ III Kollagen führen (83).

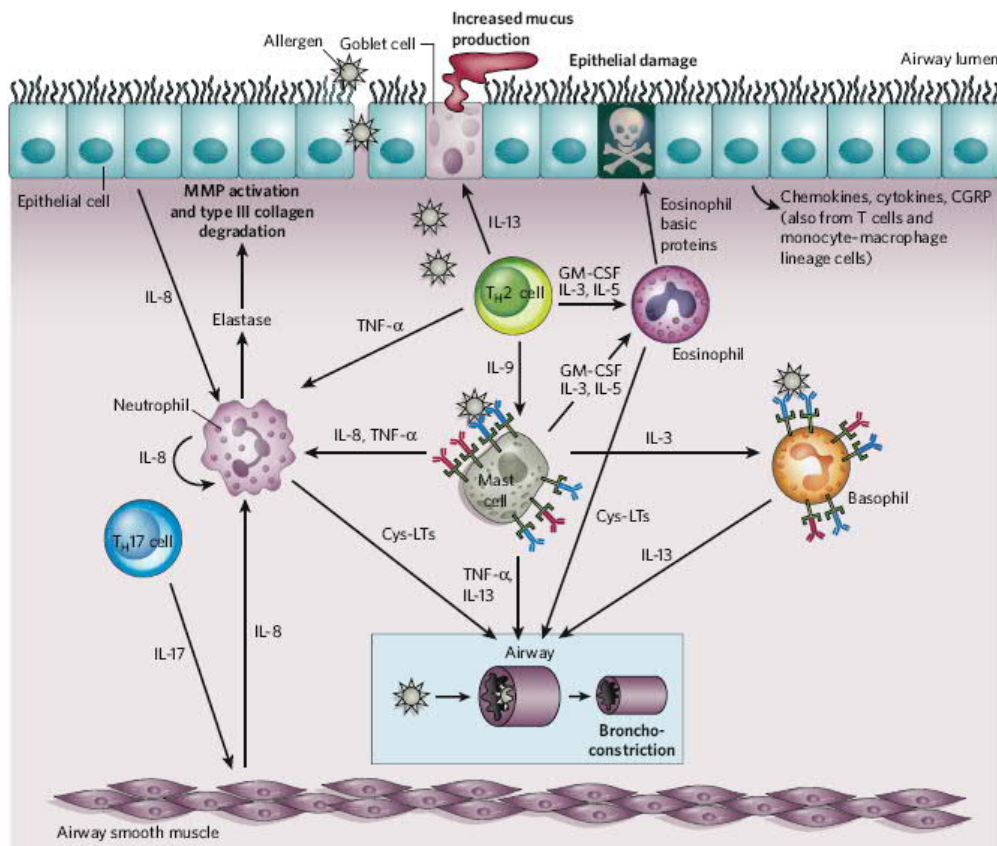


Abbildung 3: Späte Phase der Antigen-induzierten Atemwegsentzündung (83).

Bei einer dauerhaften oder häufig wiederholten Exposition mit dem Allergen kommt es zu einer chronischen Entzündung der Atemwege. In der Lunge und im Lungengewebe ist dauerhaft eine erhöhte Anzahl an adaptiven und angeborenen Immunzellen zu finden, die Mediatoren abgeben und dadurch die Entzündung aufrechterhalten. Es kommt zu einer Veränderung des Lungengewebes, die als Remodeling bezeichnet wird. Im Lungenepithel ist eine erhöhte Anzahl an Schleim-produzierenden Becherzellen zu finden. Außerdem produzieren die Epithelzellen vermehrt Zytokine und Chemokine und es kommt zu einer erheblichen Entzündung der Submucosa. Es werden vermehrt Myofibroblasten gebildet und die Durchblutung wird verstärkt. Außerdem nimmt die Größe, Anzahl und Funktion der glatten Muskelzellen zu, was eine verdickte Atemwegsmuskulatur zur Folge hat (83, 116, 190).

1.1.2. Therapie von allergischem Asthma

Bisher gibt es beim Asthma, genau wie bei allen anderen Allergien, keine Möglichkeit, die Erkrankung ursächlich zu behandeln oder die Entstehung zu verhindern. Daher kann bei diesen Erkrankungen nur eine Behandlung der Symptome erfolgen, sodass möglichst eine normale Lungenfunktion erreicht und die normale körperliche Aktivität aufrechterhalten werden kann.

Zur symptomatischen Behandlung können Substanzen verabreicht werden, die die Entzündung unterdrücken oder solche, die bronchospasmolytisch wirken. Eine Möglichkeit, die Entzündungsreaktion in der Bronchialschleimhaut zu verringern, ist die Gabe von Pharmaka wie Cromoglicinsäure oder Nedocromil, die die Mediatorfreisetzung aus den Mastzellen verhindern. Der genaue Mechanismus dieser Hemmung ist noch nicht eindeutig geklärt. Allerdings wurde in aktivierten Mastzellen eine Blockade von Chloridkanälen nachgewiesen, die die Freisetzung von Entzündungsmediatoren verhindert. Eine weitere Möglichkeit, die Entzündungsreaktion zu kontrollieren, ist die Gabe von Glucocortikoiden. Diese Medikamente weisen eine gute antiphlogistische Wirkung auf, haben bei inhalativer Verabreichung allerdings einen relativ langen Wirkungseintritt und eignen sich daher nur zu einer längerfristigen Anfallsprophylaxe. Die systemische Gabe von Glucocortikoiden erfolgt nur bei schweren Asthmaanfällen, weil über einen längeren Zeitraum erhebliche Nebenwirkungen auftreten.

Zur Behandlung der Bronchialobstruktion werden hauptsächlich β_2 -Agonisten eingesetzt. Diese bewirken durch Aktivierung von β_2 -Adrenorezeptoren eine Erschlaffung der

Bronchialmuskulatur. Kurzwirksame β_2 -Sympatomimetika werden daher bedarfsorientiert zur Behandlung von akuten Asthmaanfällen eingesetzt. Für eine längerfristige Therapie und Anfallsprophylaxe werden länger wirksame β_2 -Agonisten eingesetzt. Eine längere Wirkdauer kann z.B. erreicht werden, wenn die Substanzen als sogenannte Prodrugs verabreicht werden, die erst im Blut oder im Gewebe in ihre eigentliche Wirkform umgewandelt werden. Bei schweren Symptomen wird zusätzlich das Xantin-Derivat Theophyllin eingesetzt, welches ebenfalls ein starkes Bronchospasmolytikum ist und zusätzlich die Mediatorfreisetzung hemmt. Die Wahl und Kombination der eingesetzten Medikamente sowie deren Dosierung und Applikationshäufigkeit sind abhängig von der Schwere der Erkrankung.

Kausale Therapiemöglichkeiten, die auf der Ebene Allergen-Antikörper-Reaktion ansetzen, sind zum einen Karenzmaßnahmen durch die Ausschaltung von Triggerfaktoren. Dies kann zum Beispiel befristet durch einen Aufenthalt im Hochgebirge oder an der See erreicht werden. Eine weitere Möglichkeit ist eine Desensibilisierung mit dem entsprechenden Allergen. Dabei muss das entsprechende Allergen bekannt sein und es darf sich nicht um eine Allergie gegen sehr viele verschiedene Allergene handeln. Eine Desensibilisierung muss möglichst im frühen Stadium durchgeführt werden, da die Erfolgschancen bei längerem Bestehen der Erkrankung und höherem Lebensalter abnehmen (33, 206).

Zur Behandlung von IgE-vermittelten allergischen Reaktionen werden häufig Histamin-1-Rezeptor (H_1R)-Antagonisten erfolgreich eingesetzt. Obwohl Histamin einer der Hauptmediatoren ist, der durch die Degranulierung von Mastzellen freigesetzt wird und die meisten Symptome auslöst, zeigen diese Substanzen in der Asthmatherapie keine Wirkung. Neuen Forschungsberichten zur Folge könnte der Histamin-4-Rezeptor (H_4R), ein weiterer Histaminrezeptorsubtyp (siehe 1.3.1), bei der Pathogenese des Asthma bronchiale eine bedeutende Rolle spielen. In einem experimentellen Mausasthmodell konnte die Antagonisierung dieses Rezeptors sowohl in der Sensibilisierungs- als auch in der Provokationsphase zu einer deutlichen Verbesserung der Symptome führen (70). Außerdem konnte gezeigt werden, dass möglicherweise die Therapie mit H_1R - und H_4R -Antagonisten beim Asthma (13) und bei anderen allergischen entzündlichen Erkrankungen (278) einen neuen Therapieansatz darstellt.

1.2 Histamin

Histamin (2-(4-Imidazolyl)-ethylamin) ist ein biogenes Amin, welches im Jahr 1910 erstmals durch den britischen Pharmakologen Sir Henry Dale in Mutterkornextrakten nachgewiesen werden konnte (49). Wenig später konnte Histamin aus einer Vielzahl von Geweben isoliert werden, was vermuten ließ, dass es eine wichtige Funktion im Körper ausübt (16).

1.2.1. Biosynthese von Histamin

Histamin wird durch eine Pyridoxalphosphat-abhängige Decarboxylierung aus der Aminosäure L-Histidin gebildet. Diese Reaktion wird durch die Histidindecarboxylase (HDC) katalysiert (256) (Abbildung 4).

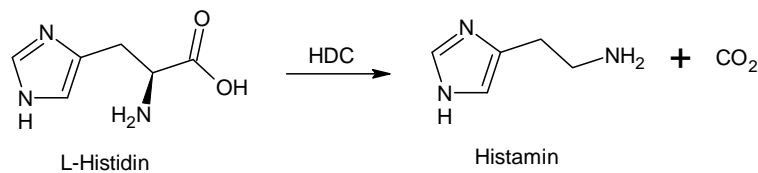


Abbildung 4: Histamin entsteht durch Decarboxylierung von L-Histidin.

Es gibt zwei Gruppen von Zellen, die in der Lage sind, Histamin zu bilden. Mastzellen, basophile Granulozyten, histaminerge Neurone und enterochromaffine (ECL)-Zellen der Magenwand können Histamin nach der Synthese in intrazellulären Granula speichern, wo es in inaktiver Form gebunden an Heparin vorliegt. Durch verschiedenste Stimuli kommt es zur Degranulierung dieser Zellen und damit zur Freisetzung des Histamins (10, 185). Reife Mastzellen befinden sich vor allem im Bindegewebe und in der Haut aber auch in der Lunge und im Gastrointestinaltrakt. Sie können bis zu 1000 Histamin-gefüllte Granula enthalten (303). Basophile Granulozyten, die ebenfalls Histamin in intrazellulären Granula speichern können, zirkulieren im Blut und können bei Bedarf ins Gewebe rekrutiert werden (291). Zu der zweiten Gruppe von Zellen, die Histamin produzieren können, gehören z.B. Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen. Diese Zellen exprimieren das Enzym HDC und sind damit in der Lage, Histamin zu bilden. Allerdings kann dies nicht intrazellulär gespeichert werden, sondern wird direkt sekretiert. Die Histaminsynthese kann in diesen Zellen durch spezifische Stimuli über die Expression der HDC reguliert werden (74, 250). Bei der Regulation der HDC-Aktivität sind vor allem Zytokine wie IL-1, IL-3, IL-12, GM-CSF und TNF- α von Bedeutung (136, 304).

Histamin ist ein wichtiger Mediator verschiedener physiologischer Prozesse, wie z.B. der Immunmodulation, der Zelldifferenzierung und Zellproliferation sowie der Magensäuresekretion und der Neurotransmission. Außerdem wird Histamin eine Rolle bei pathologischen Prozessen wie Allergie, Asthma und der Tumorentstehung zugeschrieben.

1.2.2. Metabolisierung von Histamin

Histamin kann über zwei verschiedene Wege metabolisiert werden. Eine Möglichkeit stellt die oxidative Desaminierung der primären Aminogruppe des Histamins dar. Diese Reaktion wird durch Diaminoxidasen (DAO) und Aldehydoxidasen (AO) katalysiert, wodurch Histamin zuerst zu Imidazolylaldehyd und dann zu Imidazolyllessigsäure oxidiert wird. Nach anschließender Ribosylierung kann es über die Niere ausgeschieden werden (Abbildung 5A). Über den zweiten Metabolisierungsweg wird Histamin durch das Enzym Histamin-N-Methyltransferase (HNMT) zu N-Methylhistamin abgebaut. Dabei wird eine Methylgruppe von S-Adenosyl-L-Methionin auf das Stickstoffatom am Imidazolring des Histamins übertragen. Durch eine anschließende oxidative Desaminierung mit Hilfe von Monoamin (MAO)-, Diamin (DAO)- und Aldehydoxidasen (AO) wird N-Methylhistamin zu N-Methylimidazolyllessigsäure abgebaut (10, 247, 248) (Abbildung 5B).

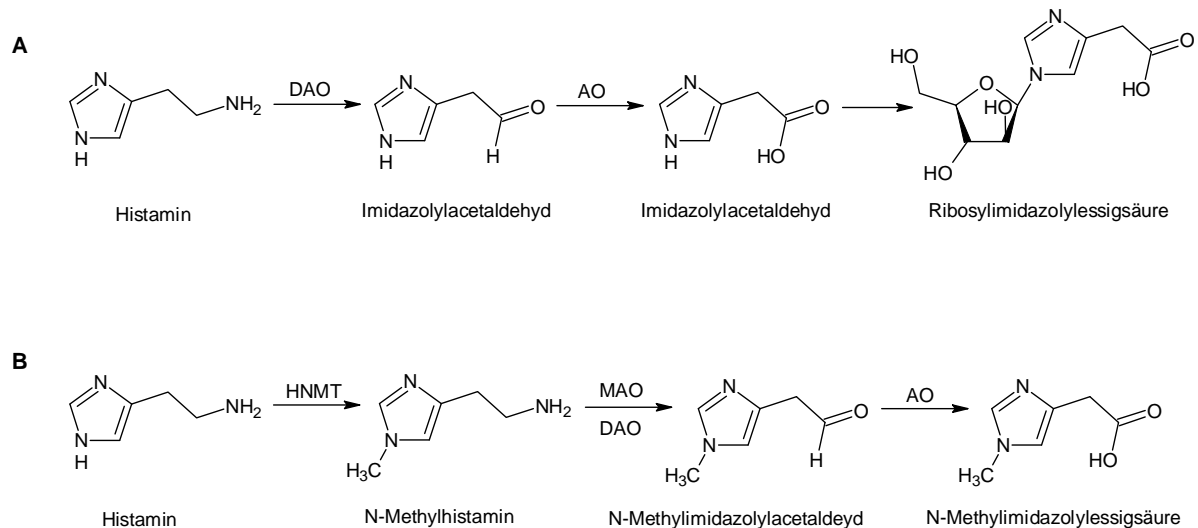


Abbildung 5: Metabolisierung von Histamin. Diaminoxidasen (DAO) und Aldehydoxidasen (AO) katalysieren eine oxidative Desaminierung der primären Aminogruppe. Histamin wird über Imidazolylaldehyd zu Imidazolyllessigsäure oxidiert (A). Alternativ katalysiert die Histamin-N-Methyltransferase (HNMT) den Abbau zu N-Methylhistamin gefolgt von einer Oxidation zu N-Methylimidazolyllessigsäure, die durch Monoamin (MAO)-, Diamin (DAO)- und Aldehydoxidasen (AO) katalysiert wird (B).

Über welchen Weg Histamin abgebaut wird, ist von der jeweiligen Lokalisation abhängig. Die DAO ist in membrangebundenen Vesikeln von Epithelzellen gespeichert und wird nach Stimulation ins Blut sezerniert (257, 258). Daher inaktiviert die DAO hauptsächlich extrazelluläres Histamin, was z.B. über Histamin-reiche Nahrung aufgenommen wird. Dagegen ist die HNMT ein zytosolisches Protein, welches Histamin nur intrazellulär metabolisiert (29, 152, 157). Wegen dieser unterschiedlichen Lokalisation konkurrieren die beiden Enzyme nicht um das Substrat, obwohl sie eine ähnliche Affinität zu Histamin aufweisen (185). HNMT wird in den meisten Geweben exprimiert. Die höchste Konzentration konnte in der Niere und Leber nachgewiesen werden. Im Bronchialepithel wird HNMT eine wichtige Rolle beim Abbau von Histamin zugeschrieben (301). Die Expression von DAO ist auf spezifische Gewebe begrenzt. Die höchste Aktivität konnte im Darm (18, 229), in der Plazenta und in der Niere nachgewiesen werden (152, 258).

1.3 Histaminrezeptoren

Die Wirkung von Histamin wird über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) vermittelt, die sieben Transmembrandomänen aufweisen. Wenn Histamin an den Rezeptor bindet, koppelt das G-Protein an den intrazellulären C-Terminus des Rezeptors (Abbildung 6).

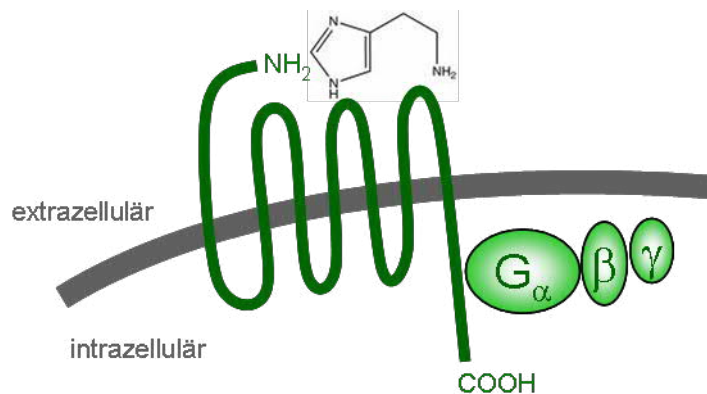


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Histaminrezeptors. Der Rezeptor weist sieben Transmembrandomänen auf. Der N-Terminus und die Histamin-Bindungsstelle befindet sich extrazellulär, der C-Terminus auf der intrazellulären Seite kann an das G-Protein koppeln.

Gleichzeitig mit der G-Protein-Kopplung an den Rezeptor dissoziiert das an die α -Untereinheit des G-Proteins gebundene GDP ab. Es entsteht der so genannte ternäre Komplex bestehend aus Histamin, dem GPCR und dem nucleotidfreien heterotrimeren G-Protein. In diesem Zustand hat der Rezeptor die größte Affinität zum Histamin. Sobald GTP an die

G_{α} -Untereinheit bindet, löst sich der ternäre Komplex auf. Dadurch wird die Affinität des Rezeptors zum Histamin herabgesetzt und das Histamin dissoziiert vom Rezeptor ab. Zusätzlich dissoziiert die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins von der GTP-gebundenen α -Untereinheit. G_{α} -GTP ist die aktive Form der α -Untereinheit, die mit Effektoren der Signaltransduktion interagieren kann, wodurch es zur Regulation von *second messengern* wie z.B. zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) oder Calcium (Ca^{2+}) kommt. Die $\beta\gamma$ -Untereinheit kann ebenfalls mit Effektormolekülen interagieren und so deren Aktivität beeinflussen. Anschließend wird das an die α -Untereinheit gebundene GTP durch die intrinsische GTPase-Aktivität zu GDP und einem freien anorganischen Phosphatrest gespalten. Dadurch kann GDP- G_{α} mit der $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit reassoziieren und das komplette G-Protein steht wieder für einen neuen Zyklus bereit (Abbildung 7) (253).

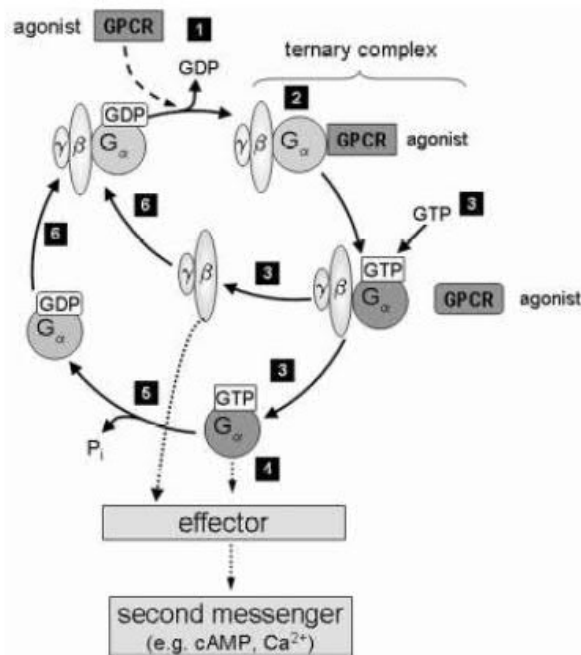


Abbildung 7: Schematische Darstellung des G-Proteinzyklus. Ein mit einem Agonist besetzter Rezeptor interagiert mit der inaktiven Form der G_{α} -Untereinheit des G-Proteins und bewirkt dadurch die Dissoziation von GDP (1). Es wird der so genannte „Ternäre Komplex“ bestehend aus Agonist, Rezeptor und Nucleotid-freiem G-Protein gebildet (2). Wenn GTP an die α -Untereinheit bindet, löst sich zum einen der Agonist vom Rezeptor und zum anderen dissoziieren die GTP-gebundene α -Untereinheit und die $\beta\gamma$ -Untereinheit (3). Sowohl die aktive GTP-gebundene Form der α -Untereinheit sowie die $\beta\gamma$ -Untereinheit können die Aktivität von Effektormolekülen regulieren (4). Das an die G_{α} -Untereinheit gebundene GTP wird später zu GDP und einem anorganischem Phosphatrest gespalten (5). G_{α} -GDP kann anschließend mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit reassoziieren und das G-Protein steht für einen neuen Zyklus zur Verfügung (6). (253)

1.3.1. Vorkommen und Funktion von Histaminrezeptoren

Zurzeit sind vier verschiedenen Histaminrezeptorsubtypen bekannt, die in der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit H₁R, H₂R, H₃R und H₄R benannt wurden. Die vier beschriebenen Histaminrezeptoren sind auf verschiedenen Zellen exprimiert und interagieren mit unterschiedlichen G-Proteinen. Dementsprechend werden ihnen verschiedene Funktionen zugeschrieben (137, 177), die in Tabelle 1 zusammengefasst sind.

Tabelle 1: Expression und Funktion von Histaminrezeptoren

H_xR	Expression	Wirkung	Funktion	G-Protein	Signalweg	Agonisten	Antagonisten
H₁R	Bronchien Darm Arteriolen ZNS Immunzellen	Kontraktion glatte Muskulatur Vasodilatation Vigilanz Regulation Zytokinsynthese	Akute allergische Reaktion	G α_q	Ca ²⁺ \uparrow cAMP \uparrow	Experimentell	Typ I Allergien (außer Asthma) Sedation
H₂R	Magen- schleimhaut Herzmuskel Arteriolen Immunzellen	Magensäure- sekretion Tachykardie Positive Inotropie Vasodilatation Regulation Zytokinsynthese	Magensäure- Sekretion	G α_s	cAMP \uparrow	Akute Herz- insuffizienz?	Säure-bedingte Magenerkrankungen
H₃R	Neuronale Zellen	Regulation Neurotransmitter- freisetzung	Neuro- transmitter	G $\alpha_{i/o}$	cAMP \downarrow Ca ²⁺ -Kanäle \downarrow	Schlaf- störungen, Analgese, Migräne?	Kognitive Störungen, Fettleibigkeit, Epilepsie?
H₄R	Immunzellen	Regulation Chemotaxis und Zytokinsynthese	Immun- modulator	G $\alpha_{i/o}$	Ca ²⁺ \uparrow cAMP \downarrow	Experimentell	Entzündliche Erkrankungen (Asthma, rheumatoide Arthritis, Lupus Erythematodes, Pruritus)?

1.3.1.1. Histamin-1-Rezeptor

Der H₁R wurde erst im Jahr 1991 kloniert (81, 299), obwohl er schon lange vorher pharmakologisch charakterisiert worden ist (20, 72). Die Expression des H₁R konnte auf vielen verschiedenen Zelltypen, wie Endothelzellen des Gefäßsystems, glatten Muskelzellen, Hepatozyten und Zellen des Atmungstraktes und des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden (103, 137). Auf B- und T-Zellen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen ist der H₁R ebenfalls zu finden (5, 169).

Der H₁R koppelt an G_{q/11}-Proteine (172). Durch die Bindung von Histamin an den Rezeptor wird das G-Protein aktiviert, was zu einer Stimulation der Phospholipase C (PLC) durch die G_α-Untereinheit führt. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG), zwei Signalmolekülen, die in der Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen (5). IP₃ induziert vornehmlich einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i) in der Zelle, der durch die Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern, aber auch durch den Ca²⁺-Einstrom aus dem Extrazellularraum begründet ist (102). DAG dagegen aktiviert die Proteinkinase C (PKC) (188). Die Aktivierung des H₁R kann außerdem zu einer Akkumulation des *second messengers* cAMP führen. Der Mechanismus, der zu diesem histaminabhängigen cAMP-Anstieg führt, ist nicht vollständig geklärt. Marley et al. (187) und Garberg et al. (87) konnten einen Zusammenhang zwischen der cAMP-Konzentration und der Menge an extrazellulär und intrazellulär vorliegendem Ca²⁺ zeigen, wogegen Maruko (188) eine direkte Aktivierung der Adenylylzyklase durch die βγ-Untereinheit des G_q-Proteins postuliert. Der über den H₁R vermittelte cAMP-Anstieg könnte ebenfalls in der Aktivierung der PKC durch DAG begründet sein (66). Eine weitere mögliche Erklärung von Francis et al. (80) beschreibt eine Aktivierung von Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Protein-Kinasen (CaMK) durch den Anstieg der [Ca²⁺]_i. CaMK sind Serin/Threonin-spezifische Proteinkinasen und können das ‚cAMP-responsive element-binding protein‘ (CREB) durch Phosphorylierung aktivieren, wodurch es zu einer CRE-vermittelten Transkription und zu einer cAMP-Erhöhung kommt.

Die erhöhte [Ca²⁺]_i in den Zellen bewirkt eine Kontraktion der glatten Muskulatur in den Bronchien und im Ileum und hat zusätzlich am Herzen einen negativen ionotropen Effekt (112, 278). Histamin induziert über den H₁R ebenfalls eine Vasodilatation und eine erhöhte Gefäßpermeabilität (94). Über einen indirekten Mechanismus kann über den H₁R eine Gefäßerweiterung der Arteriolen vermittelt werden. Durch Ca²⁺/Calmodulin wird die NO-

Synthese stimuliert und das gebildete NO führt zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur der Arteriolen (79).

Die erhöhte Gefäßpermeabilität ist auf eine H₁R-vermittelte Kontraktion der F-Aktin-Fasern im Zytoskelett der Endothelzellen zurückzuführen. Dadurch entstehen Lücken im Zellverband der Venolen, und Blutbestandteile können in das Gewebe auswandern und lösen die klassischen Symptome einer allergischen Entzündung wie Juckreiz, Ödembildung, Hautrötung und Schmerz aus (5). Auch die Symptome von allergischer Rhinitis, atopischer Dermatitis, Konjunktivitis, Nesselfieber, Asthma und anaphylaktischen Reaktionen werden durch Histamin über den H₁R ausgelöst (136). Über die Expression auf T-Zellen können immunmodulatorische Effekte über den H₁R vermittelt werden. Der H₁R ist hauptsächlich auf T_H1-Zellen exprimiert, während auf T_H2-Zellen der H₂R dominiert. Die Stimulation mit Histamin induziert eine über den H₁R vermittelte T_H1-Antwort, wohingegen die T_H1- und die T_H2-Antwort über den H₂R durch verschiedene biochemische Signale negativ reguliert werden. Untersuchungen an T-Zellen von H₁R^{-/-}-Mäusen ergab eine verminderte Expression von IFN- γ und eine erhöhte Sekretion der T_H2-Zytokine IL-4 und IL-13 (137).

Die Wirkung von Histamin über den H₁R spielt im zentralen Nervensystem (ZNS) ebenfalls eine bedeutende Rolle. Histaminerge Neuronen modulieren im ZNS das Schmerzempfinden. Außerdem werden wichtige Funktionen wie der Schlaf-Wach-Rhythmus, die Temperaturregulation, osmotische Homöostase, die Lokomotion, aber auch Lernvorgänge und die Gedächtnisbildung über Histamin reguliert (103).

H₁R-Antagonisten werden erfolgreich für die Behandlung von entzündlichen allergischen Erkrankungen eingesetzt. Durch den Einsatz von H₁R-Antagonisten der 1. Generation treten allerdings häufig Müdigkeit und andere durch die Effekte im ZNS bedingte Nebenwirkungen auf. H₁R-Antagonisten der 2. Generation können die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren und stellen einen deutlichen Therapiefortschritt dar, da sie diese unerwünschten Nebenwirkungen nicht aufweisen (77).

1.3.1.2. Histamin-2-Rezeptor

Der H₂R ist ebenfalls wie der H₁R pharmakologisch charakterisiert worden (20, 72) lange bevor das codierende Gen kloniert wurde (85, 86). Ähnlich wie der H₁R ist er in nahezu allen peripheren Geweben und im ZNS exprimiert. Die Bindung von Histamin an den H₂R bewirkt eine Konformationsänderung und damit die Aktivierung von G_s-Proteinen (112). Die G α -Untereinheit kann direkt sämtliche Adenylylzyklase-Isoformen aktivieren, wodurch es zu

einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration kommt (106). Neben einem Konzentrationsanstieg des *second messengers* cAMP wurde über den H₂R auch eine Aktivierung des PLC-Signalwegs beschrieben, der eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration bewirkt (61). Der Calciumanstieg ist dabei von der intrazellulären cAMP-Konzentration unabhängig und die Freisetzung von Ca²⁺ verläuft vermutlich über eine Kopplung des H₂R an ein anderes G-Protein (198, 288).

Eine Aktivierung des H₂R stimuliert die Magensäuresekretion in den Parietalzellen der Magenschleimhaut (20, 269). Außerdem konnte über den H₂R eine relaxierende Wirkung von Histamin an der glatten Muskulatur des Atmungstraktes, des Uterus und der Gefäßmuskulatur gezeigt werden (40, 136, 231). Histamin induziert über den H₂R ebenfalls die Differenzierung von promyelozytischen Leukämiezellen zu neutrophilen Granulozyten (262). Am Herzen führt die Stimulation von Histamin über den H₂R zu einem positiven ionotropen und chronotropen Effekt (20, 111).

Eine weitere wichtige Funktion, die über den H₂R vermittelt wird, ist die Regulation immunmodulatorischer Effekte. Auf basophilen Granulozyten und Mastzellen inhibiert der H₂R die Freisetzung des in Granula gespeicherten Histamins und moduliert die Zytokinproduktion (19, 173, 181). Der H₂R wird vermehrt auf T_H2-Zellen exprimiert und inhibiert deren Proliferation (137). In T-Zellen kann durch Histamin ebenfalls H₂R-vermittelt die Produktion der Zytokine IL-2, IL-4, IL-13 und IFN- γ inhibiert werden (65, 150, 156, 158, 232, 284) wogegen die Produktion von IL-10 und IL-5 induziert wird (156, 218, 249). Der H₂R scheint allgemein eine inhibitorische Rolle in T-Zellen zu spielen, da T-Zellen aus H₂R^{-/-}-Mäusen vermehrt IFN- γ und IL-4 bilden (137).

H₂R-Antagonisten werden zur Behandlung peptidischer Ulcera, der Magensäurehypersekretion und gastroösophagealer Refluxkrankheit eingesetzt, da sie die Bildung von Magensäure inhibieren (15, 50, 63, 96).

1.3.1.3. Histamin-3-Rezeptor

Der H₃R wurde zum ersten Mal im Jahr 1983 beschrieben (4), aber erst deutlich später kloniert (182). Er wird hauptsächlich auf Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert (182, 278). Im Gehirn konnte die Expression insbesondere in den Regionen des cerebralen Cortex, im Striatum, in der Substantia nigra und im Hippocampus nachgewiesen werden (223). Der H₃R fungiert zum einen auf histaminergen Neuronen als präsynaptischer Autorezeptor und reguliert nach Stimulation die Synthese und Freisetzung von Histamin.

Nach der Freisetzung wird Histamin im post-synaptischen Spalt schnell zu N-Methylhistamin abgebaut (103). Der H₃R reguliert aber auch als Heterorezeptor auf nicht-histaminergen Neuronen die Ausschüttung anderer Neurotransmitter wie Dopamin, Serotonin, Noradrenalin, γ -Aminobuttersäure (GABA) und Acetylcholin (112, 136). Als Grund hierfür ist eine G-Protein-vermittelte direkte Inhibition präsynaptischer Ca²⁺-Kanäle beschrieben, die die Neurotransmitterausschüttung reguliert (30). Die Verwendung von selektiven H₃R-Antagonisten steigert die Freisetzung dieser Neurotransmitter. Als Neurotransmitter spielt Histamin über den H₃R eine wichtige Rolle in der Regulation zahlreicher Funktionen wie des Schlaf-Wach-Rhythmus (9), der Nahrungsaufnahme und der Lern- und Gedächtnisprozesse (103).

Nach Bindung von Histamin an den H₃R interagiert dieser mit G_{i/o}-Proteinen, wodurch es zu einer direkten Hemmung der Adenylzyklasen und dadurch zu einer verringerten intrazellulären cAMP-Konzentration kommt (136, 160). Daraus resultiert eine verminderte Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die wiederum zu einer reduzierten CREB-Phosphorylierung und Transkription CRE-abhängiger Gene führt (167). Die Stimulation des H₃R führt in anderen Signalwegen dagegen zu einer Aktivierung, wie z.B. des ‚mitogen-activated protein kinase‘- (MAPK-) oder des Phosphoinositid-3-Kinase- (PI3K-)Signalwegs (136). Die Aktivierung von G_{i/o}-Proteinen über den H₃R kann über eine gesteigerte Aktivität der Phospholipase A₂ (PLA₂) eine vermehrte Bildung von Arachidonsäure bewirken (241). Außerdem kommt es über den H₃R möglicherweise zu einer Hemmung spannungsabhängiger Ionen-Kanäle, wodurch der Einstrom von Ca²⁺ aus dem Extrazellularraum und damit die [Ca²⁺]_i vermindert wird (31).

Zurzeit werden weder H₃R-Agonisten noch Antagonisten therapeutisch eingesetzt. In klinischen Studien konnte allerdings bereits die Wirkung eines H₃R-Agonisten als Schlafmittel gezeigt werden (179). Ebenfalls wurde ihre Wirkung bei Ischämie-bedingten Herzarrhythmien und Migräne untersucht. Substanzen, die den H₃R antagonisieren, wurden bereits in klinischen Studien für ihren Einsatz bei neuropsychiatrischen Erkrankungen wie Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS), Schizophrenie und Alzheimer getestet (167).

1.3.1.4. Histamin-4-Rezeptor

Als Letzter der vier Histaminrezeptoren wurde der H₄R im Jahr 2000 entdeckt und kloniert (203, 208, 215, 310). Mit 35 % Aminosäure-Übereinstimmungen verglichen mit dem H₃R und noch geringerer Übereinstimmung mit dem H₁R und dem H₂R, weist er nur eine relativ geringe Sequenzhomologie zu den anderen Histaminrezeptoren auf (307). Der H₄R wird hauptsächlich in Organen wie Milz, Thymus und Knochenmark exprimiert. Mit geringeren Expressionsraten konnte er ebenfalls in der Lunge, im Dünn- und Dickdarm, im Magen und im Herzen gefunden werden (208). Funktionelle H₄R-Aktivität konnte vor allem in hämatopoetischen Zellen, wie eosinophilen, neutrophilen und basophilen Granulozyten und T-Zellen, aber auch auf Mastzellen und dendritischen Zellen nachgewiesen werden (70, 100, 115, 180, 307). Durch das Expressionsprofil wird deutlich, dass der H₄R eine entscheidende Rolle in Entzündungsreaktionen und bei der Immunantwort zu spielen scheint. In Mastzellen, T-Zellen, eosinophilen Granulozyten und dendritischen Zellen kann Histamin über den H₄R Chemotaxis induzieren (100, 115, 180, 202). Die Stimulation des H₄R führt in CD8⁺ T-Zellen zur Sekretion von IL-16 (84), in Mastzellen konnte eine histamin-abhängige Bildung von IL-6 nachgewiesen werden (62) und in NK-T-Zellen reguliert der H₄R die Expression von IL-4 und IFN- γ (165). Des weitern gibt es Anhaltspunkte dafür, dass der H₄R eine wichtige Funktion in der Schmerzreaktion, bei allergischen Reaktionen, bei Autoimmunerkrankungen und bei Darm- und Brustkrebs hat (45, 121, 189, 283). Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis gibt es Hinweise darauf, dass die H₄R-Expression mit der Schwere der Erkrankung korreliert (123). Erhöhte H₄R-Expressionsraten konnten auch in Patienten mit systemischen Lupus Erythematoses nachgewiesen werden (305).

Nach Bindung des Liganden koppelt der H₄R wie der H₃R an Pertussis-Toxin-sensitive G_{i/o}-Proteine (55). Die daraufhin freigesetzte G _{$\beta\gamma$} -Untereinheit aktiviert die PLC, welche wiederum die Hydrolyse von PIP₂ zu IP₃ katalysiert und dadurch zu einem Anstieg der intrazellulären [Ca²⁺]_i führt (115, 277). Außerdem kommt es nach Stimulation des H₄R zu einer G_{i/o}-vermittelten Inhibition der Adenylylzyklasen (siehe 1.3.1.3), die eine Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration zur Folge hat. Dadurch werden alle nachgeschalteten Effekte dieses Signalwegs, wie die PKA-Aktivität und die Transkription CRE-abhängiger Gene ebenfalls vermindert (212, 215, 310). Durch Stimulation des H₄R kann außerdem eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs induziert werden (203).

H₄R-Antagonisten konnten bisher noch nicht erfolgreich in der Klinik eingesetzt werden. Ihnen wird allerdings ein vielversprechendes Potential für die Behandlung von Allergie- und

Entzündungsreaktionen zugeschrieben, bei Erkrankungen, bei denen die bisher verwendeten H_1R -Antagonisten wirkungslos sind, wie zum Beispiel beim Asthma (278). Im Tiermodell konnten H_4R -Antagonisten bereits erfolgreich eingesetzt werden. Die Gabe von H_4R -Antagonisten in einem Mausasthmadmodell konnte die Symptome ebenso verbessern wie bei der Verwendung von $H_4R^{-/-}$ -Mäusen (13, 70). Eine weitere Einsatzmöglichkeit für H_4R -Antagonisten stellt die Behandlung von chronischem Pruritus dar, da eine Verminderung von Juckreiz bei Mäusen nachgewiesen werden konnte (71). Unter Gabe von H_4R -Antagonisten konnten ebenfalls Kolitissymptome im Rattenmodell reduziert werden (283).

1.3.2. Liganden der Histaminrezeptoren

1.3.2.1. Mepyramin

Mepyramin (2-((2-(Dimethylamino)ethyl)(p-methoxybenzyl)amino)-pyridin) (Abbildung 8) ist ein kompetitiver Antagonist am H_1R aus der 1. Generation. Mit einer hohen Selektivität und einer hohen Affinität zum H_1R ($pK_d=9,4$) ist Mepyramin die am häufigsten verwendete Substanz, um die Funktionalität des H_1R und die Affinität anderer H_1R -Liganden zu untersuchen (111, 126). Die pharmakologischen Eigenschaften von Mepyramin wurden bisher nur am hH_1R untersucht. Daten über die Übertragbarkeit auf andere Spezies liegen derzeit nicht vor.

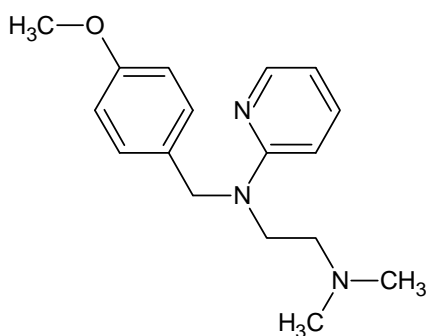


Abbildung 8: Strukturformel von Mepyramin.

1.3.2.2. JNJ777120

JNJ777120 (1-[(5-Chloro-1*H*-indol-2-yl)carbonyl]-4-methylpiperazine) (Abbildung 9) blockiert selektiv den H_4R . Mit einem K_d -Wert von 4 nM weist die Substanz eine 1000-fach höhere Selektivität zum H_4R auf als zu den anderen Histaminrezeptoren. JNJ777120 hat eine

vergleichbare Affinität zum murinen, Ratten- und humanen H₄R (277). Am hH₄R ist JNJ7777120 als inverser Agonist beschrieben, während am rekombinanten, in einem Insektenzellsystem exprimierten mH₄R ein partiell agonistischer Effekt auftritt (255).

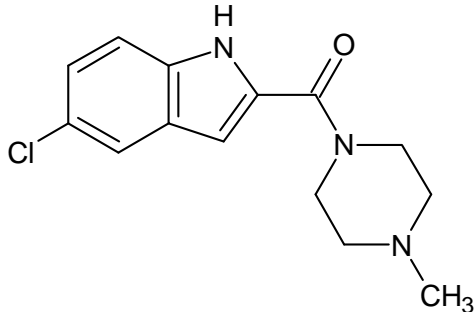


Abbildung 9: Strukturformel von JNJ7777120.

1.3.2.3. 5-Methylhistamin

5-Methylhistamin (Abbildung 10) wurde erstmal im Jahr 1972 als selektiver H₂R-Agonist beschrieben (20). Seit der Entdeckung des H₄R gilt es als selektiver Agonist am H₄R. 5-Methylhistamin weist eine > 100-fach höhere Selektivität zum H₄R auf als zu den anderen Histaminrezeptoren. Mit einem pK_i-Wert von 7,3 zeigt 5-Methylhistamin eine ähnlich hohe Affinität zum H₄R wie Histamin (pK_i = 7,8) und eine deutlich höhere Affinität zum H₄R als zum H₂R (pK_i = 5,1). Es konnte neben der Bindung an den humanen H₄R eine leicht reduzierte Affinität zum murinen und Ratten-H₄R nachgewiesen werden (178).

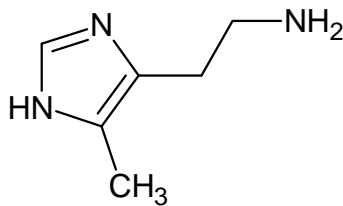


Abbildung 10: Strukturformel von 5-Methylhistamin.

1.4 MAPK-Signalweg

Eine aufeinanderfolgende Aktivierung von Proteinkinasen ist ein häufig vorkommender Mechanismus in der Signaltransduktion in vielen zellulären Prozessen. Innerhalb der letzten 20 Jahre wurden mehrere verwandte intrazelluläre Signalkaskaden aufgeklärt, die zusammen als ‚mitogen-activated protein kinase‘- (MAPK-)Signalweg bezeichnet werden. Diese Signalkaskaden vermitteln extrazelluläre Reize zu intrazellulären Signalen und veranlassen dadurch zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Stressantwort oder Apoptose.

Jede dieser Signalkaskaden besteht aus drei bis sechs hintereinandergeschalteten Proteinkinasen, die durch Phosphorylierung durch die jeweils übergeordnete Kinase aktiviert werden (siehe Abbildung 11). Ein in allen Signalwegen in gleicher Weise vorkommender drei-stufiger Prozess verläuft über die ‚MAPK kinase kinase‘ (MAP3K), die die ‚MAPK kinase‘ (MAP2K) phosphoryliert und dadurch aktiviert. Die MAP2K besitzt zwei Phosphorylierungsstellen, einen Serinrest und einen Threoninrest. Für eine Aktivierung reicht allerdings die Phosphorylierung einer der beiden Aminosäuren aus. Die MAP2K aktiviert wiederum die MAPK durch Phosphorylierung an einem Tyrosin- und einem Threoninrest. Die MAP3K werden durch kleine GTP-bindende Proteine der Ras-Familie aktiviert oder durch Adapterproteine, die ihr Signal entweder direkt oder über eine weitere Kinase (MAP4K) an die MAP3K-Ebene der Signalkaskade vermitteln. Die MAPK aktivieren letztendlich ‚MAPK-activated protein kinases‘ (MAPKAPKs), die Transkriptionsfaktoren phosphorylieren können, und darüber eine veränderte Genexpression bewirken (43, 220, 243, 260).

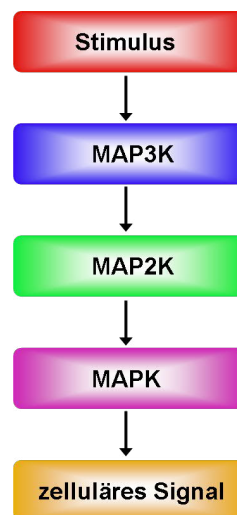


Abbildung 11: Verschiedene Ebenen des MAPK-Signalwegs. Durch einen Stimulus werden MAP3K aktiviert, die daraufhin MAP2K durch Phosphorylierung aktivieren. Diese phosphorylieren wiederum die verschiedenen MAPK, die daraufhin ihre entsprechenden Signalmoleküle aktivieren.

Die MAPK-Kaskaden können in vier Hauptsignalwege unterteilt werden, die nach ihrer MAPK-Komponente benannt werden: Zum einen gibt es den ‚extracellular signal regulated kinase‘- (ERK-)Signalweg, den ‚c-Jun N-terminal kinase‘- (JNK-)Signalweg, auch als ‚stress-activated protein kinase‘- (SAPK-)Signalweg bekannt, den p38 MAPK-Signalweg und den ‚big MAPK‘- (BMK-)Signalweg, auch unter dem Namen ERK 5 bekannt. Auf der Ebene der MAPK kommen zum Teil sehr ähnliche Isoformen der Kinasen vor (Abbildung 12). Diese

Signalkaskaden dürfen allerdings nicht als vier einzelne Signalwege betrachtet werden. Es gibt auf allen Ebenen unterschiedliche Interaktionsmöglichkeiten zwischen den einzelnen Komponenten der verschiedenen Signalwege (41, 243, 246).

1.4.1. ERK 1/2-Signalweg

Die ERK 1/2-Kaskade kann von einer Reihe Faktoren, wie zum Beispiel von Neurotransmittern, Wachstumsfaktoren und Hormonen aktiviert werden, wobei die Aktivierung über membrangebundene Rezeptoren oder Ionenkanäle vermittelt wird (171). Für die Aktivierung sind häufig Adapterproteine von Bedeutung, die mit ‚guanin exchange factors‘ (GEF) verknüpft sind und dadurch kleine GTP-bindende Proteine (wie Ras und Rap) aktivieren. Das Signal wird je nach Stimulus und Adapterprotein auf der MAP3K-Ebene an Proteine wie Raf 1, B-Raf, A-Raf, MEKK oder TPL 2 weitergeleitet (243). Raf 1 kann ebenfalls über die PKC phosphoryliert und aktiviert werden. Diese MAP3Ks phosphorylieren verschiedene MAPK/ERK-Kinasen (MEK) wie MEK 1 und MEK 2. Die MEKs phosphorylieren wiederum spezifisch einen Tyrosinrest und einen Threoninrest in der Aktivierungsdomäne von ERK 1 oder ERK 2. Im weiteren Verlauf wird das Signal an ein regulatorisches Protein vermittelt oder es wird eine Kinase aus der MAPKAPK Ebene aktiviert. Zu den MAPKAPK gehören zum Beispiel die ‚ribosomal S6 kinase‘ (RSK), die ‚MAPK/SAPK activated kinase‘ (MSK) und die ‚MAPK signal-interacting kinase‘ (MNK) (58, 82, 273, 290). Außerdem werden Transkriptionsfaktoren wie ‚Ets-like transcriptionfactor-1‘ (Elk-1) durch Phosphorylierung aktiviert, die zu einer veränderten Genexpression führen. Die Phospholipase A₂ (PLA₂) dient ebenfalls als Substrat für ERK 1/2 (243).

1.4.2. p38 MAPK-Signalweg

Die p38 MAPK-Signalkaskade wird hauptsächlich durch Zellstress aktiviert. Die kleinen GTP-bindenden Proteine Rac und CDC 42 sind als mögliche Aktivatoren des p38 MAPK-Signalwegs identifiziert worden (6, 308). Auf der Ebene der MAP4K und MAP3K kann das Signal von bis zu zehn unterschiedlichen Kinasen weitergeleitet werden, welche wiederum die MAP2K MKK 3 und MKK 6 durch Phosphorylierung aktivieren (217). MKK 6 kann alle p38-Isoformen (p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ) durch Phosphorylierung an jeweils einem spezifischen Tyrosin- und Threoninrest aktivieren, wogegen MKK 3 präferentiell p38 α , p38 γ

und p38 δ aktiviert (146). Als Substrate für p38 dienen MAPKAPK 2/3 (192, 242), MNK (82, 290), p38 regulated/activated kinase' (PRAK) (211) und MSK (58) oder es kommt zur Phosphorylierung von regulatorischen Molekülen wie der PLA₂ (155). Durch diese Signalkaskade werden die Transkriptionsfaktoren wie ATF 2, Elk-1, CHOP und MEF2C aktiviert (217), die die Expression von weiteren Transkriptionsfaktoren wie c-jun und c-fos (235), von Zytokinen wie IL-1, IL-6 und IL-8 (88, 186, 200) oder von Enzymen wie COX-2 (98, 213) regulieren.

1.4.3. SAPK/JNK-Signalweg

Der SAPK/JNK-Signalweg kann durch Zytokine wie TNF- α oder IL-1 aktiviert werden oder ähnlich wie der p38 MAPK-Signalweg über äußere Stressfaktoren. Die JNK-Proteinkinasen werden von drei Genen codiert JNK 1, JNK 2 und JNK 3; JNK 1 und JNK 2 werden ubiquitär exprimiert wohingegen JNK 3 hauptsächlich im Gehirn, im Herzen und im Hoden nachgewiesen werden konnte (53). Die JNK-Signalkaskade wird wie der p38 MAPK-Signalweg von den kleinen GTPasen Rac 1 und CDC42 eingeleitet (46). Diese leiten das Signal entweder direkt an MAP3K weiter oder aktivieren Adapterproteine, die MAP4K phosphorylieren und auf diese Weise die MAP3K aktivieren (51). Bei der Aktivierung von JNK spielen eine Reihe von MAP3K eine Rolle, zu denen zahlreiche Mitglieder der MEKK Familie, der ‚mixed-lineage kinase‘ (MLK) Familie und der ‚apoptosis signal regulating kinase‘ (ASK) Familie zählen. Diese MAP3K sind weitestgehend mit denen der p38 MAPK-Kaskade identisch (53). Auf der MAP2K-Ebene werden die Kinasen MKK 4 und MKK 7 durch Phosphorylierung eines Serin- und eines Threoninrests in ihrem Aktivierungsmotiv aktiviert. MKK 4 und MKK 7 aktivieren wiederum die verschiedenen JNK-Isoformen, indem sie einen Tyrosinrest und einen Threoninrest phosphorylieren (118, 279). Für den JNK-Signalweg konnte nur eine geringe Anzahl an MAPKAPK und zytosolischen Effektorproteinen nachgewiesen werden (243). JNK bindet an der N-terminalen Aktivierungsdomäne von c-Jun und kann c-Jun dadurch an zwei Serinresten phosphorylieren (1, 226). Andere Mitglieder der AP-1 Transkriptionsfaktor-Familie wie JunB, JunD, Elk und ATF 2 können ebenfalls von JNK phosphoryliert werden (53, 125).

1.4.4. ERK 5-Signalweg

ERK 5 wird wegen seiner Größe auch ‚big MAP kinase 1‘ (BMK 1) genannt (309). Es konnte bereits gezeigt werden, dass der ERK 5 Signalweg über oxidativen Stress (163), durch Mitogene oder Wachstumsfaktoren wie ‚epidermal growth factor‘ (EGF) oder ‚nerve growth factor‘ (NGF) aktiviert wird (142). Auf der Ebene der MAP3K verläuft die Signalvermittlung über MEKK 3, welche die MAP2K MEK 5 phosphoryliert und aktiviert. Weitere MAP3K, die in den anderen MAPK-Signalwegen eine Rolle spielen, wie Raf-1, c-Mos oder MEKK 1, sind nicht in der Lage, MEK 5 zu phosphorylieren (75). MEK 5 aktiviert spezifisch ERK 5 durch Phosphorylierung an einem Threonin- und einem Tyrosinrest, hat aber ebenfalls keinen Effekt auf andere Kinasen wie ERK 1/2 (143). ERK 5 phosphoryliert Transkriptionsfaktoren wie ‚monocyte enhancer factor‘ 2A und C (MEF2A/MEF2C) und den ‚ETS-like transkription factor‘ SAP1a (220). Als Konsequenz der MEF2C Aktivierung wird vermehrt c-Jun transkribiert, da das entsprechende Gen eine MEF2C-Bindungsstelle im Promotor aufweist (142).

1.4.5. CREB-Signalweg

‚cAMP responsive element-bindung protein‘ (CREB) ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der durch eine Signalkaskade phosphoryliert wird, die nicht direkt zum MAPK-Signalweg gehört. Mitogene, Stress, Zytokine und andere Faktoren können verschiedene Adenylylzyklase-Isoformen aktivieren und dadurch zu einer erhöhten Konzentration des *second messengers* cAMP in der Zelle führen (60, 92). Eine erhöhte Konzentration an intrazellulärem cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), da nach Bindung von cAMP an die PKA die katalytische Untereinheit des Enzyms freigesetzt wird (12). Die PKA phosphoryliert daraufhin eine Reihe von Zielgenen im Zytosol, kann aber auch in den Zellkern translozieren. Dort phosphoryliert das Enzym vor allem den Transkriptionsfaktor CREB an einem spezifischen Serinrest (264). CREB bindet als Dimer an seine Zielgenesequenz auf der DNA (298), die als ‚cAMP responsive element‘ (CRE) bezeichnet wird und aus einer acht Basenpaaren langen Palindromsequenz besteht (93). Für die cAMP-abhängige Genexpression ist außerdem die Bindung von ‚CREB-binding protein‘ (CBP) an das phosphorylierte CREB erforderlich (44).

Eine Phosphorylierung von CREB ist allerdings nicht nur durch die PKA möglich. Die aktivierten MAPK ERK 1/2 phosphorylieren RSK (siehe 1.4.1), welche in den Zellkern translozieren und dort wiederum CREB an einem spezifischen Serinrest phosphorylieren kann

(220, 296). Auch für die Substrate des p38 MAPK-Signalwegs MAPKAP 2/3 (217) und die Kinase MSK (58), die über den ERK 1/2- und den p38 MAPK-Signalweg aktiviert (siehe 1.4.2) wird, konnte gezeigt werden, dass diese in den Zellkern gelangen und dort ebenfalls CREB phosphorylieren können.

CREB spielt eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen wie bei der Differenzierung, der Proliferation und der adaptiven Immunantwort (264).

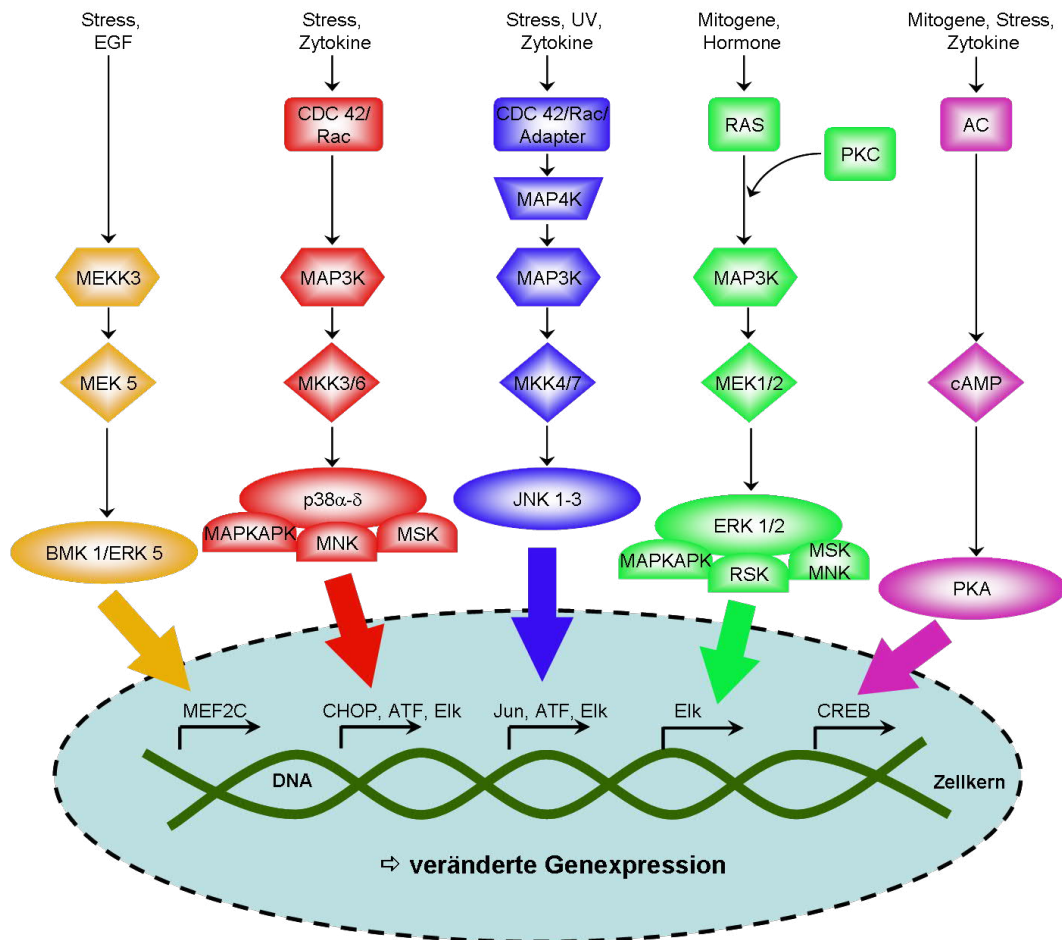


Abbildung 12: Schematische Darstellung der MAPK-Signalwege. Die vier Hauptsignalwege der MAPK-Kaskade: extracellular signal regulated kinase- (ERK 1/2-)Signalweg, c-Jun N-terminal kinase- (JNK-)Signalweg, auch als stress-activated protein kinase- (SAPK-)Signalweg bekannt, p38 MAPK-Signalweg und big MAPK- (BMK-)Signalweg, auch unter dem Namen ERK 5 bekannt. Zusätzlich ist der CREB-Signalweg dargestellt. Modifiziert nach Naor et al. (209)

1.4.6. MAPK-Aktivierung durch GPCRs

Die MAPK-Signalkaskaden können über verschiedene Stimuli, wie Stress, UV-Licht, Zytokine, Mitogene und Hormone aktiviert werden. Viele dieser Liganden vermitteln ihre Signale über GPCRs, die nach Ligandbindung mit einer entsprechenden G-Protein Isoform

interagieren. Nach dem Rezeptor-induzierten Austausch von GDP zu GTP dissoziieren die G-Proteine in G_{α} - und β/γ -Untereinheiten (siehe 1.3). Sowohl die G_{α} -Untereinheiten als auch die β/γ -Untereinheiten sind in der Lage, verschiedene MAPK-Signalwege zu aktivieren (209).

Die G_{α_s} -Untereinheit führt zu einer Aktivierung der Adenylylcyclasen und dadurch zu einer erhöhten Konzentration an intrazellulärem cAMP (siehe 1.3.1.2). Eine erhöhte cAMP-Konzentration bewirkt, entweder über eine Aktivierung der PKA oder einen PKA-unabhängigen Weg über ‚exchange protein directly activated by cAMP‘ (Epac), eine Aktivierung von ‚Ras-related protein 1‘ (RAP1) (56). RAP1 kann wiederum sowohl einen aktivierenden als auch einen inhibierenden Einfluss auf die ERK 1/2 MAPK-Kaskade haben (124). Eine erhöhte cAMP-Konzentration kann über die PKA ebenfalls zu einer vermehrten CREB-Phosphorylierung und zu einer veränderten Transkription CREB-abhängiger Gene führen (siehe 1.4.5).

Die G_q -Untereinheit aktiviert hauptsächlich die PLC, wodurch es zu einer Produktion der *second messenger* IP_3 und DAG kommt. IP_3 induziert einen $[Ca^{2+}]_i$ Anstieg in der Zelle, wohingegen DAG die PKC aktiviert (siehe 1.3.1.1). Freies intrazelluläres Ca^{2+} kann die CaM-Kinase II aktivieren, die das ‚RAS-GTPase-activating protein‘ (RAS-GAP) phosphoryliert und dadurch inhibiert. Dies führt wiederum zu einer Aktivierung von RAS und des MAPK-Signalwegs (42). Eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs über RAS kann ebenfalls durch eine Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von DAG-GEF vermittelt werden (78).

Im Gegenteil zu der G_{α_s} -Untereinheit inhibieren die G_{α_i} und G_{α_0} -Untereinheiten die Aktivität von Adenylylzyklen (siehe 1.3.1.3, 1.3.1.4). Sie induzieren über RAP-GAP eine RAP1 Aktivierung und damit eine hauptsächlich über den ERK 1/2-Signalweg vermittelte Signaltransduktion (135, 201).

Neben den α -Untereinheiten der G-Proteine sind die dissoziierten β/γ -Untereinheiten ebenfalls in der Lage, Komponenten des MAPK-Signalwegs zu aktivieren. Sie können zum einen Rezeptor-Tyrosinkinasen aktivieren, die wiederum die MAPK-Signalkaskade beeinflussen (184), oder sie aktivieren direkt die PI3K, was zu einer vermehrten Bildung von IP_3 führt (271). Über IP_3 wird der GDP-GTP-Austauschfaktor Vav reguliert, der den GDP/GTP-Austausch der kleinen GTPase RAC stimuliert (105). GTP-gebundenes und damit aktiviertes RAC aktiviert wiederum den JNK-MAPK-Signalweg (siehe 1.4.3).

