

Aus dem Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Histaminerge Neurone als zentrale pH-Sensoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Anna Luise Kernder
2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Olga A. Sergeeva

Zweitgutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Dietmar Fischer

Mein besonderer Dank für die herausragende Betreuung
meiner Doktorarbeit gilt meiner Doktormutter,
Frau Prof. Dr. rer. nat. Olga Sergeeva.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Kernder A, De Luca R, Yanovsky Y, Haas HL, Sergeeva OA (2014) Acid-sensing hypothalamic neurons controlling arousal. *Cell Mol Neurobiol* 34(6):777-89.

Yanovsky Y, Zigman JM, Kernder A, Bein A, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Haas HL, Sergeeva OA (2012) Proton- and ammonium-sensing by histaminergic neurons controlling wakefulness. *Front Syst Neurosci* 6:23.

Zusammenfassung

Histaminerge Neurone des posterioren Hypothalamus regulieren u.a. das Schlaf-/Wachverhalten des Organismus. So feuern sie nur im wachen Zustand, besonders während einer erhöhten Aufmerksamkeit.

Wie auch die benachbarten orexinergen Neurone könnten die histaminergen Neurone zentrale pH-Sensoren sein und so an der Antwort des Organismus auf einen veränderten pH-Wert durch die zentrale Steuerung der Aufmerksamkeit und der Atmung beteiligt sein.

Durch die Wahrnehmung einer zerebralen Azidose, wie sie im Rahmen des ischämischen Schlaganfalls auftritt, könnten histaminerge Neurone zudem für die bekannte neuroprotektive Konzentrationserhöhung des Mediatorstoffes Histamin im Rahmen der zerebralen Ischämie verantwortlich sein.

Um zu untersuchen, ob histaminerge Neurone zentrale pH-Sensoren sind, wurden elektrophysiologische Ableitungen mit unterschiedlichen pH-Werten der Extrazellulärlösung an Gehirnschnitten und an akut isolierten Neuronen der Ratte sowie der Maus durchgeführt. Die Expression bekannter zerebraler pH-Sensoren in histaminergen Neuronen wurde mittels der konventionellen und semiquantitativen Polymerasekettenreaktion sowie immunhistochemischen Färbungen histaminerge Neurone untersucht.

Es zeigte sich, dass histaminerge Neurone im Gehirnschnitt der Ratte, nicht jedoch der Maus, durch einen extrazellulären pH-Wert von 7.0 erregt wurden. Bei einem pH-Wert zwischen 7.0 und 4.0 konnten an isolierten Neuronen bei beiden Tierarten einwärts gerichtete Ionenströme gemessen werden. Darüber hinaus exprimieren histaminerge Neurone der Ratte und der Maus die extrazellulären pH-Sensoren ASICs, TRPV 1, OGR 1 sowie die Na^+K^+ -ATPase, die durch extrazelluläre Protonen in ihrer Funktion gehemmt wird.

Diesen Ergebnissen zufolge sind histaminerge Neurone des posterioren Hypothalamus zentrale pH-Sensoren und regulieren u.a. zusammen mit den orexinergen Neuronen die zentrale Antwort des Organismus auf einen veränderten pH-Wert durch die zentrale Steuerung von Aufmerksamkeit und Atmung. Die unterschiedliche Erregbarkeit histaminerge Neurone der Ratte und der Maus bei einem extrazellulären pH-Wert von 7.0 ist möglicherweise durch grundlegende Unterschiede des Schlaf-/Wachverhaltens der zwei Tierarten erklärbar. Weitergehende Bedeutung könnte der pH-Sensorik histaminerge Neurone im Rahmen der zerebralen Azidose bei einem ischämischen Schlaganfall zukommen, in dessen Rahmen der Mediatorstoff Histamin einen neuroprotektiven Effekt hat.

Die Bedeutung der pH-Sensorik histaminerge Neurone könnte durch Verhaltensstudien mit Histamin defizienten Mäusen ($\text{HDC}^{-/-}$) im Rahmen eines Folgeprojektes untersucht werden.

Abkürzungsverzeichnis

ACSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ASIC	<i>acid-sensing ion channels</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B.p.	Basenpaare
BZM	Benzamhydrochlorid
Ca ²⁺	Calcium
cDNA	<i>cloned DNA</i>
Cl ⁻	Chlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT-Wert	<i>cycle threshold</i> -Wert
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DIC	differentieller Interferenzkontrast
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxytyrosintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
H ⁺	Wasserstoff
HDC	Histidindecaboxylase
HKG	<i>housekeeping Gen</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
Mg ²⁺	Magnesium
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
n.s.	nicht signifikant
Na ⁺	Natrium
NCX	Natirum/Calcium-Austauscher
OGR 1	<i>ovarian cancer G Protein-coupled receptor 1</i>
PB	Phosphatpuffer
PBS	Salz des Phosphatpuffers
PBS-T	0.25 % Triton X-100 in PBS
pCO ₂	partieller Kohlenstoffdioxiddruck
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PKD2L1	<i>polycystic-kidney-disease-like ion channel</i>
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> PCR
Rn	= Rn ⁺ - Rn ⁻
Rn ⁺	Fluoreszenzsignal der Probe in einem beliebigen Zyklus der qRT-PCR
Rn ⁻	Fluoreszenzsignal der Probe zwischen den Zyklen 6 - 15 der qRT-PCR
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
ROMK	<i>rat outer medullary K⁺ channel</i>

RT Reaktion	reverse Transkriptase Reaktion
rTPA	<i>recombinant tissue plasminogen activator</i>
TASK	<i>TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel</i>
TEA	Tris-(hydroxymethyl)-aminomehan-acetat-EDTA-Puffer
TMN	Nucleus tuberomamillaris
TMNv	ventrale Subregion des Nucleus tuberomamillaris
TMNm	mediale Subregion des Nucleus tuberomamillaris
TRPV 1	<i>transient receptor potential vanilloid receptor subtype 1</i>
VLPO	ventrolaterale präoptische Area
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Der Nucleus tuberomamillaris	1
1.1.1 Lage	1
1.1.2 Funktion	3
1.2 Der Säure-Basen-Haushalt des Körpers	6
1.3 Der ischämische Schlaganfall	8
1.4 Extrazelluläre pH-Sensoren	10
1.4.1 ASIC	10
1.4.2 TRPV 1	15
1.4.3 OGR 1	18
1.4.4 Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	19
1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Elektrophysiologische Methoden	21
2.1.1 Tier- und Zellpräparation	21
2.1.2 Patch-Clamp-Technik	22
2.1.3 Ableitung histaminergener Neurone in Gehirnschnitten	23
2.1.4 Ableitungen akut isolierter histaminergener Neurone	24
2.2 Molekularbiologische Methoden	26
2.2.1 RNA-Gewinnung und reverse Transkriptasereaktion	26
2.2.2 Polymerasekettenreaktion	27
2.2.3 Einzelzell-Polymerasekettenreaktion	29
2.2.4 Entwicklung der Primer	29
2.2.5 Restriktionsanalyse	31
2.2.6 Gelelektrophorese	33
2.2.7 Purifizierung von PCR-Produkten zur Sequenzierung	34
2.2.8 Quantitative Real-Time PCR	35
2.2.9 Quantifizierung der cDNA	38
2.2.10 Quantitative PCR der Subregionen des Nucleus tuberomamillaris	40
2.3 Immunhistochemie	41
3 Ergebnisse	44
3.1 Rattus norvegicus	44

3.1.1 Patch-Clamp-Ableitungen an Gehirnschnitten	44
3.1.2 Patch-Clamp-Ableitungen an akut isolierten Neuronen	44
3.1.3 Expression extrazellulärer pH-Sensoren	46
3.1.3.1 ASICs	46
3.1.3.2 Lokalisation von ASIC Kanälen	50
3.1.3.3 ASIC Expression in den Subregionen des Nucleus tuberomamillaris	52
3.1.3.4 TRPV 1	53
3.1.3.5 Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	55
3.1.3.6 OGR 1	56
3.2 Mus musculus	57
3.2.1 Patch-Clamp-Ableitungen an Gehirnschnitten	57
3.2.2 Patch-Clamp-Ableitungen an akut isolierten Zellen	58
3.2.3 Expression pH-sensitiver Kanäle	58
3.2.3.1 ASICs	58
3.2.3.2 TRPV 1	60
3.2.3.3 OGR 1	61
4 Diskussion und Schlussfolgerungen	62
4.1 Die pH-Sensitivität histaminerges Neurone	62
4.2 Patch-Clamp-Ableitungen an isolierten histaminergen Neuronen	63
4.3 Expression extrazellulärer pH-Sensoren	64
4.3.1 ASICs	65
4.3.2 TRPV 1	68
4.3.3 OGR 1	69
4.3.4 Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	70
4.4 Umfassendes Bild der pH-Sensorik histaminerges Neurone	70
4.4.1 Extrazellulärer pH-Wert 7.0	70
4.4.2 Extrazellulärer pH-Wert zwischen 7.0 und 4.0	73
4.5 Rattus norvegicus vs. Mus musculus	75
4.6 Ausblick	77
5 Literatur- und Quellenverzeichnis	80
6 Anhang	97

1 Einleitung

1.1 Der Nucleus tuberomamillaris

1.1.1 Lage

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der sensorischen Wahrnehmung von Nervenzellen des Nucleus tuberomamillaris, einer Neuronengruppe des Hypothalamus.

Dieser ist, obwohl er nur 0.3 % des Gehirnvolumens eines erwachsenen Menschen umfasst (Hofman und Swaab, 1992), das höchste Regulationszentrum der vegetativen und endokrinen Funktionen des Körpers (Nieuwenhuys et al., 2008). Er kann als die zentrale Schnittstelle des endokrinen Systems und des Nervensystems aufgefasst werden, die die Aktivität von komplexen, lebensnotwendigen Regulationsvorgängen, wie der Blutdruck- und der Thermoregulation, der Regulation des Energie-/ Flüssigkeitshaushaltes und des Schlaf-/ Wachverhaltens mit einer circadianen Rhythmik steuert (Asan und Kugler, 2004, Nieuwenhuys et al., 2008).

In anteroposteriorer Richtung wird der Hypothalamus in drei Regionen eingeteilt: Die präoptische (blau), intermediäre (orange) und die posteriore Region (grün), (Abb. 1), die verschiedene Nuclei (dicht stehende Neuronengruppen) enthalten (Asan und Kugler, 2004).

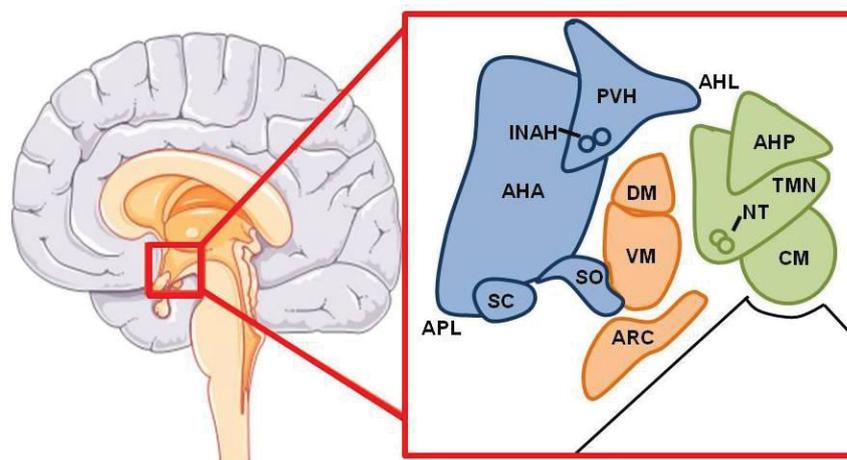


Abb. 1: Schematische Darstellung des Gehirns sowie der hypothalamischen Nuclei (Ncl.), Sagittalschnitt auf Höhe des dritten Ventrikels PVH: Nucleus (Ncl.) paraventricularis hypothalami, INAH: Ncl. interstitiales hypothalami anteriores, AHA: Area hypothalamica anterior, SO: Ncl. supraopticus, SC: Ncl. suprachiasmaticus, DM: Ncl. dorsomedialis, VM: Ncl. ventromedialis, ARC: Ncl. arcuatus, AHP: Area hypothalamica posterior, TMN: Ncl. tuberomamillaris, NT: Ncll. tuberales, CM: Corpus mamillare, AHL: Area hypothalamica lateralis, APL: Area praeoptica lateralis (In Anlehnung an: Asan E, Kugler P (2004) Zwischenhirn. In: Anatomie: makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. 2. Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut. (Drenckhahn D, Hrsg., Benninghoff A, Begr.), 16. Aufl., S. 429. München (u.a.): Urban & Fischer).

Neben den Neuronengruppen des Hypothalamus, die ihre Hormone direkt ans Blut abgeben und so viele Organsysteme direkt beeinflussen können (Paschke und Voigt, 2009), enthält dieser außerdem viele Nervenzellen, die weitreichende synaptische Verbindungen in das gesamte ZNS haben (Nieuwenhuys et al., 2008). Informationen enthält der Hypothalamus entweder aus seinen zahlreichen Afferenzen (Nieuwenhuys et al., 2008) oder direkt aus der Registrierung extrazellulärer Signale, wie der Temperatur oder der Konzentration eines peripheren Hormons im Blut (Speulda und Wunnenberg, 1977, Schaeffer et al., 2013).

Unser Interesse galt dem Nucleus tuberomamillaris, einer Neuronengruppe des posterioren Hypothalamus, die für das Gehirn einzigartig Histamin als Neurotransmitter produziert (Panula et al., 1984). Die Lage des Nucleus tuberomamillaris im Hypothalamus ist schwer abzugrenzen, da dieses Kerngebiet mit seinen histaminergen Neuronen wiederum in verschiedene morphologische Abschnitte unterteilt werden kann. So unterschieden Ericson et al. (1987) eine ventrale an der Gehirnoberfläche gelegene, eine mediale Gruppe sowie diffuse histaminerge Zellen im Nucleus tuberomamillaris des posterioren Hypothalamus der Ratte, wohingegen die Arbeitsgruppe um Inagaki den Nucleus tuberomamillaris für ihre Studien an der Ratte in fünf Untergruppen einteilen (E1 - E5, Abb. 2), (1990). Erst kürzlich wurden innerhalb des Nucleus tuberomamillaris dopaminerge Neurone entdeckt, die im Gegensatz zu den histaminergen Neuronen durch Histamin über die Aktivierung des H1 Rezeptors depolarisiert werden (De Luca et al., 2015).

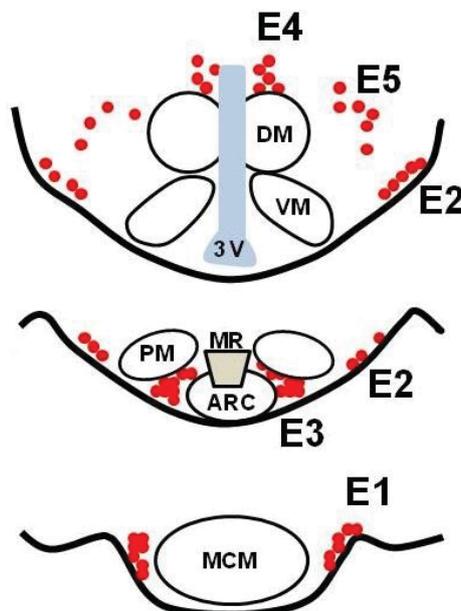


Abb. 2: Schematische Darstellung des posterioren Hypothalamus der Ratte auf Höhe des Nucleus (Ncl.) tuberomamillaris, Frontalschnitte Histaminerge Neurone sind als rote Punkte dargestellt. ARC: Ncl. arcuatus, DM: Ncl. dorsomedialis, VM: Ncl. ventromedialis, MCM: medialer Ncl. mamillaris, MR: Recessus mamillaris, PM: Ncl. praemamillaris, 3V: dritter Ventrikel (In Anlehnung an: Leurs R, Hough LB, Blandina P, Haas HL (2011) Histamine. In: Basic Neurochemistry: principles of molecular, cellular, and medical neurobiology. (Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, Price DL, Hrsg.), 8. Auflage, S. 354. München: Elsevier).

Der Nucleus tuberomamillaris hat ausgedehnte neuronale Verbindungen mit fast allen Regionen des Gehirns. Eine besonders starke histaminerge Innervation haben dabei der zerebrale Kortex, die Amygdala, die Substantia nigra sowie das Striatum (Abb. 3), (zit. nach Haas und Panula, 2003). Zusätzlich bestehen enge reziproke Innervationen histaminergener Neurone mit anderen aminergen Nervenzellgruppen des posterioren Hypothalamus, die auf eine funktionelle Zusammenarbeit dieser Nuclei hindeuten (Kaslin und Panula, 2001). Neben den histaminergen Innervationen anderer Nervenzellen konnten Histaminrezeptoren auch an Blutgefäßen und Astrozyten des Gehirns nachgewiesen werden (Suzuki et al., 1999, Mele und Juric, 2013). So ausgeprägt, wie die efferenten Verzweigungen histaminergener Fasern sind, so empfängt der Nucleus tuberomamillaris afferente Fasern aus vielen verschiedenen Gehirnregionen. Dominant sind dabei Afferenzen aus dem infralimbischen Kortex, dem Septum sowie aus anderen Kerngebieten des Hypothalamus, wie dem Nucleus präopticus (Ericson et al., 1991, Kaslin und Panula, 2001).

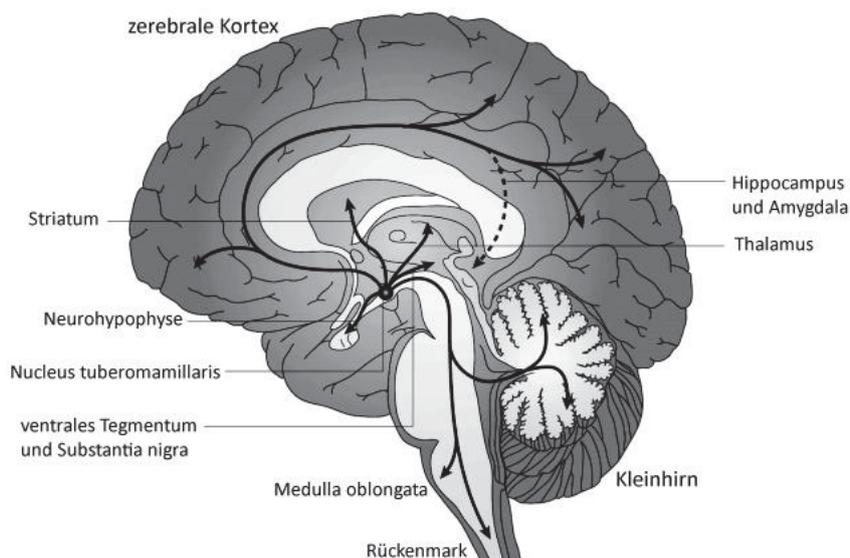


Abb. 3: Projektionen des Nucleus tuberomamillaris Schematische Darstellung eines Sagittalschnitts durch das menschliche Gehirn auf dem die weitreichenden Projektionen des Nucleus tuberomamillaris zu sehen sind (Modifiziert nach: Haas HL and Panula P (2003) The role of histamine and the tubero-mamillary nucleus in the nervous system. Nat Rev Neurosci 4: 121–130, mit freundlicher Genehmigung der Macmillan Magazines Ltd.).

1.1.2 Funktion

Die Neurone des im posterioren Hypothalamus gelegenen Nucleus tuberomamillaris nutzen als einzige Nervenzellgruppe des Gehirns Histamin als Neurotransmitter (Panula et al., 1984). In der vorliegenden Arbeit ist dabei von Bedeutung, dass Histamin die Bluthirnschranke nur

schwer passieren kann (Theoharides und Konstantinidou, 2007) und in Neuronen des Nucleus tuberomamillaris durch die Histidindecaboxylase (HDC) aus der Aminosäure L-Histidin selbst gebildet wird (Garbarg et al., 1974, Watanabe et al., 1984, Deutzmann et al., 2008).

Neben seiner Funktion als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem ist Histamin ein Signalmolekül im Magen, in der Haut und im Immunsystem. So steigert es u.a. die Säureproduktion der Parietalzellen im Magen, indem es die Protonenpumpe aktiviert (Gekle, 2009) und sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem nutzen Histamin als ein wichtiges Signalmolekül der Abwehr körperfremder Stoffe (Walzog und Fandrey, 2009). So führt das bei entzündlichen Reaktionen aus Immunzellen freigesetzte Histamin auch zu einer vermehrten Durchblutung des Gewebes und zu einer erhöhten Kapillarpermeabilität, die zu einer lokalen Ödementstehung beitragen und bei Überempfindlichkeitsreaktionen für die Symptome von Allergien verantwortlich sind (Ehmke, 2009). Diese Bedeutung von Histamin an der Symptomatik von Asthma und Allergien führte zu der Entwicklung von Antihistaminika (McElin und Horton, 1945, Southwell, 1948), deren Nebenwirkung, die Sedierung, bereits auf eine zentrale Wirkung von Histamin hinwies (zit. nach Monnier et al., 1970). Der Nachweis von Zellen im Gehirn, die Histamin produzieren, gelang jedoch erst 1984 durch immunhistochemische Färbungen von Histamin bzw. der Histidindecaboxylase an Gehirnschnitten (Panula et al., 1984, Watanabe et al., 1984).

Histaminerge Neurone liegen im posterioren Hypothalamus und sind große, bi- und multipolare Zellen mit einem Durchmesser von 20 bis 30 μm (Watanabe et al., 1984, Panula et al., 1984). Die Neurone zeigen elektrophysiologisch eine langsame Spontanaktivität von 1 bis 4 Hz bei einem Membranpotential von -50 mV (Haas und Reiner, 1988, Stevens et al., 2001), wobei die Feuerungsrate im wachen Zustand erhöht und während des Schlafens niedriger bzw. nicht vorhanden ist (Vanni-Mercier et al., 2003, Takahashi et al., 2006). Während des Schlafens inhibieren Neurone der ventrolateralen präoptischen Area (VLPO) den Nucleus tuberomamillaris (Sherin et al., 1996).

Von Economo zeigte mit schon in den zwanziger Jahren des vorherigen Jahrhunderts, dass Läsionen des posterioren Hypothalamus bei Opfern der „spanischen Grippe“ zu einer Hypersomnie und Läsionen der präoptischen Area zu einer Insomnie führten (1926). Untersuchungen an Histidindecaboxylase Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass es ohne den Neurotransmitter Histamin unmöglich ist, wach zu bleiben (Parmentier et al., 2002). Dabei erregen histaminerge Neurone des Nucleus tuberomamillaris den zerebralen Kortex in zweifacher Weise. Einerseits über direkte ausgedehnte Efferenzen zum zerebralen Kortex, andererseits indirekt über ihre Projektionen in subkortikale Gehirngebiete, wie den Thalamus

und den Gehirnstamm, und regulieren so die Aufmerksamkeit und Wachheit des Organismus (McCormick, 1992, Lin et al., 1996b, McCormick und Williamson, 1991).

Die histaminergen Neurone stehen im direkten räumlichen Kontakt zu den orexinergen Kernen des Hypothalamus, mit denen der tuberomammilläre Nucleus ein hoch komplexes integratives System vegetativer Funktionen bildet (Anaclet et al., 2009). Orexine A und B (auch Hypocretin 1 und 2 genannt) finden sich in Neuronen der perifornikalen Region des dorsolateralen Hypothalamus und regulieren zusammen mit Histamin das Schlaf-/Wachverhalten (Siegel und Boehmer, 2006, deLecea L. et al., 1998). Die Aktivität orexinergischer Neurone ist genauso wie die der histaminergen Neurone während des wachen Zustandes besonders hoch und während des Schlafs stark reduziert (Mileykovskiy et al., 2005). Untersuchungen an Knockout-Mäusen (HDC^{-/-} bzw. Orexin^{-/-}) konnten zeigen, dass den zwei Kerngebieten des Hypothalamus, die im wachen Zustand eine erhöhte Aktivität zeigen, unterschiedliche Funktionen im Rahmen des Schlaf-/ Wachverhaltens zugeschrieben werden können. So wird die Aufrechterhaltung des wachen Zustandes bzw. der Wachsamkeit eher über den Transmitter Histamin vermittelt, wobei das orexinerge System eher das Erwachen des Organismus aus dem Schlaf und Verhaltensweisen wie die Nahrungsaufnahme oder die Lokomotion beeinflusst (Anaclet et al., 2009).

Die enge reziproke Innervation der zwei Neuronengruppen des posterioren Hypothalamus (Kaslin und Panula, 2001), sowie ihre sich ergänzenden Funktionen im Rahmen des Schlaf-/ Wachverhaltens des Organismus (Anaclet et al., 2009) lassen auf ein komplexes Zusammenspiel dieser zwei Transmittersysteme schließen.

Neben der zentralen Funktion der Schlaf-/ Wachregulation des Organismus beeinflusst das histaminerge System auch viele weitere lebensnotwendige Körperfunktionen, wie die Temperaturkontrolle, die Nahrungsaufnahme und Energieverwaltung, die Osmoregulation sowie die Regulation von Atmung und Blutdruck (Tabarean et al., 2012, Masaki et al., 2001, Armstrong und Sladek, 1985, Prast und Philippu, 1991). Auch bei einigen Krankheiten des zentralen Nervensystems, wie Alzheimer, Down-Syndrom und der Wernicke Enzephalitis, konnten Veränderungen im histaminergen System gefunden werden (Leurs et al., 2011, Panula et al., 1998, Shan et al., 2012). Eine neuroprotektive Funktion scheint dem histaminergen System u.a. im Rahmen des ischämischen Schlaganfalls zuzukommen (Adachi et al., 1991).

1.2 Der Säure-Basen-Haushalt des Körpers

Der pH-Wert ist ein Maß für den sauren bzw. basischen Charakter einer wässrigen Lösung und ist definiert als der negativ dekadische Logarithmus der Protonen- (H^+) bzw. Hydroniumionen (H_3O^+) Konzentration (Brown et al., 2011):

$$\text{pH} = -\lg c(\text{H}^+)$$

Der physiologische pH-Wert im Blut des gesunden Menschen liegt zwischen 7.37 und 7.45. Unter einem Wert von 7.37 spricht man von einer Azidose, deren Ursachen in respiratorische und metabolische eingeteilt werden können (Burckhardt, 2009). Eine metabolische Azidose entsteht u.a. durch eine erhöhte Laktatbildung im Gewebe bei Hypoxie oder körperlicher Anstrengung. Weitere Ursachen können ein entgleister Diabetes mellitus (Ketoazidose) und ein Basenverlust (z.B. bei Diarrhoe) sein (Bengtsson et al., 1990). Wenn im Stoffwechsel mehr CO_2 gebildet, als über die Lunge abgeatmet werden kann, wie u.a. durch eine zentrale Atemantriebsdämpfung oder eine Obstruktion der Atemwege, entsteht hingegen eine respiratorische Azidose (Burckhardt, 2009). Die CO_2 -Konzentration steht dabei über folgende Formel mit dem pH-Wert des Blutes direkt in Verbindung:



Bei einem erniedrigten pH-Wert können im Körper Stoffwechselfvorgänge nicht mehr wie gewohnt ablaufen, da z.B. einige Enzyme nicht mehr optimal arbeiten können (Kriegel und Schellenberger, 2007). Durch die Azidose kommt es zudem zu Elektrolytverschiebungen, v.a. zu einer Hyperkaliämie, die wiederum zu Herzrhythmusstörungen und Blutdruckabfällen führen kann (Oberleithner, 2009).

Jede Körperzelle besitzt daher Regulationsmechanismen um einer drohenden Azidose entgegenzuwirken. So werden H^+ -Ionen über die Na^+/H^+ -Antiporter aus dem Zellinneren gepumpt, organische Anionen (wie Laktat) werden in neutrale Metabolite umgewandelt (CO_2 und Glukose), ATP wird aus ADP und H^+ gebildet und zytoplasmatische Proteine puffern die H^+ -Ionen ab (Burckhardt, 2009). Im Blutsystem gibt es zudem vier Puffersysteme, die den pH-Wert des Blutes konstant halten, von denen der Kohlensäure-Bikarbonat-Puffer die größte Pufferkapazität besitzt (Lang, 2010). Auf dem Blutweg erreichen die H^+ -Ionen schließlich die Niere und die Lunge, um als titrierbare Säuren oder NH_4^+ über die Niere ausgeschieden und als CO_2 über die Lunge abgeatmet zu werden (Burckhardt, 2009).

Ein weiterer lebensnotwendiger Mechanismus, der nach einer Veränderung der Säure-Basen-Homöostase des Körpers beobachtet wird, ist die Verhaltensänderung des Organismus. Dabei ist die Kontrolle von Atmung, Aufmerksamkeit, Angstgefühlen und Aggressivität essentiell (Ziemann et al., 2009, Cozine und Ngai, 1967, Buchanan und Richerson, 2010).

Die Bedeutung dieser Mechanismen zeigt das Beispiel der durch eine Atemwegsobstruktion bedingten respiratorischen Azidose während des Schlafes, die über ein Erwachen sowie eine Stimulation der Atmung zu einer Normalisierung des Blut-pH-Wertes führt. Das Nichtreagieren des Körpers auf einen erniedrigten pH-Wert könnte für das Krankheitsbild des plötzlichen Kindstodes verantwortlich sein (Paterson et al., 2009).

Für spontan atmende Organismen, deren pH-Homöostase nicht zuletzt für die Funktion ihrer Enzyme und für das Gleichgewicht der Elektrolyte und somit auch des Wasserhaushaltes von Bedeutung sind, ist es daher unabdingbar zentrale pH- und CO₂-Chemosensoren zu besitzen, die Veränderungen des pH-Wertes detektieren und Informationen darüber an andere Zentren des Gehirns weitergeben.

Neben den chemosensitiven Neuronen des Gehirnstammes, deren pH- und CO₂-Sensitivität schon seit vielen Jahren bekannt ist und erforscht wird (Huda et al., 2012, Tojima et al., 1991), scheinen auch andere Neuronengruppen, wie die orexinergen und histaminergen Neurone des posterioren Hypothalamus, an der komplexen Antwort des Organismus auf einen veränderten pH-Wert beteiligt zu sein. So zeigten Williams et al., dass die orexinergen Neurone auf eine Erniedrigung des pH-Wertes mit einer erhöhten Feuerungsrate antworten, was eine Eigenschaft chemosensorischer Neurone ist, da die meisten Neurone des Gehirns auf eine Ansäuerung des extrazellulären Milieus mit einer Hyperpolarisation und somit einer verminderten Aktionspotentialfrequenz reagieren (Williams et al., 2007, Williams und Burdakov, 2008).

Da den histaminergen Neuronen des posterioren Hypothalamus komplementäre sowie synergistische Funktionen in essentiell wichtigen Körperfunktionen, wie z.B. der Schlaf-/Wachregulation, mit den orexinergen Neuronen zugeschrieben werden (Anaclet et al., 2009), erscheint es sinnvoll auch die Bedeutung der histaminergen Neurone als pH-sensitive Chemosensoren zu betrachten.

Johnson et al. zeigten, dass eine erhöhte CO₂-Konzentration in der Subpopulation TMNv histaminergen Neurone eine erhöhte Protein-Expression von C-Fos bedingt. C-Fos ist ein ‚*immediate early gene*‘ (IEG), d.h., dass es schon wenige Minuten nach der Stimulation einer Zelle vermehrt transkribiert wird. Folglich führt eine erhöhte CO₂-Konzentration zu einer Stimulation histaminergen Neurone (TMNv), (2005).

Unklar bleibt, ob dieser Effekt durch einen veränderten synaptischen Input aus anderen Gehirnregionen, wie z.B. der orexinergen Neurone resultiert (Schone et al., 2011), oder ob histaminerge Neurone selbst als Chemosensoren fungieren.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit dem direkten Effekt eines erniedrigten extrazellulären pH-Wertes auf die Aktivität histaminergener Neurone und geht der Frage nach, ob Neurone des Nucleus tuberomammillaris neben den orexinergen Neuronen des posterioren Hypothalamus zentrale pH-sensorische Zentren sind, die die lebensnotwendige Reaktion des Organismus auf eine Veränderung der extrazellulären Protonenkonzentration steuern.

1.3 Der ischämische Schlaganfall

Der ischämische Schlaganfall ist ein akutes fokales neurologisches Defizit, welches aufgrund einer regionalen Durchblutungsstörung des Gehirns durch den umschriebenen Mangel an für den Stoffwechsel wichtigem Sauerstoff (O_2) und Nährstoffen (wie Glukose) entsteht. Besteht dieser Mangel über eine längere Zeit, so kommt es zu einem irreversiblen Absterben von Gehirngewebe (Endres und Prinz, 2012).

Ein wichtiger pathophysiologischer Mechanismus des ischämischen Schlaganfalls ist der Stoffwechselweg der anaeroben Glykolyse, der auch bei Sauerstoffmangel ATP bereitstellt, jedoch über die Bildung von Laktat und Protonen zu einer zerebralen Azidose führt (Siesjo, 1992). Durch eine solche Ischämie kann der pH-Wert im Gehirn bis auf einen Wert von 5.5 absinken (Nemoto und Frinak, 1981, Chesler, 2003).

Die Vielzahl klinischer Erscheinungsformen des ischämischen Schlaganfalls resultiert aus der Lokalisation der Durchblutungsstörung, der ursächlich thromboembolische, mikroangiopathische und hämodynamische Mechanismen zugrunde liegen können (Endres und Prinz, 2012).

Der Schlaganfall ist laut der deutschen Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes die dritthäufigste Todesursache in Deutschland und der häufigste Grund einer dauerhaften Behinderung (Statistisches Bundesamt, 2006). Aufgrund dieser hohen Morbidität und Mortalität stellen die Kosten der Akutbehandlung, Sekundärprophylaxe und Rehabilitation bedeutsame Ausgaben im deutschen Gesundheitswesen dar (Diener und Weimer, 2012).

Neben der therapeutischen Reperfusion des verschlossenen Gehirngefäßes durch eine Lysetherapie (rTPA) in einem geringen Zeitfenster von bis zu 4.5 Stunden, bzw. durch die mechanische Rekanalisierung des Gefäßes, werden heute auch viele neuroprotektive Stoffe untersucht, die im Rahmen einer zerebralen Ischämie das Infarktvolumen und somit das

Ausmaß des Schlaganfalls vermindern und so die Reperfusion des verschlossenen Gefäßes als Therapie des akuten Schlaganfalls unterstützen könnten (Hu und Chen, 2012, Diener und Weimer, 2012).

