

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE
PROF. DR. JENS SCHLOSSMANN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Interaktionen von Histamin H₁-Rezeptoragonisten und
-antagonisten mit dem humanen Histamin H₄-Rezeptor

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Karl-Friedrich Deml

2011

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE
PROF. DR. JENS SCHLOSSMANN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Interaktionen von Histamin H₁-Rezeptoragonisten und
-antagonisten mit dem humanen Histamin H₄-Rezeptor

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Karl-Friedrich Deml

2011

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jens Schlossmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Hehlhans

Tag der mündlichen Prüfung: 08.03.2012

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII

1 Einleitung	1
1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	1
1.1.1 Klinische und pharmakologische Bedeutung G-Protein gekoppelter Rezeptoren	1
1.1.2 Gemeinsame Merkmale und Liganden	1
1.1.3 Klassifikation G-Protein gekoppelter Rezeptoren	2
1.1.4 Struktur und Funktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren	2
1.1.4.1 Funktion am Beispiel des β_2 -Rezeptors	3
1.1.4.2 Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren am Beispiel des Histamin H_4 -Rezeptors	4
1.1.5 Fusionsproteine und Insektenzellen als Modell zur Analyse G-Protein- gekoppelter Rezeptoren	5
1.2 Histaminrezeptoren	6
1.2.1 Der H_1 -Rezeptor	6
1.2.2 Der H_2 -Rezeptor	7
1.2.3 Der H_3 -Rezeptor	7
1.2.4 Der H_4 -Rezeptor	8
1.3 Maximale Wirkstärke eines Liganden	9
1.4 Zweizustandsmodell der Rezeptoraktivierung	9

1.5	Übersicht verwendeter Liganden.....	10
1.6	Fragestellung.....	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Lösung verwendeter Liganden	16
2.2	Substanzen und Hersteller	16
2.3	Geräteliste	18
2.4	Zellkultur und Transfektion	19
2.5	Membranpräparation	20
2.6	[³ H]Histamin-Kompetitionsbindungsversuche.....	21
2.7	GTPase-Versuche	22
2.8	Datenauswertung	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Resultate der Sf9-Zell-Membranpräparationen	25
3.2	[³ H]-Histamin-Kompetitionsbindungsversuche.....	26
3.2.1	H ₁ -Rezeptor-Antagonisten.....	26
3.2.2	2-Phenylhistamine.....	27
3.2.3	Histaprodifene	28
3.2.4	Übersichtstabelle der erzielten pK _i -Werte.....	29
3.3	GTPase-Versuche	31
3.3.1	H ₁ -Rezeptor-Antagonisten.....	31
3.3.2	2-Phenylhistamine.....	32
3.3.3	Histaprodifene	33
3.3.4	Ergebnisübersicht der GTPase-Versuche am hH ₄ R	34
4	Diskussion	36
5	Zusammenfassung.....	39

6	Literaturverzeichnis	40
7	Anhang	46
7.1	Danksagungen	46
7.2	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	48
7.3	Eidesstattliche Erklärung	49

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zyklus G-Protein-gekoppelter Rezeptoren am Beispiel des β_2 AR modifiziert nach Seifert [16].....	4
Abbildung 2: Struktur von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren am Beispiel des H_4 R nach Leurs [15].	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Ligandeneffektivität anhand des Zweizustandsmodells der GPCR-Aktivierung (modifiziert nach Seifert [55]).	10
Abbildung 4: Strukturformeln der untersuchten Liganden, Teil 1 (Nr. 1-18), modifiziert nach Deml et al. [57].	13
Abbildung 5: Strukturformeln der verwendeten Liganden, Teil 2 (Nr. 19-43), modifiziert nach Deml et al. [57].	14
Abbildung 6. Konkurrenz zwischen [3 H]-Histamin (10 nM) und den H_1 R- Antagonisten AST, DPH und MEP in logarithmisch aufgetragener Konzentration am hH_4 R-GAIP + $G\alpha_{i2}$ + $\beta_1\gamma_2$	26
Abbildung 7: Konkurrenz zwischen [3 H]-Histamin (10 nM) und Vertretern der Gruppe der 2-Phenylhistamine in logarithmisch aufgetragener Konzentration am hH_4 R-GAIP + $G\alpha_{i2}$ + $\beta_1\gamma_2$	27
Abbildung 8: Konkurrenz zwischen [3 H]-Histamin (10 nM) und den Histaprodifenen MHP, PHP und NIHP in logarithmisch aufgetragener Konzentration am hH_4 R-GAIP + $G\alpha_{i2}$ + $\beta_1\gamma_2$	28
Abbildung 9: Regulation der GTPase durch die H_1 -Antagonisten AST, TEF und TEP am hH_4 R-GAIP + $G\alpha_{i2}$ + $\beta_1\gamma_2$	31
Abbildung 10: Stimulation der GTPase durch die 2-Phenylhistamine BPH, 3CPH und MOPH am hH_4 R-GAIP + $G\alpha_{i2}$ + $\beta_1\gamma_2$	32

Abbildung 11: Stimulation der GTPase durch die Histaprodifene NIHP, DMHP,
und DIMHP am hH_4R -GAIP + $G\alpha_{i2}$ + $\beta_1\gamma_2$33

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nach Substanzklassen geordnete Übersicht der getesteten Liganden.....	11
Tabelle 2: Liste der verwendeten Substanzen und deren Hersteller	17
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Geräte.....	19
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Membranpräparationen.....	25
Tabelle 5: Übersicht der erzielten pK _i -Werte.....	30
Tabelle 6: Ergebnisübersicht der GTPase-Assays am hH ₄ R.....	35

Abkürzungsverzeichnis

AppNHp	Adenosin-5`- $[\beta, \gamma]$ -imido]triphosphat
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BB	Bindungspuffer
β AR	beta-adrenerger Rezeptor
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-3`,5`-monophosphat
CHO-Zellen	Zellen aus den Ovarien des chinesischen Hamsters
Cys	Cystein
EC ₅₀	Konzentration der halbmaximalen Stimulation
ECL	extrazelluläre Schleife
EDTA	Ethylendinitriltetraessigsäure
E _{max}	maximale Effektivität
FBS	fetales bovines Serum
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GDP	Guanosin-5`-diphosphat
G _i	AC-inhibierendes G-Protein
Glu	Glutamin
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	GTP-bindendes Protein
G _s	AC-stimulierendes G-Protein
G _{sα}	α -Untereinheit des stimulierenden G-Protein
GTP	Guanosin-5`-triphosphat
$[\gamma$ - ³² P]GTP	$[\gamma$ - ³² P]Guanosin-5`-triphosphat
HA	Histamin
ICL	intrazelluläre Schleife
K _d	Äquilibriumdissoziationskonstante
K _i -Wert	Inhibitionskonstante
LH	luteinisierendes Hormon
pEC ₅₀	logarithmierte Konzentration der halbmaximalen Stimulation
pK _i -Wert	logarithmierte Inhibitionskonstante
Phe	Phenylalanin

Pro	Prolin
SD	Standardabweichung
SEM	Standard Error of the Mean
Ser	Serin
Sf9-Insektenzellen	<i>Spodoptera frugiperda</i> -Insektenzellen
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSH	thyroideastimulierendes Hormon
Tyr	Tyrosin
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung

1 Einleitung

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

1.1.1 Klinische und pharmakologische Bedeutung G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Die Superfamilie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR) bildet mit bis heute mehr als 800 identifizierten Genen die größte Proteinfamilie des menschlichen Genoms [1-3]. Mehr als 50% aller Medikamente haben diese Rezeptorengruppe als Angriffspunkt [4]. Es verwundert deshalb kaum, dass einige der an diesen Rezeptoren angreifenden Pharmaka zu den weltweit meist verkauften Produkten der pharmazeutischen Industrie zählen. Noch sind längst nicht alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in ausreichendem Maße charakterisiert. Aufgrund ihrer hervorragenden Bedeutung werden sie auch in Zukunft eine große Rolle bei der Entwicklung neuer Medikamente spielen [5].

1.1.2 Gemeinsame Merkmale und Liganden

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren haben zwei gemeinsame Merkmale. Zum einen sind sie strukturell aus sieben hydrophoben Transmembrandomänen aufgebaut und zum anderen interagieren sie mit einem G-Protein. Die Bezeichnung „Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren“ wäre korrekter, da in den letzten Jahren auch G-Protein unabhängige Signalwege entdeckt worden sind [6-7]. Innerhalb der Transmembrandomänen zeigen die GPCRs die größte Strukturhomologie. Die größten Unterschiede zeigen sich am Aminoterminus, am Carboxylterminus und in der dritten intrazellulären Schleife, die die Transmembrandomänen 5 und 6 verbindet. Die Länge des Aminoterminus variiert dabei zwischen 10 und mehreren hundert Aminosäuren [8].

Die endogenen Liganden der GPCRs weisen eine große strukturelle Diversität auf. Diese reichen von Photonen über Ionen, kleine organische Moleküle, Peptide bis hin zu Proteinen. Obwohl es bereits gelungen ist, die Ligandenbindungsstellen bei einigen GPCRs zu identifizieren, erlaubt die Größe der Liganden keine Voraussage über den Bindungsort [9].

1.1.3 Klassifikation G-Protein gekoppelter Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren werden in 5 Hauptgruppen unterteilt, die 2003 durch Fredriksson et al. erstmals festgelegt worden sind [1]. Die mit Abstand größte Gruppe bildet die Rhodopsin-Familie mit insgesamt 701 Mitgliedern. Innerhalb der Rhodopsin-Familie unterscheidet man 4 Gruppen. Die α -Gruppe mit 89 Rezeptoren, darunter die Prostaglandin-, Melatonin-, biogenen Amin- und Opsin-Rezeptoren. Zu den Aminrezeptoren zählen u. a. die Histaminrezeptoren. Zur β -Gruppe zählen 35 Rezeptoren. Einige ihrer Vertreter sind die Cholezystokinin-, die Neurotensin- und die Oxytocin-Rezeptoren. Aus insgesamt 59 Rezeptoren besteht die γ -Gruppe. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind die Somatostatin-, die Opioid- und die Chemokinrezeptoren. Die δ -Gruppe bildet mit ihren 58 plus geschätzten 460 olfaktorischen Rezeptoren die größte Gruppe aller GPCRs. Zur δ -Gruppe zählen u. a. die TSH-, FSH, und LH-Rezeptoren.

Deutlich weniger Mitglieder als die Großfamilie der Rhodopsin-Rezeptoren haben die Adhäsions-Familie (24 Mitglieder), die Geschmacks-Familie (24 Mitglieder), die Glutamat-Familie (15 Mitglieder) und die Sekretin-Familie (15 Mitglieder).

1.1.4 Struktur und Funktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Die Publikation der ersten Kristallstrukturen G-Protein gekoppelter Rezeptoren in den Jahren 2007 und 2008 bedeutete einen wesentlichen Fortschritt im Verständnis der Struktur und Funktion dieser größten Gruppe von Transmembranproteinen [10-13]. Dennoch beschränkt sich das derzeitige Wissen auf die Kristallstrukturen des humanen β_2 -Rezeptors, des β_1 -Adrenozeptors des Truthahns, des humanen Adenosin A_{2A} -Rezeptors, des bovinen

Opsins und die aktive Form von Rhodopsin. Diese besitzen Modellcharakter für andere G-Protein gekoppelter Rezeptoren, deren Kristallstrukturen aufgrund der extremen Schwierigkeit der Kristallzüchtung noch nicht vorliegen [12].

1.1.4.1 Funktion am Beispiel des β_2 -Rezeptors

Durch die Bindung von Adrenalin oder Noradrenalin (Agonisten) an den β_2 -Adrenozeptor kommt es zur Aktivierung der stimulatorischen Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins (G_{α_s}), was zum Abbinden von GDP mit nachfolgendem Austausch gegen GTP führt. Anschließend dissoziiert das G-Protein in seine α -Untereinheit und einen Komplex aus β - und γ -Untereinheit. Die α -Untereinheit stimuliert die Adenylylzyklase (Effektor des G_{α_s}), wodurch es zum Anstieg der Konzentration von cAMP, der Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase und schließlich zur Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen kommt. Sobald das GTP durch die der α -Untereinheit inhärenten GTPase wieder zu GDP und P_i hydrolysiert ist, reassoziieren die Untereinheiten des G-Proteins, was einen Neubeginn des Zyklus ermöglicht [14]. Das beschriebene Funktionsschema wird in Abbildung 1 veranschaulicht.

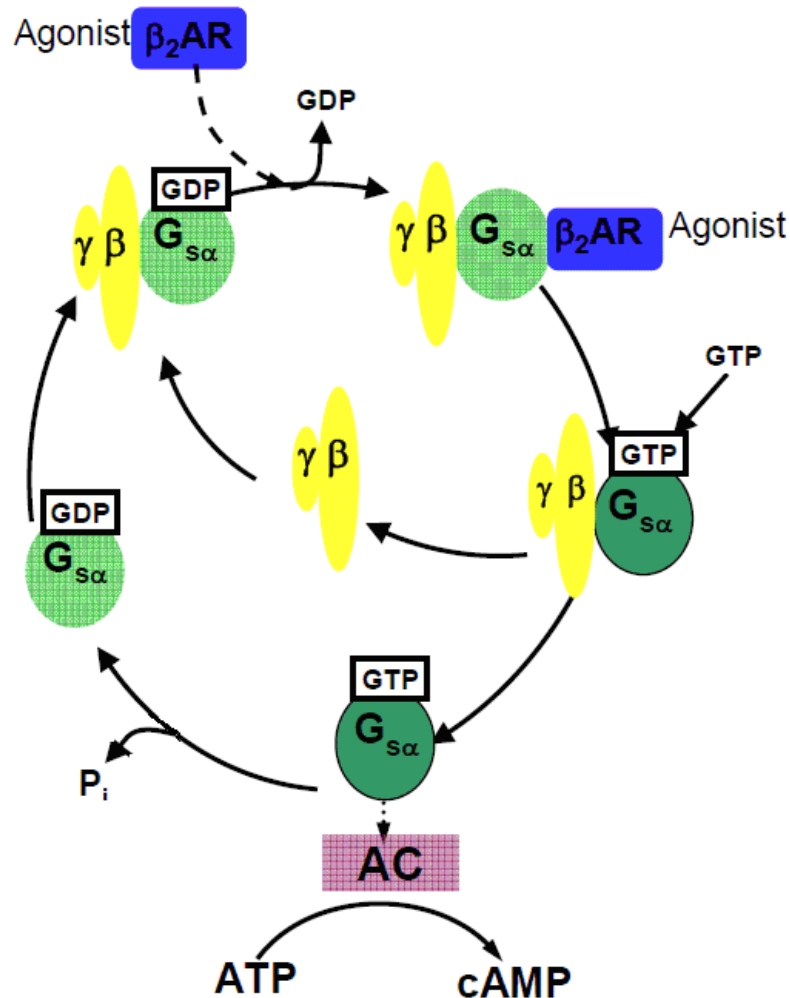


Abbildung 1: Zyklus G-Protein-gekoppelter Rezeptoren am Beispiel des β_2 AR modifiziert nach Seifert [16].