1.5 Antikörper gegen den H₄R und andere GPCRs

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Expression von Rezeptoren auf der Zelloberfläche nachzuweisen. In vielen Fällen wird der Nachweis auf mRNA-Ebene durchgeführt, wie für den H₄R durch (115) gezeigt werden konnte. Das Vorkommen von mRNA muss aber nicht zwangsläufig mit der Proteinexpression auf der Zelloberfläche korrelieren (57). Ein Nachweis der Rezeptorexpression auf Proteinebene ist für funktionelle Expressionsanalysen jedoch unabdingbar. Die Expression von rekombinanten Rezeptoren, die genetische Modifikationen in Form von Epitop-*tags* aufweisen, kann leicht mit Hilfe von Antikörpern gegen diese *tags* nachgewiesen werden (133, 151). Um endogene Rezeptoren zu detektieren, werden mit Isotopen oder Fluorophoren markierte Liganden eingesetzt oder funktionelle Assays durchgeführt (35, 147, 207). Leider stehen nicht für alle Rezeptoren passende gekoppelte Liganden zur Verfügung (287). Rezeptorspezifische Antikörper stellen eine Möglichkeit dar, endogene Rezeptoren ohne entsprechende Liganden nachzuweisen. Solche Antikörper sind hilfreich, um die Expressionsdichte der Rezeptoren, die subzelluläre Lokalisation und die Rezeptorinternalisierung zu untersuchen (195). Bei der Verwendung von Antikörpern ist es allerdings wichtig, diese vorher auf ausreichende Spezifität zu untersuchen.

Der H₄R gehört zu den GPCRs und konnte auf mRNA Ebene hauptsächlich auf Immunzellen nachgewiesen werden (siehe 1.3.1.4). Für eine Reihe von GPCRs sind verschiedene Antikörper von unterschiedlichen Anbietern kommerziell erhältlich. Allerdings sind für fast alle von ihnen, wie auch für den H₄R, nur polyklonale Antiseren erhältlich und keine selektiven monoklonalen Antikörper. Ein weiterer kritischer Punkt ist, dass diese GPCR-Antikörper nicht ausreichend charakterisiert werden, bevor sie auf den Markt kommen. In den meisten Datenblättern werden nur Western-Blot Ergebnisse von aufgereinigten Proteinen gezeigt, die nur eine einzige ausgeschnittene Bande zeigen, die die Spezifität der Antikörper zeigen soll. Die Spezifität von Antikörpern wird oft demonstriert, indem die Antigen-Antikörper-Bindung kompetitiv durch das Peptid unterbunden wird, gegen das der Antikörper entwickelt wurde. Als weiteres Spezifitätskriterium wird oft eine Bande entsprechender Größe auf dem Western-Blot angesehen, unabhängig davon, ob noch andere unspezifischen Signale auftreten (119, 224).

Für eine Reihe von Antikörpern gegen GPCRs konnte bereits eine fehlende Spezifität für den entsprechenden Rezeptor gezeigt werden, wie für Muskarinrezeptoren und den β -Adrenorezeptoren (225), den α_1 -Adrenorezeptor (131) oder Dopaminrezeptoren (21). Um eine eindeutige Aussage bezüglich Selektivität und Spezifität dieser Antikörper gegen GPCRs

zu machen, fordern viele Reviewer immer häufiger eine korrekte Validierung mit intrinsischen Kontrollen. Pradidarcheep et al. (224) und Michel et al. (195) schlagen für die Charakterisierung von Antikörpern vier Kriterien vor, von denen ein brauchbarer Antikörper mindestens eins erfüllen sollte. Als erstes Spezifitätskriterium gilt, dass in der Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie kein Signal in Zellen oder Geweben von Knockout-Tieren für den entsprechenden Rezeptor auftreten darf. Ein weiterer Anhaltspunkt für Rezeptorspezifität ist eine deutliche Abnahme der Signalstärke nach Färbung von Zellen, in denen die Rezeptorexpression genetisch herunterreguliert wurde, wie z. B. mit siRNA. Das dritte Kriterium, um Selektivität für einen bestimmten Rezeptor zu zeigen, kann durch Transfektion verschiedener Rezeptorsubtypen in die gleiche Zelllinie bestätigt werden. Ein selektiver Antikörper wird in diesem Fall nur den entsprechenden Zielrezeptor erkennen, aber nicht verwandte Subtypen. Ein weiterer Hinweis für die Spezifität eines Antikörpers für einen bestimmten Rezeptor kann erbracht werden, indem verschiedene Antikörper gegen unterschiedliche Epitope des Rezeptors eingesetzt werden. Alle Antikörper sollten hierbei ein identisches Färbemuster in der Immunhistochemie, der Durchflusszytometrie oder im Western-Blot aufweisen. Wenn rekombinante Rezeptoren verwendet werden, die einen Epitop-*tag* exprimieren, können zur Kontrolle, zusätzlich zu dem zu testenden Antikörper, spezifische Antikörper gegen diesen *tag* eingesetzt werden (199). Auch hier sollten mit beiden Antikörpern z. B. im Western-Blot identische Bandengrößen auftreten. Wenn es Antikörper gibt, die diesen Kriterien gerecht werden, stellen diese sehr wichtige Hilfsmittel für pharmakologische und immunologische Untersuchungen dar.

Für den Nachweis des H₄R sind verschiedene polyklonale Antiseren kommerziell erhältlich. Leider sind diese vom Hersteller nicht ausreichend nach den oben genannten Kriterien charakterisiert worden. Außerdem werden nicht kommerziell erhältliche Antikörper verwendet, von denen ebenfalls keine ausreichenden Spezifitätskontrollen dokumentiert sind (166, 282).

1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss des H₁R und des H₄R in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale charakterisiert werden. Dazu wurde zuerst der Frage nachgegangen, ob der kombinierte Einsatz eines H₁R-Antagonisten und eines H₄R-Antagonisten das Krankheitsbild des experimentell induzierten Asthmas in einem murinen Modell effektiver verbessert als die einzeln applizierten Antagonisten. Darüber hinaus soll

untersucht werden, ob der Zeitpunkt der Applikation, Sensibilisierung oder Provokation, einen eventuellen Effekt beeinflusst.

Im Anschluss soll untersucht werden, ob die Signalwege von mH₁R und mH₄R interagieren. Zur Beantwortung dieser Frage sollen HEK293-Zellen mit dem mH₁R, dem mH₄R oder beiden Rezeptoren in Kombination stabil transfiziert werden. An den entstandenen Zelllinien sollen frühe (intrazelluläre Calcium-Mobilisation und cAMP-Akkumulation) und späte (MAPK-Signalkaskaden) Signaltransduktionsereignisse und die Expression bestimmter Gene analysiert werden.

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit sollen drei unterschiedliche kommerziell erhältliche H₄R-Antikörper bezüglich ihrer Selektivität und Spezifität für den entsprechenden Rezeptor charakterisiert werden. Da für GPCR-Antikörper bereits häufig eine mangelnde Spezifität beschrieben werden konnte, ist es besonders wichtig, diese Antikörper vor der Verwendung einer kritischen Spezifitätsanalyse mit entsprechenden Kontrollen zu unterziehen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Versuchstiere

Für die *in vivo* Versuche im Asthmamodell wurden weibliche Balb/c Mäuse (Elevage Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) und H₄R-defiziente (Balb/c; C. 129Hrh4^{tm1Lex}) Mäuse (Eigenzucht 0601) im Alter von acht bis zehn Wochen eingesetzt. Die Tiere wurden in Gemeinschaftskäfigen mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Außerdem herrschte ein regulärer 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus bei einer konstanten Temperatur von 21°C ± 2°C. Alle experimentellen Versuche wurden unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes und nach Genehmigung durch das niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (AZ: 33.9-42502-04-08/1550) durchgeführt.

2.1.2. Chemikalien

Acetonitril	J.T.Baker
Agarose	ICN-Biomedical
Ampicillin	Sigma
APS	Sigma
Bactoagar	Becton Dickinson
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ ·2 H ₂ O)	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Eosin	Sigma
Ethanol	J.T.Baker
Ethidiumbromid	Bio-Rad
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merk
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Formaldehyd	Merk
Fura-2 AM	Tocris
Glukose	Merk

Glycerol	Serva
Glycin	ICN-Biomedical
Hämalaun	Merck
Hepes	AppliChem
HPLC-H ₂ O	J.T.Baker
Isopropanol	J.T.Baker
Kaliumchlorid (KCl)	Merk
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merk
LB-Medium Difco™ Luria Bertani Broth Miller	Becton Dickinson
Luminol	Roth
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ ·6 H ₂ O)	Merk
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ ·7 H ₂ O)	Merk
Methanol	J.T.Baker
Milchpulver	Sucofin
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	Merk
Natriumchlorid (NaCl)	J.T.Baker
Natriumhydroxid (NaOH)	Merk
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma
OCT	Sakura
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma
PEG 6000	Merk
Pluronic 20%	Sigma
p-Nitrophenylphosphat	Sigma
Propidiumiodid (PI)	Sigma
Protease-Inhibitoren	Roche
Saponin	Sigma
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merk
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fluka

Tenofovir	NIH AIDS research and Reference Program, Division of AIDS, Bethesda, MD (Katalog Nr. 10199)
Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma
Tris	AppliChem
Triton X-100	Fluka
Trypan-Blau	Sigma
Tween 20	Roth
Wasserstoffperoxid (30 %) (H ₂ O ₂)	Merck
β-Glycerolphosphat	Sigma

2.1.3. Medikamente für Tierversuche

OVA endo Grade	Profos
OVA V	Sigma
Inject Alum	Thermo Scientific
Rompun	Bayer HealthCare
Ketamin	Albrecht
Mepyramin	Sigma
JNJ7777120	Armin Buschauer, Regensburg

2.1.4. Gebrauchsfertige Lösungen und Kits

10 x Taq-Puffer NH ₄ SO ₄	Fermentas
5 x RT-Puffer	Fermentas
6 x DNA-Loading Dye	Fermentas
AutoMACS-Puffer	Miltenyi
BCA Protein Assay Reagent	Thermo Scientific
Bio-Rad Protein Assay (Bradford)	Bio-Rad
CloneJET PCR Clonig Kit	Fermentas
DiffQuik	Medion Diagnostics
dNTPs	Fermentas
FlowCytomix Basic Kit mouse	Bender MedSystems
Human Phospho-MAPK Array Kit	R&D System

(Proteome Profiler TM antibody arrays)

InnuPrep DNA Mini Kit	Analytic Jena
Ligase Puffer	Fermentas
MgCl ₂ (für PCR)	Fermentas
Mouse IL-13 Flow Cytomix	Bender MedSystems
Mouse IL-17 Flow Cytomix	Bender MedSystems
Mouse IL-5 Flow Cytomix	Bender MedSystems
Mouse INF- γ Flow Cytomix	Bender MedSystems
NucleoBond AX 500	Macherey&Nagel
NucleoSpin Extract II (Gelextraktion)	Macherey&Nagel
NucleoSpin RNA II (RNA-Extraktion)	Macherey&Nagel
oligo dT	Fermentas
Taq Man Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems
Y ⁺ -Tango-Puffer	Fermentas

2.1.5. Kulturmedien

Biocoll	Biochrom
DMEM	PAA
Insect Xpress	Lonza
OPTI-MEM	Gibco
PBS	Sigma
RPMI	PAA
Tryp-LE	Gibco

2.1.6. Puffer

3 x Laemmli-Puffer:	52,5 mM Tris, 6 % (w/v) SDS, 15 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 30 % (v/v) Glycerol, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau
ACK-Lösung:	155 mM NH ₄ Cl, 10 mM, KHCO ₃ , pH 7,4
Anti Klotting Medium:	5 % (w/v) BSA, 0,1 % (w/v) EDTA in 0,9 % (w/v) NaCl, pH 7,2

Material und Methoden

Blotpuffer:	25 mM Tris, 150 mM Glycin, 1 % (v/v) Methanol, pH 8,5
CaO-Lysepuffer:	0,5 % (v/v) NP-40, 50 mM Hepes, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerol, 20 mM β -Glycerolphosphat, 5 mM p-Nitrophenylphosphat, 1 mM Na_3VO_4 , pH 7,9
ECL (Lösung A):	1,41 mM Luminol, 0,1 M Tris, pH 8,6
ECL (Lösung B):	6,7 mM para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO
Extraktionslösung mit IS:	AcN/MeOH/ H_2O (2:2:1) + 25 ng/ml Tenofovir
Extraktionslösung:	AcN/MeOH/ H_2O (2:2:1)
Krebs-Hepes Puffer:	120 mM NaCl, 20 mM Hepes, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 1,2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1,25 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 10 mM Glucose H_2O frei pH 7,4
PAGE-Puffer :	215 mM Glycin, 25 mM Tris/HCl, 0,1 % (w/v) SDS
Permeabilisierungspuffer: (intrazelluläre FACS-Färbung)	0,5 % (w/v) BSA, 0,01 % (v/v) NaN_3 , 0,5 % (w/v) Saponin in PBS
TAE-Puffer:	40 mM Tris, 0,1 % (v/v) Eisessig, 1,3 mM EDTA, pH 8,5
TBS/T:	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween, pH 7,6
Tris Puffer (für Sammelgel):	1,0 M Tris, pH 6,8
Tris-Puffer (für Trenngel):	1,5 M Tris, pH 8,8
Tris-Puffer (zum eluieren von DNA):	10 mM Tris/HCl pH 8,0
TSS :	50 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 10 % (w/v) PEG 6000, 5 % (v/v) DMSO, in LB-Medium, pH 6,5 - 6,8
Waschpuffer: (intrazelluläre FACS-Färbung)	0,5 % (w/v) BSA, 0,01 % (v/v) NaN_3 , 0,1 % (w/v) Saponin in PBS

2.1.7. Zusätze für Zellkultur

BaculoGold™ transfection kit	BD Biosciences
FCS	PAN
Fugene HD	Roche
G418	InvivoGen
Gentamycin	Lonza
L-Glutamine	PAA
NEA	PAA
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAA
Pyruvat	PAA
Zeocin	InvivoGen
β-Mercaptoethanol	Sigma

2.1.8. Stimuli

5-Methylhistamin	Tocris
ATP	Sigma
Forskolin	Sigma
Histamin	Sigma
JNJ7777120	Armin Buschauer Regensburg
KG 501	Sigma
Mepyramin	Sigma
PD 980598	Tocris
Pertussis-Toxin	List Biological Laboratories
SB 203580	Tocris
SP 600125	Tocris
TNF-α	BASF

2.1.9. Enzyme und Zytokine

BamHI	Fermentas
CIAP	Fermentas
HindIII	Fermentas
Reverse Transkriptase	Fermentas

T ₄ -Ligase	Fermentas
Taq-Polymerase	Fermentas
XbaI	Fermentas

2.1.10. Antikörper

anti-CD20	Miltenyi
anti-c-myc biotin (9E10)	Abcam
anti-Flag biotin (M2)	Sigma
anti-H ₄ R (Ab 13283)	Abcam
anti-H ₄ R (sc H110)	Santa Cruz
anti-H ₄ R (sc M120)	Santa Cruz
anti-His ⁶	Dianova
anti-mouse FITC	Jackson ImmunoResearch
anti-mouse HRP	Dako
anti-myc FITC	Miltenyi
anti-rabbit FITC	Sigma
anti-rabbit HRP	Dako
CREB (D76/D11)	Cell Signaling
Erk 1/2 p44/42 (137F5)	Cell Signaling
p38	New England Biolabs
Phospho CREB (Ser 133/D1G6)	Cell Signaling
Phospho Erk 1/2 p44/42 (Thr202/Tyr204) (E10)	Cell Signaling
Phospho p38 (Thr180/Tyr182) polyklonal	Cell Signaling
Phospho SAPK/JNK (Thr183/Tyr185/81E11)	Cell Signaling
Rat anti-mouse IgE	Pharmlingen
SAPK/JNK polyklonal	Cell Signaling
Streptavidin HRP	Jackson ImmunoResearch
Streptavidin PE	Jackson ImmunoResearch

2.1.11. Primer und Taq-Man Sonden

H ₄ R F	5'-GGC TAT TTC TGA CTT CTT CG-3' (Eurofins MWG Operon)	
H ₄ R Rev	5'-ACT GAC TGG TAT CGA TCG TA-3' (Eurofins MWG Operon)	
Klonierung mH ₁ R F	5'-GAT CTA GAA TGA AGA CGA TCA TCG CCC TGA GCT ACA TCT TCT GCC TGG TGT TCG CCG AAC AAA AAC TCA TCT CAG AAG AGG ATC TGA GCC TTC CCA ACA CC-3' (Eurofins MWG Operon)	
Klonierung mH ₁ R Rev	5'-GAG GAT CCT TAG TGA TGG TGA TGA TGG TGG GAA CGA ATG TGC AG-3' (Eurofins MWG Operon)	
c-Fos	Hs00170630_ml	Applied Biosystems
COX-2	Hs00153133_ml	Applied Biosystems
EGR-1	Hs00152928_ml	Applied Biosystems
IL-8	Hs00174103_ml	Applied Biosystems
β-Actin	Hs99999903_ml	Applied Biosystems
β-Glucuronidase	Hs00939627_ml	Applied Biosystems

2.1.12. Plasmide

pcDNA3.1(-)-Smyc-mH ₁ R-His ⁶	Silke Beermann
pcDNA3.1zeo-SF-mH ₄ R-His ⁶	Silke Beermann
pENTR/SD/D-topo-mH ₁ R	M. Hikida
pGEM3Z-SF-mH ₄ R-His ⁶	David Schnell (Regensburg)
pJET1.2-Smyc-mH ₁ R-His ⁶	Silke Beermann

2.1.13. Baculovirus Überstände

Baculo Virus Nr. 9 : Leerviren	Passage 3 : 04.04.07 (Regensburg)
Baculo Virus Nr. 10 : mH ₄ R	Passage 3 : 10.10.05 (Regensburg)
Baculo Virus Nr. 12 : hH ₄ R	Passage 3 : 30.03.07 (Regensburg)
Baculo Virus Nr. 17 : hH ₃ R	Passage 3 (Regensburg)

2.1.14. DNA- und Proteinstandards

Gene Ruler 1 kb	Fermentas
Gene Ruler 100 bp	Fermentas
Page Ruler Plus	Fermentas
Prestained Protein Marker	Fermentas

2.1.15. Eukaryotische Zelllinien und Bakterien

<i>E.coli</i> GM48	ATCC
<i>E.coli</i> XL-1	Stratagene
HEK293	ATCC
Sf9	ATCC

2.1.16. Sonstige Verbrauchsmaterialien

Bakterienkulturschalen	Sarstedt
BioMax MR Film	Kodak
Combitips 1 ml; 5 ml; 10 ml	Eppendorf
Filterpapier 3 mm-Chromatographiepapier	Whatman
Kunststoffröhrchen 15 ml	Sarstedt
Kunststoffröhrchen 50 ml	Sarstedt
Kunststoffröhrchen 5 ml	Sarstedt
Maxi-Sorb Elisa Platten	Nunc
MicroAmp Fast 96- <i>well</i> Reaktion Plate	Applied Biosystems
MicroFine 1 ml Spritzen	Becton Dickinson
Mikrotiterplatten, 96- <i>well</i> (Zellkultur)	Nunc
Mikrotiterplatten 96- <i>well</i>	Sarstedt
Objektträger Menzel-Gläser	Thermo Scientific
Omni Fix-F 1 ml Spritzen	Braun
Pipettenspitzen 0,5-10 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen 10-200 µl; 100-1000 µl	Sarstedt
Polyvenylidenflourid (PVDF)-Transfer Membran	Pierce
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2 ml	Sarstedt
Serologische Pipetten 2 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt

Siebe Porengröße 1 mm ²	Forschungswerkstatt, Medizinische Hochschule Hannover
Venenverweilkanüle (18 G x 1 ¾)	Braun
Zellkulturflaschen T25, T75, T175	Greiner bio-one Cellstar
Zellkulturplatten, 12 ,24-well	Greiner
Zellkulturplatten, 6-well	Nunc
Zellkulturschalen	Greiner bio-one Cellstar

2.1.17. Geräte

Agarosegel Kammer Horizon	Life Technologies
Bakterieninkubator Mini OVEN	MWG Biotech
Bakterienschüttler Certomat S	Braun Biotech International
Durchflusszytometer FacsScan	Becton Dickinson
Durchflusszytometer MacsQuant Analyser	Miltenyi
Eismaschine	Ziegra
Filmentwickler Optimax	Protec
Geldokumentation BioDoc Analyse	Biometra
HPLC-Säule Zorbax Eclipse XDB-C18 1.8µ 50 x 4,6	Agilent
Inhalationsgerät PariBoy	Pari GmbH
Inhalationskammer	Forschungswerkstatt, Medizinische Hochschule Hannover
Kühlschrank 4°C/-20°C	Liebherr
Kühlschrank -80°C VIP Series	Sanyo
Massenspektrometer API 5500 QTRAP	AB SCIEX
Mikroskop Olympus CK 40	Olympus
Multipette	Eppendorf
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
Netzgerät Power PAC 1000	Bio-Rad
Neubauer-Zählkammer	Hecht-Assistent
Pipetten 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl	Eppendorf
PCR-Thermocycler primus 96 advanced	peqlab
Pipettierhilfe Pipetboy	IBS Integra Bioscience
Plattenphotometer/-fluorimeter Synergy 4	BioTek

Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph
Protein-Gel Aparatur	Bio-Rad
Real-Time PCR System Step One Plus	Applied Biosystems
Rotationsinkubator	neoLab
Schüttelinkubator Innova 40	New Brunswick Scientific
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus
Sicherheitswerkbank Laminar Air	Heraeus
Sonifier 250	Branson
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Tischzentrifuge Heraeus Fresco 12	Thermo Scientific
Wasserfiltrationsanlage Milli Q _{UF} Plus	Millipore
Western-Blot Aparatur, Semi Dry Blotter	peqlab
Zellinkubator	Heraeus
Zentrifuge Avanti J-26 XP	Beckman Coulter
Zentrifuge Sigma 6K10	Thermo Scientific
Zentrifuge Sorvall RT 6000B	Block Scientific
Zytozentrifuge Cytospin 4	Thermo Scientific

2.1.18. Computerprogramme

Chromas Lite 2.01	Technelysium Pty Ltd
FlowCytomix TM Pro 2.1	BenderMed Systems
GraphPad Prism 5	GraphPad
Microsoft Office [®] 2003	Microsoft

2.2. Methoden

2.2.1. Tierversuche

2.2.1.1. Akutes Ovalbumin-induziertes Asthmamodell

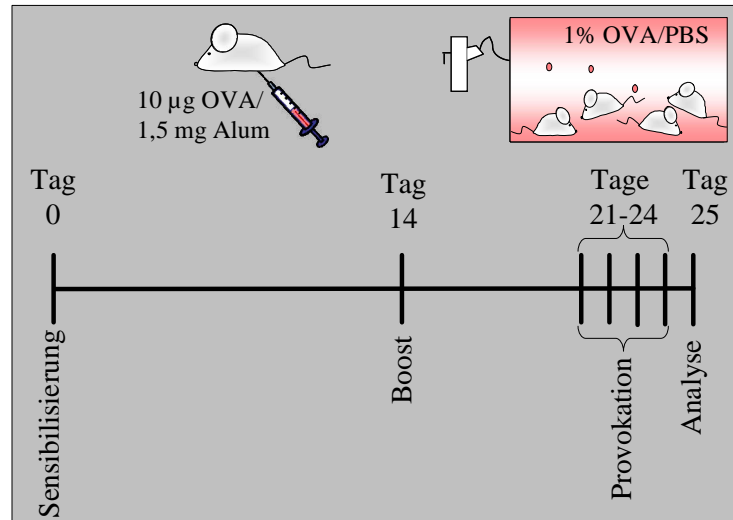


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Asthmamodells

Um in den Tieren Asthma zu induzieren, wurden 8 - 10 Wochen alte weibliche Balb/c Mäuse an den Tagen 0 und 14 mit dem experimentellen Allergen Ovalbumin (OVA) sensibilisiert. Dazu wurde ihnen 10 µg OVA adsorbiert an 1,5 mg Aluminiumhydroxid-Lösung (Asthmatiere) oder PBS mit entsprechender Menge Aluminiumhydroxid-Lösung gemischt (Kontrolltiere) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Anschließend wurden die Tiere an den Tagen 21 - 24 jeweils 20 min inhalativ mit 1 % OVA in PBS provoziert, um eine akute Atemwegsentzündung zu induzieren. Für die Provokation wurde das OVA mit einem Inhalationsgerät (Pariboy) vernebelt und in eine Plexiglasbox geleitet, in der sich die Mäuse frei bewegen konnten. Die Mäuse erhielten außerdem eine Behandlung mit dem H₁R-Antagonisten Mepyramin (400 µg/Maus), dem H₄R-Antagonisten JNJ7777120 (400 µg/Maus), beiden Substanzen in Kombination oder dem Lösungsmittel DMSO. Die Substanzen wurden subcutan (s.c.) verabreicht, entweder in der Sensibilisierungsphase 30 min vor und 2 h nach jeder OVA-Injektion oder in der Provokationsphase jeweils 30 min vor der inhalativen Allergenexposition. An Tag 25 erfolgte die Analyse. Die Mäuse wurden mit einer Überdosis Rompun/Ketamin (2:3) getötet und durch Herzpunktion entblutet. Durch 10 min Zentrifugation bei 9600 g wurde aus dem Blut Serum gewonnen. Anschließend wurde eine

Bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt (siehe 2.2.1.2) und die Lunge für histologische Untersuchungen (siehe 2.2.1.5) entnommen.

2.2.1.2. Bronchoalveoläre Lavage und differenzierte Zellzählung

Zuerst wurde die Trachea der getöteten Mäuse frei präpariert und eine Venenverweilkanüle (18 G x 1 ¾) eingeführt. Anschließend wurde die Kanüle entfernt, so dass nur der Plastikschauch in der Trachea verblieb. Durch diesen Schlauch wurde die Mauslunge mit einer 1 ml Spritze 2 x mit 1 ml PBS gespült. Das Volumen der so gewonnenen BAL wurde bestimmt und die darin enthaltenen Zellen 5 min bei 3500 g pelletiert. Der Überstand (BALf) wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C für die Zytokinbestimmung gelagert. Die Zellpellets wurden in 200 µl (Kontrolltiere) und 400 µl (Asthmatiere) Anti-Klotting-Medium aufgenommen und die Gesamtzellzahl bestimmt. Es wurde eine Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ z/ml eingestellt und 120 µl dieser Zellsuspension (120000 Zellen) als Zytospot 5 min bei 800 rpm auf einen Objektträger aufgetragen. Die Zytospots wurden über Nacht bei RT getrocknet und anschließend in Diff-Quick (Medion Diagnostics) nach dem Protokoll des Herstellers gefärbt. Von jedem Zytospot wurden 400 Zellen differenziell ausgezählt und so die Anzahl an Makrophagen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten bestimmt.

2.2.1.3. Bestimmung der anti-OVA IgE Konzentration im Serum

Die Konzentrationsbestimmung der α -OVA IgE Antikörper erfolgte mit Hilfe eines Enzyme-Linked Immuno-Sorbend Assay (ELISA). Dazu wurden zunächst eine 96-well Mikrotiterplatte (MaxiSorb) mit OVA (500 µg/ml) beschichtet. Nach Absättigung der unspezifischen Proteinbindungsplätze auf der Platte mit 5 % BSA in PBS wurden in 5 % BSA in PBS verdünnte Serumproben (Kontrolltiere 1:200, Asthmatiere 1:2000) oder ansteigende Konzentrationen eines Standardserums (gewonnen aus hyperimmunisierten Mäusen) aufgetragen und inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte eine Inkubation mit einem biotinyierten α -mouse IgE Antikörper (500 ng/ml) gefolgt von Streptavidin-HRP (100 ng/ml). Die Umwandlung von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) durch die Peroxidase wurde nach Abstoppen mit 2 M H₂SO₄ durch photometrische Messung bei 405 nm bestimmt. Die Auswertung erfolgte anhand der Standardverdünnungen (Standardserum wurde als 10^6 U/ml gesetzt).

2.2.1.4. Zytokinanalyse mittels Multiplex Fluoreszent Bead Immunoassay (FBI)

Um verschiedenste Zytokine im Serum (siehe 2.2.1.1) oder im BAL-Überstand (siehe 2.2.1.2) der Mäuse nachweisen zu können, wurde ein Multiplex Fluoreszent Immunoassay durchgeführt. Hierfür wurde die FlowCytomix[®]-Technologie (Bender MedSystems) verwendet. Dieser Kit ermöglicht die Bestimmung von bis zu 17 Zytokinen gleichzeitig in einer Probe. Die Technik beruht auf der Verwendung von synthetischen Mikropartikeln, die verschiedene Fluoreszenzintensitäten und zwei verschiedene Durchmesser aufweisen. An die Partikel je einer Fluoreszenzintensität und Größe sind spezifische Antikörper gegen je eines der zu untersuchenden Zytokine gebunden. Diese Mikropartikel werden mit der Probe inkubiert, sodass die Zytokine an die entsprechenden antikörpergekoppelten Mikropartikel binden können. Anschließend erfolgt eine Inkubation mit einem Mix aus Biotin-gekoppelten ebenfalls spezifischen zweiten Antikörpern gegen die zu untersuchenden Zytokine und einem mit einem weiteren Fluoreszenzmarker markierten Streptavidin. Die Messung der Mikropartikel erfolgte im Durchflusszytometer. So kann über die eine Fluoreszenzintensität das entsprechende Zytokin und über die andere Fluoreszenzintensität die Menge an gebundenem Antigen ermittelt werden. Um die absolute Konzentration der entsprechenden Zytokine zu ermitteln, wurden ebenfalls verschiedene Verdünnungen eines Standards eingesetzt, der alle zu untersuchenden Zytokine enthielt.

Mit dieser Methode wurden die Konzentrationen an IL-5, IL-13, IL-17 und IFN- γ bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach dem im Kit enthaltenen Protokoll des Herstellers.

2.2.1.5. Histologische Untersuchungen der Lunge

Nachdem die BAL gewonnen wurde (siehe 2.2.1.2), wurde über den Plastikschauch der Venenverweilkanüle 1 ml OCT-Lösung in die Lunge gefüllt und diese anschließend vorsichtig herauspräpariert. Die Lungen wurden mindesten 24 h in 4 % Formaldehyd in PBS fixiert und in Paraffin eingebettet. Die entstandenen Blöcke wurden in 4 μ m dicke Scheiben geschnitten und auf einem Objektträger getrocknet. Die Schnitte wurden anschließend entparaffiniert und nach standardisiertem Protokoll mit Hämalaun und Eosin (HE-Färbung) gefärbt. Durch die HE-Färbung erscheinen alle sauren oder basophilen Zellbestandteile wie z.B. der Zellkern blau und alle basischen Strukturen wie Zellplasmaproteine rot. Dadurch ist es möglich, die Struktur der Lungen differenziert darzustellen und die eingewanderten Zellen zu charakterisieren. Da eine optische Beurteilung der Lungenschnitte eine rein deskriptive

Möglichkeit darstellt, Veränderungen in der Lunge zu beschreiben, wurde zusätzlich ein semi-quantitatives Scoring verwendet (siehe Tabelle 2), was geblindet durchgeführt wurde. Dazu wurden Gefäße und Bronchien beurteilt und peribronchale und perivaskuläre Bereiche nach folgenden Kriterien bewertet:

Tabelle 2: Index für das histologische Scoring

Kategorie	Beschreibung
0	<ul style="list-style-type: none">• kein Infiltrationsherd oder peribronchiale oder perivaskuläre entzündliche Infiltrate
1	<ul style="list-style-type: none">• Ansammlungen von Leukozyten und eosinophilen Granulozyten in dünnen Lagen hauptsächlich um zentrale Bronchien und Venen• Mehr Lymphozyten als eosinophile Granulozyten
2	<ul style="list-style-type: none">• Ansammlungen von Leukozyten und eosinophilen Granulozyten um zentrale Bronchien und Venen in mehr Lagen als in Kategorie 1• Lymphozyten/eosinophile Granulozyten im Verhältnis: 50/50• Keine/wenige Aggregate von Entzündungszellen im Lungenparenchym
3	<ul style="list-style-type: none">• Ansammlungen von Leukozyten und eosinophilen Granulozyten um zentrale Bronchien und Venen und bis zu 2/3 in die Peripherie• Lymphozyten/eosinophile Granulozyten im Verhältnis: 50/50• Wenige Aggregate von Entzündungszellen im Lungenparenchym
4	<ul style="list-style-type: none">• Ansammlungen von Leukozyten und eosinophilen Granulozyten um alle sichtbaren Bronchien und Gefäße bis zur Pleura• Eosinophile Granulozyten diffus im Lungenparenchym• Aggregate von Entzündungszellen diffus im Lungenparenchym

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. RNA-Extraktion aus Zellen

Für die Isolierung von RNA aus primären Zellen oder Zellkulturlinien wurden $5 \cdot 10^6$ Zellen pelletiert und 2 x mit PBS gewaschen. Die Extraktion der RNA erfolgte mit dem Nucleo Spin II - RNA Kit (Macherey & Nagel) nach den Angaben des Herstellers. Die Konzentration der RNA wurde anschließend mithilfe des NanoDrop bestimmt.

2.2.2.2. Reverse Transkription

Durch die reverse Transkription wird RNA in cDNA umgeschrieben. Die RNA wurde hierfür wie unter 2.2.2.1 beschrieben aufgereinigt. Zunächst wurden 2 µg RNA und 2 µl oligo dT gemischt und ad 20 µl mit H₂O aufgefüllt. Das Gemisch wurde für 5 min auf 70°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und anschließend auf zwei Probengefäße à 10 µl aufgeteilt. Es wurde ein Ansatz mit und ein Ansatz ohne reverse Tanskriptase hergestellt:

4 µl	5 x RT-Puffer
0,4 µl	100 mM dNTPs
0,25µl	200 u/µl Reverse Transkriptase bzw. H ₂ O
<hr/>	
ad 10 µl	H ₂ O

Zu der einen Hälfte des RNA/oligo dT-Gemischs wurden 10 µl RT-Ansatz mit reverser Transkriptase und zu der anderen Hälfte 10 µl RT-Ansatz ohne reverse Transkriptase gegeben. Nach einer Inkubation für 1 h bei 37°C wurden die Ansätze für 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt.

2.2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um bestimmte Gene auf RNA-Ebene nachweisen zu können oder um DNA spezifisch zu amplifizieren (z.B. für Klonierungen), wurde eine PCR durchgeführt. Für den Nachweis bestimmter Gene auf RNA-Ebene wurde die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.2.3). Für die spezifische Amplifikation von DNA wurde Plasmid-DNA als Template eingesetzt. Die PCR wurde mit folgendem Ansatz durchgeführt:

2,5 µl	cDNA bzw. 1 ng Template DNA
2,5 µl	10x NH ₄ SO ₄ -Puffer
1,5 µl	25 mM MgCl ₂
0,25 µl	100 mM dNTPs
0,25 µl	100 µM Sense Primer
0,25 µl	100 µM Antisense Primer
1,25 µl	DMSO
1 µl	1 U/µl Taq-Polymerase
<hr/>	
ad 25 µl	H ₂ O

Die PCR wurde in einem PCR-Thermocycler mit folgenden Zyklusparametern durchgeführt:

Gennachweis:		Klonierung:	
5 min	95°C	5 min	95°C
30 sec	95°C	1 min	95°C
45 sec	X°C	1 min	65°C
45 sec	72°C	2 min	72°C
10 min	72°C	10 min	72°C

Das Programm wurde je nach Länge der zu amplifizierenden Sequenzen angepasst, um einen optimalen Ablauf der PCR zu erreichen. Die Annelingtemperatur (X) wurde an die jeweilige Primersequenz angepasst.

2.2.2.4. Elektrophoretische Auftrennung mittels Agerosegelelektrophorese

DNA-Proben wurden zum Überprüfen der Größe von DNA-Fragmenten oder zu präparativen Zwecken elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde 1 % oder 2 % (w/v) Agerose in 1 x TAE-Puffer aufgekocht, mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) versetzt und in eine entsprechende Kammer gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt. Die elektrophoretische Trennung wurde bei einer Spannung von 90 V durchgeführt. Die DNA-Banden wurden anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.2.2.5. Quantitative Real-Time PCR

Um die Expression bestimmter Gene auf RNA-Ebene quantitativ zu untersuchen, wurde eine Real-Time PCR mithilfe der Taq-Man Methode durchgeführt. Zunächst wurde die RNA aus den entsprechenden Zellen isoliert und durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.2.1, 2.2.2.2). Für die Real-Time PCR wurden je 2 µl cDNA in die Vertiefungen einer entsprechenden 96-well Platte vorgelegt. Außerdem wurden pro well 10 µl 2 x Taq-Man Master Mix, 0,4 µl der entsprechenden Sonde und 7,6 µl H₂O gemischt und je 18 µl/well davon in jede Vertiefung der Platte gegeben. Die PCR wurde bei folgenden Bedingungen durchgeführt:

10 min	95°C	} 40 Zyklen
15 sec	95°C	
1 min	60°C	

Zur Normierung der Daten wurden die house-keeping Gene β -Aktin und β -Gucuronidase (GUS- β) verwendet und die Daten mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode quantifiziert.

2.2.2.6. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die entsprechende DNA-Bande wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung aus dem Agarosegel unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus der Agarosematrix

wurde unter Verwendung des NucleoSpin Extract II Kit der Firma Macherey & Nagel nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von 35 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,0 von der Säule eluiert.

2.2.2.7. Ligation von aufgereinigten PCR-Produkten in Blunt-end Klonierungsvektor

Die Ligation des PCR-Produkts in einen Klonierungsvektor wurde mit dem CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas) durchgeführt. Dazu wurden zunächst in folgendem Ansatz die 3' dA-Überhänge, die von der Taq-Polymerase generiert wurden, entfernt:

10 µl	2 x Reaktion Puffer
2 µl	PCR Produkt
1 µl	DNA Blunting Enzyme
<hr/>	
ad 20 µl	H ₂ O

Der Ansatz wurde für 5 min auf 70°C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt. Die anschließende Ligation wurde durch Zugabe von 1 µl pJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/µl) und 1 µl T4-DNA Ligase und eine weitere Inkubation für 30 min bei RT durchgeführt.

2.2.2.8. Lagerung und Kultivierung von E.coli Bakterien

Die *E.coli* Stämme XL-1 und GM48 wurden in LB-Medium bei 37°C unter Schütteln bei 160 rpm kultiviert. Nach einer Transformation wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin zur Selektion beigesetzt.

Die Lagerung der Stämme erfolgte in LB-Medium, dem 20 % Glycerol zugesetzt wurden, bei -80°C. Dazu wurden die Bakterien unter Standardbedingungen zu einer OD₆₀₀ von 0,3 - 0,4 kultiviert und anschließend ein entsprechendes Volumen Glycerol zugesetzt. Vor der Lagerung bei -80°C wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2.2.9. Herstellung hitzekompetenter Bakterien

Zunächst wurde eine Vorkultur der Bakterien angesetzt, indem 3 ml LB-Medium mit einem Abstrich der bei -80°C gefrorenen Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden 50 ml frisches LB-Medium mit 50 µl der Übernachtskultur beimpft und bei 37°C und 160 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 - 0,4

kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien 10 min bei 4°C und 5000 g pelletiert und in 5 ml eiskaltem TSS resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in 200 µl Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2.10. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien (Hitzeschock-Methode)

Für die Transformation der Plasmid-DNA in Bakterien wurde die Hitzeschock-Methode verwendet. Dafür wurden 200 µl der nach 2.2.2.9 hergestellten Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Plasmid DNA bzw. 10 µl Ligationsansatz versetzt und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 45 s bei 42°C einen Hitzeschock ausgesetzt und dann erneut 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum erfolgte eine weitere Inkubation für 1 - 1,5 h bei 37°C und 160 rpm. Die Bakterien wurden anschließend bei RT für 3 min bei 3500 g abzentrifugiert, 900 µl des Überstands wurde abgenommen und das Bakterienpellet in den restlichen 300 µl resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten, die 80 µg/ml Ampicillin enthielten, ausgestrichen und die Platten anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2.11. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Mini-Präp:

Zunächst wurden 3 ml Kulturen aus LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin mit jeweils einem Klon von der Agarplatte (2.2.2.10) angeimpft. Die Kulturen wurden für ca. 16 h bei 37°C und 160 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien aus ca. 2,5 ml dieser Kultur in einem 2 ml Reaktionsgefäß pelletiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem InnuPrep Plasmid Mini Kit der Firma Analytic Jena nach dem Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde nach 1 min Inkubation mit 35 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,0 von der Säulenmatrix eluiert und anschließend die Konzentration der DNA-Lösung am NanoDrop bestimmt.

Maxi-Präp:

Zunächst wurde eine Vorkultur aus 5 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin mit dem entsprechenden Bakterienklon angeimpft und für 6 - 8 h bei 37°C und 160 rpm kultiviert. Anschließend wurden mit 3 ml dieser Kultur 300 ml frisches LB-Medium, welches 100 µg/ml Ampicillin enthielt, angeimpft und ca. 16 h bei 37°C und 160 rpm inkubiert. Die Bakterienkultur wurde daraufhin 15 min bei 2500 g zentrifugiert und die Aufreinigung der

DNA erfolgte mit dem Nucleobond AX 500 Kit der Firma Macherey&Nagel nach den Angaben des Herstellers. Die getrockneten DNA-Pellets wurden am Ende je nach Größe in 100 - 500 μ l 10 mM Tris/HCl pH 8,0 gelöst. Die DNA-Konzentration wurde UV-spektroskopisch am NanoDrop bestimmt und eine Konzentration von ca. 1 mg/ml eingestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20°C gelagert.

2.2.2.12. Restriktionsschnitte

Analytische Restriktionsspaltung:

Um aufgereinigte DNA zu identifizieren bzw. kontrollieren, wurden Restriktionsschnitte mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen durchgeführt. Dazu wurde folgender Ansatz verwendet:

0,5 μ g	Plasmid-DNA (aus Mini-Präp.)
2 μ l	Y ⁺ Tango Puffer
0,5 μ l	Enzym 1
0,5 μ l	Enzym 2
<hr/>	
ad 10 μ l	H ₂ O

Das Reaktionsgemisch wurde für 1 - 2 h bei 37°C inkubiert und die Größe der DNA-Fragmente anschließend auf einem Agarosegel (2.2.2.4) überprüft.

Präparative Restriktionsspaltung:

Um entsprechende DNA-Fragmente für die Klonierung zu erhalten, wurde Plasmid-DNA im präparativen Maßstab mittels Restriktionsendonucleasen geschnitten. Dazu wurden folgende Ansätze gewählt:

	1.	2.	3.	präparativ
Plasmid	0,5 μ g	0,5 μ g	0,5 μ g	10 μ g
Y ⁺ Tango-Puffer	2 μ l	2 μ l	2 μ l	10 μ l
Enzym I	/	1 μ l	/	1 μ l
Enzym II	/	/	1 μ l	1 μ l
H ₂ O ad	10 μ l	10 μ l	10 μ l	50 μ l

Der Vektor, in dem das gewünschte Insert enthalten war und der Zielvektor wurden auf diese Weise mit den gleichen Restriktionsendonucleasen geschnitten, um entsprechende Überhänge für die anschließende Ligation zu erhalten. Für den präparativen Restriktionsschnitt des

Zielvektors wurde zusätzlich 1 µl CIAP zugegeben, um die überhängenden Phosphatgruppen zu entfernen und eine Religation des Vektors zu verhindern. Die drei Kontrollansätze und der präparative Ansatz wurden für 2 h bei 37°C inkubiert und die DNA-Fragmente anschließend auf einem 1 %igen Agarosegel (2.2.2.4) analysiert. Die entsprechende Bande des präparativen Ansatzes wurde aus dem Gel ausgeschnitten und wie unter 2.2.2.6 beschrieben aus der Gelmatrix isoliert. Ein kleines Aliquot des aufgereinigten Vektors und des Inserts wurden nach der Gelextraktion erneut auf einem 1 %igen Agarosegel kontrolliert.

2.2.2.13. *Ligation*

Die Ligation dient der Verknüpfung von Vektor und Insert nach erfolgtem Restriktionsschnitt der Ursprungsfragmente. Es wurden drei Ansätze (Religationskontrolle und zwei verschiedene Verhältnisse Vektor : Insert) wie folgt hergestellt:

	1.	2.	3.
Vektor	1 µl	1 µl	1 µl
Insert	/	5 µl	10 µl
Ligase Puffer	2 µl	2 µl	2 µl
T ₄ -Ligase	1 µl	1 µl	1 µl
H ₂ O ad	20 µl	20 µl	20 µl

Die Ansätze wurden für 16 h bei 16°C inkubiert und anschließend 10 µl davon in *E.coli* Bakterien transformiert (siehe 2.2.2.10).

2.2.2.14. *Klonierungsstrategien der verwendeten Plasmide*

Die Sequenzen für den mH₁R und den mH₄R wurden in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert, um die Rezeptoren anschließend in HEK293-Zellen zu exprimieren. Eine zusätzliche Sequenz für ein Signalpeptid ist erforderlich, um die richtige Lokalisation der Rezeptoren in der Zellmembran zu gewährleisten. Außerdem wurden Sequenzen für verschiedene Epitop-*tags* eingefügt, die einen Nachweis der Rezeptorexpression mithilfe von Antikörpern ermöglichen.

Die in den Klonierungsschemata verwendeten Größen der Plasmidsegmente wurden willkürlich gewählt und entsprechen nicht den reellen Größenverhältnissen. Der Übersichtlichkeit halber wurden nur die für die Klonierung relevanten Segmente dargestellt.

Klonierung des Plasmids pcDNA3.1(-)-Smyc-mH₁R-His⁶

Als Ausgangsplasmid für die Klonierung des pcDNA3.1(-)-Smyc-mH₁R-His⁶-Konstrukts wurde der pENTR/DS/D-topo-Vektor verwendet, der nur die Sequenz des mH₁R ohne entsprechende Epitop-*tag*- oder Signalpeptidsequenzen enthält. Mit Hilfe von spezifischen Primern wurde der mH₁R amplifiziert und gleichzeitig die Sequenz für das Signalpeptid und einen *myc-tag* vor der mH₁R-Sequenz und die Sequenz für ein His⁶-*tag* nach der mH₁R-Sequenz eingefügt. Zusätzlich wurden die Sequenzen für die spezifischen Schnittstellen der Restriktionsenzyme XbaI (vorne) und BamHI (hinten) eingefügt, die für die weitere Klonierung von Bedeutung sind (Abbildung 14).

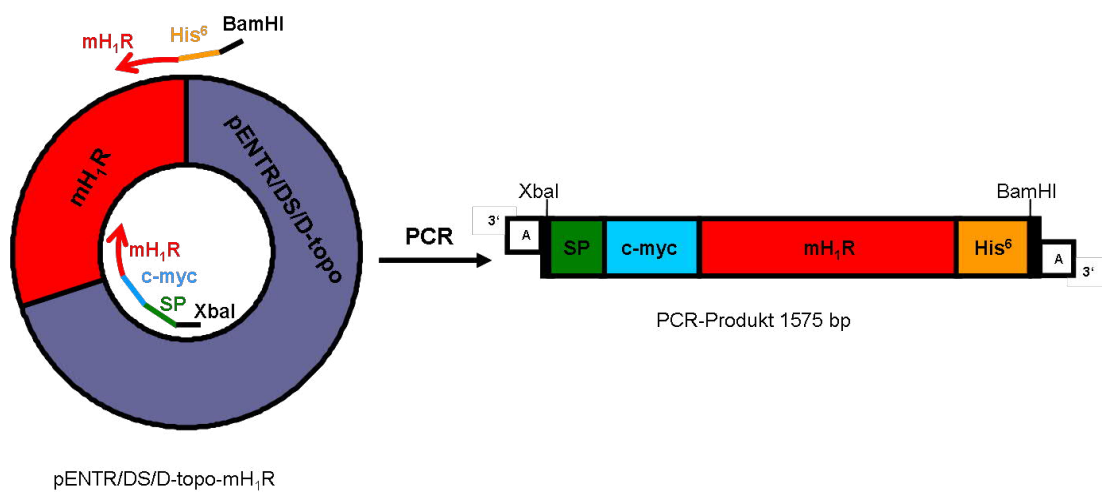


Abbildung 14: Amplifikation des mH₁R-Inserts mittels PCR. Die mH₁R-Sequenz wurde mithilfe der PCR unter Verwendung spezifischer Primer von dem pENTR/DS/D-topo-Vektor amplifiziert. Dabei wurde zusätzlich die Sequenz für das Signalpeptid (SP), den *c-myc-tag* und den His₆-*tag* und die Sequenzen der Schnittstellen für die Restriktionsenzyme XbaI und BamHI eingefügt.

Durch die Taq-Polymerase, mit der die PCR durchgeführt wurde, entstehen ein 3'-A-Überhänge am Ende des PCR-Produkts. Diese 3'-A-Überhänge wurde mithilfe eines Blunting Enzyms entfernt und das PCR-Produkt in einer anschließenden Ligation in den pJET1.2-Klonierungsvektor eingefügt. Dieser Zwischenschritt ist notwendig, weil die durch die PCR eingefügten endständigen Restriktionsschnittstellen von den Restriktionsenzymen nur schlecht erkannt werden (Abbildung 15).

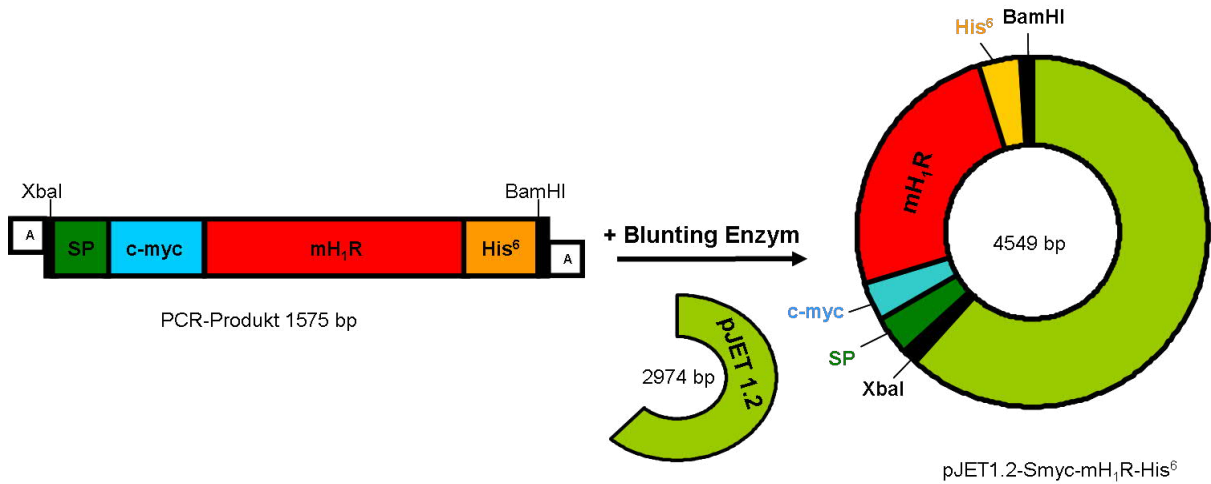


Abbildung 15: Blunt-end Ligation des PCR-Produkts in den pJET1.2 Klonierungsvektor. Die 3'-A-Überhänge des PCR-Produkts wurden mithilfe eines Blunting Enzyms entfernt und das PCR-Produkt anschließend Blunt-end in den pJET1.2-Klonierungsvektor ligiert.

Aus diesem Klonierungsvektor wurde das Insert mithilfe der Restriktionsenzyme BamHI und XbaI herausgeschnitten, für die die Schnittstellen durch die PCR eingefügt wurden. Das Zielplasmid (pcDNA3.1(-)) wurde ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen linearisiert, um entsprechende Überhänge zu für eine Ligation generieren. In einer zweiten Ligation wurde das aufgereinigte mH₁R-Insert in das Zielplasmid eingefügt (Abbildung 16).

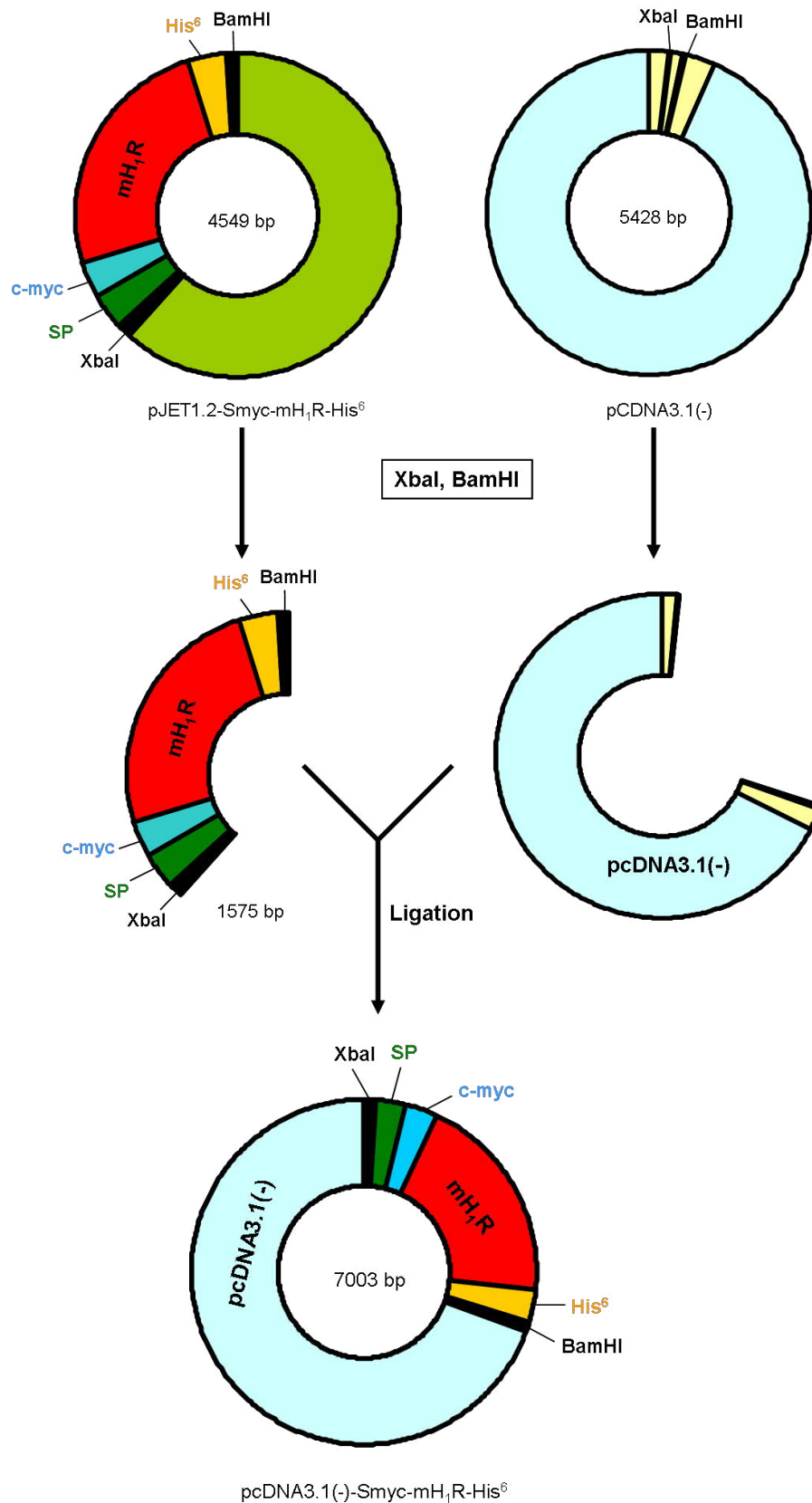


Abbildung 16: Restriktionsschnitt des Klonierungsvektors und des Zielvektors mit den Restriktionsenzymen XbaI und BamHI und anschließende Ligation. Der pJET1.2-Klonierungsvektor und der pcDNA3.1(-)-Zielvektor werden mithilfe der Restriktionsenzyme XbaI und BamHI geschnitten. Anschließend erfolgt die Ligation des Inserts in den Zielvektor.

Klonierung des Plasmids pcDNA3.1zeo-SF-mH₄R-His₆

Als Ausgangsplasmid für die Klonierung des pcDNA3.1zeo-SF-mH₄R-His⁶-Konstrukts wurde ein pGEM-Vektor verwendet, der bereits die Sequenz für das Signalpeptid, den *Flag-tag*, den mH₄R, den His⁶-*tag* und die entsprechenden Restriktionsenzyme enthielt. Dieses Insert wurde mithilfe der Restriktionsenzyme XbaI und HindIII herausgeschnitten und aufgereinigt. Das Zielplasmid (pcDNA3.1zeo) wurde durch die gleichen Restriktionsenzyme linearisiert. In einer nachfolgenden Ligation wurde das Insert in den Zielvektor eingefügt (Abbildung 17).

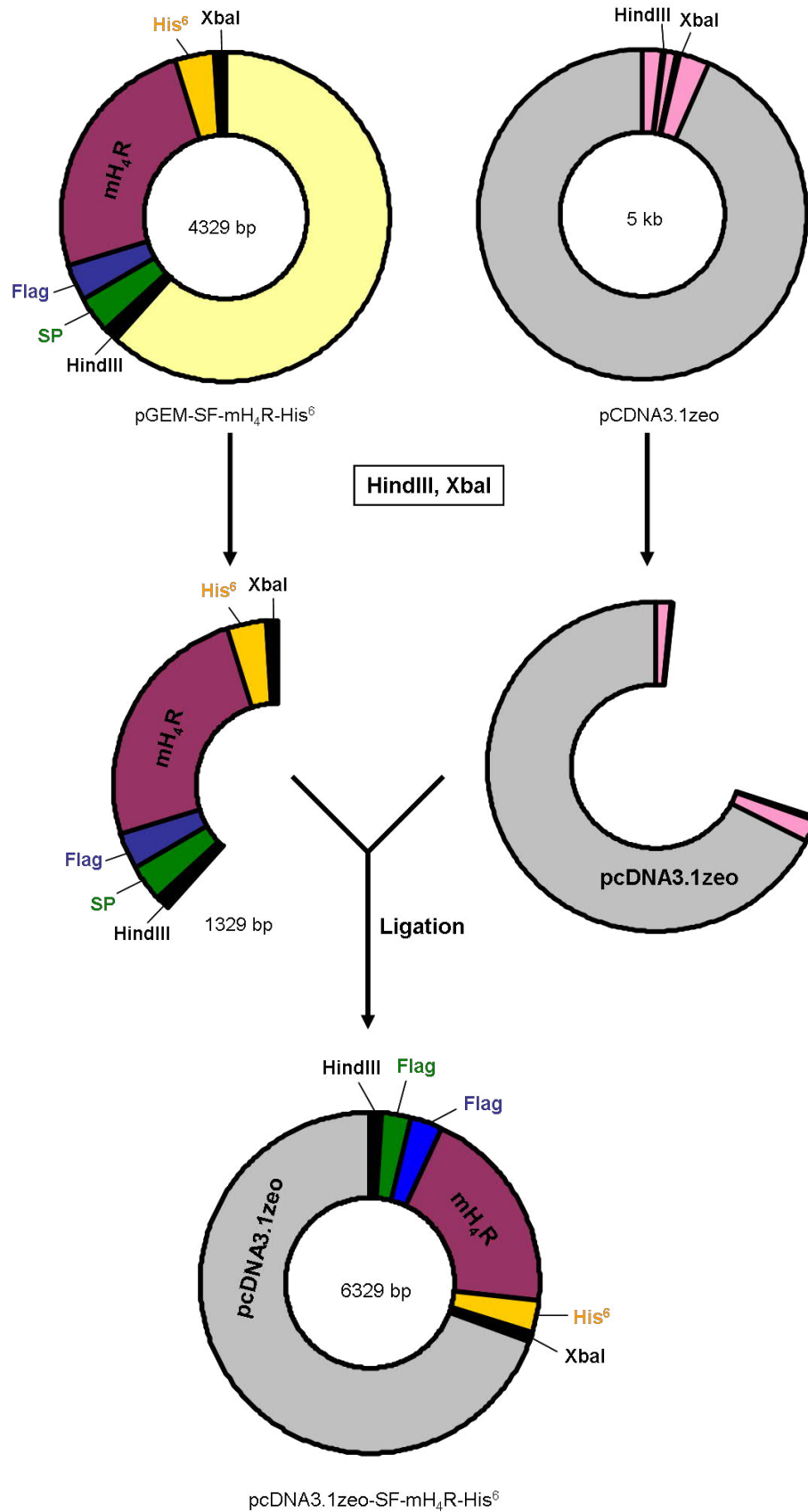


Abbildung 17: Restriktionsschnitt des Ausgangsvektors und des Zielvektors mit den Restriktionsenzymen HindIII und XbaI und anschließende Ligation. Der pGEM-SF-mH₄R-His₆-Ausgangsvektor und der pcDNA3.1zeo-Zielvektor werden mithilfe der Restriktionsenzyme HindIII und XbaI geschnitten. Anschließend erfolgt die Ligation des aufgereinigten Inserts in den Zielvektor.