Schon seit einigen Jahren wird auch eine protektive Bedeutung von Histamin im Rahmen der zerebralen Ischämie diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration an Histamin im Gehirn einige Stunden nach einer zerebralen Ischämie statistisch signifikant erhöht ist (Adachi et al., 1991). Diese erhöhte Histaminkonzentration im Rahmen der zerebralen Ischämie kann durch die vermehrte Freisetzung von Histamin einerseits aus Neuronen des Nucleus tuberomamillaris, die u.a. durch eine kurzzeitige Hypoxie aktiviert werden (Ohshima et al., 2007), und andererseits aus Immunzellen (Mastzellen) im Gehirn bedingt sein (Garbarg et al., 1976).

Es konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Konzentration an Histamin den durch eine Ischämie entstandenen neuronalen Schaden sowie das Infarktvolumen verringert (Fujitani et al., 1996, Adachi et al., 2005). Dabei könnte die Wirkung von Histamin an verschiedenen Zellgruppen des Gehirns, wie Neuronen, Gliazellen, Entzündungszellen und Gefäßendothelzellen bedeutsam sein (Hu und Chen, 2012).

Obwohl Histamin als Neuroprotektor bei dem ischämischen Schlaganfall eine zentrale Rolle zu spielen scheint, wurde der direkte Effekt eines erniedrigten pH-Wertes, wie er bei der zerebralen Ischämie im Gehirn auftritt, auf histaminerge Neurone noch nicht untersucht.

1.4 Extrazelluläre pH-Sensoren

1.4.1 ASIC

Damit der Organismus adäquat auf einen veränderten pH-Wert reagieren kann, benötigt er zentrale pH-Sensoren, die den extrazellulären pH-Wert detektieren.

In der Literatur werden zahlreiche pH-Sensorproteine in Zellen des Gehirns beschrieben, die den extrazellulär erniedrigten pH-Wert wahrnehmen und die Aktivität von Neuronen beeinflussen.

Eine Gruppe bekannter extrazellulärer pH-Sensoren des Gehirns sind die *acid-sensing ion channels* (ASICs), die bereits 1980 durch Kristhal und Pidoplichko beschrieben, jedoch erst 17 Jahre später durch die Arbeitsgruppe um Lazdunski genauer charakterisiert wurden (Krishtal und Pidoplichko, 1980, Waldmann et al., 1997a).

ASICs sind kationische Ionenkanäle, die durch extrazelluläre H^+ Ionen aktiviert werden. Sie gehören zur Untergruppe der DEG/ENaC Natrium-Ionenkanäle, die durch zwei hydrophobe transmembranäre Domänen und einen großen Cystein-reichen extrazellulären Abschnitt charakterisiert sind (Waldmann und Lazdunski, 1998, Saugstad et al., 2004, Hong et al., 2000, Snyder et al., 1994).

Das menschliche Genom enthält vier Gene (ACCN 1 - 4) für die verschiedenen ASIC Kanaluntereinheiten, die mit ihren alternativen Spleißprodukten (ASIC 1a, ASIC 1b, ASIC 2a, ASIC 2b, ASIC 3 und ASIC 4) die Subtypen des Ionenkanals bilden (Waldmann und Lazdunski, 1998, Benson et al., 2002). Zusätzlich wurden Splicevarianten von ASIC 3 und 4 beschrieben, die sich in dem C-terminalen Abschnitt (ASIC 3) oder der extrazellulären Domäne (ASIC 4) unterscheiden. Ihre physiologische Bedeutung ist noch unklar (zit. nach Deval et al., 2010).

Der genaue Aufbau des Ionenkanals ist bis heute nicht endgültig geklärt. Zunächst deuteten stöchiometrische Untersuchungen von DEG/ENaC Kanälen darauf hin, dass sich vier oder neun Untereinheiten zu einem funktionellen ASIC Kanal formieren (Firsov et al., 1998, Eskandari et al., 1999).

Neuere Studien gehen jedoch von einer trimären Struktur der ASIC Kanäle aus (Gonzales et al., 2009), (Abb. 4).

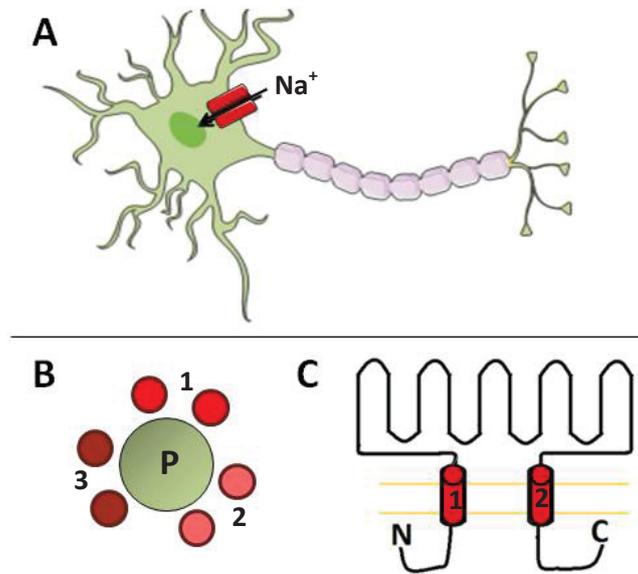


Abb. 4: Schematische Darstellung des acid-sensing ion channels (ASIC) **A:** ASICs sind v.a. für Natriumionen (Na^+) durchlässig. Darstellung von ASICs in der Zellmembran eines Neurons. **B:** Porenaufsicht eines ASIC Kanals, die zeigt, dass sich der Kanal aus drei Untereinheiten zu einem funktionellen Kanal zusammensetzt (P = Pore). **C:** Eine Untereinheit des ASIC Kanals besteht aus zwei Transmembrandomänen und einem großen Cystein-reichen extrazellulären Abschnitt. Sowohl das NH_2 -Ende (N), wie auch das COOH -Ende (C) der jeweiligen Kanaluntereinheit befinden sich intrazellulär (Modifiziert nach: Kernder A, De Luca R, Yanovsky Y, Haas HL, Sergeeva OA (2014) Acid-sensing hypothalamic neurons controlling arousal. *Cell Mol Neurobiol* 34(6):777-89, mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlages).

Die spannungsunabhängigen ASIC Kanäle sind v.a. für Natriumionen permeabel, lassen in einem geringen Ausmaß jedoch auch andere Kationen hindurchtreten (u.a. Ca^{2+} , K^+ , H^+). ASIC Kanäle werden reversibel durch Amilorid (und dessen Derivate Benzamil und Ethylisopropylamilorid) blockiert (Waldmann et al., 1997b). Calciumionen stabilisieren zudem den geschlossenen Zustand der Ionenkanäle (Paukert et al., 2004).

Die ASIC Untereinheiten können sich sowohl homooligomer (eine ASIC Kanaluntereinheit), als auch heterooligomer (verschiedene ASIC Kanaluntereinheiten) zu einem funktionellen Ionenkanal assemblieren. Die homooligomeren ASIC Kanaluntereinheiten zeigen im Vergleich ein unterschiedliches Verteilungsmuster und variieren u.a. in der pH-Sensitivität, der Ionenselektivität sowie der Desensibilisationskinetik. So zeigen die verschiedenen ASIC Homooligomere in der Maus u.a. bei unterschiedlichen extrazellulären pH-Werten ihre halbmaximale Aktivität (Benson et al., 2002), (Tabelle 1). Auch die heterooligomeren Ionenkanäle variieren stark in den oben genannten Charakteristika. So sind ASIC 1a homooligomere Komplexe z.B. für Calciumionen permeabel, wobei es ASIC 2 enthaltende Heterooligomere nicht mehr sind (Yermolaieva et al., 2004).

Innerhalb der Zelle befinden sich ASICs an verschiedenen Zellkompartimenten, wie der äußeren Zellmembran, der Kernmembran und dem endoplasmatischen Retikulum (Huang et

al., 2010, Chai et al., 2010). Dabei wurde z.B. für ASIC 1a die Lokalisation am endoplasmatischen Retikulum beschrieben, über die die Oberflächenexpression der Kanaluntereinheit an der äußeren Zellmembran reguliert werden kann. Das Neuron kann so auf äußere Reize schnell reagieren und den intrazellulären Speicher an ASIC 1a in die Zellmembran einbauen, ein Mechanismus der von Chai et al. als ‚*surface trafficking*‘ beschrieben wurde (2010).

Isoform	Expression im Gewebe	pH₅₀	Besonderheit
ASIC 1a	PNS RM Retina Knochen Geschmacksrezeptoren Gehirn	6.2 – 6.8	permeabel für Calciumionen
ASIC 1b	PNS Spinalganglion sensorische Neurone: - Haarzellen (Cochlea) - Geschmackszellen	5.1 – 6.2	
ASIC 2a	PNS RM Gehirn Retina Spinalganglion (Cochlea) Geschmackszellen Knochen	4.1 - 5.0	
ASIC 2b	PNS RM Gehirn Retina Geschmackszellen	-	bilden keinen funktionellen homooligomeren Kanal
ASIC 3	PNS Geschmackszellen Retina Hoden Lunge Innenohr Knochen Gehirn sensorische Neurone	6.2 - 6.7	
ASIC 4	PNS Gehirn RM Retina Hypophyse vestibuläre System Corti-Organ	-	bilden keinen funktionellen homooligomeren Kanal

Tabelle 1. Eigenschaften von acid-sensing ion channels (ASIC) Die Tabelle zeigt die Expression von ASIC 1 – 4 im Gewebe, die jeweiligen pH-Werte, bei denen die ASICs ihre halbmaximale Aktivierung (pH₅₀) aufweisen, sowie weitere spezielle Besonderheiten einzelner ASIC Kanaluntereinheiten. (PNS = peripheres Nervensystem, RM = Rückenmark), (Modifiziert nach: Lingueglia, E (2007) Acid-sensing ion channels in sensory perception. J Biol Chem 282:17325-17329, mit freundlicher Genehmigung des Journal of Biological Chemistry).

ASIC Kanäle sind im zentralen und im peripheren Nervensystem weit verbreitet, wurden jedoch auch in nicht neuronalem Gewebe, wie dem Hoden, der Lunge und dem Knochengewebe, nachgewiesen (zit. nach Lingueglia, 2007).

Dabei befinden sich die ASIC Kanäle im peripheren Nervensystem v.a. an freien Nervenendigungen (Price et al., 2001). Diese Lokalisation erlaubt ihnen eine bedeutende Rolle bei dem säureinduzierten Schmerz im Rahmen von Entzündungen, Infektionen, Ischämien und Tumoren im Gewebe einzunehmen, bei denen der extrazelluläre pH-Wert unter einen Wert von 7.0 abfallen kann (Issberner et al., 1996). Unterschiedliche Zusammensetzungen der ASIC Untereinheiten zu einem Ionenanal können einen breiten pH-Bereich detektieren und so den sauren Schaden im Gewebe genauer eingrenzen (Benson et al., 2002). Es ist zudem sehr interessant, dass inflammatorische Mediatoren, wie 5-Hydroxytryptamin oder Interleukin 1 die Transkription der ASIC Untereinheiten stimulieren (Mamet et al., 2002).

Die Expression von ASIC Kanälen in Geschmacksrezeptoren (Vina et al., 2013) und der Retina (Ettaiche et al., 2006) zeigt die Bedeutung der Kanäle für die sensorische Wahrnehmung des Organismus.

Im zentralen Nervensystem zeigen v.a. der zerebrale Kortex, das Cerebellum, der Hippocampus und die Amygdala, eine hohe Expression von ASIC Kanälen (Wemmie et al., 2003). Hier scheint v.a. ASIC 1a eine dominante Rolle einzunehmen (Wemmie et al., 2002).

Funktionell sind ASICs im zentralen Nervensystem so u.a. an der Langzeitpotenzierung, der Angstentstehung und der emotionalen Bewertung und Wiedererkennung von Gefahrensituationen beteiligt (Wemmie et al., 2002).

ASIC 1a Knockout-Mäuse zeigen eine reduzierte Verhaltensänderung in Gefahrensituationen (Wemmie et al., 2003) und erhöhte Konzentrationen an CO₂ und Protonen im Gehirn lösten bei gesunden Mäusen, nicht jedoch bei ASIC 1a Knockout-Mäusen Angstreaktionen aus (Ziemann et al., 2009).

Neueste Studien zeigen, dass ASIC Kanäle auch an der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls beteiligt sind. Bei einer zerebralen Ischämie kommt es durch die anaerobe Glykolyse zu einem Anstieg von Laktat im Gewebe, der mit einem pH-Wert Abfall auf bis zu 5.5 einhergehen kann (Chesler, 2003, Nemoto und Frinak, 1981). Obwohl die genauen Pathomechanismen der Beteiligung von ASICs noch unklar bleiben, geht man davon aus, dass durch die ASIC 1a Aktivierung im Rahmen der zerebralen Azidose der intrazelluläre Calciumspiegel ansteigt. Der erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel ist toxisch für die Neurone und führt zu einem vermehrten neuronalen Zelltod (Yermolaieva et al., 2004). Die

intrazerebroventrikuläre Injektion von ASIC 1a Blockern (Amilorid, PcTX1) reduzierte in Nagetieren das Infarkt volumen um bis zu 60 % (Xiong et al., 2004, Pignataro et al., 2007). Da der zerebrale pH-Wert für einige Stunden nach einem ischämischen Schlaganfall erniedrig bleibt, scheint die Entwicklung von ASIC1a Blockern in der Behandlung von Schlaganfällen zur Reduzierung des Infarktvolumens bedeutend.

Auch während eines epileptischen Anfalls kann es zu einem signifikanten Abfall des pH-Wertes im Gehirn kommen (Wang und Sonnenschein, 1955). Eine ASIC Blockade durch Amilorid oder eine selektive Blockade von ASIC 1a durch PcTX1 hemmen die neuronale Aktivität der Neurone, weshalb auch in diesem Zusammenhang die Entwicklung neuer Medikamente, die die ASIC Kanäle blockieren, bedeutsam sein kann (zit. nach Xiong et al., 2008).

Obwohl in den letzten Jahren viele Erkenntnisse über den Aufbau, die Expression und die Funktion von ASIC Kanälen gewonnen werden konnten, ist über deren Bedeutung im Hypothalamus relativ wenig bekannt.

Meng et al. veröffentlichten 2009 ihre Forschungsarbeiten über die Verteilung der ASIC 3 Kanäle im Hypothalamus der Ratte. Mittels *Real-Time* PCR, Westernblot und immunhistochemischen Färbungen wiesen sie deren ausgedehnte Verbreitung im gesamten Hypothalamus nach. Eine besonders stark ausgeprägte Expression von ASIC 3 zeigte sich im Nucleus tuberomamillaris (Meng et al., 2009). Zudem wurde im Nucleus suprachiasmaticus des Hypothalamus, einem Kerngebiet welches die circadiane Rhythmik steuert, die Expression von ASIC 1a, 1b, 2a, 2b und 3 nachgewiesen (Chen et al., 2009).

In elektrophysiologischen Untersuchungen zahlreicher hypothalamischer Neurone der Ratte konnten die durch einen erniedrigten extrazellulären pH-Wert ausgelösten Ionenströme durch den unspezifischen ASIC Kanalblocker Amilorid reversibel gehemmt werden (Wang et al., 2007).

So zeigte sich auch in orexinergen Neuronen des posterioren Hypothalamus, eine Aktivitätserhöhung durch einen erniedrigten extrazellulären pH-Wert, die zu einer erhöhten Atemfrequenz führt und durch ASIC Antagonisten blockiert werden kann (Song et al., 2012).

Die genaue Expression und mögliche Funktion der verschiedenen ASIC Kanaluntereinheiten an histaminergen Neuronen im Nucleus tuberomamillaris des posterioren Hypothalamus, die mit den orexinergen Neuronen ein integratives System vegetativer Funktionen bilden, ist noch nicht erforscht und wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit.

1.4.2 TRPV 1

Der *transient receptor potential vanilloid 1* Ionenkanal (TRPV 1) ist ein weiterer extrazellulärer pH-Sensor des Gehirns und wird in die Gruppe der TRP Kanäle (*transient receptor potential*) eingeordnet, die insgesamt in sieben Unterfamilien eingeteilt werden können (TRP- (-C, -M, -V, -A, -P, -ML, -N)). Zur TRPV Unterfamilie werden wiederum sechs Mitglieder gezählt (TRPV 1- 6), (zit. nach Nilius und Voets, 2005).

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf den TRPV 1 Kanal, einen pH-sensitiven Ionenkanal, der durch Expressionsklonierung im Jahr 1997 von Julius und seiner Arbeitsgruppe identifiziert wurde (Caterina et al., 1997) und in diversen Organsystemen sowohl neuronal als auch nicht neuronal, exprimiert wird (Cristino et al., 2006, Cavanaugh et al., 2011).

TRPV 1 Kanäle formen in Gruppierungen Tetramere mit jeweils sechs Transmembrandomänen einen funktionellen nicht-selektiven Kationenkanal. Dabei liegt sowohl das NH₂-Ende wie auch das COOH-Ende der jeweiligen Kanaluntereinheit im intrazellulären Bereich der Zelle. Die Pore des Kanals wird durch die Transmembrandomänen 5 und 6 gebildet (Abb. 5), (Caterina et al., 1997, Kedei et al., 2001, Clapham et al., 2005).

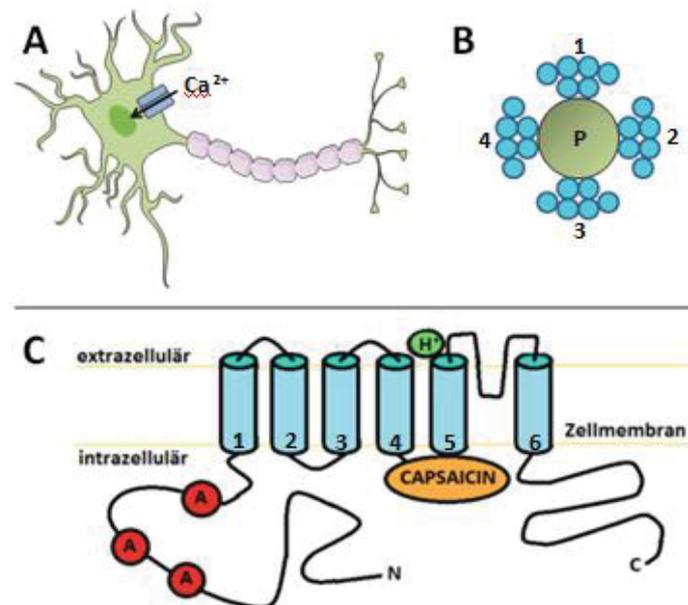


Abb. 5: Schematische Darstellung des *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV 1) Ionenkanals **A:** Der TRPV 1 Kanal in der Zellmembran eines Neurons. **B:** Porenaufsicht, die zeigt, dass sich der Kanal aus vier Untereinheiten zu einem funktionellen Ionenkanal zusammensetzt (P = Pore). **C:** Eine Untereinheit des TRPV 1 Kanals besteht aus sechs Transmembrandomänen (TM), von denen die TM 5 und 6 die Pore des Kationenkanals bilden. Sowohl des NH₂-Ende (N), wie auch das COOH-Ende (C) befinden sich intrazellulär, (A = Ankyrinwiederholungen). Capsaicin bindet intrazellulär an die TRPV 1 Kanaluntereinheit und aktiviert so den Ionenkanal. Protonen aktivieren den Kanal über eine extrazelluläre Bindungsstelle (Modifiziert nach: Kernder A, De Luca R, Yanovsky Y, Haas HL, Sergeeva OA (2014) Acid-sensing hypothalamic neurons controlling arousal. *Cell Mol Neurobiol* 34(6):777-89, mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlages).

Der Ionenkanal kann durch eine Vielzahl von Stimuli geöffnet werden. Dazu zählen u.a. Capsaicin, der Bestandteil der Chili, der deren Schärfe vermittelt, Hitze (ab 43°C), Säure, Osmolaritätsänderungen sowie die Phosphorylierung des Kanals durch die Proteinkinase C (PK C), (Caterina et al., 1997, Bevan und Geppetti, 1994, Liu et al., 2007, Mandadi et al., 2011).

Die Öffnung des Kanals erzeugt einen unselektiven einwärts gerichteten Ionenstrom, der v.a. von Calciumionen getragen wird ($\text{Ca}^{2+} > \text{Na}^+$). Auf diesen Einwärtsstrom folgt eine langanhaltende Refraktärzeit, in der der Kanal weder auf Capsaicin noch auf andere Stimuli reagiert (Clapham et al., 2005). Der einwärts gerichtete Ionenstrom depolarisiert die Zelle und führt gegebenenfalls zu einem Aktionspotential in dem Neuron.

Die Bindungsstelle von Capsaicin am TRPV 1 Kanal befindet sich intrazellulär, wobei Protonen über eine extrazelluläre Bindungsstelle den Kanal aktivieren (Jung et al., 1999, Jordt et al., 2000), (Abb. 7).

Im Gegensatz zu einigen ASIC Kanaluntereinheiten öffnet sich der TRPV 1 Kanal erst, wenn der extrazelluläre pH-Wert unter einen Wert von 6 fällt (pH_{50} : 5.4). Andererseits kann eine leichte Ansäuerung (pH-Werte zwischen 6 und 7) den TRPV 1 Kanal für andere Stimuli (wie Capsaicin oder Hitze) sensitivieren (Tominaga et al., 1998).

Die Expression des TRPV 1 Kanals an nozizeptiven afferenten Neuronen des peripheren Nervensystems sowie die Aktivierung des Ionenkanals durch Entzündungsmediatoren (wie Prostaglandin E2 und Bradykinin), erlaubt es den Kanälen eine bedeutende Rolle als multimodaler Nozizeptor einzunehmen (Grace et al., 2012, Abraham et al., 2011). Daher ist der TRPV 1 Kanal eine neue Zielstruktur verschiedener Pharmaka, die als Nichtopioid-Analgetika den TRPV 1 Kanal antagonisieren (zit. nach Knotkova et al., 2008, Szallasi et al., 2007).

Neben dieser Funktion im peripheren Nervensystem konnte der TRPV 1 Kanal zudem im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden. Mittels der Weiterentwicklung neuer molekularbiologischer Methoden, wie der Immunhistochemie sowie der in-situ-Hybridisierung, gelang der Nachweis der Expression des TRPV 1 Kanals so u.a. in hypothalamischen und thalamischen Kernen des zentralen Nervensystems (Cristino et al., 2006, Toth et al., 2005).

Der TRPV 1 Kanal scheint im zentralen Nervensystem an vielen lebensnotwendigen Funktionen beteiligt zu sein. So gibt es Hinweise darauf, dass der Kanal die synaptische Transmitterfreisetzung in Nervenzellen moduliert (Sikand und Premkumar, 2007, Marinelli et al., 2005) und die Langzeitpotenzierung im Rahmen der Gedächtnisbildung (Gibson et al., 2008, Li et

al., 2008) sowie die Körpertemperaturregulierung (Jancso-Gabor et al., 1970, Steiner et al., 2007) beeinflusst.

Zusätzlich scheint der TRPV 1 Kanal auch an der Pathophysiologie einiger Krankheiten, wie Diabetes mellitus, Adipositas (Lee et al., 2015), Parkinson (Morgese et al., 2007) und Bluthochdruck (Parpaite et al., 2015, Hao et al., 2011) involviert zu sein.

Im Rahmen der zerebralen Ischämie kommt der Aktivierung des TRPV 1 Kanals eine neuroprotektive Funktion zu. Ein möglicher Pathomechanismus ist die zentrale Senkung der Körpertemperatur des Organismus durch eine Aktivierung des Kanals (Muzzi et al., 2012, Cao et al., 2014, Khatibi et al., 2011).

In den letzten Jahren wurden zudem verschiedene Splicevarianten des TRPV 1 Kanals entdeckt, die, mit dem TRPV 1 Kanal koexprimiert, dessen Funktion beeinflussen (Abb. 6).

So isolierten Schumacher et al. eine N-terminale Splicevariante des TRPV1 Kanals der Ratte (Vr. 5'sv), der im Vergleich zum TRPV 1 Kanal ein Großteil der intrazellulären N-terminalen Domäne des Proteins fehlen (2000).

Vr.5'sv konnte in Spinalganglienzellen, in peripheren Blutzellen sowie im Gehirn nachgewiesen werden (Schumacher et al., 2000, Sanchez et al., 2001).

Die elektrophysiologischen Untersuchungen von Vr.5'sv zeigten keine Sensitivität der Kanäle für Capsaicin, Protonen oder Hitze (über 50°C). Durch die Koexpression von TRPV 1 und der Splicevariante Vr.5'sv in Geweben wird der TRPV 1 Kanal inhibitorisch beeinflusst (Eilers et al., 2007).

TRPV 1B, eine weitere Splicevariante des TRPV 1 Kanals, wird durch Hitze, nicht jedoch durch Capsaicin und Protonen, aktiviert (Lu et al., 2005). Strukturell fehlt der Splicevariante das Exon 7 des TRPV 1 Kanals. TRPV 1B konnte in Spinalganglienzellen, dem Cerebellum sowie ubiquitär in dem fetalen Gehirn nachgewiesen werden. Auch diese Splicevariante scheint die Sensitivität des TRPV 1 Kanals auf Protonen und Capsaicin bei Koexpression zu inhibieren (Vos et al., 2006).

TRPV 1 β , eine Splicevariante des TRPV 1 Kanals der Maus, bildet alleine keinen funktionellen Ionenkanal, kann den TRPV 1 Kanal jedoch ebenfalls negativ regulieren. Die Splicevariante wurde in Spinalganglienzellen, in der Haut, im Magen und der Zunge nachgewiesen (Wang et al., 2004).

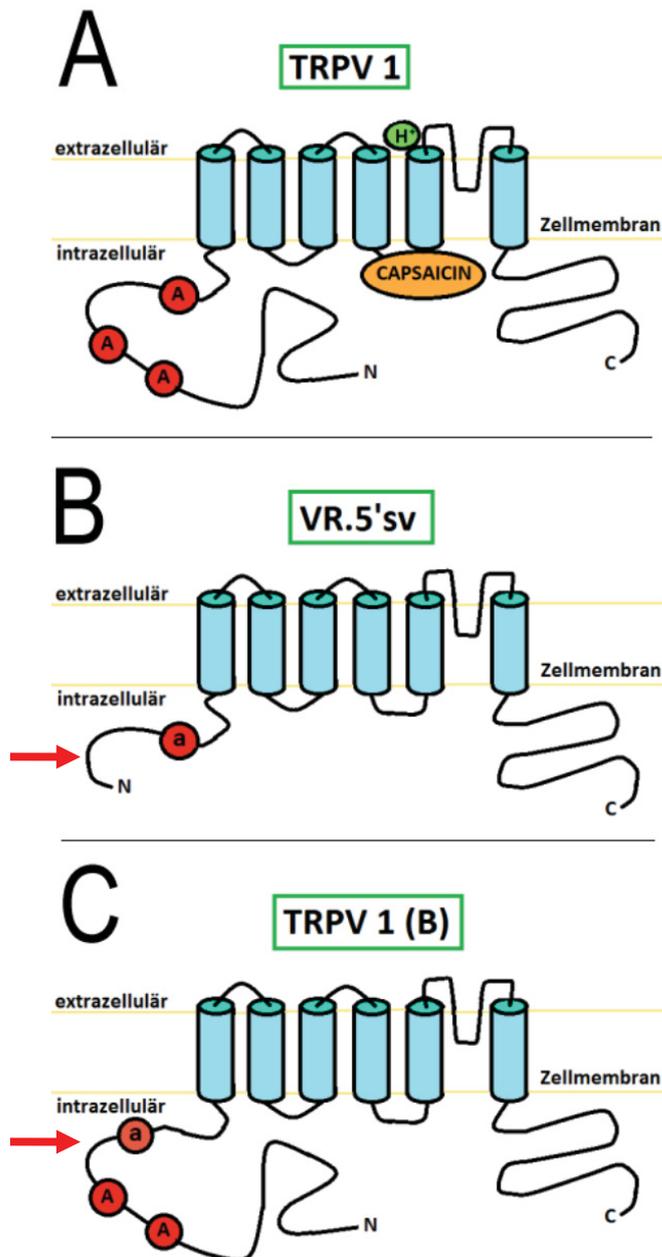


Abb. 6: Schematische Darstellung der Splicevarianten VR.5'sv und TRPV 1B des *transient receptor potential vanilloid* (TRPV 1) Kanals **A:** Eine Untereinheit des TRPV 1 Kanals bestehend aus sechs Transmembran- α -Untereinheiten. Sowohl des NH₂-Ende (N), wie auch das COOH-Ende (C) der jeweiligen Kanaluntereinheit befinden sich intrazellulär, (A = Ankyrinwiederholungen). **B:** Die Splicevariante VR.5'sv des TRPV 1 Kanals fehlt ein Großteil der intrazellulären N-terminalen Domäne des Proteins. **C:** Schematische Darstellung der Splicevariante TRPV 1B des TRPV 1 Kanals der das Exon 7 fehlt (a = verminderte Ankyrinwiederholungen (im Vergleich zu TRPV 1), (Quelle: eigene Darstellung).

1.4.3 OGR 1

Ein weiterer extrazellulärer pH-Sensor, dessen Expression im zentralen Nervensystem gezeigt werden konnte, ist der *ovarian cancer G protein-coupled receptor 1* (OGR 1), (Xu und Casey, 1996). Extrazelluläre Protonen (pH 6.8) aktivieren den G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Es

kommt über Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) zu einer vermehrten Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum (Ludwig et al., 2003). Durch die erhöhte intrazelluläre Konzentration von Calciumionen kommt es zu einer Depolarisation der Zelle, die gegebenenfalls ein Aktionspotential generieren kann.

Neben der Expression des OGR 1 in Osteoblasten, Osteoklasten und in Gefäßmuskelzellen, konnte dieser G-Protein-gekoppelte Rezeptor zudem in der Lunge, der Niere und dem Nervensystem nachgewiesen werden (Saxena et al., 2012, Mohebbi et al., 2012, Huang et al., 2007). Die Expression des extrazellulären pH-Sensors in Neuronen des Hypothalamus wurde noch nicht untersucht.

1.4.4 Na^+/K^+ -ATPase

Skou und seine Mitarbeiter entdeckten 1957 die ‚Natrium- und Kaliumionen abhängige Pumpe‘ an Krabbenneuronen der Peripherie, die unter Verbrauch von Energie (ATP) drei Natrium- gegen zwei Kaliumionen entgegen eines chemischen und elektrischen Gradienten über die Plasmamembran von Zellen transportiert (Skou, 1989). Heute weiß man, dass die Funktion der Na^+/K^+ -ATPase für jede Körperzelle von wichtiger physiologischer Bedeutung ist. Die durch die Na^+/K^+ -ATPase kontrollierte niedrige Natriumkonzentration im Zellinneren regelt z.B. die osmotische Kontrolle des Zellvolumens. In Nervenzellen ist die Na^+/K^+ -ATPase zudem für die elektrische Erregbarkeit der Neurone unabdingbar (Korbmacher und Bernhard, 2009).

Die Na^+/K^+ -ATPase setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen: Jeweils zwei α und zwei β Untereinheiten, wobei die α Untereinheit die katalytische Einheit der Pumpe darstellt. Die β Untereinheit, die glykosyliert werden kann, dient unter anderem der Stabilität der Pumpe und spielt eine wichtige Rolle bei dem Einbau der Na^+/K^+ -ATPase in die Plasmamembran der Zelle. Zudem kann sie regulatorisch die Aktivität der Ionenpumpe beeinflussen (Korbmacher und Bernhard, 2009). Man unterscheidet verschiedene Subtypen der α und β Untereinheit ($\alpha 1-4$, $\beta 1-2$), die gewebsspezifisch exprimiert werden und sich in ihrer Affinität für Natriumionen sowie ihrer Kinetik unterscheiden.

Während die $\alpha 1$ Untereinheit ubiquitär vorkommt, wird die $\alpha 2$ Untereinheit in Herzmuskelzellen, Adipozyten sowie in Astrozyten des Gehirns exprimiert. Die $\alpha 3$ Untereinheit findet sich hingegen auch in Neuronen und glatten Muskelzellen. Die $\alpha 4$ Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase wird nicht im Gehirn exprimiert. Bei der β Untereinheit unterscheidet man die $\beta 1$ Untereinheit, die ubiquitär exprimiert wird, von der $\beta 2$ Untereinheit

die in Gliazellen, Neuronen der frühen Entwicklung und in Pyramidenzellen des Hippocampus nachgewiesen werden konnten (zit. nach Tokhtaeva et al., 2012).

Der spezifische Inhibitor der Na^+/K^+ -ATPase Ouabain (g-Strophanthin), der in dem Extrakt des roten Fingerhuts vorkommt, bindet an der Außenseite des Enzyms und blockiert sowohl die Transportfunktion, als auch die ATP-Hydrolyse der Ionenpumpe (Korbmacher und Bernhard, 2009). Fuller zeigte zudem eine Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase durch einen durch extrazelluläre Protonen-aktivierten Faktor, der während einer Ischämie intrazellulär akkumuliert, von Subtypen der Na^+/K^+ -ATPase, die im Gehirn und in Kardiomyozyten exprimiert werden (2003). Eine solche Hemmung durch Protonen führt zu einer Depolarisation der Membran und somit zu einer erhöhten Erregbarkeit von Neuronen und Kardiomyozyten.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Sind histaminerge Neurone des posterioren Hypothalamus zentrale pH-Sensoren?

Wie die benachbarten orexinergen Neurone des posterioren Hypothalamus (Williams et al., 2007, Williams und Burdakov, 2008, Song et al., 2012) könnten auch die histaminergen Neurone Veränderungen des extrazellulären pH-Wertes wahrnehmen und somit an der zentralen Steuerung der Aufmerksamkeit und Atmung des Organismus beteiligt sein.

Die Wahrnehmung einer zerebralen Azidose, wie sie im Rahmen des ischämischen Schlaganfalls auftritt (Nemoto und Frinak, 1981, Chesler, 2003), über pH-Sensorproteine histaminergere Neurone könnte zudem die bekannte protektive Konzentrationserhöhung des Mediatorstoffes Histamin im Rahmen der zerebralen Ischämie erklären (Fujitani et al., 1996, Adachi et al., 2005).

Die pH-Sensorik histaminergere Neurone des posterioren Hypothalamus wurde noch nicht untersucht.

1. In der vorliegenden Arbeit wird der direkte Effekt eines erniedrigten extrazellulären pH-Wertes auf die Aktivität histaminergere Neurone mit elektrophysiologischen Ableitungen an Gehirnschnitten und akut isolierten Neuronen der Ratte sowie der Maus gemessen.
2. Die Expression bekannter zentraler pH-Sensorproteine in histaminergen Neuronen wird mittels der konventionellen und quantitativen Polymerasekettenreaktion sowie mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht.