1.1.4.2 Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren am Beispiel des Histamin H_4 -Rezeptors

Abbildung 2 zeigt den Histamin H_4 -Rezeptor. Dieser besteht aus 390 Aminosäuren, die insgesamt 7 Transmembrandomänen mit drei extra- und intrazellulären Schleifen bilden. Der N-Terminus befindet sich extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär. Die gepunktete Linie repräsentiert die Disulfidbrücke, welche die Cysteine in der dritten Transmembran- und zweiten extrazellulären Schleife miteinander verbindet. Fett dargestellt sind Asp3.32 und Glu5.46, welche eine wichtige Rolle bei der Bindung von Histamin spielen. Die H_4 R67-Isoform enthält nur die ersten 67 N-terminalen Reste (in weiss markiert), während der H_4 R302 die in grau

markierten Reste nicht aufweist. Die konservierten Reste in der Familie A der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind in schwarzen Kreisen dargestellt. Die Glycosylierungsstellen (Asn5 und Asn9) sind mit Pfeilen markiert [15].

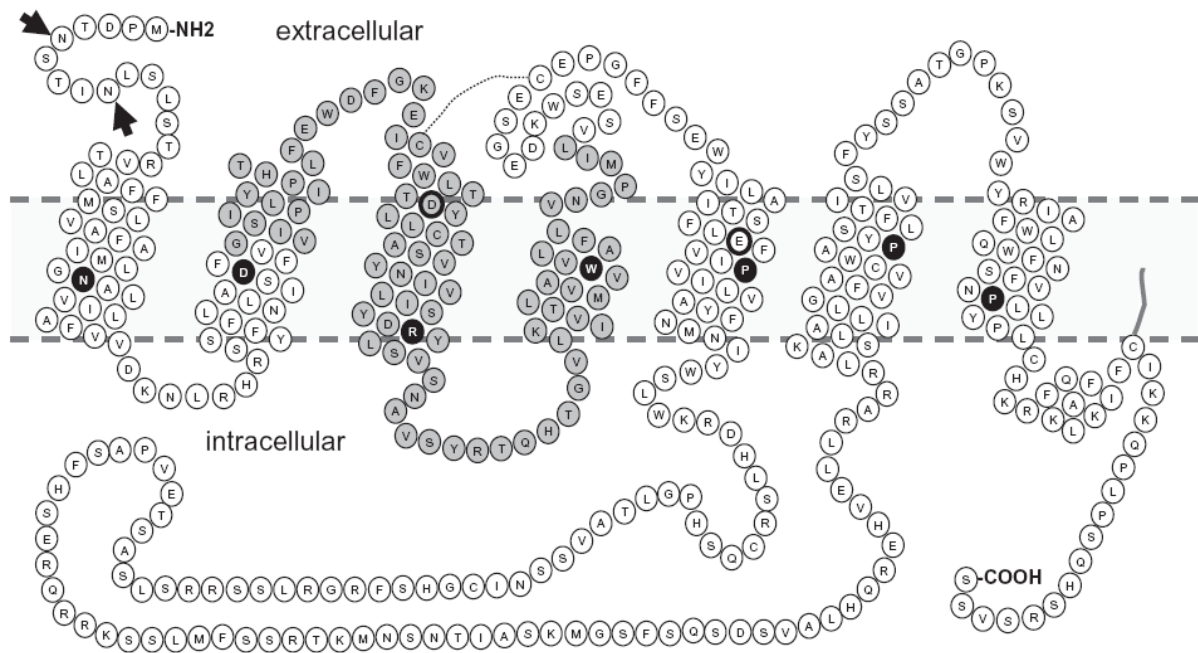


Abbildung 2: Struktur von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren am Beispiel des H₄R nach Leurs [15].

1.1.5 Fusionsproteine und Insektenzellen als Modell zur Analyse G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Mit der Konstruktion des β_2 AR-Gas Fusionsproteins gelang Bertin *et al.* die Entwicklung einer Methode, welche die Messung der GTPase-Aktivität erlaubt [16-17]. Bei diesem Fusionsprotein ist der Carboxyterminus des GPCR kovalent mit dem Aminoterminus der α -Untereinheit des G-Proteins verbunden. Vorteil dieses Konstrukts sind die definierte 1:1 Stöchiometrie zwischen Rezeptor und G-Protein und die räumliche Nähe zwischen GPCR, G-Protein und der Zellmembran. Dadurch wird eine effiziente Kopplung ermöglicht und es kön-

nen viele funktionelle Untersuchungen wie GTPase-Assays, AC-Assays und Bindungsversuche durchgeführt werden [18-21].

Ein geeignetes Expressionssystem sind *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-Insektenzellen, weil sie G_s-ähnliche Proteine nur in geringem Ausmaß exprimieren, und eine geringe endogene GTPase-Aktivität besitzen [16]. Obwohl es sich bei Fusionsproteinen um ein künstlich hergestelltes Konstrukt handelt, konnten zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass es im Bezug auf die Ligandenaffinität, -effektivität und -bindung keine großen Unterschiede zwischen fusionierten und unfusionierten Rezeptoren gibt [19-20, 22-23]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die mit physiologisch nicht vorkommenden Fusionsproteinen erzielten Ergebnisse auch auf physiologisch vorkommende, unfusionierte Systeme übertragbar sind.

1.2 Histaminrezeptoren

Allen bisher bekannten vier Histaminrezeptorsubtypen ist gemein, dass sie der Gruppe G-Protein gekoppelter Rezeptoren angehören und Histamin als endogenen Liganden besitzen [24]. Seit der Entdeckung des Histamins durch Sir Henry Dale im Jahr 1910 ist ein ganzes Jahrhundert vergangen, in dem dieses kurzwirksame biogene Amin, welches durch die katalytische Aktivität des Enzyms Histidindecaboxylase aus der Aminosäure Histidin synthetisiert wird, zu einem der meist beforschten Substanzen der biomedizinischen Wissenschaften wurde [25-26].

1.2.1 Der H₁-Rezeptor

H₁-Rezeptoren koppeln an G_q-Proteine, was zur Aktivierung von Phospholipase C, Produktion von Inositol-1,4,5-trisphosphat und Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern führt [27]. Dieser Rezeptorsubtyp wird u.a auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert, wo der H₁-Rezeptor Vasodilation und Bronchokonstriktion vermittelt. Therapeutisch werden H₁R-Antagonisten schon seit mehr als sechs Jahrzehnten erfolgreich zur Behandlung allergischer Reaktionen vom Typ 1 verwendet, wo sie Blockbusterstatus erlang-

ten [24]. Außerdem findet man H_1 -Rezeptoren im ZNS, wo durch diesen Rezeptorsubtyp u.a. der Schlaf-Wach-Rhythmus reguliert wird. Anhand von Experimenten an H_1 R-Knockout-Mäusen wurden zahlreiche Funktionen des H_1 -Rezeptors entdeckt. Dazu zählen Lokomotion, exploratorisches Verhalten, kognitive Funktionen, sensorische Informationsverarbeitung, Schmerzempfinden und Essverhalten [28-29]. Die bei der Verwendung von H_1 R-Antagonisten der ersten Generation beobachteten sedativen Effekte, die sowohl als unerwünschte Arzneimittelwirkung aber auch therapeutisch eingesetzt werden, sind ebenfalls ZNS-vermittelt und auf die Penetration der Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen [30].

1.2.2 Der H_2 -Rezeptor

H_2 -Rezeptoren aktivieren G_s -Proteine und führen zu einem Anstieg von cAMP [31]. Sie werden von Belegzellen im Magen exprimiert, wo sie die Sekretion von Magensäure vermitteln. Diese Entdeckung führte zur Entwicklung von H_2 -Rezeptorantagonisten, für deren Entwicklung Sir James Black 1988 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet worden ist [32]. Weiterhin findet man den H_2 -Rezeptor auf T-Zellen, wo ihre Aktivierung durch verminderte Expression spezifischer Zytokine zu einer Verringerung Th_1 - und Th_2 -Zell vermittelter Immunreaktionen führt [33]. Ebenso hemmt der H_2 -Rezeptor die Aktivierung neutrophiler Granulozyten [34].

1.2.3 Der H_3 -Rezeptor

Der H_3 -Rezeptor ist ein $G_{\alpha_{i/o}}$ -gekoppelter präsynaptischer Autorezeptor, der sowohl die Freisetzung von Histamin als auch von anderen Neurotransmittern inhibiert. Er wird vorwiegend im ZNS exprimiert, wo er auf histaminergen Neuronen vorgefunden wird, die ihren Ursprung im Nucleus tuberomamillaris nehmen und sich von dort aus im Gehirn ausbreiten. Zudem wird dieser Rezeptor vorwiegend in der Amygdala, im zerebralen Kortex, Globus pallidus, Hippocampus, Hypothalamus, Nucleus accumbens und im Striatum exprimiert [35]. Peripher ist er in den Atemwegen, im Gastrointestinaltrakt und im kardiovaskulären System

lokalisiert [36]. Zurzeit sind keine H₃R-Liganden auf dem Arzneimittelmarkt zugelassen, aber es werden klinische Studien mit H₃R-Antagonisten zur Behandlung von Essstörungen, Denk- und Aufmerksamkeitsstörungen sowie bestimmten Epilepsieformen durchgeführt. Mögliche Anwendungen für H₃R-Antagonisten wären dementsprechend die Behandlung kognitiver Störungen, Depression, Epilepsie, Fettsucht, Insomnie, Narkolepsie und Schizophrenie [37]. In einem Mausmodell konnte die protektive Wirkung des H₃-Rezeptors bei zerebraler Malaria und die Bedeutung dieses Rezeptors für die Funktion der Blut-Hirnschranke nachgewiesen werden, was auf eine Beteiligung dieses Rezeptors an neuroinflammatorischen Prozessen hinweist [38].

1.2.4 Der H₄-Rezeptor

Der H₄-Rezeptor wird vorwiegend auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs vorgefunden. Dazu zählen Basophile, Eosinophile, dendritische Zellen, Mastzellen, Monozyten und T-Zellen. Er ist an Pertussistoxin-sensitive G_i/G_o-Proteine gekoppelt, welche die Bildung von cAMP über Adenylylzyklasen inhibieren, und über β- und γ-Untereinheiten zu einer Mobilisierung intrazellulären Kalziums und zur Aktivierung Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPKs) führen [39-40]. Dieses jüngste Mitglied der Histaminrezeptorfamilie hat Bedeutung für die Chemotaxis von Mastzellen, Eosinophilen und dendritischen Zellen, sowie die Zytokinproduktion durch dendritische Zellen und T-Zellen. Seit seiner zeitgleichen Entdeckung durch verschiedene Gruppen in den Jahren 2000-01 ist dieses Mitglied der Histaminrezeptorfamilie intensiv beforscht worden [41-46]. *In vivo* Untersuchungen haben gezeigt, dass dieser Rezeptor eine Rolle bei allergischen Prozessen, Asthma, akuter Entzündung, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Krebserkrankungen, neuropathischem Schmerz, Pruritus und rheumatoider Arthritis besitzt [47-53]. Aufgrund dieser hervorragenden Bedeutung ist der H₄-Rezeptor ein attraktives Ziel für die Entwicklung neuer Arzneimittel [24].

1.3 Maximale Wirkstärke eines Liganden

Unter Wirkstärke (Effektivität, E_{\max}) versteht man die maximale biologische Aktivität eines Liganden an einem Rezeptor [12]. Man teilt Liganden entsprechend ihrer Wirkung in verschiedene Klassen ein. Volle Agonisten führen zu einer maximalen Rezeptorstimulation, Partialagonisten erzielen selbst bei Sättigungskonzentrationen keine Vollstimulation, neutrale Antagonisten haben keinen Effekt auf die Rezeptoraktivität, können aber andere Liganden an der Rezeptorbindung hindern, d.h. als kompetitive Antagonisten wirken. Inverse Agonisten bewirken eine Reduktion der basalen oder konstitutiven Aktivität eines Rezeptors [54].

1.4 Zweizustandsmodell der Rezeptoraktivierung

Das Zweizustandsmodell geht von einer GPCR-Isomerisierung von einem inaktiven (R)-Zustand zu einem aktiven (R^*)-Zustand aus. Veranschaulicht wird dies in Abb. 3. Volle Agonisten führen zu einer maximalen Stabilisierung des R^* -Zustands. Volle inverse Agonisten führen zu einer maximalen Stabilisierung des R -Zustands. Neutrale Antagonisten haben keinen Einfluss auf das R/R^* Equilibrium, blockieren aber die Effekte von Agonisten und inversen Agonisten. Partialagonisten und partielle inverse Agonisten haben eine niedrigere Effektivität als volle Agonisten und volle inverse Agonisten [55]. R - zu R^* -Isomerisierung in GPCRs in Abwesenheit von Liganden bezeichnet man als konstitutive Aktivität, die beim H_4 -Rezeptor sehr hoch ist [56].