2.2.3. Zellbiologische Methoden

2.2.3.1. Kultivierung von HEK293-Zellen

Für die Kultivierung der HEK293-Zellen wurde DMEM als Nährmedium verwendet, dem 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin und Penicillin (100 Units/ml)/Streptomycin (100 µg/ml) (P/S) zugesetzt wurde. Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen und bei 37°C und 7 % CO₂-Gehalt unter einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre kultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen (nach drei bis fünf Tagen) in einem Verhältnis von 1:10 bis 1:20 verdünnt. Dazu wurde das alte Medium abgenommen und die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Inkubation mit Tryp-LE für 5 min im Brutschrank abgelöst und in entsprechendem Volumen mit frischem Medium verdünnt.

2.2.3.2. Zellzählung

Um eine genau definierte Anzahl an Zellen auszusäen, wurde die Lebendzellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau-Lösung gemischt und zwischen Objektträger und Deckgläschen der Zählkammer gegeben. Dadurch erhielt man ein definiertes Volumen Zellsuspension (10⁻⁴ ml) über einem der großen Quadrate. Die lebenden (nicht Trypanblau gefärbten) Zellen wurden in den vier großen Quadranten der Zählkammer ausgezählt und gemittelt. Unter Berücksichtigung des Volumens und der 1:2 Verdünnung mit Typanblau wurde über folgende Formel die Anzahl an Zellen/ml bestimmt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{4} \cdot 10000 \cdot 2 = \text{Zellen/ml}$$

2.2.3.3. Lagerung von HEK293-Zellen und stabilen mH₂R-Zellklonen

Die Zellen wurden durch Zugabe von Tryp-LE aus der Kulturflasche abgelöst, in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und gezählt. Anschließend wurden die Zellen bei RT 5 min bei 300 g zentrifugiert, das Medium verworfen und das Zellpellet in FCS mit 10% (v/v) DMSO aufgenommen, sodass etwa eine Zellzahl von 5·10⁶ z/ml erhalten wurde. Die Zellsuspension wurde in 1 ml Portionen aliquotiert, langsam auf -80°C abgekühlt und zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Verwendung wurden ein Aliquot Zellen aus dem Stickstofftank entnommen, aufgetaut und sofort in 10 ml Kulturmedium überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei RT und 300 g wurde das Zellpellet in 10 ml frischem Kulturmedium aufgenommen und die Zellen in T75-Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2.3.4. Transfektion von HEK293-Zellen

Die Transfektion der HEK293-Zellen erfolgte mit Fugene HD (Roche). Dazu wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion aus den T75-Kulturflaschen abgelöst und gezählt (siehe 2.2.3.1, 2.2.3.2). Anschließend wurden sie mit einer Dichte von $3 \cdot 10^5$ z/ml und 2 ml pro *well* auf 6-*well* Platten ausgesät und bis zur Transfektion unter Standardbedingungen kultiviert. Für die Transfektion wurden pro *well* 300 μ l OPTI-MEM vorgelegt, 2 μ g der zu transfizierenden DNA zugegeben und gut gemischt. Anschließend wurden 7 μ l Fugene HD Transfection Reagent in die Lösung pipettiert und erneut vorsichtig gemischt. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde das Transfektionsgemisch durch Auftropfen zu den Zellen gegeben und die Platte vorsichtig geschwenkt. Die Zellen wurden zur vollständigen Rezeptorexpression 48 h unter Standardbedingungen kultiviert.

2.2.3.5. Stabile HEK293-Zelllinien

Die HEK293-Zellen wurden wie unter 2.2.3.4 beschrieben transfiziert. Nach 48 h wurde die Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie kontrolliert (2.2.3.14) und die übrigen Zellen zu einem Gesamtvolumen von 10 ml mit Kulturmedium aufgefüllt und in eine 10 cm Zellkulturschale überführt. Nach ca. 4 h erfolgte die Zugabe des entsprechenden Antibiotikums (1 mg/ml G418 und/oder 400 μ g/ml Zeocin) und die Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Über einen Zeitraum von 14 - 18 Tagen wurde im Abstand von drei bis vier Tagen das Kulturmedium erneuert und frisches Antibiotikum zugegeben, bis keine größeren Mengen an abgestorbenen Zellen mehr im Medium nachweisbar waren. Anschließend wurde mit der Einzelzellklonierung begonnen und die Zellen mit einer Zellzahl von 1,7 z/ml und 200 μ l/*well* unter Zugabe von Antibiotikum in einer 96-*well* Platte ausgesät. Klone, die annähernd konfluent in einem 96-*well* gewachsen waren, wurden in 12-*well*- und später in 6-*well* Platten überführt und die Rezeptorexpression mittels Durchflusszytometrie kontrolliert. Für die weiteren Untersuchungen wurden für die verschiedenen Transfektionen Zellklone mit einer hohen und vergleichbaren Rezeptorexpression verwendet. Die

Kultivierung erfolgte wie unter 2.2.3.1 beschrieben in T25 Zellkulturflaschen unter ständigem Selektionsdruck durch die entsprechenden Antibiotika. Für funktionelle Assays (2.2.3.6, 2.2.4.5, 2.2.4.6) wurden die Zellen kurzfristig im größeren Maßstab (T75 oder T175) ohne Zugabe von Antibiotika kultiviert.

2.2.3.6. Stimulation und Herstellung von Totallysaten aus HEK293-Zellen

Die Zellen wurden 24 h vor der Stimulation aus den T75-Kulturflaschen abgelöst und gezählt (siehe 2.2.3.1, 2.2.3.2). Anschließend wurden sie mit einer Dichte von $5 \cdot 10^5$ z/ml und 2 ml pro well auf 6-well Platten ausgesät und bis zur Stimulation unter Standardbedingungen inkubiert. Für die Stimulation wurde das Histamin in Kulturmedium auf 10 mM verdünnt und 20 µl pro 6-well zu den Zellen in das Medium gegeben (100µM final). Nach entsprechender Inkubationszeit unter Standardbedingungen wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen im well mit kaltem PBS gewaschen und durch Zugabe von 0,5 ml CaO-Lysepuffer lysiert. Die Lysate wurden in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und zur vollständigen Homogenisation unter Rotation 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Lysate 10 min bei 17000 g und 4°C zentrifugiert, um verbliebene Aggregate abzutrennen. Die Überstände, in denen die zytosolischen Proteine enthalten waren, wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Zum Nachweis der H_xRs (im Western-Blot) wurden die Zellen wie oben beschrieben ausgesät aber nicht stimuliert. Nach der Lyse erfolgte ein Ultraschallaufschluss 15 x 1 s und die Proben wurden ohne vorherige Zentrifugation bei -80°C gelagert.

2.2.3.7. Stimulation von HEK293-Zellen für Real-Time PCR-Untersuchungen

Die Zellen wurden 24 h vor der Stimulation aus den T75-Kulturflaschen abgelöst und gezählt (siehe 2.2.3.1, 2.2.3.2). Anschließend wurden sie mit einer Dichte von $5 \cdot 10^5$ z/ml und 2 ml pro well auf 6-well Platten ausgesät und bis zur Stimulation unter Standardbedingungen kultiviert. Die MAPK-Inhibitoren wurden in DMSO gelöst (SB 203580 25 µM, SP 600125 100 µM, PD 980598 25 µM, KG 501 25 µM) und aliquotiert. Für die Stimulation wurden SB 203580 und SP 600125 in Kulturmedium verdünnt (SB 203580 1 mM, SP 600125 10 mM, PD 980598). Die Zellen wurden entweder 1 h vor der Stimulation mit 50 µM PD 980598, 30 min vor der Stimulation mit 20 µM SP 600125 oder mit 2 µM SB 203580, 20 min vor der Stimulation mit 25 µM KG501 oder mit allen vier Inhibitoren in Kombination

vorinkubiert. Anschließend wurden sie entweder mit oder 100 μM Histamin, 100 ng/ml TNF- α oder ohne Stimulation für 4 h unter Standardbedingungen kultiviert. Ein *well* wurde als Basalwert ohne Inhibitor und ohne Stimulation mitgeführt. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen 1 x mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden nach erneuter Zugabe von 1 ml PBS von der Platte geschabt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die *wells* wurden mit 0,5 ml PBS nachgespült, welches ebenfalls in die 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt wurde. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 3500 g pelletiert und der Überstand entfernt. Aus den Zellpellets erfolgte zunächst die RNA-Isolierung wie unter 2.2.2.1 beschrieben gefolgt von der reversen Transkription (2.2.2.2) und der Real-Time PCR (2.2.2.5).

2.2.3.8. Inkubation von HEK293-Zellen mit Pertussis-Toxin

HEK293-Zellen wurden abhängig vom nachfolgenden Assay entweder in T75-Zellkulturflaschen kultiviert (Calciumassay) oder mit einer Dichte von $5 \cdot 10^5$ z/ml und 2 ml pro *well* auf 6-*well* Platten ausgesät (cAMP-Nachweis). Die Zellen wurden zum Anwachsen für 4-6 h unter Standardbedingungen kultiviert. Dann wurden sie für 18 h mit 50 ng/ml Pertussis-Toxin ebenfalls unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde entweder die intrazelluläre Calcium-Konzentration nach Stimulation mit Histamin oder 5-Methylhistamin bestimmt (2.2.4.5) oder der Einfluss von Histamin und 5-Meethylhistamin auf die Forskolin-induzierte cAMP-Konzentration untersucht (2.2.4.6). Zum Vergleich wurden die gleichen Proben ohne Inkubation mit Pertussis-Toxin mitgeführt.

2.2.3.9. Kultivierung von Sf9-Zellen

Für die Kultivierung in Erlenmeyerkolben wurde Insect Xpress als Nährmedium verwendet, dem 5 % FCS und 100 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin zugesetzt wurde. Die Zellen wurden unter Schüttelinkubation bei 28°C und 150 rpm ohne CO₂-Zufuhr kultiviert, wobei die Erlenmeyerkolben nie mehr als bis zur Hälfte mit Medium gefüllt waren. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen mit frischem Medium auf eine Zellzahl von $5 - 7,5 \cdot 10^5$ z/ml verdünnt. Die Zelldichte sollte $7 - 8 \cdot 10^6$ z/ml nicht überschreiten.

2.2.3.10. *Baculovirus Expression in Sf9-Zellen und Membranpräparation*

Die für die Expression benötigten Virusüberstände wurden von dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt. Dafür wurde die entsprechende cDNA in den pVL-1392 Expressionsvektor kloniert. Die Transfektion erfolgte mit dem BaculoGold™ transfection kit (BD Biosciences). Die Generierung der Virusüberstände und die Präparation der Membranen wurde wie bei (252) beschrieben, durchgeführt.

2.2.3.11. *Infektion von Sf9-Zellen*

Für die Infektion wurden die unter 2.2.3.10 beschriebenen Virusüberstände aus Passage 3 oder höher eingesetzt. Die Zellen wurden pelletiert und mit frischem Medium auf eine Zellzahl von $3 \cdot 10^6$ z/ml eingestellt. In einem Erlenmeyerkolben wurden 50 ml dieser Zellsuspension mit 500 μ l (1:100) den entsprechenden H_xR-codierenden Virusüberstand infiziert. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und nach 48 h der Grad der Infektion mikroskopisch überprüft. Infizierte Zellen zeigten charakteristische morphologische Veränderungen. Die infizierten Zellen wurden entweder für eine durchflusszytometrische Analyse eingesetzt (2.2.3.15) oder eine Membranpräparation (2.2.3.10) durchgeführt.

2.2.3.12. *Isolation von peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC) aus Vollblut*

Die PBMCs werden durch Dichtezentrifugation aus frischem Vollblut verschiedener Spender isoliert. Dazu wurden 20 ml Blut zunächst mit 20 ml PBS gemischt und 10 ml Biocoll (Dichte $1,077 \text{ g/cm}^2$) in einem 50 ml Röhrchen vorgelegt. Das mit PBS verdünnte Blut wurde vorsichtig über das Biocoll geschichtet und anschließend 20 min bei 400 g und RT ohne Bremse zentrifugiert. Daraufhin wurde die Leukozytenschicht, die sich zwischen der Blutplasma- und der Biocollschicht befindet, vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und mit RPMI (mit 5% FCS, P/S, L-Glutamin, NEA, Pyruvat, β -Mercaptoethanol) aufgefüllt. Die Zellen wurden 5 min bei 300 g und 4°C pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in ca. 15 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in ca. 5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellen gezählt (siehe 2.2.3.2).

2.2.3.13. Herstellung einer Einzelzellsuspension aus der Milz von Mäusen

Milzzellen wurden aus Balb/c wt Mäusen oder H₄R-defizienten Mäusen isoliert. Die Milzen wurden aus den getöteten Mäusen entnommen und in eine 6 cm Zellkulturschale, in der ein Sieb (Porengröße 1 mm²) und 5 ml RPMI (mit 5% FCS, P/S, L-Glutamin, NEA, Pyruvat, β-Mercaptoethanol) vorgelegt waren, überführt. Es wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt, indem die Milz mithilfe eines Spritzenstempels durch das Sieb gedrückt wurde. Die Zellsuspension wurde in ein Röhrchen überführt und Gewebebestandteile wurden 10 min auf Eis absetzen lassen. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Zur anschließenden Lyse der Erythrozyten wurde das Zellpellet in 1 ml ACK-Lösung resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 9 ml Kulturmedium erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 300 g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert und erneut für 5 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet in 5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellen gezählt (siehe 2.2.3.2).

2.2.3.14. Extrazelluläre FACS-Färbung

Für jede Probe wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen 2 x mit 1 ml AutoMACS Puffer gewaschen. Die Zellpellets wurden in 100 µl AutoMACS Puffer resuspendiert, der 10 % (v/v) Überstand von 2.4G2 Hybridomzellen zum Blockieren der Fc-Rezeptoren enthielt, und dann 15 min bei 4°C inkubiert. Um die Expression der rekombinanten Rezeptoren in HEK293- und Sf9 Zellen nachzuweisen, wurde 1 µl anti-Flag-Biotin (1:100) zugegeben und 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 x mit 1 ml AutoMACS Puffer gewaschen und die Zellpellets in 100 µl AutoMACS Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1 µl Streptavidin PE (1:100) erfolgte eine erneute Inkubation von 30 min bei 4°C im Dunkeln. 10-15 min vor Ablauf der Inkubationszeit wurden 3 µl anti-c-myc FITC zugegeben und für die verbleibende Zeit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 x mit 1 ml AutoMACS Puffer gewaschen und für die Messung in 400 µl AutoMACS Puffer resuspendiert.

Um B-Zellen von den übrigen Leukozyten der PBMC-Präparation zu unterscheiden, wurde nach dem Blockieren der Fc-Rezeptoren 10 µl anti-CD20 PE (1:10) zu 100 µl Zellsuspension gegeben und ebenfalls 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach erfolgter Antikörperfärbung wurden die Zellen 2 x mit 1 ml AutoMACS Puffer gewaschen und für die Messung in 400 µl AutoMACS Puffer resuspendiert.

2.2.3.15. Intrazelluläre FACS-Färbung

Für jede Probe wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen gewaschen und die Fc-Rezeptoren wie unter 2.2.3.14 beschrieben, blockiert. Danach wurden die Zellen pelletiert und in 50 μ l 4% PFA in PBS für 10 min bei 4°C fixiert. Nach 2 x Waschen mit 1 ml AutoMACS Puffer wurden die Zellpellets in 50 μ l Permeabilisierungspuffer resuspendiert. Um die Expression der rekombinanten Rezeptoren in HEK293- und Sf9-Zellen über den His⁶-tag nachzuweisen, wurde 1 μ l anti-His⁶ (1:50) zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Nach 2 x Waschen mit 1 ml Waschpuffer wurden die Zellpellets erneut in 50 μ l Permeabilisierungspuffer aufgenommen und nach Zugabe von anti-mouse FITC (1:500) 1 h bei RT inkubiert. Für den direkten Nachweis des H₄R erfolgte nach der Fixierung und dem Resuspendieren in Permeabilisierungspuffer die Zugabe von 1 μ l H₄R-Antikörper sc M120, sc H110 oder ab 13283 (4 μ g/ml). Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei RT wurden die Zellen 2 x mit 1 ml Waschpuffer gewaschen, die Zellpellets erneut in 50 μ l Permeabilisierungspuffer resuspendiert und mit anti-rabbit FITC (1:500) für 1 h bei RT inkubiert. Nach erfolgter Antikörperfärbung wurden die Zellen 2 x mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und für die Messung in 400 μ l AutoMACS Puffer resuspendiert.

2.2.4. Biochemische Methoden

2.2.4.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Protein-Konzentrationen in den HEK293-Totallysaten (2.2.3.6) wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine Eichreihe aus unterschiedlichen Konzentrationen BSA in PBS hergestellt. Jeweils 100 μ l der Eichreihe sowie 1:200 Verdünnungen der Proben in PBS wurden in die Vertiefungen einer 96-well Platte überführt. Nach Zugabe von 100 μ l 40 % (v/v) Bradford Assay Reagent (Bio-Rad) in PBS wurde die Extinktion der Eichreihe und der Proben bei einer Wellenlänge von 570 nm als Doppelbestimmung gemessen. Mithilfe der Eichreihe konnte die Konzentration der Proben ermittelt werden.

2.2.4.2. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine denaturierende Protein-Gelelektrophorese wird angewendet, um Proteine nach ihrem Molekulargewicht zu trennen. Als Vergleichsgröße wird ein Marker verwendet, der

verschiedene Proteine mit definiertem Molekulargewicht enthält. Die Polyacrylamid-Gele bestehen aus einem oberen Sammelgel und einem unteren Trenngel. Es wurden 10 % SDS-Polyacrylamid-Gele für den Nachweis der H_xRs verwendet und 12,5 % SDS-Polyacrylamid-Gele, um Komponenten des MAPK-Signalwegs nachzuweisen. Dabei setzen sich Trenngel und Sammelgel folgendermaßen zusammen:

Trenngel	10 %	12,5 %
30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid/25 % Glycerol	1,65 ml	2,1 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	1,25 ml	1,25 ml
H ₂ O	1,6 ml	1,15 ml
1 % SDS (w/v)	0,5 ml	0,5 ml
40 % APS (w/v)	7,5 µl	7,5 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl

Sammelgel	5 %
30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid/25 % Glycerol	0,5 ml
1,0 M Tris, pH 6,8	0,4 ml
H ₂ O	2,2 ml
1 % SDS (w/v)	30 µl
40 % APS (w/v)	7,5 µl
TEMED	7,5 µl

Während der Polymerisation wurde das Trenngel mit 2-Propanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde der Alkohol entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgelgemisch überschichtet.

Für die Trennung der Proteine wurden die Proben mit 1/2 Volumen 3 x Laemmli-Puffer versetzt. Die Proben zum Nachweis von Proteinen des MAPK-Signalwegs wurden 10 min auf 95°C erhitzt, bevor sie auf die Gele aufgetragen wurden. Um die H_xRs zu detektieren, wurden die Proben nicht erhitzt, sondern nach Zugabe des 3 x Laemmli-Puffers für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf das Sammelgel geladen und eine Stromstärke von 15 mA/Gel angelegt. Nachdem die Proben in das Trenngel hineingelaufen waren, wurde die Stromstärke auf 30 mA/Gel erhöht, und die elektrophoretische Trennung erfolgte für 1-2 h. Die Proteine wurden anschließend mittels Western-Blot sichtbar gemacht.

2.2.4.3. Western-Blot

Zum spezifischen Nachweis mit Antikörpern wurden die Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (2.2.4.2) mithilfe eines Semi Dry Blotters auf eine PVDF-Membran transferiert. Das Polyacrylamidgel wurde zu diesem Zweck in Blotpuffer äquilibriert. Eine PVDF-Membran gleicher Größe wurde zunächst kurz in 100 % Methanol aktiviert und anschließend bis zum Gebrauch in Blotpuffer inkubiert. Außerdem wurden vier 3 mm dicke Filterpapiere ebenfalls in Blotpuffer getränkt. Für den Transfer wurden die einzelnen Komponenten von Anode zu Kathode in folgender Reihenfolge luftblasenfrei geschichtet: zwei Filterpapiere, Gel, Membran, zwei Filterpapiere. Der Transfer erfolgte für 2 h bei einer angelegten Stromstärke von 0,5 mA/cm². Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran für 1-2 h in 5 % (w/v) Milchpulver in TBS/T inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsplätze abzusättigen. Anschließend wurde die Membran mit dem spezifischen Antikörper (eingesetzte spezifische Antikörper und entsprechende Verdünnung siehe Tabelle 3) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3 x 10 min Waschen mit TBS/T wurde die Membran für 2-3 h mit einem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 4) inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch 3 x Waschen mit TBS/T entfernt und die Membran für 2 min in ECL-Reagenz (5 ml Lösung A, 0,5 ml Lösung B, 1,5 µl 30 % (v/v) H₂O₂) inkubiert. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurde ein Film exponiert und anschließend entwickelt.

Tabelle 3: spezifische Western-Blot Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	verdünnt in
anti-Flag Biotin (M2)	mouse	1:500	TBS/T + 0,02 % Azid
anti-myc Biotin	mouse	1:1000	TBS/T + 0,02 % Azid
anti-H ₄ R (M120)	rabbit	1:1000	TBS/T + 0,02 % Azid
anti-H ₄ R (H110)	rabbit	1:1000	TBS/T + 0,02 % Azid
P38	rabbit	1:1000	TBS/T + 0,02 % Azid
Phospho P38	rabbit	1:1000	Roti Block + 0,02 % Azid
Erk 1/2 P44/42	rabbit	1:1000	Roti Block + 0,02 % Azid
Phospho Erk 1/2 P44/42	mouse	1:2000	Roti Block + 0,02 % Azid
SAPK/JNK	rabbit	1:1000	Roti Block + 0,02 % Azid
Phospho SAPK/JNK	rabbit	1:500	Roti Block + 0,02 % Azid
CREB	rabbit	1:1000	Roti Block + 0,02 % Azid
Phospho CREB	rabbit	1:500	Roti Block + 0,02 % Azid

Tabelle 4: Sekundärantikörper für Western-Blot

Antikörper	Verdünnung	verdünnt in
Streptavidin HRP	1:10000	TBS/T
anti-mouse HRP	1:2000	TBS/T
anti-rabbit HRP	1:2000	TBS/T

2.2.4.4. MAPK-Array

Um einen Überblick zu bekommen, welcher MAPK-Signalweg durch die Stimulation der Histaminrezeptoren aktiviert wird, wurde ein MAPK-Array durchgeführt. Mithilfe dieses Arrays kann parallel die Phosphorylierung von 26 Kinasen des MAPK-Signalwegs und anderer Serin/Threonin-Kinasen nachgewiesen werden. Das Prinzip beruht darauf, dass phosphospezifische Antikörper für die zu untersuchenden Kinasen punktförmig und in Doppelwerten auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen sind. Diese Membran wird mit dem zu untersuchenden Lysat und einem Gemisch aus biotinylierten Sekundärantikörpern inkubiert. Auf diese Weise werden die phosphorylierten Kinasen an entsprechender Stelle auf der Membran gebunden. Nur an den Stellen, an denen phosphorylierte Kinasen gebunden haben, kann der entsprechende Sekundärantikörper binden. Ungebundene Proteine und Antikörper werden durch Waschschrte entfernt und der Nachweis der phosphorylierten Kinasen erfolgt über eine an Streptavidin gekoppelte Peroxidase mit Hilfe von Chemilumineszenzdetektion. Die Punkte können aufgrund ihrer Lage den entsprechenden Kinasen zugeordnet werden und die Intensität der jeweiligen Punkte entspricht dem Grad der Phosphorylierung der entsprechenden Kinase.

HEK Leervektor, mH₁R, mH₄R und mH_{1/4}R-Zellen wurden 24 h vor Stimulation auf 6-well Platten (siehe 2.2.3.6) ausgesät und anschließend je ein well mit und ein well ohne 100 µM Histamin für 5 min inkubiert. Die Zellen wurden 1 x mit PBS gewaschen und direkt im well in 500 µl Lysis Buffer 6 aus dem Kit lysiert. Die Protein-Konzentration wurde mithilfe des Proteinassays nach Bradford (2.2.4.1) bestimmt. Anschließend wurde der Human Phospho-MAPK-Array (R&D System) nach den im Kit enthaltenen Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Pro Membran wurde eine Proteinmenge von 300 µg eingesetzt. Für die Auswertung wurde die Pixeldichte der einzelnen Punkte bestimmt. Die Intensität der Punkte ohne Stimulation wurde von der Intensität der Punkte mit Histamin-Stimulation subtrahiert, um die durch Histamin veränderte Phosphorylierung zu sehen.

2.2.4.5. Bestimmung der intrazellulären Calcium-Konzentration in HEK293-Zellen

Die Bestimmung der intrazellulären Calcium-Konzentration erfolgte mithilfe der Fura-2-Methode. Diese Methode basiert darauf, dass sich die Fluoreszenzeigenschaft des Fluorophors Fura-2 in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration ändert. In Ca^{2+} -freier Lösung wird ein Spektrum mit einem Exzitationismaximum von 365 nm gemessen. Bei hoher Ca^{2+} -Konzentration verschiebt sich das Maximum auf 340 nm. Nur bei 360 nm, dem isoelektrischen Punkt, ist die Fluoreszenz unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte daher bei einer Exzitationswellenlänge von 340 nm und 380 nm und einer Emissionswellenlänge von 508 nm. Bei Zugabe von Calcium zu einer Fura-2 Lösung ergeben sich bei diesen Wellenlängen zwei gegenläufige Änderungen der Fluoreszenzintensität: eine Zunahme bei 340 nm und eine Abnahme bei 380 nm. Es wurde Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2 AM) eingesetzt. Die hydrophobe Acetoxymethylester-Gruppe ermöglicht die Diffusion des Fluoreszenzfarbstoffs durch die Zellmembran in die Zelle. Im Zytosol wird der Acetoxymethylester-Rest von Esterasen abgespalten. Daher kann das Fura-2 die Membran nicht mehr durchdringen und verbleibt in der Zelle.

Die Messung erfolgte auf 96-well Platten, wobei jeweils zwölf Proben simultan gemessen werden konnten. Die Zellen wurden wie unter 2.2.3.1 und 2.2.3.2 kultiviert und gezählt. Pro well wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden zunächst 1 x mit PBS gewaschen und mit einer Zellzahl von $1 \cdot 10^7$ z/ml in Krebs-Hepes Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 1 μl Fura-2 AM (1 mM) und 1 μl Pluronic (20 %) pro $1 \cdot 10^6$ Zellen zugegeben und die Zellsuspension für 40 min unter Rotation bei RT im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Zellen 1:10 auf $1 \cdot 10^6$ z/ml mit Krebs-Hepes Puffer verdünnt und erneut für 20 min unter Rotation im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin 10 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert, das Zellpellet in Krebs-Hepes Puffer mit einer Zellzahl von $2 \cdot 10^7$ z/ml resuspendiert und die Zellsuspension mit 50 μl /well in einer schwarzen 96-well Platte ausgesät. Dann erfolgte die Zugabe von 50 μl der entsprechenden H_xR -Antagonisten, die in Krebs-Hepes Puffer in 2-facher Konzentration angesetzt wurden. Final wurde dadurch eine Zellzahl von $1 \cdot 10^7$ z/ml und eine einfache Konzentration der Antagonisten in einem Volumen von 100 μl erhalten. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Basislinie für 2 min. Für die Stimulation wurden Histamin bzw. 5-Methylhistamin in 4-facher Konzentration und die entsprechenden Antagonisten in 2-facher Konzentration 1:1 gemischt. Dadurch waren in dem Gemisch final die 2-fache Konzentration an Histamin/5-Methylhistamin und die einfache Konzentration der Antagonisten enthalten. Während einer 20 s Messpause wurden 100 μl des

Stimulationsgemisches zu den vorgelegten 100 μl Zellen mit Antagonisten (1:2 Verdünnung) gegeben. Die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Abhängigkeit von der Stimulation der Zellen wurde für 3 min gemessen. Danach wurden 22 μl 5 % (v/v) Triton X-100 pro well (0,5 % (v/v) final) zugegeben, um die Zellen zu lysieren und die maximale Konzentration an Ca^{2+} freizusetzen. Nach einer erneuten Messzeit von 2 min (F_{max}) wurden 25 μl 120 mM EGTA pro well (12 mM final) zugegeben, um das gesamte Ca^{2+} zu komplexieren, und wiederum für 2 min (F_{min}) gemessen. Die Auswertung und Berechnung der Ca^{2+} -Konzentration erfolgte über folgende Formel:

$$\text{Ca}^{2+} (\text{nM}) = K_D \frac{F - F_{\text{min}}}{F_{\text{max}} - F} \cdot \frac{OD_{380\text{nm}} \text{EGTA}}{OD_{380\text{nm}} \text{Triton}}$$

K_D = Dissoziationskonstante (hier 244), $F = \frac{OD_{340\text{nm}}}{OD_{380\text{nm}}}$, $F_{\text{min}} = F_{\text{EGTA}}$, $F_{\text{max}} = F_{\text{Triton}}$

2.2.4.6. Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration in HEK293-Zellen

Die Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration erfolgte über HPLC-gekoppelte Massenspektroskopie (HPLC/MS/MS). Dazu wurden die Zellen wie unter 2.2.3.1 und 2.2.3.2 beschrieben kultiviert, am Vortag gezählt, mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ z/well in 2 ml auf 6-well Platten ausgesät und bis zur Stimulation unter Standardbedingungen kultiviert. Die Substanzen zur Stimulation wurden in 100-facher Konzentration angesetzt und je 20 μl /well zugegeben. Die Stimulation erfolgte für 10 min im Brutschrank. Für die Aufarbeitung für die HPLC/MS/MS-Messung wurde anschließend zunächst das Medium abgenommen und 300 μl eiskalte Extraktionslösung mit 25 ng/ml Tenofovir als internem Standard zugegeben. Die Zellen wurden abgeschabt und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Die wells wurden 2 x mit 400 μl Extraktionslösung ohne internen Standard gespült und diese mit den Zellextrakten vereinigt. Die Suspension wurde 20 min auf 98°C erhitzt und anschließend für 10 min bei 17000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt, das Pellet mit geöffnetem Deckel bei RT getrocknet und für die Proteinbestimmung (2.2.4.7) aufbewahrt. Der Überstand wurde bei 40°C unter Stickstoffstrom bis zur vollständigen Trockene eingedampft und der Rückstand in 150 μl HPLC- H_2O aufgenommen. Nach intensivem Mischen wurden die Proben erneut für 10 min bei 17000 g und 4°C zentrifugiert und anschließend in die Probengefäße für die MS-Messung überführt. Für die Messung wurden die Proben 1:100 verdünnt. Die Messung erfolgte am API 5500

(AB SCIEX) nach einer HPLC-Auftrennung über eine Zorbax Eclipse Säule XDB-C18 1.8 μ 50 x 4,6 (Agilent). Mithilfe einer Eichreihe, die auf gleiche Weise aufgearbeitet wurde und cAMP in definierten Konzentrationen enthielt, wurde die cAMP-Konzentration der Zellextrakte bestimmt.

2.2.4.7. *Proteinbestimmung mit BCA-Assay*

Die Protein-Konzentration der Zellextrakte (2.2.4.6) wurde mithilfe des BCA-Assays bestimmt, um für die Auswertung die cAMP-Konzentration auf die Proteinmenge in der Probe beziehen zu können. Die getrockneten Proteinpellets (siehe 2.2.4.6) wurden in 800 μ l 0,1 M NaOH aufgenommen und für 30 - 60 min auf 95°C erhitzt, bis sie vollständig gelöst waren. Außerdem wurde eine Eichreihe aus unterschiedlichen Konzentrationen BSA in 0,1 M NaOH hergestellt. Jeweils 10 μ l der Eichreihe und der unverdünnten Proben wurden in die Vertiefungen einer 96-well Platte überführt. Nach Zugabe von 200 μ l BCA Protein Assay Reagent (Thermo Scientific), das nach Protokoll des Herstellers angesetzt wurde, und einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 562 nm als Dreifachbestimmung gemessen. Mithilfe der Eichreihe konnte die Konzentration der Proben ermittelt werden.

3. Ergebnisse

3.1. Asthmamodell: Behandlung mit Mepyramin und JNJ7777120

3.1.1. Differenzierte Zellzählung in der BAL

Eines der hauptsächlichen Merkmale des allergischen Asthmas ist eine massive Infiltration von Entzündungszellen, insbesondere von eosinophilen Granulozyten, in die Lunge. Dieses Symptom tritt ebenfalls im experimentellen allergischen Asthma im Mausmodell auf. Das Einwandern von Entzündungszellen in die Lunge kann mithilfe einer Lungenspülung (BAL) nachgewiesen werden. Neben der Bestimmung der absoluten Zellzahl wurden die so gewonnenen Zellen als Zytospot auf einen Objektträger aufgetragen und mit Diff Quick, das mit einer Giemsa-May-Grünwald-Färbung vergleichbar ist, gefärbt (2.2.1.2). Es wurden 400 Zellen von jedem Zytospot differenziell gezählt und die Anzahl an eosinophilen und neurophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten bestimmt. In OVA-sensibilisierten und provozierten Mäusen (Asthmatiere) sind deutlich mehr Zellen in der BAL zu finden als in schein-sensibilisierten und provozierten Mäusen (Kontrolltiere). Dieser Anstieg an Zellen in der BAL in den Asthmaticern kommt hauptsächlich durch eine erhöhte Anzahl an eosinophilen Granulozyten zustande, die in den Kontrolltieren fast nicht auftreten (108). In dem in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Mausmodell für allergisches Asthma (2.2.1.1) wurden der H₁R-Antagonist Mepyramin (MEP) und der hH₄R-Antagonist JNJ7777120 (JNJ) entweder jeweils alleine oder in Kombination eingesetzt. Eine weitere Gruppe bekam nur das Lösungsmittel DMSO in entsprechender Konzentration als Kontrolle. Die Substanzen wurden entweder in der Provokationsphase jeweils 30 min vor jeder OVA-Inhalation oder während der Sensibilisierungsphase jeweils 30 min vor und zusätzlich 2 h nach jeder OVA-Injektion verabreicht.

Im Vergleich zu den nicht sensibilisierten Kontrolltieren war in den nicht behandelten Asthmaticern und in den mit Mepyramin behandelten Tieren eine deutlich erhöhte Anzahl an Zellen in der BAL zu finden (Abbildung 18A und B). Dieser Anstieg wurde vornehmlich durch verstärktes Einwandern von eosinophilen Granulozyten verursacht. Neutrophile Granulozyten und Lymphozyten konnten in der BAL nur sehr vereinzelt detektiert werden und die Anzahl an Makrophagen verändert sich nicht durch die asthmatische Entzündung. Im Gegensatz dazu bewirkte der hH₄R-Antagonist JNJ7777120 in den Asthmaticern eine deutlich verminderte Anzahl an eingewanderten eosinophilen Granulozyten. Diese Beobachtung trat

unabhängig von dem Zeitpunkt der Therapie (Provokations- oder Sensibilisierungsphase) auf. Der Effekt von JNJ7777120 auf die Reduktion der Eosinophilenzahl in der BAL war allerdings stärker ausgeprägt, wenn die Substanz in der Provokationsphase gegeben wurde (-75 % vs DMSO) als wenn sie während der Sensibilisierung appliziert wurde (-31 % vs DMSO). Ein großer Unterschied aufgrund des Therapiezeitpunkts konnte in der Gruppe beobachtet werden, die die beiden Antagonisten Mepyramin und JNJ7777120 in Kombination bekommen hatten. Wenn die Substanzen während der Provokationsphase appliziert wurden, inhibierte Mepyramin den reduzierenden Effekt von JNJ7777120 auf die Eosinophilenzahl in der BAL (Abbildung 18A), und es wurde wieder annähernd die Zellzahl wie in den unbehandelten Asthmaticern gezählt. Wurden die Substanzen hingegen in der Sensibilisierungsphase gegeben, konnte durch zusätzliche Gabe von Mepyramin die Anzahl an Eosinophilen in der Lunge noch stärker reduziert werden (-70 % vs DMSO), als wenn JNJ7777120 alleine appliziert wurde (Abbildung 18B).

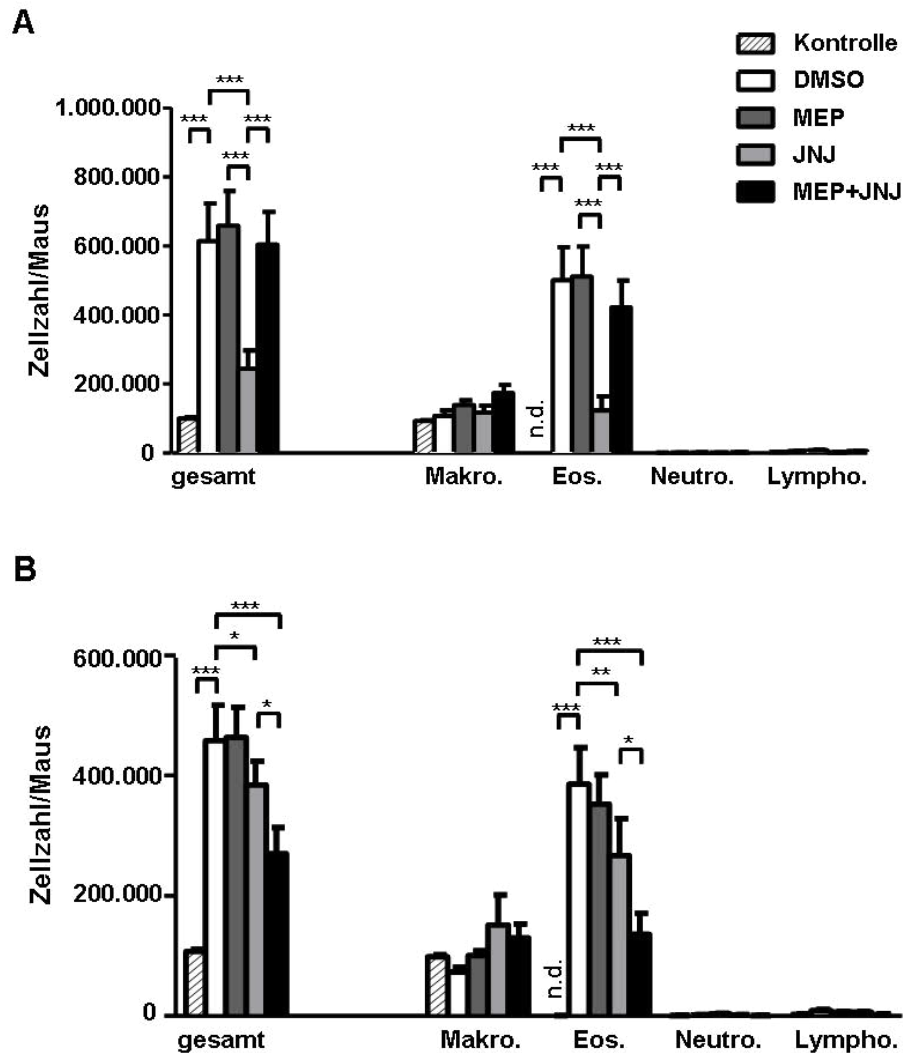


Abbildung 18: Effekt von Mepyramin und JNJ777120 auf die BAL-Zellularität. Mäuse wurden mit OVA sensibilisiert und provoziert und mit DMSO, Mepyramin, JNJ777120 oder Mepyramin und JNJ777120 behandelt entweder 30 min vor jeder OVA-Inhalation zur Provokation (A) oder 30 min vor und 2 h nach jeder OVA-Injektion zur Sensibilisierung (B). Als Kontrolle wurden Mäuse mit PBS sensibilisiert, mit OVA provoziert und mit DMSO behandelt. Die BAL wurde 24 h nach der letzten Provokation durchgeführt und die Zellen differenziell gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n_{\text{(Kontrolle)}} = 3$, $n_{\text{(DMSO)}} = 7$, $n_{\text{(MEP, JNJ, MEP+JNJ)}} = 8$. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind nach Varianzanalyse nach Bonferroni gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,005$).

3.1.2. Histologische Untersuchungen der Lunge

In Lungengewebe von Mäusen, in denen eine asthmatische Erkrankung induziert wurde, treten vermehrt peribronchiale und perivaskuläre Infiltrationen von Entzündungszellen wie Lymphozyten, Monozyten und eosinophilen Granulozyten auf (281).

Um das Einwandern von Entzündungszellen ins Lungengewebe sichtbar zu machen, wurden die Lungen 24 h nach der letzten Provokation histologisch analysiert (2.2.1.5) und mithilfe eines histologischen Scorings quantifiziert (Tabelle 2). Diese Quantifizierung der

histologischen Schnitte zeigte relativ große inter-individuelle Unterschiede innerhalb der Behandlungsgruppen (Abbildung 19B und D). In den Lungen der Asthmatiere, die mit DMSO behandelt wurden, konnte eine beträchtliche Anzahl an infiltrierten Entzündungszellen um die Bronchien und Blutgefäße herum nachgewiesen werden. Die Bronchien waren zum Teil stark kontrahiert und um die größeren Bronchien und Gefäße war vereinzelt Ödembildung zu erkennen (Abbildung 19A und C). Der Grad der Infiltrationen wurde durch die Behandlung mit Mepyramin nicht beeinflusst, wenn die Therapie in der Provokationsphase stattfand (Abbildung 19B). Wurde der Antagonist allerdings während der Sensibilisierung appliziert, bewirkte Mepyramin eine leicht verminderte Infiltration von Entzündungszellen (Abbildung 19D). Die Gabe von JNJ7777120 reduzierte signifikant die Infiltrationen in das Lungengewebe unabhängig davon, ob die Substanz in der Provokations- oder Sensibilisierungsphase gegeben wurde. Wenn die Tiere die Kombinationstherapie mit Mepyramin und JNJ7777120 in der Sensibilisierungsphase bekamen, konnte eine noch weiter verbesserte Symptomatik beobachtet werden, im Vergleich zu der Versuchsgruppe, die nur mit JNJ7777120 behandelt wurde. Der Effekt, der durch die alleinige Gabe von JNJ7777120 in der Provokationsphase bewirkt wurde, wurde durch die Kombinationstherapie nicht beeinflusst. Diesbezüglich unterscheiden sich die Daten, die während der Provokationsphase erhoben wurden beim Vergleich der Ergebnisse aus der Histologie mit denen aus der Analyse der BAL-Zellularität, wo der Effekt, der durch JNJ7777120 alleine bewirkt wurde, durch Kombinationstherapie wieder aufgehoben wurde. Diese Differenz kann allerdings methodisch erklärt werden. Das Scoring, das für die Quantifizierung der histologischen Schnitte verwendet wurde, unterscheidet nicht zwischen peribronchialen und perivaskulären Infiltrationen von Leukozyten. Dadurch wurden die eingewanderten Zellen nicht einzeln widerspiegelt. Typischerweise sind die Leukozyten, die in die Bronchien und Bronchiolen eingewandert sind, in der BAL wiederzufinden, wohingegen sich perivaskuläre Infiltrationen dort kaum detektieren lassen (127, 134). Dies machte wahrscheinlich den Unterschied zwischen den Histologie-Daten und den Daten der BAL-Zellen bei den Mäusen aus. Eosinophile Granulozyten konzentrieren sich scheinbar um Bronchien und Bronchiolen herum und nicht um Venen und Venolen, wodurch der Anstieg an Eosinophilen in den Tieren, die die Kombinationstherapie während der Provokation erhalten haben, nur in der BAL zum Tragen kam und nicht in den histologischen Daten, wo ebenfalls die perivaskulären Infiltrationen berücksichtigt wurden.

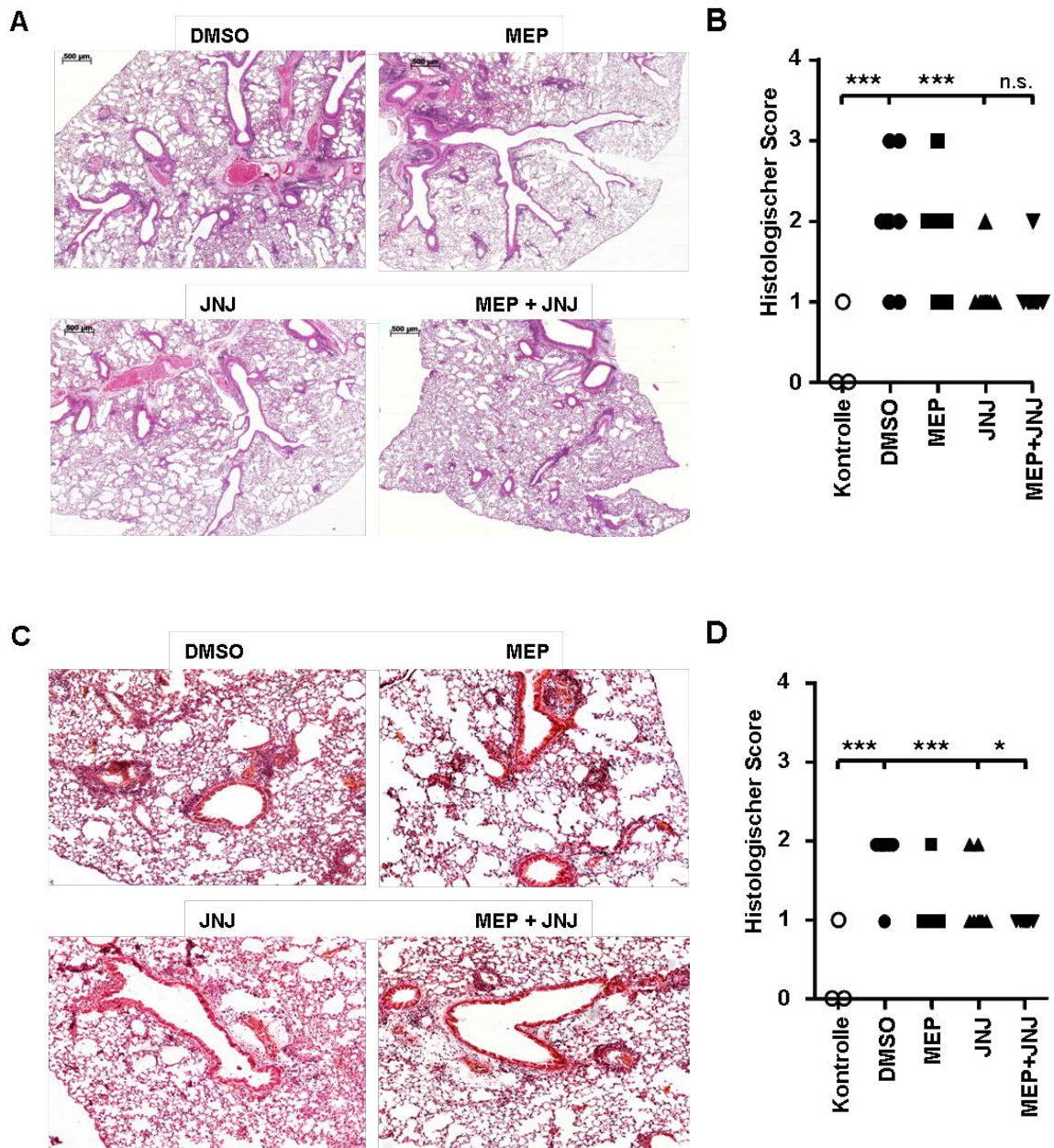


Abbildung 19: Effekt von Mepyramin und JNJ777120 auf die Atemwegsentzündung. Mäuse wurden mit OVA sensibilisiert und provoziert und mit DMSO, Mepyramin, JNJ777120 oder Mepyramin und JNJ777120 behandelt entweder 30 min vor jeder OVA-Inhalation (A,B) oder 30 min vor und 2 h nach jeder OVA-Injektion (C,D). 24 h nach der letzten Provokation wurden die Lungen entnommen, histologische Schnitte angefertigt und mit H&E angefärbt. Repräsentative Schnitte sind gezeigt (A,C). Anhand der Schnitte, wie in A, C gezeigt, wurde der Grad der Entzündung nach einem histologischen Scoring geblendet beurteilt (B,D). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n_{\text{(Kontrolle)}} = 3$, $n_{\text{(DMSO)}} = 7$, $n_{\text{(MEP, JNJ, MEP+JNJ)}} = 8$. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind nach Chi-square Test gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,005$).

3.1.3. Bestimmung der anti-OVA IgE Titer und der Zytokin-Konzentrationen im Serum

Das Auftreten von allergenspezifischem IgE ist ein Kennzeichen von allergischen Immunreaktionen vom Typ I (239). Um die allergenspezifischen Antikörpertiter zu bestimmen, wurden die Mäuse 24 h nach der letzten Provokation durch Herzpunktion entblutet und der Titer an OVA-spezifischem IgE im Serum mittels ELISA bestimmt (2.2.1.3). In den Mäusen, die mit DMSO behandelt wurden und in denen Asthma induziert wurde, konnten erhöhte Titer an OVA-spezifischen IgE Antikörpern detektiert werden, während diese in den nicht asthmatischen Kontrolltieren nicht nachgewiesen werden konnten. Die Behandlung mit Mepyramin hatte weder in der Provokationsphase noch während der Sensibilisierung einen Einfluss auf die anti-OVA IgE Konzentration im Serum verglichen mit den mit DMSO behandelten Asthma-Tieren (Abbildung 20A+D). Im Gegensatz dazu bewirkte JNJ777120, wenn es in der Provokationsphase appliziert wurde, eine Reduktion des anti-OVA IgE Titers (Abbildung 20A), während durch die Gabe in der Sensibilisierungsphase nur eine leichte, nicht statistisch signifikante Verminderung der anti-OVA IgE Konzentration hervorgerufen wurde (Abbildung 20D). Ähnlich wie bereits bei der Analyse der BAL-Zellularität beobachtet werden konnte, wurde auch hier in der Provokation die durch die alleinige Gabe von JNJ777120 vermittelte Verminderung des anti-OVA-IgE Titers wieder aufgehoben, wenn es in Kombination mit Mepyramin gegeben wurde (Abbildung 20A). Die Applikation beider Substanzen in der Sensibilisierungsphase schien hier ebenfalls eine leichte Verstärkung des JNJ777120 Effekts zu bewirken (Abbildung 20D), die allerdings nicht durch statistische Analysen gestützt werden konnte. In jedem Fall trat durch die Kombination mit Mepyramin keine Antagonisierung des reduzierenden JNJ777120 Effekts auf, wie es bei der Gabe während der Provokationsphase zu erkennen war.

Allergisches Asthma ist eine T_H2 -vermittelte Immunantwort. Daher werden typische T_H2 -Zytokine wie IL-5 und IL-13 bei dieser Erkrankung vermehrt gebildet (197). Die Konzentrationen der Zytokine IL-5 und IL-13 wurden in den Seren der Mäuse mithilfe des Multiplex Fluoreszent Bead Immunoassay (FBI) (2.2.1.4) bestimmt. In den Seren der Asthma-Tiere konnten beträchtliche IL-5- und IL-13-Konzentrationen nachgewiesen werden, während diese in den Kontrolltieren nicht detektierbar waren oder in nur sehr geringen Konzentrationen vorkamen (Abbildung 20B,C,E,F). In diesem Assay waren Zytokine, die typisch für die Antwort von anderen T_H -Zellen sind wie IL-17 und $IFN\gamma$, entweder nicht

detektierbar oder unbeeinflusst von der asthmatischen Erkrankung (Daten nicht gezeigt). In der Provokationsphase wirkte sich die Gabe von Mepyramin und JNJ777120, weder alleine noch in Kombination, signifikant auf die Serum-Konzentration von IL-13 (Abbildung 20B) und IL-5 (Abbildung 20C) aus. Im Gegensatz dazu führte die Kombinationstherapie verabreicht in der Sensibilisierungsphase zu einer statistisch signifikanten Reduktion sowohl von IL-13 (Abbildung 20E) als auch von IL-5 (Abbildung 20F) im Serum der Mäuse, verglichen mit den mit DMSO behandelten Asthmaticern. Die alleinige Gabe von JNJ777120 bewirkte während der Sensibilisierungsphase ebenfalls eine leichte Reduktion beider Zytokin-Konzentrationen, die allerdings nicht statistisch signifikant war. Die Applikation von Mepyramin allein hatte keinen Einfluss auf die Serum-Zytokin-Konzentrationen.

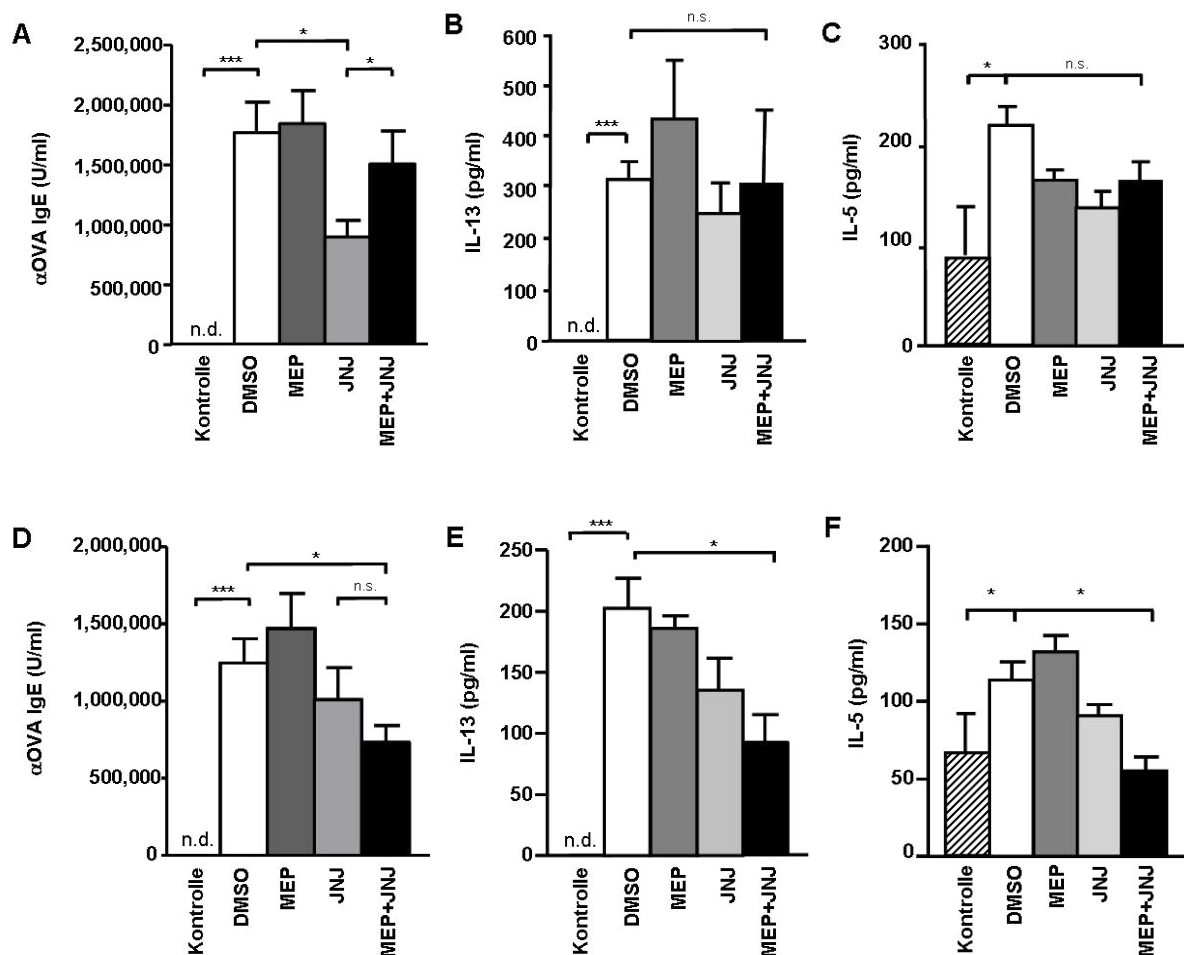


Abbildung 20: Effekt von Mepyramin und JNJ777120 auf T_H2 Zytokine und die anti-OVA IgE Konzentration im Serum. Mäuse wurden mit OVA sensibilisiert und provoziert und mit DMSO, Mepyramin, JNJ777120 oder Mepyramin und JNJ777120 behandelt entweder 30 min vor jeder OVA-Inhalation (A,B,C) oder 30 min vor und 2 h nach jeder OVA-Injektion (D,E,F). In den Seren, die aus dem 24 h nach der letzten Provokation entnommen Blut hergestellt wurden, wurden die anti-OVA IgE Titer per ELISA bestimmt (A,D) und die Konzentrationen an IL-13 (B,E) und IL-5 (C,F) mit Hilfe des FBI gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n_{\text{(Kontrolle)}} = 3$, $n_{\text{(DMSO)}} = 7$, $n_{\text{(MEP, JNJ, MEP+JNJ)}} = 8$. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind nach Varianzanalyse nach Bonferroni gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,005$).

3.2. Interaktion von mH₁R und mH₄R in einem HEK293-Zellmodell

In einem experimentellen Mausmodell für akutes Asthma bronchiale konnte gezeigt werden, dass die Gabe des H₄R-Antagonisten JNJ7777120 die Asthmasymptome deutlich verbessert (siehe 3.1 (70)). Die Kombinationstherapie mit dem H₁R-Antagonisten Mepyramin wirkte unterschiedlich auf den Verlauf der Erkrankung, je nachdem in welcher Phase der Asthmaentstehung die Substanzen appliziert wurden (siehe 3.1, (13)). Bei Gabe beider Antagonisten in der Provokationsphase wurde die verbesserte Symptomatik, die durch die alleinige Gabe von JNJ7777120 erzielt werden konnte, wieder aufgehoben. Dagegen wurde der JNJ7777120-Effekt verstärkt, wenn beide Substanzen in Kombination in der Sensibilisierungsphase verabreicht wurden. Diese Beobachtung lässt auf eine mögliche Interaktion der Signalwege von mH₁R und mH₄R schließen, die im folgenden Abschnitt in einem Zellmodell näher untersucht wurde. Dazu wurden HEK293-Zellen stabil entweder mit dem mH₁R, dem mH₄R oder beiden Rezeptoren in Kombination transfiziert (2.2.3.5).

3.2.1. Expression der rekombinanten Histaminrezeptoren in HEK293-Zellen

Da für den Nachweis der Histaminrezeptoren zurzeit keine spezifischen Antikörper zur Verfügung stehen (siehe 1.3.3), wurden bei der Klonierung in einen eukaryotischen Expressionsvektor Sequenzen für spezifische Epitop-*tags* vor bzw. nach der Sequenz des entsprechenden H_xRs eingefügt (2.2.2.14). Über diese Sequenzen wird ein Nachweis der rekombinanten Proteine mit Hilfe von Antikörpern ermöglicht. An den mH₁R wurde am extrazellulären N-Terminus ein *c-myc-tag* und an den mH₄R ein *Flag-tag* angefügt. Beide Rezeptoren wurden am intrazellulären C-Terminus mit einem His⁶-*tag* versehen (Abbildung 21). Außerdem ist die Sequenz für ein Signalpeptid erforderlich, welches die richtige Lokalisation der Sieben-Transmembran-Rezeptoren in der Zellmembran sicherstellt.

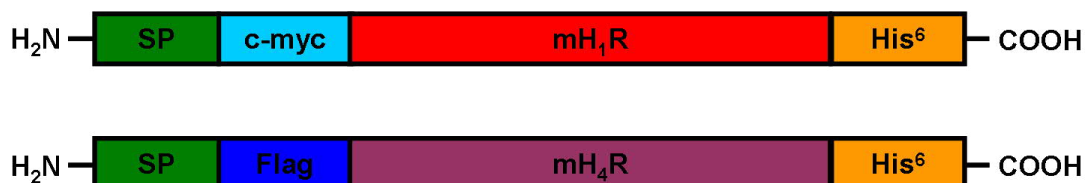


Abbildung 21: Schematische Darstellung der rekombinanten H_xRs. Um die Rezeptoren über spezifische Antikörper nachweisen zu können, wurden bei der Klonierung in die entsprechenden eukaryotischen Expressionsvektoren Sequenzen für verschiedene Epitop-*tags* vor bzw. nach der Sequenz für den H_xR eingefügt. Der mH₁R wurde N-terminal mit einem *c-myc-tag* und C-terminal mit einem His⁶-*tag* versehen. Der mH₄R wurde extrazellulär mit einem *Flag-tag* und intrazellulär mit einem His⁶-*tag* markiert. Beide Rezeptoren enthalten N-terminal die Sequenz für das Signalpeptid.

Um die Expression von mH₁R und mH₄R in den stabil transfizierten HEK293-Zellen nachzuweisen, wurden Totallysate angefertigt, diese über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert. Der Nachweis erfolgte mithilfe eines Flag- und eines c-myc-Antikörpers. In der Spur, in der mH₄R-Lysat aufgetragen wurde, waren 2 spezifische Banden mit einem Molekulargewicht zwischen 40 und 46 kDa zu erkennen, die in der Spur nicht auftraten, in der Lysat von mit Leervektor transfizierten Zellen aufgetragen war. Der H₄R hat ein errechnetes MW von ca 44 kDa (212). Das Auftreten von mehreren Banden bei unterschiedlichem apparenten Molekulargewicht ist sehr wahrscheinlich über unterschiedliche Glykosylierungen zu erklären (251). Auf dem mit dem c-myc-Antikörper gefärbten Blot war eine Bande bei ca. 64 kDa zu erkennen, die nur in der Spur auftrat, in das mH₁R-Lysat aufgetragen wurde, aber nicht in der Spur, in der Lysat von Leervektor transfizierten Zellen analysiert wurde. Die Größe von ca. 64 kDa entspricht dem errechneten und dem von (272) gezeigten Molekulargewicht für den bovinen und Ratten-H₁R.