2 Methodik

2.1 Elektrophysiologische Methoden

2.1.1 Tier- und Zellpräparation

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden als Versuchstiere Ratten (männliche Wistar Ratten, 22 - 26 Tage alt) und Mäuse (Nachkommen der Kreuzung zwischen der HDC-Cre transgenen Maus (Yanovsky et al., 2012) und der Rosa26-lox-STOP-lox-lacZ reporter Maus (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA, stock#003474), 22 – 35 Tage alt) verwendet, deren Anzahl möglichst klein gehalten wurde. Die Tiere wurden nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes von Prof. Dr. Olga Sergeeva enthauptet und das entnommene Gehirn wurde in eine eiskalte Bikarbonat-gepufferte Elektrolytlösung gebracht. Diese Lösung wird weiterhin als ACSF (*artificial cerebrospinal fluid*) bezeichnet (Tabelle 2). Auf einem Vibratom (Vibroslicer, Campden Instruments, Loughborough, Großbritannien) fertigten wir daraufhin 400 µm beziehungsweise 300 µm dicke transversale Schnitte der gewünschten Gehirnregion (posteriorer Hypothalamus) an, die unter einem Mikroskop (Wild M8, Leica Wetzlar, Deutschland) dahingehend überprüft wurden, ob sie auch die Tuberomammillarregion enthielten. Bei Raumtemperatur wurden die Schnitte anschließend für mindestens eine Stunde in der Kontrolllösung (ACSF) inkubiert, die mit Carbogen begast wurde, sodass sich ein pH-Wert von 7.4 einstellte (Tierversuchsgenehmigung für Organentnahme: O. Sergeeva 058/91, LANUV, NRW).

ACFS (Bikarbonat-gepuffert, Ableit-Lösung für Gehirnschnitte)	
125 mM	NaCl
3.7 mM	KCl
1.0 mM	CaCl ₂
1.0 mM	MgCl ₂
1.3 mM	NaH ₂ PO ₄
23 mM	NaHCO ₃
10 mM	Glukose

Tabelle 2: Zusammensetzung der ACSF (*artificial cerebrospinal fluid*), die zur elektrophysiologischen Ableitung von Gehirnschnitten benutzt wurde Die Kontrolllösung wurde mit Carbogen begast wodurch sich ein pH-Wert von 7.4 einstellte, der regelmäßig kontrolliert wurde.

2.1.2 Patch-Clamp-Technik

Die Untersuchung elektrophysiologischer Signale einzelner Neurone ist eine wichtige Untersuchungsmethode der Neurophysiologie. Sie erlaubt es genaue Informationen über die Leitfähigkeit, Kinetik und Pharmakologie membranständiger Ionenkanäle zu erhalten, die für das Verständnis der Funktion von Nervenzellen sowie deren Zusammenspiel unabdingbar sind (Kandel, 2000). Die Ableitung elektrophysiologischer Signale wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl an hypothalamischen vitalen Gehirnschnitten, wie auch an isolierten Neuronen aus ebendiesen durchgeführt.

Die *Voltage-Clamp*-Technik (Spannungsklemme) wurde bereits in den 30er Jahren von Hodgkin, Huxley und Cole entwickelt (Cole und Hodgkin, 1939). Mittels zwei in die Zelle eingestochenen elektrolytgefüllten Glasmikroelektroden (eine für die Spannungsdetektion, eine für Strominjektion) werden Ströme, die durch die Zellmembran fließen, erfasst. Nachdem Bernhard Katz die Einzelkanalströme durch Analyse des Membranrauschens berechnet hatte (Hodgkin und Katz, 1949, Hodgkin und Huxley, 1952), gelang es Neher und Sakman mit der *Patch-Clamp*-Technik (1976) diese direkt zu registrieren. Mit Hilfe einer durch Anschmelzen geglätteten Glaspipettenspitze kann hierbei, durch einen Unterdruck im Pipetteninneren, eine hochgradige Versiegelung der Glaswand mit der Zellmembran erreicht werden (Gigaohm-Seal), sodass Ionenströme im Picoamperebereich (pA) durch einzelne Ionenkanäle registriert werden können (Bear et al., 2008). Während der Messung werden Veränderungen des Membranpotentials durch einen Kompensationsstrom sofort ausgeglichen (*to clamp* = festklemmen), der dem transmembranären Strom entgegen gerichtet ist. Dieser Kompensationsstrom wird gemessen (Numberger und Draguhn, 1996). Je nach Fragestellung werden bei der *Patch-Clamp*-Technik verschiedene Membrankonfigurationen verwendet, von denen in der vorliegenden Arbeit die *Cell-Attached*- und *Whole-Cell*-Konfiguration angewandt werden (Abb. 7). Bei der *Cell-Attached*-Konfiguration wird mit einer Mikropipette ein kleiner Fleck der Zellmembran gegen die übrige Umgebung isoliert, was *Single-channel*-Aufnahmen an einer intakten Zelle ermöglicht (Bear et al., 2008, Hamill et al., 1981). Eine Sonderform der *Cell-Attached*-Konfiguration erlaubt es durch einen geringeren elektrischen Widerstand als in der konventionellen Technik mit einer Pipette mehrere Membranabschnitte nacheinander zu patchen, da die Zellmembran bei der Messung intakt bleibt (*loose Cell-Attached*-Konfiguration).

Durch stärkeres Ansaugen des Membranabschnittes in der *Cell-Attached*-Konfiguration wird dieser aus der Membran herausgerissen und die Pipette hat nun direkten Kontakt zu dem Intrazellularraum der gesamten Zelle (*whole-cell-patch*), (Hamill et al., 1981).

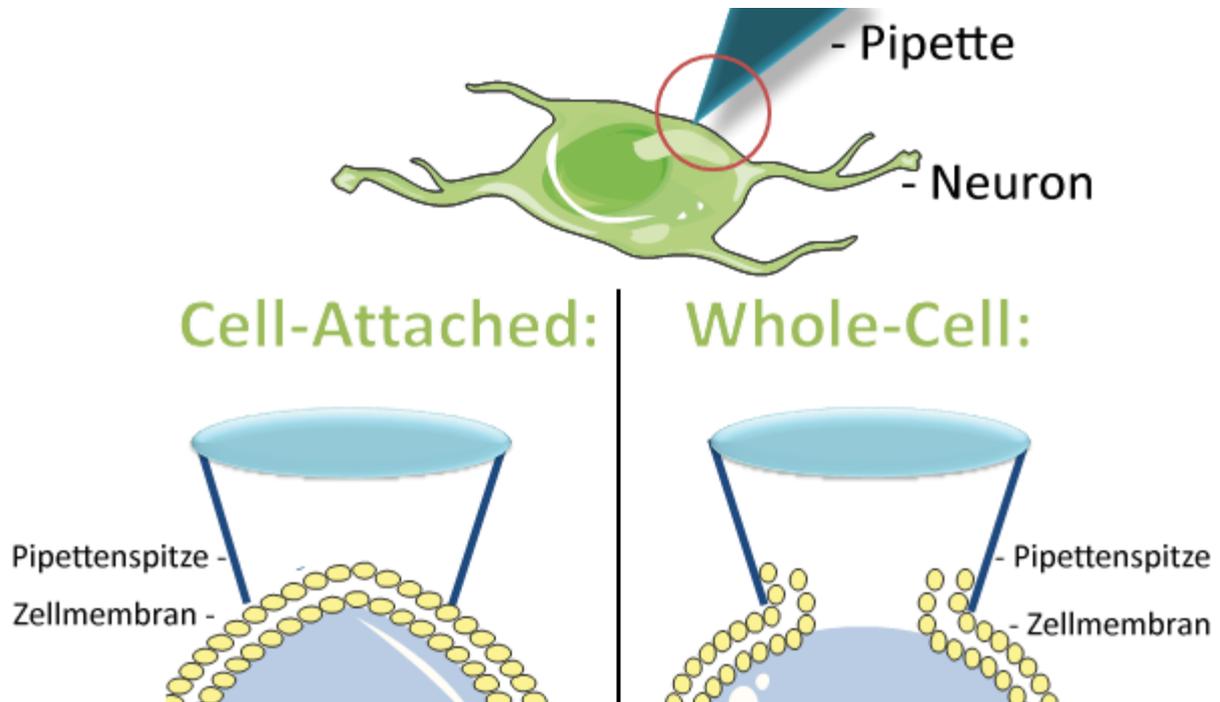


Abb. 7: Schematische Darstellung der *Cell-Attached*- sowie der *Whole-Cell*-Konfiguration Dargestellt ist der Aufbau der zwei Konfigurationen (*Cell-Attached*- und *Whole-Cell*-), die bei den elektrophysiologischen Ableitungen der vorliegenden Arbeit angewandt wurden (Quelle: eigene Darstellung).

2.1.3 Ableitung histaminerner Neurone in Gehirnschnitten

Wir untersuchten die Aktionspotentialfrequenzen der ventralen Untergruppe der tuberomamillären Region (TMNv) mittels *Patch-Clamp*-Ableitungen bei unterschiedlichen pH-Werten der Extrazellulärlösung an vitalen Gehirnschnitten.

Die mikroskopische Kontrolle der TMNv Region erfolgte im differenziellen Interferenz Kontrast (DIC) mittels eines Zeiss Axioscope 2 FS Mikroskops (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), (Filter: 780 nm, R69, Schott, Deutschland). Das mikroskopische Bild wurde anschließend mit einer infrarot-sensitiven Videokamera (Newvicon C2400, Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan) festgehalten. Wir zogen die für die Versuche verwendeten Patchpipetten aus Filament-beinhaltenden dickwandigen Brosilikat-Glasröhrchen auf einem Horizontalpuller (Sutter-Instruments, Novato, CA, USA) aus. Die Temperatur wurde während der Experimente bei 33 ± 0.5 °C gehalten. Zur Registrierung von Aktionspotential-

frequenzen histaminerger Neurone wurde die *Loose-Cell-Attached*-Konfiguration verwendet (*loose-patch*), wofür die Glaspipettenspitze mit der Kontrolllösung (ACSF) gefüllt wurde.

Die Gehirnschnitte wurden kontinuierlich mit einer Geschwindigkeit von 1,4 ml pro Minute mit der Kontrolllösung (ACSF, pH-Wert 7.4) perfundiert. In der vorliegenden Arbeit wurde anschließend für jeweils sieben Minuten eine Lösung mit einem pH-Wert von 7.0 über das Perfusionssystem appliziert, sodass die Gehirnschnitte für diese Zeit der veränderten Lösung ausgesetzt waren. Der pH-Wert wurde durch eine veränderte Konzentration von NaHCO_3 in der Kontrolllösung nach dem Protokoll von Jarolimek auf einen Wert von 7.0 eingestellt (Jarolimek et al., 1990). Es folgte eine erneute Perfusion der Gehirnschnitte für acht Minuten mit der Kontrolllösung (ACSF) bei einem pH-Wert von 7.4. Die elektrophysiologischen Signale wurden durch Axoclamp 2B (Axon Instruments, Jakarta, Indonesien) aufgenommen, verstärkt und zwischen 0,5 und 10 kHz gefiltert. Wir analysierten anschließend die Ergebnisse mit der pCLAMP 8 Software von Axon Instruments (Jakarta, Indonesien). Die Aktionspotentialfrequenz wurde kontinuierlich in bins von 15 s Dauer aufgezeichnet. Am Ende der elektrophysiologischen Experimente erfolgte die visuelle Identifizierung histaminerger Neurone durch die Hemmwirkung des Histamin H3 Rezeptoragonisten R- α -Methylhistamin (0.2 μM).

Die in der Arbeit beschriebenen Versuche führte ich unter der Anleitung von Dr. Yevgenij Yanosky aus der Forschungsgruppe des Institutes für molekulare Neurophysiologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf durch.

2.1.4 Ableitungen akut isolierter histaminerger Neurone

Um Ionenströme einzelner histaminerger Neurone messen zu können, wurden *whole-cell Patch-Clamp*-Ableitungen an akut isolierten Neuronen des Nucleus tuberomammillaris bei unterschiedlichen pH-Werten der Extrazellulärlösung durchgeführt. Dafür wurden zunächst, analog zu der Herstellung der Gehirnschnitte für die *Patch-Clamp*-Ableitungen an Gehirnschnitten, 450 μm dicke Gehirnschnitte der Region des Nucleus tuberomammillaris (posterioren Hypothalamus) hergestellt. Im folgenden Schritt wurden die Gehirnschnitte für 30 bis 40 Minuten bei 37 °C mit der Kontrolllösung (ACSF), der Papain (0,3-0,5 mg/ml) zugefügt wurde, inkubiert, sodass sich die Zellen des Gehirnschnittes voneinander isolieren konnten. Es folgte eine gründliche Spülung mit der Kontrolllösung. Die Gewebestücke wurden anschließend mit einem kleinen Volumen der Ableit-Lösung für dissoziierte Neurone versetzt (HEPES-gepuffert, pH-Wert 7.4, Tabelle 3).

Ableit-Lösung für dissoziierte Neurone	
150 mM	NaCl
3.7 mM	KCl
2.0mM	CaCl ₂
2 mM	MgCl ₂
10 mM	HEPES
10 mM	Glukose

Tabelle 3: Zusammensetzung der Ableit-Lösung (*recording solution*) für die elektrophysiologischen Ableitungen akut isolierter histaminerger Neurone Die Einstellung des pH-Wertes auf 7.4 erfolgte mit dem HEPES-Puffer.

Durch leichtes Hin- und Herpipettieren (Trituration) verteilten sich die isolierten Zellen in der Ableit-Lösung, die daraufhin in eine Ableitkammer für die *Patch-Clamp*-Ableitungen gegeben wurden. Die zur *Patch-Clamp*-Technik verwendeten Glaselektroden wurden aus Filament-beinhaltenden dickwandigen Brosilikat-Glasröhren mit Hilfe eines Horizontalziehgeräts (Shutter-Instruments, Novato, CA, USA) hergestellt und mit der Elektrodenlösung gefüllt (pH-Wert 7.4, Tabelle 4).

Elektrodenlösung	
140 mM	KCl
2 mM	MgCl ₂
0.5 mM	CaCl ₂
5 mM	EDTA
10 mM	HEPES

Tabelle 4: Zusammensetzung der Elektrodenlösung Mit dieser Lösung werden die Glaspipetten zur elektrophysiologischen Ableitung (*whole-cell Patch-Clamp*-Ableitung) akut isolierter histaminerger Neurone gefüllt. EDTA: Ethylen-diamintetraessigsäure.

Mittels der zuvor hergestellten Glaskapillare wurde daraufhin eine histaminerge Zelle in der Ableitkammer in die *Whole-Cell*-Konfiguration gebracht. In dieser war der Serienwiderstand mit 4-15 M Ω ausgeglichen (70-90%) und wurde regelmäßig kontrolliert. Die gepatchte akut isolierte Zelle wurde dann in das Applikationssystem (schnelle Perfusionstechnik nach Vorobjev et al., 1996) gefahren, wo sie kontinuierlich mit der sterilen Kontrollbadlösung (Ableit-Lösung für dissoziierte Neurone) perfundiert wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Ableitung der Ionenströme bei unterschiedlichen extrazellulären pH-Werten Lösungen mit verschiedenen pH-Werten durch eine im Durchmesser 0.08 mm große Glaskapillare appliziert. Durch eine laterale Bewegung dieser

Glaskapillare wurde die Zelle für zwei Sekunden der Testlösung ausgesetzt (Abb. 8) und die Ionenströme in dem Neuron gemessen.

Alle applizierten Lösungen flossen kontinuierlich und schwerkraftgesteuert mit der gleichen Geschwindigkeit aus der Kapillare. Die unterschiedlichen pH-Werte der applizierten Lösungen stellten wir mit Hilfe von NaOH (0.1 M) und HCl (1 M) in der Ableitlösung für dissoziierte Neurone (Tabelle 3) ein. Als Puffersubstanzen verwendeten wir MES (Sigma Life Science, St. Louis, MI, USA) und HEPES (Sigma Life Science, St. Louis, MI, USA), deren pH_{50} sich nicht voneinander unterscheidet. Die Ionenströme der Zellen wurden mit Hilfe eines EPC-9 Verstärkers bei einem Haltepotential von -50 mV gemessen. Wir sammelten die Daten mittels TIDA für Windows (HEKA, Lambrecht, Deutschland).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche führte ich gemeinsam mit Frau Prof. Dr. Olga Sergeeva durch.

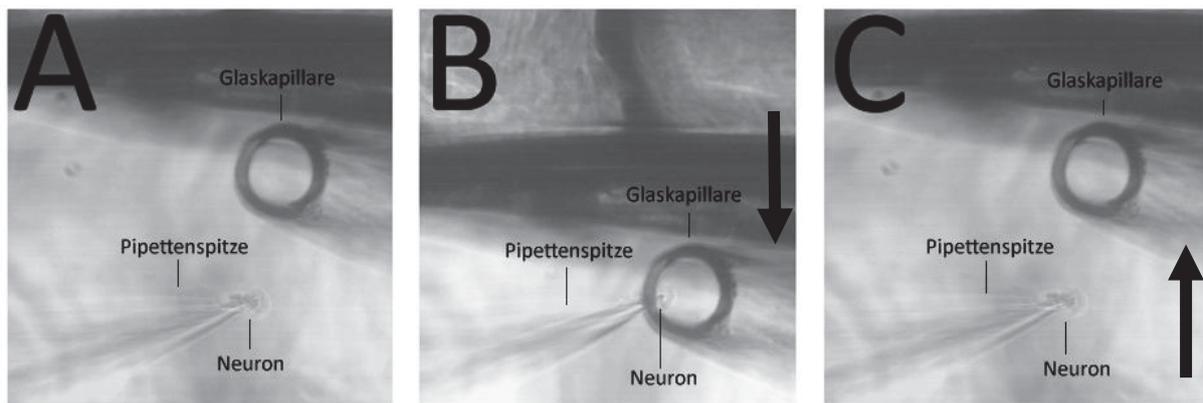


Abb. 8: Applikationssystem zur electrophysiologischen Registrierung von Ionenströmen dissoziierter Neurone **A:** Zu sehen ist die Glaspipette im Applikationssystem, an deren Ende das histaminerge Neuron in der *Whole-Cell*-Konfiguration gehalten wird. Das histaminerge Neuron wird kontinuierlich mit der Ableit-Lösung für dissoziierte Neurone mit einem pH-Wert von 7.4 umspült. **B:** Durch die laterale Bewegung des Applikationssystems gelangt das histaminerge Neuron für zwei Sekunden unter die Glaskapillare mit einem Durchmesser von 0.08 mm und wird einer veränderten Elektrolytlösung ausgesetzt. **C:** Nach zwei Sekunden gelangt das Applikationssystem wieder in seine Ausgangsstellung und das histaminerge Neuron wird wieder mit der Ableit-Lösung für dissoziierte Neurone mit einem pH-Wert von 7.4 umspült (Quelle: eigene Darstellung).

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 RNA-Gewinnung und reverse Transkriptasereaktion

Nach der electrophysiologischen Registrierung des histaminergen Neurons, wurde das Zytoplasma der Zelle zusammen mit der sterilen Elektrolytlösung in die verwendete

Glaspipette gesaugt. Im nächsten Schritt isolierten wir die in dem Zytoplasma der Zelle enthaltene RNA mit Hilfe des ‚*mRNA isolation kit*‘ (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) nach den Angaben des Herstellers. Zum Nachweis der mRNA, die Teil der momentanen Transkription eines Gens in der Zelle ist, führten wir zunächst die reverse Transkriptase Reaktion (RT Reaktion) durch. Diese wandelt die vorhandene mRNA aus der Zelle in ‚*copy DNA*‘ (cDNA) um.

Der Inhalt der Elektrode wurde dafür in ein Eppendorf Gefäß gegeben, in dem sich schon 7 µl einer vorbereiteten Lösung befanden (‚*first strand cDNA synthesis kit*‘ (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)). Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C zur RT Reaktion wurde diese Reaktion durch Tiefgefrieren bei - 20 °C gestoppt. Die RT Reaktion wurde nicht normalisiert um die äquivalenten Mengen von totaler mRNA zu bekommen.

2.2.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR), eingeführt 1986 durch Kary Mullis, ermöglicht es ein spezifisches cDNA-Fragment zu vervielfältigen (amplifizieren), (Mullis und Faloona, 1987). Unter optimalen Bedingungen kommt es pro Zyklus der PCR zu einer Verdopplung der DNA-Sequenz, was bedeutet, dass nach 40 Zyklen diese um den Faktor 2^{40} vervielfältigt wurde (= 10^{12}), sodass sich kleinste Mengen von DNA eindeutig nachweisen lassen (Albert et al., 2004).

Für die PCR werden, neben der Ausgangs-cDNA (Template), zwei Primer (15-30 Basenpaar (B.p.) lange Oligodesoxyribonukleotide, die komplementär zu der Sequenz eines Einzelstranges der zu vervielfältigen DNA sind), eine thermostabile DNA-Polymerase (aus Bakterien, z.B. *Thermus aquaticus*, Taq-Polymerase), Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP), ein Puffer sowie $MgCl_2$ benötigt. Jeder Zyklus besteht aus drei automatisierten Schritten, die bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufen (Schartl, 2009), (Tabelle 5).

Polymerasekettenreaktion	
1. Denaturierung:	Aufschmelzen des Templates in zwei Einzelstränge (95 °C)
2. Annealing:	Hybridisierung der Primer an die einzelsträngige DNA (40-72 °C)
3. Elongation:	Verlängerung der hybridisierten Primer mit Hilfe der Taq-Polymerase (72 °C)

Tabelle 5: Die drei automatisierten Schritte der Polymerasekettenreaktion (PCR) Jede PCR läuft in drei automatisierten Schritten (Denaturierung, Annealing und Elongation) ab. (Daten entnommen aus: Gentechnik, Gendiagnostik, Gentherapie; Manfred Schartl, S. 445 – 447, In: Biochemie und Molekularbiologie des Menschen, Hrsg: Manfred Schartl, Manfred Gessler, Arnold von Eckardstein, 2009).

Die Amplifikation der DNA in dünnwandigen PCR-Gefäßen erfolgte in einem Standard-PCR-Ansatz für 100µl (Tabelle 6).

Standard-Ansatz der PCR
cDNA (1.1-1.5µl)
dNTP (200µM von jedem dNTP)
10 x PCR-Puffer
1.5 mM bzw. 3 mM MgCl ₂
sense und antisense Primer (jeweils 10 pM)
2.5 units Taq-Polymerase

Tabelle 6: Standard-Ansatz der Polymerasekettenreaktion (PCR) Die Tabelle zeigt die verschiedenen Bestandteile des PCR-Ansatzes. Die Magnesiumchloridkonzentration des Ansatzes wurde für jede PCR etabliert (1.5 beziehungsweise 3 mM).

Das Reaktionsvolumen wurde mit nukleasefreiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt (Promega, Mannheim, Deutschland). Die TAQ-Polymerase, der PCR-Puffer, das MgCl₂ sowie alle vier dNTPs wurden von Qiagen (Erkrath, Deutschland) bezogen. Die Primer wurden durch MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) hergestellt.

Die Amplifikation wurde mit einem Thermocycler (*Master cycler*) der Firma Eppendorf (Weiterstadt, Deutschland) durchgeführt (Tabelle 7).

Standardprogramm der PCR				
I.	94 °C	1 Minute	initiale Denaturierung	} 35-40 Zyklen (Wiederholungen)
II.	94 °C	48 Sekunden	Denaturierung	
	49.5 - 53°C	48 Sekunden	Primer Annealing	
	72 °C	1 Minute	Elongation	
III.	72 °C	10 Minuten	finale Elongation	

Tabelle 7: Standardprogramm der Polymerasekettenreaktion (PCR) Lediglich die Temperatur während des Primerannealings variiert zwischen den verschiedenen PCR und wurde dem Primerpaar entsprechend etabliert.

Die Annealingtemperatur wurde dem Primerpaar entsprechend etabliert:

HDC: 1. Amplifikation: 50°C, 2. Amplifikation: 53°C; ASIC (insgesamt): 50°C, ASIC 1 - 4: 2. Amplifikation: 50°C; ASIC 1a/b: 1. Amplifikation: 50°C, 2. Amplifikation: 53°C, ASIC 2a/2b: 1. Amplifikation: 50°C, 2. Amplifikation: 53°C; TRPV1: 1. Amplifikation: 50°C, 2. Amplifikation: 53°C; TRPV1 (VR.5'sv): 1. Amplifikation: 50°C, 2. Amplifikation: 50°C, TRPV1 (B): 1. Amplifikation: 50°C, 2. Amplifikation: 50°C, TRPV1 β: 1. Amplifikation: 50°C, 2. Amplifikation: 50°C, Na⁺/K⁺-ATPase α: 1. Amplifikation 49.5°C; 2. Amplifikation:

50°C; Na⁺/K⁺-ATPase β: 1. Amplifikation: 50°C, 2. Amplifikation: 50°C, OGR 1: 1. Amplifikation: 50°C, 2. Amplifikation: 50°C.

2.2.3 Einzelzell-Polymerasekettenreaktion

Um auch geringste Templatemengen in der Zelle nachzuweisen, wie etwa bei der Amplifikation von Genprodukten aus einer einzelnen Zelle (Einzelzell-PCR), haben wir im Rahmen der Arbeit die Methode der *nested-PCR* („verschaltete“ PCR) angewandt. Bei diesem Verfahren wird eine normale PCR nach dem oben erläuterten Schema durchgeführt. Das Produkt dieser ersten PCR wird als Template für eine zweite PCR-Amplifikation verwendet (Becker, 2010). Die verwendeten Primer dieser zweiten Amplifikation binden an eine Sequenz der zu vervielfältigenden DNA, die innerhalb des in der ersten Amplifikation vervielfältigten DNA-Fragmentes liegt. Alle anderen Reagenzien entsprachen denen der ersten Amplifikation. Das Standardprogramm am Thermocycler wurde beibehalten, die Annealingtemperatur dem Primerpaar entsprechend etabliert.

2.2.4 Entwicklung der Primer

Die Primer zur Amplifikation der cDNA der Histidindecaboxylase, dem Marker für histaminerge Zellen, wurden dem Protokoll von Parmentier et al. entnommen (2009). Alle anderen aufgeführten Primer entwickelten wir mit Hilfe von Primer Express von ABI PRISM (Pleasanton, CA, USA; Tabelle 8). Zur Untersuchung der Expression der vier ASIC Kanaluntereinheiten in histaminergen Neuronen wurden in der ersten PCR der Einzelzell-PCR für alle Untereinheiten (ASIC 1 - 4) die gleichen Primer verwendet. Erst in der zweiten Amplifikationsrunde unterschieden sich die Primer zur Amplifikation der einzelnen ASIC Kanaluntereinheiten voneinander.

Rattus norvegicus			
Name des Primers	sense	antisense	Produktlänge in Basenpaaren
<u>HDC</u>			
1. Amplifikation	5'-gatgatggagcccWgtgaata-3'	5'-ctggtcagaggcataggaaca-3'	
2. Amplifikation	5'-agtctctgcaagacgcctc-3'	5'-ctggtcagaggcataggaaca-3'	457

<hr/>			
<u>ASIC 1</u>			
2. Amplifikation	5'-cctagtggagaaagaccaggaata-3'	5'-ccRatRaacaRBcccatctg-3'	276
<u>ASIC 2</u>			
2. Amplifikation	5'-agatYcacagYcagKMKgaRcc-3'	5'-cctttctgccagtagaccga-3'	321
<u>ASIC 3</u>			
2. Amplifikation	5'-gggtgactgcaataccgcat-3'	5'-tcattcgacagccacacttc-3'	164
<u>ASIC 4</u>			
2. Amplifikation	5'-gaacagcggctaacttatctgc-3'	5'-catgggccctcagagccc-3'	263
<u>ASIC 1a/1b</u>	5'-tccttgggctgctgctg-3'	5'-gtggccgccatcttg-3'	<u>1a:</u> 360 <u>1b:</u> 324
<u>ASIC 2a/2b</u>	5'-tccttSggcYtgctgctg-3'	5'-gctcagactgactgtgatctg-3'	<u>2a:</u> 617 <u>2b:</u> 638
<hr/>			
<u>TRPV 1</u>			
1. Amplifikation	5'-tcatgggtgagaccgtcaacaag-3'	5'-tggcctaaggatcccgtataat-3'	220
2. Amplifikation	5'-tacctggaacaccaatgtggg-3'	5'-tggcctaaggatcccgtataat-3'	
<u>TRPV 1 VR.5'sv</u>			
1. Amplifikation	5'-catccagggactagcctcat-3'	5'-agggtccacgagaagcat-3'	121
2. Amplifikation	5'-catccagggactagcctcat-3'	5'-tgcagcaggaactcacaat-3'	
<u>TRPV 1B</u>			
1. Amplifikation	5'-catccagggactagcctcat-3'	5'-agggtccacgagaagcat-3'	292
2. Amplifikation	5'-tgggtggaggtggcagataa-3'	5'-agggtccacgagaagcat-3'	
<hr/>			
<u>Na⁺/K⁺-ATPase α1</u>			
1. Amplifikation	5'-gggttgacgagacaagta-3'	5'-accaatgttctgaagga-3'	418
2. Amplifikation	5'-gggttgacgagacaagta-3'	5'-atgacgacagcagacagcac-3'	
<u>Na⁺/K⁺-ATPase α2</u>			
1. Amplifikation	5'-gggtgcaagaagaacaga-3'	5'-accatgttctgaagga-3'	249
2. Amplifikation	5'-gggtgcaagaagaacaga-3'	5'-aagcggccaatcca-3'	
<u>Na⁺/K⁺-ATPase α3</u>			
1. Amplifikation	5'-caagaagcaaggccaaag-3'	5'-accatgttctgaagga-3'	115
2. Amplifikation	5'-caagaagcaaggccaaag-3'	5'-gcacgcagtcggtattgtatt-3'	
<u>Na⁺/K⁺-ATPase β1</u>			
1. Amplifikation	5'-tggaagRaRttcRtStggaa-3'	5'-ccaSWcgRtcttggtac-3'	121
2. Amplifikation	5'-tggaagRaRttcRtStggaa-3'	5'-cgaatgaatgccggc-3'	
<u>Na⁺/K⁺-ATPase β2</u>			
1. Amplifikation	5'-tggaagRaRttcRtStggaa-3'	5'-ccaSWcgRtcttggtac-3'	136
2. Amplifikation	5'-tggaagRaRttcRtStggaa-3'	5'-ttaccacatggtgagggtga-3'	
<hr/>			
<u>OGR 1</u>			
1. Amplifikation	5'-gagagagattggcttcatctcc-3'	5'-tcatttgggccttgatc-3'	123
2. Amplifikation	5'-cattgaccacacatccac-3'	5'-tcatttgggccttgatc-3'	
<hr/>			
Mus musculus			
<hr/>			
Name des Primers	sense	antisense	Produktlänge in Basenpaaren
<hr/>			
<u>HDC</u>			
1. Amplifikation	5'-gatgatggagcccWgtgaata-3'	5'-tcagaggtgtaggcaacga-3'	
<hr/>			

2. Amplifikation	5'-gatgatggagcccWgtgaata-3'	5'-gatgctgtcccagctgtcg-3'	193
<u>ASIC (insgesamt)</u>			
1. Amplifikation	5'-agatYcacagYcagKMKgaRcc-3'	5'-ccRatRaacaRBcccatctg-3'	
<u>ASIC 1</u>			
2. Amplifikation	5'-cctagtggagaaagaccaggaata-3'	5'-ccRatRaacaRBcccatctg-3'	276
<u>ASIC 2</u>			
2. Amplifikation	5'-agatYcacagYcagKMKgaRcc-3'	5'-cctttctgccagtagaccga-3'	321
<u>ASIC 3</u>			
2. Amplifikation	5'-gggtgactgaataccgcat-3'	5'-tcattcgacagccacacttc-3'	155
<u>ASIC 4</u>			
2. Amplifikation	5'-gaacagcggctaacttatctgc-3'	5'-catgggccctcagagccc-3'	263
<u>TRPV 1</u>			
1. Amplifikation	5'-tcatgggtgagaccgtcaacaag-3'	5'-tggcctaaggatcccgtataat-3'	
2. Amplifikation	5'-tacctggaacaccaatgtggg-3'	5'-tggcctaaggatcccgtataat-3'	220
<u>TRPV1 β</u>			
	5'-tgtccaggaagttcactgaatg-3'	5'-gaagtagaagttcactgaatg-3'	211
<u>OGR 1</u>			
1. Amplifikation	5'-gagagagattggcttcatctcc-3'	5' tcatttcgggccttgatc-3'	
2. Amplifikation	5'-cattgaccacaccatccac-3'	5' tcatttcgggccttgatc-3'	123

Tabelle 8: Aufzählung der verwendeten Primerpaare der Polymerasekettenreaktionen (PCR) der vorliegenden Arbeit Die Tabelle zeigt getrennt die verwendeten Primerpaare der PCR der Ratte (*Rattus norvegicus*) und die der Maus (*Mus musculus*). Aufgeführt sind die Nukelotidsequenzen der Primer sowie die Länge der durch die PCR entstandenen DNA-Fragmente (Basenpaare = B.p.). a= Adenin, c= Cytosin, g= Guanin, t= Thymin, B= Cytosin, Guanin oder Thymin, K= Guanin oder Thymin, M= Adenin oder Cytosin, R=Adenin oder Guanin, S= Cytosin oder Guanin, W= Adenin oder Thymin, Y= Cytosin oder Thymin.

Um zwischen den alternativen Spliceprodukten der ASIC Kanäle ASIC 1 (ASIC 1a und 1b) und ASIC 2 (ASIC 2a und 2b) zu unterscheiden, wurde ein Alignment der DNA-Sequenzen der zwei Splicevarianten mit dem Programm Geneious (Biomatters Ltd, Auckland, Neuseeland) durchgeführt, sodass die Primer so bestimmt werden konnten, dass durch die PCR beide Splicevarianten (ASIC 1a und 1b beziehungsweise ASIC 2a und 2b) amplifiziert werden, sich die amplifizierten DNA-Fragmente jedoch in ihrer Länge voneinander unterscheiden. Das amplifizierte DNA-Fragment von ASIC 1a ist 360 B.p. lang, wohingegen das DNA-Fragment von ASIC 1b 324 B.p. lang ist (ASIC 2a: 617 B.p., ASIC 2b: 638 B.p.).