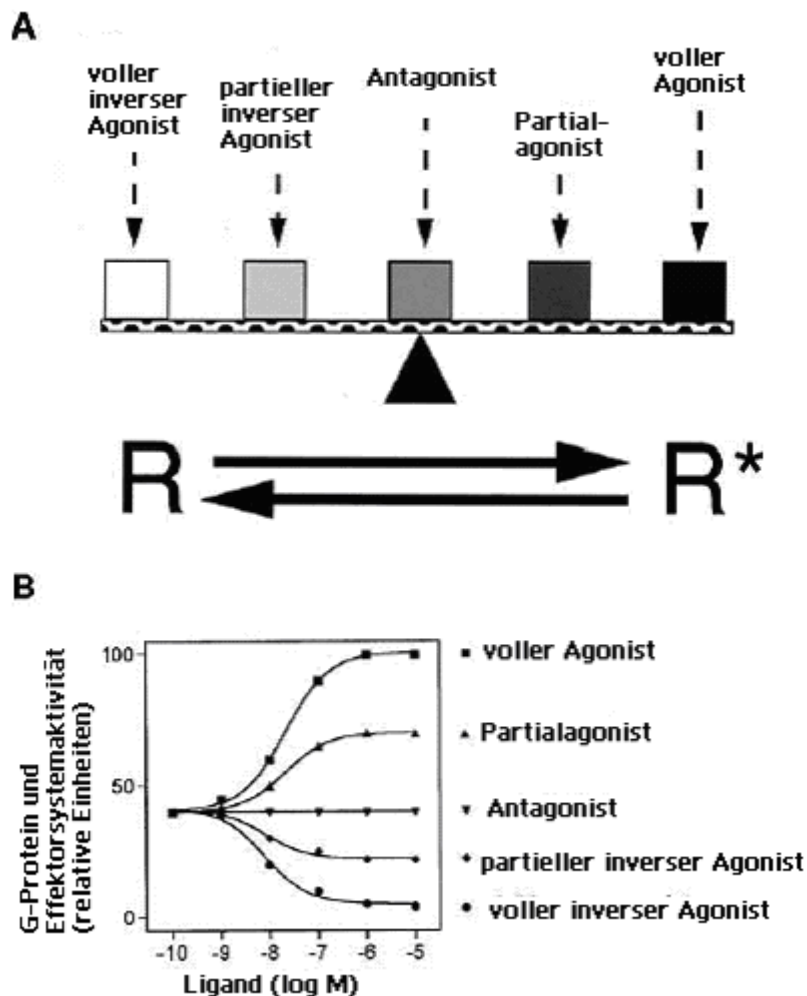


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Ligandeneffektivität anhand des Zweizustandsmodells der GPCR-Aktivierung (modifiziert nach Seifert [55]).

1.5 Übersicht verwendeter Liganden

Es wurden insgesamt 18 H₁R-Antagonisten und 22 H₁R-Agonisten untersucht, darunter 8 H₁R-Antagonisten der ersten Generation, 6 der zweiten Generation und 3 Antidepressiva. Unter den untersuchten 22 H₁R-Agonisten stellten die 2-Phenylhistamine mit 12 Vertretern die größte untersuchte Gruppe dar. Als Referenzsubstanz für einen inversen Agonisten diente Thioperamid [56]. Ebenso zu den Untersuchungen zählte JNJ7777120, der einzig bisher verfügbare selektive Antagonist am H₄R [49]. Die folgende Tabelle und die Abbildungen 4 und 5 geben einen Überblick über die Diversität der analysierten Liganden.

Tabelle 1: Nach Substanzklassen geordnete Übersicht der getesteten Liganden.

	Nr.	hH ₄ R	
		Abkürzung	Substanzname
H₁R Antagonisten, erste Generation	1	TRI	Tripolidin
	2	DPH	Diphenhydramin
	3	MEP	Mepyramin
	4R	(+)-DMT	(+)-Dimethinden
	4S	(-)-DMT	(-)-Dimethinden
	5	CPI	(+)-Chlorpheniramin
	6	KET	Ketotifen
	7	CLE	Clemastin
H₁R Antagonisten, zweite Generation	8	CYPRO	Cyproheptadin
	9	AST	Astemizol
	10	AZE	Azelastin
	11	TEF	Terfenadin
	12	FEX	Fexofenadin
	13	LEVO	Levocetirizin
	14	LORA	Loratidin
	15	TEP	N-{2-[2-(3-Trifluoromethylphenyl)-1H-imidazol-4-yl]ethyl}piperidin
Antidepressiva	16	DOX	Doxepin
	17	MAPRO	Maprotilin
	18	MIRTA	Mirtazapin
Histamin	19	HIS	Histamin

Kleine Agonisten	20	BET	Betahistin
	21	MEH	2-Methylhistamin
	22	BEH	2-Benzylhistamin
	23	MPTH	2-(4-Methylphenylthiomethyl)histamin
	24	TEA	2-(2-Thiazolyl)ethanamin
2-Phenylhistamine	25	PH	2-Phenylhistamin
	26	2FPH	2-(2-Fluorphenyl)histamin
	27	2MPH	2-(3-Methylphenyl)histamin
	28	MOPH	2-(3-Methoxyphenyl)histamin
	29	TFMPH	2-(3-Trifluormethylphenyl)histamin
	30	3FPH	2-(3-Fluorphenyl)histamin
	31	3CPH	2-(3-Chlorphenyl)histamin
	32	BPH	2-(3-Bromphenyl)histamin
	33	IPH	2-(3-Iodophenyl)histamin
	34	4FPH	2-(4-Fluorphenyl)histamin
	35	4CPH	2-(4-Chlorphenyl)histamin
	36	DFPH	2-(2,4-Difluorphenyl)histamin
Histaprodifene	37	MHP	Methylhistaprodifen
	38	DMHP	Dimethylhistaprodifen
	39	PHP	Pyrrolidinohistaprodifen
	40	NIHP	Suprahistaprodifen
	41	DIMHP	Dimeres Histaprodifen
Referenzliganden	42	THIO	Thioperamid
	43	JNJ	JNJ7777120

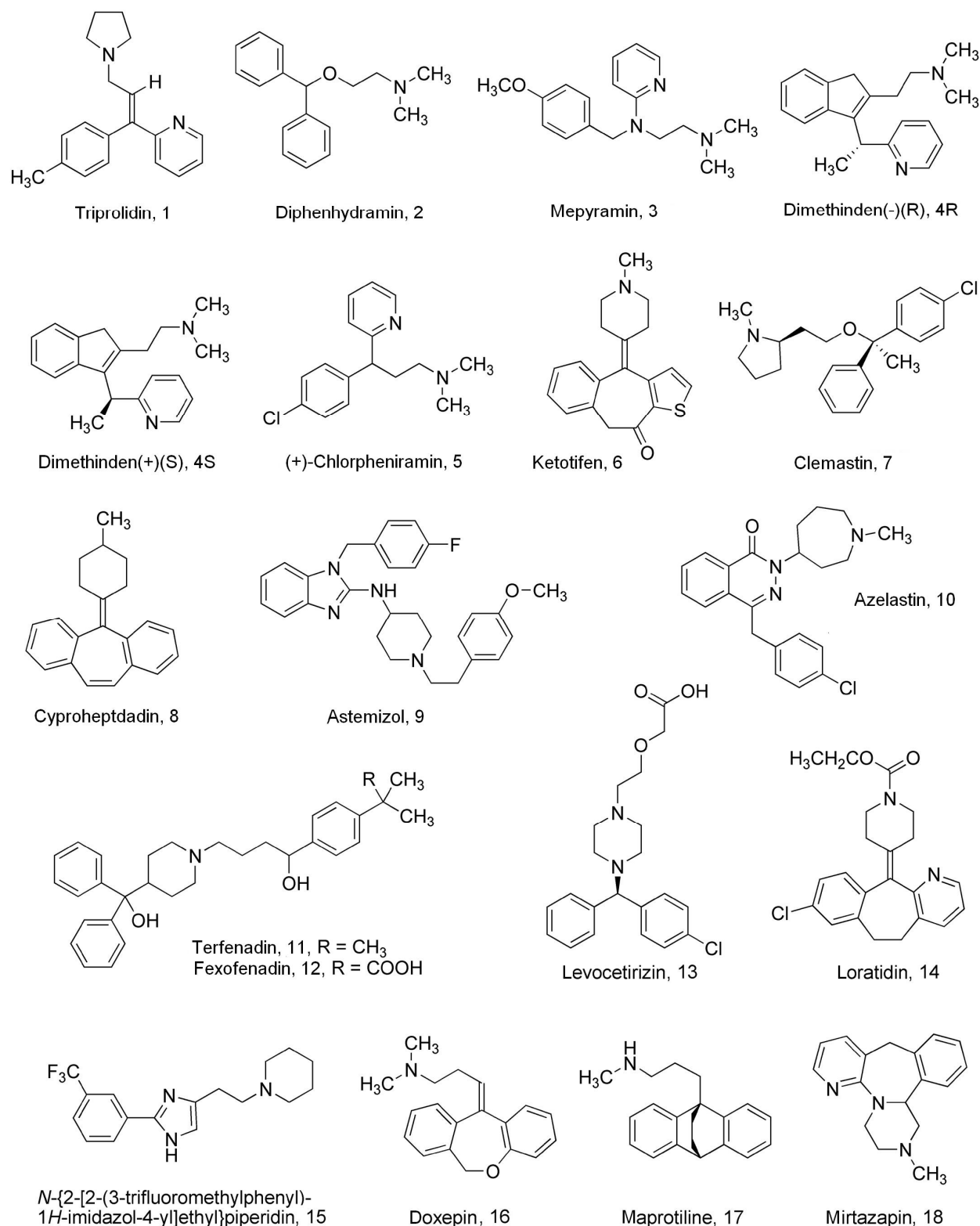


Abbildung 4: Strukturformeln der untersuchten Liganden, Teil 1 (Nr. 1-18), modifiziert nach Deml et al. [57].

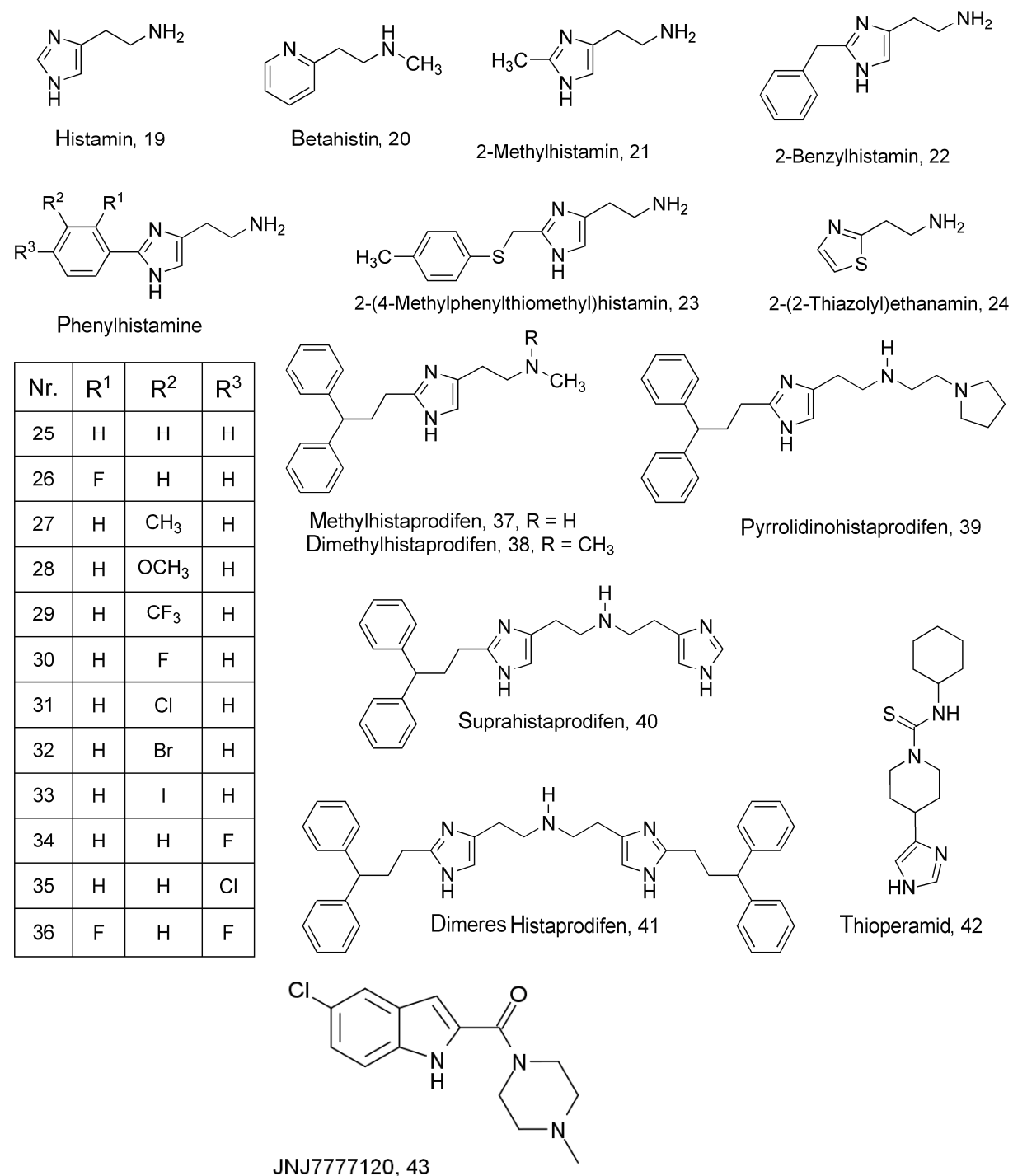


Abbildung 5: Strukturformeln der verwendeten Liganden, Teil 2 (Nr. 19-43), modifiziert nach Deml et al. [57].

1.6 Fragestellung

Seit der zeitgleichen Entdeckung des Histamin H_4 -Rezeptors durch mehrere Gruppen in den Jahren 2000-01 bestand Unklarheit darüber, ob und mit welcher Wirkung klassische Liganden des H_1 R an das neu entdeckte Mitglied der Histaminrezeptoren binden. Die von Nguyen et. al [44] beschriebenen Affinitäten konnten von keiner anderen Gruppe bestätigt werden. Thurmond empfahl deshalb diese Ergebnisse mit Vorsicht zu behandeln [24]. Die Anfertigung dieser Arbeit diente der Klärung dieser Fragestellung. Es erfolgte eine systematische Untersuchung klassischer H_1 R-Agonisten und H_1 R-Antagonisten am humanen H_4 R.

2 Material und Methoden

2.1 Lösung verwendeter Liganden

Die verwendeten Phenylhistamine wurden komplett in Wasser gelöst [58]. Stammlösungen der Histaprodifene, Astemizol, Azelastin, Terfenadin, Fexofenadin, Ketotifen, Clemastin, Cyproheptadin, Mirtazapin und Loratadin (jeweils 10 mM) wurden in Dimethylsulfoxid gelöst. In allen Versuchen mit in Dimethylsulfoxid gelösten Liganden wurde die Dimethylsulfoxidkonzentration auf 5% eingestellt, um eine komplette Lösung der Substanzen zu gewährleisten [57, 59-60].