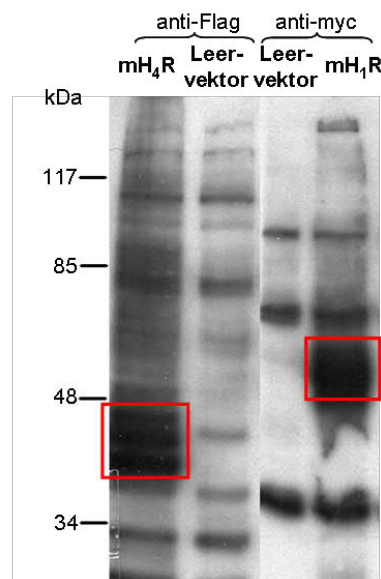


Abbildung 22: Expressionsanalyse des rekombinanten mH₁R und mH₄R im Western-Blot. Stabil transfizierte HEK293 mH₁R-, mH₄R- und mit Leervektor transfizierte Zellen wurden lysiert und die Protein-Konzentration der Totallysate bestimmt. Anschließend wurden 50 µg Protein auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und per Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte mit einem c-myc- und einen Flag-Antikörper jeweils in Kombination mit einem entsprechenden Sekundärantikörper.

Mit Hilfe von Western-Blot Analysen werden Proteine im denaturierten Zustand nachgewiesen. Dadurch kann allerdings nicht nachgewiesen werden, ob sich die Histaminrezeptoren korrekt in ihrer Tertiärstruktur gefaltet haben und als Sieben-Transmembran-Rezeptoren in die Zellmembran eingelagert haben. Daher wurden Expressionsanalysen der nativen Rezeptorproteine an intakten Zellen mittels

Durchflusszytometrie durchgeführt. Mit mH_1R , mH_4R und $mH_{1/4}R$ transfizierte HEK293-Zellen und Leervektor-transfizierte Kontrollzellen wurden mit dem c-myc- und dem Flag-Antikörper gefärbt. In der Analyse im Durchflusszytometer zeigten die mH_1R -transfizierte Zellen nach Färbung mit dem myc-Antikörper eine deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den mit dem Leervektor transfizierten Zellen und den nur mit Sekundärantikörper gefärbten Kontrollen. In den mH_4R -transfizierten Zellen trat eine ähnlich verstärkte Fluoreszenzintensität nach Färbung mit dem Flag-Antikörper auf, die ebenfalls in den Leervektor-transfizierten Zellen und den Kontrollen mit dem Sekundärantikörper nicht zu erkennen war. Die Zellen, die stabil mit dem mH_1R und dem mH_4R transfiziert worden waren, zeigten sowohl mit dem Flag- als auch mit dem c-myc-Antikörper eine erhöhte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Kontrollen und scheinen demnach beide Rezeptoren zu exprimieren.

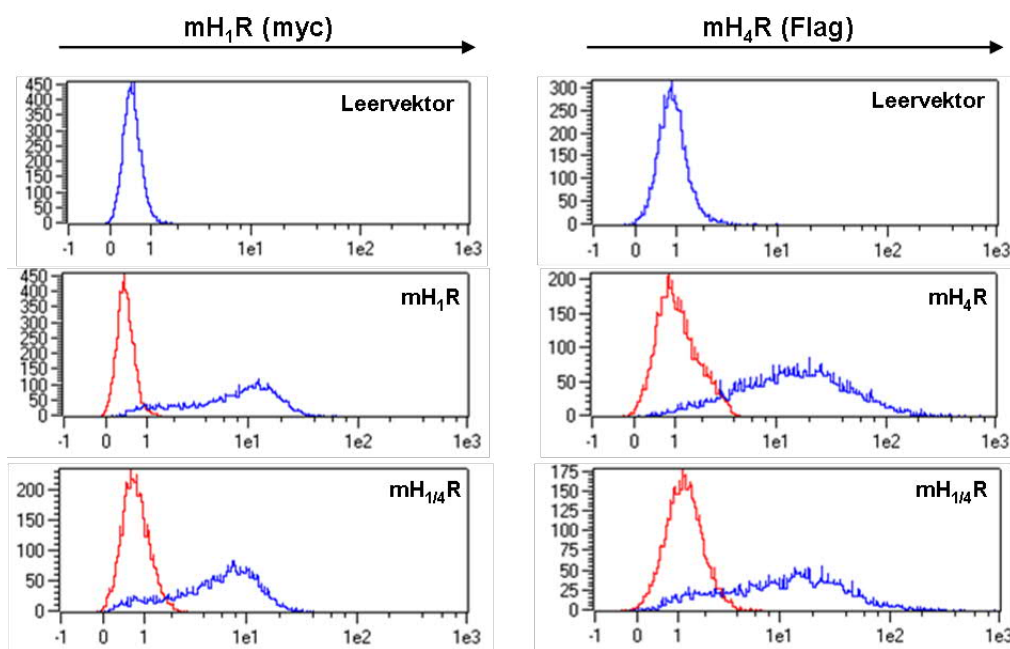


Abbildung 23: Expressionsanalyse des rekombinanten mH_1R und mH_4R mittels Durchflusszytometrie. Stabil transfizierte HEK293 mH_1R -, mH_4R -, $mH_{1/4}R$ - und mit Leervektor transfizierte Zellen wurden mit einem c-myc- und einem Flag-Antikörper und entsprechenden Sekundärantikörpern gefärbt. Die Rezeptorexpression wurde im Durchflusszytometer analysiert. Die blauen Histogramme stellen die Färbung mit den spezifischen Antikörpern dar, die roten Histogramme die nur mit Sekundärantikörper gefärbten Kontrollen.

3.2.2. Einfluss von mH₁R und mH₄R auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration in HEK293-Zellen

Die Expression in der Zellmembran, die mithilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden konnte, sagt allerdings noch nichts über die Funktionalität der rekombinanten Rezeptoren aus. Für eine funktionierende Signaltransduktion ist das Vorhandensein der entsprechenden G-Proteine essenziell. Der H₁R koppelt an das G_q-Protein und aktiviert darüber die Phospholipase C (PLC) (siehe 1.3.1.1). Dadurch kommt es nach Stimulation mit Histamin oder entsprechenden Liganden zu einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) (112). Dieser Effekt konnte für den hH₁R bereits an stabil transfizierten HEK-Zellen gezeigt werden (76). Die Aktivierung des H₄R führt ebenfalls zu einer gesteigerten $[Ca^{2+}]_i$ (203). Der H₄R koppelt hingegen an G_i-Proteine (siehe 1.3.1.4), über deren $\beta\gamma$ -Untereinheit ebenfalls die PLC aktiviert wird und es dadurch zu einem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg kommt (55). Daher wurde in diesen stabil transfizierten Zelllinien die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ als ein funktioneller Parameter analysiert.

Sowohl in den mH₁R-transfizierten Zellen als auch in den mH₄R- und mH_{1/4}R-transfizierten Zellen kam es in Abhängigkeit der Histamin-Konzentration zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. In den mH₁R- und mH_{1/4}R-Zellen wurde ein maximales $\Delta[Ca^{2+}]_i$ von ca. 400 nM erreicht (Abbildung 24A+C). Das Maximum in den mH₄R-transfizierten Zellen lag nur bei etwa 200 nM (Abbildung 24B). Der mH₁R hat eine relativ hohe Affinität zu Histamin, wie an dem pEC₅₀-Wert von 8,2 zu erkennen war (Abbildung 24A), verglichen mit dem pEC₅₀-Wert in den mH₄R-transfizierten Zellen von 6,9 (Abbildung 24B). Der pEC₅₀-Wert in den mH_{1/4}R-Zellen entspricht dem der mH₁R-transfizierten Zellen (Abbildung 24C).

5-Methylhistamin ist in der Literatur als selektiver Agonist am humanen H₄R beschrieben (178). In den mit mH₁R, mH₄R und mH_{1/4}R transfizierten HEK293-Zellen kam es durch Stimulation mit 5-Methylhistamin ebenfalls zu einem dosisabhängigen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. In den mH₁R- und den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen wurde ein maximales $\Delta[Ca^{2+}]_i$ von 600 nM (Abbildung 24D+F) und in den mH₄R-transfizierten Zellen ein maximales $\Delta[Ca^{2+}]_i$ von 200 nM (Abbildung 24E) erreicht. Die höchste Affinität mit einem pEC₅₀-Wert von 6,8 wurde für den mH₄R erreicht (Abbildung 24E), wogegen der pEC₅₀-Wert für die 5-Methylhistaminbindung an den mH₁R bei 5,2 (Abbildung 24D) und für die mH_{1/4}R-Zellen bei 5,9 lag (Abbildung 24F).

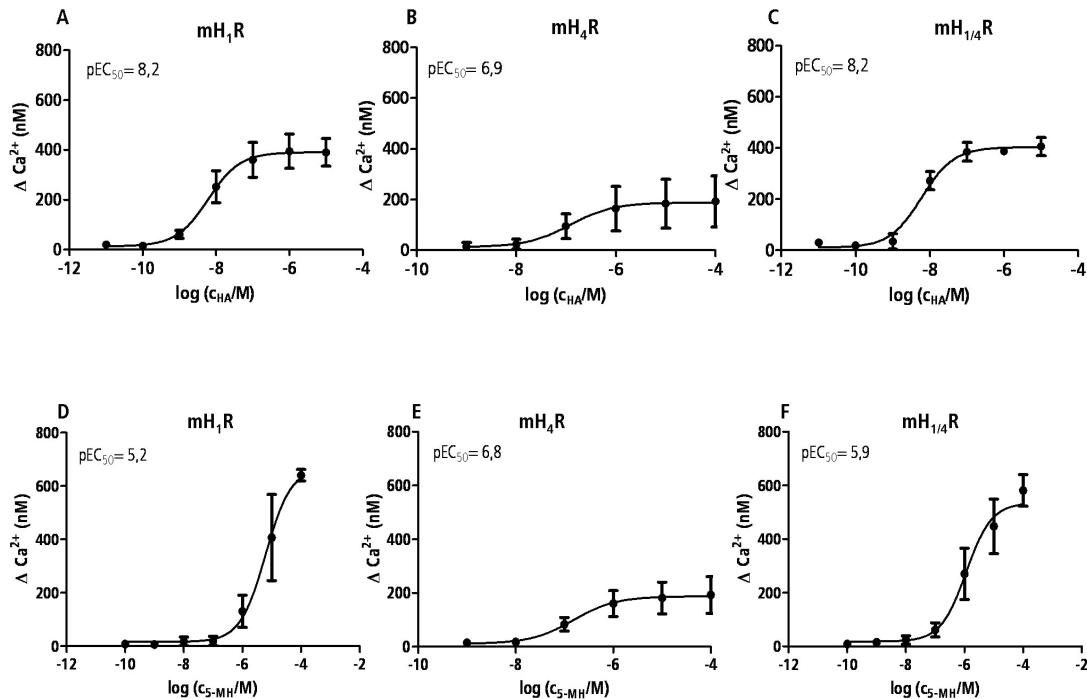


Abbildung 24: Effekt von Histamin und 5-Methylhistamin über den mH_1R und den mH_4R auf die $[Ca^{2+}]_i$. Stabil transfizierte HEK293 mH_1R - (A+D), mH_4R - (B+E) und $mH_{1/4}R$ -Zellen (C+F) wurden mit Fura-2 AM beladen und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen an Histamin (A-C) oder 5-Methylhistamin (D-F) stimuliert. Die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde über die Fluoreszenzintensität bei einer Exzitationswellenlänge von 340 nm und 380 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 2-3$ (jeweils 2 unabhängige Replikate)

Um zu zeigen, dass der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in diesen HEK293-Zelllinien tatsächlich über den mH_1R und den mH_4R vermittelt wurde, wurden die Zellen vor der Stimulation mit Histamin bzw. 5-Methylhistamin entweder mit dem H_1R -Antagonisten Mepyramin (MEP) oder mit dem H_4R -Antagonisten JNJ7777120 (JNJ) inkubiert. Anschließend wurde der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit Histamin bzw. 5-Methylhistamin in einer Konzentration, mit der nach Abbildung 24 ein maximales Ca^{2+} -Signal erreicht werden konnte, bestimmt.

Der durch Histamin induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in den mH_1R -transfizierten Zellen konnte durch Mepyramin konzentrationsabhängig annähernd auf das Basalniveau reduziert werden. Der pIC_{50} -Wert dafür entsprach 7,4 und der pK_b -Wert lag bei 8,6 (Abbildung 25A). Eine ähnlich potente Hemmung des Histamin-induzierten Ca^{2+} -Anstiegs konnte in den mH_4R -transfizierten Zellen mit JNJ7777120 mit einem pIC_{50} -Wert von 6,9 und einem pK_b -Wert von 8,8 (Abbildung 25B) bestimmt werden. In den $mH_{1/4}R$ -transfizierten Zellen konnte der durch Histamin induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg zwar durch Mepyramin mit einem pIC_{50} -Wert von 6,9 und einem pK_b -Wert von 8,2 (Abbildung 25C), aber nicht durch JNJ7777120 in einer maximalen Konzentration von 10 μM inhibiert werden (Abbildung 25D). Höhere Konzentrationen an JNJ7777120 wurden nicht verwendet, weil die Substanz in einer höheren

Konzentration nicht mehr selektiv den H₄R antagonisiert, sondern ebenfalls eine unspezifische Inhibition des Histamin-induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiegs in den mH₁R-transfizierten Zellen nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt). Der durch den H₄R-Agonisten 5-Methylhistamin induzierte [Ca²⁺]_i-Anstieg in den mH₁R-transfizierten Zellen konnte ebenfalls dosisabhängig durch den H₁R-Antagonisten Mepyramin mit einem pIC₅₀-Wert von 7,8 und einem pK_b-Wert von 8,2 inhibiert werden (Abbildung 25E). In den mH₄R-transfizierten Zellen betrug der pIC₅₀-Wert 7,0 und der pK_b-Wert 8,8 für die Inhibition des 5-Methylhistamin-induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiegs mit JNJ777120 (Abbildung 25F). In beiden Fällen wurde die [Ca²⁺]_i durch die Antagonisten auf das Niveau von unstimulierten Zellen reduziert. In den mH_{1/4}R wurde der 5-Methylhistamin-induzierte [Ca²⁺]_i-Anstieg durch die Zugabe von Mepyramin mit einem pIC₅₀-Wert von 7,3 und einem pK_b-Wert von 8,3 annähernd auf den Basalwert reduziert (Abbildung 25G). Der H₄R-Antagonist JNJ777120 bewirkte auch in der höchsten Konzentration von 10 μM nur eine leichte Reduktion der [Ca²⁺]_i auf etwa 60 % der nicht antagonisierten 5-Methylhistamin-Stimulation. Der pIC₅₀-Wert für diese Inhibition betrug 6,0 und der pK_b-Wert 7,0 (Abbildung 25H).

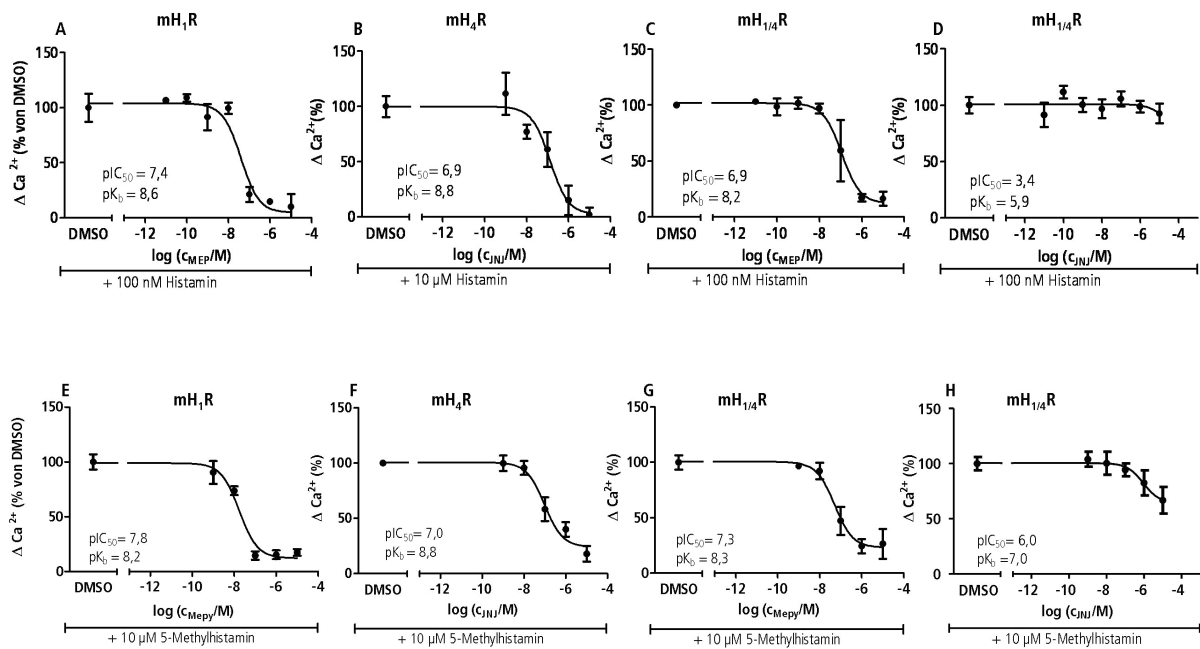


Abbildung 25: Effekt von Mepyramin und JNJ777120 auf den durch Histamin bzw. 5-Methylhistamin induzierten Anstieg der [Ca²⁺]_i über den mH₁R und den mH₄R. Stabil transfizierte HEK293 mH₁R-(A+E), mH₄R-(B+F) und mH_{1/4}R-Zellen (C,D+G,H) wurden mit Fura-2 AM beladen und mit verschiedenen Konzentrationen an Mepyramin (A,C+E,G) oder JNJ777120 (B,D+F,H) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 nM (A,C,D) oder 10 μM (B) Histamin oder 10 μM 5-Methylhistamin (E-H) stimuliert. Die Änderung der [Ca²⁺]_i wurde über die Fluoreszenzintensität bei einer Exzitationswellenlänge von 340 nm und 380 nm bestimmt. Die Stimulation mit Histamin bzw. 5-Methylhistamin wurde als 100 % angenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n = 2-3 (jeweils 2 unabhängige Replikate)

3.2.3. Einfluss von mH₁R und mH₄R auf die Forskolin-induzierte intrazelluläre cAMP-Konzentration in HEK293-Zellen

Als weiteren Parameter für die Signaltransduktion der H_xRs wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration in den stabil transfizierten HEK293-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen zuerst mit Forskolin, einem Aktivator für Adenylylzyklasen (ACs), stimuliert (259). Für den H₁R ist bereits beschrieben, dass die Stimulation mit Histamin den Forskolin-induzierten cAMP-Anstieg verstärkt (170). Diese Verstärkung kommt entweder durch die Aktivierung einiger AC-Isoformen durch die erhöhte [Ca²⁺]_i und Calmodulin zustande (60) oder sie wird über einen [Ca²⁺]_i-unabhängigen Weg induziert, der durch Aktivierung von ACs über die βγ-Untereinheit des G_q-Proteins vermittelt wird (188). Der H₄R, der an das G_i-Protein koppelt, kann darüber direkt Adenylylzyklasen hemmen und so die Forskolin-induzierte cAMP-Konzentration vermindern (89, 310).

Die mH₁R-, mH₄R- und mH_{1/4}R-transfizierten Zellen wurden mit Forskolin stimuliert, um eine Basalaktivität der Adenylylzyklasen zu erreichen. Zusätzlich wurden die Zellen entweder mit oder ohne Histamin bzw. 5-Methylhistamin und/oder den H₁R- und H₄R-Antagonisten Mepyramin und JNJ7777120 inkubiert. Die durch Stimulation mit 100 μM Forskolin allein erreichte intrazelluläre cAMP-Konzentration wurde als 100 % angenommen und die weiteren Werte entsprechend berechnet. Sowohl die mH₁R-, mH₄R- als auch die mH_{1/4}R-transfizierten Zellen zeigten nach Stimulation mit Forskolin einen deutlichen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollen. In den mH₁R-transfizierten Zellen kam es durch zusätzliche Stimulation mit 100 μM Histamin oder 100 μM 5-Methylhistamin zu einem enormen Anstieg der cAMP-Konzentration, der durch die Histamin-Stimulation mit etwa 3500 % (Abbildung 26A) deutlich stärker ausfiel als durch Stimulation mit dem als H₄R-Agonisten beschriebenen 5-Methylhistamin mit ca. 600 % (Abbildung 27A). Diese Effekte konnten durch Mepyramin konzentrationsabhängig reduziert werden. Die Inhibition der Histamin-Stimulation mit 10 μM Mepyramin bewirkte zwar eine signifikante Reduktion der Forskolin-induzierten cAMP-Konzentration, die allerdings nicht den Ausgangswert der Forskolin-Stimulation erreichte (Abbildung 26A). Nach Stimulation mit 5-Methylhistamin reichte bereits eine Mepyramin-Konzentration von 0,1 μM aus, um die Forskolin-induzierte cAMP-Konzentration auf den Ausgangswert der Forskolin-Stimulation abzusenken (Abbildung 27A). Die alleinige Inkubation mit Mepyramin hatte in beiden Fällen keinen Einfluss auf die Forskolin-induzierte cAMP-Konzentration. In den mH₄R-transfizierten Zellen kam es sowohl nach Stimulation mit 100 μM Histamin als auch mit

100 μM 5-Methylhistamin zu einer deutlichen Reduktion der Forskolin-induzierten cAMP-Konzentration auf etwa 25-30 % (Abbildung 26B+Abbildung 27B). Dieser Effekt konnte durch die zusätzliche Gabe von JNJ7777120 konzentrationsabhängig wieder aufgehoben werden. Allerdings war in beiden Fällen eine Konzentration von 100 μM JNJ7777120 erforderlich, um annähernd eine cAMP-Konzentration von 100 % zu erreichen. Aber auch diese JNJ7777120-Konzentration hatte alleine ohne Histamin- oder 5-Methylhistamin-Stimulation keinen Einfluss auf die Forskolin-induzierte cAMP-Konzentration. In den $\text{mH}_{1/4}\text{R}$ -transfizierten Zellen zeigt sich ein ähnliches Bild wie in den mH_1R -transfizierten Zellen. Durch die Stimulation mit 100 μM Histamin wurde die Forskolin-induzierte cAMP-Konzentration auf ca. 1000 % erhöht (Abbildung 26C). Die Stimulation mit 100 μM 5-Methylhistamin bewirkte einen Anstieg auf etwa 150 % (Abbildung 27C). In beiden Fällen wurde die Forskolin-induzierte cAMP-Konzentration durch die Gabe von Mepyramin signifikant reduziert. Nach der Stimulation mit Histamin und zusätzlicher Gabe von 10 μM Mepyramin wurde die cAMP-Konzentration auf ~40 % reduziert, also auf ein geringeres Niveau als durch die Stimulation nur mit Forskolin erreicht wurde (Abbildung 26C). In Kombination mit 5-Methylhistamin reichten schon 0,1 μM Mepyramin aus, um die Forskolin-induzierte cAMP-Konzentration auf 30 % zu reduzieren. Eine Mepyramin-Konzentration von 10 μM bewirkte hier sogar eine Reduktion auf 20 % der Forskolin-Stimulation (Abbildung 27C). Diese Reduktion unterhalb des Forskolinwerts entspricht ungefähr der Abnahme, die in den mH_4R -transfizierten Zellen nach Stimulation mit Histamin (Abbildung 26B) oder 5-Methylhistamin (Abbildung 27B) gemessen wurde. Daher scheinen beide Rezeptoren in dieser Zelllinie funktionell exprimiert zu sein. Der inhibitorische mH_4R -Effekt wird allerdings erst deutlich, wenn der mH_1R durch den Antagonisten blockiert wird. Sowohl nach Stimulation mit Histamin als auch mit 5-Methylhistamin hatte die Gabe von JNJ7777120 auch in einer Konzentration von 100 μM keinen signifikanten Einfluss auf die Forskolin-induzierte cAMP-Konzentration. Wurden allerdings beide Antagonisten in Kombination verwendet (Mepyramin 10 μM und JNJ7777120 100 μM), also beide Rezeptoren blockiert, wurde annähernd die cAMP-Konzentration erreicht, die der Stimulation nur mit Forskolin entsprach (Abbildung 26C+Abbildung 27C). In Kombination mit der 5-Methylhistamin-Stimulation kam es bei der Gabe beider Antagonisten sogar zu einem signifikanten Anstieg der Forskolin-induzierten cAMP-Konzentration verglichen mit der alleinigen Gabe von 10 μM Mepyramin (Abbildung 27C). Die Selektivität für den entsprechenden Rezeptor blieb hier auch bei einer Mepyramin-Konzentration von 10 μM und

einer JNJ777120-Konzentration von 100 μM erhalten. Mepyramin hatte keinen Einfluss auf die durch Histamin vermittelte Reduktion der Forskolin-induzierten cAMP-Konzentration in den mH_4R -transfizierten Zellen und JNJ777120 beeinflusste den durch Histamin vermittelten Anstieg der Forskolin-induzierten cAMP-Konzentration in den mH_1R -transfizierten Zellen nicht (Daten siehe Anhang II).

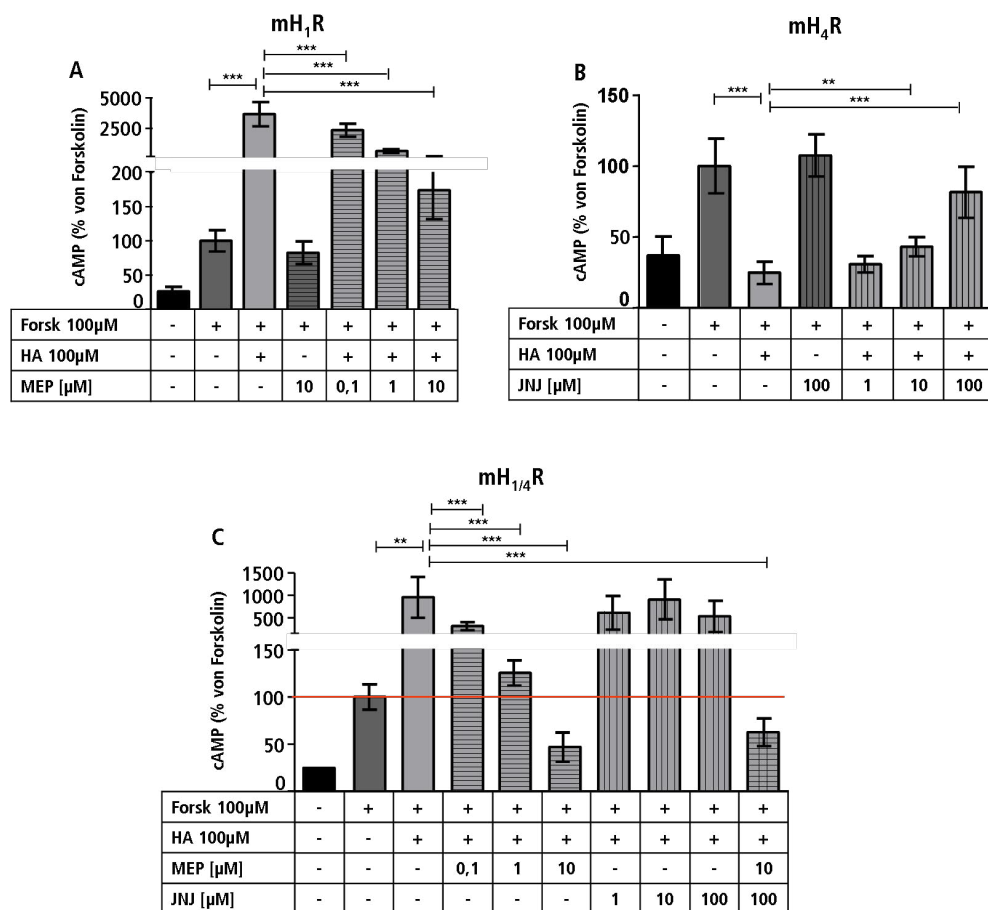


Abbildung 26: Effekt von Histamin auf den Forskolin-induzierten cAMP-Anstieg über den mH_1R und den mH_4R und die Inhibition mit den Antagonisten Mepyramin und JNJ777120. Zu den stabil transfizierten HEK293 mH_1R - (A), mH_4R - (B) und $\text{mH}_{1/4}\text{R}$ -Zellen (C) wurde zuerst Mepyramin und/oder JNJ777120 in angegebener Konzentration gegeben und dann mit 100 μM Histamin (A-C) stimuliert. Anschließend wurde zu den Zellen 100 μM Forskolin oder DMSO als Kontrolle geben und für 10 min inkubiert. Die intrazelluläre cAMP-Konzentration wurde nach Extraktion mittels HPLC/MS/MS bestimmt und auf die Protein-Konzentration bezogen. Die Stimulation mit Forskolin wurde als 100 % angenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 2-5$ (jeweils 3 unabhängige Replikate)

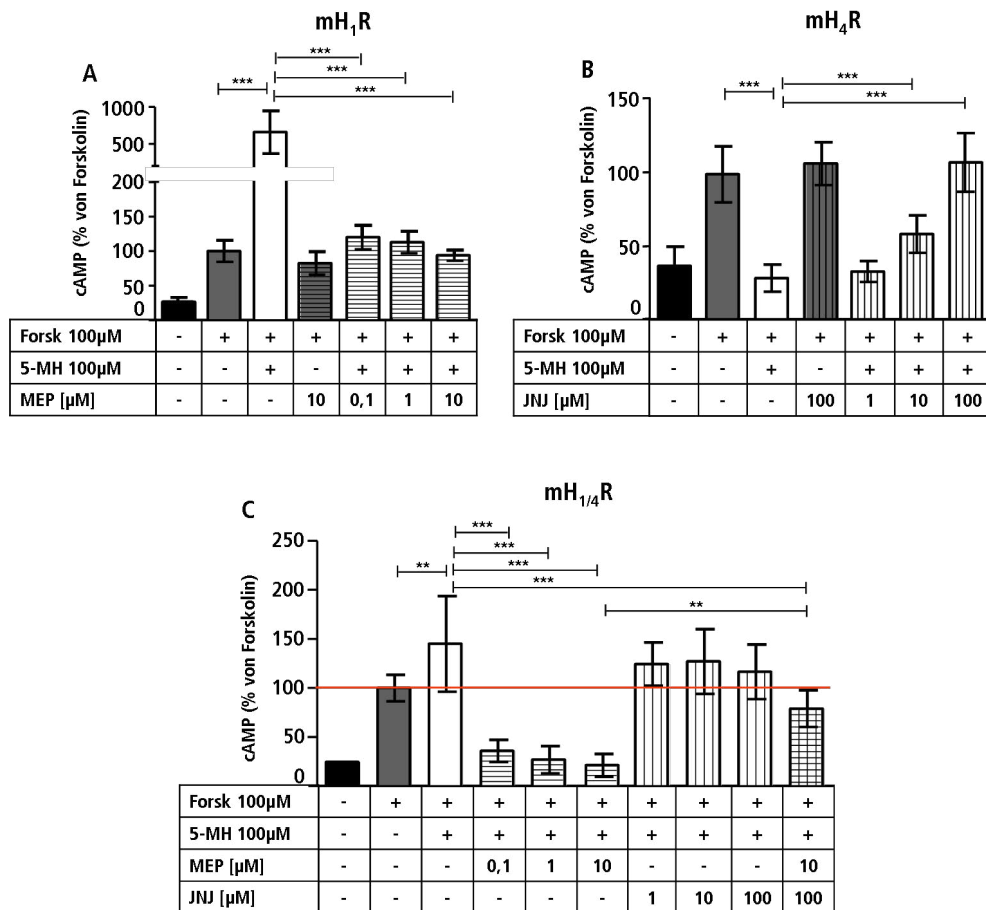


Abbildung 27: Effekt von 5-Methylhistamin auf den Forskolin-induzierten cAMP-Anstieg über den mH₁R und den mH₄R und die Inhibition mit den Antagonisten Mepyramin und JNJ777120. Zu den stabil transfizierten HEK293 mH₁R-(A), mH₄R-(B) und mH_{1/4}R-Zellen (C) wurde zuerst Mepyramin und/oder JNJ777120 in angegebener Konzentration gegeben und dann mit 5-Methylhistamin (A-C) stimuliert. Anschließend wurde zu den Zellen 100 µM Forskolin oder DMSO als Kontrolle geben und für 10 min inkubiert. Die intrazelluläre cAMP-Konzentration wurde nach Extraktion mittels HPLC/MS/MS bestimmt und auf die Protein-Konzentration bezogen. Die Stimulation mit Forskolin wurde als 100 % angenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n = 2-5 (jeweils 3 unabhängige Replikate)

3.2.4. Inhibition mit Pertussis-Toxin

Pertussis-Toxin ist ein sekretorisches Exotoxin, welches von dem Gram-negativen Bakterium *Bordetella Pertussis* gebildet wird. Das Toxin katalysiert die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit des heterotrimeren G_i-Proteins. Dadurch ist keine Interaktion des G_i-Proteins mit dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor mehr möglich und das G_i-Protein verbleibt in seinem GDP-gebundenen inaktiven Zustand, wodurch die G-proteinabhängige Signaltransduktion des Rezeptors inhibiert wird (38, 204). Da nur der mH₄R an das G_i-Protein koppelt und der mH₁R an das G_q-Protein, sollten durch das Toxin im Folgenden nur die mH₄R-vermittelten Effekte beeinflusst werden.

3.2.4.1. Einfluss von Pertussis-Toxin auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration

Nach Inkubation mit Pertussis-Toxin wurden die mit mH₁R-, mH₄R- und mH_{1/4}R-transfizierten HEK293-Zellen mit Histamin bzw. 5-Methylhistamin stimuliert und die Änderung der [Ca²⁺]_i bestimmt. In den mH₁R-transfizierten Zellen konnte durch Stimulation mit Histamin bzw. 5-Methylhistamin ein Calciumanstieg von ~250-280 nM (Abbildung 28A+D) gemessen werden, der nicht durch die Inkubation mit Pertussis-Toxin beeinflusst wurde. Die nicht mit Pertussis-Toxin behandelten mH₄R-transfizierten Zellen reagierten auf die Stimulation mit Histamin oder 5-Methylhistamin mit einem [Ca²⁺]_i-Anstieg von ca. 100 nM. Die mit Pertussis-Toxin vorinkubierten mH₄R-transfizierten Zellen zeigten dagegen auf die Stimulation keinen Anstieg der [Ca²⁺]_i. Der Δ[Ca²⁺]_i-Wert von etwa 10 nM entsprach dem Kontrollwert, bei dem nur Puffer zugegeben wurde. Dagegen reagierten die mH₄R-transfizierten Zellen unabhängig von der Inkubation mit Pertussis-Toxin auf die Stimulation mit ATP mit einem Ca²⁺-Anstieg von ~75 nM (Abbildung 28B+E). Pertussis-Toxin inhibierte also nur den Histamin- bzw. 5-Methylhistamin-vermittelten Ca²⁺-Anstieg in den mH₄R-transfizierten Zellen. Die Zellen haben durch die Inkubation mit dem Toxin jedoch nicht ihre Eigenschaft verloren, Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern freizusetzen oder von extrazellulär einzuschleusen, sondern reagierten trotzdem noch auf ATP-Stimulation. In den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen kam es durch Stimulation mit Histamin oder 5-Methylhistamin zu einem [Ca²⁺]_i-Anstieg von 290-320 nM, der nicht durch die Vorinkubation mit Pertussis-Toxin beeinflusst wurde (Abbildung 28C+F).

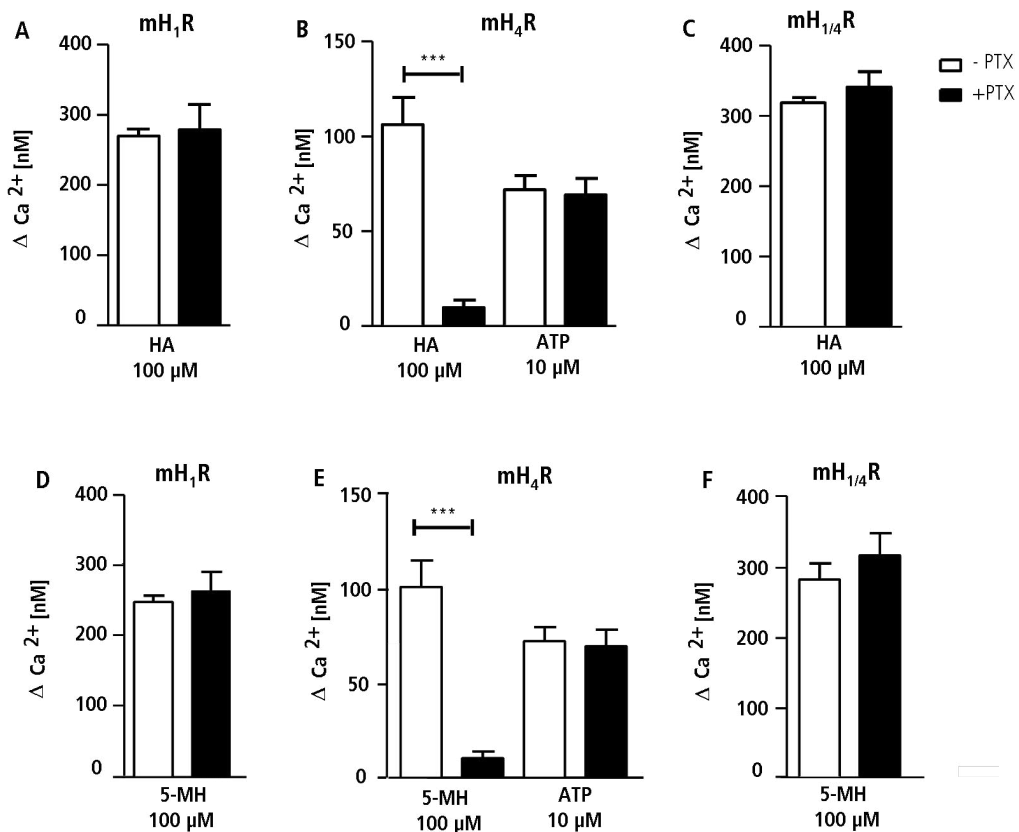


Abbildung 28: Einfluss von PTX auf die durch Histamin/5-Methylhistamin-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ über den mH_1R und den mH_4R . Stabil transfizierte HEK293 mH_1R - (A+D), mH_4R - (B+E) und $mH_{1/4}R$ -Zellen (C+F) wurden für 18 h mit oder ohne 50 ng/ml PTX inkubiert. Anschließend wurden sie mit Fura-2 AM beladen und die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde über die Messung der Fluoreszenzintensität bei einer Exzitationswellenlänge von 340 nm und 380 nm nach Stimulation mit 100 μM Histamin (A-C) oder 100 μM 5-Methylhistamin (D-F) bestimmt. Die mH_4R -transfizierten Zellen wurden außerdem mit 10 μM ATP (B+E) stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 2$ mit jeweils 2 unabhängigen Replikaten.

3.2.4.2. Einfluss von Pertussis-Toxin auf die Forskolin-induzierte intrazelluläre cAMP-Konzentration

Die mH_1R -, mH_4R - und $mH_{1/4}R$ -transfizierten HEK293-Zellen wurden mit Pertussis-Toxin inkubiert, anschließend mit Forskolin und Histamin bzw. 5-Methylhistamin stimuliert und die intrazelluläre cAMP-Konzentration bestimmt. Das Ergebnis der Stimulation mit Forskolin wurde als 100 % angenommen und die anderen Werte entsprechend berechnet. Die $mH_{1/4}R$ -transfizierten Zellen wurden zusätzlich vor der Stimulation mit Mepyramin behandelt.

Unabhängig davon, ob die Zellen mit Pertussis-Toxin behandelt wurden, konnte in allen drei Zelllinien mit Forskolin ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration induziert werden. In den mH_1R -transfizierten Zellen wurde die Forskolin-induzierte cAMP-Konzentration durch Stimulation mit Histamin auf ~400 % (Abbildung 29A) und durch Stimulation mit 5-Methylhistamin auf ~200 % (Abbildung 29D) erhöht, unabhängig davon, ob

die Zellen vorher mit Pertussis-Toxin behandelt wurden. In den nicht mit Pertussis-Toxin behandelten mH₄R-transfizierten Zellen wurde die Forskolin-induzierte cAMP-Konzentration durch Histamin auf 20 % (Abbildung 29B) und durch 5-Methylhistamin auf 30 % (Abbildung 29E) reduziert. In den Toxin-behandelten Zellen konnte diese Reduktion dagegen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 29B+E). Die mH_{1/4}R-transfizierten Zellen zeigten nach Stimulation mit Histamin einen Anstieg der Forskolin-induzierten cAMP-Konzentration von ca. 400 % in den unbehandelten Zellen und ca. 500 % in den mit Pertussis-Toxin vorbehandelten Zellen (Abbildung 29C). Die zusätzliche Inkubation mit Mepyramin bewirkte in den unbehandelten Zellen eine Abnahme der cAMP-Konzentration auf ~50 % der Forskolin-Stimulation, die ungefähr dem Histamineffekt am mH₄R entspricht (Abbildung 29B). In den Toxin-behandelten Zellen wurde die cAMP-Konzentration durch Mepyramin nur auf den Forskolinwert (~110 %) reduziert (Abbildung 29C). Durch die Stimulation mit 5-Methylhistamin wurde die Forskolin-induzierte cAMP-Konzentration in den unbehandelten mH_{1/4}R-transfizierten Zellen nicht erhöht. Allerdings kam es in den mit Pertussis-Toxin vorbehandelten Zellen zu einem Anstieg auf ca. 200 % (Abbildung 29F). Mepyramin bewirkte in den unbehandelten Zellen eine Reduktion auf ~25 %, die dem 5-Methylhistamineffekt am mH₄R entsprach (Abbildung 29E). In den Toxin-behandelten mH_{1/4}R-Zellen konnte Mepyramin die Forskolin-induzierte cAMP-Konzentration nur etwa auf den Forskolinwert reduzieren (Abbildung 29F).

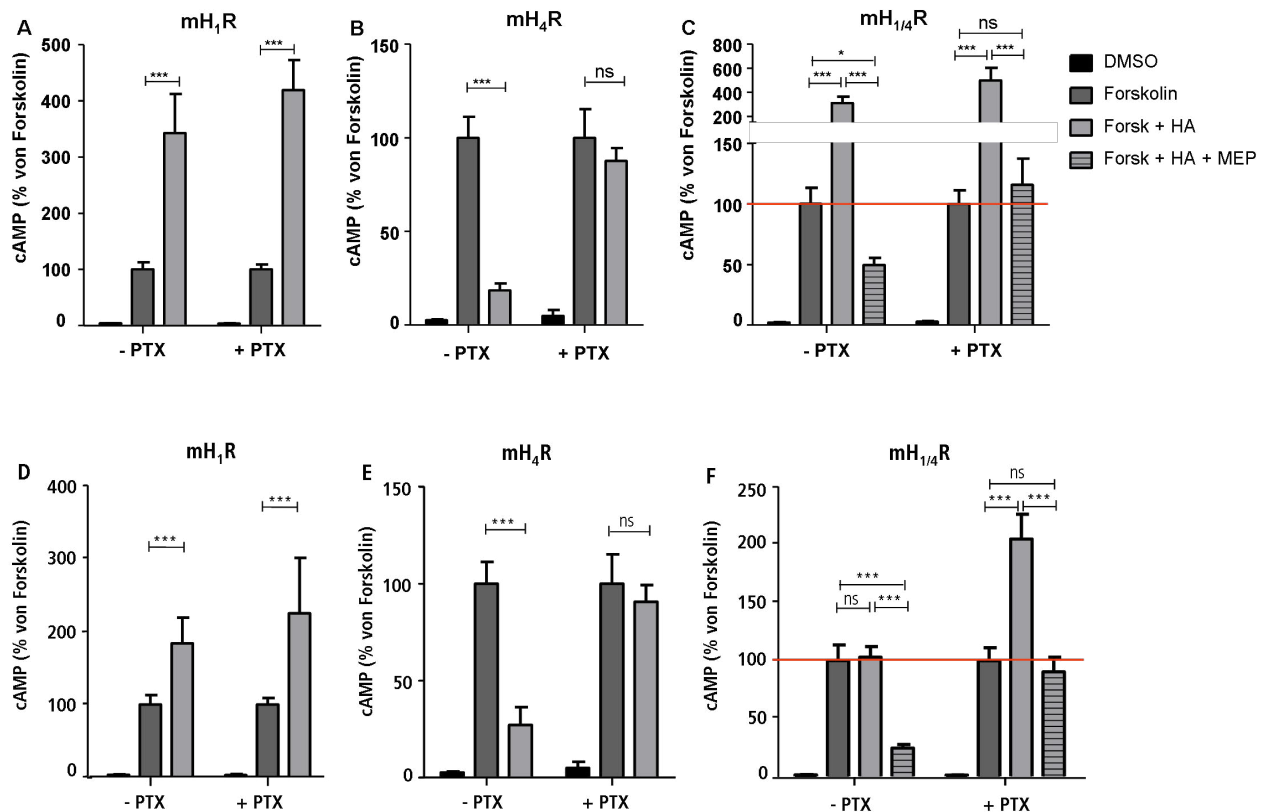


Abbildung 29: Einfluss von PTX auf die durch Histamin/5-Methylhistamin induzierte Änderung der Forskolin-induzierten cAMP-Konzentration über den mH₁R und den mH₄R. Stabil transfizierte HEK293 mH₁R-(A+D), mH₄R-(B+E) und mH_{1/4}R-Zellen (C+F) wurden für 18 h mit oder ohne 50 ng/ml PTX inkubiert. Anschließend wurden sie mit 100 µM Histamin (A-C) oder 100 µM 5-Methylhistamin (D-F) und 100 µM Forskolin oder DMSO als Kontrolle für 10 min stimuliert. Die mH_{1/4}R-transfizierten Zellen wurden vor der Stimulation zusätzlich mit oder ohne 10 µM Mepyramin behandelt. Die intrazelluläre cAMP-Konzentration wurde nach Extraktion mittels HPLC/MS/MS bestimmt und auf die Protein-Konzentration bezogen. Die Stimulation mit Forskolin wurde als 100 % angenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n = 2 mit jeweils 3 unabhängigen Replikaten

3.2.5. Histamin-abhängige Phosphorylierung von Komponenten des MAPK-Signalwegs über den mH₁R und mH₄R

Der Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration durch die Aktivierung der Phospholipase C und die Aktivierung oder Hemmung der Adenylylzyklen und darüber veränderte cAMP-Konzentrationen in den Zellen sind zwei sehr proximale Ereignisse der Signalwege, die über den H₁R und H₄R aktiviert werden können. Es wurde bereits sowohl für den mH₁R (3, 37) als auch für den mH₄R (62) gezeigt, dass durch eine Stimulation mit Histamin weiter distal auftretende Kinasen des MAPK-Signalwegs aktiviert werden können. Um einen Überblick zu bekommen, welche Kinasen des MAPK-Signalwegs in der Signaltransduktion des mH₁R und des mH₄R in den HEK293-Zellen eine Rolle spielen, wurde ein MAPK-Array durchgeführt, mit dem die Phosphorylierung einzelner Kinasen des

MAPK-Signalwegs und einiger anderer Serin/Threonin-Kinasen nachgewiesen werden kann. Es wurden dafür Lysate von den stabil transfizierten Zelllinien eingesetzt, die unstimuliert belassen oder mit Histamin stimuliert wurden. Die Differenz der Pixeldichte zwischen unstimulierten und stimulierten Proben ist in Abbildung 30 für die Kinasen aufgetragen, die eine veränderte Phosphorylierung nach Histamin-Stimulation aufwiesen.

Eine besonders starke Phosphorylierung, die sowohl in den mH₁R-, den mH₄R- als auch in den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen auftrat, konnte für die Kinasen ERK 1 und ERK 2 detektiert werden. Die Kinasen p38 α und CREB wurden nur moderat über die Aktivierung des mH₁R und mH₄R phosphoryliert. Die Kombination beider Rezeptoren in einer Zelle führte allerdings zu einer deutlich verstärkten Phosphorylierung von p38 α . Für MKK 3 und MKK 6 wurde eine leichte Phosphorylierung über die mH₄R-Aktivierung detektiert, die in den mH_{1/4}R-Zellen verstärkt auftrat. RSK 1 und JNK wurden moderat über eine Aktivierung des mH₄R phosphoryliert, was in ähnlicher Intensität auch in den mH_{1/4}R-Zellen zu erkennen war. Eine Phosphorylierung von Akt trat nur in den mH₄R-transfizierten Zellen auf und p70S6 wurde nur in den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen phosphoryliert.

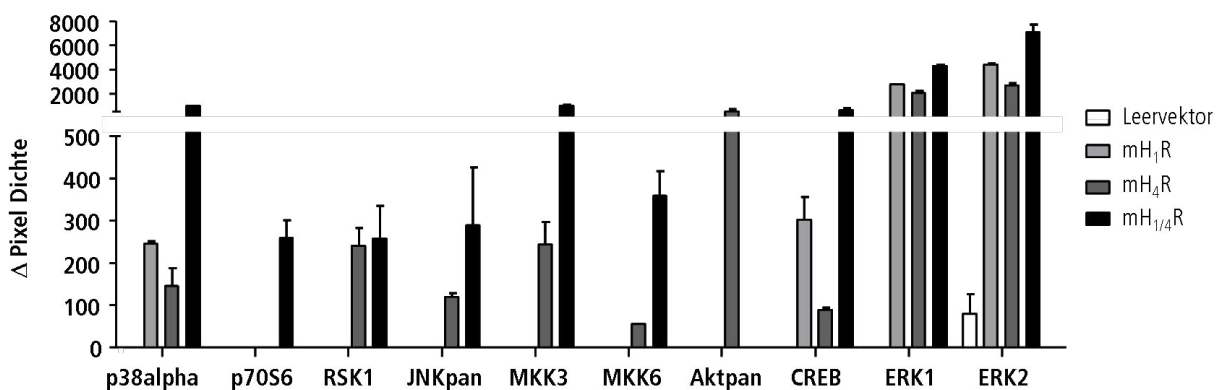


Abbildung 30: Effekt von Histamin auf die Phosphorylierung von Komponenten des MAPK-Signalwegs. Stabil transfizierte HEK293 Leervektor-, mH₁R-, mH₄R- und mH_{1/4}R-Zellen wurden für 5 min mit oder ohne 100 μ M Histamin stimuliert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden in einem MAPK-Array eingesetzt, mit dem man die Phosphorylierung einzelner Kinasen des MAPK-Signalwegs und anderer Serin/Threonin-Kinasen parallel in einer Probe nachweisen kann. Die Pixeldichte der einzelnen Signale wurde bestimmt und die Differenz der Intensität der Punkte ohne Histamin-Stimulation und denen mit Histamin-Stimulation wurde dargestellt.

Anhand des MAPK-Arrays wurde eine Auswahl getroffen, welche Kinasen im Folgenden im Western-Blot näher analysiert werden sollten. Dazu wurden die mH₁R-, mH₄R- und mH_{1/4}R-transfizierten Zellen für unterschiedliche Zeiten mit Histamin stimuliert, lysiert und mit entsprechenden phosphospezifischen Antikörpern mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 31). In der ersten Zeile ist der Nachweis mit einem Antikörper dargestellt, der das

totale p38-Protein bei einer Größe von 38 kDa detektiert. Die Banden weisen in allen Spuren ähnliche Intensitäten auf, sodass von einer gleichmäßigen Beladung der Gele ausgegangen werden konnte. In der zweiten Zeile wurde ein Phospho-p38 Antikörper eingesetzt, der nur die phosphorylierte Form des 38 kDa großen Proteins erkennt. Nach 5 und 15 min Stimulation mit Histamin konnte in den mH₁R- und mH₄R-transfizierten Zellen eine dünne Bande und in den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen eine stärkere Bande bei entsprechender Größe detektiert werden, die in den unstimulierten Zellen (0 min) nicht auftrat. Bei 30 min ist diese Bande kaum noch zu erkennen, wurde in den mH₄R- und mH_{1/4}R-transfizierten Zellen nach 60 min Stimulationszeit allerdings wieder etwas intensiver. Die Kinasen ERK 1 und ERK 2, deren phosphorylierte Form in der dritten Zeile analysiert wurden, weisen eine Größe von 42 und 44 kDa auf. Mit einem entsprechenden Antikörper traten in den mH₄R- und mH_{1/4}R-transfizierten Zellen bereits nach 2 min zwei Banden entsprechender Größe auf, die in den unstimulierten Zellen nicht nachweisbar waren. Die Bandenintensität nahm nach 5 min Stimulation stark zu und blieb auch bis zu einer Stimulationszeit von 60 min erhalten. In den mH₁R-transfizierten Zellen traten weniger intensive Banden nach 2 und 5 min auf. Nach einer Stimulation von 15 min waren sie kaum noch nachweisbar, traten jedoch nach 30 und 60 min Inkubation mit Histamin wieder auf. Mithilfe des Phospho-CREB Antikörpers wurde in der vierten Zeile eine entsprechende Bande bei 43 kDa nachgewiesen. In den mH₁R-transfizierten Zellen trat diese bereits nach 2 min leicht auf, war nach 5 min Stimulation wieder schwächer und nach 15 - 60 min wieder mit stärkerer Intensität zu detektieren. In den mH₄R-transfizierten Zellen kam es bis zu einer Stimulationszeit von 15 min zu einer Zunahme der CREB-Phosphorylierung, die bei längeren Inkubationszeiten wieder abnahm. Die mH_{1/4}R-Zellen zeigten nach 5, 15 und 60 min einen Anstieg der CREB-Phosphorylierung. In der unteren Zeile wurde die phosphorylierte Form der Kinase SAPK/JNK mit einer Größe von 46 und 54 kDa nachgewiesen. In den mH₁R-transfizierten Zellen traten keine Banden in entsprechender Größe auf. In den mH₄R-transfizierten Zellen war eine deutliche Bande bei 46 kDa vor allem nach 5 min zu erkennen, die nach längerer Inkubationszeit mit Histamin nicht mehr nachweisbar war. Die stärkste SAPK/JNK-Phosphorylierung in den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen war ebenfalls nach 5 min zu detektieren. Allerdings war hier die entsprechende Bande bei einer Stimulationszeit von bis zu 60 min noch in leicht abgeschwächter Form nachweisbar. Auf den mit dem SAPK/JNK-Antikörper entwickelten Blot trat in allen Spuren eine dicke Bande kurz über der spezifischen 46 kDa Bande auf (Abbildung 31). Hierbei scheint es zu einer Kreuzreaktivität mit einem anderen in den

Lysaten enthaltenen zytosolischen Protein zu kommen, weil die Bandenintensität sich nicht in Abhängigkeit von der Histaminstimulation ändert. Das Auftreten dieser Bande mit gleichmäßiger Intensität in allen Spuren ist allerdings ein weiteres Indiz für eine gleichmäßige Beladung des Gels.

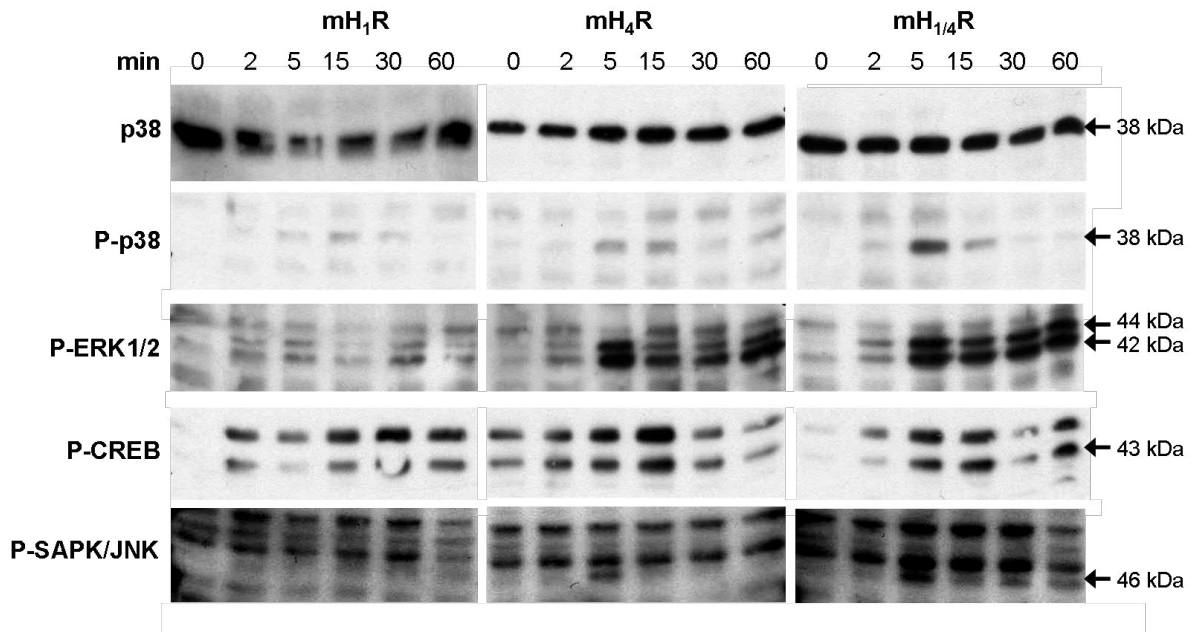


Abbildung 31: Effekt von Histamin auf die Phosphorylierung von p38, ERK 1/2, CREB und SAPK/JNK über den mH₁R und den mH₄R. Stabil transfizierte HEK293 mH₁R-, mH₄R- und mH_{1/4}R-Zellen wurden für entsprechende Zeit mit 100 μ M Histamin stimuliert, anschließend lysiert und die Protein-Konzentration bestimmt. 50 μ g der Lysate wurden pro Spur auf einer 12,5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern die spezifisch das totale p38 Protein (p38), Phospho-p38 (P-p38), Phospho-ERK 1/2 (P-ERK 1/2), Phospho-CREB (P-CREB) und Phospho-SAPK/JNK (P-SAPK/JNK) erkennen. Dargestellt ist jeweils ein Ausschnitt aus einem repräsentativen Western-Blot.

3.2.6. Histamin-abhängige Genexpression

Die Phosphorylierung spezifischer Substratproteine durch MAPK beeinflusst die Zellproliferation, das Überleben, die Motilität und den Metabolismus der Zelle und reguliert die Transkription und Translation bestimmter Gene (47). Da in 3.2.5 eine Histamin-abhängige Phosphorylierung von Komponenten des MAPK-Signalwegs nachgewiesen werden konnte, wurde die Expression einzelner Zielgene nach Histamin-Stimulation auf RNA-Ebene mittels Real-Time PCR analysiert. Als Zielgene wurden im Folgenden das Chemokin IL-8, das Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2) und die Transkriptionsfaktoren Early growth response protein 1 (EGR-1) und c-FOS untersucht.

In einer kinetischen Untersuchung wurde in den mH₁R-transfizierten Zellen eine maximale Expression von IL-8, EGR-1 und c-FOS 4 h nach Zugabe von Histamin gemessen (Daten

nicht gezeigt). Daher wurde die Stimulationszeit von 4 h für die weiteren Versuche verwendet. Um die Beteiligung der im Western-Blot identifizierten MAPK an der Histamin-abhängigen Genexpression zu untersuchen, wurden die stabil transfizierten Zellen vor der Histamin-Stimulation mit entsprechenden MAPK-Inhibitoren inkubiert: SB 203580 inhibiert den p38-Signalweg (162), SP 600125 den JNK-Signalweg (289), PD 980598 den ERK-Signalweg (306) und KG 501 inhibiert den CREB-Signalweg (17).

3.2.6.1. Expression von IL-8

Die Histamin-abhängige Expression von IL-8 wurde in den stabil transfizierten Zelllinien analysiert. Als Positiv-Kontrolle für die IL-8-Expression wurde TNF- α verwendet, da in der Literatur bereits beschrieben wurde, dass TNF- α die Expression von IL-8 induziert (26) und in HEK-Zellen bereits eine erhöhte IL-8-Expression nach Stimulation mit TNF- α gezeigt werden konnte (164). Diese Kontrolle diente dazu zu zeigen, dass die Zelllinien trotzdem sie stabil einen bzw. zwei Histaminrezeptoren exprimieren, per se in der Lage sind, IL-8 mRNA zu produzieren. Die vierstündige Stimulation mit TNF- α induzierte in allen Zelllinien eine Expression von IL-8, die von einer 15-fachen Expression des Basalwerts in den Leervektor-transfizierten und mH₄R-transfizierten Zellen über eine ~25-fache Expression in den mH₁R-transfizierten Zellen bis zu einer ~35-fachen Expression in den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen reichte (Abbildung 32). Die Stimulation mit Histamin hatte in den Leervektor-transfizierten Zellen keinen Einfluss auf die Expression von IL-8. In den mH₁R- und mH_{1/4}R-transfizierten Zellen konnte die IL-8-Expression nach Stimulation mit Histamin 6-fach erhöht werden. In den mH₄R-transfizierten Zellen wurde dagegen die IL-8-Expression durch Stimulation mit Histamin nicht beeinflusst (Abbildung 32).