2.2.5 Restriktionsanalyse

Zur sicheren Unterscheidung zwischen den alternativen Spliceprodukten ASIC 1a und 1b sowie ASIC 2a und 2b wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Nach der PCR-

Amplifikation wurden die DNA-Fragmente hierfür mithilfe von Restriktionsendonukleasen an einer spezifischen Stelle geschnitten (Tabelle 9). Die Restriktionsenzyme wurden so gewählt, dass sie jeweils nur einen der zwei alternativen Spliceprodukte (ASIC 1a oder 1b bzw. ASIC 2a oder ASIC 2b) schneiden. Das Restriktionsenzym Eco R I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) schneidet das amplifizierte DNA-Fragment des ASIC 1a Spleißproduktes, nicht jedoch das der ASIC 1b Kanaluntereinheit. Das Restriktionsenzym Eco 47 (Promega, Madison, WI, USA) schneidet analog dazu nur das amplifizierte DNA-Fragment des ASIC 2b Spleißproduktes (Abb. 9). Pro Probe wurden 7 µl nukleasefreies Wasser, 1,1 µl des jeweiligen für das Restriktionsenzym spezifischen Puffers, 1 µl des spezifischen Restriktionsenzym sowie 3-5 µl der zuvor amplifizierten DNA verwendet. Nachdem die Mischung bei 37 °C für mindestens zwei Stunden inkubiert wurde, wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die durch die Restriktionsenzyme geschnittenen DNA-Fragmente aufzutrennen.

Rezeptor	Restriktionsenzym	DNA-Fragmentlänge (B.p.)
ASIC 1a	Eco R I (G AATTC)	210 : 150
ASIC 2b	Eco 47 (AGC GCT)	327 : 311

Tabelle 9: Die amplifizierten DNA-Fragmente der acid-sensing ion channel (ASIC) Splicevarianten ASIC 1a und ASIC 2b werden durch die Restriktionsenzyme Eco RI bzw. Eco 47 geschnitten. Das amplifizierte DNA-Fragment der ASIC 1a Kanaluntereinheit hat eine Länge von 360 Basenpaaren (B.p.). Nach Zugabe des Restriktionsenzym Eco RI betragen die Längen der geschnittenen DNA-Fragmente 210 und 150 B.p.. Das amplifizierte DNA-Fragment der ASIC 2b Kanaluntereinheit hat eine Länge von 638 B.p.. Nach Zugabe des Restriktionsenzym Eco 47 betragen die Längen der geschnittenen DNA-Fragmente 327 und 311 B.p..

10	ASIC 1b	TCAT	AGGTAG----GGGACCGCGTTGCTTATTAAT
	ASIC 1a	TGGC	GTGTGTGCACTGAGCGTGTGCAGTACTATT
	ASIC 2a	TCGGATCCCTGGGCTGCTGCTG	-----TGGAGAGCTCGGAGAGGGTGTCTACT--GT
	ASIC 2b	GCACGTCCCTCGGCTTGCTGCTG	TCC-----TGGTCCTCGAACCGCCTGCTACT---GG
12	ASIC 1b	TCTTCCCAGCTGTCACT	TTCTGCAACACCAATGCCGTGCCGTTGTCCCAGCTCAGCT
	ASIC 1a	-CTTCCCTGCTGTCACT	ACTGTGCAATCTCAATGAGTTCGGCTTAGCCAAGTCTCCA
	ASIC 2a	ACCTCAATGGCTTCGGTTC	CCAGGCTTACCA
	ASIC 2b	ACAACAACCCCTGCGCTT	CCCGCGCCTCTCCAC
15	ASIC 1b	-GGCC-----CAGAGGCTTTCT-CCGGGGAGCCTTTTAACCTCCAT---	C Eco RI
	ASIC 1a	AGGCCAACTTCGGAGCTTCAAGCCAAGCCC---TTCAA---CAT--GCGT-	GAATTCT
	ASIC 2a	AGGCCAACTTCAAACACTACAAACCGAAGCAG---TTCA---GCAT---	Eco 47
	ASIC 2b	TGGCCGACTTCGGCTTCTCTGCGCGCGCACTTCGAGGGCATC	AGCGCTGCC
18			

ASIC 1b	<u>AACTCGGGC</u> CAAGATGGGCGGCCACGGCTGAAGACCATGAAAGGTGGGACTGG
ASIC 1a	<u>AACTCGGGC</u> CAAGATGGGCGGCCACGGCTGAAGACCATGAAAGGTGGGACTGG
ASIC 2a	<u>AACTCA</u> ASIC 1a/1b antisense <u>CACGGTCAAGGGGGGACGGG</u>
ASIC 2b	<u>AACTCA</u> ASIC 1a/1b antisense <u>CACGGTCAAGGGGGGACGGG</u>
19	
ASIC 1b	CTGGAGATCATGCTGGACATTAGCAAGATGAATATTTGCCTGTGTGGGGAGAG
ASIC 1a	CTGGAGATCATGCTGGACATTAGCAAGATGAATATTTGCCTGTGTGGGGAGAG
ASIC 2a	<u>CTGGAGATCATGCTGGACATTAGCAAGATGAGTACCTGCCATCTGGAC</u> AGAG
ASIC 2b	<u>CTGGAGATCATGCTGGACATTAGCAAGATGAGTACCTGCCATCTGGAC</u> AGAG
20	
ASIC 1b	ASIC 2a/2b antisense GTGCAGATCCACAGTCAGGATGAACCC
ASIC 1a	ASIC 2a/2b antisense GTGCAGATCCACAGTCAGGATGAACCC
ASIC 2a	GAAACAACGTTTGAAGCAGGAGTGAAGTTTCAAGATCCACAGTCAGTCTGAGCCG
ASIC 2b	GAAACAACGTTTGAAGCAGGAGTGAAGTTTCAAGATCCACAGTCAGTCTGAGCCG

Abb. 9: Alignment der Splicevarianten der *acid-sensing ion channel 1* (ASIC 1) Kanaluntereinheit (ASIC 1a/1b) sowie der ASIC 2 Kanaluntereinheit (ASIC 2a/2b) Markiert sind die DNA-Sequenzen an denen die Primer für die Polymerasekettenreaktion binden (ASIC 1a/1a sense und antisense sowie ASIC 2a/2b sense und antisense) sowie die Stelle der DNA-Sequenz, die durch die Restriktionsenzyme (Eco RI und Eco 47) durchtrennt werden. Die aufgezeigte DNA-Sequenz wurde an mehreren Stellen der Übersicht halber gekürzt.

2.2.6 Gelelektrophorese

Der Nachweis der in der PCR amplifizierten DNA erfolgt mittels der Gelelektrophorese. Hierbei trennt man die Nukleinsäuren unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes in einer Gelmatrix auf. Diese besteht aus Agarose oder Polyacrylamid, welches in einer ionisierenden Pufferlösung liegt. Da die DNA-Fragmente in Lösung elektrisch geladen vorliegen (negative Ladung der Phosphatreste), wandern die Moleküle der Größe nach unterschiedlich schnell zur Anode. Dabei ist die Laufstrecke der DNA-Fragmente umgekehrt proportional zur molaren Masse der Nukleinsäuren und damit auch der Länge der DNA-Fragmente (Montenarh und Löffler, 2007). Für unsere Proben wurde Agarose (2 %) verwendet. Diese wurde in TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer; Tabelle 10) aufgekocht und mit ‚*GelRed Nucleic Acid Gel Stain*‘ (Biotium, Hayward, CA, USA) vermischt (8 µl/150 ml). ‚*GelRed Nucleic Acid Gel Stain*‘ ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zwischen die Basen der DNA interkaliert, unter UV-Licht fluoresziert und so sichtbar wird (Gebrauchsinformation des Herstellers). Das Ergebnis wurde zur Dokumentation unter UV-Licht fotografiert. Als Marker verwendeten wir die 100 B.p. Leiter, mit der 500 B.p. Linie als Hauptmarker.

TEA-Puffer (pH 7.5-8.0)	
10	mM TRIS
1	mM EDTA
3	M Natriumacetat

Tabelle 10: Zusammensetzung des TEA-Puffers Der TEA-Puffer, bestehend aus TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Sigma, Deisenhoffen, Deutschland), EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure, FLUKA Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm, Deutschland) und Natriumacetat, wird zur Herstellung der Agarosegele benutzt.

2.2.7 Purifizierung von PCR-Produkten zur Sequenzierung

Nachdem die DNA-Fragmente amplifiziert wurden, wurden diese sequenziert (Abb. 10). Für diesen Vorgang muss die DNA jedoch von Primern, Enzymen und Nukleotiden gereinigt werden (Purifizierung).

Wir verwendeten das ‚*Qiaquick PCR Purification Kit*‘ (Qiagen, Erkrath, Deutschland). Bei der Purifizierung wird das PCR-Produkt in eine Säule gegeben, an dessen Membran die DNA bindet. Anschließend wird der Inhalt der Säule mit verschiedenen Puffern unterschiedlicher Salzkonzentrationen gewaschen. Im letzten Schritt eluiert man die DNA mit Hilfe von H₂O (Gebrauchsinformation des Herstellers). Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Anschließend erfolgte die Sequenzierung in einer automatischen Sequenziermaschine (ABI, Model 377, Weiterstadt, Deutschland).

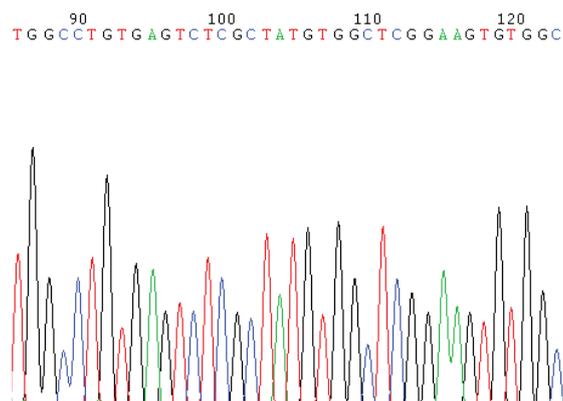


Abb. 10: Beispielhafter Auszug aus der Sequenzierung des acid-sensing ion channels 3 (ASIC 3 Kanals) der Ratte Farben: schwarz: Guanin (G), blau: Cytosin (C), rot: Thymin (T), grün: Adenin (A).

Die in unseren Versuchen erhaltenen Sequenzen stimmten mit den bereits in der Genbank bekannten Sequenzen überein (Tabelle 11).

Rattus norvegicus	
HDC	NM_017016.2
ASIC 1	NM_024154.2
ASIC 1a	U94403.1
ASIC 1b	AJ-309926.1
ASIC 2a	NM_001034014.1
ASIC 2b	NM_012892.2
ASIC 3	NM_173135.1
ASIC 4	NM_022234.2
TRPV 1	NM_031982.1
TRPV 1B	AF327067.1
TRPV1 VR.5'sv	AF 158248
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	
- α1	NM_012504.1
- α2	NM_012505.2
- α3	NM_012506.1
- β1	NM_013113.2
- β2	NM_012507.3
OGR 1	NM_001108049.1
Mus musculus	
HDC	NM_008230.5
ASIC 1	NM_009597.1
ASIC 2	NM_001034013.2
ASIC 3	NM_183000.2
ASIC 4	NM_183022.3
TRPV 1	NM_001001445.1
TRPV 1 β	AY-452084.1
OGR 1	NM_0011776731

Tabelle 11: Aufzählung der für die vorliegende Arbeit sequenzierten DNA-Fragmente mit deren Erkennungsnummern der Genbank (Pubmed) Die Tabelle zeigt getrennt die Erkennungsnummern der Ratte (*Rattus norvegicus*) sowie die der Maus (*Mus musculus*).

2.2.8 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative *Real-Time* PCR (qRT PCR) beruht auf dem Prinzip der bereits oben beschriebenen konventionellen PCR, ermöglicht jedoch zusätzlich den vorhandenen DNA-Gehalt in der Probe zu quantifizieren. Mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffes wird die Anzahl der entstandenen Kopien der DNA nach jedem Zyklus der PCR gemessen. Die

Fluoreszenz des Farbstoffes steigt dabei proportional zu der Menge an doppelsträngiger DNA in der Probe an (Higuchi et al., 1993). Als fluoreszierender Farbstoff wurde ‚SYBR-Green I‘, ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff (*SYBR Green master mix kit*, Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet, welcher an doppelsträngige DNA gebunden sein Emissionsmaximum ändert (Zipper et al., 2004). Durch die Anregung mit einer Halogenlampe (Exzitationsmaximum 485 nm), wird nun das Fluoreszenz-Signal (Emmission bei 520 nm) der Proben nach jedem PCR-Zyklus gemessen (*Real-Time*). Ab einer Mindestmenge an DNA kann ein Signal detektiert werden, daraufhin steigt das Fluoreszenzsignal exponentiell. In dieser exponentiellen Phase der PCR liegen optimale Reaktionsbedingungen vor und eine Quantifizierung der DNA-Menge ist möglich. Nach der exponentiellen Phase nähert sich das Fluoreszenzsignal einem Maximum an (Abb. 11). Durch den starken Anstieg an DNA, Monophosphatnukleotiden und Pyrophosphaten kommt es hier zu einer Hemmung der Amplifikation der DNA (Hof und Dörries, 2009, Innis und Gelfand, 1990).

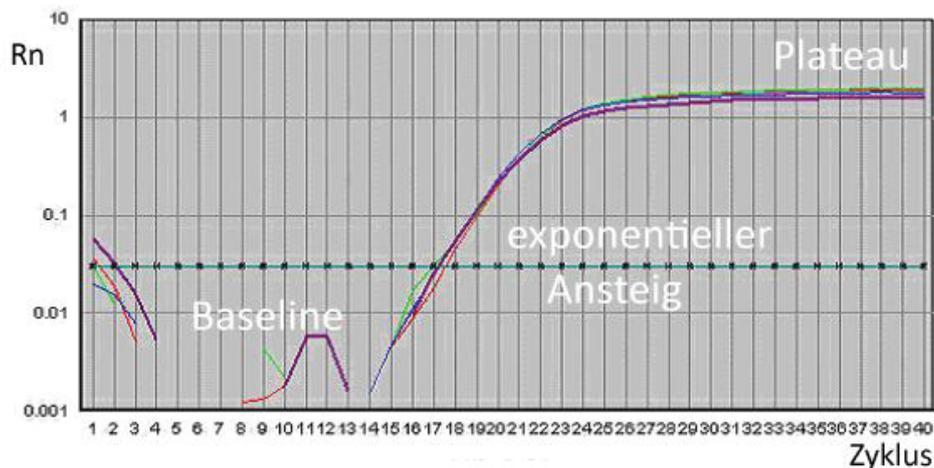


Abb. 11: Graphische Darstellung der Real-Time PCR Beispielhafte Darstellung des gemessenen Fluoreszenzsignals, welches während der quantitativen PCR der Na⁺/K⁺ATPase $\alpha 3$ Untereinheit aufgezeichnet wurde. Rn = gemessene Fluoreszenzsignal, welches gegen einen internen Farbstoff korrigiert wurde.

Die quantitativen PCR wurden mit dem ‚GeneAmp 5700 Sequence Detection-System‘ der Firma PE Biosystems (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt. Die Amplifikation der DNA erfolgte in einem Standard-PCR-Ansatz (Tabelle 12).

Standard-Ansatz (qRT PCR)	
1-5 µl	cDNA
10 pM	sense (up) und antisense (low) Primer
15.75 µl	MasterMix

Tabelle 12: Standard-Ansatz der quantitativen *Real-Time* Polymerasekettenreaktion (qRT PCR) Der *MasterMix* beinhaltet: SYBR PCR-Puffer, MgCl₂ (Magnesiumchlorid), dNTP (Desoxynukleosidtriphosphate), AmpliTaq Gold sowie AmpErase UNG (Uracil-N-Glykosylase), (Applied Biosystems, Carlsbad, CA; USA), (cDNA = *cloned* DNA).

Das Reaktionsvolumen wurde mit nukleasefreiem Wasser auf 50 µl aufgefüllt (Promega, Mannheim, Deutschland). Die für die qRT-PCR verwendeten Primer wurden durch MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) hergestellt und sind in Tabelle 13 aufgeführt. Der ‚*MasterMix*‘ des Standardansatzes wurde von der Firma Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA) bezogen. Dabei verhindert die Zugabe der Uracil-N-Glykosylase zu den PCR-Ansätzen Kontaminationen mit PCR-Produkten aus vorherigen Aufarbeitungen. Anstelle von Thymin (dTTP) wird zur DNA-Vervielfältigung Uracil (dUTP) in die DNA-Fragmente eingebaut. Die Uracil-N-Glykosylase schneidet daher lediglich Uracil enthaltende DNA-Produkte (aus vorherigen DNA-Amplifikationen), während Thymin enthaltende cDNA (Ursprungs-DNA) nicht angegriffen wird. Die Aktivierung der Uracil-N-Glykosylase geschieht bei 50°C und ist der erste Schritt des Standardprogrammes der qPCR (Tabelle 13). Die Uracil-N-Glykosylase hydrolysiert die N-glykosidische Bindung zwischen der Desoxyribose der DNA und dem Uracil (Longo et al., 1990).

Standardprogramm der qRT PCR			
I.	50 °C	2 Minuten	Inkubation, Aktivierung der Uracil-N-Glykosylase
II.	95 °C	10 Minuten	initiale Denaturierung, Inaktivierung der Uracil-N-Glykosylase, Aktivierung der Amplitaq Gold Polymerase
III.	95 °C	15 Sekunden	Denaturierung
	50 °C	2 Minuten	kominiertes Primerannealing-, Elongationsschritt
			} 40 Zyklen
IV.	60 °C	1 Minute	finale Elongation

Tabelle 13: Standardprogramm der quantitativen *Real-Time* Polymerasekettenreaktion (qRT PCR) Der Schritt III der qRT PCR wird 40-mal wiederholt.

Um zu überprüfen, ob in der qRT PCR nur das gewünschte PCR-Produkt und keine anderen PCR-Produkte oder Primerdimer amplifiziert wurden (Ririe et al., 1997), erstellten wir anschließend an den letzten Zyklus der qPCR ein Hitze-Dissoziierungs-Protokoll (PE Biosystems 5700 Software, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Dafür wurde die

Temperatur pro Sekunde um 0,3 °C auf bis zu 95 °C erhöht und die noch vorhandene Fluoreszenz gemessen (Abb. 12). Mit steigender Temperatur dissoziieren die DNA-Doppelstränge abhängig von ihrer Länge in ihre zwei Einzelstränge. Da „SYBR Green I“ nur mit doppelsträngiger DNA interkaliert, nimmt die gemessene Fluoreszenzintensität mit zunehmender Temperatur ab. Alle von uns untersuchten PCR-Produkte zeigten in der Denaturierungskurve einen einzelnen Peak.

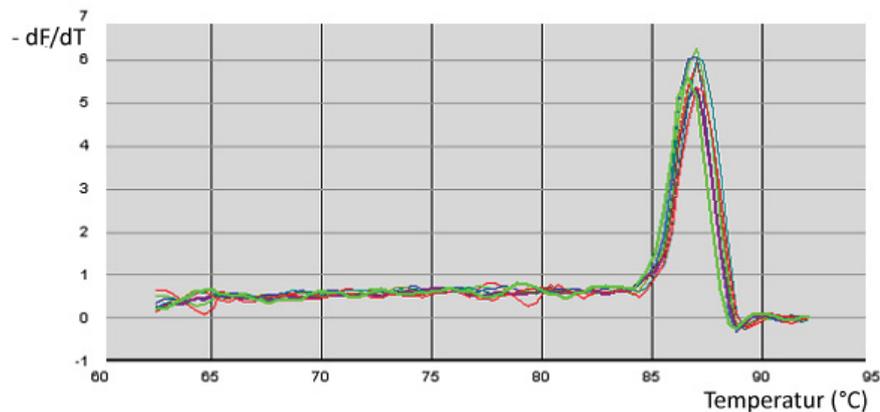


Abb. 12: Denaturierungskurve nach der Amplifikation des DNA-Fragmentes von β -Aktin Zur Erstellung des Hitze-Dissoziierungsprotokolls wurde die Temperatur um 0,3 °C pro Minute auf bis zu 95 °C erhöht und die vorhandene Fluoreszenz gemessen. Die Grafik zeigt die Temperatur (in °C) gegenüber $-dF/dT$ (Fluoreszenzänderung pro Zeit) aufgetragen (F =Fluoreszenz, T = Zeit). dF/dT wird maximal, wenn der Fluoreszenzabfall in der Probe am größten ist.

2.2.9 Quantifizierung der cDNA

Zur Quantifizierung der cDNA in den Proben werden zwei verschiedene Rechenmodelle herangezogen (absolute und relative Quantifizierung), die beide die Phase des exponentiellen Anstiegs der Menge an cDNA-Fragmenten in der Probe betrachten (Abb. 5).

Dabei beschreibt der CT-Wert (*cycle threshold*) den Signalgrenzwert, der in etwa der zehnfachen Standardabweichung der Hintergrundfluoreszenz entspricht, und somit den Anfang der exponentiellen Phase der qRT PCR darstellt. Je kleiner der CT-Wert ist, d.h., je früher sich das Fluoreszenzsignal von der Hintergrundstrahlung abhebt, desto mehr Kopien des Zielgens waren zu Beginn in der Probe (Gibson et al., 1996, Higuchi et al., 1993). Zur Bestimmung des CT-Wertes wurde durch die PE Biosystems 5700 Software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) zunächst der ΔR_n -Wert bestimmt: $\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$. Wobei der R_n^+ -Wert das Fluoreszenzsignal zu einer beliebigen Zyklenzahl ist und der R_n^- -Wert das Fluoreszenzsignal während der Baseline (errechnet zwischen den Zyklen 6-15 der qRT PCR)

darstellt. Der Grenzwert wird nun als Mittelpunkt des Log (ΔR_n) gegen die Zyklenzahl festgelegt, sodass der CT-Wert die Zyklenzahl ist, bei der der ΔR_n Wert den zuvor festgelegten Grenzwert schneidet (Gebrauchsinformation des Herstellers).

Die absolute Quantifizierung eines DNA-Gehaltes erfolgt mit Hilfe der Generierung einer Standardkurve, bei der der CT-Wert gegen den Logarithmus der Menge der eingesetzten DNA aufgetragen wird (Abb. 13). Mit Hilfe einer Standardverdünnungsreihe aus einer Probe mit DNA bekannter Konzentration kann nun die DNA-Menge einer Probe aus den erhaltenen CT-Werten mit Hilfe der Standardkurve berechnet werden (Geradengleichung: $\log(\text{Kopienzahl}) = (CT - b) / m$), (Pfaffl und Hageleit, 2001). Das Rechenmodell der absoluten Quantifizierung findet Anwendung wenn Informationen über die genaue Kopienzahl der DNA in der Probe gebraucht werden, wie z.B. bei der wiederholten Bestimmung viraler DNA in Blutproben eines Patienten unter einer antiviralen Therapie.

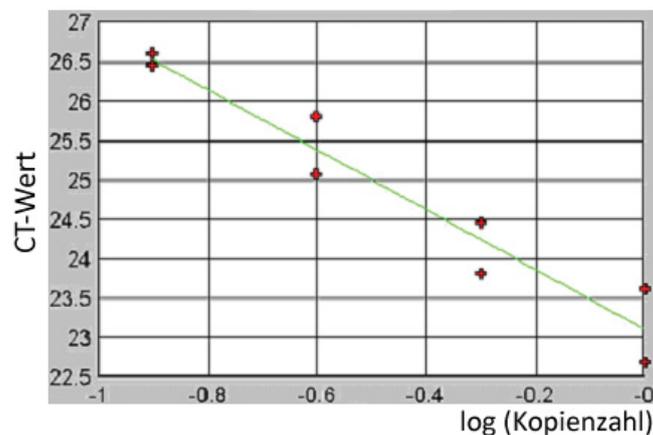


Abb. 13: Standardkurve der Expression von β -Aktin Zur Erstellung der Standardkurve wurden die DNA-Proben schrittweise verdünnt (bis 1:64). Der lineare Regressionskoeffizient lag bei 0,9653. Die Grafik zeigt den Logarithmus der Kopienzahl von β -Aktin in der Probe gegen den errechneten CT-Wert aufgetragen.

Bei der relativen Quantifizierung (semiquantitativ) des DNA-Gehaltes wird hingegen das Fluoreszenzsignal einer internen Kontrolle, dem Referenzgen (*housekeeping* Gen, HKG), mit dem zu untersuchenden DNA-Fragment verglichen (Rasmussen, 2001). Die interne Kontrolle soll ubiquitär synthetisiert werden, leicht zu detektieren sein, nicht stark in der Expression zwischen den einzelnen Zellen variieren und während des Zellzyklus konstant exprimiert werden (Bustin, 2000, Pfaffl et al., 2004). In unseren Versuchen wurde β -Aktin als Referenzgen histaminерger Neurone verwendet. Voraussetzung der relativen Quantifizierung ist die gleiche Effizienz der Amplifikation des Ziel- und Referenzgens (Pfaffl, 2001). Mithilfe der Berechnung des $\Delta\Delta CT$ -Wertes kann man nun den Expressionsunterschied zwischen zwei Gruppen darstellen (Livak und Schmittgen, 2001).

$$\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{1.\text{Gruppe}} - \Delta CT_{2.\text{Gruppe}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Die Quantifizierung des DNA-Produktes erfolgte in unseren Versuchen relativ ($\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$), wozu alle PCR-Reaktionen im Vergleich zur β -Aktin Expression normalisiert wurden. Zur Erstellung der Standardkurven wurden die DNA-Proben schrittweise verdünnt (bis 1:64). Der lineare Regressionskoeffizient war jeweils größer als 0.95.

2.2.10 Semiquantitative PCR des Nucleus tuberomamillaris

Um Expressionsunterschiede verschiedener Kanäle und Rezeptoren in den Subregionen des Nucleus tuberomamillaris zu detektieren, führten wir semiquantitative Polymerasekettenreaktionen von zwei verschiedenen Subregionen des posterioren Hypothalamus durch ($n = 8$). Dazu teilten wir zunächst Gehirnschnitte des posterioren Hypothalamus der Ratte, die die histaminergen Neurone beinhalteten, in zwei Gruppen ein. Der laterale Abschnitt (TMNv) entspricht der Region E2 nach Inagaki, wobei der mediale Abschnitt (TMNm) weniger histaminerge Neurone enthält und den Regionen E4 und E3 entspricht (Abb. 14), (1990). Mittels der semiquantitativen PCR verglichen wir den DNA-Gehalt der zwei Subregionen des Nucleus tuberomamillaris (TMNv und TMNm) für die vier ASIC Kanaluntereinheiten (ASIC 1 - 4) sowie für die HDC, dem Marker für histaminerge Zellen.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen semiquantitativen PCR zum Vergleich des DNA-Gehaltes der zwei Subregionen führte ich gemeinsam mit Frau Prof. Dr. Olga Sergeeva durch.

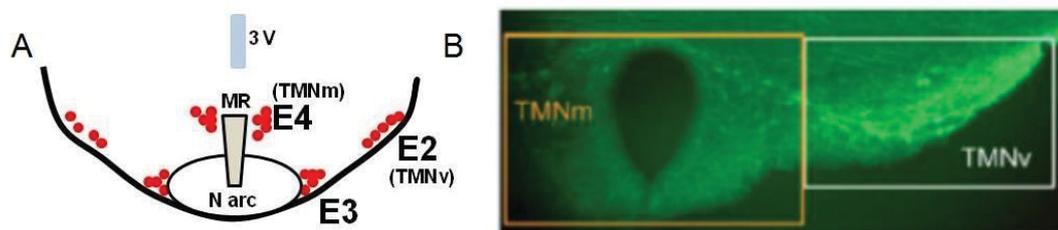


Abb. 14: Nucleus tuberomamillaris (Frontalschnitt) A: Die schematische Darstellung zeigt die Subregionen eines hypothalamischen Frontalschnittes. N arc: Nucleus arcuatus, 3V: dritter Ventrikel, MR: Recessus mamillaris, TMNv, TMNm: ventrale und mediale Subregion des Nucleus tuberomamillaris (In Anlehnung an: Leurs R, Hough LB, Blandina P, Haas HL (2011) Histamine. In: Basic Neurochemistry: principles of molecular, cellular, and medical neurobiology. (Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, Price DL, Hrsg.), 8. Auflage, S. 354. München: Elsevier). B: Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit dem ‚rabbit-anti-histamine‘ Antikörper, dessen Bindung durch den zweiten Antikörper (*donkey-anti-rabbit*), der mit Alexa-fluor 488 konjugiert ist, visualisiert wird. Die eingerahmten Regionen (TMNm und TMNv) entsprechen den Subregionen des posterioren Hypothalamus (Quelle: eigene Darstellung).

2.3 Immunhistochemie

Um die genaue Lokalisation von Rezeptoren und Kanälen in histaminergen Neuronen zu untersuchen wurden immunhistochemische Färbungen von ebendiesen angefertigt. Dafür wurden Gehirnschnitte (450 μm) der posterioren hypothalamischen Gehirnregion, die die TMN-Region beinhalten, zunächst für 6-8 Stunden in 4 % Paraformaldehyd enthaltenden 0.1 M Phosphatpuffer (PB, Tabelle 14) bei einem pH-Wert von 7.4 fixiert und daraufhin für 30 min in 20% Saccharose enthaltenden 0.1 M PB gebracht.

PB (0.1 M)		PBS (0.1 M)	
2 mM	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0.01 M	PB
61 mM	Na_2HPO_4	0.31 M	NaCl

Tabelle 14: Zusammensetzung des für immunhistochemische Färbungen verwendeten Phosphatpuffers (PB) und des Phosphatpuffersalzes (PBS) Je nach Färbungsschritt wurden den Puffern 20 % Saccharose (PB), 4 % Paraformaldehyd (PB), bzw. 0.25 % Triton X-100 (PBS-T) zugefügt.

Auf einem Kryotom der Firma Leica (Wetzlar, Deutschland) wurden anschließend 25 μm dünne Gehirnschnitte hergestellt, die auf mit Gelatine beschichteten Objektträgern aufgezogen und getrocknet wurden.

Zur Färbung der verschiedenen Proteine mit Hilfe von Antikörpern wurden die Schnitte zunächst für jeweils 15 Minuten in PBS mit 0.25 % Triton X-100 (PBS-T) dreimal gewaschen. Triton-X 100 dient der Permeabilisierung, sodass den Antikörpern der Zugang zum Zellinneren ermöglicht wird. Dabei hat Triton-X 100 die Besonderheit, dass es irreversibel permeabilisiert und auch Mitochondrien und Zellkerne für Antikörper zugänglich macht (Goldenthal et al., 1985). Daraufhin erfolgte ein Vorinkubieren mit einprozentigem normalem Serum (Serum der 2. AK Spezies) in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Dieser Schritt dient der Reduktion unspezifischer Antikörperbindungsstellen (Blockierung). Im nächsten Schritt wurden die polyklonalen Primärantikörper in einprozentigem normalen Serum in PBS verdünnt und für 12 - 16 Stunden bei 4 °C auf die Schnitte gegeben (Tabelle 15). Polyklonale Antikörper sind antigenspezifisch, erkennen jedoch mehrere Epitope eines Antigens, was der Signalverstärkung dient. Auf der anderen Seite können aus diesem Grund auch die Hintergrundsignale der Färbung verstärkt sein (Bradtke et al., 2009).

Primärantikörper	Verdünnung	Herstellungsfirma
<i>guinea pig anti HDC</i>	1 : 1000	Progen Biotech, Heidelberg, Deutschland
<i>rabbit anti histamine</i>	1 : 1000	Millipore, Temecula, CA, USA
<i>rabbit anti ASIC 1</i>	1 : 100	Millipore, Temecula, CA, USA
<i>guinea pig anti ASIC 3</i>	1 : 100	Millipore, Temecula, CA, USA

Tabelle 15: Aufzählung der für die immunhistochemischen Färbungen verwendeten Primärantikörper
Die Tabelle zeigt die Namen der verwendeten Primärantikörper, deren Verdünnung in PBS (Phosphatpuffer mit 20% Saccharose) für die immunhistochemischen Färbungen sowie deren Herstellungsfirmen.

Nach wiederholtem dreimaligem Waschen mit PBS-T wurden die Schnitte daraufhin mit dem jeweils spezifischen Sekundärantikörper, der sich gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers richtet, für 90 Minuten in einer Dunkelkammer inkubiert (Tabelle 16). Dieser Sekundärantikörper ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert und kann so unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Sekundärantikörper	Verdünnung	Fluoreszenzfarbstoff	Herstellungsfirma
<i>donkey anti guinea pig</i>	1:500	Cy 3	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
<i>donkey anti rabbit</i>	1:500	Cy 3	Jackson, ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
<i>goat anti guinea pig</i>	1:500	Alexa Fluor 488	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
<i>donkey anti rabbit</i>	1:500	Alexa Fluor 488	LI-COR Bioscience, Lincoln, NE, USA

Tabelle 16: Aufzählung der für die immunhistochemischen Färbungen verwendeten Sekundärantikörper
Die Tabelle zeigt die Namen der verwendeten Sekundärantikörper, deren Verdünnung in PBS, den Fluoreszenzfarbstoff mit dem die Sekundärantikörper markiert wurde und die Herstellungsfirmen. Cy 3 = Indocarbocyanin (Absorptionsmaximum: 550 nm, Emissionsmaximum: 570 nm), Alexa Fluor 448 (Absorptionsmaximum: 493 nm, Emissionsmaximum: 519 nm).

Im letzten Schritt wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen und in *Aqua Poly Mount* (Polysciences, Warrington, Großbritannien) mit Deckgläsern eingeschlossen. Die Analyse der Immunhistofärbungen erfolgte entweder mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2 Plus, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) oder einem Konfokalmikroskop (Zeiss LSM 510, META, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Die Filter wurden passend für die einzelnen fluoreszierenden Farbstoffe verwendet.

In jedem Experiment wurden notwendige Negativkontrollen zum Fehlerausschluss durchgeführt. Zum einen nutzen wir die Fixationskontrolle zur Unterscheidung von Autofluoreszenz bedingter Hintergrundfluoreszenz, die eine spezifische, durch Antikörper bedingte Fluoreszenz, vortäuschen könnte. Hierfür wurden sowohl die Primär- als auch die Sekundärantikörper durch Normalserum ersetzt. Alle anderen Schritte der Färbung wurden beibehalten.

Zum anderen wurde bei den Einzelfärbungen (Verwendung eines Primär- und eines Sekundärantikörpers) eine Sekundärkörperkontrolle zur Untersuchung von durch den Zweitantikörper bedingter Hintergrundfluoreszenz durchgeführt. Bei dieser Sekundärkörperkontrolle wurde lediglich der Sekundär-, nicht aber der Primärantikörper, auf die Gehirnschnitte gegeben. Auch hier wurden alle anderen Schritte der oben beschriebenen Immunhistofärbung analog durchgeführt.

Zum Ausschluss von Kreuzreaktivitäten der verschiedenen verwendeten Antikörper bei den Doppelimmunhistofärbungen (Verwendung von jeweils zwei Primär- und zwei Sekundärantikörpern) wurden nach einem festen Schema vier verschiedene Kontrollen der Färbung durchgeführt (Tabelle 17).