2.2 Substanzen und Hersteller

Substanz	Hersteller
[³ H]HA, spezifische Aktivität: 14.2 Ci/mmol	Perkin Elmer, Boston, MA, USA
[³² P] _i als H ₃ PO ₄ , spezifische Aktivität: 8500-9120 Ci/mmol zur Synthese von [γ - ³² P]GTP	Perkin Elmer, Boston, MA, USA
Albumin, bovines	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Adenylylimidodiphosphat (AppNHp)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
ATP (Dinatriumsalz), Reinheit: 100%	Roche, Mannheim, Deutschland
Benzamid, aufgereinigt, 99,9%	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Kreatinkinase (CK) vom Hasenmuskel	Roche, Mannheim, Deutschland
Kreatinphosphat, dibasisches Tetrahydrat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
DC Protein Assay Kit II	Bio-Rad Lab., München, Deutschland
EDTA, Titriplex® II	Merck, Darmstadt, Deutschland

Ethanol abs.	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland
fetales bovines Serumalbumin, Hitze-inaktiviert	Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland
GDP (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Gentamycin 50 mg/ml	Cambrex, Wuppertal, Deutschland
GF/C Filter (Glasmikrofaserfilter, 24 mm)	Whatman, Dassel, Deutschland
Graph Pad Prism 4.0 Programm	Graphpad, San Diego, CA, USA
GTP (Dinatriumsalz)	Roche, Mannheim, Deutschland
HCl, rauchend, 37%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Leupeptin, Hemisulfat	EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, USA
Methanol abs.	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland
MgCl ₂ ×6 H ₂ O p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS Puffer (Dulbecco)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Rotizint [®] eco plus	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Scintillation Counter Tri-Carb 2800 TR	Perkin Elmer, Massachusetts, Deutschland
Sf9-Zellen	LGC Promochem, VA, USA
Sf-900 II Zellmedium (1×), flüssig	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Base	USB Europe GmbH, Staufen, Deutschland

Tabelle 2: Liste der verwendeten Substanzen und deren Hersteller

2.3 Geräteliste

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Harvester	M-48R	Brandel, Gaithersburgh, MD, USA
Heizblock	Digital Heatblock	VWR, West Chester, PA, USA
Photometer	Bio-Photometer 4153	ECOM-P Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttler	innova2000, platform shaker	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Szintillationszähler	Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800 TR	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Vortexer	Reax 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Zellinkubator	C24 KC Refrigerated Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Zentrifugen	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Heraeus Multifuge 3L-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Jouan GR4i Centrifuge	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA
Sorvall Super T21	Kendro, Newtown, CT, USA

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Geräte

2.4 Zellkultur und Transfektion

Die Sf9-Zellen wurden in 250 mL Erlenmeyerkolben bei 28°C und einer Rotation von 150 Umdrehungen pro Minute in SF 900 II-Medium kultiviert, welches mit 5% (vol./vol.) fetalem Rinderserum und 0,1 mg mL⁻¹ Gentamycin supplementiert war. Die Zelldichte wurde bei 1,0-6,0 x 10⁶ Zellen mL⁻¹ gehalten [16]. Das Medium wurde alle 2-3 Tage sowie vor jeder Infektion gewechselt. Rekombinante Baculoviren wurden mit Hilfe des BaculoGOLD Transfektionskits generiert. Nach der Transfektion von Sf9-Zellen mit pVL-1392-Plasmiden und einer Kulturzeit von 7 Tagen wurden die Virusstammlösungen durch zwei sequentielle Amplifikationen gewonnen. In einer ersten Amplifikation wurden die Zellen mit einer Dichte von 2,0 x 10⁶ Zellen mL⁻¹ suspendiert und mit einer 1:100 Verdünnung des Überstandes der initial transfizierten Kultur infiziert. Die Zellen wurden für 7 Tage kultiviert, was im Absterben nahezu der gesamten Zellpopulation resultierte. Der Überstand dieser Infektion wurde für 10 min bei 3000 x g zentrifugiert und lichtgeschützt bei 4°C gelagert. In einer zweiten Amplifikation wurden die Zellen mit einer Dichte von 3,0 x 10⁶ Zellen mL⁻¹ gesät und mit einer 1:20 Verdünnung des Überstandes der ersten Amplifikation infiziert. Die Zellen wurden für 48 h kultiviert und der Überstand wurde abzentrifugiert. Die meisten Zellen zeigten nach diesen 48 h Zeichen der Infektion wie Veränderung der Morphologie und Viruseinschlusskörperchen. Die meisten Zellen waren aber noch intakt. Der Überstand der zweiten Amplifikation bildete die

Virusstammlösung zur Infektion der Zellen für die Membranpräparation. Für die Membranpräparation wurden die Zellen mit einer Dichte von $3,0 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} ausgesät und mit einer 1:100 Verdünnung der Virusstammlösung der zweiten Amplifikation infiziert. Die infizierten Zellen wurden 48 h kultiviert. Von einer 100 mL Kultur von mit Baculoviren infizierten Sf9-Zellen erhält man durch Zentrifugation 35-55 mg Membranprotein. Um verschiedene Expressionshöhen von GPCRs und G-Proteinen zu erhalten, können Virusverdünnungen und Infektionsdauer variiert werden. Es ist jedoch schwierig, die Proteinexpression durch Variation dieser Parameter exakt zu kontrollieren [61].

2.5 Membranpräparation

Alle Schritte der Membranpräparation erfolgten bei 4°C . Die Sf9-Zellen wurden abgeerntet, nach Zeichen der Infektion überprüft (s.o.) und für 10 min bei $1000 \times g$ zentrifugiert. In einem einmaligen Waschvorgang wurden die Zellen für 10 Minuten bei $1000 \times g$ in 50 mL Puffer zentrifugiert. Dieser bestand aus 137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 0,5 mM MgCl_2 , 0,9 mM CaCl_2 , 1,5 mM KH_2PO_4 und 0,8 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4. Danach wurden die Zellen mit 25 Hüben in einem Dounce-Homogenisator in 15 mL Puffer lysiert. Im Puffer enthalten waren 1 mM EDTA, 0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ Benzamidin und $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ Leupeptin in 10 mM Tris/HCl, pH 7,4. Durch Zentrifugation bei $500 \times g$ für 5 min wurden die Zellkerne und die unversehrten Zellen entfernt. Die überstehende Suspension wurde für 20 min bei $40000 \times g$ zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde in 20 mL Lysispuffer resuspendiert und wieder zentrifugiert. Die Membranen wurden bei einer resultierenden Proteinkonzentration von 0,5-1,5 mg Protein mL^{-1} in Bindungspuffer (12,5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA in 75 mM Tris/HCl, pH 7,4) suspendiert.

Die Proteinkonzentration wurde mit dem DC Protein Assay Kit von Bio-Rad bestimmt. Als Standardprotein wurde bovines Serumalbumin verwendet. Aus einer Stammlösung (2 mg/ml) wurde eine Verdünnungsreihe in Bindungspuffer hergestellt. Sinnvoll sind fünf bis sechs Konzentrationen in einem Bereich von 100-1000 $\mu\text{g/mL}$ BSA. Es wurden je 20 μL der Standardreihe, 20 μL der suspendierten Membran oder 20 μL BB (Leerwert) mit jeweils 100 μL

Reagenz A` (bestehend aus 1 ml Reagenz A und 20 μ L Reagenz S) und 800 μ L Reagenz B vermischt. Die Inkubationszeit dieses Ansatzes betrug 20 min. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Standardreihe und der Membran mit dem Biophotometer und dem Programm Lowry bestimmt. Die präparierten Sf9-Membranen wurden in 1 mL Aliquots bei -80°C aufbewahrt [16].

2.6 [³H]Histamin-Kompetitionsbindungsversuche

Vor den Versuchen wurden die Membranen nach dem Auftauen bei 4°C und 13000 Umdrehungen pro Minute (U/min) 10 min zentrifugiert und in Bindungspuffer (s. Membranpräparation) resuspendiert. Dieser Waschvorgang war wichtig, um so weit wie möglich endogene Guaninnukleotide zu entfernen. Verbleibende Guaninnukleotide könnten mit der Analyse exogener Guaninnukleotide interferieren. Die Membranen wurden mindestens 30 Mal mit einer Insulinspritze homogenisiert. Dadurch wurde eine optimale Membransuspension erzielt. Zur Bestimmung der pK_i -Werte wurden die Sf9-Membranen (50-100 μ g Protein pro Ansatz, abhängig von der Expressionshöhe) in 250 μ L BB aufgenommen, der mit 0,2% BSA versetzt war. BSA dient der Verhinderung der Adsorption von Membranen an die Wand der Eppendorf-Röhrchen. Die nichtspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 10 μ M THIO bestimmt. Für die Kompetitionsbindungsversuche wurden 10 nM [³H]-Histamin und 5 verschiedene Konzentrationen der Testsubstanz verwendet. Der Ansatz wurde für 60 Minuten bei 25°C und einer Schüttelfrequenz von 250 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Die Trennung von gebundenem und freiem Radioliganden erfolgte mittels Filtration durch GF/C-Filter, die mit 0,3% Polyethylenimin vorbehandelt wurden, sowie dreimaliger Waschung mit eiskaltem Bindungspuffer (4°C). Die Filter-gebundene Radioaktivität wurde mit Hilfe des Szintillationszählers gemessen. Zur Sicherstellung der Lösung und Diffusion der im Filter gebundenen Moleküle in die Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint[®] eco plus) wurde die Radioaktivität erst nach mehreren Stunden gemessen [16].

Bestimmung der absoluten Agonistenbindung

cpm _{total} :	gemessene Radioaktivität der Proben, die die Liganden enthalten
cpm _{unspezifisch} :	gemessene Radioaktivität der Proben, die 10 µM Thioperamid enthalten
pmol [³ H]HA:	absolute Menge an [³ H]HA, die ein Reaktionsgefäß enthält, hier: 5 pmol
cpm _{total zugegeben} :	gemessene Radioaktivität von 50 µL der [³ H]HA-Lösung in 4 mL Szintillationslösung
mg Protein:	zugegebene Menge an Protein (0,05-0,1 mg/Reaktionsgefäß)

$$[\text{pmol/mg}] = \frac{(\text{cpm}_{\text{total}} - \text{cpm}_{\text{unspezifisch}}) \times \text{pmol } [^3\text{H}]_{\text{HA}}}{\text{cpm}_{\text{total zugegeben}} \times \text{mg Protein}}$$

Formel 1: Bestimmung der absoluten Agonistenbindung.

2.7 GTPase-Versuche

Vor der Zugabe von [γ -³²P]GTP (0,1-0,2 µCi/Ansatz) wurden alle Schritte bei 4°C durchgeführt. Zuerst wurden die Liganden (10 µL pro Ansatz) zugegeben. Dann folgte 20 µL Tris/HCl 20 mM, pH 7,4. Der Reaktionsmix beinhaltete final 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 100 µM Adenosin-5´-[β , γ -imido]triphosphat (AppNHp), 100 nM GTP, 100 µM, ATP, 5 mM MgCl₂, 100 µM EDTA, 5 mM Kreatinphosphat, 40 µg Kreatinkinase und 0.2% (mass/vol.) BSA in Millipore H₂O. Für das [γ -³²P]GTP wurde als Lösungsmittel Reaktionsmix genommen.

Tris dient als Puffer, AppNHp hemmt niedrig affine GTPasen, [γ -³²P]GTP wird mit kaltem GTP gemischt, um Radioaktivität zu sparen, die GTPase benötigt Mg²⁺, Kreatinkinase und

Kreatinphosphat (CP) werden zur Regeneration von GTP verwendet ($CP + GDP \rightarrow C + GTP$ unter CK-Katalyse), ATP dient der Regeneration von GTP aus GDP, EDTA komplexiert zweiwertige Ionen und BSA vermindert die Adsorption von Protein und Liganden an die Wand des Reaktionsgefäßes.

Insgesamt befanden sich somit 50 μL Reaktionsmix im Ansatz. Die suspendierten Membranen (10 μg Protein in 20 μL) wurden anschließend in 0,5 ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert (20 μL je Gefäß). Die nun jeweils 80 μL enthaltenden Ansätze wurden in einem Heizblock bei einer Temperatur von 25°C für 2 min inkubiert, bevor 20 μL [γ - ^{32}P]GTP zugegeben wurde. Die Vorinkubation, Start der Reaktion und das Stoppen der Reaktion erfolgten jeweils in Intervallen von 15 s. Um die nicht-enzymatische Degradation von [γ - ^{32}P]GTP zu erfassen, wurden drei Ansätze mit 1 mM GTP mitgetestet.

Die Dauer der Reaktion betrug 20 min. Sie wurde durch die Zugabe von 900 μL Kohlesuspension (4°C), bestehend aus 5% (mass/vol.) aktivierter Kohle und 50 mM NaH_2PO_4 , pH 2,0, terminiert. Ein ständiges Rühren der Kohlelösung war wichtig, weil die Kohlepartikel schnell sedimentieren. Um ein Verstopfen der Pipettenspitze zu verhindern, wurde diese vorher schräg abgeschnitten.

Im Anschluss daran wurden die Proben sieben Minuten bei 15000 g und 4°C zentrifugiert. Pro Ansatz wurden 600 μL des Reaktionsgemisches entnommen und in 6 mL Szintillationsgefäße überführt, in die vorher jeweils 3 mL H_2O gegeben wurde. Die Vermessung der Proben erfolgte im Szintillationszähler [16].

Bestimmung der GTPase-Aktivität:

$\text{cpm}_{\text{total}}$: gemessene Radioaktivität ([^{32}P]P_i) aller Proben, die einen Liganden enthalten

cpm_{GTP} : gemessene Radioaktivität der Proben, die GTP 1 mM final enthalten

$\text{pmol}_{\text{GTP unmarkiert}}$: absolute Menge an GTP, die ein Reaktionsgefäß enthält, hier:

10 pmol (100 nM/100 μl Reaktionsvolumen)

1,66: Korrekturfaktor, da von den 1000 μL Reaktionsansatz nur 600 μl vermessen werden

$\text{cpm}_{\text{zugegeben}}$: gemessene Radioaktivität von 20 μL der $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ -Lösung

in 3 ml H_2O

$\text{min}_{\text{Inkubation}}$: Reaktionszeit (hier: 20 min)

$\text{mg}_{\text{Protein}}$: zugegebene Menge an Protein (10 μg /Reaktionsgefäß)

$$[\text{pmol}/\text{mg}/\text{min}] = \frac{(\text{cpm}_{\text{total}} - \text{cpm}_{\text{GTP}}) \times \text{pmol}_{\text{GTP unmarkiert}} \times 1.66}{\text{cpm}_{\text{zugegeben}} \times \text{mg}_{\text{Protein}} \times \text{min}_{\text{Inkubation}}}$$

Formel 2: Bestimmung der GTPase-Aktivität.