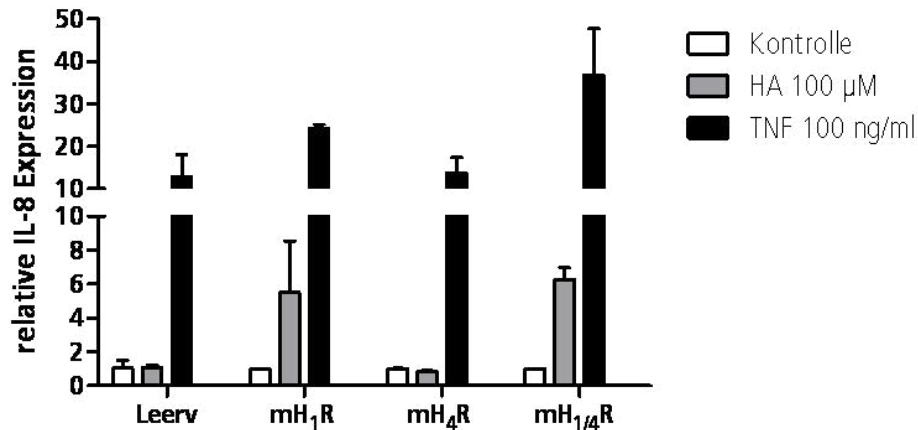


Abbildung 32: Expression von IL-8 nach Stimulation mit Histamin/TNF- α . Stabil transfizierte HEK293 Leervektor-, mH₁R-, mH₄R- und mH_{1/4}R-Zellen wurden für 4 h mit 100 μ M Histamin oder 100 ng/ml TNF- α stimuliert oder ohne Stimulation inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen extrahiert und durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Expression von IL-8 wurde mittels Real-Time PCR unter der Verwendung von Taq-Man Sonden nachgewiesen. Dargestellt ist die relative IL-8-Expression bezogen auf die unstimulierten Zellen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm SD von n = 2.

Die IL-8-Expression wurde ebenfalls untersucht, wenn die Zellen vor der Histamin-Stimulation mit den MAPK-Inhibitoren SB 203580, SP 600125, PD 980598 oder KG 501 inkubiert wurden. In diesen Versuchen konnte in den mH₁R-transfizierten Zellen durch Histamin-Stimulation eine Verdreifachung der IL-8-Expression induziert werden. Diese konnte nur durch den ERK-Inhibitor PD 980598 signifikant auf den Basalwert reduziert werden. Eine ähnliche Reduktion wurde durch die Inkubation mit allen vier Inhibitoren in Kombination erzielt (Abbildung 33A). In den mH₄R-transfizierten Zellen hatte Histamin, wie schon oben gezeigt, keinen Einfluss auf die IL-8-Expression, dementsprechend waren auch die MAPK-Inhibitoren ohne Wirkung (Abbildung 33B). Die Inkubation mit den MAPK-Inhibitoren alleine ohne anschließende Stimulation mit Histamin hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression von IL-8 (Daten siehe Anhang III). Die mH_{1/4}R-transfizierten Zellen wurden nicht weiter untersucht. Sie zeigten in Abbildung 32 nach Stimulation mit Histamin eine vergleichbare IL-8-Expression wie die mH₁R-transfizierten Zellen. Da weder Histamin noch die MAPK-Inhibitoren einen Einfluss auf die IL-8-Expression in den mH₄R-transfizierten Zellen hatten, wäre auch hier in den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen der gleiche Effekt zu erwarten wie in den mH₁R-transfizierten Zellen.

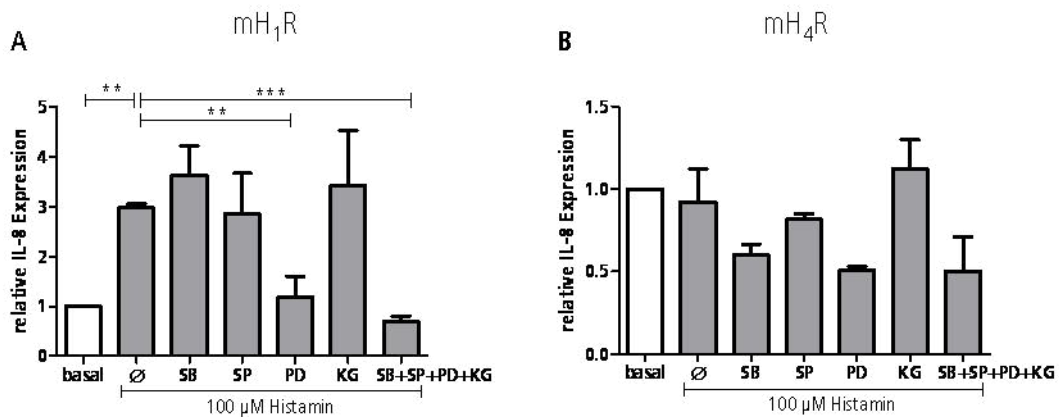


Abbildung 33: Effekt von MAPK-Inhibitoren auf die Expression von IL-8 nach Stimulation mit Histamin. Stabil transfizierte HEK293 mH₁R- (A) und mH₄R-Zellen (B) wurden für 1 h mit 50 µM PD 980598, für 30 min mit 2 µM SB 203580 bzw. 20 µM SP 600125 oder 20 min mit 25 µM KG 501 vorinkubiert und anschließend für 4 h mit 100 µM Histamin stimuliert. Eine Probe (basal) wurde weder mit Inhibitoren behandelt noch mit Histamin stimuliert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen extrahiert und durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Expression von IL-8 wurde mittels Real-Time PCR unter der Verwendung von Taq-Man Sonden nachgewiesen. Dargestellt ist die relative IL-8-Expression bezogen auf die unstimulierten Zellen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± SD von n = 2-3. Signifikante Unterschiede zwischen den Stimulationen sind nach Varianzanalyse nach Bonferroni gekennzeichnet (*p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,005).

3.2.6.2. Expression von EGR-1

Des Weiteren wurde die Expression von EGR-1 nach Stimulation mit Histamin untersucht. Auch hier wurden die MAPK-Inhibitoren eingesetzt, um die beteiligten Signalwege zu analysieren. In den mH₁R-transfizierten Zellen konnte durch Stimulation mit Histamin eine stark erhöhte EGR-1-Expression nachgewiesen werden, die dem 200-fachen Wert der unstimulierten Zellen entsprach. Diese erhöhte EGR-1-Expression konnte leicht, allerdings nicht signifikant durch den JNK-Inhibitor SP 600125 auf etwa 100-fach reduziert werden. Der ERK-Inhibitor PD 980598 bewirkte eine signifikante Reduktion auf das 4-fache des Basalwerts. Nur alle Inhibitoren in Kombination konnten die Histamin-abhängige EGR-1-Expression komplett auf das Niveau des Basalwerts inhibieren (Abbildung 34A). In den mH₄R-transfizierten Zellen wurde die EGR-1-Expression durch Histamin etwa verdoppelt, allerdings war diese Veränderung nicht signifikant. Eine signifikante Erhöhung auf das 4-fache des Basalwerts ergab sich, wenn die Zellen vor der Histamin-Stimulation mit dem p38-Inhibitor SB 203585 inkubiert wurden. Eine Inkubation mit SP 600125 ergab eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion des Histamineffekts, der durch PD 980598 alleine und alle Inhibitoren in Kombination signifikant auf den Basalwert reduziert werden konnte (Abbildung 34B). In den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen ergab sich ein ähnliches Bild wie in den

mH₁R-transfizierten Zellen. Histamin induzierte eine ca. 200-fache EGR-1-Expression. Diese wurde durch SB 203580 nicht beeinflusst, konnte aber durch SP 600125 und KG 501 etwa auf das 100-fache und durch PD 980598 und die Kombination aus allen vier Inhibitoren ca. auf die 3-fache Expressionsstärke reduziert werden (Abbildung 34C). Der Basalwert wurde hier in keinem Fall erreicht. Die Inkubation mit den Inhibitoren alleine ohne nachfolgende Stimulation mit Histamin hatte keinen Einfluss auf die EGR-1-Expression (Daten siehe Anhang IV).

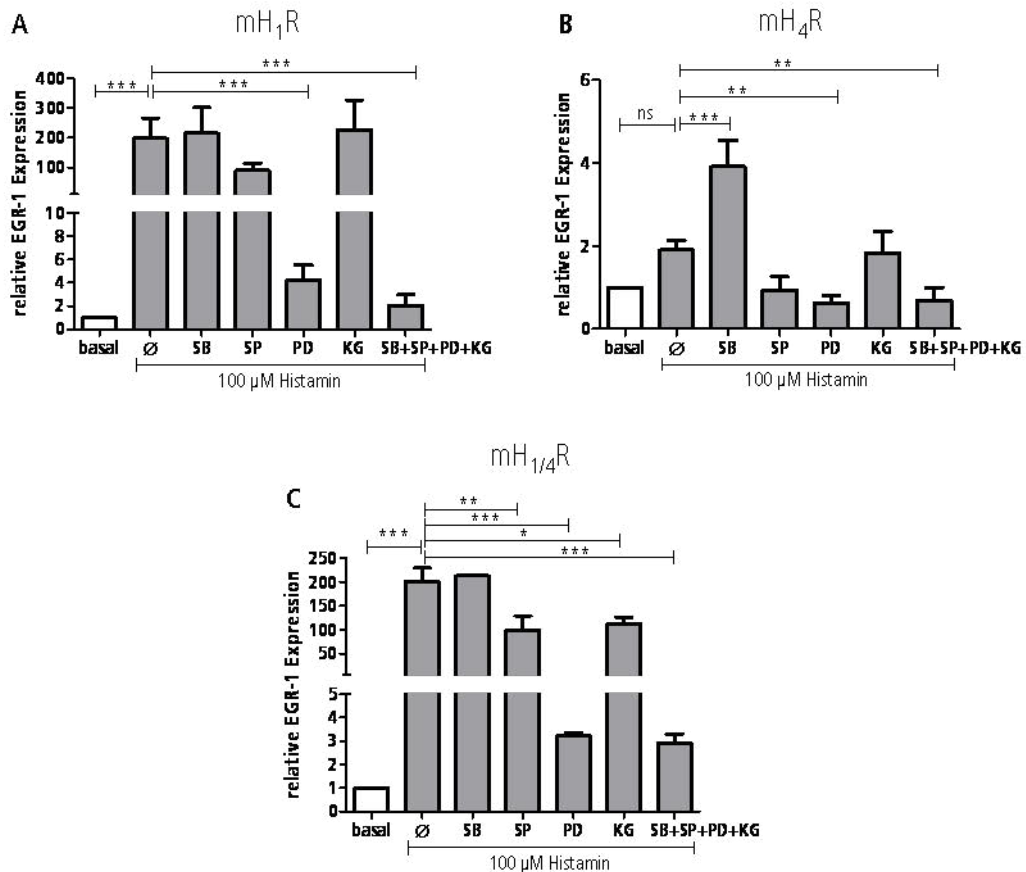


Abbildung 34: Effekt von MAPK-Inhibitoren auf die Expression von EGR-1 nach Stimulation mit Histamin. Stabil transfizierte HEK293 mH₁R- (A), mH₄R- (B) und mH_{1/4}R-Zellen (C) wurden für 1 h mit 50 μM PD 980598, für 30 min mit 2 μM SB 203580 bzw. 20 μM SP 600125 oder 20 min mit 25 μM KG 501 vorinkubiert und anschließend für 4 h mit 100 μM Histamin stimuliert. Eine Probe (basal) wurde weder mit Inhibitoren behandelt noch mit Histamin stimuliert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen extrahiert und durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Expression von EGR-1 wurde mittels Real-Time PCR unter der Verwendung von Taq-Man Sonden nachgewiesen. Dargestellt ist die relative EGR-1-Expression bezogen auf die unstimulierten Zellen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± SD von n = 3. Signifikante Unterschiede zwischen den Stimulationen sind nach Varianzanalyse nach Bonferroni gekennzeichnet (*p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,005).

3.2.6.3. Expression von c-Fos

Als weiteres Zielgen wurde die Histamin-abhängige Expression des Transkriptionsfaktors c-Fos untersucht. In den mH₁R-transfizierten Zellen induzierte Histamin einen 50-fachen Anstieg der c-Fos-Expression. Alle vier MAPK-Inhibitoren hatten weder alleine noch in Kombination einen signifikanten Einfluss auf diese Genexpression (Abbildung 35A). Allerdings war mit dem ERK-Inhibitor PD 980598 eine leichte Reduktion der c-Fos-Expression zu erkennen, von einer 50-fach erhöhten Expression nach Stimulation mit Histamin im Vergleich zum Basalwert auf eine ca. 30-fach erhöhte Expression nach Inkubation mit dem ERK-Inhibitor. Diese Reduktion war allerdings nach statistischen Analysen nicht signifikant. Eine Stimulation mit Histamin über den mH₄R konnte keine c-Fos-Expression induzieren. Die Expression blieb in den mH₄R-transfizierten Zellen sowohl nach Stimulation mit Histamin als auch nach Inkubation mit den MAPK-Inhibitoren auf dem Niveau des Basalwerts (Abbildung 35B). Auch auf die c-Fos-Expression hatten die Inhibitoren alleine ohne anschließende Stimulation mit Histamin keine Auswirkung (Daten siehe Anhang V). Da auch hier der Histamin-abhängige c-Fos Anstieg allein über den mH₁R vermittelt zu verlaufen scheint, wurden die mH_{1/4}R-transfizierten Zellen nicht untersucht.

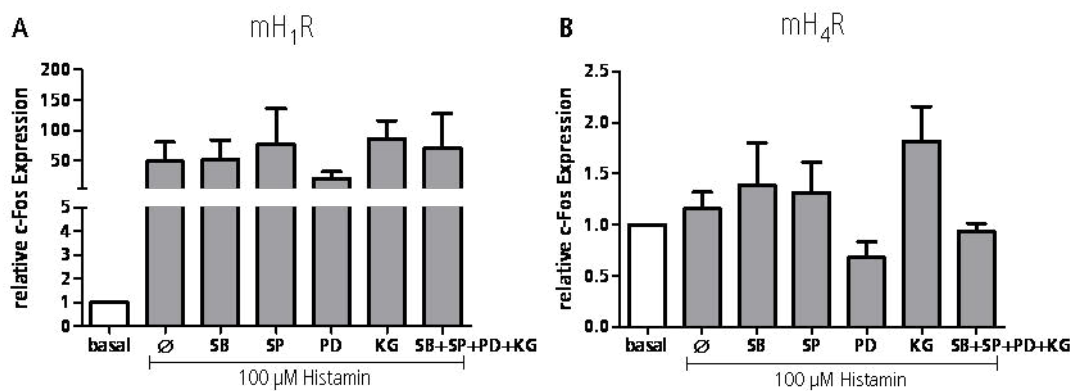


Abbildung 35: Effekt von MAPK-Inhibitoren auf die Expression von c-Fos nach Stimulation mit Histamin. Stabil transfizierte HEK293 mH₁R- (A) und mH₄R-Zellen (B) wurden für 1 h mit 50 µM PD 980598, für 30 min mit 2 µM SB 203580 bzw. 20 µM SP 600125 oder 20 min mit 25 µM KG 501 vorinkubiert und anschließend für 4 h mit 100 µM Histamin stimuliert. Eine Probe (basal) wurde weder mit Inhibitoren behandelt noch mit Histamin stimuliert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen extrahiert und durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Expression von c-Fos wurde mittels Real-Time PCR unter der Verwendung von Taq-Man Sonden nachgewiesen. Dargestellt ist die relative c-Fos-Expression bezogen auf die unstimulierten Zellen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± SD von n = 3. Signifikante Unterschiede zwischen den Stimulationen sind nach Varianzanalyse nach Bonferroni gekennzeichnet (*p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,005).

In den mH₁R-transfizierten Zellen wurde durch Histamin ebenfalls ein 5-facher Anstieg der COX-2-Genexpression detektiert. Dieser konnte durch PD 980598 auf die Hälfte und durch die Kombination aus allen vier Inhibitoren auf den Basalwert reduziert werden. Aufgrund der recht starken Streuung der Werte sind die Unterschiede allerdings nicht signifikant. Eine COX-2-Expression wurde durch Histamin-Stimulation in den mH₄R-transfizierten Zellen nicht induziert (Daten im Anhang VI)

3.3. Spezifität von H₄R-Antikörpern

Die Spezifität und Selektivität von kommerziell erhältlichen H₄R-Antikörpern stellt ein großes Problem dar. Um diese zu analysieren, wurde der H₄R rekombinant in Sf9-Zellen und in HEK293-Zellen exprimiert. Für einen spezifischen Nachweis wurde das Protein am extrazellulären N-Terminus mit einem Flag-Epitop versehen und am intrazellulären C-Terminus an ein His⁶-Epitop gekoppelt (Abbildung 36). Gegen diese Epitope sind gut validierte Antikörper erhältlich, sodass eine sichere Expressionskontrolle des kompletten rekombinanten Proteins von C- bis N-Terminus ermöglicht wurde und die Effizienz der Infektion bzw. Transfektion quantitativ bestimmt werden konnte. Der Nachweis des Rezeptors über den His⁶-Antikörper diente außerdem der Kontrolle für die Effizienz der intrazellulären FACS-Färbung, da alle getesteten H₄R-Antikörper gegen intrazelluläre Epitope des Rezeptors gerichtet sind. Es wurden drei verschiedene, kommerziell erhältliche Antikörper gegen den H₄R auf Spezifität untersucht:

- Santa Cruz sc M120 ⇒ gerichtet gegen ein Peptid bestehend aus Aminosäure 194-313 in der dritten intrazellulären Domäne des hH₄R; neben dem hH₄R auch am mH₄R und rH₄R getestet
- Santa Cruz sc H110 ⇒ gerichtet gegen ein Peptid bestehend aus Aminosäure 194-303 in der dritten intrazellulären Domäne des hH₄R; nur am hH₄R getestet
- Abcam ab 13183 ⇒ gerichtet gegen ein Epitop aus der ersten intrazellulären Domäne der hH₄R, das nicht näher angegeben ist; nur am hH₄R getestet

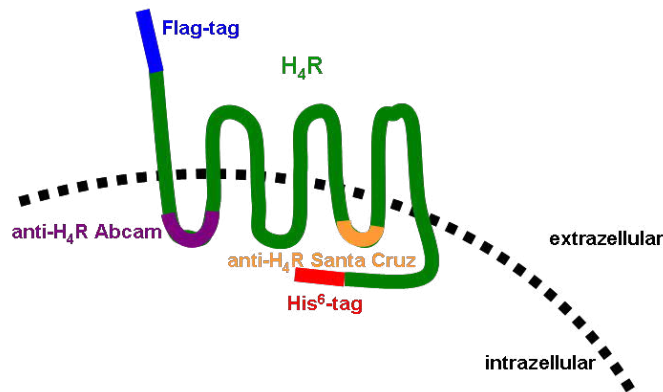


Abbildung 36: Schematische Darstellung des rekombinanten H₄R. Die extrazelluläre N-terminale Domäne des Sieben-Transmembran-Rezeptors ist mit einem Flag-Epitop versehen, der intrazelluläre C-Terminus ist an einen His⁶-tag gekoppelt. Die Bindungsstellen der H₄R-Antikörper, Abcam 13183 in der ersten intrazellulären Domäne und Santa Cruz sc M120 und sc H110 in der dritten intrazellulären Domäne sind gekennzeichnet.

3.3.1. Evaluation der Spezifität von H₄R-Antikörpern mittels Durchflusszytometrie an infizierten SF9-Zellen

Sf9-Zellen wurden mit Baculoviren, die für mH₄R, hH₄R oder hH₃R codieren, infiziert (253) und durchflusszytometrische Analysen mit anti-Flag, anti-His⁶ und den drei oben beschriebenen H₄R-Antikörpern wurden 48 h nach Infektion durchgeführt. Im Vergleich zu den Leervirus-infizierten Zellen und den nur mit Sekundärantikörper gefärbten Kontrollzellen zeigten die mH₄R-, hH₄R- und hH₃R-infizierten Zellen deutlich Flag- und His⁶ positive Zellen (Abbildung 37A-H). Die Infektionseffizienz betrug für alle Rezeptoren annähernd 50 %. Nach der Färbung mit den H₄R-Antikörpern sc M120 (Abbildung 37I-L), sc H110 (Abbildung 37M-P) und ab 13183 (Abbildung 37Q-T) konnte im Vergleich zu den nur mit Sekundärantikörper gefärbten Zellen und ungefärbten Kontrollzellen eine leichte Erhöhung der Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden. Allerdings trat diese Erhöhung nicht nur in den mH₄R- und hH₄R- transfizierten Zellen, sondern gleichermaßen den hH₃R-infizierten Zellen auf und auch in den Leervektor-infizierten Zellen, die keine Histaminrezeptoren exprimieren. Außerdem verschob sich unter Verwendung der H₄R-Antikörper die gesamte Zellpopulation hin zu erhöhter Fluoreszenzintensität, wogegen nach Färbung mit dem Flag- und dem His⁶-Antikörper nur etwa 50 % der Zellen eine Rezeptorexpression aufwiesen.

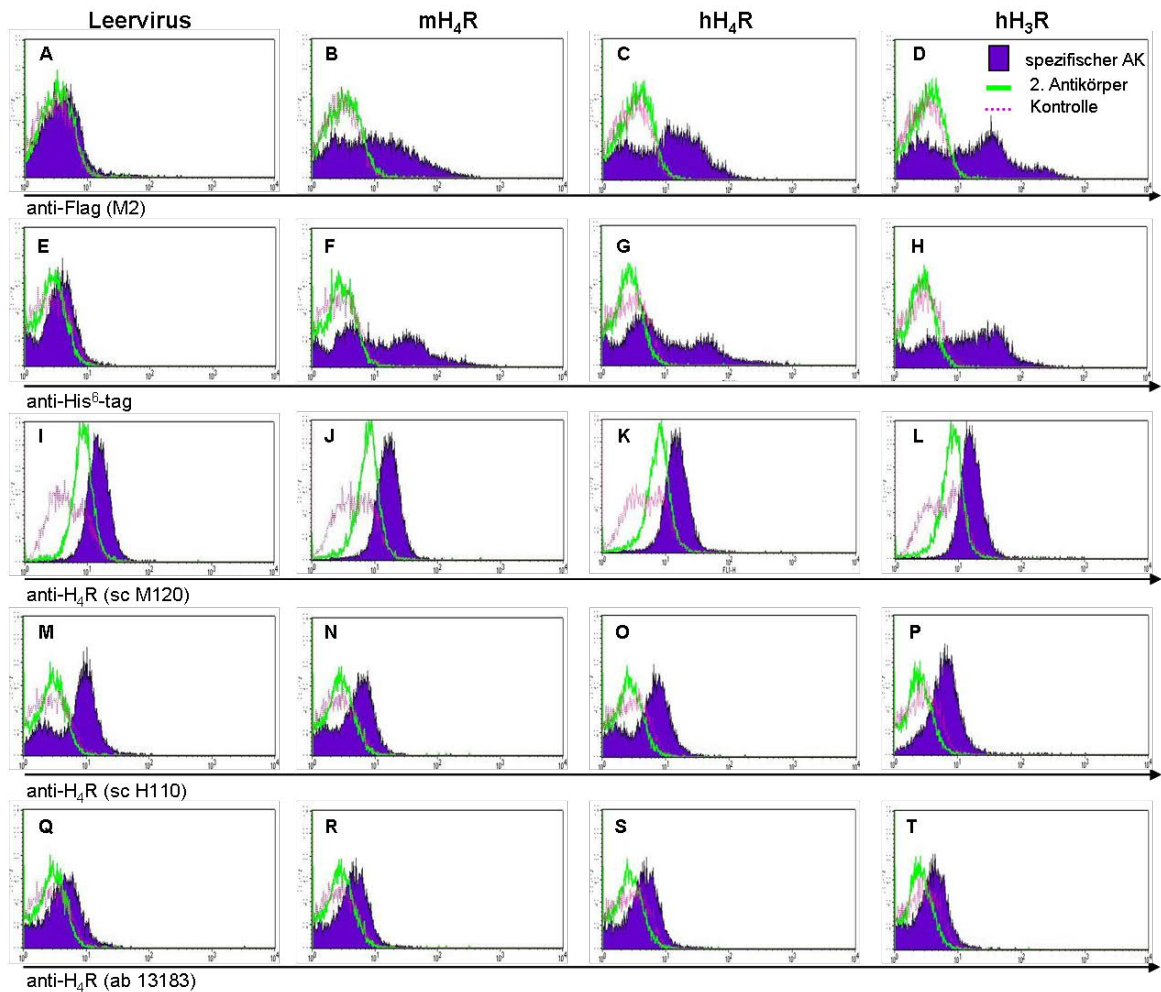


Abbildung 37: Evaluation von H₄R-Antikörpern per Durchflusszytometrie unter Verwendung von Sf9-Zellen, die rekombinante Histaminrezeptoren exprimieren. Sf9-Zellen wurden wie angegeben mit Leervirus oder Viren, die für mH₄R, hH₄R oder hH₃R codieren, infiziert. Durchflusszytometrische Analysen wurden 48 h nach der Infektion unter Verwendung von anti-Flag (A-D), anti-His⁶ (E-H) und der H₄R-Antikörper sc M120 (I-L), sc H110 (M-P) und ab13183 (Q-T) durchgeführt. Die Färbung mit dem spezifischen Antikörper ist jeweils durch die violett ausgefüllten Histogramme dargestellt, die Sekundärantikörperfärbung durch die grünen Linien und die ungefärbten Kontrollzellen durch die pink gestrichelten Linien. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Histogramm für jede Färbung.

3.3.2. Evaluation der Spezifität von H₄R-Antikörpern im Western-Blot an infizierten Sf9-Zellen

Membranpräparationen wurden von mH₄R-infizierten Sf9-Zellen 48 h nach der Infektion durchgeführt, wie bei Schneider et al. (251) beschrieben. Die Expression des mH₄R wurde mittels Western-Blot-Analysen unter Verwendung des Flag-Antikörpers nachgewiesen. Durch die Auftrennung über die SDS-PAGE waren zwei spezifische Banden zwischen 40 und 46 kDa zu erkennen (Abbildung 38A), die sehr wahrscheinlich durch unterschiedliche Glykosylierungen des Rezeptorproteins zu Stande kommen (251). Diese Banden traten nicht in den Spuren auf, in denen Proben von uninfizierten- oder Leervirus-infizierten Sf9-

Membranen aufgetragen wurden. Nach Entwickeln mit den H₄R-Antikörpern sc M120 (Abbildung 38B) und sc H110 (Abbildung 38C) waren mehrere sehr schwache Banden auf dem Western-Blot zu erkennen. Allerdings entsprach keine von diesen Banden einer Größe von 40-46 kDa, die den mH₄R repräsentieren und mithilfe des Flag-Antikörpers nachgewiesen werden konnten.

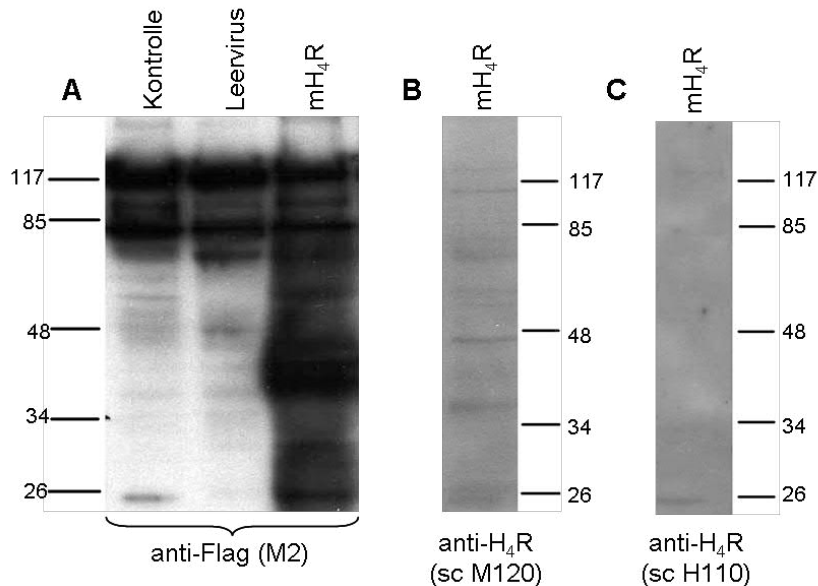


Abbildung 38: Evaluation von H₄R-Antikörpern im Western-Blot unter Verwendung von Sf9-Zellen, die den rekombinaten mH₄R exprimieren. Membranpräparationen von entweder uninfizierten (Kontrolle) oder mit Leervirus- oder mH₄R-codierenden Viren infizierte Sf9-Zellen wurden 48 h nach der Infektion durchgeführt. Diese Membranfraktionen wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert. Die Detektion der Proteine erfolgte unter Verwendung des Flag-Antikörpers (A) oder der H₄R-Antikörper sc M120 (B) und sc H110 (C) jeweils in Kombination mit dem entsprechenden Sekundärantikörper.

3.3.3. Evaluation der Spezifität von H₄R-Antikörpern mittels Durchflusszytometrie an transfizierten HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für den mH₄R oder hH₄R, jeweils fusioniert an ein N-terminales Flag-*tag* und ein C-terminales His⁶-*tag*, codieren. Die Rezeptorexpression wurde 48 h nach der Transfektion durchflusszytometrisch mit dem Flag-, dem His⁶- und den H₄R-Antikörpern analysiert. mH₄R- und hH₄R-transfizierte Zellen, die mit dem Flag-Antikörper (Abbildung 39B-C) und dem His⁶-Antikörper (Abbildung 39E-F) inkubiert wurden, zeigten eine erhöhte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Leervektor-transfizierten Zellen (Abbildung 39A+D) und den nur mit Sekundärantikörper gefärbten Kontrollen. Die Transfektionseffizienz betrug in den mH₄R-transfizierten Zellen etwa 70 % und in den hH₄R-transfizierten Zellen ca. 50 %. Im Vergleich zu den mit rabbit IgG-Isotyp gefärbten Zellen und den ungefärbten Kontrollzellen, wiesen die mit den H₄R-Antikörpern

sc M120 (Abbildung 39G-I) und sc H110 (Abbildung 39J-L) gefärbten Zellen eine leicht erhöhte Fluoreszenzintensität auf. Diese war allerdings in den mH₄R- und hH₄R-transfizierten Zellen ebenso zu erkennen wie in den Leervektor-transfizierten Zellen, die keinen H₄R aufwiesen. Auch hier war, wie bei der Analyse der infizierten Sf9-Zellen, die gesamte Zellpopulation hin zu erhöhter Fluoreszenzintensität verschoben, obwohl nach Flag- und His⁶-tag Färbung nur 50 % bzw. 70 % der Zellen eine Rezeptorexpression aufwiesen.

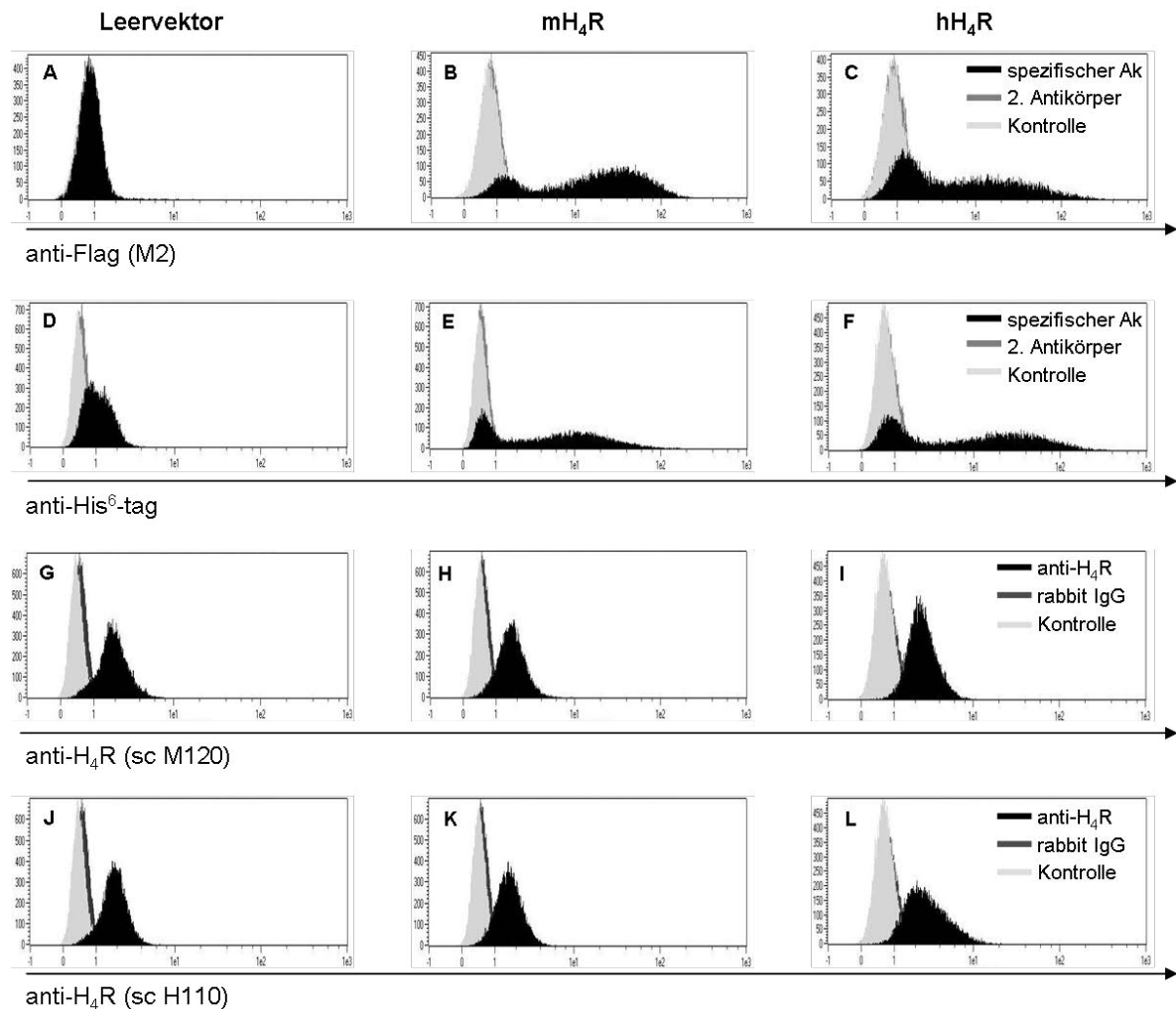


Abbildung 39: Evaluation von H₄R-Antikörpern per Durchflusszytometrie unter Verwendung von HEK293-Zellen, die rekombinante H₄Rs exprimieren. HEK293-Zellen wurden mit Leervektor oder mit Plasmiden, die für mH₄R oder hH₄R codieren, transfiziert. Durchflusszytometrische Analysen wurden 48 h nach der Transfektion unter Verwendung von anti-Flag (A-C), anti-His⁶ (D-F) und der H₄R-Antikörper sc M120 (G-I), und sc H110 (J-L) durchgeführt. Die Färbung mit dem spezifischen Antikörper ist jeweils durch die schwarzen ausgefüllten Histogramme dargestellt, die Isotypkontrolle und Sekundäntikörperfärbung durch die dunkelgrauen Histogramme und die ungefärbten Kontrollzellen durch die hellgrauen Histogramme. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Histogramm für jede Färbung.

3.3.4. Evaluation der Spezifität von H₄R-Antikörpern im Western-Blot an transfizierten HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die entweder für mH₄R oder hH₄R codierten. Diese Zellen wurden 48 h nach der Transfektion lysiert und die Lysate über eine SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot analysiert. Eine erfolgreiche Expression der Histaminrezeptoren wurde mithilfe des Flag-Antikörpers nachgewiesen. Die beiden erwarteten Banden bei einer Größe zwischen 40 und 46 kDa traten nur in den Spuren auf, in denen Lysate von mH₄R- und hH₄R-transfizierten Zellen aufgetragen wurden und waren in Lysaten von Leervektor-transfizierten Zellen nicht nachzuweisen (Abbildung 40A). Der Nachweis mit den rabbit IgG-Antikörper (Isotyp-Kontrolle) (Abbildung 40B) und den H₄R-Antikörpern sc M120 (Abbildung 40C) und sc H110 (Abbildung 40D) ergab für alle drei Antikörper ein ähnliches Bandenmuster mit sehr vielen Banden unterschiedlicher Größe. Allerdings zeigte keine von ihnen die erwartete Größe von 40-46 kDa auf, die mithilfe des Flag-Antikörpers nachgewiesen werden konnte. Das Bandenmuster unterschied sich auch nicht zwischen den Spuren, in denen Lysate von Leervektor-transfizierten HEK293-Zellen aufgetragen wurden und daher keine spezifischen Banden zu erwarten waren und den Spuren, in denen Lysate der mH₄R- oder hH₄R-transfizierten Zellen analysiert wurden.

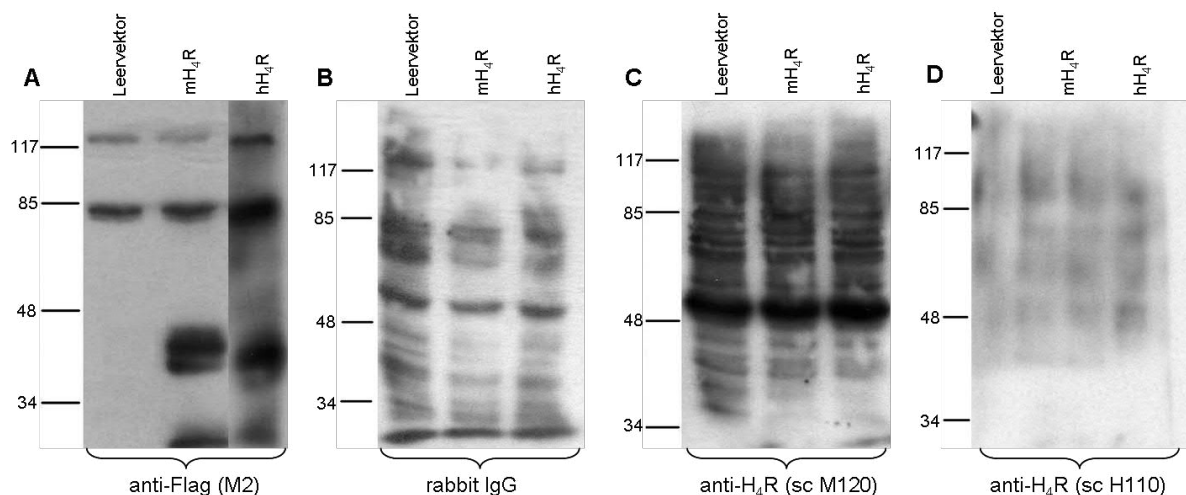


Abbildung 40: Evaluation von H₄R-Antikörpern im Western-Blot unter Verwendung von HEK293-Zellen, die rekombinate H₄Rs exprimieren. HEK293-Zellen, die entweder mit Leervektor-, oder mit für mH₄R- oder hH₄R codierenden Vektoren transfiziert wurden, wurden 48 h nach der Transfektion lysiert. Diese Zelllysate wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert. Die Detektion der Proteine erfolgte unter Verwendung des Flag-Antikörpers (A), des rabbit IgG-Antikörpers (B) oder der H₄R-Antikörper sc M120 (C) und sc H110 (D) jeweils in Kombination mit dem entsprechenden Sekundärantikörper.

3.3.5. Evaluation der Spezifität von H₄R-Antikörpern mittels Durchflusszytometrie an Milzzellen von Wildtyp- und H₄R^{-/-}-Mäusen

Milzzellen von H₄R^{-/-}-Mäusen (115) und von Balb/c Wildtyp-Mäusen wurden isoliert und mit den H₄R-Antikörpern sc M120 und sc H110 und entsprechenden Kontrollen gefärbt. In der nachfolgenden durchflusszytometrischen Analyse zeigten sowohl Wildtyp- als auch H₄R^{-/-}-Zellen, die mit sc M120 und sc H110 gefärbt wurden, eine deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität verglichen mit Sekundärantikörper-gefärbten Zellen und den ungefärbten Kontrollen. Die rabbit IgG-Isotypkontrolle zeigte nur eine leicht erhöhte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den ungefärbten Kontrollzellen, die allerdings ebenfalls in den Wildtyp-Zellen als auch in den H₄R^{-/-}-Zellen auftrat (Abbildung 41A; Daten für sc M120 vergleichbar, daher nicht gezeigt). Ein direkter Vergleich von sc M120 (Abbildung 41B) und sc H110 (Abbildung 41C) gefärbten Wildtyp- und H₄R^{-/-}-Milzzellen zeigte sogar eine leicht höhere Fluoreszenzintensität der H₄R^{-/-}-Zellen. Die Abwesenheit des mH₄R in den Milzzellen der H₄R^{-/-}-Mäusen wurde auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR überprüft. Die spezifische mH₄R-Bande bei einer Größe von 177 bp, die in der Plasmidkontrolle und in dem Ansatz der Balb/c Wildtyp-Milzzellen zu erkennen ist, fehlt in der Spur, in der der Ansatz aus den H₄R^{-/-}-Zellen aufgetragen wurde (Abbildung 41B, Kasten).

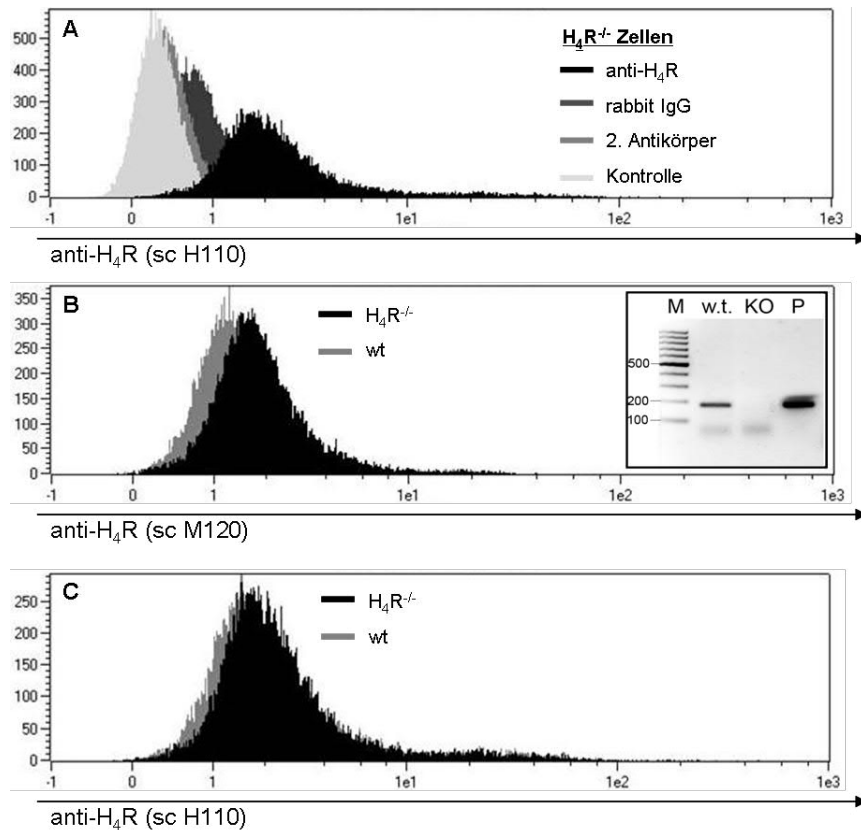


Abbildung 41: Evaluation von H₄R-Antikörpern mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von Milzzellen aus Wildtyp- und H₄R^{-/-}-Mäusen. Aus Milzen von Balb/c Wildtyp- und H₄R^{-/-}-Mäusen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt. Milzzellen von H₄R^{-/-}-Mäusen wurden (A) mit sc H110 (schwarz), rabbit IgG Isotyp Kontrolle (dunkelgrau) und Sekundärantikörper (grau) gefärbt oder ungefärbt (hellgrau) gemessen. Die Histogramme B und C zeigen sc M120 (B) und sc H110 (C) gefärbte Milzzellen von H₄R^{-/-}-Mäusen (schwarz) und Wildtyp-Mäusen (wt) (grau). Im Kasten in B ist ein spezifischer mH₄R Nachweis auf RNA-Ebene mittels RT-PCR dargestellt. RNA wurde aus Milzzellen von Wildtyp-(*wt*) und H₄R^{-/-}-Mäusen (*KO*) isoliert und die mH₄R-mRNA wurde mithilfe von RT-PCR nachgewiesen. (M: Molekulargewichtsmarker; P: Kontroll-PCR mit mH₄R-Plasmid als Template; die Zahlen auf der linken Seite geben die molare Masse in Basen Paaren an)

3.3.6. Evaluation der Spezifität von H₄R-Antikörpern mittels Durchflusszytometrie an humanen B-Zellen

Entsprechend der Datenblätter sind die H₄R-Antikörper hauptsächlich am humanen H₄R getestet worden. Daher sollten sie in dieser Arbeit ebenfalls an endogenen hH₄Rs getestet werden. Da laut Literatur B-Zellen keinen H₄R exprimieren (115, 168), wurden PBMCs aus peripherem Blut isoliert und mit anti-CD20-PE gefärbt, um B-Zellen von den restlichen Leukozyten zu unterscheiden. Durch die Färbung mit den H₄R-Antikörpern sc M120 und sc H110 kam es sowohl in den CD20⁺- als auch in den CD20⁻-Zellen zu einer erhöhten Fluoreszenzintensität (Abbildung 42A-D) verglichen mit der Sekundärantikörper-Färbung oder den ungefärbten Zellen. Die Färbung mit der rabbit IgG-Isotypkontrolle bewirkte eine

leichte Erhöhung der Fluoreszenzintensität in den CD20⁺- genauso wie in den CD20⁻-Zellen, die allerdings deutlich geringer ausfiel als die Färbung mit sc M120 oder sc H110.

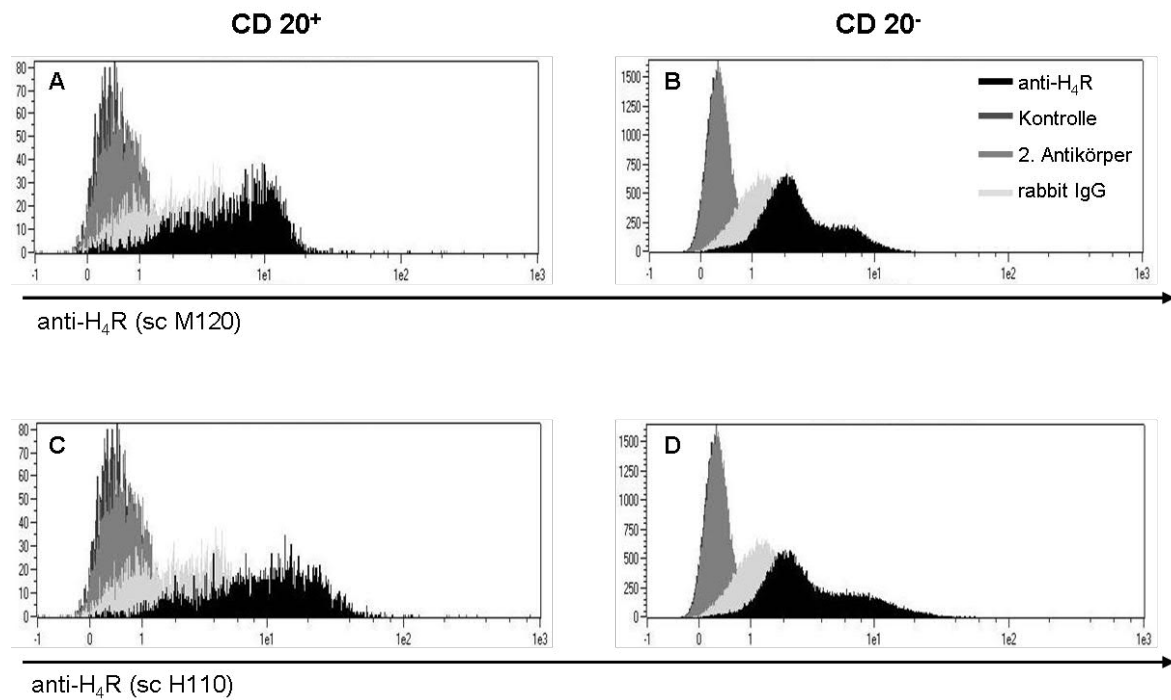


Abbildung 42: Evaluation von H₄R-Antikörpern per Durchflusszytometrie unter Verwendung von humanen PBMCs. PBMCs wurden aus humanem peripheren Blut isoliert und mit anti-CD20-PE in Kombination mit den H₄R-Antikörpern sc M120 (A,B; schwarz) und sc H110 (C,D; schwarz), rabbit IgG-Isotyp (hellgrau), Sekundärantikörper (grau) gefärbt oder ungefärbt (dunkelgrau) gemessen. Die Histogramme in A und C zeigen die CD20⁺-Zellen und die Histogramme in B und D die CD20⁻-Zellen.

4. Diskussion

4.1. Asthmodell: Behandlung mit Mepyramin und JNJ777120

In dieser Arbeit wurde der Effekt von Mepyramin, einem Antagonisten am H₁R und JNJ777120, einem H₄R-Antagonisten, in einem experimentellen Mausmodell für allergisches Asthma untersucht. Als Modellallergen wurde OVA verwendet, was zur Sensibilisierung i.p. appliziert und während der Provokation von den Mäusen in vernebelter Form eingeatmet wurde. Die beiden Antagonisten wurden zum einen in der Sensibilisierungsphase appliziert und in einem weiteren Versuch während der Provokation verabreicht und die Effekte dieser unterschiedlichen Behandlungszeitpunkte miteinander verglichen. Als Parameter der asthmatischen Erkrankung wurden die Anzahl an eosinophilen Granulozyten in der BAL, Infiltrationen von Entzündungszellen in das Lungengewebe anhand von histologischen Schnitten und die Allergen-spezifischen IgE-Titer und Zytokin-Konzentrationen im Serum der Tiere analysiert.

Die Behandlung der Asthmatiere mit dem H₁R-Antagonisten Mepyramin hatte unter beiden Bedingungen nahezu keinen Effekt auf die untersuchten Parameter. Dagegen konnte der H₄R-Antagonist JNJ777120 diese Asthmasymptome deutlich reduzieren und zwar unabhängig davon, ob er in der Sensibilisierungsphase oder während der Provokation verabreicht wurde. Ähnliche Ergebnisse bezüglich des Effekts des H₄R-Antagonisten JNJ777120 konnten bereits von einer anderen Forschergruppe veröffentlicht werden (70). Dagegen konnte von de Bie et al. (54) im Vorfeld zeigen, dass die Gabe von 20 mg Mepyramin/kg Körpergewicht während der Provokationsphase die Eosinophilenzahl in der BAL reduziert. Diese unterschiedlichen Ergebnisse von Bie et al. (54) und den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen sind sehr wahrscheinlich in der Art und Weise der Applikation begründet. In der oben zitierten Studie wurde Mepyramin zwei Mal am Tag verabreicht und die Behandlung wurde bereits einen Tag vor der ersten Provokation begonnen. In dem in dieser Arbeit verwendeten Modell wurde Mepyramin nur an den Provokationstagen jeweils 30 min vor jeder Provokation gegeben. Ein weiterer Unterschied ist der Applikationsweg. In der von de Bie et al. (54) beschriebenen Studie wurde Mepyramin durch Injektion i.p. verabreicht, während die Behandlung in dem in dieser Arbeit beschriebenen Versuch durch s.c. Injektion erfolgte. Außerdem ist das gesamte Asthmodell von de Bie et al. (54) anders aufgebaut als das in dieser Arbeit durchgeführte. Im Vergleich zu zwei OVA-Injektionen zur Sensibilisierung im Abstand von zwei Wochen verwendeten de Bie et al. (54) sieben

Injektionen an aufeinanderfolgenden Tagen. Die Provokation wurde von de Bie et al. (54) erst vier Wochen nach der Sensibilisierung und dann an acht aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt, wobei die Tiere jeweils nur 5 min vernebelte OVA-Lösung einatmen mussten. In dem in dieser Arbeit beschriebenen Modell wurden die Tiere eine Woche nach der zweiten Sensibilisierung an nur vier aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils 30 min provoziert. Das hauptsächliche Augenmerk dieser Arbeit liegt allerdings auf der Behandlung mit dem H₄R-Antagonisten JNJ7777120 (277) in Kombination mit dem H₁R-Antagonisten Mepyramin (7). Die Substanzen wurden ebenfalls einmal während der Sensibilisierung und einmal in der Provokationsphase in Kombination appliziert. Durch Mepyramin konnte der JNJ7777120-Effekt reguliert werden, wobei dieser Effekt deutlich von dem Zeitpunkt abhängig war, an dem die Behandlung durchgeführt wurde. Wenn beide Substanzen während der Provokation appliziert wurden, inhibierte Mepyramin den Effekt von JNJ7777120, welches bei alleiniger Gabe zu einer verbesserten Asthmasymptomatik führte. Das Krankheitsbild gleicht also den nur mit Mepyramin behandelten Tieren bzw. den mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Kontrollen. Wurde die Behandlung mit der Kombination aus beiden Antagonisten dagegen während der Sensibilisierungsphase durchgeführt, verstärkte Mepyramin den Effekt von JNJ7777120 und die Asthmasymptome konnten im Verhältnis zu den nur mit JNJ7777120 behandelten Tieren weiter verbessert werden (zusammengefasst in Tabelle 5).

Tabelle 5: Vergleich der Effekte von Mepyramin, JNJ7777120 und Mepyramin + JNJ7777120 auf verschiedene Parameter in einem experimentellen murinen Asthmamodell in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Applikation.

Zeitpunkt	Provokation			Sensibilisierung		
	MEP	JNJ	MEP+JNJ	MEP	JNJ	MEP+JNJ
Eosinophile in der BAL	⇒	↓	⇒	⇒	↓	↓↓
Histologie der Lunge	⇒	↓	↓	↓	↓	↓
α-OVA IgE im Serum	⇒	↓	⇒	⇒	[↓]	↓
IL-13 im Serum	⇒	[↓]	⇒	⇒	[↓]	↓
<i>Auswirkung von MEP auf die JNJ-Behandlung</i>	<i>antagonistisch</i>			<i>synergistisch</i>		

Die Effekte von Mepyramin (MEP), JNJ7777120 (JNJ) oder einer Kombination aus beiden Substanzen (MEP + JNJ), die in einem experimentellen murinen Asthmamodell entweder in der Provokationsphase oder während der Sensibilisierung gegeben wurden, wurden anhand von unterschiedlichen Parametern untersucht. Die Effekte wurden mit in der entsprechenden Phase mit DMSO behandelten Tieren verglichen und als nicht verändert (⇒), leicht reduziert ([↓]), reduziert (↓) und stark reduziert (↓↓) bewertet.

Dieses unterschiedliche Verhalten in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Behandlung kann dadurch erklärt werden, dass Histamin in der Sensibilisierungs- und in der Provokationsphase auf unterschiedliche Zielzellen mit unterschiedlicher Histaminrezeptorexpression wirkt. Die dadurch hervorgerufenen Effekte können durch die Antagonisten folglich unterschiedlich inhibiert werden.

Die Sensibilisierung (Abbildung 43) stellt im Wesentlichen eine Immunreaktion gegen das Allergen dar und läuft im Lymphknoten ab. Das Allergen wird in der Lunge von dendritischen Zellen aufgenommen und prozessiert. Die dendritischen Zellen wandern mit dem Allergenpeptid beladen in den Lymphknoten und präsentieren es dort naiven T-Zellen. Histamin wird im Lymphknoten vermutlich hauptsächlich von dendritischen Zellen und T-Zellen gebildet. Jutel et al. (137) konnten zeigen, dass Histamin über den H₁R auf T_H1-Zellen eine Proliferation bewirkt, während es über den H₂R auf T_H2-Zellen die Proliferation hemmt. Dunford et al. (70) konnten dagegen weder einen Einfluss von Histamin noch von JNJ7777120 auf die Proliferation von T_H0-Zellen nachweisen. Der H₁R ist auf der Oberfläche von dendritischen Zellen und T-Zellen hauptsächlich an der Regulation der Zytokinproduktion beteiligt (101, 137). Der H₄R reguliert ebenfalls die Zytokinproduktion, spielt aber auch bei der Antigenpräsentation und der Zellmigration eine Rolle (32, 70, 202). Demnach könnte die Aktivierung von dendritischen Zellen und/oder T-Zellen reduziert sein, wenn der H₁R und der H₄R beide durch Antagonisten blockiert sind und nicht durch Histamin aktiviert werden können. Es konnte bisher allerdings nicht bewiesen werden, dass der H₁R und der H₄R *in vivo* parallel auf einer Zelle exprimiert werden, da keine hoch spezifischen Antikörper zur Verfügung stehen, mit denen diese Rezeptorproteine in nativen Zellen nachgewiesen werden könnten (siehe 3.3 (14)). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Effekt durch die Wirkung von Mepyramin und JNJ7777120 auf unterschiedliche Zielzellen verursacht wird. Es könnten zum Beispiel zwei Populationen dendritischer Zellen oder zwei verschiedene T-Zellpopulationen involviert sein oder der eine Antagonist wirkt auf T-Zellen und der andere auf die dendritischen Zellen.

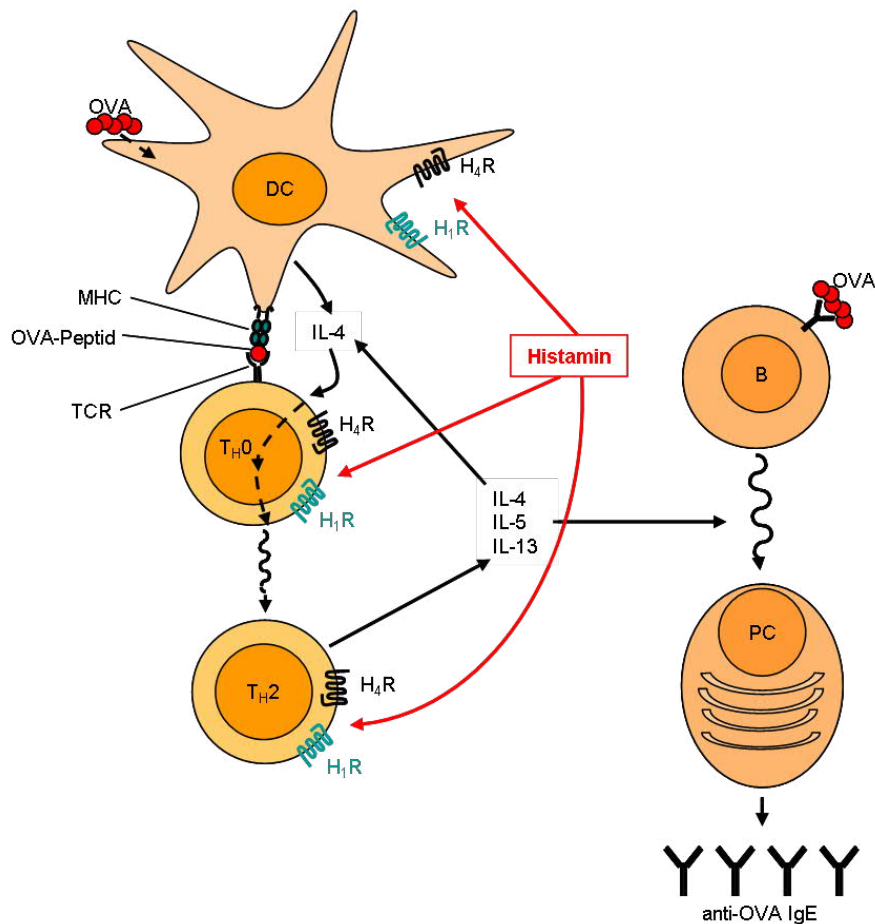


Abbildung 43: Einfluss von Histamin auf die Immunreaktion in der Sensibilisierung. Dendritische Zellen (DC) nehmen das Allergen auf, prozessieren es und präsentieren es anschließend naiven T_{H0}-Zellen über MHC II-Moleküle. Die T-Zellen polarisieren im entsprechenden Zytokinmilieu hauptsächlich zu T_{H2}-Zellen. Außerdem werden B-Zellen aktiviert, die zu Plasmazellen (PC) differenzieren und allergenspezifische IgE-Immunglobuline produzieren.

Während der Provokation (Abbildung 44) wird Histamin von Mastzellen oder basophilen Granulozyten freigesetzt. Bei Allergenkontakt werden die spezifischen IgE-Immunglobuline auf der Oberfläche dieser Zellen quervernetzt und es kommt zur Degranulation der Zellen, wobei Mediatoren wie Histamin aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden. Dabei treten relativ hohe lokale Histamin-Konzentrationen im peripheren Gewebe und vor allem in der Lunge auf, die hauptsächlich Zellen wie Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Mastzellen, eosinophile Granulozyten und polarisierte T-Zellen beeinflussen. Histamin bewirkt in der Lunge die typischen Asthmasymptome wie Bronchokonstriktion und eine erhöhte Schleimsekretion. Außerdem kommt es zu einer Vasodilatation und zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität, die es Zellen wie eosinophilen Granulozyten ermöglicht, aus dem Blutstrom in das Gewebe einzuwandern, und zudem zur Bildung eines Bronchialödems führt. Über die Antigenpräsentation durch die dendritischen Zellen und das entsprechende

Zytokinmilieu während der Sensibilisierung werden T-Zellen vorrangig zu T_H2-Zellen polarisiert (145). Polarisierte T_H2-Zellen produzieren wiederum Zytokine und andere Mediatoren, die beispielsweise das Wachstum und die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten regulieren und dadurch in der Pathogenese von akutem und chronischem Asthma eine entscheidenden Rolle spielen (73). In dieser Phase der Erkrankung führt der H₄R möglicherweise zu einer gesteigerten Aktivierung von Effektorzellen, während der H₁R entweder direkt oder indirekt über andere Zellen diese Aktivierung reduziert.