	Primärantikörper		Sekundärantikörper	
	A	B	anti A	anti B
1	+	+	+	+
2	+	-	+	+
3	-	+	+	+
4	-	-	+	+

Tabelle 17: Schematische Darstellung der vier Kontrollen der Doppelimmunhistofärbungen Die Kontrollen wurden durchgeführt um Kreuzreaktionen der verschiedenen Antikörper zu untersuchen.

Einige schematische Abbildungen der Arbeit wurden mit Hilfe von ‚*Medical Servier Art*‘ erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Rattus norvegicus

3.1.1 Patch-Clamp-Ableitungen an Gehirnschnitten

Beeinflusst der pH-Wert der Extrazellulärflüssigkeit die Aktivität histaminergener Neurone? Diese Frage wurde in *Patch-Clamp*-Ableitungen bei unterschiedlichen pH-Werten der Extrazellulärlösung untersucht. In der *Cell-Attached*-Konfiguration registrierten wir Aktionspotentialfrequenzen histaminergener Neurone in Gehirnschnitten der TMNV-Region der Ratte. Unter Kontrollbedingungen (pH-Wert: 7.4) zeigte sich eine durchschnittliche Feuerungsrate von 1.14 ± 0.05 Hz ($n = 28$). Eine leichte Ansäuerung (pH-Wert: 7.0) der Badlösung für 7 Minuten steigerte die Feuerungsrate von 23 der 28 abgeleiteten histaminergen Neurone der Ratte (82 %) bei 33 °C. Im Folgenden werden lediglich die pH-sensitiven histaminergen Neurone betrachtet. Im Vergleich zur Feuerungsrate bei einem pH-Wert von 7.4 stieg diese bei Ansäuerung (pH-Wert: 7.0) auf 166 ± 15 % ($n = 23$) der Kontrollfeuerungsrate an. Abbildung 15 zeigt, dass auf die initiale, durch Säure ausgelöste Erregung, eine Reduktion der Aktivität auf bis zu 45 % der Kontrollfrequenz in der *wash-out*-Phase folgte.

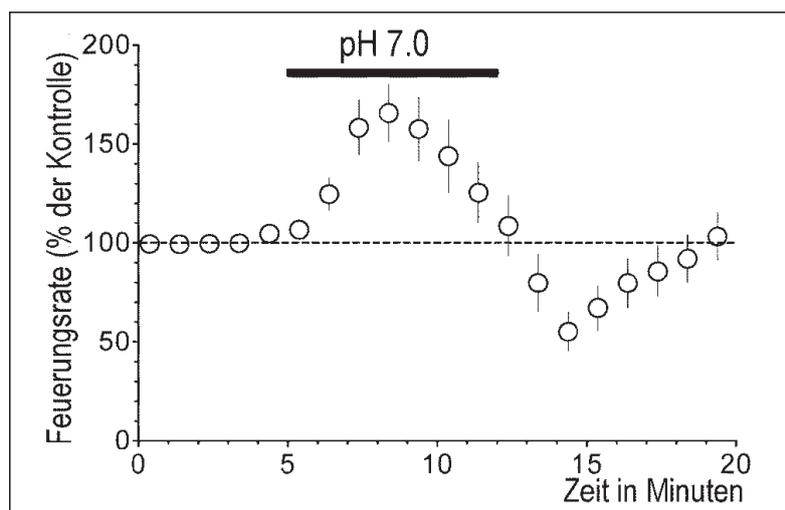


Abb. 15: Die Erniedrigung des pH-Wertes der Badlösung von 7.4 auf 7.0 erhöht die Feuerungsrate histaminergener Neurone der ventralen Subregion des Nucleus tuberomammillaris der Ratte auf 166 ± 15 % der Kontrolle bei einem pH-Wert von 7.4 ($n = 23$). Die Ableitung der Feuerungsrate einzelner histaminergener Neurone in Gehirnschnitten der Ratte erfolgte in der *Cell-Attached*-Konfiguration der *Patch-Clamp*-Ableitung. Die Aktivität der Neuronen wurde zunächst fünf Minuten lang in der Kontrolllösung mit einem pH-Wert von 7.4 abgeleitet. Daraufhin wurden die Gehirnschnitte für sieben Minuten einer Badlösung mit einem pH-Wert von 7.0 ausgesetzt. Es folgte eine erneute Aufzeichnung der Feuerungsrate in der Kontrolllösung (pH 7.4) für acht Minuten ($n = 23$).

3.1.2 Patch-Clamp-Ableitungen an akut isolierten Neuronen

In einem zweiten Untersuchungsschritt wurden die, der Aktivitätsänderung histaminergener Neurone (pH 7.0 der Extrazellulärlösung) zugrunde liegenden Ionenströme der Neurone abgeleitet. Dazu führten wir *Patch-Clamp*-Ableitungen akut isolierter histaminergener Neurone der Ratte durch. In der *Whole-Cell*-Konfiguration wurden mit Hilfe eines Applikationssystems in einem Intervall von 30 Sekunden die Zellen für jeweils zwei Sekunden einer Lösung (*recording solution*) mit einem erniedrigten pH-Wert ausgesetzt. Die durch einen erniedrigten pH-Wert ausgelösten Ionenströme einzelner histaminergener Neurone wurden registriert. Wir untersuchten die Wirkung unterschiedlicher pH-Werte der extrazellulären *recording solution* (pH 7.0 - 4.0) an 17 Neuronen der Ratte. Keine der untersuchten Neurone zeigte messbare Ströme bei einem pH-Wert von 7.0. Die durch eine Ansäuerung der *recording solution* auf einen pH-Wert von 6.5 ausgelösten Ströme waren 37 ± 8 pA groß (82 % der Neurone). Abbildung 16 zeigt die gemessenen Ionenströme (pH 4.0 - 7.0).

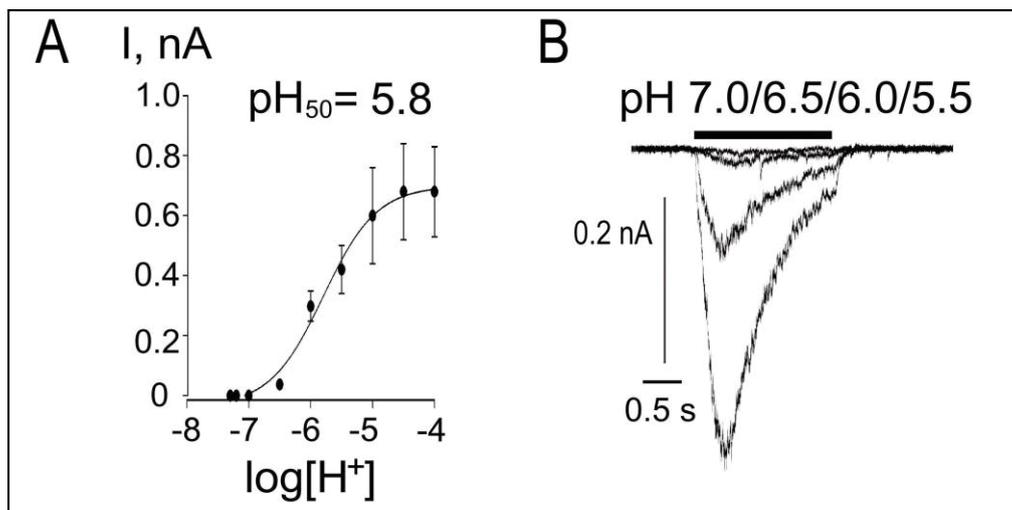


Abb. 16: Erniedrigte pH-Werte der Extrazellulärlösung führen zu veränderten Ionenströmen in akut isolierten histaminergen Neuronen der Ratte. Akut isolierte histaminerge Neurone der Ratte wurden mit Hilfe eines Applikationssystems in der *Whole-Cell*-Konfiguration der *Patch-Clamp*-Ableitung für jeweils zwei Sekunden einer Testlösung (*recording solution*) mit einem erniedrigten pH-Wert ausgesetzt. **A:** Die Dosis-Wirkungskurve zeigt die gemittelten Ergebnisse von 17 histaminergen Neuronen. **B:** Die Abbildung zeigt die bei unterschiedlichen pH-Werten ausgelösten Ionenströme eines repräsentativen Neurons.

3.1.3 Expression extrazellulärer pH-Sensoren

3.1.3.1 ASICs

Die Expression von ASICs in histaminergen Neuronen der Ratte untersuchten wir mit Hilfe der PCR. Nach der elektrophysiologischen Registrierung eines Neurons wurde dessen Zytoplasma in die verwendete Elektrode gesaugt. Die reverse Transkription wandelte die darin enthaltene mRNA in cDNA um. Die Identifizierung der TMN-Neurone erfolgte durch den Nachweis der HDC (n = 80) in den einzelnen Neuronen. Abbildung 17 zeigt beispielhaft die Expression der HDC einer Einzelzelle der Ratte. Die Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes beträgt 457 B.p.. Für die weitere Analyse wurden lediglich HDC-positive Neurone verwendet.

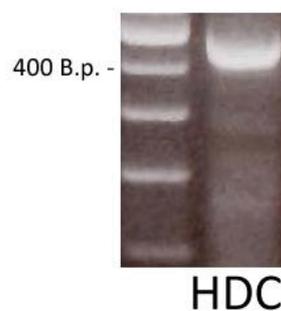


Abb. 17: Histaminerge Neurone exprimieren die Histidindecaboxylase (HDC). Die Expression der HDC durch histaminerge Neurone wurde mit der Einzelzell-Polymerasekettenreaktion untersucht. Die Abbildung zeigt beispielhaft die Expression der HDC von einer histaminergen Einzelzelle. Die Produktlänge beträgt 457 Basenpaare (B.p.). Als Marker (M) wurde die Einteilung in 100 B.p.-Schritten mit der stärksten Bande bei 500 B.p. gewählt.

ASIC 1 - 4

Zur Untersuchung der Expression von ASICs in Zellen des Nucleus tuberomammillaris wurden zunächst PCR-Proben der gesamten TMN-Region untersucht. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Reaktion zeigte die Expression aller vier ASIC Kanaluntereinheiten in der TMN-Region der Ratte (Abb. 18 A). In Proben der gesamten TMN-Region befinden sich neben histaminergen Neuronen zusätzlich Astrozyten, Gliazellen und andere Neurone. Die Einzelzell-PCR histaminergere Neurone (HDC-positiv) bewies die Expression der ASIC Kanaluntereinheiten in histaminergen Neuronen (n = 46). Die Untersuchung der 46 histaminergen Einzelzellen zeigte, dass nicht jedes Neuron die gleichen ASIC Kanaluntereinheiten exprimiert (Abb. 18 B).

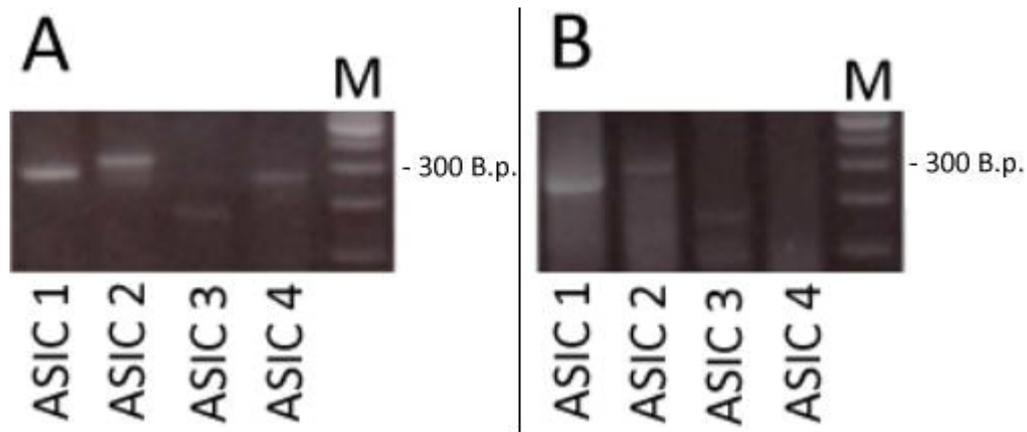


Abb. 18: Histaminerge Neurone der Ratte exprimieren *acid-sensing ion channels* (ASICs). Die Länge der amplifizierten DNA-Fragmente der einzelnen ASIC Kanaluntereinheiten beträgt: ASIC 1: 276 Basenpaare (B.p.), ASIC 2: 321 B.p., ASIC 3: 164 B.p., ASIC 4: 263 B.p.. Als Marker (M) wurde die Einteilung in 100 B.p.-Schritten mit der stärksten Bande bei 500 B.p. gewählt. **A:** In Proben der Region des Nucleus tuberomammillaris konnte die Expression aller vier ASIC Kanaluntereinheiten gezeigt werden. **B:** Die Einzelzell-PCR eines repräsentativen histaminergen Neurons zeigt die Expression der ASIC Kanaluntereinheiten ASIC 1, 2 und 3.

ASIC 1 konnte in 71.1 % der untersuchten 46 HDC-positiven Neurone mittels PCR nachgewiesen werden. ASIC 2 wurde in 53.3 %, ASIC 3 in 62,5 % und ASIC 4 in 44.4 % der histaminergen Zellen aufgezeigt. 17.7 % der histaminergen Neurone exprimierten alle vier ASIC Kanaluntereinheiten (Abb.19).

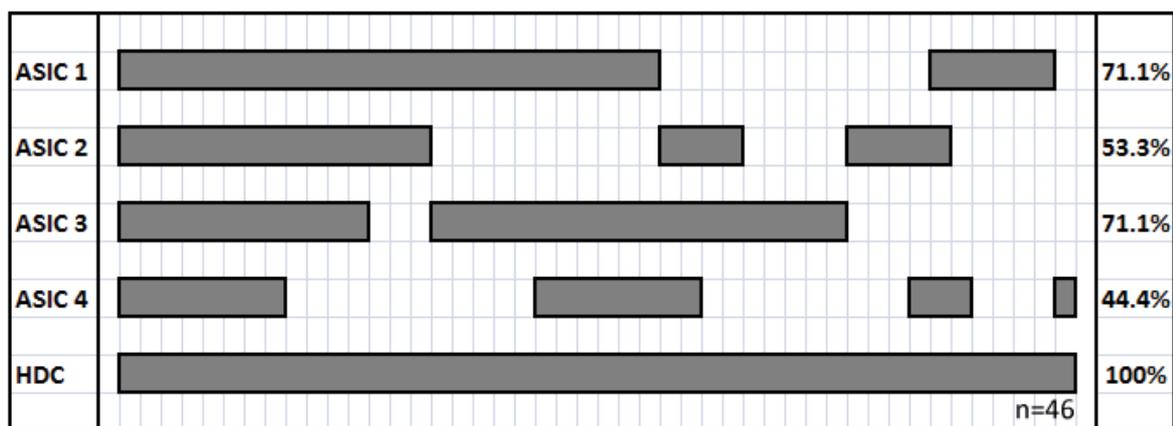


Abb. 19: Histaminerge Neurone des Nucleus tuberomammillaris exprimieren *acid-sensing ion channels* (ASICs). Wir fanden unterschiedliche Zusammensetzungen der vier Kanaluntereinheiten 1 - 4. Die Expression von ASIC 1 - 4 wurde mittels Einzelzell-PCR HDC-positiver Neurone untersucht (n = 46).

ASIC 1a und 1b

Zur Unterscheidung zwischen den zwei Splicevarianten der ASIC 1 Kanaluntereinheit (ASIC 1a, ASIC 1b) in histaminergen Neuronen wurden die Primer für die PCR so gewählt, dass sich die Länge der amplifizierten DNA-Fragmente der zwei Splicevarianten voneinander unterscheiden (ASIC 1a: 360 B.p., ASIC 1b: 324 B.p.).

Zur sicheren Unterscheidung zwischen den zwei Splicevarianten wurde zusätzlich eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Das Restriktionsenzym Eco R I schneidet lediglich das amplifizierte DNA-Fragment der ASIC 1a, nicht aber der ASIC 1b Kanaluntereinheit. Die Abbildung 20 zeigt, dass das gesamte amplifizierte DNA-Fragment der PCR aus Proben des Nucleus tuberomamillaris der ASIC 1 Kanaluntereinheit durch das Restriktionsenzym Eco RI gespalten wurde. Die durch das Restriktionsenzym Eco RI entstandenen Spaltprodukte der ASIC 1a Splicevariante haben eine Länge von 210 und 150 B.p.. In histaminergen Neuronen wird folglich lediglich die ASIC 1a und nicht die ASIC 1b Kanaluntereinheit exprimiert.

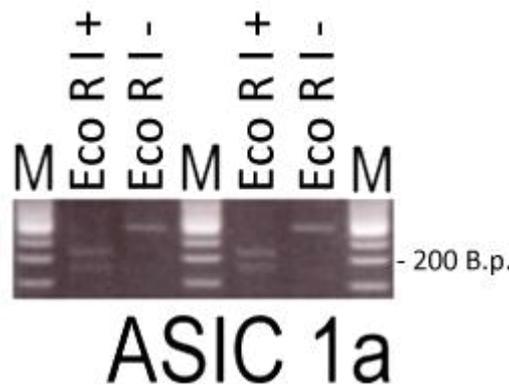


Abb. 20: In der Region des Nucleus tuberomamillaris der Ratte wird die *acid-sensing ion channel (ASIC) 1a* Splicevariante der ASIC 1 Kanaluntereinheit exprimiert. Eco RI schneidet lediglich die ASIC 1a Splicevariante der ASIC 1 Kanaluntereinheit. Die geschnittenen DNA-Fragmente haben eine Länge von 150 und 210 Basenpaaren (B.p.). Zu sehen ist, dass die gesamte amplifizierte DNA durch das Restriktionsenzym geschnitten wird. Als Marker (M) wurde die Einteilung in 100 B.p.-Schritten mit der stärksten Bande bei 500 B.p. gewählt (Modifiziert nach: Kernder A, De Luca R, Yanovsky Y, Haas HL, Sergeeva OA (2014) Acid-sensing hypothalamic neurons controlling arousal. *Cell Mol Neurobiol* 34(6):777-89, mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlages).

Um sicher zu gehen, dass die entworfenen Primer auch die ASIC Untereinheit 1b amplifizieren, wurde die PCR-Reaktion zusätzlich mit einer Positivkontrolle (Zellen des Nucleus Edinger-Westphal) durchgeführt. Abbildung 21 zeigt die Expression beider Splicevarianten der ASIC 1 Kanaluntereinheit in Zellen des Nucleus Edinger-Westphal. Dies ist zum einen durch die Darstellung von zwei unterschiedlich langen DNA-Fragmenten in der gelelektrophoretischen Auftrennung der Amplifikation der ASIC Kanaluntereinheit 1 zu erkennen (ASIC 1a: 360 B.p., ASIC 1b: 324 B.p.; Abb. 21 A), zum anderen zeigen sich nach der Zugabe des Restriktionsenzym Eco RI in der gelelektrophoretischen Auftrennung drei verschieden große DNA-Fragmente (ASIC 1a (durch Eco RI geschnitten): 150 und 210 B.p., ASIC 1b: 324 B.p.; Abb. 21 B). Die Sequenzierung der DNA-Amplifikation der ASIC 1 Kanaluntereinheit des Nucleus Edinger-Westphal bestätigte die Expression der zwei Splicevarianten in dieser Gehirnregion (Abb. 21 C).

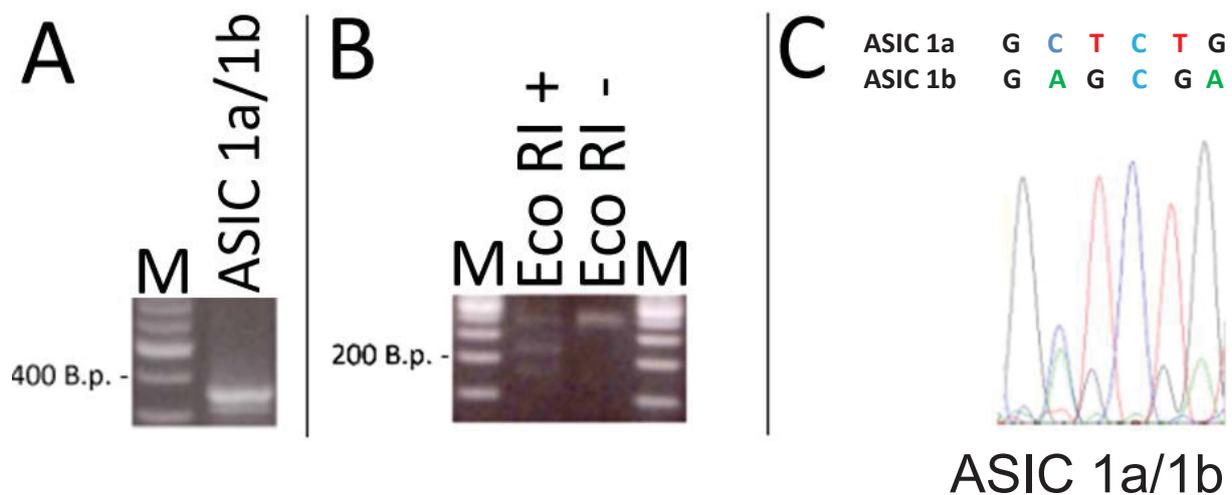


Abb. 21: Im Nucleus Edinger-Westphal werden beide Splicevarianten der *acid-sensing ion channel 1* (ASIC 1) Kanaluntereinheit (ASIC 1a /1b) exprimiert. A: Die amplifizierten DNA-Produkte der Splicevarianten des ASIC 1 Kanals unterscheiden sich in ihrer Produktlänge (ASIC 1a: 360 Basenpaare (B.p.), ASIC 1b: 324 B.p.). B: Die Restriktionsanalyse zeigt nach der Zugabe des Restriktionsenzym Eco RI drei unterschiedlich lange DNA-Fragmente (ASIC 1a: 210 und 150 B.p., ASIC 1b: 324 B.p.) Als Marker (M) wurde die Einteilung in 100 B.p.-Schritten mit der stärksten Bande bei 500 B.p. gewählt (Modifiziert nach: Kernder A, De Luca R, Yanovsky Y, Haas HL, Sergeeva OA (2014) Acid-sensing hypothalamic neurons controlling arousal. *Cell Mol Neurobiol* 34(6):777-89, mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlages). C: Ein repräsentativer Ausschnitt der Sequenzierung des ASIC 1a/1b Kanals zeigt die Expression beider Splicevarianten der ASIC 1 Kanaluntereinheit in Neuronen des Nucleus Edinger-Westphal.

Die Untersuchungen ergeben, dass histaminerge Neurone des Nucleus tuberomamillaris, im Gegensatz zu Zellen des Nucleus Edinger-Westphal, die Splicevariante ASIC 1a der ASIC Kanaluntereinheit exprimieren, nicht jedoch die Splicevariante ASIC 1b.

ASIC 2a und 2b

Die Untersuchung der Expression der zwei Splicevarianten des ASIC 2 Kanals (ASIC 2a, ASIC 2b) in histaminergen Neuronen erfolgte analog zu den Untersuchungen der ASIC 1 Splicevarianten. Die Längen amplifizierten DNA-Fragmente der ASIC 2 Splicevarianten betragen 617 B.p. (ASIC 2a) und 638 B.p. (ASIC 2b). Zur Restriktionsanalyse wurde das Restriktionsenzym Eco 47 verwendet, welches lediglich das amplifizierte DNA-Fragment des ASIC 2b Kanals schneidet. Das amplifizierte DNA-Fragment der ASIC 2b Splicevariante wird durch das Restriktionsenzym Eco 47 in zwei DNA-Fragmente der Länge 327 bzw. 311 B.p. getrennt. Die Abbildung 22 zeigt die Expression beider Splicevarianten der ASIC 2 Kanaluntereinheit in Zellen des Nucleus tuberomamillaris. Einerseits zeigen die zwei Splicevarianten der ASIC 2 Kanaluntereinheit eine unterschiedliche Länge in der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR in DNA-Proben der TMN-Region (A). Andererseits zeigt die Restriktionsanalyse, dass nicht das gesamte amplifizierte DNA-

Fragment durch das Restriktionsenzym Eco 47 gespalten wird (B). Die Sequenzierung des ASIC 2 Kanals aus der TMN-Region bestätigte die Expression beider Splicevarianten der ASIC 2 Kanaluntereinheit (Abb. 22 C).

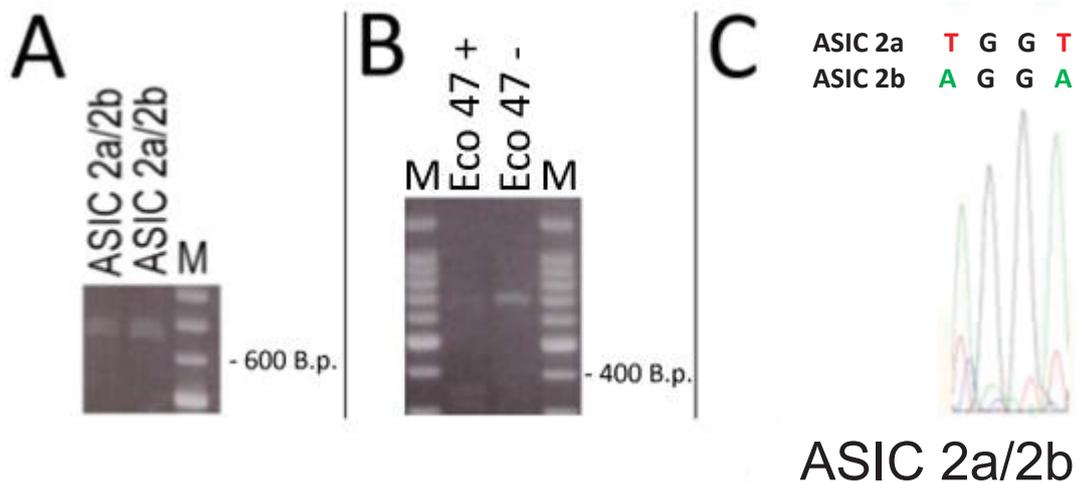


Abb. 22: In der Region des Nucleus tuberomamillaris werden beide Splicevarianten der acid-sensing ion channel 2 (ASIC 2) Kanaluntereinheit (ASIC 2a/2b) exprimiert. A: Die amplifizierten DNA-Produkte der Splicevarianten des ASIC 2 Kanals unterscheiden sich in ihrer Produktlänge (ASIC 2a: 617 Basenpaare (B.p.), ASIC 2b: 638 B.p.). **B:** Die Restriktionsanalyse zeigt nach der Zugabe des Restriktionsenzym Eco 47 drei unterschiedlich lange DNA-Fragmente (ASIC 2a: 617 B.p., ASIC 2b: 327 und 311 B.p.). Als Marker (M) wurde die Einteilung in 100 B.p.-Schritten mit der stärksten Bande bei 500 B.p. gewählt (Modifiziert nach: Kerder A, De Luca R, Yanovsky Y, Haas HL, Sergeeva OA (2014) Acid-sensing hypothalamic neurons controlling arousal. Cell Mol Neurobiol 34(6):777-89, mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlages). **C:** Ein repräsentativer Ausschnitt der Sequenzierung des ASIC 2a/2b Kanals zeigt die Expression beider Splicevarianten der ASIC 2 Kanaluntereinheit in Neuronen des Nucleus tuberomamillaris.

Die Ergebnisse zeigen, dass in histaminergen Neuronen sowohl die ASIC 2a als auch die ASIC 2b Splicevariante der ASIC 2 Kanaluntereinheit exprimiert wird.

Insgesamt ließ sich die Expression aller vier ASIC Kanaluntereinheiten (ASIC 1 - 4) in histaminergen Neuronen des Nucleus tuberomamillaris nachweisen.

3.1.3.2 Lokalisation von ASIC Kanälen

Um die genaue Lokalisation von ASIC Kanälen in histaminergen Zellen zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen der ASIC 1a sowie der ASIC 3 Kanaluntereinheit angefertigt. Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern des Meerschweinchens gegen die Histidindecaboxylase und Antikörpern des Kaninchens gegen die ASIC 1a Kanaluntereinheit zeigte eine gemeinsame Lokalisation der zwei Färbungen innerhalb des Zellkörpers histaminergener Neurone. Insgesamt ließen sich 76.5 % der mit dem HDC-Antikörper angefärbten Zellen mit dem gegen die ASIC 1a Untereinheit gerichteten

Antikörper anfärben (n = 149). Zusätzlich zu den doppelgefärbten histaminergen Neuronen ließen sich mit dem ASIC 1a Antikörper weitere kleine ovale Zellen (< 10 µm), die innerhalb des gesamten Präparates lokalisiert waren, anfärben. Abbildung 23 zeigt die Doppelimmunhistofärbung mit Antikörpern gegen die HDC (rot) sowie Antikörpern gegen die ASIC 1a Kanaluntereinheit (grün).

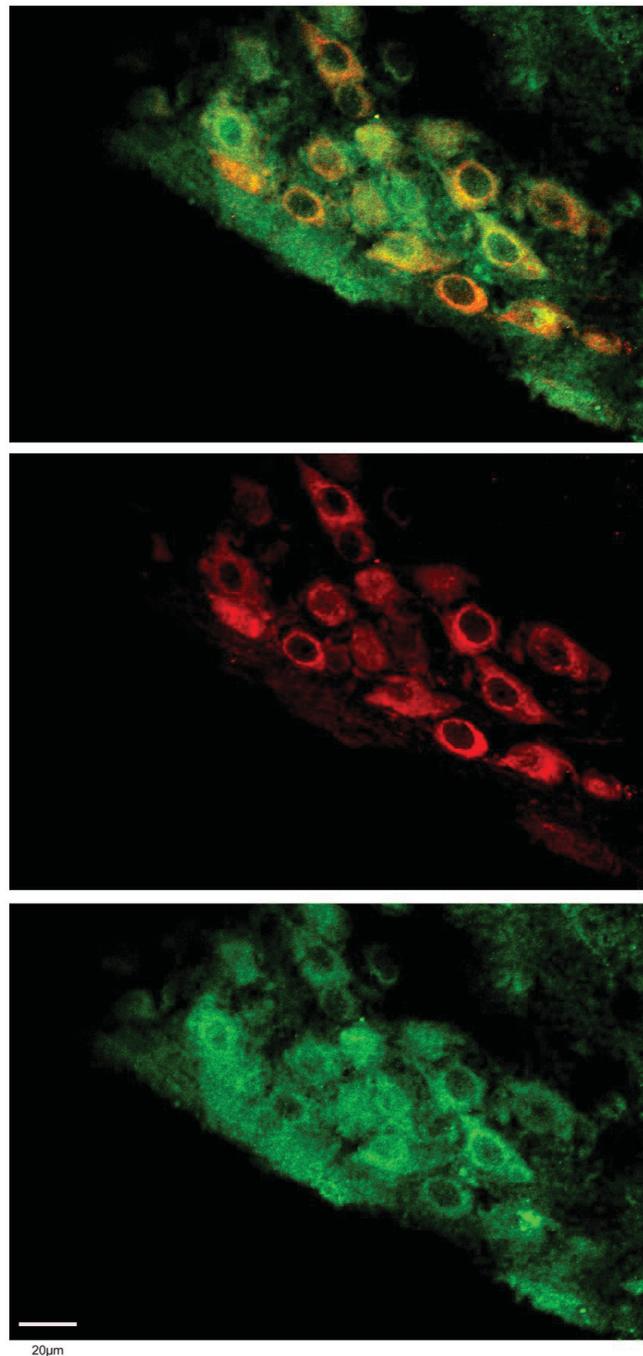


Abb. 23: Doppelimmunhistofärbung (*acid-sensing ion channel 1a* (ASIC 1a) und Histidindecaboxylase (HDC)) einer Zellgruppe histaminерger Neurone der Ratte Primärantikörper: *rabbit anti ASIC 1a*, *guinea pig anti HDC*, Sekundärantikörper: *donkey anti guinea pig* (mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy 3 konjugiert), *donkey anti rabbit* (mit dem Fluoreszenzfarbstoff AF 488 konjugiert). Darstellung der HDC in rot, der ASIC 1a Kanaluntereinheit in grün.

Die Doppelimmunhistofärbung zur Untersuchung der Lokalisation der ASIC 3 Kanaluntereinheit in histaminergen Neuronen der Ratte erfolgte mit Antikörpern des Kaninchens gegen Histamin zur Darstellung histaminergener Neurone der Ratte und Antikörpern des Meerschweinchens gegen die ASIC 3 Kanaluntereinheit. Es zeigte sich ebenfalls eine gemeinsame Lokalisation der zwei Färbungen innerhalb des Zellkörpers histaminergener Neurone. Insgesamt ließen sich 81.39 % der mit dem Antikörper gegen Histamin angefärbten Zellen auch mit dem gegen die ASIC 3 Kanaluntereinheit gerichteten Antikörper anfärben (n = 43).

3.1.3.3 ASIC Expression in den Subregionen des Nucleus tuberomamillaris

Die Variation der ASIC Expression innerhalb des Nucleus tuberomamillaris untersuchten wir mit Hilfe von semiquantitativen Polymerasekettenreaktionen zweier Subregionen des posterioren Hypothalamus (n = 8). Dazu teilten wir zunächst die Gehirnschnitte der Ratte, die die histaminergen Neurone enthielten, in zwei Abschnitte ein. Der laterale Abschnitt (TMNv) entspricht der Region E2 nach Inagaki, wobei der mediale Abschnitt weniger histaminerge Neurone enthält und den Regionen E4 und E3 entspricht (Inagaki et al., 1990).

Die *Real-Time* PCR ermöglicht die quantitative Bestimmung des mRNA-Gehaltes einer Probe, indem der durch die reverse Transkriptasereaktion und anschließende PCR entstandene DNA-Gehalt einer Probe gemessen wird. Wir verglichen den DNA-Gehalt der zwei Subregionen des Nucleus tuberomamillaris (TMNv und TMNm) für die vier ASIC Kanaluntereinheiten (ASIC 1 - 4) sowie für die HDC, dem Marker für histaminerge Zellen. In dem zellreichen ventrolateralen Abschnitt (TMNv) des Nucleus tuberomamillaris zeigte sich ein signifikant höherer DNA-Gehalt der Histidindecaboxylase, ($p < 0.05$, Mann-Whitney). Von den untersuchten ASIC Kanaluntereinheiten zeigte sich bei ASIC 3 ein signifikanter Unterschied in dem mRNA-Gehalt der zwei Abschnitte TMNm und TMNv ($p < 0.05$, Mann-Whitney). Der mRNA-Gehalt der übrigen ASIC Kanaluntereinheiten wich in den zwei Proben nicht bedeutsam voneinander ab ($p > 0.05$, Mann-Whitney, n.s.; Abb. 24).