2.8 Datenauswertung

Die Daten wurden mit dem Programm Graph Pad Prism 4.0 ausgewertet. Mit Hilfe dieser Software wurden auch sämtliche Grafiken erstellt. Zur Berechnung der Mittelwerte, der Standardabweichungen und zur Berechnung des Standard Error of the Mean (SEM) wurde Microsoft Excel 2003 benutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Resultate der Sf9-Zell-Membranpräparationen

Spodoptera frugiperda (Sf9)-Insektenzellen wurden in der Vergangenheit häufig und erfolgreich zur Untersuchung der Interaktion von verschiedenen Säugetier-GPCRs mit ihren verwandten G-Proteinen verwendet [62-63]. Aufgrund des Fehlens von endogenen konstitutiv aktiven Rezeptoren [61, 63] ist der Signalhintergrund sehr niedrig. Dieses System eignet sich somit ideal für Untersuchungen zur Bestimmung der Affinität, Potenz und Effektivität von Liganden an den untersuchten Rezeptoren. Die untenstehende Tabelle zeigt die verwendeten Membranen, welche aus drei Membranpräparationen erzielt wurden.

Membran-nummer	Rezeptorfusionsprotein	G α - Untereinheit	G $\beta\gamma$ - Untereinheit	Konzentration Protein [$\mu\text{g/ml}$]
1195	hH ₄ R-RGS19	G α_{i2}	$\beta_1\gamma_2$	582
1428	hH ₄ R-RGS19	G α_{i2}	$\beta_1\gamma_2$	1856
1429	hH ₄ R-RGS19	G α_{i2}	$\beta_1\gamma_2$	1918

Tabelle 4. Übersicht der verwendeten Membranpräparationen.

3.2 [³H]-Histamin-Kompetitionsbindungsversuche

3.2.1 H₁-Rezeptor-Antagonisten

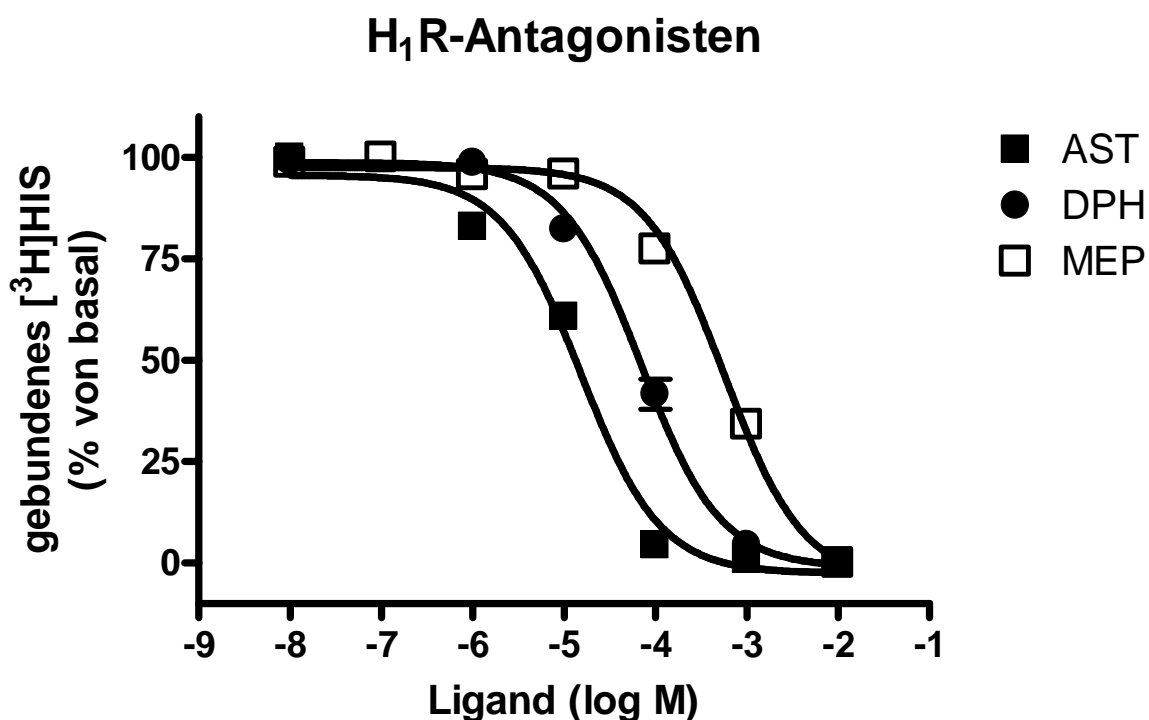


Abbildung 6. Konkurrenz zwischen [³H]-Histamin (10 nM) und den H₁R-Antagonisten AST, DPH und MEP in logarithmisch aufgetragener Konzentration am hH₄R-GAIP + G α_{i2} + $\beta_1\gamma_2$. Es handelt sich um Mittelwerte \pm SEM von bis zu sieben unabhängigen Einzelexperimenten in Triplikaten an verschiedenen Membranpräparationen.

Abbildung 6 zeigt die Konkurrenzkurven für repräsentative H₁R-Antagonisten. AST war mit einem pK_i-Wert von $5,10 \pm 0,06$ der potenteste Vertreter dieser Klasse. Eine um den Faktor 15 niedrigere Affinität zeigte MEP mit einem pK_i-Wert < 4 . DPH lag mit einem pK_i-Wert von 4,37 zwischen AST und dem niedrig affinen MEP.

3.2.2 2-Phenylhistamine

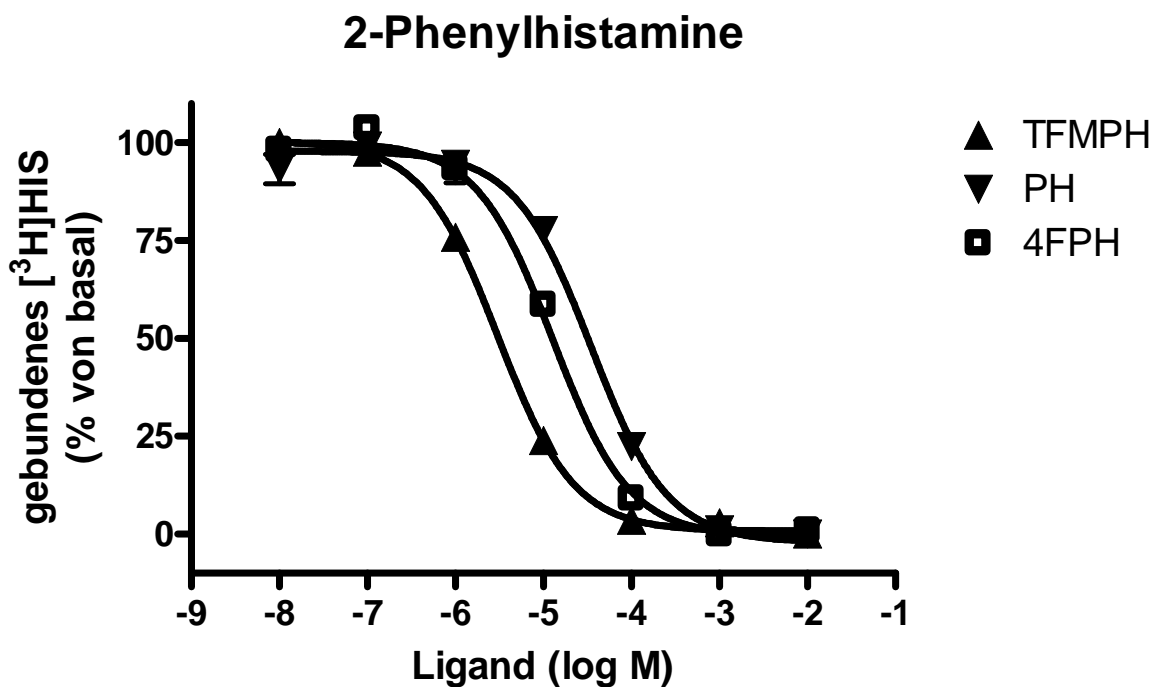


Abbildung 7: Konkurrenz zwischen [³H]-Histamin (10 nM) und Vertretern der Gruppe der 2-Phenylhistamine in logarithmisch aufgetragener Konzentration am hH₄R-GAIP + G_α₁₂ + β₁γ₂. Es handelt sich um Mittelwerte ± SEM von bis zu sieben unabhängigen Einzelexperimenten in Triplikaten an verschiedenen Membranpräparationen.

Abbildung 7 zeigt die Konkurrenzkurven für ausgewählte Vertreter der Gruppe der 2-Phenylhistamine. Diese stellten die zweitgrößte der untersuchten Substanzklassen dar. Die mit Abstand potenteste Substanz aus dieser Klasse war das TFMPH mit einem pK_i-Wert von 5,91 ± 0,12. Dem gegenüber steht als am wenigsten potenter Ligand aus der Klasse der 2-Phenylhistamine das MPTH mit einem pK_i-Wert von 4,74 ± 0,05, das eine um den Faktor 15 geringere Potenz als TFMPH zeigte. 4FPH lag mit einem pK_i-Wert von 5,26 ± 0,07 zwischen TFMPH und MPTH.

3.2.3 Histaprodifene

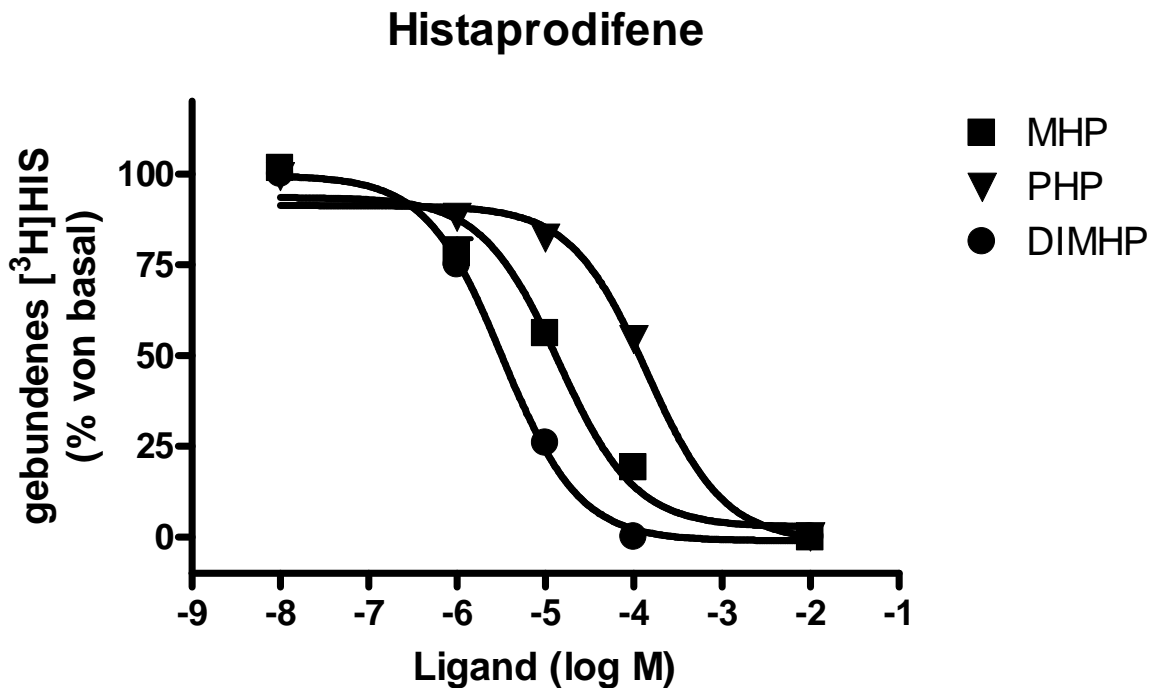


Abbildung 8: Konkurrenz zwischen [^3H]-Histamin (10 nM) und den Histaprodifenen MHP, PHP und NIHP in logarithmisch aufgetragener Konzentration am $\text{hH}_4\text{R-GAIP} + \text{G}\alpha_{i2} + \beta_1\gamma_2$. Es handelt sich um Mittelwerte \pm SEM von bis zu sieben unabhängigen Einzelerperimenten in Triplikaten an verschiedenen Membranpräparationen

In Abbildung 8 sind die Konkurrenzkurven von 3 Histaprodifen zu sehen. Von den untersuchten Histaprodifen zeigte NIHP am hH_4R die höchste Affinität mit einem pK_i -Wert von $5,77 \pm 0,05$. Damit war dieser Ligand der drittpotenteste Agonist. Fast ebenso potent war das DIMHP ($\text{pK}_i = 5,57 \pm 0,08$). Die Potenz von PHP war jedoch mehr als 20-fach geringer als bei den vorher genannten Liganden ($\text{pK}_{i(\text{PHP})} = 4,18 \pm 0,01$). MHP lag mit einem pK_i -Wert von $5,17 \pm 0,05$ im Mittelbereich.