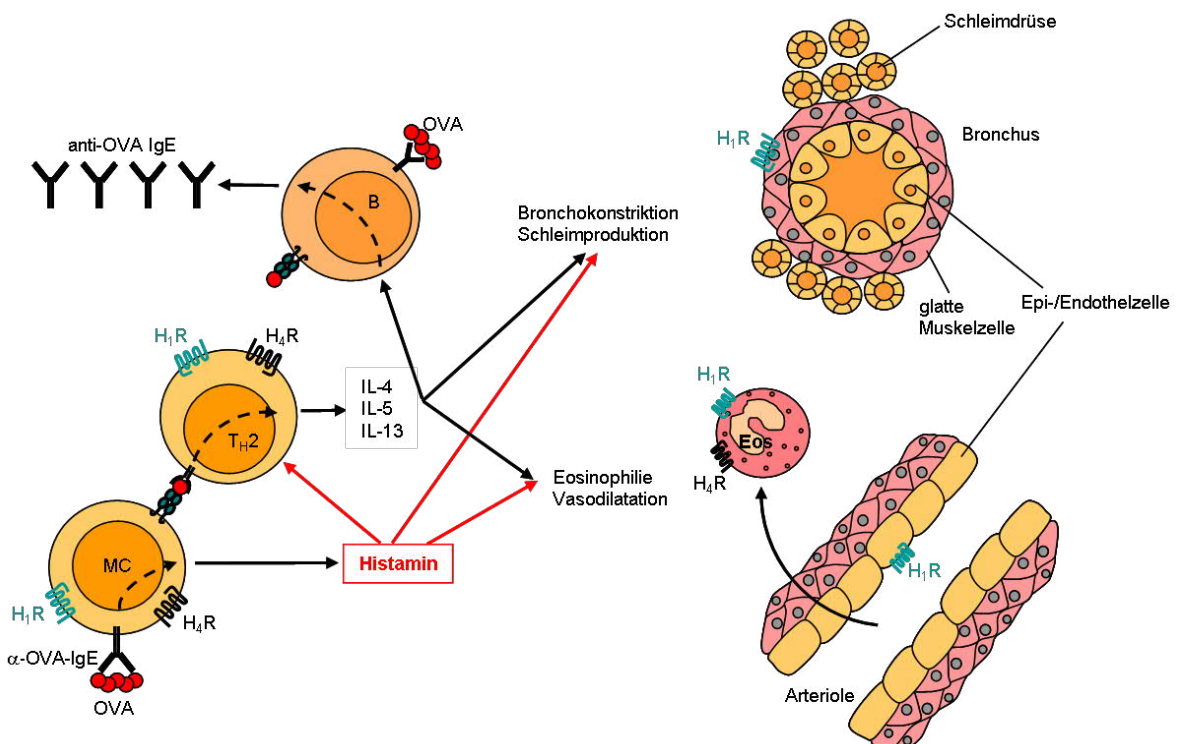


Abbildung 44: Einfluss von Histamin auf die Immunreaktion in der Provokationsphase. Beim lokalen erneuten Kontakt mit dem Allergen wird Histamin aus den Granula der sensibilisierten Mastzellen freigesetzt. Dies wirkt auf die polarisierten T_H2-Zellen und die ins Gewebe eingewanderten eosinophilen Granulozyten, aber auch auf glatte Muskelzellen und Endothel- und Epithelzellen von Arteriolen und Bronchien.

Andererseits könnten die verschiedenen Effekte, die Mepyramin und JNJ7777120 aufgrund der unterschiedlichen Zeitpunkte der Behandlung ausüben, in unterschiedlichen Histamin-Konzentrationen begründet sein, die im entsprechenden Gewebe zum jeweiligen Zeitpunkt vorliegen (311). Im Lymphknoten ist das Histaminvorkommen während der Sensibilisierung eher gering, während im Gegensatz dazu bei der Provokation hohe Konzentrationen in der Lunge gemessen werden können (130). An Sf9-Zellen, die rekombinant den murinen H₄R exprimieren, konnte gezeigt werden, dass sich JNJ7777120 wie ein partieller Agonist verhält (255, 263). Daher wird vermutet, dass die tatsächliche Funktion *in vivo* jeweils von den

lokalen Konzentrationen an Histamin und JNJ7777120 und dem entsprechenden Zellsystem abhängig ist. In den unterschiedlichen Geweben, in denen sich Sensibilisierung und Provokation abspielen, können beide Substanzen in verschiedenen Verhältnissen zueinander vorkommen, wodurch JNJ7777120 möglicherweise eine andere Wirkung auf den H₄R ausübt (210). Darüber hinaus ist nichts über die Expressionslevel der beiden Rezeptoren auf den verschiedenen Zelltypen bekannt. Wenn beide Rezeptoren gleichzeitig auf einer Zielzelle exprimiert werden, könnte das Verhältnis H₁R/H₄R dabei eine wichtige Rolle spielen, wie sich ein Blockieren der Rezeptoren mit Antagonisten auswirkt. Ein unterschiedliches Verhältnis von H₁R zu H₄R auf verschiedenen Zelltypen könnte die beobachteten Unterschiede bei der Behandlung mit Mepyramin und JNJ7777120 in der Sensibilisierung verglichen mit der Provokationsphase erklären. Außerdem könnte die als „funktionelle Selektivität“ bezeichnete Ligand-spezifische Aktivierung von GPCRs eine weitere mögliche Erklärung der hier beobachteten Unterschiede sein (148, 149, 261). Vor allem im Lymphknoten scheint JNJ7777120 über den H₄R ein entsprechendes G-Protein vermitteltes Signal zu inhibieren (115). Diese Inhibition der Signalkaskade kann durch Mepyramin verstärkt werden. Dagegen kann JNJ7777120 in der Peripherie möglicherweise zu einem G-Protein unabhängigen, β -Arrestin vermittelten Effekt führen, der durch Mepyramin inhibiert wird (240).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass in dieser Arbeit Anhaltspunkte dafür gegeben werden konnten, dass Histamin sowohl über den H₁R, als auch über den H₄R eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des murinen allergischen Asthmas spielt. Der Einfluss, den die beiden Rezeptoren ausüben, unterscheidet sich allerdings in Abhängigkeit von der Phase der Erkrankung. Während der Sensibilisierung scheint die Kooperation der beiden Rezeptoren einen anderen Effekt zu vermitteln als in der Provokationsphase. Dieses Ergebnis war so nicht erwartet und kann über das derzeitige Modell der Histaminrezeptorfunktion nicht ausreichend erklärt werden. Daher sollte diese unterschiedliche Funktion der Histaminrezeptoren auf zellulärer und molekularer Ebene näher untersucht werden. Über den Einfluss von H₁R und H₄R auf die Pathogenese von humanem Asthma ist bisher nichts bekannt und die Übertragbarkeit der Daten aus dem Mausmodell auf das humane System muss ebenfalls überprüft werden. Trotzdem geben diese Daten einen ersten Hinweis darauf, dass Histaminrezeptor-Antagonisten eine entscheidende Rolle auch in der Therapie von humanem Asthma spielen könnten.

In dem hier verwendeten Modell ist es aufgrund der analysierten Parameter nur bedingt möglich, eine Aussage über den Typ der Immunantwort zu machen. Um eindeutig eine Verschiebung in Richtung T_{H2} -Antwort und eine Abnahme der T_{H1} - und T_{H17} -Antwort zu zeigen, müssten weitere Parameter analysiert werden. Allerdings war das Hauptaugenmerk dieser Arbeit nicht die detaillierte Identifizierung des Typs der T-Zellantwort, sondern ein Vergleich der Auswirkungen, die die Behandlung mit Mepyramin und JNJ7777120 hat, in Abhängigkeit von dem Zeitpunkt, an dem die Substanzen appliziert wurden: Sensibilisierung oder Provokation. Obwohl die Daten im Grundsatz die Vermutung unterstützen, dass sowohl der H_1R als auch der H_4R entscheidend an der Pathogenese des Asthmas beteiligt sind, wären aus therapeutischer Sicht weitere funktionelle Analysen, wie die Messung der Lungenfunktion, eindeutig erforderlich. Dies ist ein technisch relativ aufwendiges Verfahren und ist für weitere nachfolgende Untersuchungen des Effekts geplant. Außerdem sollen in weiterführenden Versuchen detailliert zusätzliche Parameter untersucht werden, um die zugrunde liegende Immunantwort zu charakterisieren. Des Weiteren sollte ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Effekt auf eine unterschiedliche Pharmakokinetik von Mepyramin und JNJ7777120 zurückzuführen ist. Hierfür sind Messungen der Antagonist-Konzentrationen in verschiedenen Geweben zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation und die Berechnung der Halbwertszeiten der beiden Liganden erforderlich.

4.2. Interaktion von mH_1R und mH_4R im HEK293-Zellmodell

4.2.1. Expression von mH_1R und mH_4R im Zellmodell und funktionelle Analysen

Die Untersuchungen aus dem murinen Asthmodell (siehe 3.10.3.1, 4.10.4.1, (13)) ergaben, dass der H_1R -Antagonist Mepyramin den Effekt des H_4R -Antagonisten JNJ7777120 beeinflussen kann. Dabei konnte eine unterschiedliche Wirkung erzielt werden, je nachdem, ob die Behandlung mit den Antagonisten während der Sensibilisierungsphase oder während der Provokationsphase durchgeführt wurde. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass es möglicherweise eine Interaktion zwischen den Signalwegen des H_1R und des H_4R gibt, die dieses Verhalten begründen könnte. Die Voraussetzung für diese Hypothese ist, dass beide Rezeptoren auf einer Zelle exprimiert werden. Um die Signalwege des H_1R und des H_4R auf zellulärer Ebene genauer zu analysieren, wurde in diesem Teil der Arbeit ein Zellkulturmodell entwickelt. Es wurden stabil transfizierte HEK293-Zelllinien hergestellt, die entweder nur den mH_1R , nur den mH_4R oder beide Rezeptoren in Kombination exprimieren.

HEK293-Zellen weisen endogen keine Histaminrezeptoren auf. Durch die Transfektion konnten gezielt nur der H₁R, der H₄R oder beide Rezeptoren in Kombination exprimiert und analysiert werden. Dadurch konnten die einzelnen Signalwege getrennt voneinander betrachtet werden und es wurde ausgeschlossen, dass Histamin zusätzlich über endogene H_xRs wirkt. Es wurden keine zusätzlichen G-Proteine transfiziert und überexprimiert. Die gemessenen Effekte beruhen ausschließlich auf der Kopplung der H_xRs an endogene G-Proteine, um das System so physiologisch wie möglich zu halten.

Da zurzeit keine spezifischen Antikörper für die H_xRs zur Verfügung stehen, wurden die rekombinanten Rezeptoren am extrazellulären N-Terminus mit einem Flag- bzw. *c-myc-tag* und am intrazellulären C-Terminus mit einem His⁶-*tag* versehen. Auf diese Weise konnte die vollständige Expression der Rezeptoren im Western-Blot und in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Der durchflusszytometrische Nachweis hat den Vorteil, dass die Rezeptorproteine im nativen Zustand in intakten Zellen analysiert werden können und nicht nur in Lysaten, in denen die Tertiärstruktur der Proteine durch Denaturierung zerstört wurde, wie im Western-Blot. Auf diese Weise konnte außerdem die relative Expression der Rezeptoren auf der Zelle nachgewiesen und dadurch nach der stabilen Transfektion Zellklone ausgewählt werden, die eine vergleichbare Rezeptorexpression aufwiesen.

Der H₁R koppelt nach Histaminbindung an G_q-Proteine und aktiviert darüber die PLC. Dadurch wird vermehrt IP₃ gebildet, was wiederum zur Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern oder zu einem Ca²⁺-Einstrom aus dem Extrazellularraum führt. Außerdem kann die erhöhte [Ca²⁺]_i möglicherweise zu einer Aktivierung von Calmodulin führen, was wiederum zu einer erhöhten Aktivität der Adenylylzyklen und einem cAMP-Anstieg führt (siehe 1.3.1.1). Der H₄R vermittelt seine Wirkung nach Histaminbindung über G_i-Proteine. Dies führt ebenfalls zu einer PLC-Aktivierung und zu einem Anstieg der [Ca²⁺]_i. G_i-Proteine inhibieren aber im Gegensatz zu G_q-Proteinen die Aktivität der Adenylylzyklen, wodurch es zu einer cAMP-Abnahme kommt (siehe 1.3.1.4). Über den H₁R und den H₄R werden also die gleichen Effektormoleküle reguliert, wodurch eine gegenseitige Beeinflussung der Signalwege möglich ist, wenn sich beide Rezeptoren in der gleichen Zielzelle befinden (Abbildung 45).

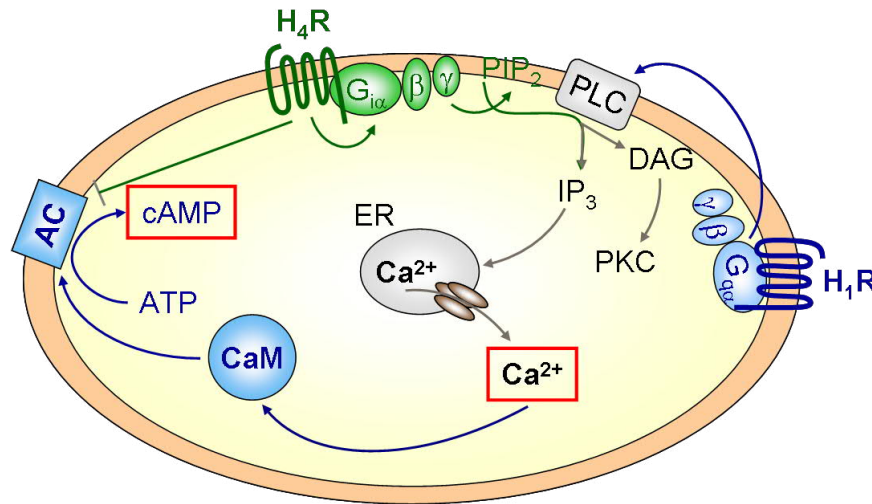


Abbildung 45: Signalweg von H₁R und H₄R. Der H₁R koppelt an G_q-Proteine und es kommt durch eine Aktivierung der PLC zu einer vermehrten Bildung von IP₃, was zu einer erhöhten [Ca²⁺]_i führt. Die erhöhte [Ca²⁺]_i kann über die Aktivierung von Calmodulin (CaM) wiederum Adenylzyklasen aktivieren und darüber einen cAMP-Anstieg in der Zelle bewirken. Der H₄R koppelt an G_i-Proteine und bewirkt durch Aktivierung der PLC ebenfalls eine erhöhte [Ca²⁺]_i. G_i-Proteine inhibieren dagegen Adenylzyklasen, wodurch es zu einer Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration kommt.

Um die Funktionalität der Histaminrezeptoren in diesen stabil transfizierten HEK-Zelllinien nachzuweisen, wurden daher die [Ca²⁺]_i und die cAMP-Konzentration gemessen. Es konnte bereits mehrfach und in verschiedenen Zellsystemen gezeigt werden, dass die Stimulation des hH₁R eine erhöhte [Ca²⁺]_i und einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt (76, 188, 268). Über eine Simulation des mH₄R konnte bereits eine erhöhte [Ca²⁺]_i in Mastzellen nachgewiesen werden (115) und der hH₄R erhöht ebenfalls histaminabhängig die [Ca²⁺]_i (203, 310). Eine Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration konnte in verschiedenen Zelllinien über den hH₄R gezeigt werden (89, 193). In dem hier verwendeten HEK-Zellmodell bewirkte die Stimulation mit Histamin in den mH₁R-, den mH₄R- und in den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen einen konzentrationsabhängigen Anstieg der [Ca²⁺]_i. In den H₁R-transfizierten Zellen war die gemessene [Ca²⁺]_i allerdings doppelt so hoch wie in den mH₄R-transfizierten Zellen. Die mH_{1/4}R-transfizierten Zellen zeigten die gleiche Konzentrationsabhängigkeit und den gleichen maximalen [Ca²⁺]_i-Wert wie die mH₁R-transfizierten Zellen. Der histaminabhängige Anstieg der [Ca²⁺]_i in den mH₁R-transfizierten Zellen konnte durch den H₁R-Antagonisten Mepyramin und in den mH₄R-transfizierten Zellen durch den H₄R-Antagonisten JNJ777120 auf den Basalwert reduziert werden. In den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen wurde das Histaminsignal nur durch Mepyramin, aber nicht durch JNJ777120 inhibiert. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass in den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen der mH₁R hauptsächlich an der histaminabhängigen Regulation

der $[Ca^{2+}]_i$ beteiligt ist. Unerwarteter Weise führte auch das als selektiver H_4R -Agonist beschriebene 5-Methylhistamin (178) sowohl in den mH_1R -, den mH_4R - als auch in den $mH_{1/4}R$ -transfizierten Zellen zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Die Affinität zum mH_1R war zwar deutlich geringer als zum mH_4R , aber der maximale $\Delta[Ca^{2+}]_i$ -Wert war dafür um ein Dreifaches höher. Dieses Verhalten sollte berücksichtigt werden bei der Verwendung von 5-Methylhistamin z.B. im Tiermodell oder in der Zellkultur an Zellen, die sowohl den H_1R als auch den H_4R auf der Oberfläche exprimieren. Bei einer 5-Methylhistamin-Konzentration von $1 \mu M$ konnte durch diesen Effekt beispielsweise sowohl in den mH_1R als auch in den mH_4R -transfizierten Zellen ein $\Delta[Ca^{2+}]_i$ -Wert von $\sim 200 \text{ nM}$ erreicht werden. Die 5-Methylhistamin-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Signale konnten hier ebenfalls durch die entsprechenden Antagonisten inhibiert werden. Obwohl 5-Methylhistamin eine höhere Affinität zum mH_4R hat, zeigte sich an den $mH_{1/4}R$ -transfizierten Zellen ein ähnliches maximales $\Delta[Ca^{2+}]_i$ -Signal und eine ähnliche Konzentrationsabhängigkeit wie in den mH_1R -transfizierten Zellen, welches auch in diesem Fall nur mit Mepyramin effektiv gehemmt werden konnte. Die leichte Reduktion des 5-Methylhistamin-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Signals, die durch JNJ7777120 in der Konzentration von $10 \mu M$ in den $H_{1/4}R$ -Zellen erzielt werden konnte, ist vermutlich auf eine unspezifische Wirkung zurückzuführen. In dieser Konzentration kann JNJ7777120 den Effekt von 5-Methylhistamin auf die $[Ca^{2+}]_i$ auch in den mH_1R -transfizierten Zellen auf ein ähnliches Niveau reduzieren (Daten siehe Anhang I). Dies war nach Stimulation mit Histamin nicht der Fall. JNJ7777120 scheint in einer so hohen Konzentration nicht mehr nur selektiv den mH_4R zu inhibieren, sondern auch den mH_1R . Die Affinität zum mH_1R scheint aber nur relativ gering zu sein, sodass es durch Histamin vom Rezeptor verdrängt werden kann und die Histaminwirkung nicht inhibiert. 5-Methylhistamin, das als H_4R -Agonist selbst nur eine geringe Affinität zum mH_1R aufweist, kann JNJ7777120 nicht vom mH_1R verdrängen.

In den mH_1R -transfizierten Zellen führte Histamin genau wie 5-Methylhistamin zu einem starken Anstieg der Forskolin-induzierten cAMP-Akkumulation. Durch die Inhibition mit Mepyramin konnte eindeutig gezeigt werden, dass das Signal über den H_1R vermittelt wurde. In den mH_4R -transfizierten Zellen führten sowohl Histamin als auch 5-Methylhistamin wie erwartet zu einer Reduktion der Forskolin-induzierten cAMP-Konzentration, die wiederum durch den Antagonisten JNJ7777120 inhibiert werden konnte. Für eine vollständige Reduktion des Histamin- bzw. 5-Methylhistamineffekts ist eine relativ hohe JNJ7777120-Konzentration von $100 \mu M$ erforderlich, obwohl die Substanz in der Literatur als sehr potenter H_4R -Antagonist beschrieben ist (277). Eine mögliche Begründung könnte sein, dass

für die Histamin- bzw. 5-Methylhistamin-Stimulation mit 100 μM ebenfalls eine relativ hohe Konzentration der Agonisten eingesetzt wurde. Bei einer Betrachtung der Literaturwerte ergibt sich ein pEC_{50} -Wert von 6,8 für die Stimulation des mH_4R mit Histamin (siehe Tabelle 6). Anhand der Daten, die in dieser Arbeit im Ca^{2+} -Assay erhalten wurden, konnte für den mH_4R ein pEC_{50} -Wert von 6,9 für die Stimulation mit Histamin und von 6,8 für die Stimulation mit 5-Methylhistamin berechnet werden. Diese Werte zeigen, dass schon eine Histamin- bzw. 5-Methylhistamin-Konzentration von 1 μM ausreichend gewesen wäre, um eine halbmaximale Stimulation des mH_4R zu erreichen. Bei einer geringeren Agonist-Konzentration wäre die Menge an Antagonist, die für eine komplette Inhibition des Signals erforderlich gewesen wäre, sicherlich ebenfalls geringer gewesen.

Die $\text{mH}_{1/4}\text{R}$ -transfizierten Zellen zeigten nach Stimulation mit Histamin bzw. 5-Methylhistamin ähnlich wie die mH_1R -transfizierten Zellen einen deutlichen Anstieg der Forskolin-induzierten cAMP Akkumulation. Der H_4R -Antagonist JNJ7777120 hatte keine Auswirkung auf diesen Effekt, wohingegen Mepyramin die Konzentration auf etwa die Hälfte der basalen Forskolin-Stimulation reduzierte. Durch die Gabe beider Antagonisten in Kombination konnte die cAMP-Konzentration den Wert der Forskolin-Stimulation erreichen. Dies zeigt, dass in dieser HEK-Zelllinie sowohl der mH_1R als auch der mH_4R funktionell exprimiert wurde. Nach Inkubation mit Mepyramin sind die H_1Rs auf der Zelloberfläche blockiert und Histamin bzw. 5-Methylhistamin bewirkten über den mH_4R und das inhibitorische G_i -Protein eine Abnahme der cAMP-Konzentration. Wenn beide Rezeptoren gleichzeitig durch einen Agonisten stimuliert werden, überwiegt die Aktivierung der Adenylzyklasen über den H_1R . Auf der anderen Seite wäre es auch möglich, dass eine Reduktion der cAMP-Konzentration um 50 % durch den mH_4R bei einem gleichzeitigen Anstieg der cAMP-Konzentration um 1000 % über den mH_1R nicht zu detektieren war und im Bereich der Schwankungen der Messwerte lag.

Durch die Vorinkubation der Zellen mit PTX wurde in den mH_4R -transfizierten Zellen sowohl für den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg als auch für die Inhibition der Forskolin-induzierten cAMP-Konzentration gezeigt, dass diese Signalwege G_i -Protein-vermittelt ablaufen. Das Toxin inhibiert in den mH_4R -transfizierten Zellen nicht allgemein die Freisetzung von Ca^{2+} , da die Zellen trotzdem noch in der Lage sind, auf die Stimulation mit ATP mit einem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg zu reagieren. Die H_1R -vermittelten Signale blieben durch das Toxin unbeeinträchtigt. PTX inhibiert selektiv nur die G_i -proteinabhängige Signaltransduktion (38, 204), G_q -vermittelte Signale werden durch das Toxin nicht beeinflusst. Hofstra et al. (115) konnten

bereits in murinen Mastzellen zeigen, dass die über den H₄R vermittelte Ca²⁺-Mobilisierung PTX-sensitiv war. Bei der Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration nach Inkubation mit PTX zeigte sich ein weiteres Indiz dafür, dass der mH₄R in den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen funktionell exprimiert wird. Der durch Histamin bzw. 5-Methylhistamin und Forskolin-induzierte cAMP-Anstieg konnte durch Mepyramin in den PTX-behandelten mH_{1/4}R-Zellen auf den Kontrollwert von nur mit Forskolin stimulierten Zellen reduziert werden. In den unbehandelten Zellen wurde die cAMP-Konzentration durch Mepyramin dagegen auf ein geringeres Niveau reduziert, was durch den G_i-vermittelten Histamineffekt am H₄R begründet werden kann.

Diese stabil transfizierten HEK-Zellen stellen ein gutes Modell da, um den mH₁R und den mH₄R pharmakologisch zu charakterisieren. Die in dieser Arbeit generierten pharmakologischen Parameter und bereits veröffentlichte Werte für die humanen und murinen H_xRs wurden in Tabelle 6 zusammengefasst. Bei den in dieser Arbeit durch funktionelle Analysen erhaltenen Daten handelt es sich um pK_b-Werte, dagegen werden in der Literatur häufig pK_i-Werte aufgeführt, die in Radioligand-Bindungsstudien gemessen wurden. pK_i- und pK_b-Werte korrelieren nicht immer vollständig miteinander (254). Die meisten bisher veröffentlichten pharmakologischen Parameter, wie pEC₅₀-Werte und pK_i-Werte, wurden hauptsächlich an den humanen Histaminrezeptoren untersucht (siehe Tabelle 6). Für die murinen H_xRs gibt es dazu fast keine publizierten Daten. Es werden aber viele H_xR-Agonisten und Antagonisten in unterschiedlichsten Krankheitsmodellen in der Maus eingesetzt. Um die Übertragbarkeit eines Effekts aus dem Mausmodell auf den Menschen abschätzen zu können, ist es wichtig, die pharmakologischen Größen wie Affinität oder Effektivität eines Liganden in beiden Systemen zu vergleichen. Die mH_xRs und hH_xRs weisen zwar eine relativ hohe Homologie auf (67 % für den H₄R (176)), dennoch konnte z.B. für JNJ7777120 gezeigt werden, dass es am in einem Insektenzellsystem exprimierten rekombinanten hH₄R ein partieller inverser Agonist ist, während am mH₄R eine partial agonistische Wirkung gezeigt werden konnte (255). Allerdings sollte nicht von der proximalen Signaltransduktion auf zelluläre Antworten geschlossen werden, da es bisher keine weiteren Hinweise auf eine agonistische Funktion von JNJ7777120 gibt. Um zu analysieren, ob bestimmte Liganden am murinen Rezeptor eine ähnliche Wirkung aufweisen wie am entsprechenden humanen Rezeptor, ist es wichtig, die murinen H_xRs ebenfalls in Zellmodellen zu untersuchen.

Tabelle 6: Vergleich pharmakologischer Daten zwischen murinen und humanen H_xRs.

		H ₁ R		H ₂ R		H ₃ R		H ₄ R	
Spezies		h	m	h	m	h	m	h	m
pK _i	HA	4,2 ^[2]	-	4,3 ^[2]	-	8,0 ^[2]	-	7,8 ^[2]	7,1 ^[1]
	5-MH	<4 ^[2]	-	5,1 ^[2]	-	5,3 ^[2]	-	7,3 ^[2]	6,8 ^[1]
pK _b	HA	-	8,6	-	-	-	-	-	8,8
	5-MH	-	8,2	-	-	-	-	-	8,8
pEC ₅₀	HA	7,0 ^[3]	8,2	7,2 ^[3]	-	8,6 ^[3]	-	7,7 ^[3]	6,8 ^[3] / 6,9
	5-MH	<5 ^[3]	5,2	6,8 ^[3]	-	6,1 ^[3]	-	7,4 ^[3]	6,8
pIC ₅₀	HA	7,9 ^{#[5]}	7,4[#]	-	-	-	-	-	7,4 ^{*[4]} / 6,9[*]
	5-MH	-	7,8[#]	-	-	-	-	-	7,0[*]

Werte aus dem Calciumassay (siehe 3.2.2)

[1] → pK_i: Radioligandbindungsassay mit [³H]Histamin in HEK293T-Zellen (175)

[2] → pK_i: Radioligandbindungsassay mit [³H]Histamin, [³H]N-Methylhistamin, [³H]Mepyramin und [¹²⁵I]Iodoaminopotentidin in SK-N-MC-Zellen (178)

[3] → pEC₅₀: NFAT Luciferase Reporterassay (H₁R), Inhibition der Forskolin-induzierten CRE-β-Galactosidase Aktivität (H₂R) in HEK293T-Zellen, Inhibition der Forskolin-induzierten cAMP-Bildung (H₃R, H₄R) in SK-N-MC-Zellen (174)

[4] → pIC₅₀: Chemotaxisassay mit murinen Knochenmarksmastzellen (277)

[5] → pIC₅₀: [³H]InsP₃ Bildung in hH₁R transfizierten COS-7-Zellen (8)

pIC₅₀-Werte: [#]100 nM HA/10 μM 5-MH Inhibition mit Mepyramin; ^{*}10 μM HA/5-MH Inhibition mit JNJ7777120

4.2.2. Aktivierung des MAPK-Signalwegs über mH₁R und mH₄R

In den stabil mit mH₁R und mH₄R transfizierten Zelllinien wurde ebenfalls untersucht, welchen Einfluss eine Stimulation mit Histamin auf verschiedene Komponenten des MAPK-Signalwegs hat und ob auf dieser Ebene eine mögliche Interaktion der Signalwege zwischen mH₁R und mH₄R zu erkennen ist. Nach Beschreibung von Naor et al. (209) können die verschiedenen G-Proteine auf unterschiedliche Art und Weise in den MAPK-Signalweg eingreifen und dadurch verschiedene Kaskaden des MAPK-Signalwegs aktivieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach einer Stimulation mit Histamin über den mH₁R p38 MAPK, ERK 1/2 und CREB phosphoryliert wurden. In dem Phospho-MAPK-Array konnte zusätzlich eine Phosphorylierung der Kinase MKK 3 nachgewiesen werden. Das ist nicht unerwartet, da diese Kinase erst nachdem sie selbst durch Phosphorylierung aktiviert wurde, in der Lage ist, p38 MAPK zu phosphorylieren (217). Robinson et al. (237) konnte bereits eine Aktivierung von ERK 1/2 und p38 MAPK nach Stimulation mit Histamin und ebenfalls keinen Einfluss auf eine JNK-Phosphorylierung in einer Hamstermuskelzelllinie

nachweisen. Dieses Signal konnte durch den H₁R-Antagonisten Mepyramin inhibiert werden, was die Beteiligung des H₁R vermuten ließ. Allerdings konnte die von Robinson et al. (237) gezeigte Phosphorylierung von ERK 1/2 und p38 MAPK unerwarteterweise ebenfalls durch PTX inhibiert werden, was für eine Signalkaskade über das PTX-sensitive G_i-Protein sprechen würde. Normalerweise koppelt der H₁R an G_q-Proteine (172), die über PLC vermittelt, eine erhöhte [Ca²⁺]_i und eine Aktivierung der PKC bewirken und dadurch Ras-vermittelt die Aktivierung des ERK 1/2-Signalwegs regulieren (274). Andererseits konnten Leurs et al. (170) bereits einen ersten Hinweis auf eine H₁R-G_i-Protein-Kopplung geben, indem sie zeigten, dass die H₁R-vermittelte Freisetzung von Arachidonsäure durch PTX inhibiert werden konnte, während das Toxin keinen Einfluss auf die [Ca²⁺]_i hatte. In beiden Fällen (170, 237) handelte es sich allerdings um den Meerschweinchen- bzw. den Hamster-H₁R und nicht um den in dieser Arbeit untersuchten murinen H₁R. Die inhibitorische Wirkung von PTX auf die Freisetzung von Arachidonsäure konnte von Leurs et al. (170) auch nur in CHO-Zellen, aber nicht in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Die Spezies des Zellsystems bzw. des Rezeptors scheint also eine entscheidende Rolle dabei zu spielen, über welches G-Protein die Signalkaskade des H₁R abläuft.

Über den mH₁R ist keine Phosphorylierung von SAPK/JNK nach Stimulation mit Histamin zu erkennen, was auch im Phospho-MAPK-Array für die mH₁R-transfizierten Zellen gezeigt werden konnte. Dandekar et al. (52) konnten sogar eine Abnahme der SAPK/JNK-Phosphorylierung, die in Mausmilzzellen schon ohne Stimulation detektiert werden konnte, über den H₁R mit Hilfe eines H₁R-Agonisten nachweisen. Demnach scheint der mH₁R in den Mausmilzzellen konstitutiv aktiv zu sein, was in dieser Arbeit in dem HEK-Zellmodell nicht bestätigt werden konnte. Nach dem starken cAMP-Anstieg, der durch die Histamin-Stimulation in den mH₁R-transfizierten Zellen induziert werden konnte, war die Phosphorylierung von CREB zu erwarten. cAMP aktiviert die PKA, die dadurch wiederum den Transkriptionsfaktor CREB phosphoryliert und aktiviert (siehe 1.4.5).

Nach Stimulation der H₄R-transfizierten Zellen mit Histamin konnte ebenfalls eine Phosphorylierung der MAPK p38, ERK 1/2 und SAPK/JNK und des Transkriptionsfaktors CREB nachgewiesen werden. Morse et al. (203) konnten schon direkt nach der ersten Klonierung des H₄R zeigen, dass dieser Rezeptor an der Regulation des MAPK-Signalwegs beteiligt ist. Sie konnten in mit dem hH₄R stabil transfizierten HEK-Zellen eine Phosphorylierung von ERK 1/2 nachweisen, die durch PTX inhibiert werden konnte und daher über das G_i-Protein vermittelt zu sein schien. Eine mH₄R-abhängige Phosphorylierung

von ERK 1/2 und MEK konnten Desai et al. (62) in aus Knochenmark generierten murinen Mastzellen nachweisen und zeigten, dass die IL-6 Produktion über diesen Signalweg reguliert wird. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Aktivierung des p38 MAPK-Signalwegs über den H₄R wurde bisher nicht beschrieben. Die Phosphorylierung von SAPK/JNK nach Stimulation mit Histamin über den H₄R konnte bereits von Dandekar et al. (52) in Mausmilzzellen bestätigt werden. Bei der SAPK/JNK-Aktivierung scheint TNF- α eine entscheidende Rolle zu spielen, da die histaminabhängige Phosphorylierung von SAPK/JNK in TNF- α ^{-/-}-Mäusen nicht auftritt. Unerwartet ist, dass nach Histamin-Stimulation über den mH₄R eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB nachgewiesen werden konnte. CREB wird von der PKA nach Aktivierung durch cAMP phosphoryliert. Da der H₄R nach Stimulation mit Histamin an G_i-Proteine koppelt, die die Adenylylzyklen inhibieren, kommt es, wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, zu einer Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration. Somit wäre eine verminderte Phosphorylierung von CREB zu erwarten gewesen. Es gibt allerdings auch noch andere Signalwege, über die CREB phosphoryliert werden kann. Zum einen konnte eine Phosphorylierung von CREB über MAPKAPK-2, dem Substrat von p38 MAPK, gezeigt werden, die durch einen p38-Inhibitor vollständig gehemmt werden konnte (69, 217, 275). Eine weitere mögliche Aktivierung von CREB kann ebenfalls durch die Kinase MSK-1 erfolgen, die als Substrat von ERK 2 und p38 dient. Diese Phosphorylierung kann sowohl durch einen ERK-, als auch durch einen p38-Inhibitor gehemmt werden (58). Ein weiterer Mechanismus, der zu einer CREB-Aktivierung führt, konnte über eine Phosphorylierung durch CaM-Kinasen beschrieben werden. CaM-Kinasen werden durch eine erhöhte [Ca²⁺]_i aktiviert (265). Da in den mH₄R-transfizierten Zellen nach Stimulation mit Histamin sowohl eine Phosphorylierung von ERK 1/2 und p38 MAPK nachgewiesen werden konnte als auch eine erhöhte [Ca²⁺]_i, wird CREB hier vermutlich über einen dieser alternativen Signalwege phosphoryliert und nicht wie hauptsächlich beschrieben über eine PKA-Aktivierung durch cAMP. Um zu identifizieren, über welchen Signalweg die CREB-Phosphorylierung in den mH₄R-transfizierten Zellen vermittelt wurde, sollten für weitere Versuche Inhibitoren für den ERK 1/2- und p38 MAPK-Signalweg eingesetzt und entsprechende CaM-Kinasen inhibiert werden.

Die mH_{1/4}R-transfizierten Zellen wiesen nach Stimulation mit Histamin eine stärkere p38-Phosphorylierung auf als die Zellen, die entweder den mH₁R oder den mH₄R exprimieren. Außerdem ist das Signal nach einer Stimulationszeit von 5 min am intensivsten, während sowohl in den mH₁R als auch in den mH₄R die stärkste Phosphorylierung erst nach 15 min

auftrat. Hier scheint sich der Effekt der beiden Rezeptoren zu potenzieren, wobei unklar ist, ob es zu einer Interaktion der Signalwege kommt oder ob die p38 MAPK-Kaskade auch in den mH_{1/4}R-Zellen nur von einem der beiden Rezeptoren aktiviert wird und sich nur geringfügig anders verhält, weil es sich um einen anderen Zellklon handelt. In den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen war nach 5 minütiger Histamin-Stimulation eine deutliche ERK 1/2-Phosphorylierung zu erkennen, die auch nach einer Stimulation von 60 min noch erhalten blieb. Die ERK 1/2-Phosphorylierung in den mH₁R-transfizierten Zellen war viel geringer ausgeprägt und nahm nach 15 min zuerst ab, um dann nach 30 bzw. 60 min wieder zuzunehmen. Eine ähnliche Zu- und Abnahme war auch in den mH₄R-transfizierten Zellen zu erkennen, wobei die Phosphorylierung hier im Allgemeinen stärker war, als in den mH₁R-transfizierten Zellen. Daher scheint die ERK 1/2-Phosphorylierung in den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen ebenfalls von beiden Signalwegen abhängig zu sein, wobei die über den mH₁R vermittelte schwächere Phosphorylierung die mH₄R vermittelte Phosphorylierung noch zu verstärken scheint. Die CREB-Phosphorylierung war in den mH₄R- und den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen nach 15 minütiger Stimulation und in den mH₁R-transfizierten Zellen erst nach 30 min Stimulation mit Histamin am intensivsten. Nach 30 min (mH₄R) bzw. 60 min (mH₁R) kommt es zu einer Intensitätsabnahme des Signals. In den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen nahm die Phosphorylierung nach 30 min zuerst ab, war dann nach 60 min aber wieder verstärkt erkennbar. Eine Phosphorylierung von SAPK/JNK konnte nur in den mH₄R-transfizierten Zellen nach einer Stimulationszeit von 5 min nachgewiesen werden und blieb in den mH₁R-transfizierten Zellen aus. Die mH_{1/4}R-transfizierten Zellen zeigten dagegen eine stärkere SAPK/JNK-Phosphorylierung nach Stimulation mit Histamin für 5 min als die mH₄R-transfizierten Zellen. Dieses Signal blieb in abgeschwächter Form auch nach einer Stimulationszeit von bis zu 60 min noch erhalten. Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass sich die histaminabhängige Phosphorylierung der drei untersuchten MAPK und CREB in den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen immer geringfügig anders verhielt, als in den Zellen, die entweder den mH₁R oder den mH₄R exprimierten. Daher lässt sich vermuten, dass in allen Fällen beide Rezeptoren an der entsprechenden Signaltransduktion und der Phosphorylierung beteiligt sind. Eine weitere mögliche Erklärung für die unterschiedliche Phosphorylierungsintensitäten könnten verschiedene Expressionslevel der Rezeptoren in den Zelllinien sein. Auch wenn nach der Einzelzellklonierung Klone ausgewählt wurden, deren Rezeptorexpressionslevel ähnlich waren, sind diese nicht 100 %ig identisch. Außerdem kann sich die Rezeptorexpression in den stabilen Zelllinien auch trotz ständigem Selektionsdruck

durch Antibiotika mit der Zeit verändern. Um zu identifizieren, welchen Anteil welcher der beiden Rezeptoren an der Phosphorylierung in den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen hat, sollten für weitere Versuche selektive Agonisten und Antagonisten für den H₁R und den H₄R eingesetzt werden und anschließend ebenfalls die Phosphorylierung von Komponenten des MAPK-Signalwegs analysiert werden.

Eine Degradation von I κ B und eine Phosphorylierung von NF κ B konnte weder in den mH₁R-, noch in den mH₄R-transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis konnte von Desai et al. (62) für den mH₄R bestätigt werden. Bakker et al. (8) konnten dagegen eine hH₁R-vermittelte Aktivierung von NF κ B in transfizierten COS-7 Zellen nachweisen. Ein möglicher Grund für den Unterschied im Vergleich zu dem in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnis könnte sein, dass es sich um unterschiedliche H₁R-Spezies handelt. Bakker et al. (8) verwendeten den hH₁R, während in dieser Arbeit der mH₁R analysiert wurde. Außerdem wurden für beide Studien unterschiedliche Zelllinien für die Transfektion verwendet. In weiteren Untersuchungen an den mH₁R- und mH₄R-transfizierten Zellen sollte die Aktivierung des PIK3-Signalwegs und die Phosphorylierung von Akt weiter untersucht werden, da der Phospho-MAPK-Array einen Hinweis auf eine mH₄R-vermittelte Akt-Phosphorylierung gab. Außerdem konnten Desai et al. (62) bereits eine Beteiligung des mH₄R am PIK3-Signalweg und an der Akt-Phosphorylierung in Mausmilzzellen nachweisen. In dem in dieser Arbeit verwendeten HEK-Zellmodell sollten ebenfalls Analysen durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob die Aktivierung der unterschiedlichen MAPK-Komponenten durch PTX bzw. Inhibitoren der anderen G-Proteine inhibiert werden kann. Danach könnte eine Aussage darüber gemacht werden, welches G-Protein in die entsprechende Signalkaskade involviert ist. Nach Untersuchungen von Robinson et al. (237) scheint eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs auch über andere G-Proteine vermittelt zu sein, als für den entsprechenden Rezeptor hauptsächlich beschrieben wurde. Der H₁R scheint unter bestimmten Bedingungen ebenfalls das inhibitorische G_i-Protein koppeln zu können (170), was allerdings wie oben beschrieben, speziesabhängig zu sein scheint. Daher wäre interessant zu analysieren, welche G-Proteine in diesem HEK-Zellmodell bei der Aktivierung der MAPK-Signalkaskaden über den mH₁R und mH₄R eine Rolle spielen und ob der mH₄R ebenfalls mit anderen G-Proteinen als G_i interagieren kann. Für den Anstieg der [Ca²⁺]_i und die Regulation der intrazellulären cAMP-Konzentration konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass sie in den mH₄R-, aber nicht in den mH₁R-transfizierten Zellen über das PTX-sensitive G_i-Protein vermittelt werden.

Neben einer G-Proteinaktivierung konnte für einige GPCRs bereits gezeigt werden, dass sie bestimmte Signalwege G-proteinunabhängig über eine direkte Kopplung von Arrestinen aktivieren können. Arrestine sind normalerweise an der Rezeptor-Desensibilisierung nach der Aktivierung durch einen Agonisten beteiligt. Nach der Agonistbindung wird der GPCR an intrazellulären Domänen oder am C-Terminus durch GPCR-Kinasen (GRK) phosphoryliert. Dadurch wird β -Arrestin rekrutiert und kann an diese phosphorylierten Domänen binden. Durch diese Arrestinbindung ist aufgrund von sterischer Hinderung keine Bindung des G-Proteins und damit keine G-Protein-vermittelte Signaltransduktion mehr möglich. Außerdem kommt es zu einer Internalisierung, bei der der Rezeptor in saure Endosomen aufgenommen wird, wo er entweder dephosphoryliert und wieder zurück an die Zelloberfläche transportiert wird oder das komplette Rezeptorprotein degradiert wird, wodurch es zu einer Herunterregulation der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche kommt (222). Auf der anderen Seite konnte allerdings auch gezeigt werden, dass GPCRs direkt, ohne G-Proteinkopplung über β -Arrestin MAPK-Signalwege aktivieren können. Nachdem der GPCR durch die GRK phosphoryliert und nach β -Arrestinbindung durch Endozytose internalisiert wurde, dienen β -Arrestine als Adaptorproteine und bringen die entsprechenden Komponenten der MAPK-Signalwege, wie MAPKKK, MAPKK und MAPK in räumliche Nähe. Auf diese Weise vereinfachen Adaptorproteine die Protein-Protein-Interaktionen, stellen die Spezifität des Signals sicher und halten die richtige subzelluläre Verteilung der Proteine aufrecht (222). Eine solche G-Protein-unabhängige Aktivierung über β -Arrestin konnte bereits für die ERK- (59, 183) und die JNK 3-Kaskade beschrieben werden (191) (Abbildung 46).

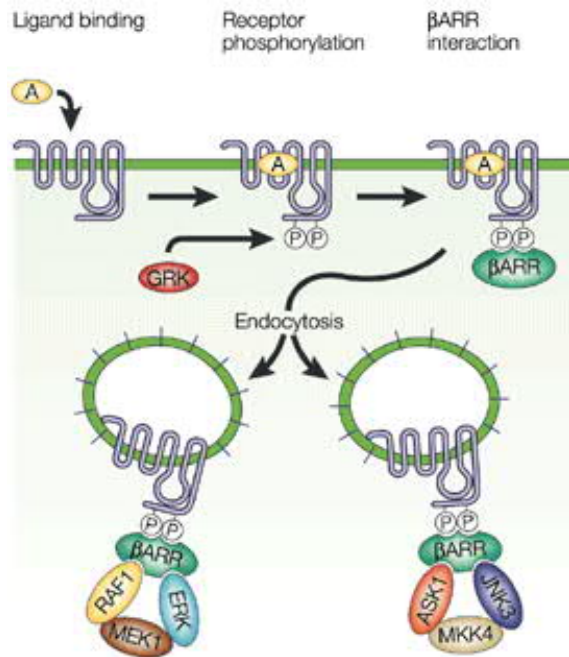


Abbildung 46: GPCR-vermittelte Aktivierung des MAPK-Signalwegs über β-Arrestin. Nach Agonistbindung werden intrazelluläre Domänen des GPCR durch GRKs phosphoryliert und es kommt zu einer Bindung von β-Arrestin. Nach Internalisierung der Rezeptoren durch Endozytose können die Arrestine als Adaptorproteine fungieren und Komponenten des MAPK-Signalwegs in räumliche Nähe bringen. Dadurch wird eine G-Protein-unabhängige Aktivierung von MAPK-Kaskaden ermöglicht (222).

Nach Herunterregulation von Arrestin 3 mittels siRNA konnte für die Histamin-Stimulation über den H₁R bereits eine Abnahme der ERK 1/2-Phosphorylierung gezeigt werden (28), die möglicherweise in einer Arrestin-vermittelten MAPK-Aktivierung begründet ist. Für den H₄R konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit Histamin die GTP γ S-Bindung und die β-Arrestin Rekrutierung mit gleicher Potenz und Effizienz aktiviert wird. Außerdem kann das als H₄R-Antagonist beschriebene JNJ777120 am H₄R auch ohne Histamin-Stimulation zu einer β-Arrestin Rekrutierung und zu einer β-Arrestin vermittelten ERK-Phosphorylierung führen (240).

Daher könnte auch die Phosphorylierung der in dieser Arbeit untersuchten MAPK neben G-Proteinen auch über β-Arrestin vermittelt sein. Ein Hinweis auf einen β-Arrestin vermittelten Signalweg könnte die Kinetik der Phosphorylierung sein. Eine G-Protein-abhängige Phosphorylierung tritt schon wenige Minuten nach Stimulation ein und weist nur eine relativ geringe Halbwertszeit auf. Außerdem wandert die phosphorylierte MAPK in den Zellkern. Dagegen verläuft die β-Arrestin-abhängige MAPK-Aktivierung langsamer. Die stärkste Phosphorylierung tritt erst 5-10 min nach der Stimulation ein. Außerdem bleibt die Phosphorylierung über einen Zeitraum von bis zu 90 min erhalten und die über β-Arrestin aktivierten MAPK sind in endosomalen Vesikeln im Zytosol wiederzufinden (2). Eine länger

anhaltende Aktivierung konnte in den hier verwendeten HEK-Zelllinien vor allem bei ERK 1/2 und CREB nachgewiesen werden. Eine nähere Analyse, ob die hier nachgewiesenen Phosphorylierungen über die entsprechenden G-Proteine oder über β -Arrestin vermittelt wurden, sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Dazu könnten Inhibitoren gegen einzelne G-Proteine eingesetzt werden und ein genetischer Knockdown von Arrestin 2 und 3 mittels siRNA durchgeführt werden. Außerdem könnte die Lokalisation der aktivierten MAPK in der Zelle untersucht werden.

Noubade et al. (214) konnten zeigen, dass der H_1R eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des p38 MAPK-Signalwegs in $CD4^+$ -T-Zellen spielt und an der Regulation der $IFN-\gamma$ Produktion beteiligt ist. Eine gleichzeitige Aktivierung des p38 MAPK-Signalwegs über den H_1R und ein zweites Signal über den T-Zellrezeptor (TCR) sind in den $CD4^+$ -Zellen erforderlich, um eine Polarisierung zu T_H1 -Zellen zu erreichen. Das Zusammenspiel von H_1R und TCR könnte über das G_q -Protein erfolgen. Der H_1R koppelt nach Histaminbindung an G_q -Proteine und für den TCR ist ebenfalls eine solche Assoziation über das CD3-Molekül beschrieben (270). Auf der anderen Seite hat die Aktivierung von ERK 1/2 einen entscheidenden Einfluss auf die T_H2 -Differenzierung (221). Die Stimulation des TCR in naiven T-Zellen durch ein über MHC-Moleküle präsentiertes Antigen aktiviert den ERK-MAPK-Signalweg. Dadurch wird die von IL-4 vermittelte Wirkung am IL-4R hochreguliert und es kommt zu einer Polarisierung in Richtung T_H2 -Zellen (67, 300).

Kampen et al. (138) konnten nachweisen, dass Eotaxin eine Phosphorylierung von ERK 2 und p38 MAPK initiiert und dadurch die Eotaxin-abhängige Chemotaxis und Degranulation von eosinophilen Granulozyten reguliert wird. In eosinophilen Granulozyten konnte ebenfalls eine H_4R -vermittelte Chemotaxis nachgewiesen werden (230). Da in dieser Arbeit eine Aktivierung von Komponenten des MAPK-Signalwegs über den H_4R nachgewiesen wurde, spielt der MAPK-Signalweg möglicherweise auch bei der H_4R -vermittelten Chemotaxis eine Rolle. Auf diese Weise haben die H_xRs über den MAPK-Signalweg möglicherweise einen entscheidenden Einfluss auf die Immunregulation und die adaptive Immunantwort.

4.2.3. MAPK-vermittelte Genexpression über den mH_1R und mH_4R

Die Aktivierung der verschiedenen Komponenten des MAPK-Signalwegs endet jeweils in einer Phosphorylierung von entsprechenden Transkriptionsfaktoren, die im Zellkern die Genexpression regulieren. Daher sollten im weiteren Verlauf dieser Arbeit Gene nachgewiesen werden, die im Zuge dieser Signalkaskaden exprimiert werden. Histamin ist

vor allem in entzündlichen Prozessen und allergischen Reaktionen involviert. IL-8 ist ein Chemokin, dem bei Entzündungen und immunmodulatorischen Prozessen häufig eine entscheidende Bedeutung zukommt. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass durch Stimulation mit Histamin über den H₁R die Produktion von IL-8 induziert wird. Mittels spezifischer Inhibitoren konnte dargelegt werden, dass sowohl der NFκB-Signalweg als auch die MAPK-Signalwege ERK, p38 und SAPK/JNK an dieser Aktivierung beteiligt sind (196). Daher wurde in dieser Arbeit die Expression von IL-8 in den HEK-Zelllinien auf mRNA-Ebene quantitativ untersucht und mithilfe verschiedener MAPK-Inhibitoren analysiert, welcher MAPK-Signalweg bei der IL-8-Expression eine Rolle spielt. Um zu sehen, ob es in allen stabil transfizierten Zelllinien möglich ist, eine Expression von IL-8 zu induzieren, wurden die Zellen zuerst mit TNF-α stimuliert, für das eine Induktion der IL-8-Expression bereits mehrfach nachgewiesen werden konnte (27, 141). TNF-α konnte in allen Zelllinien einen deutlichen Anstieg der IL-8-Expression induzieren. Die Menge an gebildeter IL-8 mRNA schwankt allerdings relativ stark beim Vergleich der verschiedenen Zelllinien. Die unterschiedliche Reaktivität der stabil transfizierten Zelllinien nach TNF-α-Stimulation könnte in der Einzelzellklonierung begründet sein. Die Anzahl an TNF-Rezeptoren wird nicht auf allen HEK293-Zellen gleich gewesen sein. So könnte durch die Einzelzellklonierung für die eine Zelllinie eine Zelle mit mehr und für eine andere Zelllinie eine Zelle mit weniger TNF-Rezeptoren ausgewählt worden sein.

Nach Stimulation mit Histamin konnte nur in den mH₁R- und in den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen ein Anstieg der IL-8-Expression detektiert werden. In den mH₄R-transfizierten Zellen blieb die Expression auf dem Niveau der Leervektor-transfizierten Kontrollzellen. Die IL-8-Expression in den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen entsprach in etwa der Expression in den mH₁R-transfizierten Zellen. In den mH₁R-transfizierten Zellen konnte die IL-8-Expression durch den ERK-Inhibitor PD 980598 signifikant bis auf den Basalwert reduziert werden, sodass die histaminabhängige IL-8-Expression über den mH₁R vornehmlich über den ERK-Signalweg vermittelt zu sein scheint. Der p38-Inhibitor SB 203580, der JNK-Inhibitor SP 600125 und der CREB-Inhibitor KG 501 hatten keinen Einfluss auf die histaminabhängige IL-8-Expression in den mH₁R-transfizierten Zellen. Auch wenn alle vier Inhibitoren in Kombination zu den Zellen gegeben wurden, konnte die IL-8-Expression auf ein ähnliches Niveau reduziert werden, wie mit dem ERK-Inhibitor alleine. Da in den mH₄R-transfizierten Zellen keine IL-8-Expression durch Stimulation mit Histamin induziert werden konnte, war mit den Inhibitoren keine Abnahme zu erwarten. Der Einfluss der Inhibitoren auf die IL-8-

Expression in den mH₄R-transfizierten Zellen wurde allerdings trotzdem ermittelt, um auszuschließen, dass eine Inhibition bestimmter MAPK-Signalwege eine vermehrte IL-8-Expression induziert. Diese Vermutung konnte allerdings nicht bestätigt werden. Da in den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen eine nahezu identische IL-8-Expression wie in den mH₁R-transfizierten Zellen gemessen wurde und über den mH₄R keine IL-8-Expression induziert werden konnte, wurde davon ausgegangen, dass die IL-8-Expression in den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen ausschließlich über den mH₁R vermittelt wurde. Im weiteren Verlauf wurde die IL-8-Expression daher nach Inkubation mit den MAPK-Inhibitoren in den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen nicht untersucht.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1 einen wichtigen Einfluss auf die durch IL-1 oder TNF-α induzierte IL-8-Expression haben (114). Eine IL-8-Induktion über NFκB konnte in diesem Zellmodell ausgeschlossen werden, weil weder in den mH₁R- noch in den mH₄R-transfizierten Zellen eine NFκB-Phosphorylierung nach Stimulation mit Histamin nachgewiesen werden konnte. Außerdem konnte eine Aktivierung von AP-1 nach Stimulation mit Histamin über den H₄R beschrieben werden (100). AP-1 ist ein Homo- oder Heterodimer, bestehend aus unterschiedlichen Komponenten der Jun-, Fos- und ATF-Familien (139), und kann durch die verschiedenen MAPK-Signalwege reguliert werden (292). c-Jun ein Mitglied der Jun-Familie wird hauptsächlich über JNK aktiviert. Daher wurde angenommen, dass JNKs an Entzündungsreaktionen beteiligte Gene über c-Jun und AP-1 aktivieren (125, 153). Allerdings konnte gezeigt werden, dass c-Jun in der IL-8 Regulation nur eine untergeordnete Rolle spielt (205). Für p38 MAPK wurde beschrieben, dass es weniger an der Expression von IL-8 beteiligt ist, aber dafür spezifische posttranslationale Prozesse reguliert. Durch Aktivierung des p38 MAPK-Signalwegs wird über MAPKAPK 2 die Stabilität der IL-8 mRNA erhöht (120, 294). Bisher wurde wenig über die Induktion der IL-8-Expression durch Aktivierung des ERK-Signalwegs beschrieben. Es gibt erste Hinweise darauf, dass die IL-8-Expression über ERK vermittelt abläuft und eine leicht erhöhte IL-8-Expression konnte nach Stimulation mit EGF, einem ERK-Aktivator, nachgewiesen werden (114, 120). Eine ERK-abhängige IL-8-Expression konnte in dem in dieser Arbeit verwendeten HEK-Zellmodell für die mH₁R-transfizierten Zellen nach Stimulation mit Histamin bestätigt werden. Allerdings wäre eine vermehrte IL-8-Expression auch in den mH₄R-transfizierten Zellen zu erwarten gewesen, da in diesen Zellen nach Histamin-Stimulation ebenfalls eine erhöhte ERK-Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte. Die unterschiedlichen Beobachtungen von anderen Arbeitsgruppen im

Vergleich zu den Ergebnissen, die in dieser Arbeit in dem HEK-Zellmodell detektiert wurden, können durch die unterschiedlichen Stimuli zustande kommen. In den bisher beschriebenen Analysen wurde die IL-8-Expression häufig nach Stimulation mit IL-1 oder TNF- α gemessen. Eine Expressionsanalyse nach Stimulation mit Histamin wurde bisher noch nicht durchgeführt. Das verwendete Zellsystem wird einen weiteren entscheidenden Einfluss darauf haben, welcher Signalweg nach Stimulation aktiviert wird. Hoffmann et al. (114) konnten in ihrer Zusammenfassung zeigen, dass der Stimulus und das Zellsystem einen entscheidenden Einfluss auf den Signalweg haben, der die IL-8-Expression induziert. In weiterführenden Versuchen wäre es hilfreich, die Expression von IL-8 nach Stimulation mit Histamin auch auf Proteinebene nachzuweisen, da der in dieser Arbeit durchgeführte Nachweis nur auf mRNA-Ebene stattfand und das Vorhandensein der entsprechenden mRNA nicht zwangsläufig zu einer Translation führen muss (97).

Weiterhin wurde die Expression von COX-2 quantifiziert, einem Enzym, das die Prostaglandinsynthese katalysiert. Prostaglandine spielen in vielen entzündlichen Prozessen eine wichtige Rolle. COX-2 ist im Vergleich zu COX-1 nicht konstitutiv exprimiert, sondern ist durch entsprechende Stimulation induzierbar. Für die COX-2-Expression konnte gezeigt werden, dass sie abhängig vom Stimulus und vom Zellsystem über die MAPK-Signalwege p38, ERK und SAPK/JNK reguliert wird (98, 213, 266). Im COX-2-Promotor befindet sich unter anderem ein CRE-Element, was durch Bindung von CREB aktiviert werden kann, und eine Ets-Bindungsstelle, die z.B. durch Elk-1 aktiviert werden kann. Außerdem wurde ein NF κ B-abhängiger Signalweg beschrieben (267). In den mH₁R-transfizierten Zellen wurde die COX-2-Expression nach Stimulation mit Histamin leicht, wegen der starken Streuung der Werte jedoch nicht signifikant erhöht (Daten siehe Anhang VI). Mit dem ERK-Inhibitor konnte eine partielle Reduktion der COX-2-Expression erzielt werden und nach Inkubation mit allen Inhibitoren in Kombination konnte das Basalniveau erreicht werden. Die COX-2-Expression scheint in diesem HEK-Zellmodell daher hauptsächlich über den ERK-Signalweg reguliert zu werden, da die anderen Inhibitoren alleine keine Wirkung zeigten. Trotzdem scheinen die anderen Signalwege auch eine geringe Beteiligung an der COX-2-Aktivierung zu haben, da das Basalniveau erst nach Inkubation mit allen vier Inhibitoren in Kombination erreicht werden konnte. Dieses Ergebnis steht nicht im Widerspruch zu dem im COX-2-Promotor nachgewiesenen CRE-Element, da bereits gezeigt werden konnte, dass eine CREB-Phosphorylierung auch über einen ERK-abhängigen Signalweg verlaufen kann (220, 296). Außerdem führt eine Aktivierung des ERK-Signalwegs zu einer Phosphorylierung von Elk-1,

was an die Ets-Sequenz im COX-2-Promotor binden kann. In den mH₄R-transfizierten Zellen konnte durch Stimulation mit Histamin keine COX-2-Expression induziert werden, obwohl im Western-Blot ebenfalls eine ERK-Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte.