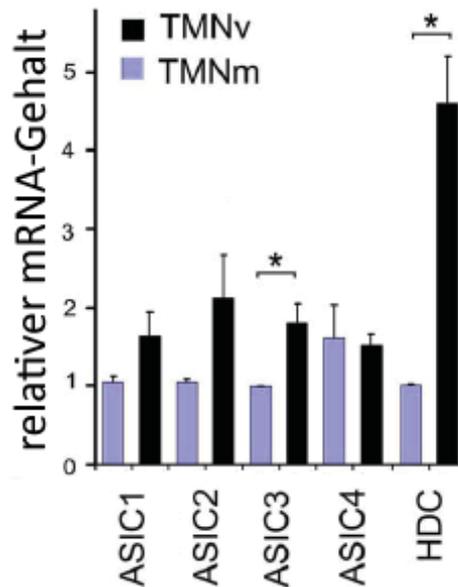


Abb. 24: mRNA-Gehalt normalisiert auf die niedrigste Expression von *acid-sensing ion channel* (ASIC) 1 – 4 sowie der Histidindecaboxylase (HDC), dem Marker für histaminerge Neurone Dargestellt ist die vergleichende Analyse des mRNA-Gehaltes der ventralen und medialen Subregion (TMNv und TMNm) des Nucleus tuberomamillaris (semiquantitative *Real-Time* Polymerasekettenreaktion, 8 Ratten im Alter zwischen 23 und 27 Tagen, * $p < 0.05$, Mann-Whitney).

3.1.3.4 TRPV 1

Die Expression des TRPV 1 Kanals in histaminergen Neuronen wurde mittels der Einzelzell-PCR HDC-positiver Proben untersucht. Die gelelektrophoretische Auftrennung zeigte die Expression des TRPV 1 Kanals in diesen Neuronen (Abb. 25). Insgesamt exprimierten 18.8 % der untersuchten histaminergen Neurone den TRPV 1 Kanal ($n = 32$). Die Produktlänge beträgt 220 B.p..

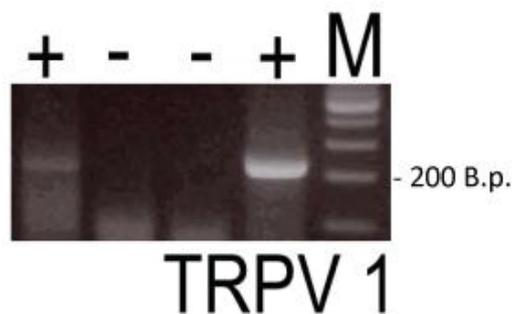


Abb. 25: Histaminerge Neurone der Ratte exprimieren den *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV 1) Kanal. Abgebildet sind vier histaminerge Einzelzellen (HDC-positiv). Zwei von den vier Einzelzellen zeigen eine positive Bande für den TRPV 1 Kanal. Die Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes beträgt 220 Basenpaare (B.p.). Als Marker (M) wurde die Einteilung in 100 B.p.-Schritten mit der stärksten Bande bei 500 B.p. gewählt (Modifiziert nach: Kernder A, De Luca R, Yanovsky Y, Haas HL, Sergeeva OA (2014) Acid-sensing hypothalamic neurons controlling arousal. *Cell Mol Neurobiol* 34(6):777-89, mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlages).

Das Barhistogramm (Abb. 26) stellt die Expression der verschiedenen ASIC Kanaluntereinheiten und des TRPV 1 Kanals in 32 Einzelzellen dar. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Expression der unterschiedlichen ASIC Kanaluntereinheiten und dem TRPV 1 Kanal in histaminergen Einzelzellen.

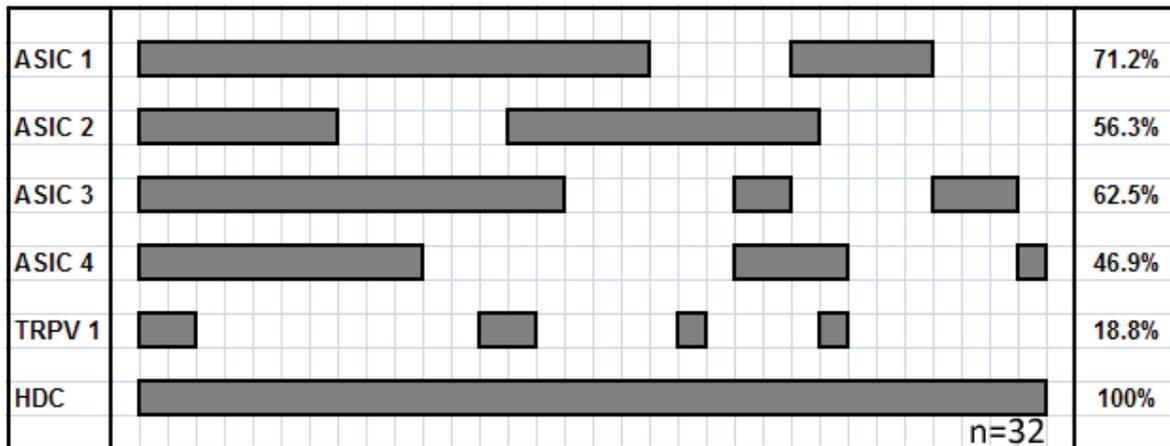


Abb. 26: 18.8 % der histaminergen Neurone des Nucleus tuberomamillaris exprimieren den *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV 1) Kanal (n = 32). Die Expression des TRPV 1 Kanals sowie der *acid-sensing ion channel* (ASIC) Kanaluntereinheiten wurde mittels der Einzelzell-Polymerasekettenreaktion Histidindecaboxylase-positiver Neurone untersucht. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Expression von ASIC 1 - 4 und des TRPV 1 Kanals (Modifiziert nach: Kernder A, De Luca R, Yanovsky Y, Haas HL, Sergeeva OA (2014) Acid-sensing hypothalamic neurons controlling arousal. *Cell Mol Neurobiol* 34(6):777-89, mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlages).

TRPV 1 Splicevarianten

Mittels Einzelzell-PCR untersuchten wir zudem die Expression der Splicevarianten des TRPV 1 Kanals (TRPV 1B und VR.5^{sv}) histaminergener Neurone der Ratte.

Abbildung 27 A zeigt den Nachweis der Expression der TRPV 1B Splicevariante in der TMN-Region der Ratte. Die Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes der Splicevariante beträgt 292 B.p., die des TRPV 1 Kanals 380 B.p.. Die Einzelzell-PCR ergab, dass zwei von sieben Einzelzellen die Splicevariante exprimierten (28.57 %, n = 7).

Abbildung 27 B zeigt den Nachweis der Splicevariante VR.5^{sv} des TRPV 1 Kanals in der TMN-Region. Die Länge des amplifizierten Fragmentes der Splicevariante beträgt 121 B.p.. Lediglich eine von neun histaminergen Einzelzellen zeigte in der gelelektrophoretischen Auftrennung eine positive Bande (11.11 %, n = 9).

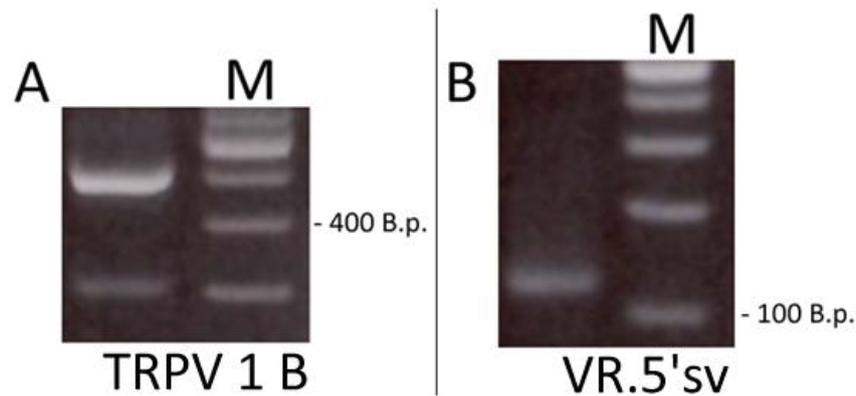


Abb. 27: Die *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV 1) Splicevarianten TRPV 1B und VR.5'sv werden histaminergen Neuronen der Ratte exprimiert. **A:** Die Gelelektrophorese zeigt eine Bande bei 380 Basenpaaren (B.p.), die das DNA-Fragment der Amplifikation des TRPV 1 Kanals darstellt sowie eine Bande bei 292 B.p., die das amplifizierte DNA-Fragment der TRPV 1 Splicevariante TRPV 1B darstellt. **B:** Die Gelelektrophorese zeigt die Expression der Splicevariante VR.5'sv des TRPV 1 Kanals der Ratte. Die Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes beträgt 121 B.p.. Als Marker (M) wurde die Einteilung in 100 B.p.-Schritten mit der stärksten Bande bei 500 B.p. gewählt.

Die Darstellungen zeigen, dass histaminerge Neurone der Ratte den TRPV 1 sowie die zwei Splicevarianten (TRPV 1B und VR.5'sv) des Kanals exprimieren.

3.1.3.5 Na⁺/K⁺-ATPase

Zur Untersuchung der Expression der unterschiedlichen Na⁺/K⁺-ATPase Untereinheiten in histaminergen Neuronen wurden Einzelzell-PCR durchgeführt (n = 5). Die Analyse der PCR zeigte die Expression der Na⁺/K⁺-ATPase Untereinheiten α 1, α 3, β 1, β 2 und keine Heterogenität in der Expression der Untereinheiten. In DNA-Proben der gesamten TMN-Region konnte zusätzlich die Expression der α 2 Untereinheit nachgewiesen werden (Abb. 28).

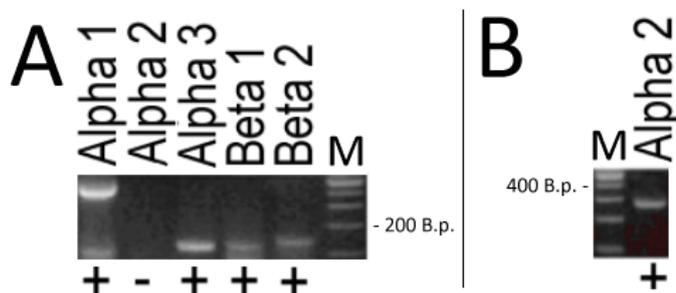


Abb. 28: Die Expression der Na⁺/K⁺-ATPase im Nucleus tuberomamillaris der Ratte **A:** Gelelektrophorese einer Einzelzellpolymerasekettenreaktion eines repräsentativen histaminergen Neurons mit der Expression der Na⁺/K⁺-ATPase Untereinheiten: α 1, α 3, β 1, β 2. Die Länge der amplifizierten DNA-Fragmente beträgt: α 1: 418 Basenpaare (B.p.), α 3: 115 B.p., β 1: 121 B.p., β 2: 136 B.p. **B:** In Proben der Region des Nucleus tuberomamillaris zeigte sich die Expression der α 2 Untereinheit der Na⁺/K⁺-ATPase (249 B.p.). Als Marker (M) wurde die Einteilung in 100 B.p.-Schritten mit der stärksten Bande bei 500 B.p. gewählt (Modifiziert nach: Kernder A, De Luca R, Yanovsky Y, Haas HL, Sergeeva OA (2014) Acid-sensing hypothalamic neurons controlling arousal. *Cell Mol Neurobiol* 34(6):777-89, mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlages).

3.1.3.6 OGR 1

Die Expression des OGR 1 Rezeptors in histaminergen Neuronen wurde mittels Einzelzell-PCR untersucht. Eine von 13 HDC-positiven Zellen zeigte sich in der PCR positiv für den OGR 1 Rezeptor (7.69 %, n = 13). Abbildung 29 zeigt die Gelelektrophorese des OGR 1 Rezeptors in der TMN-Region. Die Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes des Rezeptors beträgt 123 B.p..

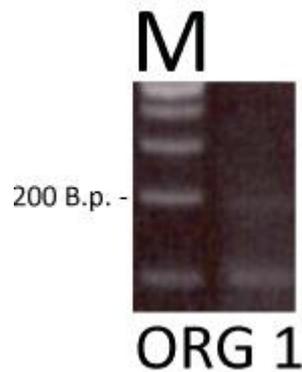


Abb. 29: Der ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 (OGR 1) Rezeptor wird in der Region des Nucleus tuberomammillaris der Ratte exprimiert. Die Abbildung zeigt die Gelelektrophorese der Polymerasekettenreaktion des OGR 1 Rezeptors. Die Produktlänge beträgt 123 Basenpaare (B.p.). Als Marker (M) wurde die Einteilung in 100 B.p.-Schritten mit der stärksten Bande bei 500 B.p. gewählt (Modifiziert nach: Kernder A, De Luca R, Yanovsky Y, Haas HL, Sergeeva OA (2014) Acid-sensing hypothalamic neurons controlling arousal. *Cell Mol Neurobiol* 34(6):777-89, mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlages).

3.2 Mus musculus

3.2.1 Patch-Clamp-Ableitungen an Gehirnschnitten

Um vergleichend zu den Untersuchungen an Gehirnschnitten der Ratte zu untersuchen, ob ein erniedrigter pH-Wert der Extrazellulärlösung zu einer Aktivitätsveränderung histaminergener Neurone der Maus führt, wurden an diesen *Patch-Clamp*-Ableitungen bei unterschiedlichen pH-Werten der Extrazellulärlösung durchgeführt (n = 12). In der *Cell-Attached*-Konfiguration wurden Aktionspotentialfrequenzen histaminergener Neurone in Gehirnschnitten der TMN-Region registriert. Histaminerge Neurone der Maus zeigten, im Gegensatz zu Neuronen der Ratte, keine Erhöhung der Feuerungsrate bei einem pH-Wert von 7.0 (113.98 % der Kontrollfrequenz, Abb. 30). Interessanterweise zeigt sich nach der Applikation der sauren Lösung (pH-Wert: 7.0) in der *wash-out*-Phase eine Reduktion der Feuerungsrate histaminergener Neurone der Maus auf 60.6 % der Kontrollfrequenz. Diese wurde vergleichend auch bei den *Patch-Clamp*-Ableitungen der Ratte beobachtet.

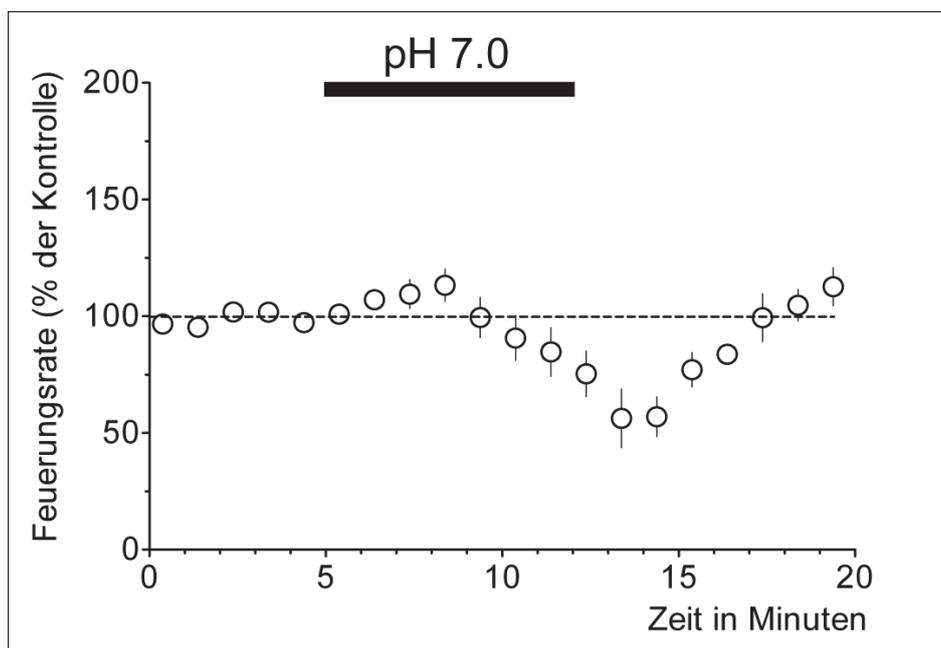


Abb. 30: Die Erniedrigung des pH-Wertes der Badlösung von 7.4 auf 7.0 erhöhte die Feuerungsrate histaminergener Neurone der Maus nicht. Die Ableitung der Feuerungsrate einzelner histaminergener Neurone in Gehirnschnitten der Maus erfolgte in der *Cell-Attached*-Konfiguration der *Patch-Clamp*-Ableitung. Die Aktivität der Neurone wurde zunächst fünf Minuten lang in der Kontrolllösung mit einem pH-Wert von 7.4 abgeleitet. Daraufhin wurden die Gehirnschnitte für sieben Minuten einer Badlösung mit einem pH-Wert von 7.0 ausgesetzt. Es folgte eine erneute Aufzeichnung der Feuerungsrate histaminergener Neurone in der Kontrolllösung (pH 7.4) für acht Minuten. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte der Aufzeichnungen von zwölf histaminergen Neuronen der Maus.

3.2.2 Patch-Clamp-Ableitungen an akut isolierten Zellen

In dem zweiten Untersuchungsschritt wurden, wiederum analog zu den Untersuchungen der Ratte, Ionenströme bei veränderten pH-Werten der Testlösung (*recording solution*) gemessen. Dazu wurden mit *Patch-Clamp*-Ableitungen akut isolierte histaminerge Neurone der Maus in der *Whole-Cell*-Konfiguration untersucht. Der Versuchsaufbau und die Durchführung wurden vergleichbar zu den Untersuchungen der histaminergen Zellen der Ratte gewählt. An 14 histaminergen Neuronen der Maus zeichneten wir die Wirkung unterschiedlicher pH-Werte (pH 7.0 - 4.0) auf. Keine der untersuchten Neurone zeigte messbare Ionenströme bei einem pH-Wert von 7.0. Die bei einem pH-Wert von 6.5 ausgelösten Ströme waren durchschnittlich 79 pA groß (Abb. 31).

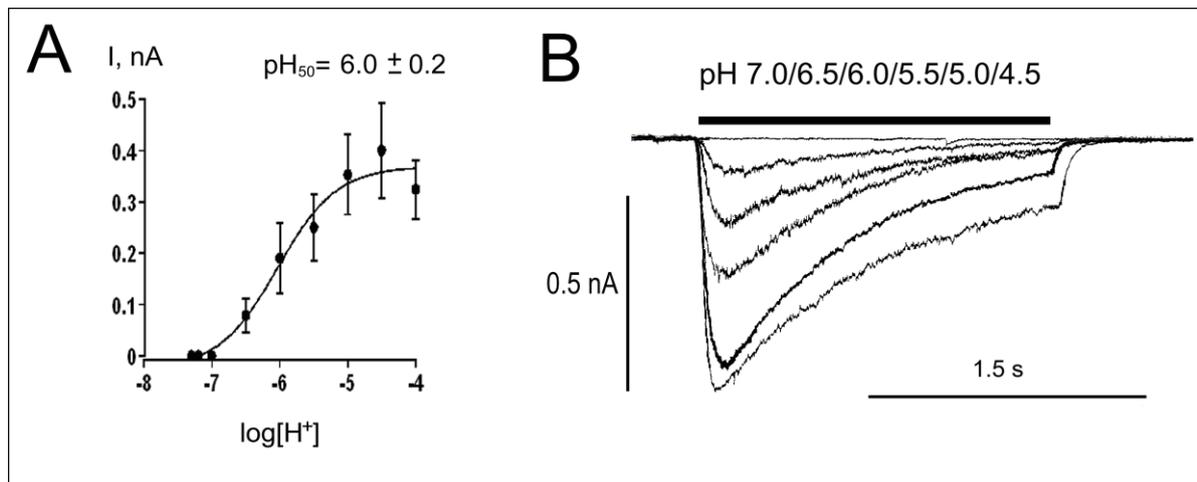


Abb. 31: Erniedrigte pH-Werte der Extrazellulärlösung führen zu veränderten Ionenströmen in akut isolierten histaminergen Neuronen der Maus. Akut isolierte Neurone der Maus wurden mit Hilfe eines Applikationssystems in der *Whole-Cell*-Konfiguration der *Patch-Clamp*-Ableitung für jeweils zwei Sekunden einer Testlösung (*recording solution*) mit einem erniedrigtem pH-Wert ausgesetzt. Die Abbildungen A und B zeigen die Ionenströme von zwei repräsentativen histaminergen Neuronen der Maus bei unterschiedlichen pH-Werten (7.0 - 4.0) der Testlösung (*recording solution*).

3.2.3 Expression pH-sensitiver Kanäle

3.2.3.1 ASICs

Die Expression von ASICs in histaminergen Neuronen der Maus untersuchten wir ebenfalls mittels der PCR. Als Probe diente das Zytoplasma der Neurone, welches nach der elektrophysiologischen Registrierung des Neurons in die verwendete Elektrode gesaugt wurde. Die Identifizierung der TMN-Neurone erfolgte durch den Nachweis der HDC ($n = 44$).

Abbildung 32 zeigt beispielhaft die Expression der HDC von zwei Einzelzellen der Maus. Die Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes beträgt 193 B.p.. Für die weitere Analyse wurden lediglich HDC-positive Zellen verwendet.

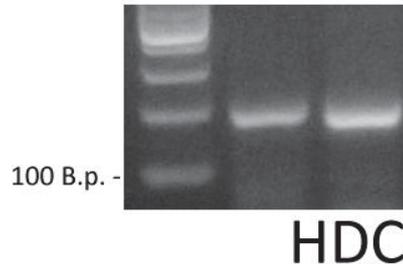


Abb. 32: Die Expression der Histidindecaboxylase (HDC) von zwei histaminergen Einzelzellen Die Produktlänge beträgt 193 Basenpaare (B.p.). Als Marker (M) wurde die Einteilung in 100 B.p.-Schritten mit der stärksten Bande bei 500 B.p. gewählt.

Zur Untersuchung der Expression des ASIC Kanals in histaminergen Neuronen der Maus wurden sowohl PCR-Proben der gesamten TMN-Region, wie auch HDC-positive histaminerge Einzelzellen untersucht. Die Produktlänge der jeweils amplifizierten DNA-Fragmente der ASIC Kanaluntereinheiten beträgt: ASIC 1: 276 B.p., ASIC 2: 321 B.p., ASIC 3: 155 B.p., ASIC 4: 263 B.p.. Die Analyse der Einzelzell PCR zeigte, dass 13.3 % der untersuchten histaminergen Zellen ASIC 1, 13.3 % ASIC 2, 20 % ASIC 3 und 33.3 % ASIC 4 exprimierten (n = 15, Abb. 33). Es konnte kein Zusammenhang der Expression einzelner ASIC Kanaluntereinheiten gezeigt werden.

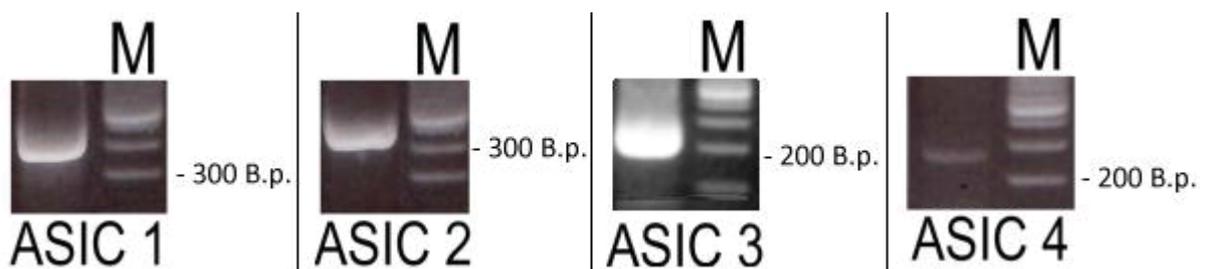


Abb. 33: Gelelektrophorese von vier histaminergen Einzelzellen, die die verschiedenen acid-sensing ion channels (ASIC) Kanaluntereinheiten exprimieren. Die Produktlängen der ASIC Kanaluntereinheiten betragen: ASIC 1: 276 Basenpaare (B.p.), ASIC 2: 321 B.p., ASIC 3: 155 B.p., ASIC 4: 263 B.p.. Als Marker (M) wurde die Einteilung in 100 B.p.-Schritten mit der stärksten Bande bei 500 B.p. gewählt.

Die Darstellungen zeigen, dass auch histaminerge Neurone der Maus alle vier ASIC Kanaluntereinheiten, jedoch je nach Zelle in unterschiedlicher Zusammensetzung, exprimieren.

3.2.3.2 TRPV 1

Die Expression von TRPV 1 in histaminergen Neuronen der Maus wurde an 22 Einzelzellen mittels Einzelzell-PCR untersucht (Abb. 34). Zwei histaminerge Neurone zeigten positive Banden in der PCR für den TRPV 1 Kanal (9.09 %, n = 22). Die Produktlänge beträgt 220 B.p..

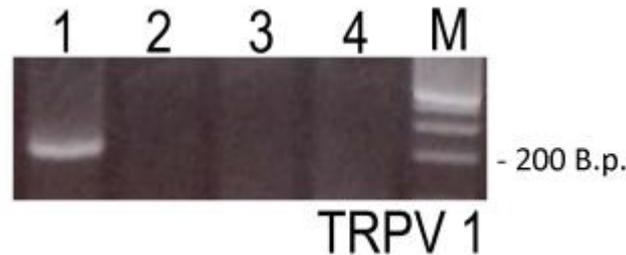


Abb. 34: Histaminerge Neurone der Maus exprimieren den *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV 1) Kanal. Abgebildet ist repräsentativ die Gelelektrophorese des TRPV 1 Kanals in vier histaminergen Einzelzellen der Maus (Histidindecaboxylase-positiv). Eine von vier Einzelzellen zeigt die Expression des TRPV 1 Kanals. Die Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes beträgt 220 Basenpaare (B.p.). Als Marker (M) wurde die Einteilung in 100 B.p.-Schritten mit der stärksten Bande bei 500 B.p. gewählt.

TRPV 1 Splicevariante

Wir untersuchten die Expression der Splicevariante des TRPV 1 Kanals der Maus (TRPV 1 β) mittels PCR mit Proben der TMN-Region. Die Gelelektrophorese zeigte, dass die TRPV 1 Splicevariante in der TMN-Region nicht exprimiert wird. Als Positivkontrolle wurden Proben des Nucleus arcuatus untersucht. Die gelelektrophoretische Auftrennung zeigte hier die Expression der TRPV 1 Splicevariante (Abb. 35). Die Produktlänge des in der PCR amplifizierten DNA-Fragmentes beträgt 211 B.p..

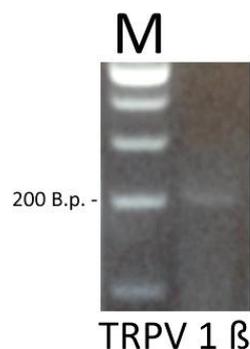


Abb. 35: Die Splicevariante des *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV 1) Kanals TRPV 1 β wird im Nucleus arcuatus der Maus exprimiert. Die Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes beträgt 211 Basenpaare (B.p.). Als Marker (M) wurde die Einteilung in 100 B.p.-Schritten mit der stärksten Bande bei 500 B.p. gewählt.

3.2.3.3 OGR 1

Die Expression des OGR 1 Rezeptors wurde mittels Einzelzell-PCR von acht histaminergen Neuronen der Maus untersucht. Eine von acht HDC-positiven Zellen zeigte in der gelelektrophoretischen Auftrennung eine positive Bande (12.5 %, n = 8, Abb. 36). Die Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes des OGR 1 Rezeptors der TMN-Region der Maus beträgt 222 B.p..

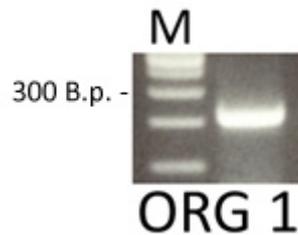


Abb. 36: Der ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 (OGR 1) Rezeptor wird in der Region des tuberomamillären Nucleus der Maus exprimiert. Die Abbildung zeigt die Gelelektrophorese des OGR 1 Rezeptors. Die Produktlänge beträgt 222 Basenpaare (B.p.). Als Marker (M) wurde die Einteilung in 100 B.p.-Schritten mit der stärksten Bande bei 500 B.p. gewählt.

Die beschriebenen Ergebnisse wurden teilweise in ‚Acid-sensing hypothalamic neurons controlling arousal‘ (Kernder et al., 2014) und in ‚Proton- and ammonium-sensing by histaminergic neurons controlling wakefulness‘ (Yanosky et al., 2012) veröffentlicht.

4 Diskussion und Schlussfolgerungen

4.1 Die pH-Sensitivität histaminerger Neurone

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass histaminerge Neurone des posterioren Hypothalamus der Ratte durch einen erniedrigten extrazellulären pH-Wert, ähnlich wie die chemosensitiven Neurone des Gehirnstammes (Jarolimek et al., 1990), erregt werden.

Die Arbeit zeigt zudem die Expression extrazellulärer pH-Sensoren (ASICs, TRPV 1, ORG 1, Na⁺/K⁺-ATPase) in histaminerger Neuronen.

In einem ersten Untersuchungsschritt registrierten wir Aktionspotentialfrequenzen histaminerger Neurone in Gehirnschnitten der Ratte bei unterschiedlichen extrazellulären pH-Werten in der *Cell-Attached*-Konfiguration (n = 23). Die Ableitungen führten wir an histaminerger Neuronen, die an der Gehirnoberfläche und somit auch mit Kontakt zum Liquor cerebrospinalis gelegenen Subregion TMNv des Nucleus tuberomammillaris durch. Diese Subgruppe TMNv wies in den Versuchen von Johnson et al. nach der Exposition einer erhöhten CO₂-Konzentration eine verstärkte Expression von C-Fos auf (2005). Die Heterogenität histaminerger Neurone des Nucleus tuberomammillaris konnte bereits mehrfach aufgezeigt werden (Miklos und Kovacs, 2003, Sergeeva et al., 2002, zit. nach Blandida et al. 2012).

In unseren Untersuchungen zeigten diese histaminerger Neurone im Gehirnschnitt der Ratte (TMNv) bei einem pH-Wert von 7.0 eine Erhöhung der Feuerungsrate auf $166 \pm 15 \%$ (n = 23) der Kontrolle (pH-Wert: 7.4).

Diese registrierte Aktivitätsveränderung gleicht der pH-Antwort bekannter chemosensitiver Neurone des Gehirnstammes sowie orexinergischer Neurone des posterioren Hypothalamus (Williams et al., 2007, Jarolimek et al., 1990). Die durch einen erniedrigten pH-Wert ausgelöste Aktivitätssteigerung ist eine Eigenschaft chemosensorischer Neurone, da die meisten Neurone des Gehirns auf eine Ansäuerung des extrazellulären Milieus mit einer Hyperpolarisation reagieren (Chesler, 2003). Die gemessene Aktivitätssteigerung deutet daher auf eine Funktion histaminerger Neurone im Rahmen der zentralen pH-Sensitivität hin.

Da wir in diesem ersten Versuchsschritt histaminerge Neurone der Ratte in Gehirnschnitten untersuchten, ergeben sich zwei Hypothesen zur Erklärung der Aktivitätssteigerung histaminerger Neurone bei einem pH-Wert von 7.0.

1. Histaminerge Neurone sind Chemosensoren und können über pH-Sensoren den erniedrigten extrazellulären pH-Wert registrieren.

Diese Hypothese wird durch die in der Literatur beschriebene Sensorik histaminerger Neurone von multiplen anderen extrazellulären Reizen, wie der Temperatur oder der Konzentration von ATP und seinen Metaboliten, unterstützt (Hong et al., 2006, Sergeeva et al., 2006). Die zahlreichen Efferenzen des Nucleus tuberomammillaris in Regulationszentren des Gehirns wie dem Nucleus tractus solitarius, der ein zentraler Regulator der reflektorischen Atmung des Hirnstammes ist, würden den histaminergen Neuronen als mögliche Chemosensoren außerdem weitreichende Funktionen zuschreiben (Airaksinen und Panula, 1988, Airaksinen et al., 1989, Inagaki et al., 1990, Cumming et al., 1994).

2. Histaminerge Neurone werden durch exzitatorische Afferenzen aus anderen pH-sensitiven Gehirnregionen bei einem erniedrigten extrazellulären pH-Wert erregt.

Diese Hypothese wird durch die in der Literatur beschriebenen exzitatorischen Afferenzen histaminerger Neuronen aus anderen Gehirnregionen, die die Aufmerksamkeit und Wachheit des Organismus steuern und kontrollieren (Ericson et al., 1991, Wouterlood und Gaykema, 1988, Wouterlood et al., 1987, Wouterlood und Tuinhof, 1992), unterstützt. Ein Beispiel sind die orexinergen Neuronen des posterioren Hypothalamus, deren pH-Sensitivität bereits nachgewiesen wurde (Williams et al., 2007, Torrealba et al., 2003). Neben den pH-sensitiven Neuronen könnte auch die durch H^+ bzw. CO_2 ausgelöste Freisetzung von ATP aus Gliazellen für die Erregung histaminerger Neurone verantwortlich sein (Gourine et al., 2010).

Um diese zwei Hypothesen zu untersuchen, führten wir zwei verschiedene Versuche durch. Zum einen analysierten wir die durch extrazelluläre Protonen ausgelösten Ionenströme an aus dem Zellverband isolierten histaminergen Neuronen. Zum anderen überprüften wir, ob histaminerge Neurone bekannte zentrale pH-Sensoren exprimieren.

4.2 Patch-Clamp-Ableitungen an isolierten histaminergen Neuronen

Mittels *Patch-Clamp*-Ableitungen akut isolierter histaminerger Neurone registrierten wir die durch einen erniedrigten extrazellulären pH-Wert ausgelösten Ionenströme bei pH-Werten zwischen 7.0 und 4.0 ($n = 17$). Keine der untersuchten Neurone zeigte messbare Ströme bei einem pH-Wert von 7.0.

Die Tatsache, dass histaminerge Neurone im Zellverband auf einen pH-Wert von 7.0 mit einer erhöhten Aktionspotentialfrequenz antworteten, in aus dem Zellverband isolierten histaminergen Neuronen jedoch bei diesem pH-Wert keine Ionenströme gemessen werden konnten, könnte die Hypothese stärken, dass die pH-Sensitivität histaminergener Neurone durch exzitatorische Affenzen aus anderen Gehirnregionen bzw. durch die Freisetzung lokaler Mediatoren (wie ATP aus Gliazellen) bedingt ist (Hypothese 2).

Beachtet werden muss dabei allerdings, dass sich die Struktur der Neurone durch die Isolation aus dem Zellverband stark verändert. So besitzen diese Zellen weniger Dendriten und Axone, an denen wichtige pH-Sensoren wie ASICs lokalisiert sein könnten (Yanovsky et al., 2012).