3.2.4 Übersichtstabelle der erzielten pK_i-Werte

	Nr.	Abkürzung	Substanzname	pK _i ± SEM
H₁R-Antagonisten, erste Generation	1	TRI	Tripolidin	4,06 ± 0,01
	2	DPH	Diphenhydramin	4,37 ± 0,10
	3	MEP	Mepyramin	< 4
	4R	(+)-DMT	(+)-Dimethinden	< 4
	4S	(-)-DMT	(-)-Dimethinden	< 4
	5	CPI	(+)-Chlorpheniramin	4,56 ± 0,01
	6	KET	Ketotifen	4,30 ± 0,11
	7	CLE	Clemastin	4,80 ± 0,07
	8	CYPRO	Cyproheptadin	4,79 ± 0,09
H₁R-Antagonisten, zweite Generation	9	AST	Astemizol	5,10 ± 0,06
	10	AZE	Azelastin	4,30 ± 0,03
	11	TEF	Terfenadin	4,83 ± 0,16
	12	FEX	Fexofenadin	< 4
	13	LEVO	Levocetirizin	< 4
	14	LORA	Loratidin	4,74 ± 0,02
		15	TEP	N-{2-[2-(3-Trifluoromethylphenyl)-1H-imidazol-4-yl]ethyl}piperidin
Antidepressiva	16	DOX	Doxepin	4,78 ± 0,10
	17	MAPRO	Maprotilin	4,48 ± 0,03
	18	MIRTA	Mirtazapin	< 4
Histamin	19	HIS	Histamin	8,07 ± 0,14

Kleine Agonisten	20	BET	Betahistin	4,09 ± 0,07
	21	2MEH	2-Methylhistamin	6,05 ± 0,01
	22	2BEH	2-Benzylhistamin	4,83 ± 0,01
	23	MPTH	2-(4-Methylphenyl-thiomethyl)-histamin	4,74 ± 0,05
	24	TEA	2-(2-Thiazolyl)ethanamin	< 4
2-Phenylhistamine	25	PH	2-Phenylhistamin	4,79 ± 0,04
	26	2FPH	2-(2-Fluorphenyl)histamin	4,86 ± 0,13
	27	2MPH	2-(3-Methylphenyl)-histamin	5,18 ± 0,19
	28	MOPH	2-(3-Methoxyphenyl)-histamin	4,75 ± 0,15
	29	TFMPH	2-(3-Trifluormethylphenyl)-histamin	5,91 ± 0,12
	30	3FPH	2-(3-Fluorphenyl)histamin	5,19 ± 0,14
	31	3CPH	2-(3-Chlorphenyl)histamin	5,51 ± 0,04
	32	BPH	2-(3-Bromphenyl)histamin	5,76 ± 0,01
	33	IPH	2-(3-Iodophenyl)histamin	5,54 ± 0,07
	34	4FPH	2-(4-Fluorphenyl)histamin	5,26 ± 0,07
	35	4CPH	2-(4-Chlorphenyl)histamin	4,76 ± 0,09
	36	DFPH	2-(2,4-Difluorphenyl)-histamin	5,76 ± 0,05
Histaprodifene	37	MHP	Methylhistaprodifen	5,17 ± 0,05
	38	DMHP	Dimethylhistaprodifen	4,23 ± 0,04
	39	PHP	Pyrollidinohistaprodifen	4,18 ± 0,01
	40	NIHP	Suprahistaprodifen	5,77 ± 0,05
	41	DIMHP	Dimeres Histaprodifen	5,57 ± 0,08

Tabelle 5: Übersicht der erzielten pK_i-Werte

3.3 GTPase-Versuche

3.3.1 H₁-Rezeptor-Antagonisten

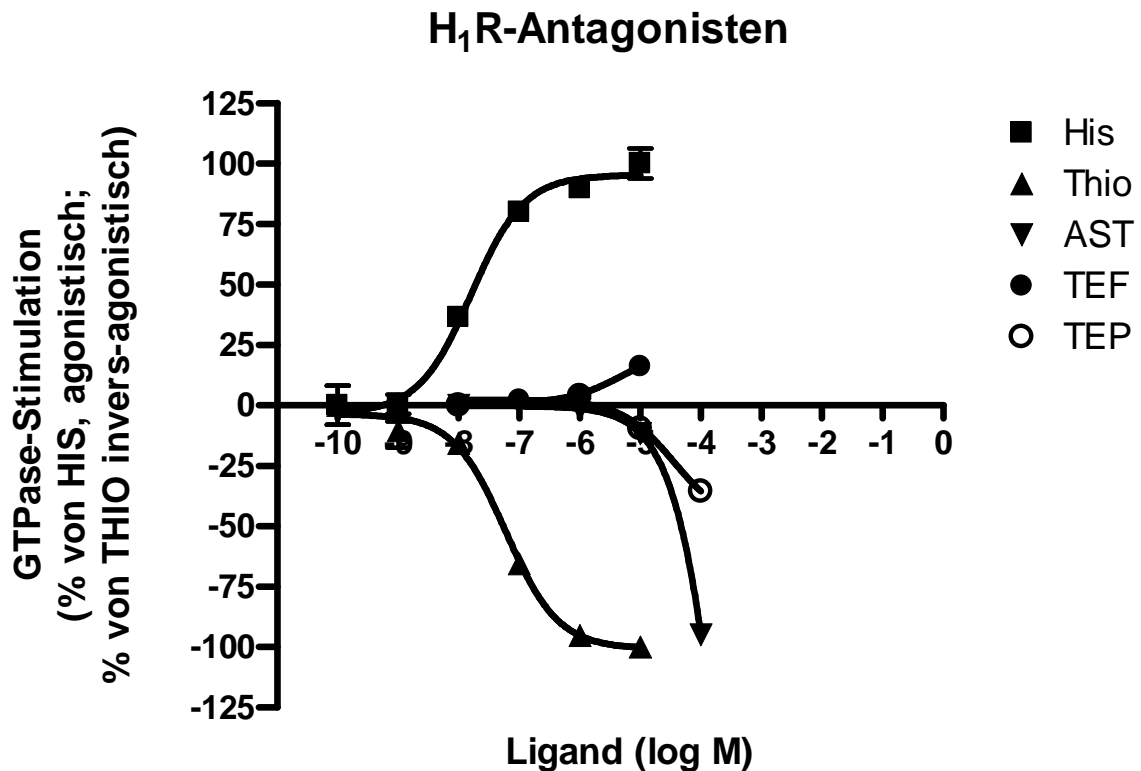


Abbildung 9: Regulation der GTPase durch die H₁-Antagonisten AST, TEF und TEP am hH₄R-GAIP + G α_{i2} + $\beta_{1\gamma_2}$. Die dargestellten Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM von bis zu vier Einzelerperimenten in Triplikaten. Die Werte der inversen Agonisten beziehen sich auf E_{max} von Thioperamid, die Werte der Partialagonisten auf Histamin.

Abbildung 9 zeigt die Konzentrations-Wirkungskurven für 3 Vertreter der H₁-Antagonisten mit Histamin als Referenz für einen vollen Agonisten und Thioperamid als Referenz für invers-agonistisches Verhalten. Die stärkste Stimulation erzielte TEF mit einem E_{max}-Wert von $+0,16 \pm 0,02$. Das stärkste invers-agonistische Verhalten zeigte AST (E_{max} = $-0,92 \pm 0,06$). Die mit Abstand höchste Potenz zeigten MEP (pEC₅₀ = $5,17 \pm 0,10$) und TRI (pEC₅₀ = $4,96 \pm 0,07$). Im Gegensatz dazu waren AST mit einem pEC₅₀ = < 4 und TEP mit einem pEC₅₀ von $4,58 \pm 0,04$ deutlich weniger potent.

3.3.2 2-Phenylhistamine

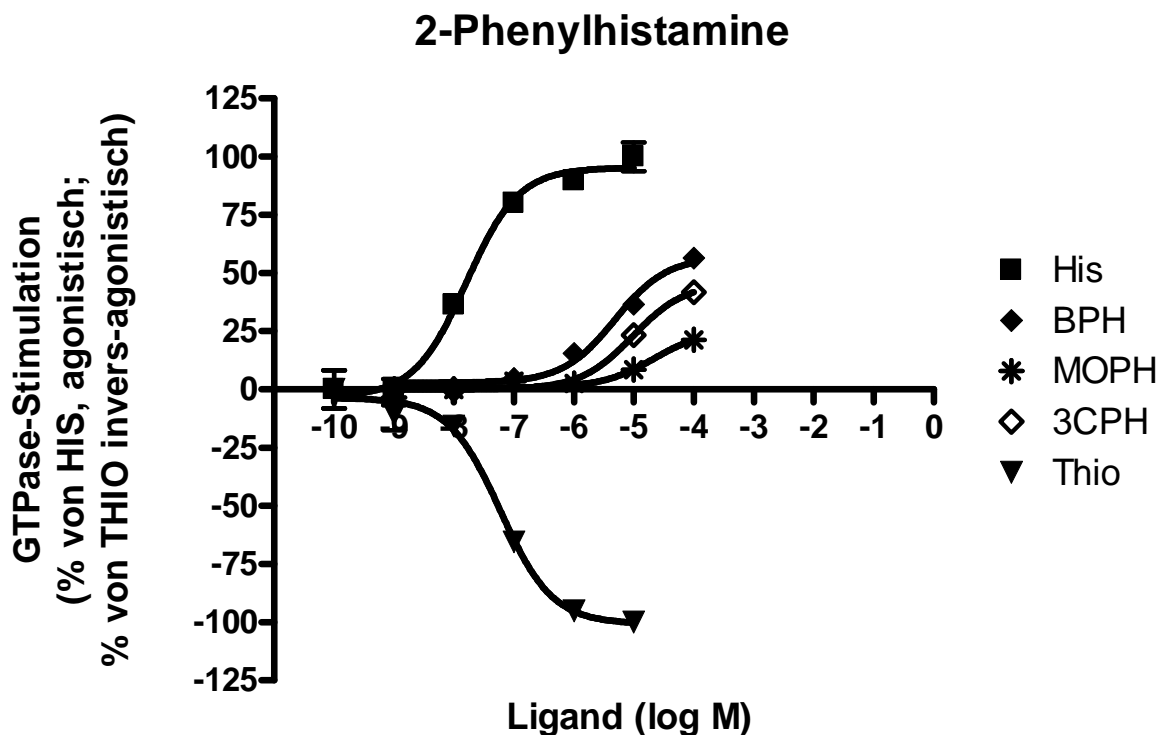


Abbildung 10: Stimulation der GTPase durch die 2-Phenylhistamine BPH, 3CPH und MOPH am hH_4R -GAIP + $G\alpha_{i2}$ + $\beta_1\gamma_2$. Die dargestellten Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM von bis zu vier Einzelexperimenten in Triplikaten.

Sämtliche Vertreter dieser Gruppe zeigten sich als mehr oder weniger starke Partialagonisten. Dies wird in Abbildung 10 anhand von ausgewählten Vertretern dieser Gruppe veranschaulicht. BPH als einer der stärksten Partialagonisten erzielte einen E_{max} -Wert von $+0,61 \pm 0,02$. Eine schwächere Stimulation der GTPase erzielten 3CPH ($E_{max} = +0,44 \pm 0,02$) und MOPH ($E_{max} = +0,20 \pm 0,01$). Anders war das Bild bei Betrachtung der Potenz. IPH mit einem pEC_{50} -Wert $5,86 \pm 0,08$ und TFMPH mit einem pEC_{50} -Wert von $5,83 \pm 0,08$ waren am potentesten.

3.3.3 Histaprodifene

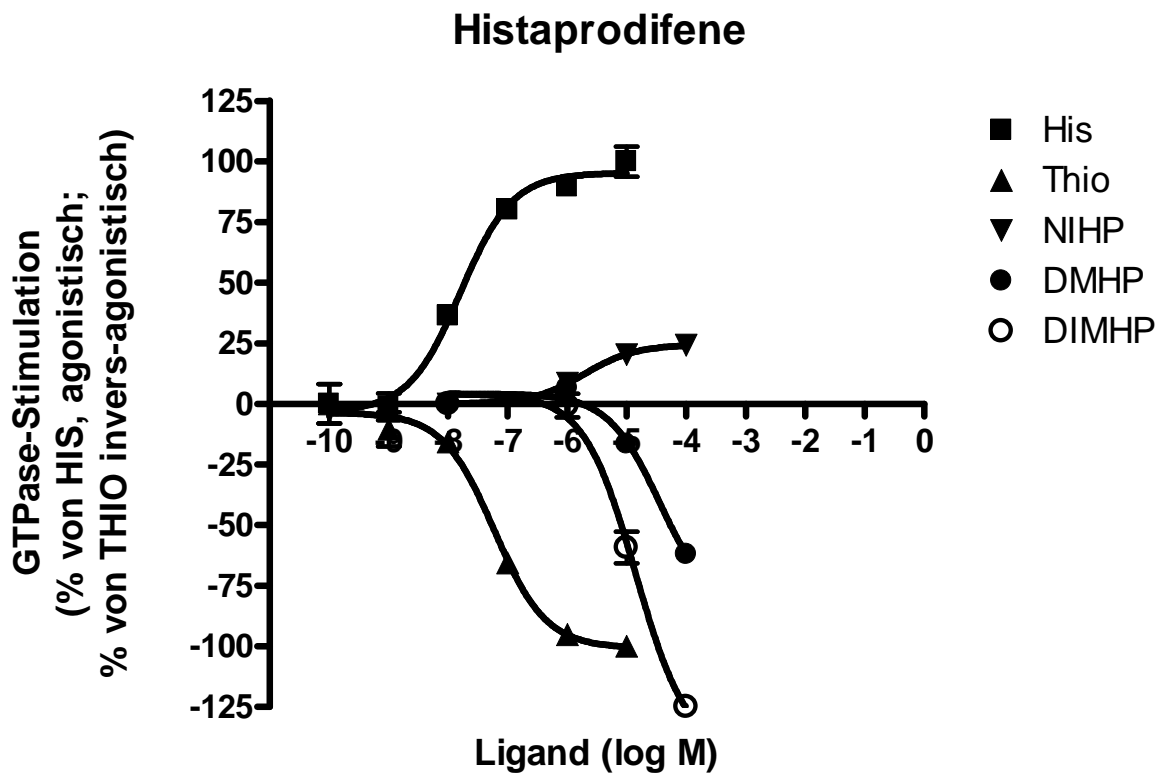


Abbildung 11: Stimulation der GTPase durch die Histaprodifene NIHP, DMHP, und DIMHP am hH_4R -GAIP + $G\alpha_{12}$ + $\beta_1\gamma_2$. Die dargestellten Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM von bis zu vier Einzelexperimenten in Triplikaten. Die Werte der inversen Agonisten beziehen sich auf E_{max} von THIO, die Werte vom Partialagonisten NIHP auf Histamin.

Die größte Überraschung aller GTPase-Versuche stellte DIMHP dar. Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, zeigte es einen größeren invers-agonistischen Effekt als THIO ($E_{max} = -1,27 \pm 0,02$ vs. 1). MHP, DMHP und PHP zeigten sich ebenfalls als inverse Agonisten. Als einziger Ligand dieser Gruppe präsentierte sich NIHP als schwacher Partialagonist mit einem E_{max} -Wert von $+0,25 \pm 0,02$.