Die Signalwege zwischen MAPK-Phosphorylierung und Zytokin- bzw. Enzymexpression wurden auf Transkriptionsebene weiter untersucht. Es wurde die Expression des Transkriptionsfaktors c-Fos, der an der Bildung des AP-1-Komplexes beteiligt sein kann, nach Histamin-Stimulation quantifiziert. c-Fos gehört zu der Gruppe der ‚immediate early Gene‘, die sehr schnell, aber nur transient nach der Stimulation exprimiert werden. Die Expression von c-Fos kann über drei verschiedene Signale reguliert werden (128, 236). Zum einen kann CREB nach Phosphorylierung an eine CRE-Promotorregion im c-Fos Gen binden (128, 245). Eine weitere Promotorregion im c-Fos Gen bildet das SRE-Element. Diese Region wird von einem ‚serum response factor‘ (SRF) und einem ‚ternary complex factor‘ (TCF) gebunden, die zusammen einen ternären Komplex bilden. Zu den TCF-Proteinen gehören unter anderem Elk-1, SAP 1 und SAP 2. Der TCF Elk-1 kann an seiner C-terminalen Aktivierungsdomäne von Mitgliedern der ERK 1/2-, JNK- oder p38 MAPK-Signalkaskade durch Phosphorylierung aktiviert werden (39, 91, 129, 228, 292). Die dritte Domäne im c-Fos-Promotor, die sogenannte SIE-Region, kann von einem Transkriptionsfaktorkomplex aus STAT 1 und STAT 3 aktiviert werden. Die Aktivierung von STAT erfolgt über einen Ras-abhängigen Signalweg (110). Der Transkriptionsfaktor STAT wird in Folge der Bindung von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren an Rezeptoren der Zytokinrezeptor-Superfamilie über Phosphorylierung durch Janus-Kinasen (JAK) aktiviert (122). Die Regulation der c-Fos-Expression erfolgt demnach also sowohl über die drei MAPK-Signalwege als auch über den Transkriptionsfaktor CREB. Da mittels Western-Blot nach Stimulation mit Histamin sowohl über den mH₁R als auch über den mH₄R eine Phosphorylierung der MAPK-Signalwege und des Transkriptionsfaktor CREB nachgewiesen werden konnte, war zu erwarten, dass eine Histamin-Stimulation eine vermehrte Expression von c-Fos bewirken würde. In den mH₁R-transfizierten Zellen konnte ein deutlicher Anstieg der c-Fos-Expression nachgewiesen werden, der allerdings weder durch die MAPK-Inhibitoren, noch durch den CREB-Inhibitor signifikant reduziert wurde. Eine leichte, jedoch nicht statistisch signifikante Reduktion konnte nur mit dem ERK-Inhibitor PD 980598 erzielt werden. Die Aktivierung über den ERK-Signalweg scheint also nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da die Expression nicht auf den Basalwert reduziert werden konnte. Das Ergebnis zeigt, dass die Expression von c-Fos nach Histamin-Stimulation scheinbar noch über ein anderes Signal als über die MAPK-

Signalwege und CREB aktiviert werden kann. In den mH₄R-transfizierten Zellen blieb die c-Fos-Expression nach Stimulation dagegen in dem Bereich des Basalwerts. Die leichte Reduktion der c-Fos-Expression in den mH₁R-transfizierten Zellen mit dem ERK-Inhibitor, lässt sich dadurch erklären, dass eine Stimulation der ERK-Signalkaskade hauptsächlich zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 führt. Elk-1 gehört, wie oben beschrieben, zu den TCF-Proteinen und bildet zusammen mit SRF einen ternären Komplex, der an die SRE-Promotorregion im c-Fos-Gen binden kann und dadurch dessen Transkription reguliert. Es wäre allerdings ebenfalls zu erwarten gewesen, dass die erhöhte c-Fos-Expression in den mH₁R auch durch die JNK- und p38-Inhibitoren reduziert worden wäre, da eine Aktivierung dieser MAPK-Signalwege ebenfalls zu einer Phosphorylierung von Elk-1 führen kann (siehe 1.4.1, 1.4.2, 1.4.3). Außerdem wäre eine Reduktion der c-Fos-Expression durch den CREB-Inhibitor zu erwarten gewesen, da in den mH₁R-transfizierten Zellen ein deutlicher cAMP-Anstieg und eine Phosphorylierung von CREB nachgewiesen werden konnte. Hill et al. (110) konnten dagegen zeigen, dass Serum die c-Fos-Expression induzieren kann. Die in der entsprechenden Arbeit verwendeten NIH 3T3-Zellen wurden vor der Stimulation für 36 h in Resting-Medium mit nur 0,5 % FCS kultiviert und anschließend mit 15 % FCS stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die serumvermittelte c-Fos-Expression zum einen über die SRE-Promotorregion erfolgen konnte, wobei hierfür sowohl ein ERK-abhängiger Weg als auch eine direkte Aktivierung des SRF unabhängig von TCF-Proteinbindung beschrieben wurde. Zum anderen kann die erhöhte Expression auch über die SIE-Promotorregion vermittelt werden, wobei nach Stimulation mit Serum allerdings keine vermehrte DNA-Bindung von STAT nachzuweisen war (110). In den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen wurden die stabil transfizierten HEK-Zellen kontinuierlich in einem Medium mit 10 % FCS kultiviert, welches auch während der Stimulation mit Histamin nicht gewechselt wurde. Der Effekt von Serum auf die c-Fos-Expression sollte eigentlich durch den Vergleich mit dem Basalwert, für den die Zellen ebenfalls mit 10 % FCS enthaltenem Medium kultiviert und nicht stimuliert wurden, abgedeckt sein. Eine mögliche Erklärung dafür, dass mit den MAPK- und CREB-Inhibitoren keine Effekte detektiert werden konnten, wäre allerdings, dass die Stimulation mit dem Serum, die über einen MAPK- und CREB- unabhängigen Weg abläuft, effektiver ist als die MAPK- und CREB-vermittelte Inhibition und dadurch der Einfluss der Inhibitoren nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Um diese Vermutung genauer zu untersuchen, sollte die Analyse der c-Fos-Expression in den HEK-Zelllinien nach Kultivierung der Zellen mit verminderten FCS-Konzentration wiederholt werden und der Effekt von Serum auch auf die

Expression der anderen, in dieser Arbeit untersuchten Gene analysiert werden. Außerdem wurde die c-Fos-Expression bei Hill et al. (110) 30 min nach Stimulation gemessen und eine maximale c-Fos-Expression konnte nach 15 bis 30 min nach Stimulation nachgewiesen werden, die bei längerer Stimulationszeit wieder abnahm (95). In dieser Arbeit konnte eine maximale c-Fos-Expression erst nach einer Stimulation von 4 h detektiert werden (Daten nicht gezeigt), weshalb die weiteren Versuche mit den Inhibitoren ebenfalls in diesem Zeitintervall durchgeführt wurden. Diese zeitlich verschobene Expression könnte darin begründet sein, dass die c-Fos-Expression nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen unterschiedlich schnell abläuft. In den bereits veröffentlichten Daten wurde meist die Stimulation mit IL-1, TNF- α , LPS oder Serum untersucht. Der Effekt einer Stimulation mit Histamin auf die c-Fos-Expression wurde bisher nicht analysiert. Die zeitlich versetzte Expression könnte allerdings auch ein Hinweis darauf sein, dass Sekundäreffekte zum Tragen kommen und die c-Fos-Expression nicht direkt durch die Stimulation mit Histamin induziert wurde, sondern durch einen anderen Mediator, der durch die Histamin-Stimulation reguliert wird. Unklar bleibt allerdings, warum über Stimulation des mH₄R, bei der ebenfalls eine Phosphorylierung von Komponenten des MAPK-Signalwegs nachgewiesen wurde, keine vermehrte c-Fos-Expression detektiert werden konnte.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, EGR-1, der ebenfalls zu der Familie der ‚immediate early Gene‘ gehört, wurde in Abhängigkeit von Histamin-Stimulation quantifiziert. Der EGR-1-Promotor enthält mehrere SRE-Regionen, an die SRF und TCFs wie Elk-1 binden und einen ternären Komplex bilden können (99). Die Aktivierung von Elk-1 wird durch Phosphorylierung über den ERK- und den JNK-Signalweg vermittelt (293). Für die EGR-1-Transkription konnte allerdings gezeigt werden, dass vor allem die Elk-1-Aktivierung, die über den ERK-Signalweg vermittelt wird, eine Rolle spielt (276). In der EGR-1-Promotorregion befindet sich ebenfalls ein CRE-Element. Es konnte jedoch beschrieben werden, dass eine Stimulation mit dem Adenylzyklaseaktivator Forskolin keine erhöhte Transkription von EGR-1 induzierte (194). Es scheint also keine cAMP-vermittelte EGR-1-Transkription über die CRE-Promotorregion abzulaufen (276). Rolli et al. (238) konnten dagegen zeigen, dass CREB und ATF-1 an diese Region binden, die vorher von MAPKAPK und MSK-1 über einen p38 MAPK-abhängigen Signalweg aktiviert wurden. EGR-1 reguliert eine Reihe von biologischen Prozessen und spielt auch in Entzündungsreaktionen eine entscheidende Rolle. Es kann direkt über Interaktion mit den entsprechenden Promotorregionen die Expression von Zytokinen wie IL-6, IL-8, CCL-2, TNF- α und MCP-1

induzieren (113, 219, 302). In den mH₁R-transfizierten Zellen war nach Stimulation mit Histamin ein deutlicher Anstieg der EGR-1-Expression zu erkennen. Eine leichte, jedoch nicht signifikante Reduktion der EGR-1-Expression konnte mit dem JNK-Inhibitor SP 600125 erzielt werden. Dies war so nicht zu erwarten, da in den mH₁R-transfizierten Zellen im Western-Blot keine JNK-Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise ist die Phosphorylierung so gering, dass sie auf Proteinebene nicht detektiert werden konnte, aber ausreichend, um Substratmoleküle zu aktivieren und dadurch die EGR-1-Expression zu induzieren. Durch Inhibition des MEK-ERK-Signalwegs mit PD 980598 konnte die EGR-1-Expression dagegen deutlich reduziert werden, auch wenn der Wert etwas über dem unstimulierten Basalwert lag. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen von Whitmarsh et al. (293), die ebenfalls eine EGR-1 Induktion über ERK und JNK nachweisen konnten. Außerdem wird die Aussage von Thiel et al. (276) bestätigt, die nachweisen konnten, dass hauptsächlich eine Aktivierung des ERK-Signalwegs an der EGR-1-Transkription beteiligt ist. Eine vollständige Inhibition der EGR-1-Expression konnte in den mH₁R-transfizierten Zellen nur erzielt werden, wenn die Zellen vor der Histamin-Stimulation mit allen Inhibitoren in Kombination vorinkubiert wurden, also der ERK- und der JNK-Signalweg gleichzeitig inhibiert wurden. Der p38-Inhibitor SB 203580 hatte keinen Einfluss auf die Histamin-induzierte EGR-1-Expression in den mH₁R-transfizierten Zellen, obwohl von Rolli et al. (238) ein p38-abhängiger Signalweg für die EGR-1 Induktion beschrieben wurde. Eine zweifach erhöhte EGR-1-Expression konnte nach Histamin-Stimulation auch in den mH₄R-transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Diese konnte ebenfalls mit dem JNK-Inhibitor leicht und mit dem ERK-Inhibitor signifikant reduziert werden. Der p38-Inhibitor bewirkte unerwarteterweise eine Induktion der EGR-1-Expression und nicht eine Abnahme, wie in der Literatur beschrieben. Fraglich ist auch, warum die EGR-1-Expression in den mH₄R-transfizierten Zellen viel geringer ausfällt als in den mH₁R-transfizierten Zellen, obwohl über beide Rezeptoren nach Stimulation mit Histamin eine ERK-Phosphorylierung und in den mH₄R-transfizierten Zellen zusätzlich eine JNK-Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte. Eine Stimulation mit Histamin könnte in den mH₄R-transfizierten Zellen möglicherweise die Expression eines Faktors initiieren, der nicht nur die EGR-1-Expression, sondern auch die c-Fos-, COX-2- und IL-8-Expression inhibieren kann. Diese Inhibition scheint für c-Fos, COX-2 und IL-8 komplett MAPK-unabhängig zu sein. Die Inhibition der EGR-1-Expression scheint zum Teil p38 MAPK-vermittelt zu sein, da durch den p38-Inhibitor ein leichter Anstieg der EGR-1-Expression nachgewiesen werden konnte. Allerdings

ist die EGR-1-Expression auch nach Zugabe des p38-Inhibitors wesentlich geringer als die Expression, die in den mH₁R-transfizierten Zellen nach Histamin-Stimulation detektiert werden konnte.

Über die Expression von EGR-1 in den mH₁R-transfizierten Zellen könnte die Vermutung erklärt werden, dass c-Fos vermutlich nicht direkt durch die Histamin-Stimulation aktiviert wird, sondern in einem Zwischenschritt ein weiterer Mediator gebildet wird. Ein solcher Mediator könnte z.B. TNF- α sein, welches zu den Genen gehört, die nach Aktivierung am schnellsten transkribiert werden (280). Im TNF- α -Promotor konnten sowohl eine Region nachgewiesen werden, die EGR-1 bindet, als auch ein CRE-Element, das cAMP- und calciumabhängig aktiviert wird (280, 302). Daher wäre es möglich, dass es über die vermehrte Transkription von EGR-1 und die erhöhte [Ca²⁺]_i und cAMP-Konzentration nach Stimulation mit Histamin in den mH₁R-transfizierten Zellen zu einer erhöhten Konzentration an TNF- α in den Zellkulturüberständen kam. TNF- α könnte nach Bindung an seinen Rezeptor über eine Aktivierung eines JAK- und STAT-vermittelten Signalwegs zu einer MAPK-unabhängigen Aktivierung der SIE-Region im c-Fos-Promotor führen. Auf diese Weise könnte über diesen Zwischenschritt erklärt werden, warum die c-Fos-Expression in diesem Zellmodell erst nach 4 h ihr Maximum erreicht. Außerdem würde diese Vermutung eine mögliche Erklärung dafür geben, dass die c-Fos-Expression nur leicht, aber nicht signifikant durch den ERK-Inhibitor reduziert werden kann. Zwar wird in den mH₁R-transfizierten Zellen nach Inkubation mit dem ERK-Inhibitor weniger EGR-1 exprimiert, aber vielleicht reicht eine geringere Menge an EGR-1 aus, um eine maximale TNF- α -Sekretion hervorzurufen, oder eine geringere TNF- α -Konzentration ist ausreichend, um eine maximale c-Fos-Expression zu initiieren. Außerdem könnte TNF- α in den mH₁R-transfizierten Zellen ebenfalls MAPK-unabhängig über die nach Histamin-Stimulation erhöhte [Ca²⁺]_i und cAMP-Konzentration induziert werden. In den mH₄R-transfizierten Zellen reicht ein zweifacher Anstieg der EGR-1-Expression nach Histamin-Stimulation und auch der leichte Anstieg durch den p38-Inhibitor vermutlich nicht aus, um eine TNF- α - und darüber hinaus eine c-Fos-Expression zu induzieren. Um diese Hypothese zu verifizieren, sollte in weiteren Versuchen TNF- α in den Zelllinien nach Stimulation mit Histamin auf mRNA- und auf Proteinebene nachgewiesen werden. Außerdem müsste die Verwendung selektiver TNF- α -Inhibitoren die c-Fos-Expression deutlich inhibieren.

In den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen konnte durch Stimulation mit Histamin ähnlich wie in den mH₁R-transfizierten Zellen vermehrt EGR-1 exprimiert werden. Die EGR-1-Expression

konnte durch den JNK-Inhibitor und durch den CREB-Inhibitor um etwa die Hälfte reduziert werden. Mit dem ERK-Inhibitor konnte eine deutliche Reduktion nachgewiesen werden, die allerdings den Basalwert nicht erreichte. Eine Inkubation mit allen Inhibitoren in Kombination konnte die EGR-1-Expression nicht weiter bis auf den Basalwert absenken. Ein Grund dafür könnte die induzierte EGR-1-Expression sein, die nach Inkubation mit dem p38-Inhibitor in den mH₄R-transfizierten Zellen nachgewiesen werden konnte. Diese ist in den nur mit dem p38-Inhibitor behandelten mH_{1/4}R-transfizierten Zellen, durch die starke Induktion der EGR-1-Expression über den mH₁R, nicht zu erkennen. In den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen scheinen also bezüglich der EGR-1-Expression Effekte über den mH₁R und über den mH₄R zum Tragen zu kommen. Um den Anteil des jeweiligen Rezeptors an der EGR-1-Expression in den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen ausmachen zu können, sollten in nachfolgenden Versuchen selektive Agonsiten und Antagonisten für den H₁R und den H₄R eingesetzt und die Genexpression auf gleiche Weise analysiert werden. Allgemein wird hier deutlich, wie auch schon in den funktionellen Analysen gezeigt werden konnte, dass in den mH_{1/4}R-transfizierten Zellen die über den mH₁R vermittelten Effekte überwiegen. Eventuell könnten diese Effekte durch eine unterschiedliche Rezeptordichte von mH₁R und mH₄R auf der Zelloberfläche zustande kommen. Die Wahrscheinlichkeit hierfür ist allerdings nicht sehr hoch, da in durchflusszytometrischen Analysen eine ähnliche Expressionsdichte nachgewiesen wurde. Eine andere Erklärung könnte sein, dass der mH₁R in den HEK-Zellen effektiver an sein entsprechendes G-Protein koppelt als der mH₄R und dass dadurch bevorzugt die mH₁R-vermittelte Signaltransduktion abläuft. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es tatsächlich zu einer Interaktion innerhalb der beiden Signalwege kommt, die die mH₄R-vermittelte Signaltransduktion inhibiert und vorrangig die mH₁R-vermittelten Signalwege ablaufen lässt. Nach den Genexpressionsanalysen lässt sich zusammenfassen, dass es nach Stimulation über den mH₁R zu einer AP-1- und Elk-1-vermittelten Genexpression kommt, die hauptsächlich über den ERK-Signalweg reguliert wird. Es konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von Faktoren die Signaltransduktion beeinflussen und auf unterschiedliche Art und Weise interagieren. Das untersuchte Zellsystem und der verwendete Stimulus spielen eine entscheidende Rolle bei der Entscheidung, welche Signalwege in der entsprechenden Zelle angeschaltet werden. Um diese Signalwege noch genauer zu untersuchen, könnten auf ähnliche Weise weitere Mediatoren und Transkriptionsfaktoren analysiert werden. Außerdem könnten spezifische Mutanten hergestellt werden, in denen einzelne Signalmoleküle funktionslos sind. Auf diese Weise könnte die Beteiligung des entsprechenden Moleküls an

der Signaltransduktion analysiert werden. Außerdem könnten neben IL-8 weitere Zytokine und Signalmoleküle nicht nur auf RNA, sondern auch auf Proteinebene nachgewiesen werden, die nach Stimulation mit Histamin möglicherweise induziert werden. Die Genexpression könnte ebenfalls unter Verwendung verschiedener H₁R- und H₄R-Agonisten und Antagonisten untersucht werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit verwendeten stabil transfizierten HEK-Zelllinien ein gutes Modell darstellen, um die mH₁R- und mH₄R-vermittelte Signaltransduktion und mögliche Interaktionen zu untersuchen. Dennoch muss man sich hierbei im Klaren darüber sein, dass es sich nur um ein Zellmodell handelt, das zwar die Wirkung einer Substanz in dieser einen Zelle wiedergeben kann, aber nicht die komplexen Vorgänge widerspiegelt, die sich im Organismus durch Interaktion vieler verschiedener Zellpopulationen abspielen.

4.3. Spezifität von H₄R-Antikörpern

In dieser Arbeit wurde die Spezifität von drei unterschiedlichen kommerziell erhältlichen H₄R-Antikörpern in verschiedenen Zellsystemen und anhand verschiedener Parameter untersucht. Diese Antikörper wurden durch Immunisierung mit Peptiden hergestellt, die der Sequenz intrazellulärer Bereiche des H₄R entsprachen. Die beiden Antikörper der Firma Santa Cruz sc M120 und sc H110 waren gegen sehr ähnliche Peptide gerichtet, die sich nur in der Sequenzlänge unterschieden, weshalb ein sehr ähnliches Verhalten erwartet wurde. Die für die Immunisierung verwendeten Peptide waren allerdings relativ lang. Dadurch sollte theoretisch die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, Antiseren zu erhalten, die das entsprechende komplette Protein in voller Länge erkennen. Denn auf diese Weise sollte die Anzahl an verschiedenen Antikörpern, die in den Antiseren enthalten sind, erhöht sein. Trotzdem ergibt sich bei Proteinen, die in die Zellmembran integriert sind, die Schwierigkeit, dass ihre Sekundär- und Tertiärstruktur durch Interaktionen mit anderen Membrankomponenten beeinflusst werden kann, sodass sich dadurch andere Epitope ergeben, als ein entsprechendes lösliches Peptid aufweist. Für die in dieser Arbeit untersuchten Antikörper wurde in den Datenblättern die Reaktivität gegenüber dem humanen H₄R beschrieben. Nur für den anti-H₄R sc M120 wurde angegeben, dass er zusätzlich den Maus- und den Rattenrezeptor erkennen kann. Für die beiden Antikörper der Firma Santa Cruz, M 120 und H 110, ist angegeben, dass sie für die Anwendung im Western-Blot, für

Immunpräzipitation, Immunfluoreszenz und ELISA geeignet sind. Für andere Verwendungen wurden die Antikörper laut Herstellerangaben nicht getestet. Der ab 13183 Antikörper der Firma Abcam wurde nur in immunhistologischen Untersuchungen an in Formalin/Paraformalin-fixierten und in Paraffin eingebettetem Gewebe geprüft.

In dieser Arbeit wurden mit den drei verschiedenen H₄R-Antikörpern sowohl durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt, als auch ihre Spezifität in Western-Blot Analysen überprüft. In durchflusszytometrischen Analysen an mit Baculoviren infizierten Sf9-Zellen und transfizierten HEK293-Zellen konnte die Expression des kompletten H₄R-Proteins vom N-Terminus bis zum C-Terminus mithilfe des Flag- und des His⁶-Antikörpers nachgewiesen werden. Die Färbung mit dem Flag- und dem His⁶-Antikörper konnte neben dem Rezeptornachweis dazu verwendet werden, das extra- und intrazelluläre Färbeprotokoll zu überprüfen. Im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen zeigten die mit dem Flag- bzw. His⁶-Antikörper gefärbten H₄R-infizierten/transfizierten Zellen eine deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität. Durch die Infektion/Transfektion ergaben sich zwei Zellpopulationen, eine mit der Fluoreszenzintensität von uninfizierten/untransfizierten Zellen, die folglich den rekombinanten Rezeptor nicht exprimierten, und eine zweite mit erhöhter Fluoreszenzintensität, die das gewünschte Rezeptorprotein exprimierten.

Die Zellen, die mit den H₄R-Antikörpern gefärbt wurden, zeigten ebenfalls eine erhöhte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den mit der Isotyp-Kontrolle gefärbten Zellen oder ungefärbten Kontrollzellen. Dieser Anstieg war allerdings unabhängig von dem infizierten bzw. transfizierten Rezeptor, da ein annähernd identisches Signal sowohl in den mH₄R-, den hH₄R- oder den hH₃R-exprimierenden Zellen, ebenso wie in den Kontrollzellen auftrat. Außerdem kam es nach Färbung mit den H₄R-Antikörpern zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität in der gesamten Zellpopulation und nicht, wie mit dem Flag- und His⁶-Antikörper gezeigt werden konnte, zu zwei getrennten Populationen von infizierten/transfizierten und uninfizierten/untransfizierten Zellen. Ein ähnliches Ergebnis ergab sich bei der Analyse von Milzzellen von Wildtyp-Mäusen und H₄R^{-/-}-Mäusen und nach der Färbung von humanen B-Zellen verglichen mit anderen Leukozyten. B-Zellen exprimieren laut Literatur keinen H₄R, während der H₄R auf anderen Leukozyten auf RNA-Ebene nachgewiesen werden konnte (115). Auch hier wurde die gesamte Leukozytenpopulation von den H₄R-Antikörpern gefärbt, unabhängig davon, ob sie den H₄R exprimieren oder nicht.

In Western-Blot-Analysen zeigte keine der mit den H₄R-Antikörpern nachgewiesenen Banden die erwartete Größe des H₄R, die mit dem Flag-Antikörper detektiert werden konnte. Beim Vergleich der Western-Blot-Ergebnisse in den beiden unterschiedlichen Zelllinien traten nach Färbung mit den H₄R-Antikörpern deutlich Unterschiede auf. Die infizierten Sf9-Membranen zeigten in den Western-Blot-Analysen nur sehr schwache Banden, während die HEK293-Lysate sehr viele deutliche Banden aufwiesen, obwohl vergleichbare Proteinmengen und Expositionszeiten verwendet wurden. Die reduzierte Anzahl von Hintergrundbanden in den Sf9-Zellen könnte in dem verwendeten Expressionssystem begründet sein. Möglicherweise traten weniger Kreuzreaktivitäten mit Membranbestandteilen aus Sf9-Insektenzellen auf. Außerdem handelte es sich hier um aufgereinigte Membranfraktionen und nicht um totale Zelllysate, wie dies bei den HEK293-Zellen der Fall war. Daher könnten diese Banden in den HEK293-Zelllysaten durch eine Kreuzreaktivität mit zytosolischen Proteinen zustande kommen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle diese Ergebnisse zeigen, dass die Signale, die mit den H₄R-Antikörpern detektiert werden konnten, nicht aus spezifischer Bindung an den Rezeptor resultieren, sondern auf unspezifische Bindung an andere Zellbestandteile zurückzuführen sind. Demzufolge sind die drei in dieser Arbeit untersuchten H₄R-Antikörper zum spezifischen Nachweis des H₄R weder in der nativen (Durchflusszytometrie) noch in der denaturierten Form (SDS-PAGE) brauchbar.

In den meisten Publikationen werden Antikörper-Färbungen nur mit dem entsprechenden Ig-Isotyp oder durch Präabsorption mit dem Peptid, gegen das der Antikörper gerichtet ist, als einzige Kontrollen durchgeführt (36, 64). Diese Kontrollen würden auch in dieser Arbeit die Aussage zulassen, dass die Antikörper den Rezeptor spezifisch erkennen, da in den durchflusszytometrischen Untersuchungen die Fluoreszenzintensität in den Kontrollen niedriger war, als in den mit Antikörper gefärbten Zellen. Allerdings trat diese erhöhte Fluoreszenzintensität, wie oben diskutiert, ebenfalls in uninfizierten/untransfizierten Zellen oder in Zellen von H₄R^{-/-}-Mäusen auf. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass Zellen, die den entsprechenden Rezeptor nicht exprimieren, eine wichtige und entscheidende Kontrolle sind, um die Spezifität von Antikörpern zu beurteilen, und dass einige bereits publizierte Daten, die mit den entsprechenden Antikörpern generiert wurden, aufgrund dieser Erkenntnis neu interpretiert werden müssen.

Mit den Untersuchungen der H₄R-Antikörper konnte in dieser Arbeit mit dem H₄R neben den Muskarinrezeptoren und dem β -Adrenorezeptor (225), dem α_1 -Adrenorezeptor (131) und den

Dopaminrezeptoren (21) ein weiteres Mitglied der GPCRs identifiziert werden, für das kommerziell erhältliche Antikörper keine ausreichende Selektivität und Spezifität aufweisen. Pradidarcheep et al. (224) und Michel et al. (195) haben aufgrund dieser Problematik vier Kriterien aufgestellt (siehe 1.5), von denen wenigstens eines erfüllt sein sollte, um eine ausreichende Spezifität von Antikörpern nachzuweisen. In dem ersten Kriterium wurde verlangt, dass keine Antikörper-Färbung in Zellen auftritt, die den entsprechenden Rezeptor nicht exprimieren, wie z.B. in Zellen von Knockout-Mäusen. Dieses Kriterium wurde in dieser Arbeit in doppelter Hinsicht getestet, da zum einen Zellen von $H_4R^{-/-}$ -Mäusen gefärbt wurden und zum anderen uninfizierte/untransfizierte Zellen als Kontrollen mitgeführt wurden. Allerdings konnte in beiden Fällen nur eine fehlende Spezifität der H_4R -Antikörper nachgewiesen werden. Das zweite Kriterium, eine deutliche Abnahme der Färbung in Zellen, in denen der Rezeptor genetisch herunterreguliert wurde (z.B. durch siRNA), wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Das dritte Spezifitätskriterium umfasst die Färbung nach Transfektion von verschiedenen GPCR-Subtypen einer entsprechenden Familie in dieselbe Zielzelllinie. Ein selektiver Antikörper würde nur den Zielrezeptor erkennen und nicht die verwandten Subtypen. In dieser Arbeit wurde ebenfalls der H_3R untersucht, der eng mit dem H_4R verwandt ist. Die untersuchten H_4R -Antikörper banden aber in gleicher Weise an die Zellen unabhängig davon, welcher Rezeptor hineintransfiziert wurde. Das vierte Kriterium, um Hinweise auf die Spezifität eines Antikörpers zu bekommen, besagt, dass nach Färbung mit verschiedenen Antikörpern gegen unterschiedliche Epitope des Rezeptors, annähernd identische Färbemuster im Western-Blot und in der Immunhistochemie auftreten sollten. Das Gleiche gilt für die zusätzliche Verwendung von Antikörpern gegen einen spezifischen Epitop-*tag* nach der Transfektion von getagten Rezeptoren (199). In dieser Arbeit wurden rekombinante Rezeptoren mit Flag- und His⁶-*tag* verwendet und die Färbung mit den H_4R -Antikörpern mit der Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen diese Epitop-*tags* verglichen, wobei sich die Färbemuster im Western-Blot und in der Durchflusszytometrie deutlich voneinander unterschieden.

In Summe wurden in dieser Arbeit also drei der vier von Pradidarcheep et al. (224) und Michel et al. (195) beschriebenen Spezifitätskriterien untersucht, von denen die zu testenden Antikörper keines erfüllt haben. Dieses ist als Beweis für die fehlende Spezifität der drei untersuchten H_4R -Antikörper zu werten.

Es sollte, wie von Pradiarcheep et al. (224) und Michel et al. (195) gefordert, „zertifizierte“ kommerziell erhältliche Antikörper und Antiseren geben, die mindestens eins der oben

beschriebenen Kriterien erfüllen, um entsprechende Spezifität zu zeigen. Eine solche Validierung sollte standardmäßig von den Antikörperherstellern durchgeführt werden und die Spezifität sollte in den Datenblättern mit geeigneten Methoden und entsprechenden Kontrollen dokumentiert werden. Wenn solche Antikörper erhältlich wären, würden zeitaufwendige und teure Validierungsversuche für den Nutzer wegfallen. Zum jetzigen Zeitpunkt lässt sich zusammenfassend sagen, dass Vorsicht geboten ist bei der Interpretation von Daten, die mit kommerziell erhältlichen Antikörpern gegen den H₄R oder andere GPCRs generiert wurden (14).

5. Literaturverzeichnis

1. **Adler, V., A. Polotskaya, F. Wagner, and A. S. Kraft.** 1992. Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity. *J Biol Chem* **267**:17001-17005.
2. **Ahn, S., S. K. Shenoy, H. Wei, and R. J. Lefkowitz.** 2004. Differential kinetic and spatial patterns of β -arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J Biol Chem* **279**:35518-35525.
3. **Ales, K., B. Wraber, and M. Lipnik-Stangelj.** 2008. The synergistic effect of histamine and IL-6 on NGF secretion from cultured astrocytes is evoked by histamine stimulation of IL-6 secretion via H_1 -receptor-PKC-MAPK signalling pathway. *Inflamm Res* **57 Suppl 1**:S33-34.
4. **Arrang, J. M., M. Garbarg, and J. C. Schwartz.** 1983. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H_3) of histamine receptor. *Nature* **302**:832-837.
5. **Bachert, C.** 2002. The role of histamine in allergic disease: re-appraisal of its inflammatory potential. *Allergy* **57**:287-296.
6. **Bagrodia, S., B. Dérijard, R. J. Davis, and R. A. Cerione.** 1995. Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* **270**:27995-27998.
7. **Bain, W. A., J. L. Broadbent, and R. P. Warin.** 1949. Comparison of anthisan (mepyramine maleate) and phenergan as histamine antagonists. *Lancet* **2**:47-52.
8. **Bakker, R. A., S. B. Schoonus, M. J. Smit, H. Timmerman, and R. Leurs.** 2001. Histamine H_1 -receptor activation of NF- κ B: roles for $G\beta\gamma$ - and $G\alpha_{q/11}$ -subunits in constitutive and agonist-mediated signaling. *Mol Pharmacol* **60**:1133-1142.
9. **Barbier, A. J., C. Berridge, C. Dugovic, A. D. Laposky, S. J. Wilson, J. Boggs, L. Aluisio, B. Lord, C. Mazur, C. M. Pudiak, X. Langlois, W. Xiao, R. Apodaca, N. I. Carruthers, and T. W. Lovenberg.** 2004. Acute wake-promoting actions of JNJ-5207852, a novel, diamine-based H_3 antagonist. *Br J Pharmacol* **143**:649-661.
10. **Barnes, P. J.** 2001. Histamine and serotonin. *Pulm Pharmacol Ther* **14**:329-339.
11. **Beasley, R., J. Crane, C. K. Lai, and N. Pearce.** 2000. Prevalence and etiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* **105**:S466-472.
12. **Beebe, S. J.** 1994. The cAMP-dependent protein kinases and cAMP signal transduction. *Semin Cancer Biol* **5**:285-294.
13. **Beermann, S., S. Glage, D. Jonigk, R. Seifert, and D. Neumann.** 2012. Opposite effects of mepyramine on JNJ7777120-induced amelioration of experimentally induced asthma in mice in sensitization and provocation. *PLoS One* **7**:e30285.
14. **Beermann, S., R. Seifert, and D. Neumann.** 2012. Commercially available antibodies against human and murine histamine H_4 -receptor lack specificity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **385**:125-135.
15. **Berner, B. D., C. S. Conner, D. R. Sawyer, and J. K. Siepler.** 1982. Ranitidine: a new H_2 -receptor antagonist. *Clin Pharm* **1**:499-509.
16. **Best, C. H., H. H. Dale, H. W. Dudley, and W. V. Thorpe.** 1927. The nature of the vaso-dilator constituents of certain tissue extracts. *J Physiol* **62**:397-417.
17. **Best, J. L., C. A. Amezcua, B. Mayr, L. Flechner, C. M. Murawsky, B. Emerson, T. Zor, K. H. Gardner, and M. Montminy.** 2004. Identification of small-molecule antagonists that inhibit an activator: coactivator interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:17622-17627.

18. **Biegański, T.** 1983. Biochemical, physiological and pathophysiological aspects of intestinal diamine oxidase. *Acta Physiol Pol* **34**:139-154.
 19. **Bissonnette, E. Y.** 1996. Histamine inhibits tumor necrosis factor alpha release by mast cells through H₂ and H₃ receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol* **14**:620-626.
 20. **Black, J. W., W. A. Duncan, C. J. Durant, C. R. Ganellin, and E. M. Parsons.** 1972. Definition and antagonism of histamine H₂ -receptors. *Nature* **236**:385-390.
 21. **Bodei, S., N. Arrighi, P. Spano, and S. Sigala.** 2009. Should we be cautious on the use of commercially available antibodies to dopamine receptors? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **379**:413-415.
 22. **Bousquet, J., P. K. Jeffery, W. W. Busse, M. Johnson, and A. M. Vignola.** 2000. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* **161**:1720-1745.
 23. **Bradding, P., Y. Okayama, P. H. Howarth, M. K. Church, and S. T. Holgate.** 1995. Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J Immunol* **155**:297-307.
 24. **Bradding, P., J. A. Roberts, K. M. Britten, S. Montefort, R. Djukanovic, R. Mueller, C. H. Heusser, P. H. Howarth, and S. T. Holgate.** 1994. Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* **10**:471-480.
 25. **Bradding, P., A. F. Walls, and S. T. Holgate.** 2006. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* **117**:1277-1284.
 26. **Bradley, J. R.** 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* **214**:149-160.
 27. **Brasier, A. R., M. Jamaluddin, A. Casola, W. Duan, Q. Shen, and R. P. Garofalo.** 1998. A promoter recruitment mechanism for tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 transcription in type II pulmonary epithelial cells. Dependence on nuclear abundance of Rel A, NF-κB1, and c-Rel transcription factors. *J Biol Chem* **273**:3551-3561.
 28. **Brighton, P. J., S. Rana, R. J. Challiss, J. C. Konje, and J. M. Willets.** 2011. Arrestins differentially regulate histamine- and oxytocin-evoked phospholipase C and mitogen-activated protein kinase signalling in myometrial cells. *Br J Pharmacol* **162**:1603-1617.
 29. **Brown, D. D., R. Tomchick, and J. Axelrod.** 1959. The distribution and properties of a histamine-methylating enzyme. *J Biol Chem* **234**:2948-2950.
 30. **Brown, R. E., and H. L. Haas.** 1999. On the mechanism of histaminergic inhibition of glutamate release in the rat dentate gyrus. *J Physiol* **515 (Pt 3)**:777-786.
 31. **Brown, R. E., D. R. Stevens, and H. L. Haas.** 2001. The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol* **63**:637-672.
 32. **Bryce, P. J., C. B. Mathias, K. L. Harrison, T. Watanabe, R. S. Geha, and H. C. Oettgen.** 2006. The H₁ histamine receptor regulates allergic lung responses. *J Clin Invest* **116**:1624-1632.
 33. **Buhl, R., D. Berdel, C. P. Criée, A. Gillissen, P. Kardos, C. Kroegel, W. Leupold, H. Lindemann, H. Magnussen, D. Nowak, D. Pfeiffer-Kascha, K. Rabe, M. Rolke, G. Schultze-Werninghaus, H. Sitter, D. Ukena, C. Vogelmeier, T. Welte, R. Wettengel, and H. Worth.** 2006. [Guidelines for diagnosis and treatment of asthma patients]. *Pneumologie* **60**:139-177.
 34. **Busse, W. W., and R. F. Lemanske.** 2001. Asthma. *N Engl J Med* **344**:350-362.
 35. **Bylund, D. B., and M. L. Toews.** 2011. Radioligand binding methods for membrane preparations and intact cells. *Methods Mol Biol* **746**:135-164.
-

36. **Bäumer, W., S. Wendorff, R. Gutzmer, T. Werfel, D. Dijkstra, P. Chazot, H. Stark, and M. Kietzmann.** 2008. Histamine H₄ receptors modulate dendritic cell migration through skin-immunomodulatory role of histamine. *Allergy* **63**:1387-1394.
37. **Cammarota, M., L. R. Bevilaqua, J. A. Rostas, and P. R. Dunkley.** 2003. Histamine activates tyrosine hydroxylase in bovine adrenal chromaffin cells through a pathway that involves ERK1/2 but not p38 or JNK. *J Neurochem* **84**:453-458.
38. **Carbonetti, N. H.** 2010. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol* **5**:455-469.
39. **Cavigelli, M., F. Dolfi, F. X. Claret, and M. Karin.** 1995. Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J* **14**:5957-5964.
40. **Chand, N., and P. Eyre.** 1978. Histamine receptors of airway smooth muscle of ferret and rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **21**:55-65.
41. **Chang, L., and M. Karin.** 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**:37-40.
42. **Chen, H. J., M. Rojas-Soto, A. Oguni, and M. B. Kennedy.** 1998. A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron* **20**:895-904.
43. **Chen, Z., T. B. Gibson, F. Robinson, L. Silvestro, G. Pearson, B. Xu, A. Wright, C. Vanderbilt, and M. H. Cobb.** 2001. MAP kinases. *Chem Rev* **101**:2449-2476.
44. **Chrivia, J. C., R. P. Kwok, N. Lamb, M. Hagiwara, M. R. Montminy, and R. H. Goodman.** 1993. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**:855-859.
45. **Cianchi, F., C. Cortesini, N. Schiavone, F. Perna, L. Magnelli, E. Fanti, D. Bani, L. Messerini, V. Fabbroni, G. Perigli, S. Capaccioli, and E. Masini.** 2005. The role of cyclooxygenase-2 in mediating the effects of histamine on cell proliferation and vascular endothelial growth factor production in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **11**:6807-6815.
46. **Coso, O. A., M. Chiariello, J. C. Yu, H. Teramoto, P. Crespo, N. Xu, T. Miki, and J. S. Gutkind.** 1995. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**:1137-1146.
47. **Cuevas, B. D., A. N. Abell, and G. L. Johnson.** 2007. Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene* **26**:3159-3171.
48. **Dahlberg, P. E., and W. W. Busse.** 2009. Is intrinsic asthma synonymous with infection? *Clin Exp Allergy* **39**:1324-1329.
49. **Dale, H. H., and P. P. Laidlaw.** 1910. The physiological action of β -iminazolyethylamine. *J Physiol* **41**:318-344.
50. **Daly, M. J., J. M. Humphray, and R. Stables.** 1981. Some in vitro and in vivo actions of the new histamine H₂-receptor antagonist, ranitidine. *Br J Pharmacol* **72**:49-54.
51. **Dan, I., N. M. Watanabe, and A. Kusumi.** 2001. The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol* **11**:220-230.
52. **Dandekar, R. D., and M. M. Khan.** 2012. Involvement of histamine receptors in SAPK/JNK phosphorylation. *Int Immunopharmacol* **13**:190-196.
53. **Davis, R. J.** 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**:239-252.
54. **De Bie, J. J., P. A. Henricks, W. W. Cruikshank, G. Hofman, E. H. Jonker, F. P. Nijkamp, and A. J. Van Oosterhout.** 1998. Modulation of airway hyperresponsiveness and eosinophilia by selective histamine and 5-HT receptor antagonists in a mouse model of allergic asthma. *Br J Pharmacol* **124**:857-864.

55. **de Esch, I. J., R. L. Thurmond, A. Jongejan, and R. Leurs.** 2005. The histamine H₄ receptor as a new therapeutic target for inflammation. *Trends Pharmacol Sci* **26**:462-469.
56. **de Rooij, J., F. J. Zwartkruis, M. H. Verheijen, R. H. Cool, S. M. Nijman, A. Wittinghofer, and J. L. Bos.** 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**:474-477.
57. **de Sousa Abreu, R., L. O. Penalva, E. M. Marcotte, and C. Vogel.** 2009. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst* **5**:1512-1526.
58. **Deak, M., A. D. Clifton, L. M. Lucocq, and D. R. Alessi.** 1998. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J* **17**:4426-4441.
59. **DeFea, K. A., J. Zalevsky, M. S. Thoma, O. Déry, R. D. Mullins, and N. W. Bunnnett.** 2000. β -arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* **148**:1267-1281.
60. **Defer, N., M. Best-Belpomme, and J. Hanoune.** 2000. Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**:F400-416.
61. **Delvalle, J., L. Wang, I. Gantz, and T. Yamada.** 1992. Characterization of H₂ histamine receptor: linkage to both adenylyl cyclase and [Ca²⁺]_i signaling systems. *Am J Physiol* **263**:G967-972.
62. **Desai, P., and R. L. Thurmond.** 2011. Histamine H₄ receptor activation enhances LPS-induced IL-6 production in mast cells via ERK and PI3K activation. *Eur J Immunol* **41**:1764-1773.
63. **Diebel, L. N., D. M. Liberati, and L. Hall-Zimmerman.** 2011. H₂ blockers decrease gut mucus production and lead to barrier dysfunction in vitro. *Surgery* **150**:736-743.
64. **Dijkstra, D., H. Stark, P. L. Chazot, F. C. Shenton, R. Leurs, T. Werfel, and R. Gutzmer.** 2008. Human inflammatory dendritic epidermal cells express a functional histamine H₄ receptor. *J Invest Dermatol* **128**:1696-1703.
65. **Dohlsten, M., G. Hedlund, H. O. Sjögren, and R. Carlsson.** 1988. Inhibitory effects of histamine on interleukin 2 and gamma interferon production of different human T helper cell subsets. *Scand J Immunol* **28**:727-733.
66. **Donaldson, J., A. M. Brown, and S. J. Hill.** 1989. Temporal changes in the calcium-dependence of the histamine H₁-receptor-stimulation of cyclic AMP accumulation in guinea-pig cerebral cortex. *Br J Pharmacol* **98**:1365-1375.
67. **Dong, C., R. J. Davis, and R. A. Flavell.** 2002. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* **20**:55-72.
68. **Douwes, J., S. Cheng, N. Travier, C. Cohet, A. Niesink, J. McKenzie, C. Cunningham, G. Le Gros, E. von Mutius, and N. Pearce.** 2008. Farm exposure in utero may protect against asthma, hay fever and eczema. *Eur Respir J* **32**:603-611.
69. **Dumitru, C. A., M. K. Fechner, T. K. Hoffmann, S. Lang, and S. Brandau.** 2012. A novel p38-MAPK signaling axis modulates neutrophil biology in head and neck cancer. *J Leukoc Biol* **91**:591-598.
70. **Dunford, P. J., N. O'Donnell, J. P. Riley, K. N. Williams, L. Karlsson, and R. L. Thurmond.** 2006. The histamine H₄ receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4⁺ T cells. *J Immunol* **176**:7062-7070.
71. **Dunford, P. J., K. N. Williams, P. J. Desai, L. Karlsson, D. McQueen, and R. L. Thurmond.** 2007. Histamine H₄ receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus. *J Allergy Clin Immunol* **119**:176-183.

72. **Durant, G. J., C. R. Ganellin, and M. E. Parsons.** 1975. Chemical differentiation of histamine H₁- and H₂-receptor agonists. *J Med Chem* **18**:905-909.
73. **Durrant, D. M., and D. W. Metzger.** 2010. Emerging roles of T helper subsets in the pathogenesis of asthma. *Immunol Invest* **39**:526-549.
74. **Dy, M., A. Arnould, F. M. Lemoine, F. Machavoine, H. Ziltener, and E. Schneider.** 1996. Hematopoietic progenitors and interleukin-3-dependent cell lines synthesize histamine in response to calcium ionophore. *Blood* **87**:3161-3169.
75. **English, J. M., C. A. Vanderbilt, S. Xu, S. Marcus, and M. H. Cobb.** 1995. Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms. *J Biol Chem* **270**:28897-28902.
76. **Esbenshade, T. A., C. H. Kang, K. M. Krueger, T. R. Miller, D. G. Witte, J. M. Roch, J. N. Masters, and A. A. Hancock.** 2003. Differential activation of dual signaling responses by human H₁ and H₂ histamine receptors. *J Recept Signal Transduct Res* **23**:17-31.
77. **Estelle, F., and R. Simons.** 1999. H₁-receptor antagonists: safety issues. *Ann Allergy Asthma Immunol* **83**:481-488.
78. **Farnsworth, C. L., N. W. Freshney, L. B. Rosen, A. Ghosh, M. E. Greenberg, and L. A. Feig.** 1995. Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF. *Nature* **376**:524-527.
79. **Fleming, I., B. Fisslthaler, S. Dimmeler, B. E. Kemp, and R. Busse.** 2001. Phosphorylation of Thr⁴⁹⁵ regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* **88**:E68-75.
80. **Francis, H., S. Glaser, S. Demorrow, E. Gaudio, Y. Ueno, J. Venter, D. Dostal, P. Onori, A. Franchitto, M. Marzioni, S. Vaculin, B. Vaculin, K. Katki, M. Stutes, J. Savage, and G. Alpini.** 2008. Small mouse cholangiocytes proliferate in response to H₁ histamine receptor stimulation by activation of the IP₃/CaMK I/CREB pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**:C499-513.
81. **Fukui, H., K. Fujimoto, H. Mizuguchi, K. Sakamoto, Y. Horio, S. Takai, K. Yamada, and S. Ito.** 1994. Molecular cloning of the human histamine H₁ receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* **201**:894-901.
82. **Fukunaga, R., and T. Hunter.** 1997. MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J* **16**:1921-1933.
83. **Galli, S. J., M. Tsai, and A. M. Piliponsky.** 2008. The development of allergic inflammation. *Nature* **454**:445-454.
84. **Gantner, F., K. Sakai, M. W. Tusche, W. W. Cruikshank, D. M. Center, and K. B. Bacon.** 2002. Histamine h₄ and h₂ receptors control histamine-induced interleukin-16 release from human CD8⁺ T cells. *J Pharmacol Exp Ther* **303**:300-307.
85. **Gantz, I., G. Munzert, T. Tashiro, M. Schäffer, L. Wang, J. DelValle, and T. Yamada.** 1991. Molecular cloning of the human histamine H₂ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **178**:1386-1392.
86. **Gantz, I., M. Schäffer, J. DelValle, C. Logsdon, V. Campbell, M. Uhler, and T. Yamada.** 1991. Molecular cloning of a gene encoding the histamine H₂ receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:5937.
87. **Garbarg, M., and 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.

88. **Garcia, J., B. Lemercier, S. Roman-Roman, and G. Rawadi.** 1998. A Mycoplasma fermentans-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 and NF-kappaB activity and cytokine secretion in macrophages via the activation of mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* **273**:34391-34398.
89. **Gbahou, F., L. Vincent, M. Humbert-Claude, J. Tardivel-Lacombe, C. Chabret, and J. M. Arrang.** 2006. Compared pharmacology of human histamine H₃ and H₄ receptors: structure-activity relationships of histamine derivatives. *Br J Pharmacol* **147**:744-754.
90. **Georas, S. N., M. C. Liu, W. Newman, L. D. Beall, B. A. Stealey, and B. S. Bochner.** 1992. Altered adhesion molecule expression and endothelial cell activation accompany the recruitment of human granulocytes to the lung after segmental antigen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol* **7**:261-269.
91. **Gille, H., T. Strahl, and P. E. Shaw.** 1995. Activation of ternary complex factor Elk-1 by stress-activated protein kinases. *Curr Biol* **5**:1191-1200.
92. **Gilman, A. G.** 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* **56**:615-649.
93. **Goodman, R. H.** 1990. Regulation of neuropeptide gene expression. *Annu Rev Neurosci* **13**:111-127.
94. **Gottwald, T., S. Coerper, M. Schäffer, G. Köveker, and R. H. Stead.** 1998. The mast cell-nerve axis in wound healing: a hypothesis. *Wound Repair Regen* **6**:8-20.
95. **Greenberg, M. E., A. L. Hermanowski, and E. B. Ziff.** 1986. Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of c-fos, c-myc, and actin gene transcription. *Mol Cell Biol* **6**:1050-1057.
96. **Grossman, M. I., J. H. Kurata, J. I. Rotter, J. H. Meyer, A. Robert, C. T. Richardson, H. T. Debas, and D. M. Jensen.** 1981. Peptic ulcer: new therapies, new diseases. *Ann Intern Med* **95**:609-627.
97. **Gry, M., R. Rimini, S. Strömberg, A. Asplund, F. Pontén, M. Uhlén, and P. Nilsson.** 2009. Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC Genomics* **10**:365.
98. **Guan, Z., S. Y. Buckman, A. P. Pentland, D. J. Templeton, and A. R. Morrison.** 1998. Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 --> SEK1/MKK4 --> p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* **273**:12901-12908.
99. **Guha, M., M. A. O'Connell, R. Pawlinski, A. Hollis, P. McGovern, S. F. Yan, D. Stern, and N. Mackman.** 2001. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* **98**:1429-1439.
100. **Gutzmer, R., C. Diestel, S. Mommert, B. Köther, H. Stark, M. Wittmann, and T. Werfel.** 2005. Histamine H₄ receptor stimulation suppresses IL-12p70 production and mediates chemotaxis in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* **174**:5224-5232.
101. **Gutzmer, R., K. Langer, M. Lisewski, S. Mommert, D. Rieckborn, A. Kapp, and T. Werfel.** 2002. Expression and function of histamine receptors 1 and 2 on human monocyte-derived dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* **109**:524-531.
102. **Haaksma, E. E., R. Leurs, and H. Timmerman.** 1990. Histamine receptors: subclasses and specific ligands. *Pharmacol Ther* **47**:73-104.
103. **Haas, H., and P. Panula.** 2003. The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* **4**:121-130.

104. **Hammad, H., and B. N. Lambrecht.** 2006. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* **118**:331-336.
105. **Han, J., K. Luby-Phelps, B. Das, X. Shu, Y. Xia, R. D. Mosteller, U. M. Krishna, J. R. Falck, M. A. White, and D. Broek.** 1998. Role of substrates and products of PI3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* **279**:558-560.
106. **Hanoune, J., and N. Defer.** 2001. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**:145-174.
107. **Hartert, T. V., and R. S. Peebles.** 2000. Epidemiology of asthma: the year in review. *Curr Opin Pulm Med* **6**:4-9.
108. **Hartwig, C., T. Tschernig, M. Mazzega, A. Braun, and D. Neumann.** 2008. Endogenous IL-18 in experimentally induced asthma affects cytokine serum levels but is irrelevant for clinical symptoms. *Cytokine* **42**:298-305.
109. **Henderson, A. J., and J. O. Warner.** 2012. Fetal origins of asthma. *Semin Fetal Neonatal Med* **17**:82-91.
110. **Hill, C. S., and R. Treisman.** 1995. Differential activation of c-fos promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors. *EMBO J* **14**:5037-5047.
111. **Hill, S. J.** 1990. Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharmacol Rev* **42**:45-83.
112. **Hill, S. J., C. R. Ganellin, H. Timmerman, J. C. Schwartz, N. P. Shankley, J. M. Young, W. Schunack, R. Levi, and H. L. Haas.** 1997. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev* **49**:253-278.
113. **Hoffmann, E., J. Ashouri, S. Wolter, A. Doerrie, O. Dittrich-Breiholz, H. Schneider, E. F. Wagner, J. Troppmair, N. Mackman, and M. Kracht.** 2008. Transcriptional regulation of EGR-1 by the interleukin-1-JNK-MKK7-c-Jun pathway. *J Biol Chem* **283**:12120-12128.
114. **Hoffmann, E., O. Dittrich-Breiholz, H. Holtmann, and M. Kracht.** 2002. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* **72**:847-855.
115. **Hofstra, C. L., P. J. Desai, R. L. Thurmond, and W. P. Fung-Leung.** 2003. Histamine H₄ receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther* **305**:1212-1221.
116. **Holgate, S. T.** 2007. Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* **120**:1233-1244; quiz 1245-1236.
117. **Holgate, S. T.** 2008. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* **38**:872-897.
118. **Holland, P. M., M. Suzanne, J. S. Campbell, S. Noselli, and J. A. Cooper.** 1997. MKK7 is a stress-activated mitogen-activated protein kinase kinase functionally related to hemipterous. *J Biol Chem* **272**:24994-24998.
119. **Holmseth, S., K. P. Lehre, and N. C. Danbolt.** 2006. Specificity controls for immunocytochemistry. *Anat Embryol (Berl)* **211**:257-266.
120. **Holtmann, H., R. Winzen, P. Holland, S. Eickemeier, E. Hoffmann, D. Wallach, N. L. Malinin, J. A. Cooper, K. Resch, and M. Kracht.** 1999. Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* **19**:6742-6753.

121. **Hsieh, G. C., P. Chandran, A. K. Salyers, M. Pai, C. Z. Zhu, E. J. Wensink, D. G. Witte, T. R. Miller, J. P. Mikusa, S. J. Baker, J. M. Wetter, K. C. Marsh, A. A. Hancock, M. D. Cowart, T. A. Esbenshade, J. D. Brioni, and P. Honore.** 2010. H₄ receptor antagonism exhibits anti-nociceptive effects in inflammatory and neuropathic pain models in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **95**:41-50.
122. **Ihle, J. N., B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, K. Yamamoto, W. E. Thierfelder, B. Kreider, and O. Silvennoinen.** 1994. Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem Sci* **19**:222-227.
123. **Ikawa, Y., M. Suzuki, S. Shiono, E. Ohki, H. Moriya, E. Negishi, and K. Ueno.** 2005. Histamine H₄ receptor expression in human synovial cells obtained from patients suffering from rheumatoid arthritis. *Biol Pharm Bull* **28**:2016-2018.
124. **Impey, S., K. Obrietan, and D. R. Storm.** 1999. Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron* **23**:11-14.
125. **Ip, Y. T., and R. J. Davis.** 1998. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) - from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* **10**:205-219.
126. **Ison, R. R., F. M. Franks, and K. S. Soh.** 1973. The binding of conformationally restricted antihistamines to histamine receptors. *J Pharm Pharmacol* **25**:887-894.
127. **James, A. L.** 2002. Peripheral airways in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* **2**:166-174.
128. **Janknecht, R., M. A. Cahill, and A. Nordheim.** 1995. Signal integration at the c-fos promoter. *Carcinogenesis* **16**:443-450.
129. **Janknecht, R., W. H. Ernst, V. Pingoud, and A. Nordheim.** 1993. Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *EMBO J* **12**:5097-5104.
130. **Jarjour, N. N., W. J. Calhoun, L. B. Schwartz, and W. W. Busse.** 1991. Elevated bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in allergic asthmatics are associated with increased airway obstruction. *Am Rev Respir Dis* **144**:83-87.
131. **Jensen, B. C., P. M. Swigart, and P. C. Simpson.** 2009. Ten commercial antibodies for α_1 -adrenergic receptor subtypes are nonspecific. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **379**:409-412.
132. **Johansson, S. G., T. Bieber, R. Dahl, P. S. Friedmann, B. Q. Lanier, R. F. Lockey, C. Motala, J. A. Ortega Martell, T. A. Platts-Mills, J. Ring, F. Thien, P. Van Cauwenberge, and H. C. Williams.** 2004. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* **113**:832-836.
133. **Jongsma, M., U. M. Florczyk, M. C. Hendriks-Balk, M. C. Michel, S. L. Peters, and A. E. Alewijnse.** 2007. Validation of a rapid, non-radioactive method to quantify internalisation of G-protein coupled receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **375**:329-336.
134. **Jonigk, D., M. Merk, K. Hussein, L. Maegel, K. Theophile, M. Muth, U. Lehmann, C. L. Bockmeyer, M. Mengel, J. Gottlieb, T. Welte, A. Haverich, H. Golpon, H. Kreipe, and F. Laenger.** 2011. Obliterative airway remodeling: molecular evidence for shared pathways in transplanted and native lungs. *Am J Pathol* **178**:599-608.
135. **Jordan, J. D., K. D. Carey, P. J. Stork, and R. Iyengar.** 1999. Modulation of rap activity by direct interaction of G α_o with Rap1 GTPase-activating protein. *J Biol Chem* **274**:21507-21510.
136. **Jutel, M., M. Akdis, and C. A. Akdis.** 2009. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy* **39**:1786-1800.

137. **Jutel, M., T. Watanabe, S. Klunker, M. Akdis, O. A. Thomet, J. Malolepszy, T. Zak-Nejmark, R. Koga, T. Kobayashi, K. Blaser, and C. A. Akdis.** 2001. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H₁ and H₂ receptors. *Nature* **413**:420-425.
138. **Kampen, G. T., S. Stafford, T. Adachi, T. Jinqun, S. Quan, J. A. Grant, P. S. Skov, L. K. Poulsen, and R. Alam.** 2000. Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Blood* **95**:1911-1917.
139. **Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi.** 1997. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**:240-246.
140. **Kariyawasam, H. H., and D. S. Robinson.** 2006. The eosinophil: the cell and its weapons, the cytokines, its locations. *Semin Respir Crit Care Med* **27**:117-127.
141. **Kasahara, T., N. Mukaida, K. Yamashita, H. Yagisawa, T. Akahoshi, and K. Matsushima.** 1991. IL-1 and TNF- α induction of IL-8 and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line. *Immunology* **74**:60-67.
142. **Kato, Y., T. H. Chao, M. Hayashi, R. I. Tapping, and J. D. Lee.** 2000. Role of BMK1 in regulation of growth factor-induced cellular responses. *Immunol Res* **21**:233-237.
143. **Kato, Y., V. V. Kravchenko, R. I. Tapping, J. Han, R. J. Ulevitch, and J. D. Lee.** 1997. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J* **16**:7054-7066.
144. **Kay, A. B.** 2005. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med* **11**:148-152.
145. **Kay, A. B.** 2006. The role of T lymphocytes in asthma. *Chem Immunol Allergy* **91**:59-75.
146. **Keesler, G. A., J. Bray, J. Hunt, D. A. Johnson, T. Gleason, Z. Yao, S. W. Wang, C. Parker, H. Yamane, C. Cole, and H. S. Lichenstein.** 1998. Purification and activation of recombinant p38 isoforms α , β , γ , and δ . *Protein Expr Purif* **14**:221-228.
147. **Keller, M., D. Erdmann, N. Pop, N. Pluym, S. Teng, G. Bernhardt, and A. Buschauer.** 2011. Red-fluorescent argininamide-type NPY Y₁ receptor antagonists as pharmacological tools. *Bioorg Med Chem* **19**:2859-2878.
148. **Kenakin, T.** 2010. G protein coupled receptors as allosteric proteins and the role of allosteric modulators. *J Recept Signal Transduct Res* **30**:313-321.
149. **Kenakin, T., and L. J. Miller.** 2010. Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol Rev* **62**:265-304.
150. **Khan, M. M.** 1995. Regulation of IL-4 and IL-5 secretion by histamine and PGE₂. *Adv Exp Med Biol* **383**:35-42.
151. **Klein, U., M. T. Ramirez, B. K. Kobilka, and M. von Zastrow.** 1997. A novel interaction between adrenergic receptors and the α -subunit of eukaryotic initiation factor 2B. *J Biol Chem* **272**:19099-19102.
152. **Klocker, J., S. A. Mätzler, G. N. Huetz, A. Drasche, C. Kolbitsch, and H. G. Schwelberger.** 2005. Expression of histamine degrading enzymes in porcine tissues. *Inflamm Res* **54 Suppl 1**:S54-57.
153. **Kracht, M.** 2000. Regulation of cytokine transcription by common stress kinase cascades. *Eur Cytokine Netw* **11**:497-499.
154. **Kraft, S., and J. P. Kinet.** 2007. New developments in Fc ϵ RI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol* **7**:365-378.