4.3 Expression extrazellulärer pH-Sensoren

Damit der Organismus adäquat auf einen veränderten pH-Wert reagieren kann, benötigt er pH-sensitive Kanäle und Rezeptoren die den veränderten extrazellulären pH-Wert detektieren und den Körper über den gemessenen pH-Wert informieren. Tresguerres beschreibt mit seinen Mitarbeitern extrazellulären pH-Sensoren des Gehirns (2010), deren Expression in der vorliegenden Arbeit in histaminergen Neuronen des Nucleus tuberomammillaris untersucht wird. Zu den beschriebenen extrazellulären pH-Sensoren zählen einerseits die pH-sensitiven Ionenkanälen ASICs und die Gruppe der TRP Kanäle. Auf der anderen Seite gibt es G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die durch einen Anstieg der extrazellulären Protonenkonzentration aktiviert werden. Die Expression des OGR 1 konnte bereits im Gehirn gezeigt werden (Xu und Casey, 1996). Neben diesen pH-Sensoren gibt es Transporter und Pumpen, deren Funktion durch einen veränderten extrazellulären pH-Wert eingeschränkt wird. So zeigten Fuller et al. eine Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase durch einen durch Protonen aktivierten Faktor in Subtypen der Na^+/K^+ -ATPase, die im Gehirn und in Kardiomyozyten exprimiert werden (2003). Eine solche Hemmung durch Protonen führt zu einer Depolarisation der Membran und somit zu einer erhöhten Erregbarkeit von Neuronen und Kardiomyozyten.

Ob die histaminergen Neurone des Nucleus tuberomammillaris solche extrazellulären pH-Sensoren exprimieren, ist wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit.

4.3.1 ASICs

Mittels der Einzelzell-PCR von 46 histaminergen Neuronen der Ratte konnten wir die Expression der ASIC Kanaluntereinheiten 1a, 2a, 2b, 3 und 4 in den Neuronen des Nucleus tuberomamillaris des posterioren Hypothalamus nachweisen, deren Expression im zentralen Nervensystem bereits beschrieben wurde (Craig et al., 1998, Askwith et al., 2004, Meng et al., 2009, Grunder et al., 2000). Im Hypothalamus wurden bisher jedoch lediglich die ASIC Kanaluntereinheiten 1a, 1b, 2a, 2a und 3 nachgewiesen (Meng et al., 2009, Chen et al., 2009). Interessanterweise zeigte die Untersuchung der Koexpression der ASIC Kanaluntereinheiten in den histaminergen Einzelzellen (n=46) ganz unterschiedliche Zusammensetzungen der ASIC Kanaluntereinheiten ASIC 1 – 4 in den einzelnen Zellen. Diese Heterogenität ermöglicht es einen sehr breiten pH-Bereich zu detektieren und den sauren Schaden im Gewebe genauer einzugrenzen (Benson et al., 2002). Die Heterogenität histaminergener Neurone des Nucleus tuberomamillaris konnte bereits mehrfach aufgezeigt werden (Miklos und Kovacs, 2003, Sergeeva et al., 2002, zit. nach Blandina et al., 2012).

- Die höchste Expressionsrate in histaminergen Neuronen der Ratte zeigte die ASIC 1 Kanaluntereinheit, die im Vergleich zu den anderen ASIC Kanaluntereinheiten eine vorrangige Bedeutung im zentralen Nervensystem einnimmt (Wemmie et al., 2002).

71.1 % der untersuchten 46 HDC-positiven Neurone zeigten bei uns in der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR eine positive Bande des ASIC 1 Kanals. Die Restriktionsanalyse zeigte die Expression der ASIC 1a, jedoch nicht der ASIC 1b Kanaluntereinheit, die wir dagegen in Neuronen des Nucleus Edinger-Westphal nachweisen konnten. Interessanterweise zeigt die ASIC 1a Kanaluntereinheit eine Sensitivität für extrazelluläre Protonenkonzentrationen, die im Bereich von physiologischen Schwankungen liegen und ist als einzige Kanaluntereinheit für Calciumionen permeabel (zit. nach Lingueglia, 2007).

Um die genaue Lokalisation der ASIC 1a Kanaluntereinheit in histaminergen Zellen zu untersuchen, fertigten wir immunhistochemische Färbungen an. Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern des Meerschweinchens gegen die HDC und Antikörpern des Kaninchens gegen die ASIC 1a Kanaluntereinheit zeigte eine gemeinsame Lokalisation der zwei Färbungen innerhalb des Zellkörpers in 76.5 % der Zellen (n = 149). Dieser Anteil an mit dem ASIC 1a Antikörper gefärbten histaminergen

Neuronen stimmt mit unseren Ergebnissen der PCR überein, wo gezeigt werden konnte, dass 71.1 % der HDC-positiven Neurone den ASIC 1 Kanal exprimieren.

Die genaue Lokalisation des Proteins innerhalb der Neurone ist allerdings noch unklar. Die alleinige Lokalisation der ASIC 1a Kanaluntereinheit in der Zellmembran scheint jedoch ausgeschlossen. Auf den immunhistochemischen Bildern entspricht die Verteilung des Proteins eher dem darunter liegenden Retikulum.

Schon Chai et al. zeigten 2010 die prädominante Lokalisation der ASIC 1a Kanaluntereinheit am intrazellulären endoplasmatischen Retikulum sowie der äußeren Kernmembran, die jedoch der nachgewiesenen Funktion der ASIC 1a Kanaluntereinheit als extrazellulärer pH-Sensor nicht widersprechen muss. Vielmehr kann das Neuron so auf äußere Reize schnell reagieren und den intrazellulären Speicher an ASIC 1a in die Zellmembran einbauen, ein Mechanismus der von Chai et al. als ‚*surface trafficking*‘ beschrieben wurde (Chai et al., 2010).

Unsere immunhistochemischen Färbungen zeigten keine spezifischen Abstufung in der Färbung der ASIC 1a Kanaluntereinheit in den Subregionen des Nucleus tuberomammillaris und auch die vergleichende semiquantitative PCR der Expression der ASIC 1 Kanaluntereinheit in den Subregionen TMNv und TMNm zeigte keinen signifikanten Expressions-unterschied ($p > 0.05$, Mann-Whitney, n.s.).

- 53.3 % der untersuchten 46 HDC-positiven Neurone zeigten in der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR eine positive Bande für den ASIC 2 Kanal, dessen Expression im Hypothalamus bekannt ist (Chen et al., 2009). Mittels der Restriktionsanalyse konnten wir die Expression der zwei Splicevarianten ASIC 2a und ASIC 2b in den histaminergen Neuronen nachweisen. Die ASIC 2a Kanaluntereinheit wird erst durch sehr niedrige extrazelluläre pH-Werte, wie sie bei einer zerebralen Ischämie auftreten, aktiviert (zit. nach Lingueglia, 2007). Gerade vor diesem Hintergrund erscheint es interessant, dass gezeigt werden konnte, dass diese Kanaluntereinheit während einer zerebralen Ischämie, bei der die pH-Werte im Gehirn auf bis 5.0 absinken können (Nemoto und Frinak, 1981, Johnson et al., 2001), hochreguliert wird. Auch bei unseren histaminergen Neuronen wäre es denkbar, dass die Detektion des erniedrigten extrazellulären pH-Wertes während der zerebralen Ischämie durch die hochregulierten pH-Sensoren (ASIC 2a) zu einer erhöhten Feuerungsrate in histaminergen Neuronen führt, und somit die Konzentration der Mediatorsubstanz Histamin im Gehirn erhöht. Die erhöhte Histaminkonzentration im Rahmen des ischämischen Schlaganfalls wurde bereits beschrieben. Dem

Neurotransmitter kommt in diesem Zusammenhang eine neuroprotektive Funktion bei (Adachi et al., 1991, Adachi et al., 2005, Fujitani et al., 1996). Der genaue Entstehungsmechanismus dieser erhöhten Histaminkonzentration ist noch nicht bekannt. Die Detektion des erniedrigten extrazellulären pH-Wertes in histaminergen Neuronen durch u.a. ASIC 2a und einer so ausgelösten Aktivitätssteigerung histaminergener Neurone wäre somit ein interessanter Erklärungsansatz.

- 62.5 % der untersuchten 46 HDC-positiven Neurone zeigten in der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR eine positive Bande für den ASIC 3 Kanals, dessen Expression im Hypothalamus sowie in Neuronen des Nucleus tuberomamillaris bekannt ist (Chen et al., 2009, Meng et al., 2009). Die ASIC 3 Kanaluntereinheit ist sowohl im zentralen, wie auch im peripheren Nervensystem weit verbreitet und wird durch extrazelluläre Protonenkonzentrationen, die im Bereich von physiologischen Schwankungen liegen, aktiviert (Waldmann et al., 1997a). Unsere vergleichenden Untersuchungen der Expression der ASIC 3 Kanaluntereinheit in den Subregionen des Nucleus tuberomamillaris (TMNv und TMNm) mittels semiquantitativer PCR zeigte eine signifikant erhöhte Expression in Neuronen der ventrolateralen Subgruppe (TMNv), ($p < 0.05$, Mann-Whitney). Diese signifikanten Expressionsunterschiede könnten für die von Johnson et al. beobachtete alleinige Aktivierung dieser Subgruppe durch einen erhöhten CO₂-Spiegel verantwortlich sein (Johnson et al., 2005) und somit als ein Regulationsmechanismus des Organismus gegen die drohenden Azidose angesehen werden. Die Aussage der semiquantitativen PCR wird jedoch dadurch eingeschränkt, dass die zwei Subregionen des Nucleus tuberomamillaris (TMNv und TMNm) eine unterschiedliche Anzahl histaminergener Neurone beinhalten.
- Die Expression der Kanaluntereinheit ASIC 4 wurde vollständigshalber untersucht. Über die Funktion dieser Kanaluntereinheit ist sehr wenig bekannt (zit. nach Lingueglia, 2007). Eine sehr starke Expression des Kanals wurde in der Hypophyse gefunden. Die ASIC 4 Kanaluntereinheit scheint entweder nicht, wie die anderen ASIC Kanaluntereinheiten, durch extrazelluläre Protonen erregt zu werden oder sie bildet keine homooligomeren Kanäle (Grunder et al., 2000).
44.4 % der untersuchten histaminergener Neurone der Ratte exprimierten die ASIC 4 Kanaluntereinheit (n = 46).

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die histaminergen Neurone der Ratte in einem großen Ausmaß die extrazellulären pH-Sensoren ASICs exprimieren. Durch die aufgezeigten großen Unterschiede in der Koexpression der ASIC Kanaluntereinheiten in den histaminergen Einzelzellen (n = 46) kann ein sehr breiter pH-Bereich detektiert (Benson et al., 2002).

Somit könnten ASICs, die durch extrazelluläre pH-Werte im Bereich der physiologischen Schwankungsbreite aktiviert werden (wie ASIC 1a, ASIC 3), essentiell für die Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Wertes des Organismus sein. Dies gilt besonders für die zentrale Steuerung durch histaminerge Neurone von Atmung und Aufmerksamkeit als Antwort auf einen veränderten pH-Wert (Chesler, 2003, Takahashi et al., 2006, Schneider et al., 2014).

Auf der anderen Seite könnten ASICs, die durch weit höhere Konzentrationen an extrazellulären Protonen aktiviert werden (wie ASIC 2a), für die mögliche Aktivierung histaminergener Neurone bei einer zerebralen Ischämie verantwortlich sein (Nemoto und Frinak, 1981, Johnson et al., 2001, Adachi et al., 1991). Die Reduktion der Stromamplitude bei einem pH-Wert von 6.0 durch den ASIC Kanalblocker Benzamilhydrochlorid unterstützt die Überlegung, dass ASICs an der Detektion eines erniedrigten zerebralen pH-Wertes im Rahmen einer Ischämie beteiligt sind (Yanovsky et al., 2012). Gleichzeitig führte die intrazerebroventrikuläre Injektion von ASIC Kanalblockern zu einer Reduktion des Infarktvolu-men um bis zu 60 % in Nagetieren (Xiong et al., 2004, Pignataro et al., 2007).

4.3.2 TRPV 1

Mittels der Einzelzell-PCR von 32 histaminergen Neuronen der Ratte konnten wir die Expression des pH-sensitiven TRPV 1 Kanals im Nucleus tuberomamillaris des posterioren Hypothalamus nachweisen, dessen Expression im zentralen Nervensystem und hier insbesondere im Hypothalamus bereits beschrieben wurde (Cavanaugh et al., 2011).

Insgesamt konnten wir die Expression des Kanals in 18.8 % der untersuchten histaminergen Neurone der Ratte zeigen (n = 32).

Da in der Literatur jedoch bereits von der schwierigen Detektion des TRPV 1 Kanals berichtet wurde (Menigoz und Boudes, 2011), wäre die weitere Untersuchung der Expression des TRPV 1 Kanals mit anderen Untersuchungstechniken wie dem Westernblot oder der Doppelimmunhistofärbung sinnvoll. Die tatsächliche Expression des Ionenkanals kann folglich deutlich über der durch die PCR registrierten Expressionsrate liegen.

Die Aktivierung des TRPV 1 Kanals erfolgt im Gegensatz zu der von einigen ASIC Kanaluntereinheiten erst, wenn der extrazelluläre pH-Wert unter 6.0 abfällt (pH₅₀: 5.4), was

dem Kanal eine Bedeutung im Rahmen der pH-Wert Detektion während der zerebralen Ischämie zusprechen könnte (Tominaga et al., 1998). Gerade vor diesem Gesichtspunkt scheint es interessant, dass beschrieben wurde, dass die Aktivierung des Kanals im Rahmen des ischämischen Schlaganfalls neuroprotektiv wirkt (Muzzi et al., 2012, Khatibi et al., 2011). Da Yevgenij Yanovsky bereits bei einem extrazellulären pH-Wert von 7.0 eine Blockierung der erhöhten Aktivität histaminerger Neurone durch den TRPV 1 Antagonisten Capsazepin (10 μ M) beobachten konnte (2012), wäre es denkbar, dass der Ionenkanal bereits durch andere Stimuli, wie Endocannabinoide sensitiviert wurde. Andererseits blockiert Capsazepin auch die Isoformen 1, 2 und 4 der HCN Ionenkanäle (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel*), wodurch es auch zu einer erniedrigten Feuerungsrate histaminerger Neurone kommen kann (Zuo et al., 2013, Gill et al., 2004).

Wir untersuchten zudem die Expression bekannter Splicevarianten des TRPV 1 Kanals in histaminergen Neuronen der Ratte mittels Einzelzell-PCR.

Die Expression der Splicevariante TRPV 1B, der im Vergleich zum TRPV 1 Kanal das Exon 7 fehlt, zeigte sich in 28.57 % der histaminergen Neurone (n = 7). Diese Splicevariante konnte bereits in Spinalganglienzellen, in Neuronen des Cerebellums sowie im fetalen Gehirn nachgewiesen werden und scheint die Sensitivität des TRPV 1 Kanals auf Protonen, Capsaicin und Hitze zu inhibieren (Vos et al., 2006).

Die Expression der Splicevariante VR.5'sv des TRPV 1 Kanals zeigte sich in einer von neun untersuchten histaminergen Neuronen (11.11 %, n = 9). VR.5'sv konnte bereits in Spinalganglienzellen, in peripheren Blutzellen sowie im Gehirn nachgewiesen werden (Schumacher et al., 2000). Auch hier führt die Koexpression von TRPV 1 mit der Splicevariante VR.5'sv zu einer Inhibierung der Aktivität des TRPV 1 Kanals (Eilers et al., 2007).

4.3.3 OGR 1

Wir untersuchten die Expression des pH-sensitiven OGR 1 Rezeptors (GRP 68) in histaminergen Neuronen der Ratte mittels Einzelzell-PCR. 7.96 % der untersuchten histaminergen Neurone zeigten die Expression des pH-sensitiven Rezeptors (n = 13).

Die Aktivierung dieses G-Protein-gekoppelten Rezeptors führt über Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) zu einer vermehrten Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum und könnte somit zu der Erregung histaminerger Neurone beitragen. Da die Bildung von IP₃ über die Aktivierung des OGR 1 Rezeptors bei pH-Werten, die im Rahmen der physiologischen Schwankungsbreite liegen am größten ist (Ludwig et al., 2003), könnte der Rezeptor an der Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Wertes des Organismus beteiligt sein.

4.3.4 Na⁺/K⁺-ATPase

Mittels Einzelzell-PCR untersuchten wir die bis dahin noch nicht im Detail bekannte Expression der Na⁺/K⁺-ATPase Untereinheiten in histaminergen Neuronen (n = 5). Es zeigte sich eine Expression der Untereinheiten α 1, α 3, β 1, β 2 in jeder der untersuchten Neurone der Ratte (n = 5). Interessanterweise werden diese vier Subtypen der Na⁺/K⁺-ATPase, die im Gehirn und in Kardiomyozyten exprimiert werden, durch einen durch Protonen aktivierten Faktor gehemmt (Fuller et al., 2003). Eine solche Hemmung durch Protonen führt zu einer Depolarisation der Membran und somit zu einer erhöhten Erregbarkeit von Neuronen und Kardiomyozyten, die für die beobachtete Erregung histaminergener Neurone durch extrazelluläre Protonen bedeutsam sein könnte.

Yevgenij Yanovsky und Olga Sergeeva zeigten zudem, dass die Aktivitätserhöhung histaminergener Neurone bei einem extrazellulären pH-Wert von 7.0 nicht beobachtet werden konnte, wenn die Na⁺/K⁺-ATPase gleichzeitig durch Ouabain (0.5 μ M) blockiert wurde (Yanovsky et al., 2012).

4.4 Umfassendes Bild der pH-Sensorik histaminergener Neurone

4.4.1 Extrazellulärer pH-Wert 7.0

Wir zeigten, dass histaminerge Neurone in Gehirnschnitten der Ratte durch pH-Wert Erniedrigungen innerhalb des physiologischen Schwankungsbereichs (Chesler, 2003) erregt werden. Des Weiteren wurde im Rahmen der Arbeit ein kleiner Anteil der sehr komplexen pathophysiologischen Vorgänge in histaminergen Neuronen untersucht, die für die beschriebene Erregung histaminergener Neurone verantwortlich sein könnten. Diese Untersuchungen ergeben zusammen mit den Ergebnissen der Forschungsgruppe des Institutes für Neuro- und Sinnesphysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ein umfassendes, wenn auch nicht lückenloses Bild der histaminergen Erregung (Abb. 37), das unter dem Titel „Proton and ammonium-sensing by histaminergic neurons controlling wakefulness“ (Yanovsky et al., 2012), veröffentlicht wurde.

Die beobachtete Erregung histaminergener Neurone scheint zu einem großen Teil durch exzitatorische Afferenzen aus anderen pH-sensitiven Gehirnregionen bestimmt zu sein. Dies wird zum einen durch die fehlende pH-Antwort aus dem Zellverband akut isolierter histaminergener Neurone bei einem pH-Wert von 7.0 deutlich. Zum anderen zeigten Yevgenij

Yanovsky und Olga Sergeeva, dass die gemessene pH-Antwort zu 80 % durch den Antagonisten des metabotropen Glutamatzeptors mGluR I (LY 367385, 20 μ M) geblockt wird (Yanovsky et al., 2012). Die pH-sensitiven orexineren Neurone des posterioren Hypothalamus senden exzitatorische glutamaterge Efferenzen zu den histaminergen Neuronen und könnten so für deren Erregung über die Aktivierung des metabotropen Glutamatzeptors verantwortlich sein (Williams et al., 2007). Andererseits zeigte die Stimulation orexinerer Neurone der Maus lediglich dem glutamatergen AMPA Rezeptor zugeordnete Ionenströme in histaminergen Neuronen (Schone et al., 2012). Auch die Stimulation histaminergener Neurone über andere glutamaterge Afferenzen wäre denkbar, wie z.B. über Efferenzen aus dem lateralen Hypothalamus oder der lateralen präoptischen Area (Yang und Hatton, 1997).

Neben den erregenden glutamatergen Afferenzen könnte auch die durch H^+ bzw. CO_2 ausgelöste Freisetzung von ATP aus Gliazellen die Erregung histaminergener Neurone über die Aktivierung von P2Y1 Rezeptoren bedingen (Gourine et al., 2010, Sergeeva et al., 2006, Mulkey und Wenker, 2011). Es wurde jedoch gezeigt, dass der Antagonist des purinergen Rezeptors (MRS 2179) die beobachtete Erregung histaminergener Neurone nicht beeinflusst (Yanovsky et al., 2012).

Durch die beschriebene Aktivierung des metabotropen Glutamatzeptors durch Glutamat kommt es über den Phospholipase C-Signalweg zu einer Öffnung unselektiver Kationenkanäle (wie den TRP Ionenkanälen), die den intrazellulären Calciumspiegel ansteigen lassen (Kato et al., 2012, El-Hassar et al., 2011, Peretz et al., 1994). Der erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel aktiviert nun den Na^+/Ca^{2+} -Austauscher (NCX), der ein Calciumion gegen drei Natriumionen aus der Zelle schleust und so zu einer weiteren Depolarisation des Neurons führt. Die differenzierte Expression des Na^+/Ca^{2+} -Austauscher in histaminergen Neuronen ist aus früheren Publikationen bekannt (Sergeeva et al., 2003, Sergeeva et al., 2004).

Während die Erregung histaminergener Neurone durch den Antagonisten des metabotropen Glutamatzeptors mGluR I (LY 367385, 20 μ M) nur zu 80 % blockiert wurde, konnte durch Benzamilhydrochlorid (BZM, 20 μ M) hingegen eine komplette Blockierung der Erregung histaminergener Neurone bei einem pH-Wert von 7.0 gezeigt werden (Yanovsky et al., 2012). BZM blockiert neben den ASIC Kanälen auch den Na^+/H^+ - sowie den Na^+/Ca^{2+} - Austauscher (Ugawa et al., 2002, Wang et al., 1997, Lin et al., 1996a).

Da durch den mGluR-Antagonisten (LY 367385) die Erregungskaskade des Neurons über die Aktivierung des Na^+/Ca^{2+} -Austauscher blockiert wird, BZM jedoch neben dem Na^+/Ca^{2+} -Austauscher ebenfalls ASICs blockiert und zu einer kompletten Blockierung der Erregung

histaminerger Neurone führt, scheinen ASICs an der Erregung histaminerger Neurone bei einem extrazellulären pH-Wert von 7.0 beteiligt zu sein. Hier kommen v.a. die ASIC 1a sowie ASIC 3 Kanaluntereinheit in Frage, die bereits durch eine geringe extrazelluläre pH-Wert Erniedrigung aktiviert werden (zit. nach Lingueglia, 2007, Waldmann et al., 1997a). Die detaillierte Expression dieser zwei ASIC Kanaluntereinheiten konnte in der vorliegenden Arbeit in histaminergen Neuronen gezeigt werden.

Neben der Erregung histaminerger Neurone über Glutamat und der Aktivierung von ASICs durch Protonen konnten wir die Expression des OGR 1 Rezeptors in histaminergen Neuronen nachweisen. Die Aktivierung dieses G-Protein-gekoppelten Rezeptors führt über Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) zu einer vermehrten Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum (Ludwig et al., 2003) und könnte somit zu der gemessenen Erregung histaminerger Neurone beitragen.

Zusätzlich zu den beschriebenen Kanälen und Rezeptoren kann die Inhibierung der Na⁺/K⁺-ATPase durch extrazelluläre Protonen zu einer Erregung histaminerger Neurone führen (Fuller et al., 2003). Die Expression der durch Protonen inhibierten Na⁺/K⁺-ATPase Untereinheiten konnten wir in histaminergen Neuronen zeigen. Durch die Hemmung der Na⁺/K⁺-ATPase kommt es zu einer Depolarisation der Membran und somit zu einer erhöhten Erregbarkeit von Neuronen und Kardiomyozyten. Olga Sergeeva und Yevgenij Yanovsky konnten durch die Blockade der Na⁺/K⁺-ATPase mit Ouabain (0.5µM) eine Erhöhung der Feuerungsrate histaminerger Neurone erzeugen, die mit der Erregung durch einen extrazellulären pH-Wert von 7.0 vergleichbar ist (Yanovsky et al., 2012).

Ähnlich wie es für die pH-sensitiven Chemosensoren des Gehirnstammes gezeigt werden konnte (zit. nach Jiang et al., 2005), scheinen viele verschiedene Rezeptoren und Kanäle an der Erregung histaminerger Neurone durch einen erniedrigten extrazellulären pH-Wert beteiligt zu sein (pH: 7.0). Durch die verschiedenen pH-Sensoren, deren heterogene Expression wir in histaminergen Neuronen nachweisen konnten, kann so ein umfassendes Bild über den extrazellulären pH-Wert aufgezeigt werden. Über zahlreiche Efferenzen des Nucleus tuberomamillaris zu Regulationszentren, wie den Nucleus tractus solitarius, einem zentralen Regulator des reflektorischen Atmung, könnten so Informationen über den extrazellulären pH-Wert weitergeleitet werden (Cumming et al., 1994). Insgesamt könnten die Glutamatfreisetzung aus anderen pH-sensitiven Gehirnregionen, die Aktivierung der ASICs und des OGR 1 sowie die Hemmung der Na⁺/K⁺-ATPase an der beschriebenen Erregung histaminerger Neurone bei einem extrazellulären pH-Wert von 7.0 beteiligt zu sein.

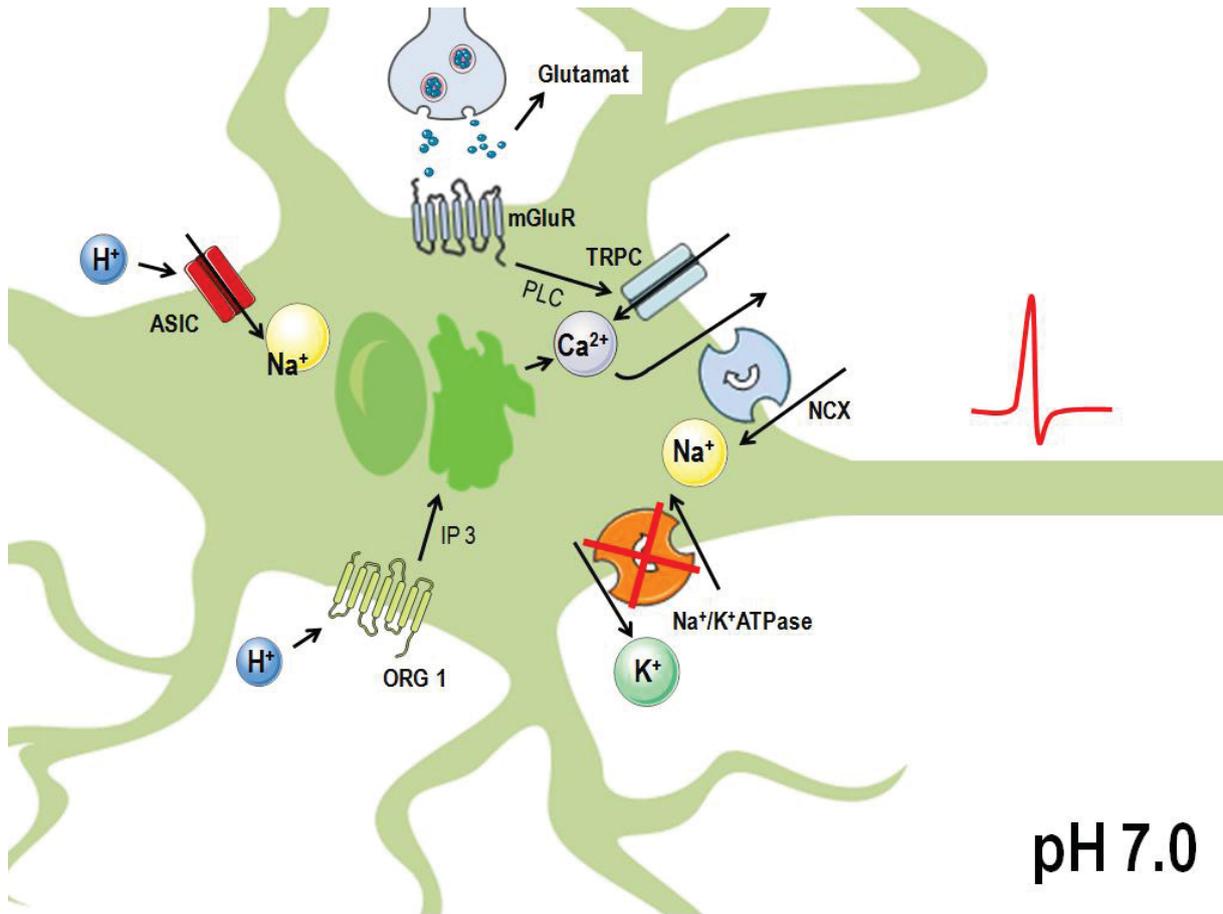


Abb. 37: Schematische Darstellung der möglichen Erregungskaskade histaminerger Neurone bei einem extrazellulären pH-Wert von 7.0 Die Erregung histaminerger Neurone bei einem extrazellulären pH-Wert von 7.0 scheint zu einem großen Teil durch exzitatorische glutamaterge Afferenzen aus anderen pH-sensitiven Gehirnregionen bestimmt zu sein (z.B. aus der lateralen präoptischen Area). Glutamat bindet an den metabotropen Glutamatrezeptor 1 (mGluR 1), wodurch über die Phospholipase C (PLC) unselektive Kationkanäle (*transient receptor potential cation channels*, TRPC) geöffnet werden. Der durch die Öffnung der TRPC Kanäle erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel aktiviert den Na^+/Ca^{2+} -Austauscher (NCX), der ein Calciumion gegen drei Natriumionen aus der Zelle transportiert, was das Neuron weiter depolarisiert. Neben dieser Erregungskaskade können die Aktivierung von *acid-sensing ion channels* (ASICs), sowie des *ovarian cancer G protein-coupled receptor 1* (OGR 1) an der erhöhten Aktionspotentialfrequenz histaminerger Neurone beteiligt sein. Die Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase durch extrazelluläre Protonen könnte ebenfalls zu der Erregung histaminerger Neurone beitragen (Modifiziert nach: Kernder A, De Luca R, Yanovsky Y, Haas HL, Sergeeva OA (2014) Acid-sensing hypothalamic neurons controlling arousal. *Cell Mol Neurobiol* 34(6):777-89, mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlages).

4.4.2 Extrazellulärer pH-Wert zwischen 7.0 und 4.0

Die vorliegende Arbeit stellt zudem die mögliche Bedeutung der pH-Sensorik histaminerger Neurone im Rahmen der zerebralen Ischämie dar (Abb. 38), bei der der zerebrale pH-Wert auf einen Wert von bis zu 5.5 abfallen kann (Siesjo, 1992). Die Erregung der Neurone durch einen erniedrigten extrazellulären pH-Wert könnte zu der in der Literatur beschriebenen vermehrten Freisetzung von Histamin führen, dessen Pathomechanismus noch nicht geklärt ist. Die erhöhte Konzentration an Histamin scheint einen protektiven Einfluss auf das

neuronale Gewebe im Rahmen der zerebralen Ischämie zu haben (Adachi et al., 1991, Adachi et al., 2005, Fujitani et al., 1996).

Patch-Clamp-Ableitungen an akut isolierten Neuronen zeigten bei uns ab einem pH-Wert von < 6.5 der *recording solution* messbare Ionenströme in histaminergen Neuronen.

Die Beteiligung der Aktivierung von ASICs durch extrazelluläre Protonen konnte durch Versuche gezeigt werden, bei denen durch die Zugabe des ASIC Kanalblockers Benzamilhydrochlorid (BZM, 20 μM), die durch extrazelluläre Protonen ausgelösten Ionenströme auf 30 ± 6 % der Kontrolle reduziert wurden (Yanovsky et al., 2012).

An der beschriebenen Erregung könnte v.a. die ASIC 2a Kanaluntereinheit, die durch hohe extrazelluläre Konzentrationen an Protonen, wie sie im Rahmen der zerebralen Ischämie vorkommen, beteiligt sein. Die Expression der ASIC 2a Kanaluntereinheit konnten wir in histaminergen Neuronen nachweisen.

Neben den ASICs könnte auch der pH-sensitive TRPV 1 Kanal an der beschriebenen Erregung eine Rolle spielen, dessen Expression wir in histaminergen Neuronen nachweisen konnten. Gerade vor diesem Gesichtspunkt scheint es interessant, dass beschrieben wurde, dass die Aktivierung des Kanals im Rahmen des ischämischen Schlaganfalls durch eine induzierte Hypothermie neuroprotektiv wirkt (Khatibi et al., 2011, Muzzi et al., 2012).

Gegen eine dominierende Rolle des TRPV 1 Kanals bei der Erregung histaminergener Neurone spricht einerseits die beschriebene Blockade der Ionenströme durch den ASIC Kanalblocker (BZM), andererseits die Messung des Umkehrpotentials, der durch Säure ausgelösten Ionenströme, durch Olga Sergeeva, welches dem von Natriumionen entspricht (Yanovsky et al., 2012). Die Aktivierung des TRPV 1 Kanals erzeugt hingegen einen unselektiven Kationen-Einwärtsstrom, der v.a. von Calciumionen ($\text{Ca}^{2+} > \text{Na}^{+}$) getragen wird (Clapham et al., 2003).

Wie auch schon bei der Erregung histaminergener Neurone bei einem pH-Wert von 7.0 beschrieben, könnte die Hemmung der $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase durch Protonen zu der Erregung histaminergener Neurone bei beitragen (Fuller et al., 2003).