3.3.4 Ergebnisübersicht der GTPase-Versuche am hH₄R

	Nr.	Abk.	Substanzname	pEC ₅₀ ± SEM	E _{max} ± SEM
H₁R- Antagonisten, erste Generation	1	TRI	Triprolidin	4,96 ± 0,07	-0,34 ± 0,01
	2	DPH	Diphenhydramin	n. d.	+0,05 ± 0,01
	3	MEP	Mepyramin	5,17 ± 0,01	-0,21 ± 0,03
	4R	(+)-DMT	(+)-Dimethinden	4,65 ± 0,07	-0,21 ± 0,03
	4S	(-)-DMT	(-)-Dimethinden	4,43 ± 0,02	-0,21 ± 0,03
	5	CPI	(+)-Chlorpheniramin	4,60 ± 0,09	-0,34 ± 0,04
	6	KET	Ketotifen	4,59 ± 0,05	-0,30 ± 0,03
	7	CLE	Clemastin	4,68 ± 0,08	-0,62 ± 0,06
H₁R- Antagonisten, zweite Genera- tion	8	CYPRO	Cyproheptadin	n. d.	-0,04 ± 0,06
	9	AST	Astemizol	< 4	-0,92 ± 0,06
	10	AZE	Azelastin	4,43 ± 0,06	-0,37 ± 0,04
	11	TEF	Terfenadin	n. d.	+0,16 ± 0,02
	12	FEX	Fexofenadin	n. d.	-0,13 ± 0,01
	13	LEVO	Levocetirizin	n. d.	+0,13 ± 0,01
	14	LORA	Loratidin	n. d.	+0,06 ± 0,02
	15	TEP	N-{2-[2-(3-Trifluoromethylphenyl)-1H-imidazol-4-yl]ethyl}piperidine	4,58 ± 0,04	-0,37 ± 0,02
Antidepressiva	16	DOX	Doxepin	n. d.	-0,15 ± 0,05
	17	MAPRO	Maprotilin	n. d.	+0,01 ± 0,06
	18	MIRTA	Mirtazapin	n. d.	-0,10 ± 0,08
Histamin	19	HIS	Histamin	7,93 ± 0,06	+1,00
Kleine Agonisten	20	BET	Betahistin	< 4	+0,37 ± 0,02
	21	2MEH	2-Methylhistamin	5,42 ± 0,13	+0,85 ± 0,01
	22	BEH	2-Benzylhistamin	n. d.	+0,14 ± 0,01
	23	MPTH	2-(4 Methylphenylthiomethyl)histamin	4,59 ± 0,13	+0,54 ± 0,01
	24	TEA	2-(2-Thiazolyl)-ethanamin	< 4	+0,22 ± 0,02

2-Phenyl-histamine	25	PH	2-Phenylhistamin	4,92 ± 0,07	+0,32 ± 0,02
	26	2FPH	2-(2-Fluorphenyl)-histamin	4,01 ± 0,08	+0,62 ± 0,04
	27	2MPH	2-(3-Methylphenyl)histamin	< 4	+0,33 ± 0,02
	28	MOPH	2-(3-Methoxyphenyl)histamin	< 4	+0,20 ± 0,01
	29	TFMPH	2-(3-Trifluormethylphenyl)-histamin	5,83 ± 0,08	+0,51 ± 0,02
	30	3FPH	2-(3-Fluorphenyl)-histamin	4,76 ± 0,03	+0,53 ± 0,02
	31	3CPH	2-(3-Chlorphenyl)histamin	5,40 ± 0,08	+0,44 ± 0,02
	32	BPH	2-(3-Bromphenyl)histamin	5,02 ± 0,03	+0,61 ± 0,02
	33	IPH	2-(3-Iodophenyl)-histamin	5,86 ± 0,08	+0,30 ± 0,02
	34	4FPH	2-(4-Fluorphenyl)-histamin	< 4	+0,39 ± 0,01
	35	4CPH	2-(4-Chlorphenyl)histamin	n. d.	+0,13 ± 0,01
	36	DFPH	2-(2,4-Difluorphenyl)histamin	5,04 ± 0,07	+0,65 ± 0,02
Hista-prodifene	37	MHP	Methylhista-prodifen	5,20 ± 0,11	-0,93 ± 0,03
	38	DMHP	Dimethylhista-prodifen	4,47 ± 0,16	-0,62 ± 0,03
	39	PHP	Pyrrolidino-histaprodifen	< 4	-0,62 ± 0,03
	40	NIHP	Suprahistaprodifen	5,82 ± 0,12	+0,25 ± 0,02
	41	DIMHP	Dimeres Histaprodifen	4,81 ± 0,01	-1,27 ± 0,02

Tabelle 6: Ergebnisübersicht der GTPase-Assays am hH₄R

4 Diskussion

Sowohl der Histamin H_1 - als auch der H_4 -Rezeptor sind in die Pathogenese allergischer Erkrankungen involviert [47, 64-65]. Dies lässt vermuten, dass duale H_1/H_4 -Rezeptorantagonisten bei der Behandlung entzündlich-allergischer Krankheiten von Nutzen sein könnten.

In früheren Untersuchungen war für [3H]Mepyramin am rekombinanten hH_4R in HEK293 Zellen ein K_d -Wert von 32 nM bestimmt worden, entsprechend einem pK_d -Wert von 7,50 [44]. Ich fand einen pK_i -Wert von 5,44 (siehe 3.2.4). Das ist um zwei Zehnerpotenzen niedriger als von Nguyen et. al. [44] berichtet. Ähnliche Unterschiede zwischen meinen Ergebnissen und denen von Nguyen [44] zeigten sich für Doxepin. Im Gegensatz dazu war mein für Chlorpheniramin ermittelter Wert fast identisch mit dem von Nguyen [44]. Andere Gruppen [66-67] konnten ebenfalls die hochaffine Bindung von H_1R -Antagonisten, welche von Nguyen et. al [44] beschrieben wurde, nicht bestätigen. Möglicherweise lassen sich die Unterschiede in den Daten dadurch erklären, dass die von Nguyen et. al [44] verwendeten HEK293-Zellen auch den H_1 -Rezeptor exprimiert haben [56], welcher mit einem pK_d -Wert von 8,34 eine hohe Affinität für Mepyramin besitzt [58]. Dieser Wert weicht immer noch um eine Größenordnung von Nguyen et. al [44] ab. Eine genaue Analyse des Sättigungs-Bindungs-Experiment in Abbildung 4b) in Nguyen's [44] Artikel zeigt, dass ihr System hoch- und niedrigaffine Mepyraminbindungsstellen besitzt, die nicht angemessen mit einem Modell, das zwei Bindungsstellen beinhaltet, analysiert worden sind. Die niedrig-affine Bindungsstelle in der Untersuchung von Nguyen, die wahrscheinlich dem hH_4R entsprach, erreicht keine Sättigung. Die Hill-Koeffizienten für viele H_1 -Antagonisten in den Competitionsexperimenten von Nguyen [44] sind <1 , was auf zwei Bindungsstellen hinweist, die wiederum nicht mit einem 2-Bindungsstellen-Modell analysiert wurden. Ich habe keine Hinweise auf eine Kontamination von hH_1R in meinem hH_4R -RGS19 Membranpräparationen. Dies konnte durch die Abwesenheit der typischen Immunoreaktivität des hH_1R mit dem M1 monoklonalen Antikörper [68-69],

die Abwesenheit von spezifischer [³H]Mepyramin-Bindung an den hH₄R-RGS19 und die Abwesenheit von flachen und potentiell biphasischen Kompetitionskurven gezeigt werden.

Eine andere Möglichkeit, die Unterschiede zwischen meinen Untersuchungen und denen Nguyens [44] zu erklären, ist die Verwendung zweier unterschiedlicher Expressionssysteme. Ich verwendete Sf9-Insektenzellen, Nguyen hingegen nahm ein Säugetierexpressionmodell. Die Unterschiede im Expressionssystem könnten die Rezeptorglykosylierung und Oligomerisierung betreffen, was die GPCR-Eigenschaften beeinflussen könnte. In Übereinstimmung mit meinen Daten zeigten Lim et. al (2005) [66], dass einige H₁R-Antagonisten der ersten und zweiten Generation an in Säugetierzellen exprimierten hH₄R pK_i-Werte <5 aufwiesen. Somit schlussfolgerte ich, dass, trotz der Verwirrung durch Nguyens [44] Untersuchungen, viele H₁R-Antagonisten der ersten (1-8) und zweiten Generation (9-14) sowie Antidepressiva (16-18) an den hH₄R mit niedrigerer Affinität als an den H₁R binden. Meine Daten legen nahe, dass bereits beschriebene therapeutische Effekte von H₁-Antagonisten der ersten und zweiten Generation in hohen Konzentrationen bei allergischen Reaktionen vom Typ I durch die duale Blockade des H₁- und H₄-Rezeptors verursacht sein könnten [24]. Zur Verifizierung dieser Hypothese müssten Messungen der Arzneimittelkonzentrationen *in vivo* vorgenommen werden.

Die niedrige Potenz von Astemizol in den GTPase-Versuchen steht im Widerspruch mit der signifikant höheren Affinität dieses Liganden in den Kompetitionsbindungsversuchen. Wahrscheinlich werden unterschiedliche GPCR-Zustände mit beiden Methoden betrachtet. Ähnliche Beobachtungen machte ich für das dimere Histaprodifen und einige Phenylhistamine. Im Gegensatz dazu zeigte Suprahistaprodifen bei den pK_i- und pEC₅₀-Werten eine sehr gute Übereinstimmung. All diese Daten unterstützen die Existenz Liganden-spezifischer hH₄R-Zustände. Hinweise für Liganden-spezifische GPCR-Zustände liegen auch für den hH₁R und den hH₂R vor [72-75].

Die Phenylhistamine zeigten ein unterschiedliches pharmakologisches Profil am hH₁R und hH₄R. Für Phenylhistamine wurde eine etwas höhere Potenz am hH₁R im Vergleich zum hH₄R festgestellt. Phenylhistamine sind an beiden Rezeptoren Partialagonisten. Die maxima-

len Wirkstärken sind am hH₁R und hH₄R im selben Bereich oder höher am hH₁R als am hH₄R. 2-Phenylhistamine sind weniger selektive H₁-Agonisten als angenommen [60-61].

Ebenso wie bei den Phenylhistaminen wurden bei den Histaprodifen Unterschiede zwischen hH₁R und hH₄R festgestellt. Histaprodifene zeigen eine höhere Affinität zum hH₁R als zum hH₄R. Im Unterschied zu den Phenylhistaminen ist nur Suprahistaprodifen ein Partialagonist am hH₁R und am hH₄R. Alle anderen Histaprodifene sind Partialagonisten am hH₁R und inverse Agonisten am hH₄R.

[³⁵S]Guanosin 5'-[γ-thio]triphosphat-Bindungsexperimente mit Sf9-Membranen die hH₄R zusammen mit Gα_{i2} oder nur Gα_{i2} alleine exprimieren, ließen vermuten, dass Thioperamid kein voller inverser Agonist, sondern nur ein partieller inverser Agonist ist [56]. In Übereinstimmung mit dieser Voraussage inhibierte das dimere Histaprodifen die GTP-Hydrolyse effektiver als Thioperamid. Somit stabilisiert dimeres Histaprodifen den inaktiven Zustand des Rezeptors effektiver als Thioperamid. Zudem stabilisiert dimeres Histaprodifen die inaktive Konformation des hH₄R effektiver als Methylhistaprodifen. Das weist darauf hin, dass die zweite Histaprodifengruppe im dimeren Histaprodifen die invers-agonistische Konformation der Histaprodifenpartialstruktur in der Histaprodifenbindungstasche nahe TM5 und TM6 stabilisiert. Die kleinen Histaprodifene sind flexibler in der Histaprodifenbindungstasche nahe TM5 und TM6, was zu einer schwächeren Stabilisierung der inaktiven Konformation im Vergleich zu dimerem Histaprodifen führt. Es ist möglich, dass Histaprodifene mit höherer invers-agonistischer Aktivität als dimeres Histaprodifen identifiziert werden. Somit zeigen meine Untersuchungen die Schwierigkeiten der Definition voller inverser Agonisten.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit stellt eine systematische pharmakologische Analyse klassischer H₁R-Agonisten und H₁R-Antagonisten am humanen H₄R dar. Zu diesem Zweck wurden die Eigenschaften verschiedener Liganden am Fusionsprotein hH₄R-RGS19+G α_{i2} + $\beta_1\gamma_2$ untersucht (siehe 1.1.5 und 3.1). Mit der Durchführung der [³H]-Kompetitions-Bindung und des GTPase-Assays wurden etablierte und ausreichend validierte Methoden zur Untersuchung der Liganden-Rezeptorinteraktion am H₄R gewählt [77]. Dies ermöglichte es, sowohl Aussagen zur Affinität als auch zur Effektivität der Liganden zu treffen. Es konnte gezeigt werden, dass H₁-Antagonisten and H₁-Agonisten am hH₄R mit niedrigerer Affinität als am hH₁R binden. H₁-Liganden zeigen dabei Partialagonismus, neutralen Agonismus und inversen Agonismus. Astemizol, welches Ähnlichkeiten mit JNJ7777120 hat, ist ein guter Ausgangspunkt für die Entwicklung dualer H₁R/H₄R-Antagonisten. Solche Liganden könnten sehr nützlich zur Behandlung von Typ-1-Allergien sein. Dimeres Histaprodifen übertrifft Thioperamid als inversen Agonisten hinsichtlich der Effektivität. Demnach ist dimeres Histaprodifen ein exzellenter Startpunkt zur Entwicklung selektiver, potenter und wirkungsvoller inverser Agonisten am hH₄R. Solche Liganden könnten ebenfalls von großem therapeutischem Wert für die Behandlung von Typ-1-Allergien sein. Aufgrund bislang fehlender Untersuchungen des Einflusses des H₄-Rezeptors in asthmatische Prozesse beim Menschen sind weitere Studien zur Klärung dieser Fragestellung notwendig [78].