155. **Kramer, R. M., E. F. Roberts, S. L. Um, A. G. Börsch-Haubold, S. P. Watson, M. J. Fisher, and J. A. Jakubowski.** 1996. p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA₂. *J Biol Chem* **271**:27723-27729.
156. **Krouwels, F. H., B. E. Hol, R. Lutter, B. Bruinier, A. Bast, H. M. Jansen, and T. A. Out.** 1998. Histamine affects interleukin-4, interleukin-5, and interferon- γ production by human T cell clones from the airways and blood. *Am J Respir Cell Mol Biol* **18**:721-730.
157. **Küfner, M. A., P. Ulrich, M. Raithel, and H. G. Schwelberger.** 2001. Determination of histamine degradation capacity in extremely small human colon samples. *Inflamm Res* **50 Suppl 2**:S96-97.
158. **Lagier, B., B. Lebel, J. Bousquet, and J. Pène.** 1997. Different modulation by histamine of IL-4 and interferon-gamma (IFN- γ) release according to the phenotype of human Th0, Th1 and Th2 clones. *Clin Exp Immunol* **108**:545-551.
159. **Lai, C. K., R. Beasley, J. Crane, S. Foliaki, J. Shah, S. Weiland, and I. S. o. A. a. A. i. C. P. T. S. Group.** 2009. Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* **64**:476-483.
160. **Laitinen, J. T., and M. Jokinen.** 1998. Guanosine 5'-(γ -[³⁵S]thio)triphosphate autoradiography allows selective detection of histamine H₃ receptor-dependent G protein activation in rat brain tissue sections. *J Neurochem* **71**:808-816.
161. **Larché, M., S. J. Till, B. M. Haselden, J. North, J. Barkans, C. J. Corrigan, A. B. Kay, and D. S. Robinson.** 1998. Costimulation through CD86 is involved in airway antigen-presenting cell and T cell responses to allergen in atopic asthmatics. *J Immunol* **161**:6375-6382.
162. **Lee, J. C., S. Kassis, S. Kumar, A. Badger, and J. L. Adams.** 1999. p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors - mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacol Ther* **82**:389-397.
163. **Lee, J. D., R. J. Ulevitch, and J. Han.** 1995. Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **213**:715-724.
164. **Lee, S., Y. J. Kim, S. Kwon, Y. Lee, S. Y. Choi, J. Park, and H. J. Kwon.** 2009. Inhibitory effects of flavonoids on TNF- α -induced IL-8 gene expression in HEK 293 cells. *BMB Rep* **42**:265-270.
165. **Leite-de-Moraes, M. C., S. Diem, M. L. Michel, H. Ohtsu, R. L. Thurmond, E. Schneider, and M. Dy.** 2009. Cutting edge: histamine receptor H₄ activation positively regulates in vivo IL-4 and IFN- γ production by invariant NKT cells. *J Immunol* **182**:1233-1236.
166. **Lethbridge, N. L., and P. L. Chazot.** 2010. Immunological identification of the mouse H₄ histamine receptor on spinal cord motor neurons using a novel anti-mouse H₄R antibody. *Inflamm Res* **59 Suppl 2**:S197-198.
167. **Leurs, R., R. A. Bakker, H. Timmerman, and I. J. de Esch.** 2005. The histamine H₃ receptor: from gene cloning to H₃ receptor drugs. *Nat Rev Drug Discov* **4**:107-120.
168. **Leurs, R., P. L. Chazot, F. C. Shenton, H. D. Lim, and I. J. de Esch.** 2009. Molecular and biochemical pharmacology of the histamine H₄ receptor. *Br J Pharmacol* **157**:14-23.
169. **Leurs, R., M. J. Smit, and H. Timmerman.** 1995. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol Ther* **66**:413-463.

170. **Leurs, R., E. Traiffort, J. M. Arrang, J. Tardivel-Lacombe, M. Ruat, and 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.
171. **Lewis, T. S., P. S. Shapiro, and N. G. Ahn.** 1998. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* **74**:49-139.
172. **Li, H., N. H. Choe, D. T. Wright, and K. B. Adler.** 1995. Histamine provokes turnover of inositol phospholipids in guinea pig and human airway epithelial cells via an H₁-receptor/G protein-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol* **12**:416-424.
173. **Lichtenstein, L. M., and E. Gillespie.** 1975. The effects of the H₁ and H₂ antihistamines on "allergic" histamine release and its inhibition by histamine. *J Pharmacol Exp Ther* **192**:441-450.
174. **Lim, H. D., M. Adami, E. Guaita, T. Werfel, R. A. Smits, I. J. de Esch, R. A. Bakker, R. Gutzmer, G. Coruzzi, and R. Leurs.** 2009. Pharmacological characterization of the new histamine H₄ receptor agonist VUF 8430. *Br J Pharmacol* **157**:34-43.
175. **Lim, H. D., C. de Graaf, W. Jiang, P. Sadek, P. M. McGovern, E. P. Istyastono, R. A. Bakker, I. J. de Esch, R. L. Thurmond, and R. Leurs.** 2010. Molecular determinants of ligand binding to H₄R species variants. *Mol Pharmacol* **77**:734-743.
176. **Lim, H. D., A. Jongejan, R. A. Bakker, E. Haaksma, I. J. de Esch, and R. Leurs.** 2008. Phenylalanine 169 in the second extracellular loop of the human histamine H₄ receptor is responsible for the difference in agonist binding between human and mouse H₄ receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **327**:88-96.
177. **Lim, H. D., R. A. Smits, R. Leurs, and I. J. De Esch.** 2006. The emerging role of the histamine H₄ receptor in anti-inflammatory therapy. *Curr Top Med Chem* **6**:1365-1373.
178. **Lim, H. D., R. M. van Rijn, P. Ling, R. A. Bakker, R. L. Thurmond, and R. Leurs.** 2005. Evaluation of histamine H₁-, H₂-, and H₃-receptor ligands at the human histamine H₄ receptor: identification of 4-methylhistamine as the first potent and selective H₄ receptor agonist. *J Pharmacol Exp Ther* **314**:1310-1321.
179. **Lin, J. S.** 2000. Brain structures and mechanisms involved in the control of cortical activation and wakefulness, with emphasis on the posterior hypothalamus and histaminergic neurons. *Sleep Med Rev* **4**:471-503.
180. **Ling, P., K. Ngo, S. Nguyen, R. L. Thurmond, J. P. Edwards, L. Karlsson, and W. P. Fung-Leung.** 2004. Histamine H₄ receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *Br J Pharmacol* **142**:161-171.
181. **Lippert, U., A. Möller, P. Welker, M. Artuc, and B. M. Henz.** 2000. Inhibition of cytokine secretion from human leukemic mast cells and basophils by H₁- and H₂-receptor antagonists. *Exp Dermatol* **9**:118-124.
182. **Lovenberg, T. W., B. L. Roland, S. J. Wilson, X. Jiang, J. Pyati, A. Huvar, M. R. Jackson, and M. G. Erlander.** 1999. Cloning and functional expression of the human histamine H₃ receptor. *Mol Pharmacol* **55**:1101-1107.
183. **Luttrell, L. M., F. L. Roudabush, E. W. Choy, W. E. Miller, M. E. Field, K. L. Pierce, and R. J. Lefkowitz.** 2001. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β -arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:2449-2454.

184. **Luttrell, L. M., T. van Biesen, B. E. Hawes, W. J. Koch, K. Touhara, and R. J. Lefkowitz.** 1995. G $\beta\gamma$ subunits mediate mitogen-activated protein kinase activation by the tyrosine kinase insulin-like growth factor 1 receptor. *J Biol Chem* **270**:16495-16498.
185. **Maintz, L., and N. Novak.** 2007. Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr* **85**:1185-1196.
186. **Marie, C., S. Roman-Roman, and G. Rawadi.** 1999. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in interleukin-8 production by human monocytes and polymorphonuclear cells stimulated with lipopolysaccharide or Mycoplasma fermentans membrane lipoproteins. *Infect Immun* **67**:688-693.
187. **Marley, P. D., K. A. Thomson, K. Jachno, and M. J. Johnston.** 1991. Histamine-induced increases in cyclic AMP levels in bovine adrenal medullary cells. *Br J Pharmacol* **104**:839-846.
188. **Maruko, T., T. Nakahara, K. Sakamoto, M. Saito, N. Sugimoto, Y. Takuwa, and K. Ishii.** 2005. Involvement of the $\beta\gamma$ subunits of G proteins in the cAMP response induced by stimulation of the histamine H $_1$ receptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **372**:153-159.
189. **Maslinska, D., M. Laure-Kamionowska, K. T. Maslinski, K. Derogowski, G. Szewczyk, and S. Maslinski.** 2006. Histamine H $_4$ receptors on mammary epithelial cells of the human breast with different types of carcinoma. *Inflamm Res* **55 Suppl 1**:S77-78.
190. **Mauad, T., E. H. Bel, and P. J. Sterk.** 2007. Asthma therapy and airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol* **120**:997-1009; quiz 1010-1001.
191. **McDonald, P. H., C. W. Chow, W. E. Miller, S. A. Laporte, M. E. Field, F. T. Lin, R. J. Davis, and R. J. Lefkowitz.** 2000. β -arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* **290**:1574-1577.
192. **McLaughlin, M. M., S. Kumar, P. C. McDonnell, S. Van Horn, J. C. Lee, G. P. Livi, and P. R. Young.** 1996. Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J Biol Chem* **271**:8488-8492.
193. **Medina, V. A., P. G. Brenzoni, D. J. Lamas, N. Massari, C. Mondillo, M. A. Nunez, O. Pignataro, and E. S. Rivera.** 2011. Role of histamine H $_4$ receptor in breast cancer cell proliferation. *Front Biosci (Elite Ed)* **3**:1042-1060.
194. **Meyer, R. G., J. H. Küpper, R. Kandolf, and H. P. Rodemann.** 2002. Early growth response-1 gene (Egr-1) promoter induction by ionizing radiation in U87 malignant glioma cells in vitro. *Eur J Biochem* **269**:337-346.
195. **Michel, M. C., T. Wieland, and G. Tsujimoto.** 2009. How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **379**:385-388.
196. **Minami, T., T. Kuroishi, A. Ozawa, H. Shimauchi, Y. Endo, and S. Sugawara.** 2007. Histamine amplifies immune response of gingival fibroblasts. *J Dent Res* **86**:1083-1088.
197. **Mitchell, J., V. Dimov, and R. G. Townley.** 2010. IL-13 and the IL-13 receptor as therapeutic targets for asthma and allergic disease. *Curr Opin Investig Drugs* **11**:527-534.
198. **Mitsuhashi, M., and D. G. Payan.** 1991. Multiple signaling pathways of histamine H $_2$ receptors. *Agents Actions Suppl* **33**:289-294.
199. **Miyauchi, S., A. Hirasawa, T. Iga, N. Liu, C. Itsubo, K. Sadakane, T. Hara, and G. Tsujimoto.** 2009. Distribution and regulation of protein expression of the free fatty acid receptor GPR120. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **379**:427-434.

200. **Miyazawa, K., A. Mori, H. Miyata, M. Akahane, Y. Ajisawa, and H. Okudaira.** 1998. Regulation of interleukin-1 β -induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **273**:24832-24838.
201. **Mochizuki, N., Y. Ohba, E. Kiyokawa, T. Kurata, T. Murakami, T. Ozaki, A. Kitabatake, K. Nagashima, and M. Matsuda.** 1999. Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G α_i . *Nature* **400**:891-894.
202. **Morgan, R. K., B. McAllister, L. Cross, D. S. Green, H. Kornfeld, D. M. Center, and W. W. Cruikshank.** 2007. Histamine 4 receptor activation induces recruitment of FoxP3⁺ T cells and inhibits allergic asthma in a murine model. *J Immunol* **178**:8081-8089.
203. **Morse, K. L., J. Behan, T. M. Laz, R. E. West, S. A. Greenfeder, J. C. Anthes, S. Umland, Y. Wan, R. W. Hipkin, W. Gonsiorek, N. Shin, E. L. Gustafson, X. Qiao, S. Wang, J. A. Hedrick, J. Greene, M. Bayne, and F. J. Monsma.** 2001. Cloning and characterization of a novel human histamine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **296**:1058-1066.
204. **Moss, J., S. J. Stanley, D. L. Burns, J. A. Hsia, D. A. Yost, G. A. Myers, and E. L. Hewlett.** 1983. Activation by thiol of the latent NAD glycohydrolase and ADP-ribosyltransferase activities of Bordetella pertussis toxin (islet-activating protein). *J Biol Chem* **258**:11879-11882.
205. **Mukaida, N., S. Okamoto, Y. Ishikawa, and K. Matsushima.** 1994. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* **56**:554-558.
206. **Mutschler, E., G. Geisslinge, and H. K. Kroemer, M. Schäfer-Korting.** 2001. *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Auflage ed, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
207. **Myslivecek, J., M. Klein, M. Novakova, and J. Ricny.** 2008. The detection of the non-M2 muscarinic receptor subtype in the rat heart atria and ventricles. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **378**:103-116.
208. **Nakamura, T., H. Itadani, Y. Hidaka, M. Ohta, and K. Tanaka.** 2000. Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH₄R. *Biochem Biophys Res Commun* **279**:615-620.
209. **Naor, Z., O. Benard, and R. Seger.** 2000. Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab* **11**:91-99.
210. **Neumann, D., S. Beermann, and R. Seifert.** 2010. Does the histamine H₄ receptor have a pro- or anti-inflammatory role in murine bronchial asthma? *Pharmacology* **85**:217-223.
211. **New, L., Y. Jiang, M. Zhao, K. Liu, W. Zhu, L. J. Flood, Y. Kato, G. C. Parry, and J. Han.** 1998. PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *EMBO J* **17**:3372-3384.
212. **Nguyen, T., D. A. Shapiro, S. R. George, V. Setola, D. K. Lee, R. Cheng, L. Rauser, S. P. Lee, K. R. Lynch, B. L. Roth, and B. F. O'Dowd.** 2001. Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol* **59**:427-433.
213. **Nihiro, H., T. Otsuka, E. Ogami, K. Yamaoka, S. Nagano, M. Akahoshi, H. Nakashima, Y. Arinobu, K. Izuhara, and Y. Niho.** 1998. MAP kinase pathways as a route for regulatory mechanisms of IL-10 and IL-4 which inhibit COX-2 expression in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **250**:200-205.

214. **Noubade, R., G. Milligan, J. F. Zachary, E. P. Blankenhorn, R. del Rio, M. Rincon, and C. Teuscher.** 2007. Histamine receptor H₁ is required for TCR-mediated p38 MAPK activation and optimal IFN- γ production in mice. *J Clin Invest* **117**:3507-3518.
215. **Oda, T., N. Morikawa, Y. Saito, Y. Masuho, and S. Matsumoto.** 2000. Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem* **275**:36781-36786.
216. **Okayama, Y., C. Petit-Frère, O. Kassel, A. Semper, D. Quint, M. J. Tunon-de-Lara, P. Bradding, S. T. Holgate, and M. K. Church.** 1995. IgE-dependent expression of mRNA for IL-4 and IL-5 in human lung mast cells. *J Immunol* **155**:1796-1808.
217. **Ono, K., and J. Han.** 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* **12**:1-13.
218. **Osna, N., K. Elliott, and M. M. Khan.** 2001. Regulation of interleukin-10 secretion by histamine in T_H2 cells and splenocytes. *Int Immunopharmacol* **1**:85-96.
219. **Pawlinski, R., B. Pedersen, B. Kehrle, W. C. Aird, R. D. Frank, M. Guha, and N. Mackman.** 2003. Regulation of tissue factor and inflammatory mediators by Egr-1 in a mouse endotoxemia model. *Blood* **101**:3940-3947.
220. **Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M. H. Cobb.** 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**:153-183.
221. **Pelaia, G., G. Cuda, A. Vatrella, L. Gallelli, M. Caraglia, M. Marra, A. Abbruzzese, M. Caputi, R. Maselli, F. S. Costanzo, and S. A. Marsico.** 2005. Mitogen-activated protein kinases and asthma. *J Cell Physiol* **202**:642-653.
222. **Pierce, K. L., and R. J. Lefkowitz.** 2001. Classical and new roles of β -arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci* **2**:727-733.
223. **Pillot, C., A. Heron, V. Cochois, J. Tardivel-Lacombe, X. Ligneau, J. C. Schwartz, and J. M. Arrang.** 2002. A detailed mapping of the histamine H₃ receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience* **114**:173-193.
224. **Pradidarcheep, W., W. T. Labruyère, N. F. Dabhoiwala, and W. H. Lamers.** 2008. Lack of specificity of commercially available antisera: better specifications needed. *J Histochem Cytochem* **56**:1099-1111.
225. **Pradidarcheep, W., J. Stallen, W. T. Labruyère, N. F. Dabhoiwala, M. C. Michel, and W. H. Lamers.** 2009. Lack of specificity of commercially available antisera against muscarinergic and adrenergic receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **379**:397-402.
226. **Pulverer, B. J., J. M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki, and J. R. Woodgett.** 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**:670-674.
227. **Rackemann, F. M.** 1947. A working classification of asthma. *Am J Med* **3**:601-606.
228. **Raingeaud, J., A. J. Whitmarsh, T. Barrett, B. Dérijard, and R. J. Davis.** 1996. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* **16**:1247-1255.
229. **Raithel, M., M. Küfner, P. Ulrich, and E. G. Hahn.** 1999. The involvement of the histamine degradation pathway by diamine oxidase in manifest gastrointestinal allergies. *Inflamm Res* **48 Suppl 1**:S75-76.
230. **Reher, T. M., D. Neumann, A. Buschauer, and R. Seifert.** 2012. Incomplete activation of human eosinophils via the histamine H₄-receptor: evidence for ligand-specific receptor conformations. *Biochem Pharmacol* **84**:192-203.

231. **Reinhardt, D., and E. Ritter.** 1979. Hypothermia-induced potentiation of histamine H₂-receptor-mediated relaxation and cyclic AMP increase in the isolated mesenteric artery of the rabbit. *Agents Actions* **9**:9-14.
232. **Rezai, A. R., J. F. Salazar-Gonzalez, O. Martínez-Maza, J. Bramhall, R. Afrasiabi, and V. Kermani-Arab.** 1990. Histamine blocks interleukin 2 (IL-2) gene expression and regulates IL-2 receptor expression. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **12**:345-362.
233. **Riese, R. J., and H. A. Chapman.** 2000. Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Opin Immunol* **12**:107-113.
234. **Rivera, J., and A. M. Gilfillan.** 2006. Molecular regulation of mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* **117**:1214-1225; quiz 1226.
235. **Roberson, M. S., T. Zhang, H. L. Li, and J. M. Mulvaney.** 1999. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* **140**:1310-1318.
236. **Robertson, L. M., T. K. Kerppola, M. Vendrell, D. Luk, R. J. Smeyne, C. Bocchiaro, J. I. Morgan, and T. Curran.** 1995. Regulation of c-fos expression in transgenic mice requires multiple interdependent transcription control elements. *Neuron* **14**:241-252.
237. **Robinson, A. J., and J. M. Dickenson.** 2001. Activation of the p38 and p42/p44 mitogen-activated protein kinase families by the histamine H₁ receptor in DDT₁MF-2 cells. *Br J Pharmacol* **133**:1378-1386.
238. **Rolli, M., A. Kotlyarov, K. M. Sakamoto, M. Gaestel, and A. Neininger.** 1999. Stress-induced stimulation of early growth response gene-1 by p38/stress-activated protein kinase 2 is mediated by a cAMP-responsive promoter element in a MAPKAP kinase 2-independent manner. *J Biol Chem* **274**:19559-19564.
239. **Rosenwasser, L. J.** 2011. Mechanisms of IgE Inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep* **11**:178-183.
240. **Rosethorne, E. M., and S. J. Charlton.** 2011. Agonist-biased signaling at the histamine H₄ receptor: JNJ7777120 recruits β-arrestin without activating G proteins. *Mol Pharmacol* **79**:749-757.
241. **Rouleau, A., X. Ligneau, J. Tardivel-Lacombe, S. Morisset, F. Gbahou, J. C. Schwartz, and J. M. Arrang.** 2002. Histamine H₃-receptor-mediated [³⁵S]GTPγS binding: evidence for constitutive activity of the recombinant and native rat and human H₃ receptors. *Br J Pharmacol* **135**:383-392.
242. **Rouse, J., P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A. Alonso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt, and A. R. Nebreda.** 1994. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**:1027-1037.
243. **Rubinfeld, H., and R. Seger.** 2004. The ERK cascade as a prototype of MAPK signaling pathways. *Methods Mol Biol* **250**:1-28.
244. **Samitas, K., J. Lötvall, and A. Bossios.** 2010. B cells: from early development to regulating allergic diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **58**:209-225.
245. **Sassone-Corsi, P.** 1995. Transcription factors responsive to cAMP. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**:355-377.
246. **Schaeffer, H. J., and M. J. Weber.** 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**:2435-2444.
247. **SCHAYER, R. W.** 1956. The metabolism of histamine in various species. *Br J Pharmacol Chemother* **11**:472-473.
248. **SCHAYER, R. W., and S. A. KARJALA.** 1956. Ring N methylation; a major route of histamine metabolism. *J Biol Chem* **221**:307-313.
-

249. **Schmidt, J., S. Fleissner, I. Heimann-Weitschat, R. Lindstaedt, and I. Szelenyi.** 1994. Histamine increases anti-CD3 induced IL-5 production of T_H2-type T cells via histamine H₂-receptors. *Agents Actions* **42**:81-85.
250. **Schneider, E., F. M. Lemoine, J. Breton-Gorius, F. Machavoine, A. Arnould, E. M. Cramer, J. Guichard, and D. Michel.** 1999. IL-3-induced coexpression of histidine decarboxylase, IL-4 and IL-6 mRNA by murine basophil precursors. *Exp Hematol* **27**:1010-1018.
251. **Schneider, E. H., D. Schnell, D. Papa, and R. Seifert.** 2009. High constitutive activity and a G-protein-independent high-affinity state of the human histamine H₄-receptor. *Biochemistry* **48**:1424-1438.
252. **Schneider, E. H., and R. Seifert.** 2010. Coexpression systems as models for the analysis of constitutive GPCR activity. *Methods Enzymol* **485**:527-557.
253. **Schneider, E. H., and R. Seifert.** 2010. Sf9 cells: a versatile model system to investigate the pharmacological properties of G protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **128**:387-418.
254. **Schneider, E. H., A. Strasser, R. L. Thurmond, and R. Seifert.** 2010. Structural requirements for inverse agonism and neutral antagonism of indole-, benzimidazole-, and thienopyrrole-derived histamine H₄ receptor ligands. *J Pharmacol Exp Ther* **334**:513-521.
255. **Schnell, D., I. Brunskole, K. Ladova, E. H. Schneider, P. Igel, S. Dove, A. Buschauer, and R. Seifert.** 2011. Expression and functional properties of canine, rat, and murine histamine H₄ receptors in Sf9 insect cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **383**:457-470.
256. **Schwartz, J. C., J. M. Arrang, M. Garbarg, H. Pollard, and M. Ruat.** 1991. Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev* **71**:1-51.
257. **Schwelberger, H. G., and E. Bodner.** 1997. Purification and characterization of diamine oxidase from porcine kidney and intestine. *Biochim Biophys Acta* **1340**:152-164.
258. **Schwelberger, H. G., A. Hittmair, and S. D. Kohlwein.** 1998. Analysis of tissue and subcellular localization of mammalian diamine oxidase by confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Inflamm Res* **47 Suppl 1**:S60-61.
259. **Seamon, K. B., W. Padgett, and J. W. Daly.** 1981. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:3363-3367.
260. **Seger, R., and E. G. Krebs.** 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* **9**:726-735.
261. **Seifert, R., and S. Dove.** 2009. Functional selectivity of GPCR ligand stereoisomers: new pharmacological opportunities. *Mol Pharmacol* **75**:13-18.
262. **Seifert, R., A. Höer, I. Schwaner, and A. Buschauer.** 1992. Histamine increases cytosolic Ca²⁺ in HL-60 promyelocytes predominantly via H₂ receptors with an unique agonist/antagonist profile and induces functional differentiation. *Mol Pharmacol* **42**:235-241.
263. **Seifert, R., E. H. Schneider, S. Dove, I. Brunskole, D. Neumann, A. Strasser, and A. Buschauer.** 2011. Paradoxical stimulatory effects of the "standard" histamine H₄-receptor antagonist JNJ7777120: the H₄ receptor joins the club of 7 transmembrane domain receptors exhibiting functional selectivity. *Mol Pharmacol* **79**:631-638.
264. **Shaywitz, A. J., and M. E. Greenberg.** 1999. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* **68**:821-861.
-

265. **Sheng, M., M. A. Thompson, and M. E. Greenberg.** 1991. CREB: a Ca²⁺-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* **252**:1427-1430.
266. **Shifflett, D. E., S. L. Jones, A. J. Moeser, and A. T. Blikslager.** 2004. Mitogen-activated protein kinases regulate COX-2 and mucosal recovery in ischemic-injured porcine ileum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**:G906-913.
267. **Singer, C. A., K. J. Baker, A. McCaffrey, D. P. AuCoin, M. A. Dechert, and W. T. Gerthoffer.** 2003. p38 MAPK and NF-kappaB mediate COX-2 expression in human airway myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**:L1087-1098.
268. **Slack, R. J., L. J. Russell, D. A. Hall, M. A. Luttmann, A. J. Ford, K. A. Saunders, S. T. Hodgson, H. E. Connor, C. Browning, and K. L. Clark.** 2011. Pharmacological characterization of GSK1004723, a novel, long-acting antagonist at histamine H₁ and H₃ receptors. *Br J Pharmacol* **164**:1627-1641.
269. **Soll, A. H., and J. H. Walsh.** 1979. Regulation of gastric acid secretion. *Annu Rev Physiol* **41**:35-53.
270. **Stanners, J., P. S. Kabouridis, K. L. McGuire, and C. D. Tsoukas.** 1995. Interaction between G proteins and tyrosine kinases upon T cell receptor.CD3-mediated signaling. *J Biol Chem* **270**:30635-30642.
271. **Stephens, L. R., A. Eguinoa, H. Erdjument-Bromage, M. Lui, F. Cooke, J. Coadwell, A. S. Smrcka, M. Thelen, K. Cadwallader, P. Tempst, and P. T. Hawkins.** 1997. The G_{βγ} sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* **89**:105-114.
272. **Strasser, A., B. Striegl, H. J. Wittmann, and R. Seifert.** 2008. Pharmacological profile of histaprodifens at four recombinant histamine H₁ receptor species isoforms. *J Pharmacol Exp Ther* **324**:60-71.
273. **Sturgill, T. W., L. B. Ray, E. Erikson, and J. L. Maller.** 1988. Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* **334**:715-718.
274. **Sugden, P. H., and A. Clerk.** 1997. Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal* **9**:337-351.
275. **Tan, Y., J. Rouse, A. Zhang, S. Cariati, P. Cohen, and M. J. Comb.** 1996. FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J* **15**:4629-4642.
276. **Thiel, G., and G. Cibelli.** 2002. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol* **193**:287-292.
277. **Thurmond, R. L., P. J. Desai, P. J. Dunford, W. P. Fung-Leung, C. L. Hofstra, W. Jiang, S. Nguyen, J. P. Riley, S. Sun, K. N. Williams, J. P. Edwards, and L. Karlsson.** 2004. A potent and selective histamine H₄ receptor antagonist with anti-inflammatory properties. *J Pharmacol Exp Ther* **309**:404-413.
278. **Thurmond, R. L., E. W. Gelfand, and P. J. Dunford.** 2008. The role of histamine H₁ and H₄ receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. *Nat Rev Drug Discov* **7**:41-53.
279. **Tournier, C., A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, T. Barrett, and R. J. Davis.** 1997. Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH₂-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:7337-7342.
280. **Tsai, E. Y., J. Jain, P. A. Pesavento, A. Rao, and A. E. Goldfeld.** 1996. Tumor necrosis factor alpha gene regulation in activated T cells involves ATF-2/Jun and NFATp. *Mol Cell Biol* **16**:459-467.
281. **Tschernig, T., D. Neumann, A. Pich, M. Dorsch, and R. Pabst.** 2008. Experimental bronchial asthma - the strength of the species rat. *Curr Drug Targets* **9**:466-469.
-

282. **van Rijn, R. M., P. L. Chazot, F. C. Shenton, K. Sansuk, R. A. Bakker, and R. Leurs.** 2006. Oligomerization of recombinant and endogenously expressed human histamine H₄ receptors. *Mol Pharmacol* **70**:604-615.
283. **Varga, C., K. Horvath, A. Berko, R. L. Thurmond, P. J. Dunford, and B. J. Whittle.** 2005. Inhibitory effects of histamine H₄ receptor antagonists on experimental colitis in the rat. *Eur J Pharmacol* **522**:130-138.
284. **Vauth, M., D. Möhner, S. Beermann, R. Seifert, and D. Neumann.** 2012. Histamine via the histamine H₂-receptor reduces α -CD3-induced interferon- γ synthesis in murine CD4⁺ T cells in an indirect manner. *J Interferon Cytokine Res* **32**:185-190.
285. **von Garnier, C., L. Filgueira, M. Wikstrom, M. Smith, J. A. Thomas, D. H. Strickland, P. G. Holt, and P. A. Stumbles.** 2005. Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. *J Immunol* **175**:1609-1618.
286. **von Mutius, E.** 2007. Asthma and allergies in rural areas of Europe. *Proc Am Thorac Soc* **4**:212-216.
287. **Vrydag, W., and M. C. Michel.** 2007. Tools to study β_3 -adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **374**:385-398.
288. **Wang, L., I. Gantz, and J. DelValle.** 1996. Histamine H₂ receptor activates adenylate cyclase and PLC via separate GTP-dependent pathways. *Am J Physiol* **271**:G613-620.
289. **Wang, W., C. Ma, Z. Mao, and M. Li.** 2004. JNK inhibition as a potential strategy in treating Parkinson's disease. *Drug News Perspect* **17**:646-654.
290. **Waskiewicz, A. J., A. Flynn, C. G. Proud, and J. A. Cooper.** 1997. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J* **16**:1909-1920.
291. **Wedemeyer, J., M. Tsai, and S. J. Galli.** 2000. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol* **12**:624-631.
292. **Whitmarsh, A. J., and R. J. Davis.** 1996. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med (Berl)* **74**:589-607.
293. **Whitmarsh, A. J., P. Shore, A. D. Sharrocks, and R. J. Davis.** 1995. Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* **269**:403-407.
294. **Winzen, R., M. Kracht, B. Ritter, A. Wilhelm, C. Y. Chen, A. B. Shyu, M. Müller, M. Gaestel, K. Resch, and H. Holtmann.** 1999. The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J* **18**:4969-4980.
295. **Woolcock, A. J., and J. K. Peat.** 1997. Evidence for the increase in asthma worldwide. *Ciba Found Symp* **206**:122-134; discussion 134-129, 157-129.
296. **Xing, J., D. D. Ginty, and M. E. Greenberg.** 1996. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* **273**:959-963.
297. **Xuan, W., G. B. Marks, B. G. Toelle, E. Belousova, J. K. Peat, G. Berry, and A. J. Woolcock.** 2002. Risk factors for onset and remission of atopy, wheeze, and airway hyperresponsiveness. *Thorax* **57**:104-109.
298. **Yamamoto, K. K., G. A. Gonzalez, W. H. Biggs, and M. R. Montminy.** 1988. Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* **334**:494-498.

299. **Yamashita, M., H. Fukui, K. Sugama, Y. Horio, S. Ito, H. Mizuguchi, and H. Wada.** 1991. Expression cloning of a cDNA encoding the bovine histamine H₁ receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:11515-11519.
300. **Yamashita, M., M. Kimura, M. Kubo, C. Shimizu, T. Tada, R. M. Perlmutter, and T. Nakayama.** 1999. T cell antigen receptor-mediated activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway controls interleukin 4 receptor function and type-2 helper T cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:1024-1029.
301. **Yamauchi, K., K. Sekizawa, H. Suzuki, H. Nakazawa, Y. Ohkawara, D. Katayose, H. Ohtsu, G. Tamura, S. Shibahara, and M. Takemura.** 1994. Structure and function of human histamine N-methyltransferase: critical enzyme in histamine metabolism in airway. *Am J Physiol* **267**:L342-349.
302. **Yao, J., N. Mackman, T. S. Edgington, and S. T. Fan.** 1997. Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor-alpha promoter in human monocytic cells. Regulation by Egr-1, c-Jun, and NF- κ B transcription factors. *J Biol Chem* **272**:17795-17801.
303. **Yong, L. C.** 1997. The mast cell: origin, morphology, distribution, and function. *Exp Toxicol Pathol* **49**:409-424.
304. **Yoshimoto, T., H. Tsutsui, K. Tominaga, K. Hoshino, H. Okamura, S. Akira, W. E. Paul, and K. Nakanishi.** 1999. IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13962-13966.
305. **Yu, B., Y. Shao, P. Li, J. Zhang, Q. Zhong, H. Yang, X. Hu, B. Chen, X. Peng, Q. Wu, Y. Chen, M. Guan, J. Wan, and W. Zhang.** 2010. Copy number variations of the human histamine H₄ receptor gene are associated with systemic lupus erythematosus. *Br J Dermatol* **163**:935-940.
306. **Zelivianski, S., M. Spellman, M. Kellerman, V. Kakitelashvilli, X. W. Zhou, E. Lugo, M. S. Lee, R. Taylor, T. L. Davis, R. Hauke, and M. F. Lin.** 2003. ERK inhibitor PD98059 enhances docetaxel-induced apoptosis of androgen-independent human prostate cancer cells. *Int J Cancer* **107**:478-485.
307. **Zhang, M., J. D. Venable, and R. L. Thurmond.** 2006. The histamine H₄ receptor in autoimmune disease. *Expert Opin Investig Drugs* **15**:1443-1452.
308. **Zhang, S., J. Han, M. A. Sells, J. Chernoff, U. G. Knaus, R. J. Ulevitch, and G. M. Bokoch.** 1995. Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem* **270**:23934-23936.
309. **Zhou, G., Z. Q. Bao, and J. E. Dixon.** 1995. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* **270**:12665-12669.
310. **Zhu, Y., D. Michalovich, H. Wu, K. B. Tan, G. M. Dytko, I. J. Mannan, R. Boyce, J. Alston, L. A. Tierney, X. Li, N. C. Herrity, L. Vawter, H. M. Sarau, R. S. Ames, C. M. Davenport, J. P. Hieble, S. Wilson, D. J. Bergsma, and L. R. Fitzgerald.** 2001. Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor. *Mol Pharmacol* **59**:434-441.
311. **Zimmermann, A. S., H. Burhenne, V. Kaefer, R. Seifert, and D. Neumann.** 2011. Systematic analysis of histamine and N-methylhistamine concentrations in organs from two common laboratory mouse strains: C57Bl/6 and Balb/c. *Inflamm Res* **60**:1153-1159.

6. Anhang

6.1. Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation zum Thema „Funktion und Pharmakologie des Histamin H₁- und H₄-Rezeptors in der Maus“ selbständig verfasst habe und alle benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet oder an einer anderen Universität oder einer anderen Fakultät als Dissertation eingereicht.

Hannover, den 27.09.2012

6.2. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Detlef Neumann bedanken, der mich fortwährend wissenschaftlich betreut hat und mich durch zahlreiche experimentelle Anregungen, praktischen Ratschläge und interessanten Diskussionen weitergebracht hat. Durch seinen Optimismus hat er es immer wieder geschafft mich zu motivieren. Nicht zuletzt durch seine freundliche und engagierte Betreuung hat mir diese Arbeit viel Freude bereitet. Vielen Dank dafür!

Genauso herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Walter Müller für die freundliche Übernahme des Korreferats bedanken und bei Prof. Dr. Reinhard Schwinzer, der sich bereit erklärt hat, die Rolle des Drittprüfers zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Roland Seifert, dem Leiter des Instituts für Pharmakologie, der es mir ermöglicht hat, die hier vorliegende Dissertation in seinem Institut anzufertigen.

Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei Renate Schottmann, Anna Bauer und Juliane von der Ohe für ihr großes Engagement, die gute Zusammenarbeit und die vielen nützlichen Hinweise und Hilfen im Labor, ohne die diese Arbeit so nicht zustande gekommen wäre. Vielen lieben Dank!

Dr. Christina Hartwig danke ich für die Hilfe bei der Etablierung des Asthmamodells und für die hilfreichen Anregungen und Diskussionen.

Bei der Zentralen Forschungseinrichtung für Massenspektrometrie/Metabolomics, vor allem bei Dr. Heike Burhenne und Annette Garbe, bedanke ich mich für die zuverlässige und zeitnahe Messung meiner Proben.

Für das Anfertigen und die Auswertung der histologischen Lungenschnitte möchte ich mich bei Dr. Silke Glage und Elena Wiebe bedanken.

Annette Stanke danke ich für ihre Hilfsbereitschaft in verschiedensten organisatorischen Angelegenheiten.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Bürokollegen und Mitdoktoranden Kerstin, Caro, Micha und Jörg für die freundschaftliche Atmosphäre und die vielen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Diskussionen bedanken, die den Arbeitsalltag stets aufgelockert haben.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den Mitgliedern der AG Neumann aber auch bei allen andern Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie bedanken, die mich alle freundlich aufgenommen haben und bei Problemen jederzeit behilflich waren. Durch diese nette und kollegiale Arbeitsatmosphäre habe ich mich während meiner gesamten Promotionszeit sehr wohl gefühlt. Herzlichen Dank an alle!

Ein ganz besonderer Dank gilt in diesem Rahmen meinen Eltern, die es mir ermöglicht haben zu studieren, mich in allen Entscheidungen unterstützt haben und einfach immer für mich da sind.

6.3. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Silke Beermann
Anschrift	Dresdener Str.23 31832 Springe
Geburtstag	08.11.1983
Geburtsort:	Hannover
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulische Ausbildung

1990 – 1994	Grundschule am Ebersberg Springe
1994 – 1996	Orientierungsstufe Nord Springe
1996 – 2003	Otto-Hahn-Gymnasium Springe
2003	Abitur

Studium

2003 – 2005	Grundstudium der Biochemie an der Leibniz Universität Hannover
Oktober 2005	Vordiplom
2005 – 2008	Hauptstudium der Biochemie an der Leibniz Univesität Hannover
Februar 2008	Diplomprüfung
Februar 2008 – August 2008	Diplomarbeit im Institut für Virologie der Medizinischen Hochschule Hannover mit dem Thema: <i>Charakterisierung des polymorphen UL11-Proteins des humanen Cytomegalovirus</i>

Promotion

Januar 2009	Beginn der Dissertation zum Dr. rer. nat. am Institut für Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Detlef Neumann
Dezember 2012	Voraussichtlich Promotion

6.4. Publiationsliste

Rummel A, Häfner K, Mahrhold S, Darashchonak N, Holt M, Jahn R, **Beermann S**, Karnath T, Bigalke H, Binz T: *Botulinum neurotoxins C, E and F bind gangliosides via a conserved binding site prior to stimulation-dependent uptake with botulinum neurotoxin F utilising the three isoforms of SV2 as second receptor*. J Neurochem. 2009 Sep;110(6):1942-54.

Deml KF, **Beermann S**, Neumann D, Strasser A, Seifert R: *Interactions of histamine H₁-receptor agonists and antagonists with the human histamine H₄-receptor*. Mol Pharmacol. 2009 Nov;76(5):1019-30.

Favilli F, Anzilotti C, Martinelli L, Quattroni P, De Martino S, Pratesi F, Neumann D, **Beermann S**, Novick D, Dinarello CA, Boraschi D, Migliorini P: *IL-18 activity in systemic lupus erythematosus*. Ann N Y Acad Sci. 2009 Sep;1173:301-9.

Neumann D, **Beermann S**, Seifert R: *Does the histamine H₄ receptor have a pro- or anti-inflammatory role in murine bronchial asthma?* Pharmacology. 2010;85(4):217-23. Review

Beermann S, Seifert R, Neumann D.: *Commercially available antibodies against human and murine histamine H₄-receptor lack specificity*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2012 Feb;385(2):125-35.

Beermann S, Glage S, Jonigk D, Seifert R, Neumann D: *Opposite effects of mepyramine on JNJ 7777120-induced amelioration of experimentally induced asthma in mice in sensitization and provocation*. PLoS One. 2012;7(1):e30285.

Vauth M, Möhner D, **Beermann S**, Seifert R, Neumann D: *Histamine via the histamine H₂-receptor reduces α -CD3-induced interferon- γ synthesis in murine CD4⁺T cells in an indirect manner*. J Interferon Cytokine Res. 2012 Apr;32(4):185-90.

Neumann D, **Beermann S**, Mägel L, Jonigk D, Weber-Steffens D, Männel D, Seifert R: *Problems associated with the use of commercial and non-commercial antibodies against the histamine H₄ receptor*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2012 Sep;385(9):855-60.

6.5. Veröffentlichte Abstracts von Postern und Vorträgen

Neumann D, **Beermann S**, Kaefer V, Seifert R: *Analysis of the effect of histamine on the interferon- γ synthesis mouse spleen and thymus cells*. 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie. Mainz, 10. bis 12. März 2009

Beermann S, Seifert R, Neumann D: *Analysis of the Effect of Histamine on the Interferon- γ Synthesis in Mouse Spleen Cells*. 2nd European Congress of Immunology ECI. Berlin, 13. bis 16. September 2009

Seifert R, Schnell D, Schneider E, Igel P, Buschauer A, **Beermann S**, Neumann D: *Molecular analysis of the histamine H₄-receptor and its pathophysiological role in bronchial asthma*. COST WG4 Meeting, 2009

Beermann S, Seifert R, Neumann D: *Complex interaction of Histamin H₁- and H₄-receptors in the pathogenesis of murine ovalbumin-induced asthma*. 51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie. Mainz, 23. bis 25. März 2010

Neumann D, **Beermann S**, Möhner D, Seifert R: *Histamine indirectly reduces IFN- γ production in murine T-cells*. 51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie. Mainz, 23. bis 25. März 2010

Neumann D, **Beermann S**, Vauth M, Möhner D, Resch K, and Seifert R: *Histamine indirectly reduces IFN- γ production in murine T-cells*. 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie. Leipzig 22. -25. September 2010

Beermann S, Seifert R, Neumann D: *Analysis of the effect of selective histamine receptor ligands at murine H₁R and H₄R recombinantly expressed in HEK293 cells*. 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie. Frankfurt, 30. März bis 01. April 2011

Beermann S, Seifert R, Neumann D: *Analysis of the signalling pathways of murine H₁R and H₄R recombinantly expressed in HEK293 cells*. 78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie. Dresden, 19. bis 22. März 2012

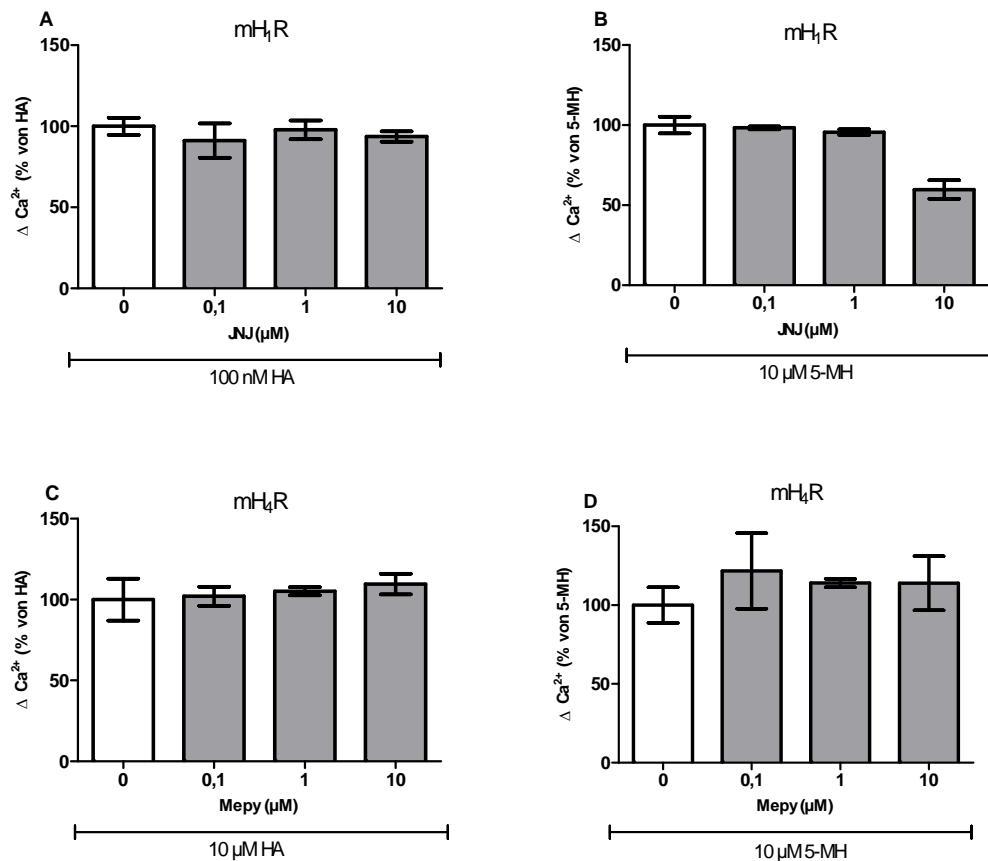
6.6. Qualifikationen und Fortbildungen

- *Strahlenschutzkurs nach Fachkundegruppe S4.2 mit den Inhalten der Module GH und OH.* Fachkunde nach Strahlenschutzverordnung (StrlSchV). Medizinische Hochschule Hannover, Hannover 18. November 2006
- *Basics in Laboratory Animal Science and Perioperative Management.* Medizinische Hochschule Hannover, 16. Januar 2009
- *Tiermodelle in der Pharmakologischen Forschung.* Advanced Courses in Pharmakology, Mainz 09. März 2009
- *Arzneimittelinteraktionen, -metabolismus und -transport.* Advanced Courses in Pharmakology, Mainz 09. März 2009.
- *Fortbildungslehrgang Gentechnische Sicherheit für Projektleiter und Beauftragte für biologische Sicherheit nach § 15 Abs.2 Satz 1 Nr. 3 GenTSV.* Medizinische Hochschule Hannover, Hannover 24. bis 25. März 2009
- *Current concepts in Immunology.* 1st Autumnschool der DGfI, Bad Schandau, 04. bis 09. Oktober 2009
- *Models of Asthma and COPD.* 9. Workshop Fraunhofer ITEM, Hannover, 22. bis 23. Januar 2010
- *Methoden zur Analyse G-Protein gekoppelter Rezeptoren.* Advanced Courses in Pharmakology, Mainz 22. März 2010
- *Moderne Massensektrometrie in der Pharmakologie.* Advanced Courses in Pharmakology, Mainz, 22. März 2010
- *MACSQuant Analyser Training.* Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, 28. Juni bis 01. Juni 2010
- *Fachkunde im Strahlenschutz gemäß StrlSchV.* Leibniz Universität Hannover, Hannover 03. November 2011
- *New Microscopic Techniques.* Advanced Courses in Pharmakology, Dresden 19. März 2012
- *Predictors of Drug Response.* Advanced Courses in Pharmakology, Dresden 19. März 2012

6.7. Daten im Anhang

Einfluss des mH₁R und mH₄R auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration in HEK293-Zellen

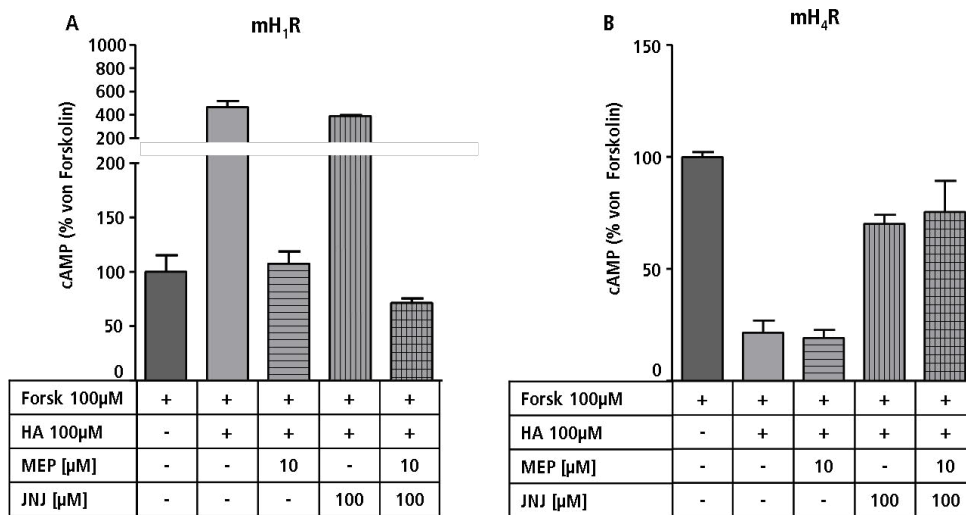
Einfluss des H₄R-Antagonisten JNJ7777120 auf den mH₁R-vermittelten Histamin- bzw. 5-Methylhistamin-Effekt und des H₁R-Antagonisten Mepyramin auf den mH₄R-vermittelten Effekt auf die [Ca²⁺]_i.



Anhang I: Effekt von JNJ7777120 auf den durch Histamin bzw. 5-Methylhistamin induzierten Anstieg der [Ca²⁺]_i über den mH₁R und von Mepyramin auf den Anstieg der [Ca²⁺]_i über den mH₄R. Stabil transfizierte HEK293 mH₁R-(A+B) und mH₄R-Zellen (C+D) wurden mit Fura-2 AM beladen und mit verschiedenen Konzentrationen an JNJ7777120 (A+B) oder Mepyramin (C+D) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 nM (A) oder 10 μM (C) Histamin oder 10 μM 5-Methylhistamin (B+D) stimuliert. Die Änderung der [Ca²⁺]_i wurde über die Fluoreszenzintensität bei einer Exzitationswellenlänge von 340 nm und 380 nm bestimmt. Die Stimulation mit Histamin bzw. 5-Methylhistamin wurde als 100 % angenommen.

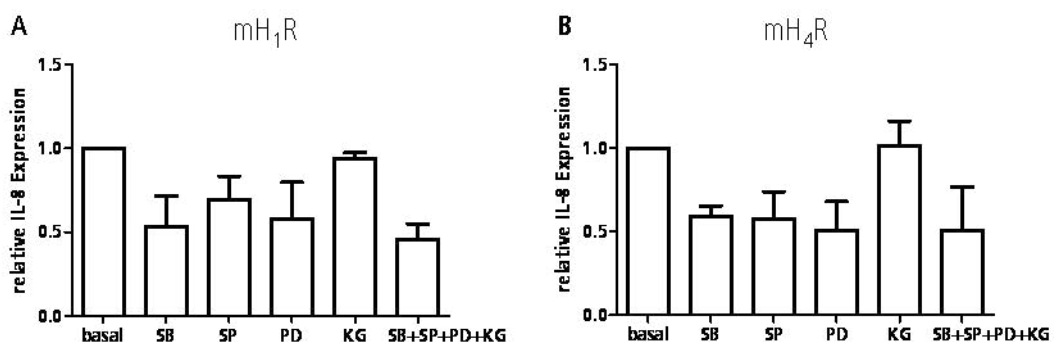
Einfluss des mH₁R und mH₄R auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration
in HEK293-Zellen

Einfluss des H₁R-Antagonisten Mepyramin und des H₄R-Antagonisten JNJ777120 oder einer Kombination beider Antagonisten auf den mH₁R- und mH₄R-vermittelten Histamin-Effekt auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration.

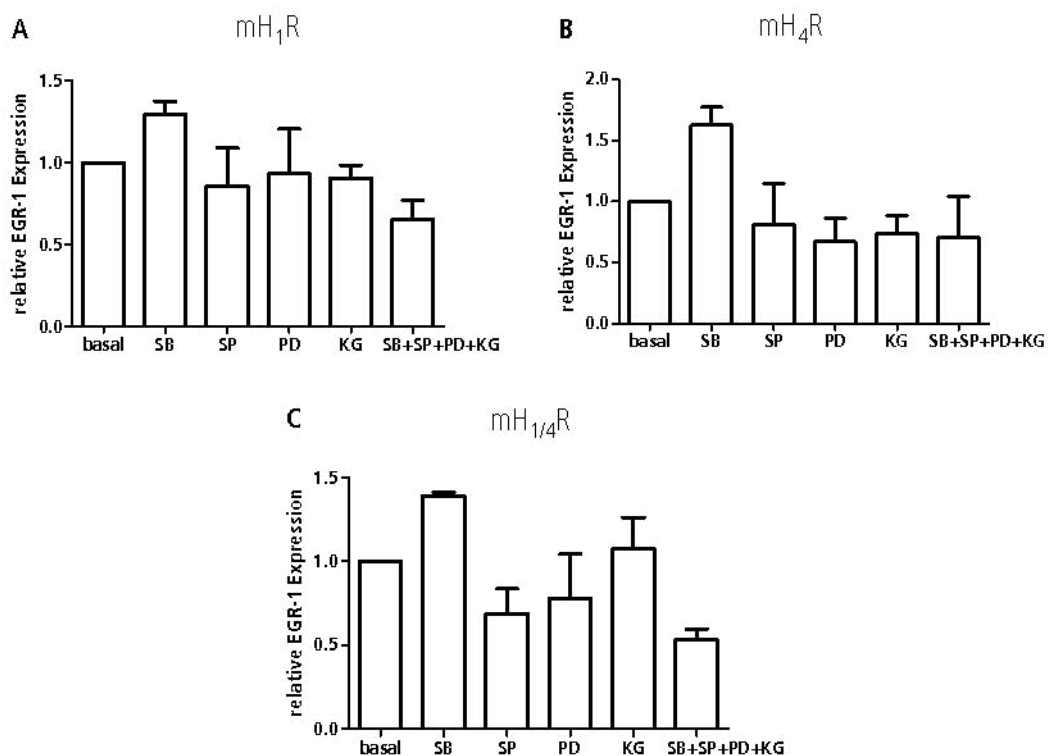


Anhang II: Effekt von Histamin auf den Forskolin-induzierten cAMP-Anstieg über den mH₁R und mH₄R und die Inhibition mit den Antagonisten Mepyramin und JNJ777120. Zu den stabil transzierte HEK293 mH₁R-(A) und mH₄R-Zellen (B) wurde zuerst Mepyramin und/oder JNJ777120 in angegebener Konzentration gegeben und dann mit oder ohne 100 µM Histamin stimuliert. Anschließend wurde zu den Zellen 100 µM Forskolin oder DMSO als Kontrolle geben und für 10 min inkubiert. Die intrazelluläre cAMP-Konzentration wurde nach Extraktion mittels HPLC/MS/MS bestimmt und auf die Protein-Konzentration bezogen. Die Stimulation mit Forskolin wurde als 100 % angenommen.

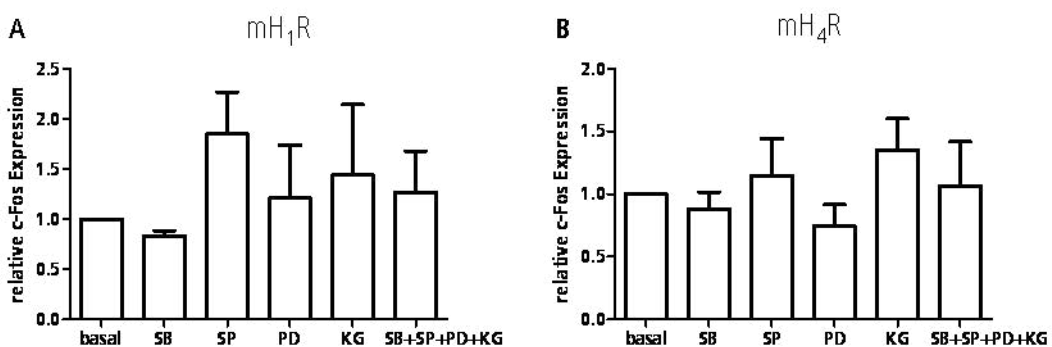
Expression von IL-8 ohne Stimulation mit Histamin



Anhang III: Effekt von MAPK-Inhibitoren auf die Expression von IL-8 ohne Stimulation mit Histamin. Stabil transzierte HEK293 mH₁R- (A) und mH₄R-Zellen (B) wurden für 1 h mit 50 µM PD 980598, für 30 min mit 2 µM SB 203580 bzw. 20 µM SP 600125 oder 20 min mit 25 µM KG 501 vorinkubiert und anschließend ohne weitere Stimulation für 4 h inkubiert. Eine Probe (basal) wurde nicht mit Inhibitoren vorinkubiert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen extrahiert und durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Expression von IL-8 wurde mittels Real-Time PCR unter der Verwendung von Taq-Man Sonden nachgewiesen. Dargestellt ist die relative IL-8-Expression bezogen auf die unstimulierten Zellen.

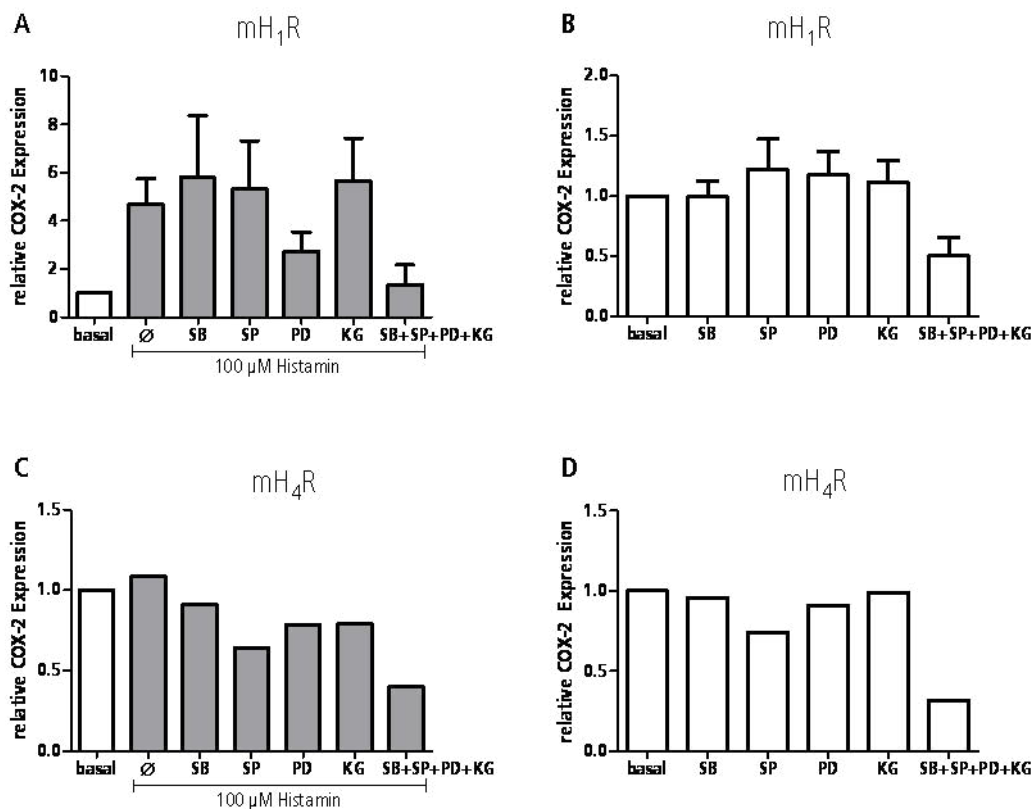
Expression von EGR-1 ohne Stimulation mit Histamin

Anhang IV: Effekt von MAPK-Inhibitoren auf die Expression von EGR-1 ohne Stimulation mit Histamin. Stabil transfizierte HEK293 mH₁R- (A), mH₄R- (B) und mH_{1/4}R-Zellen (C) wurden für 1 h mit 50 μ M PD 980598, für 30 min mit 2 μ M SB 203580 bzw. 20 μ M SP 600125 oder 20 min mit 25 μ M KG 501 vorinkubiert und anschließend ohne weitere Stimulation für 4 h inkubiert. Eine Probe (basal) wurde nicht mit Inhibitoren vorinkubiert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen extrahiert und durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Expression von EGR-1 wurde mittels Real-Time PCR unter der Verwendung von Taq-Man Sonden nachgewiesen. Dargestellt ist die relative EGR-1-Expression bezogen auf die unstimulierten Zellen.

Expression von c-Fos ohne Stimulation mit Histamin

Anhang V: Effekt von MAPK-Inhibitoren auf die Expression von c-Fos ohne Stimulation mit Histamin. Stabil transfizierte HEK293 mH₁R- (A) und mH₄R-Zellen (B) wurden für 1 h mit 50 μ M PD 980598, für 30 min mit 2 μ M SB 203580 bzw. 20 μ M SP 600125 oder 20 min mit 25 μ M KG 501 vorinkubiert und anschließend ohne weitere Stimulation für 4 h inkubiert. Eine Probe (basal) wurde nicht mit Inhibitoren vorinkubiert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen extrahiert und durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Expression von c-Fos wurde mittels Real-Time PCR unter der Verwendung von Taq-Man Sonden nachgewiesen. Dargestellt ist die relative c-Fos-Expression bezogen auf die unstimulierten Zellen.

Expression von COX-2 mit und ohne Stimulation mit Histamin



Anhang VI: Effekt von MAPK-Inhibitoren auf die Expression von COX-2 nach Stimulation mit und ohne Histamin. Stabil transfizierte HEK293 mH₁R- (A+B) und mH₄R-Zellen (C+D) wurden für 1 h mit 50 µM PD 980598, für 30 min mit 2 µM SB 203580 bzw. 20 µM SP 600125 oder 20 min mit 25 µM KG 501 vorinkubiert und anschließend für 4 h mit (A+C) oder ohne (B+D) 100 µM Histamin stimuliert. Eine Probe (basal) wurde weder mit Inhibitoren behandelt noch mit Histamin stimuliert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen extrahiert und durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Expression von COX-2 wurde mittels Real-Time PCR unter der Verwendung von Taq-Man Sonden nachgewiesen. Dargestellt ist die relative COX-2-Expression bezogen auf die unstimulierten Zellen.