6 Literaturverzeichnis

1. Fredriksson, R., et al. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, 2003. 63(6): p. 1256-72.
2. Lander, E.S., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001. 409(6822): p. 860-921.
3. Venter, J.C., et al. The sequence of the human genome. *Science*, 2001. 291(5507): p. 1304-51.
4. Flower, D.R. Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1422(3): p. 207-34.
5. Howard, A.D., et al. Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery. *Trends Pharmacol Sci*, 2001. 22(3): p. 132-40.
6. Lefkowitz, R.J. and S.K. Shenoy. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, 2005. 308(5721): p. 512-7.
7. Azzi, M., et al. Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(20): p. 11406-11.
8. Kobilka, B.K. and Deupi, X. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 2007. 28(8): p. 397-406.
9. Ji, T.H., et al. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem*, 1998. 273(28): p. 17299-302.
10. Rasmussen, S.G., et al. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2007. 450(7168): p. 383-7.
11. Rosenbaum, D.M., et al. GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science*, 2007. 318(5854): p. 1266-73.
12. Rosenbaum, D.M., et al. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 2009. 459(7245): p. 356-63.
13. Cherezov, V., et al. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, 2007. 318(5854): p. 1258-65.
14. Xiao, R.P. Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Sci STKE.*, 2001. 104(re15).
15. Leurs, R., et al. Molecular and biochemical pharmacology of the histamine H4 receptor. *Br J Pharmacol*, 2009. 157(1): p. 14-23.

16. Seifert, R. and Wieland, R. G- protein-coupled receptors. Wiley-VCH 1: 81-120, 2005.
17. Bertin, B., et al. Cellular signaling by an agonist-activated receptor/Gs alpha fusion protein. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(19): p. 8827-31.
18. Seifert, R., et al. GPCR-Galpha fusion proteins: molecular analysis of receptor-G-protein coupling. Trends Pharmacol Sci, 1999. 20(9): p. 383-9.
19. Seifert, R., et al. Different effects of Gsalpha splice variants on beta2-adrenoreceptor-mediated signaling. The beta2-adrenoreceptor coupled to the long splice variant of Gsalpha has properties of a constitutively active receptor. J Biol Chem, 1998. 273(9): p. 5109-16.
20. Wenzel-Seifert, K. and R. Seifert. Molecular analysis of beta(2)-adrenoceptor coupling to G(s)-, G(i)-, and G(q)-proteins. Mol Pharmacol, 2000. 58(5): p. 954-66.
21. Seifert, R., et al. Different effects of Gsalpha splice variants on beta2-adrenoreceptor-mediated signaling. The Beta2-adrenoreceptor coupled to the long splice variant of Gsalpha has properties of a constitutively active receptor. J Biol Chem, 1998. 273(18): p. 5109-16.
22. Wenzel-Seifert, K., et al. Similarities and differences in the coupling of human beta1- and beta2-adrenoceptors to Gs(alpha) splice variants. Biochem Pharmacol, 2002. 64(1): p. 9-20.
23. Seifert, R., et al. Reconstitution of beta2-adrenoceptor-GTP-binding-protein interaction in Sf9 cells--high coupling efficiency in a beta2-adrenoceptor-G(s alpha) fusion protein. Eur J Biochem, 1998. 255(2): p. 369-82.
24. Thurmond, R.L., et al. The role of histamine H₁ and H₄ receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. Nat Rev Drug Discov, 2008. 7(1): p. 41-53.
25. Barger G, et al. The presence in ergot and physiological activity of B- iminazoylethylamine. J Physiol, 1910. 40: p. 38-40.
26. Tiligada, E., et al. The role of histamine H₄ receptor in immune and inflammatory disorders. British Journal of Pharmacology, 2009. 157: p. 24-33.
27. Jutel, M., et al. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. Clin Exp Allergy, 2009. 39(12): p. 1786-800.
28. van Ruitenbeek, P., et al. Histamine H₁ receptor blockade predominantly impairs sensory processes in human sensimotor performance. Br J Pharmacol, 2009a. 157: p. 76-85.
29. Inoue, I., et al. Analysis of histamine H₁ receptor deficient mice: role in locomotor activity and anaphylaxis. Taniguchi Symp. Brain Sci. , 1996. 19: p. 139-149.
30. Stahl, S.M. Selective histamine H₁ antagonism: novel hypnotic and pharmacologic actions challenge classical notions of antihistamines. CNS Spectr., 2008. 13(12): p. 1027-1038.

31. Bakker, R.A., et al. Histamine receptors: specific ligands, receptor biochemistry, and signal transduction. *Clin. Allergy Immunol.*, 2002. 17: p. 27-64.
32. Black, J.W. Pioneers in Cardiology: Sir James Black, MB, ChB, FRS, FRCP. Interview by Mark Nicholls. *Circulation*, 2008. 117(8): p. f47-8.
33. Jutel M, et al. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H₁ and H₂ receptors. *Nature*, 2001. 413: p. 420-425.
34. Burde R., et al. Histamine inhibits activation of human neutrophils and HL-60 leukemic cells via H₂-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1989. 340: p. 671-678.
35. Pollard H., et al. A detailed autoradiographic mapping of histamine H₃ receptors in rat brain areas. *Neuroscience*, 1993. 52: p. 169-89.
36. Bertaccini G, et. al. Histamine H₃ receptors: an overview *Ital J Gastroenterol*, 1991. 23: p. 378-85.
37. Tilligada, E., et al. Histamine H₃ and H₄ receptors as novel drug targets. *Expert Opin Investig Drugs*, 2009. 18(10): p. 1519-1531.
38. Beghdadi, W., et al. Histamine H(3) receptor-mediated signaling protects mice from cerebral malaria. *PLOS one*, 2009. 23(4(6)): p. e6044.
39. de Esch, I.J., et al. The histamine H₄ receptor as a new therapeutic target for inflammation. *Trends Pharmacol Sci*, 2005. 26(9): p. 462-9.
40. Gutzmer, R., et al. Histamine H₄ receptor stimulation suppresses IL-12p70 production and mediates chemotaxis in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 2005. 174(9): p. 5224-32.
41. Oda, T., et al. Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem*, 2000. 275: p. 36781-36786.
42. Nakamura, T., et al. Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, hH₄R. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 279: p. 615-620.
43. Liu, C., et al. Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H₄) expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol*, 2001. 59: p. 420-426.
44. Nguyen, T., et al. Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol*, 2001. 59(3): p. 427-33.
45. Morse, K.L., et al. Cloning and characterization of a novel human histamine receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. 296: p. 1058-1066.
46. Zhu, Y., et al. Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor. *Mol Pharmacol*, 2001. 434-441.
47. Dunford, P.J., et al., The histamine H₄ receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells. *J Immunol*, 2006. 176(11): p. 7062-70.

48. Dunford, P.J., et al., Histamine H₄ receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. 119(1): p. 176-83.
49. Grzybowska-Kowalczyk, A., et al., Expression of histamine H₄ receptor in human osteoarthritic synovial tissue. *Inflamm Res*, 2008. 57 Suppl 1: p. S63-4.
50. Grzybowska-Kowalczyk, A., et al., Distribution pattern of histamine H₄ receptor in human synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis. *Inflamm Res*, 2007. 56 Suppl 1: p. S59-60.
51. Boer, K., et al., Decreased expression of histamine H₁ and H₄ receptors suggests disturbance of local regulation in human colorectal tumours by histamine. *Eur J Cell Biol*, 2008. 87(4): p. 227-36.
52. Medina, V., et al. Histamine-mediated signaling processes in human malignant mammary cells. *Cancer Biol Ther*, 2006. 5(11): p. 1462-71.
53. Medina, V., et al. The role of histamine in human mammary carcinogenesis: H₃ and H₄ receptors as potential therapeutic targets for breast cancer treatment. *Cancer Biol Ther*, 2008. 7(1): p. 28-35.
54. Kenakin, T. Drug efficacy at G-protein coupled receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2002. 42: p. 349-379.
55. Seifert, R. and K. Wenzel-Seifert. Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2002. 366(5): p. 381-416.
56. Schneider, E.H., et al. High constitutive activity and a G-protein-independent high-affinity state of the human histamine H(4)-receptor. *Biochemistry*, 2009. 48(6): p. 1424-38.
57. Deml, K.F., et al. Interactions of histamine H₁-receptor agonists and antagonists with the human histamine H₄-receptor. *Mol Pharmacol*, 2009. 76(5): p. 1019-30.
58. Seifert, R., et al. Multiple differences in agonist and antagonist pharmacology between human and guinea pig histamine H₁-receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. 305(3): p. 1104-15.
59. Strasser, A., et al. Pharmacological profile of histaprodifens at four recombinant histamine H₁ receptor species isoforms. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008. 324(1): p. 60-71.
60. Strasser, A., et al. Molecular basis for the selective interaction of synthetic agonists with the human histamine H₁-receptor compared with the guinea pig H₁-receptor. *Mol Pharmacol*, 2009. 75(3): p. 454-65.
61. Houston, C., et al. The human histamine H₂-receptor couples more efficiently to Sf9 insect cell G_s-proteins than to insect cell G_q-proteins: limitations of Sf9 cells for the analysis of receptor/G_q-protein coupling. *J Neurochem*, 2002. 80(4): p. 678-96.

62. Barr, A.J., et al. Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells. A direct evaluation of selectivity in receptor.G protein coupling. *J Biol Chem*, 1997. 272(4): p. 2223-9.
63. Wenzel-Seifert, K., et al. High constitutive activity of the human formyl peptide receptor. *J Biol Chem*, 1998. 273(37): p. 24181-9.
64. Tilligada, E., et al. Histamine H₃ and H₄ receptors as novel drug targets. *Expert Opin Investig Drugs*, 2009. 18(10): p. 1519-31.
65. Hofstra, C.L., et al. Histamine H₄ receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. 305(3): p. 1212-21.
66. Lim, H.D., et al. 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*, 2005. 314(3): p. 1310-21.
67. Venable, J.D., Thurmond, R. L. Development and Chemistry of Histamine H₄ Receptor Ligands as Potential Modulators of Inflammatory and Allergic Responses. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 2006. 5(4): p. 307–322.
68. Simons, F.E. Advances in H₁-antihistamines. *N Engl J Med*, 2004. 351(21): p. 2203-17.
69. Smits, R.A., et al. Fragment based design of new H₄ receptor-ligands with anti-inflammatory properties in vivo. *J Med Chem*, 2008. 51(8): p. 2457-67.
70. Seifert, R., et al. Functional differences between full and partial agonists: evidence for ligand-specific receptor conformations. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. 297(3): p. 1218-26.
71. Smith, F.M., et al. Role of histamine H₃ and H₄ receptors in mechanical hyperalgesia following peripheral nerve injury. *Neuroimmunomodulation*, 2007. 14(6): p. 317-25.
72. Tanaka, S. and Ichikawa, A. Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: immune regulatory roles of histamine produced by leukocytes. *J Pharmacol Sci*, 2006. 101(1): p. 19-23.
73. Parnot, C. and Kobilka, B. Toward understanding GPCR dimers. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. 11(8): p. 691-2.
74. Strakhova, M.I., et al. Localization of histamine H₄ receptors in the central nervous system of human and rat. *Brain Res*, 2009. 1250: p. 41-8.
75. Sugata, Y., et al. Histamine H₄ receptor agonists have more activities than H₄ agonism in antigen-specific human T-cell responses. *Immunology*, 2007. 121(2): p. 266-75.
76. Leschke, C., et al. Synthesis and histamine H₁ receptor agonist activity of a series of 2-phenylhistamines, 2-heteroarylhistamines, and analogues. *J Med Chem*, 1995. 38(8): p. 1287-94.

-
77. Schneider, E.H. and Seifert, R. Histamine H(4) receptor-RGS fusion proteins expressed in Sf9 insect cells: a sensitive and reliable approach for the functional characterization of histamine H(4) receptor ligands. *Biochem Pharmacol*, 2009. 78(6): p. 607-16.
 78. Neumann, D., et. al. Does the Histamine H₄ Receptor Have a Pro- or Anti-Inflammatory Role in Murine Bronchial Asthma? *Pharmacology*, 2010. 85: p. 217-223.

7 Anhang

7.1 Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Regensburg in den Jahren 2007-2009 erstellt.

Mein Dank gilt besonders Prof. Dr. R. Seifert, der mir sehr kurzfristig dieses hoch interessante und anspruchsvolle Thema angeboten hat. Gerade die kontinuierliche Weiterbetreuung meiner Dissertation trotz seines Wechsels zum 15. September 2008 an die Medizinische Hochschule Hannover sei an dieser Stelle hervorgehoben.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. J. Schlossmann für die aufmunternden Gespräche während der Erstellungsphase der Dissertation und für die Übernahme der Erstgutachterschaft.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. S. Elz für die zur Verfügung gestellten Substanzen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich recht herzlich bei Silke Beermann, Prof. Dr. D. Neumann und Frau Dr. A. Strasser, die als Koautoren wertvolle Beiträge für das in der Zeitschrift *Molecular Pharmacology* publizierte Paper zur vorliegenden Arbeit geliefert haben.

Besonderer Dank geht auch an Dr. E. H. Schneider, der immer eine Antwort auf meine zahlreichen Fragen hatte und den Laboralltag für mich auf häufig humorvolle Weise angenehmer gestaltet hat.

Für die akribische Durchsicht meiner Dissertation möchte ich mich herzlich bedanken bei Prof. Dr. F. Markwardt, Julius-Bernstein-Institut für Physiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und Dr. E. H. Schneider, Laboratory of Molecular Immunology, NIAID/NIH.

Vielen Dank auch den technischen Assistentinnen am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie in Regensburg, die jederzeit sehr hilfsbereit waren. Hervorheben möchte ich an dieser Stelle Astrid Seefeld und Gertraud Wilberg.

Mein größter Dank gebührt meiner Mutter, die mir durch ihre kontinuierliche Unterstützung, ihren Rückhalt und ihr Verständnis das Studium der Humanmedizin einschließlich meiner Auslandsaufenthalte und der vorliegenden Dissertation unter denkbar guten Rahmenbedingungen ermöglicht hat.

7.2 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Abstracts

Straßer A, Wittmann HJ, Deml KF, Seifert R. (2009), Dual histamine H₁- and H₄-receptor ligands. 50. Jahrestagung der DGPT (Mainz).

Originalarbeiten

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; 76: 1019-1030

Deml KF, Seifert R, Strasser A. Interactions of Histamine H₁-Receptor Agonists and Antagonists with the Human and Rat Histamine H₃-Receptors. (*in preparation*).

7.3 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter

Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten

Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....

(Ort, Datum)

.....

(Unterschrift)