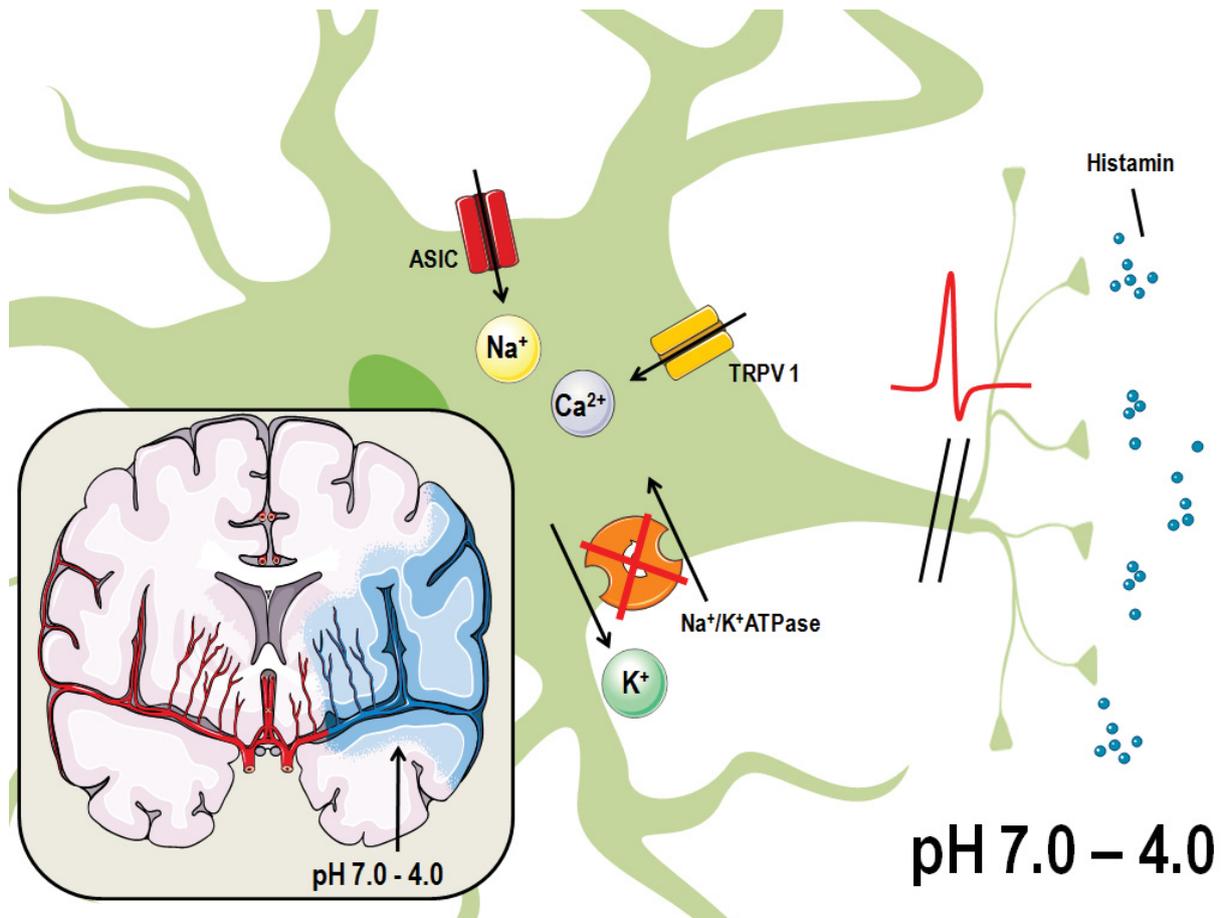


Abb. 38: Schematische Darstellung der möglichen Erregungskaskade histaminerger Neurone bei extrazellulären pH-Werten zwischen 7.0 und 4.0, wie er bei der zerebralen Ischämie im Gehirn auftritt. Durch die erhöhte Protonenkonzentration kommt es zu einem einwärts gerichteten Natriumeinstrom in das histaminerge Neuron. Dieser Natriumeinstrom kann durch die Aktivierung des *acid-sensing ion channels* (ASICs) bedingt sein. Wir konnten zudem die Expression des *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV 1 Kanals) in histaminergen Neuronen nachweisen, der an der Erregung histaminerger Neurone durch extrazelluläre Protonen beteiligt sein kann. Die Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase durch extrazelluläre Protonen könnte ebenfalls zu der Erregung beitragen (Quelle: eigene Darstellung).

4.5 Rattus norvegicus vs. Mus musculus

Vergleichend zu den beschriebenen Ergebnissen der Ratte (*Rattus norvegicus*) untersuchten wir die pH-Sensorik histaminerger Neurone der Maus (*Mus musculus*).

Es zeigte sich ein großer Unterschied in den Ergebnissen der *Patch-Clamp*-Ableitungen histaminerger Neurone im Gehirnschnitt bei einem extrazellulären pH-Wert von 7.0. Die histaminergen Neurone der Maus zeigten keine Erhöhung der Feuerungsrate bei einem extrazellulären pH-Wert von 7.0 (113.98 % der Kontrollfrequenz, $n = 12$), wohingegen die Feuerungsrate histaminerger Neurone der Ratte auf 166 ± 15 % ($n = 23$) der Kontrollfeuerungsrate anstieg.

Die in unseren Versuchen verwendeten Mäuse- und Rattenarten zeigen ein unterschiedliches Schlaf-/ Wachverhalten. Während die Wanderratte (*Rattus norvegicus*) dämmerungs- und nachtaktiv ist (Becker, 1978), wechselt die Hausmaus (*Mus musculus*) bis zu zwanzigmal in 24 Stunden zwischen Ruhe und Tätigkeit, wobei die Nacht als Tätigkeitszeit bevorzugt wird (Dieterlen, 1988). Dieses unterschiedliche Verhalten der zwei Tierarten könnte die Divergenz in der Erregbarkeit histaminergener Neurone durch einen extrazellulären pH-Wert von 7.0 erklären, deren Bedeutung in einer zentralen Beeinflussung des Schlaf-/ Wachverhaltens zur Aufrechterhaltung eines konstanten Körper-pH-Wertes zu liegen scheint.

In der Literatur werden bereits Unterschiede in den das Schlaf-/ Wachverhalten kontrollierenden histaminergen Neuronen der zwei Tierarten beschrieben. So liegen die histaminergen Neurone der Maus nicht so kompakt beieinander, sind kleiner und weisen insgesamt eine geringere Anzahl auf (Parmentier et al., 2002). Außerdem zeigten die Neurone der Ratte nicht jedoch der Maus eine hohe Konzentration des Enzyms Adenosindeaminase, welches die Konzentration an Adenosin, einem wichtigen Mediator der Schlaf-/ Wachregulation des Organismus, in der Zelle kontrolliert (Staines et al., 1987, Thakkar et al., 2003b, Thakkar et al., 2003a).

Zudem konnten große Unterschiede in der Zelldichte und der Projektionen der Neuronengruppen des Hypothalamus der zwei Tierarten gezeigt werden, die das Melaninkonzentrierende Hormon (MHC) produzieren. Dieses Hormon spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Ess-/ und Schlaf-/ Wachverhaltens (Croizier et al., 2010). Insgesamt konnten bereits einige Unterschiede in den das Schlaf-/ Wachverhalten regulierenden Neuronengruppen der zwei Tierarten aufgezeigt werden.

Die *Patch-Clamp*-Ableitungen an aus dem Zellverband isolierten histaminergen Neuronen der Maus zeigten allerdings keine Unterschiede zu den Ergebnissen der Ratte. Somit konnten auch in den Neuronen der Maus Ionenströme erst ab einem pH-Wert von < 6.5 der *recording solution* gemessen werden. Die gemessenen Ionenströme waren bei den unterschiedlichen pH-Werten (pH 7.0 - 4.5) vergleichbar groß.

Die Expression von pH-Sensoren in histaminergen Neuronen der Maus wurde vergleichend zu den Untersuchungen der Ratte mittels der PCR untersucht. Wie auch in den Neuronen der Ratte zeigte sich die Expression der ASICs, des TRPV 1 Kanals sowie des OGR 1 Rezeptors in histaminergen Neuronen der Maus. Während bei der Ratte die Expression des TRPV 1 Ionenkanals in 18.8 % der histaminergen Einzelzellen nachgewiesen werden konnte, zeigten bei der Maus lediglich 9 % der Neurone eine positive Bande in der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR des TRPV 1 Kanals. Die Überprüfung dieser niedrigen Expressionsrate

mit anderen Untersuchungstechniken wie dem Westernblot oder der Doppelimmunhistofärbung, sowie der Entwicklung von weiteren Primern für die PCR scheint sinnvoll, da in der Literatur bereits die schwierige Detektion des TRPV 1 Kanals beschrieben wird (Menigoz und Boudes, 2011).

Die Expression der Splicevariante des TRPV 1 Kanals der Maus (TRPV 1 β) konnten wir in histaminergen Neuronen der Maus nicht nachweisen. Als Positivkontrolle dienten Zellen des Nucleus arcuatus. Koexprimiert mit dem TRPV 1 Kanal in der Zelle soll die Splicevariante den Ionenkanal inhibieren. In der Literatur wird die Expression dieser Splicevariante in Spinalganglienzellen, in der Haut, im Magen und auf der Zunge beschrieben (Wang et al., 2004).

Unsere Untersuchungen der pH-Sensorik histaminergere Neurone der Maus zeigen, dass auch diese auf einen erniedrigten pH-Wert der Extrazellulärlösung reagieren. Diese Erregbarkeit könnte über die Aktivierung der ASICs, des TRPV 1 Kanals sowie des OGR 1 Rezeptors vermittelt werden, deren detaillierte Expression in histaminergen Neuronen der Maus im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde.

4.6 Ausblick

In der Literatur werden neben den in der vorliegenden Arbeit untersuchten pH-Sensoren (ASICs, TRPV 1, OGR 1, Na^+/K^+ -ATPase) zudem auswärts-gerichtete Kaliumkanäle als pH-Sensoren beschrieben, von denen der *rat outer medullary K⁺ channel* (ROMK) sowie der *TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel* (TASK) genauer untersucht wurden (McNicholas et al., 1998, Duprat et al., 1997). Diese pH-sensitiven Kaliumkanäle werden durch extrazelluläre Protonen in ihrer Funktion gehemmt, wodurch es zu einer intrazellulären Akkumulation von Kaliumionen und einer daraus folgenden Depolarisation der Zelle kommt. Die Kaliumkanäle scheinen im gesamten Körper wichtige Aufgaben als pH-Sensoren wahrzunehmen. So konnte ihre Expression sowohl in Organen, wie in den Herzmuskelzellen, als auch in Neuronen des zentralen Nervensystems (Hippocampus, Substantia nigra, Raphekerne) nachgewiesen werden (Brown et al., 1990, Lacey et al., 1988, Williams et al., 1988, Kurachi, 1985).

Es konnte gezeigt werden, dass die beschriebene Erregung histaminergere Neurone bei einem extrazellulären pH-Wert von 7.0 zu 80 % durch den Antagonisten des metabotropen Glutamatrezeptors mGluR I (LY 367385, 20 μM) blockiert wird (Yanovsky et al., 2012). Olga Sergeeva zeigte zudem, dass der durch Protonen ausgelöste Ionenstrom in histaminergen Neuronen bei einem pH-Wert von 6.0 durch Natriumionen bedingt ist (Yanovsky et al.,

2012), was eine vorwiegende Beteiligung pH-sensitiver Kaliumkanäle an der Erregung histaminerger Neurone bei pH-Werten von 7.0 und 6.0 ausschließt. Trotzdem wäre es vollständigshalber sehr interessant, die Expression und Beteiligung der pH-sensitiven Kaliumkanäle an der Erregung histaminerger Neurone durch eine erhöhte extrazelluläre Protonenkonzentration zu untersuchen.

Neben diesen pH-sensitiven Kaliumkanälen wird in der Literatur zudem von einem v.a. in Geschmackszellen exprimierten nicht-selektiven Kationenkanal, dem *polycystic-kidney-disease-like ion channel* (PKD2L1) berichtet, dessen Expression auch um den Zentralkanal gezeigt werden konnte. Neurone, die diesen Ionenkanal exprimierten, reagierten exzitatorisch auf extrazelluläre pH-Werte zwischen 7.4 und 6.5, was den Kanälen eine Funktion im Rahmen der Aufrechterhaltung eines konstanten Körper pH-Wertes zusprechen könnte (Huang et al., 2006). Die Untersuchung der Expression des PKD2L1 Ionenkanals wäre somit für das bessere Verständnis der Erregung histaminerger Neurone bei einem pH-Wert von 7.0 bedeutsam.

Die vorliegende Arbeit baut u.a. auf einer Veröffentlichung von Johnson et al. auf, die gezeigt hat, dass eine erhöhte CO₂-Konzentration zu einer Aktivierung der TMNv-Untergruppe histaminerger Neurone führt (2005). Diese Aktivierung histaminerger Neurone kann entweder direkt durch die erhöhte Konzentration an CO₂ oder indirekt durch die Erniedrigung des pH-Wertes ausgelöst worden sein. Wir untersuchten in dieser Arbeit die direkte Wirkung eines erniedrigten pH-Wertes auf die Aktivität, der in den Arbeiten von Johnson aktivierten Untergruppe histaminerger Neurone. Da diese Neurone in unseren Versuchen durch eine Erniedrigung des extrazellulären pH-Wertes erregt wurden, scheint es nahezuliegen, dass auch die in den Versuchen von Johnson et al. gemessene Aktivierung histaminerger Neuronen nach der Exposition mit einer erhöhten CO₂-Konzentration durch den veränderten pH-Wert bedingt ist. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Neurone zusätzlich über den direkten Effekt der erhöhten CO₂-Konzentration aktiviert wurden. Somit wäre die vergleichende Untersuchung der direkten Wirkung einer erhöhten Konzentration von CO₂ auf die Aktivität histaminerger Neurone im Rahmen eines Folgeprojektes sehr interessant.

Wir analysierten den direkten Effekt eines erniedrigten pH-Wertes auf die Aktivität histaminerger Neurone in Gehirnschnitten sowie an akut aus dem Zellverband isolierten Neuronen und untersuchten mögliche pathophysiologische Mechanismen, die für die veränderte Aktivität der Neurone verantwortlich sein könnten. Solche Untersuchungen sind wichtig für das generelle Verständnis der zentralen pH-Sensorik, lassen es jedoch nur in einem eingeschränkten Maß zu, die Bedeutung der pH-Sensorik histaminerger Neurone zu

verstehen. Somit wären als Folgeprojekte u.a. Verhaltensstudien mit Histamin-defizienten Mäusen (HDC^{-/-}) sinnvoll (Anaclet et al., 2009, Chepkova et al., 2012, Ohtsu et al., 2001). In solchen Projekten könnte man z.B. in einem zerebralen Infarktmodell bzw. einem Modell mit einer erhöhten CO₂-Exposition das Ausmaß der Bedeutung der pH-Sensorik histaminерger Neurone besser verstehen.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

Abraham TS, Chen ML, Ma SX (2011) TRPV1 expression in acupuncture points: response to electroacupuncture stimulation. *J Chem Neuroanat* 41:129-136.

Adachi N, Liu K, Arai T (2005) Prevention of brain infarction by postischemic administration of histidine in rats. *Brain Res* 1039:220-223.

Adachi N, Oishi R, Saeki K (1991) Changes in the metabolism of histamine and monoamines after occlusion of the middle cerebral artery in rats. *J Neurochem* 57:61-66.

Airaksinen MS, Flugge G, Fuchs E, Panula P (1989) Histaminergic system in the tree shrew brain. *J Comp Neurol* 286:289-310.

Airaksinen MS, Panula P (1988) The histaminergic system in the guinea pig central nervous system: an immunocytochemical mapping study using an antiserum against histamine. *J Comp Neurol* 273:163-186.

Albert B, Johnson A, Julian L, Raff M, Roberts K, Walter P (2004) *Molekularbiologie der Zelle*, 4. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Anaclet C, Parmentier R, Ouk K, Guidon G, Buda C, Sastre JP, Akaoka H, Sergeeva OA, Yanagisawa M, Ohtsu H, Franco P, Haas HL, Lin JS (2009) Orexin/hypocretin and histamine: distinct roles in the control of wakefulness demonstrated using knock-out mouse models. *J Neurosci* 29:14423-14438.

Armstrong WE, Sladek CD (1985) Evidence for excitatory actions of histamine on supraoptic neurons in vitro: mediation by an H1-type receptor. *Neuroscience* 16:307-322.

Asan E, Kugler P (2004) Zwischenhirn. In: *Anatomie: makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. 2. Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut. (Drenckhahn D, Hrsg., Benninghoff A, Begr.), 16. völlig neu bearb. Aufl., S. 419-26. München (u.a.): Urban & Fischer.

Askwith CC, Wemmie JA, Price MP, Rokhlina T, Welsh MJ (2004) Acid-sensing ion channel 2 (ASIC2) modulates ASIC1 H⁺-activated currents in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 279:18296-18305.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA, Engel A (2008) *Neurowissenschaften. Ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin und Psychologie*. (Engel A Hrsg.), 3. Aufl., S. 98. Heidelberg: Spektrum, akad. Ver.

Becker B (2010) Molekularbiologische Methoden zum Nachweis lebensmittelübertragbarer Viren. In: *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik: Grundlegende Methoden und Anwendungen* (Busch U, Hrsg.), S. 112-113. Heidelberg (u.a.): Springer.

Becker K (1978) *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) - Wanderratte . In: Handbuch der Säugetiere Europas. (Niethammer J, Hrsg.), S. 413-415. Wiesbaden: Akademische Verlagsgesellschaft.

Bengtsson F, Boris-Moller F, Hansen AJ, Siesjo BK (1990) Extracellular pH in the rat brain during hypoglycemic coma and recovery. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:262-269.

Benson CJ, Xie J, Wemmie JA, Price MP, Henss JM, Welsh MJ, Snyder PM (2002) Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H⁺-gated channels in mouse sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2338-2343.

Bevan S, Geppetti P (1994) Protons: small stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves. *Trends Neurosci* 17:509-512.

Blandina P, Munari L, Provensi G, Passani MB (2012) Histamine neurons in the tuberomammillary nucleus: a whole center or distinct subpopulations? *Front Syst Neurosci* 6:33.

Bradtke K, Luttmann W, Küpper M, Myrtek D (2009) *Der Experimentator: Immunologie*. 3. Aufl., S. 15-19, Heidelberg: Spektrum, akad. Verl.

Brown DA, Gahwiler BH, Griffith WH, Halliwell JV (1990) Membrane currents in hippocampal neurons. *Prog Brain Res* 83:141-160.

Brown TL, LeMay HE, Bursten BE (2011) *Chemie - Die zentrale Wissenschaft*. 10. aktualisierte Aufl., S. 635-637, München (u.a.): Pearson Higher Education.

Buchanan GF, Richerson GB (2010) Central serotonin neurons are required for arousal to CO₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16354-16359.

Burckhardt G (2009) Säuren-Basen-Haushalt. In: *Physiologie* (Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagel S, Hrsg.), 6. Aufl., S. 316-327. Stuttgart: Thieme.

Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25:169-193.

Cao Z, Balasubramanian A, Marrelli SP (2014) Pharmacologically induced hypothermia via TRPV1 channel agonism provides neuroprotection following ischemic stroke when initiated 90 min after reperfusion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 306:R149-R156.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.

Cavanaugh DJ, Chesler AT, Jackson AC, Sigal YM, Yamanaka H, Grant R, O'Donnell D, Nicoll RA, Shah NM, Julius D, Basbaum AI (2011) Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *J Neurosci* 31:5067-5077.

Chai S, Li M, Branigan D, Xiong ZG, Simon RP (2010) Activation of acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a) by surface trafficking. *J Biol Chem* 285:13002-13011.

- Chen CH, Hsu YT, Chen CC, Huang RC (2009) Acid-sensing ion channels in neurones of the rat suprachiasmatic nucleus. *J Physiol* 587:1727-1737.
- Chepkova A, Yanovsky E, Parmentier R, Ohtsu H, Haas HL, Lin JS, Sergeeva OA (2012) Histamine receptor expression, hippocampal plasticity and ammonia in histidine decarboxylase knockout mice. *Cell Mol Neurobiol* 32:17-25.
- Chesler M (2003) Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol Rev* 83:1183-1221.
- Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G (2005) International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 57:427-450.
- Clapham DE, Montell C, Schultz G, Julius D (2003) International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 55:591-596.
- Cole KS, Hodgkin AL (1939) Membrane and protoplasm resistance in the squid giant axon. *J Gen Physiol* 22:671-687.
- Cozine RA, Ngai SH (1967) Medullary surface chemoreceptors and regulation of respiration in the cat. *J Appl Physiol* 22:117-121.
- Craig PJ, McAinsh AD, McCormack AL, Smith W, Beattie RE, Priestley JV, Yip JL, Averill S, Longbottom ER, Volsen SG (1998) Distribution of the voltage-dependent calcium channel $\alpha(1A)$ subunit throughout the mature rat brain and its relationship to neurotransmitter pathways. *J Comp Neurol* 397:251-267.
- Cristino L, de PL, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di M, V (2006) Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139:1405-1415.
- Croizier S, Franchi-Bernard G, Colard C, Poncet F, La RA, Risold PY (2010) A comparative analysis shows morphofunctional differences between the rat and mouse melanin-concentrating hormone systems. *PLoS One* 5:e15471.
- Cumming P, Gjedde A, Vincent S (1994) Histamine H3 binding sites in rat brain: localization in the nucleus of the solitary tract. *Brain Res* 641:198-202.
- DeLuca R, Suvorava T, Yang D, Baumgartel W, Kojda G, Haas HL, Sergeeva OA (2015) Identification of histaminergic neurons through histamine 3 receptor-mediated autoinhibition. *Neuropharmacology*.
- deLecea L., Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:322-327.
- Deval E, Gasull X, Noel J, Salinas M, Baron A, Diochot S, Lingueglia E (2010) Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. *Pharmacol Ther* 128:549-558.

Deutzmann R (2008) Mediatoren. In: Biochemie. (Rassow J, Hauser K, Netzker R, Mitwirkende), 2., aktualisierte Aufl., S. 638-639. Stuttgart: Thieme.

Diener HC, Weimer C (2012) Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. (Kommission "Leitlinien" der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Hrsg.) 5. vollst. überarb. Aufl., S. 1044-1051, Stuttgart (u.a.): Thieme.

Dieterlen F (1988) Echt Mäuse und Langschwanzmäuse. In: Grzimerks Enzyklopädie, Säugetiere (Grzimerk B, Hrsg.), S. 176-182. Frankfurt am Main: Kindler.

Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C, Lazdunski M (1997) TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J* 16:5464-5471.

Economo C (1926) Die Pathologie des Schlafes. In: Handbuch der Normalen und Pathologischen Physiologie. (Bethe A, Bergmann G, Embden G, Ellinger A, Hrsg.), S. 591-610. Berlin: Springer.

Ehmke H (2009) Das Kreislaufsystem. In: Physiologie (Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagel S, Hrsg.), 6. Aufl., S. 204. Stuttgart: Thieme.

Eilers H, Lee SY, Hau CW, Logvinova A, Schumacher MA (2007) The rat vanilloid receptor splice variant VR.5^{sv} blocks TRPV1 activation. *Neuroreport* 18:969-973.

El-Hassar L, Hagenston AM, D'Angelo LB, Yeckel MF (2011) Metabotropic glutamate receptors regulate hippocampal CA1 pyramidal neuron excitability via Ca²⁺(+) wave-dependent activation of SK and TRPC channels. *J Physiol* 589:3211-3229.

Endres M, Prinz V (2012) Zerebrovaskuläre Erkrankungen. In: Harrisons Innere Medizin (Dietel M, Suttrop N, Zeitz M, Hrsg.), 17. veränd. Aufl., dt. Ausgabe, S. 3538-3563. Berlin: ABV Wissenschaftsverlagsgesellschaft.

Ericson H, Blomqvist A, Kohler C (1991) Origin of neuronal inputs to the region of the tuberomammillary nucleus of the rat brain. *J Comp Neurol* 311:45-64.

Ericson H, Watanabe T, Kohler C (1987) Morphological analysis of the tuberomammillary nucleus in the rat brain: delineation of subgroups with antibody against L-histidine decarboxylase as a marker. *J Comp Neurol* 263:1-24.

Eskandari S, Snyder PM, Kreman M, Zampighi GA, Welsh MJ, Wright EM (1999) Number of subunits comprising the epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 274:27281-27286.

Ettaiche M, Deval E, Cougnon M, Lazdunski M, Voilley N (2006) Silencing acid-sensing ion channel 1a alters cone-mediated retinal function. *J Neurosci* 26:5800-5809.

Firsov D, Gautschi I, Merillat AM, Rossier BC, Schild L (1998) The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *EMBO J* 17:344-352.

- Fujitani T, Adachi N, Nagaro T, Miyazaki H, Nakamura Y, Kataoka K, Arai T (1996) Histaminergic H₂ action protects hippocampal CA1 neurons by prolonging the onset of the anoxic depolarization in gerbils. *J Neurochem* 67:2613-2615.
- Fuller W, Parmar V, Eaton P, Bell JR, Shattock MJ (2003) Cardiac ischemia causes inhibition of the Na/K ATPase by a labile cytosolic compound whose production is linked to oxidant stress. *Cardiovasc Res* 57:1044-1051.
- Garbarg M, Barbin G, Bischoff S, Pollard H, Schwartz JC (1976) Dual localization of histamine in an ascending neuronal pathway and in non-neuronal cells evidenced by lesions in the lateral hypothalamic area. *Brain Res* 106:333-348.
- Garbarg M, Barbin G, Feger J, Schwartz JC (1974) Histaminergic pathway in rat brain evidenced by lesions of the medial forebrain bundle. *Science* 186:833-835.
- Gekle M (2009) Funktion des Magen-Darm-Trakts, Energiehaushalt und Ernährung. In: *Physiologie* (Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagel S, Hrsg.), 6. Aufl., S. 416-438. Stuttgart: Thieme.
- Gibson HE, Edwards JG, Page RS, Van Hook MJ, Kauer JA (2008) TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons. *Neuron* 57:746-759.
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6:995-1001.
- Gill CH, Randall A, Bates SA, Hill K, Owen D, Larkman PM, Cairns W, Yusaf SP, Murdock PR, Strijbos PJ, Powell AJ, Benham CD, Davies CH (2004) Characterization of the human HCN1 channel and its inhibition by capsazepine. *Br J Pharmacol* 143:411-421.
- Goldenthal KL, Hedman K, Chen JW, August JT, Willingham MC (1985) Postfixation detergent treatment for immunofluorescence suppresses localization of some integral membrane proteins. *J Histochem Cytochem* 33:813-820.
- Gonzales EB, Kawate T, Gouaux E (2009) Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature* 460:599-604.
- Gourine AV, Kasymov V, Marina N, Tang F, Figueiredo MF, Lane S, Teschemacher AG, Spyer KM, Deisseroth K, Kasparov S (2010) Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* 329:571-575.
- Grace M, Birrell MA, Dubuis E, Maher SA, Belvisi MG (2012) Transient receptor potential channels mediate the tussive response to prostaglandin E₂ and bradykinin. *Thorax* 67:891-900.
- Grunder S, Geissler HS, Bassler EL, Ruppertsberg JP (2000) A new member of acid-sensing ion channels from pituitary gland. *Neuroreport* 11:1607-1611.
- Haas H, Panula P (2003) The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 4:121-130.

- Haas HL, Reiner PB (1988) Membrane properties of histaminergic tuberomammillary neurones of the rat hypothalamus in vitro. *J Physiol* 399:633-646.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Hao X, Chen J, Luo Z, He H, Yu H, Ma L, Ma S, Zhu T, Liu D, Zhu Z (2011) TRPV1 activation prevents high-salt diet-induced nocturnal hypertension in mice. *Pflugers Arch* 461:345-353.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11:1026-1030.
- Hodgkin AL, HUXLEY AF (1952) The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116:473-496.
- Hodgkin AL, KATZ B (1949) The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J Physiol* 108:37-77.
- Hofman MA, Swaab DF (1992) The human hypothalamus: comparative morphometry and photoperiodic influences. *Prog Brain Res* 93:133-147.
- Hong K, Mano I, Driscoll M (2000) In vivo structure-function analyses of *Caenorhabditis elegans* MEC-4, a candidate mechanosensory ion channel subunit. *J Neurosci* 20:2575-2588.
- Hong ST, Bang S, Paik D, Kang J, Hwang S, Jeon K, Chun B, Hyun S, Lee Y, Kim J (2006) Histamine and its receptors modulate temperature-preference behaviors in *Drosophila*. *J Neurosci* 26:7245-7256.
- Hu WW, Chen Z (2012) Role of histamine and its receptors in cerebral ischemia. *ACS Chem Neurosci* 3:238-247.
- Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Trankner D, Ryba NJ, Zuker CS (2006) The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442:934-938.
- Huang C, Hu ZL, Wu WN, Yu DF, Xiong QJ, Song JR, Shu Q, Fu H, Wang F, Chen JG (2010) Existence and distinction of acid-evoked currents in rat astrocytes. *Glia* 58:1415-1424.
- Huang CW, Tzeng JN, Chen YJ, Tsai WF, Chen CC, Sun WH (2007) Nociceptors of dorsal root ganglion express proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Mol Cell Neurosci* 36:195-210.
- Huda R, Pollema-Mays SL, Chang Z, Alheid GF, McCrimmon DR, Martina M (2012) Acid-sensing ion channels contribute to chemosensitivity of breathing-related neurons of the nucleus of the solitary tract. *J Physiol* 590:4761-4775.
- Inagaki N, Toda K, Taniuchi I, Panula P, Yamatodani A, Tohyama M, Watanabe T, Wada H (1990) An analysis of histaminergic efferents of the tuberomammillary

nucleus to the medial preoptic area and inferior colliculus of the rat. *Exp Brain Res* 80:374-380.

Innis MA, Gelfand DH (1990) Optimization of PCRs. In: *PCR Protocols, a guide to methods and applications*. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, Hrsg.), S. 1-11. San Diego (u.a.): Acad. Press.

Issberner U, Reeh PW, Steen KH (1996) Pain due to tissue acidosis: a mechanism for inflammatory and ischemic myalgia? *Neurosci Lett* 208:191-194.

Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J, Jancso N (1970) Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat-sensitive structures by capsaicin in rats. *J Physiol* 208:449-459.

Jarolimek W, Misgeld U, Lux HD (1990) Neurons sensitive to pH in slices of the rat ventral medulla oblongata. *Pflugers Arch* 416:247-253.

Jiang C, Rojas A, Wang R, Wang X (2005) CO₂ central chemosensitivity: why are there so many sensing molecules? *Respir Physiol Neurobiol* 145:115-126.

Johnson MB, Jin K, Minami M, Chen D, Simon RP (2001) Global ischemia induces expression of acid-sensing ion channel 2a in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:734-740.

Johnson PL, Moratalla R, Lightman SL, Lowry CA (2005) Are tuberomammillary histaminergic neurons involved in CO₂-mediated arousal? *Exp Neurol* 193:228-233.

Jordt SE, Tominaga M, Julius D (2000) Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8134-8139.

Jung J, Hwang SW, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Kim WB, Kim D, Oh U (1999) Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel. *J Neurosci* 19:529-538.

Kandel E (2000) Ion Channels. In: *Principles of neural science.*, (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Hrsg.), 4. Auflage, S. 105-111. New York (u.a.): McGraw-Hill.

Kaslin J, Panula P (2001) Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* 440:342-377.

Kato AS, Knierman MD, Siuda ER, Isaac JT, Nisenbaum ES, Bredt DS (2012) Glutamate receptor delta2 associates with metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1), protein kinase Cγ, and canonical transient receptor potential 3 and regulates mGluR1-mediated synaptic transmission in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 32:15296-15308.

Kedei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ, Blumberg PM (2001) Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* 276:28613-28619.

Kernder A, De Luca R, Yanovsky Y, Haas HL, Sergeeva OA (2014) Acid-sensing hypothalamic neurons controlling arousal. *Cell Mol Neurobiol* 34(6):777-89.

- Khatibi NH, Jadhav V, Charles S, Chiu J, Buchholz J, Tang J, Zhang JH (2011) Capsaicin pre-treatment provides neurovascular protection against neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Acta Neurochir Suppl* 111:225-230.
- Knotkova H, Pappagallo M, Szallasi A (2008) Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival? *Clin J Pain* 24:142-154.
- Korbmacher C, Bernhard B (2009) Funktion und Interaktion von Zellen. In: *Physiologie* (Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagel S, Hrsg.), 6. Auflage, S. 31-34. Stuttgart: Thieme.
- Kriegel T, Schellenberger W (2007) Bioenergetik und Enzymologie. In: *Biochemie und Pathobiochemie*. (Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, Hrsg.), 8., völlig neu bearb. Aufl., S. 127-128. Heidelberg: Springer.
- Krishtal OA, Pidoplichko VI (1980) A receptor for protons in the nerve cell membrane. *Neuroscience* 5:2325-2327.
- Kurachi Y (1985) Voltage-dependent activation of the inward-rectifier potassium channel in the ventricular cell membrane of guinea-pig heart. *J Physiol* 366:365-385.
- Lacey MG, Mercuri NB, North RA (1988) On the potassium conductance increase activated by GABAB and dopamine D2 receptors in rat substantia nigra neurones. *J Physiol* 401:437-453.
- Lang F (2010) Säure-Basen-Haushalt. In: *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. (Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, Hrsg.), 31. überarb. und aktualisierte Aufl., S. 752-762. Heidelberg: Springer.
- Lee E, Jung DY, Kim JH, Patel PR, Hu X, Lee Y, Azuma Y, Wang HF, Tsitsilianos N, Shafiq U, Kwon JY, Lee HJ, Lee KW, Kim JK (2015) Transient receptor potential vanilloid type-1 channel regulates diet-induced obesity, insulin resistance, and leptin resistance. *FASEB J* 29:3182-3192.
- Leurs R, Hough LB, Blandina P, Haas HL (2011) Histamine. In: *Basic Neurochemistry: principles of molecular, cellular, and medical neurobiology*. (Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, Price DL, Hrsg.), 8. Auflage, S. 351-367. München: Elsevier.
- Li HB, Mao RR, Zhang JC, Yang Y, Cao J, Xu L (2008) Antistress effect of TRPV1 channel on synaptic plasticity and spatial memory. *Biol Psychiatry* 64:286-292.
- Lin CW, Kalaria RN, Kroon SN, Bae JY, Sayre LM, LaManna JC (1996a) The amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ exchange antiporter and control of intracellular pH in hippocampal brain slices. *Brain Res* 731:108-113.
- Lin JS, Hou Y, Sakai K, Jouvét M (1996b) Histaminergic descending inputs to the mesopontine tegmentum and their role in the control of cortical activation and wakefulness in the cat. *J Neurosci* 16:1523-1537.
- Lingueglia E (2007) Acid-sensing ion channels in sensory perception. *J Biol Chem* 282:17325-17329.

- Liu L, Chen L, Liedtke W, Simon SA (2007) Changes in osmolality sensitize the response to capsaicin in trigeminal sensory neurons. *J Neurophysiol* 97:2001-2015.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Longo MC, Berninger MS, Hartley JL (1990) Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93:125-128.
- Lu G, Henderson D, Liu L, Reinhart PH, Simon SA (2005) TRPV1b, a functional human vanilloid receptor splice variant. *Mol Pharmacol* 67:1119-1127.
- Ludwig MG, Vanek M, Guerini D, Gasser JA, Jones CE, Junker U, Hofstetter H, Wolf RM, Seuwen K (2003) Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature* 425:93-98.
- Mamet J, Baron A, Lazdunski M, Voilley N (2002) Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. *J Neurosci* 22:10662-10670.
- Mandadi S, Armati PJ, Roufogalis BD (2011) Protein kinase C modulation of thermo-sensitive transient receptor potential channels: Implications for pain signaling. *J Nat Sci Biol Med* 2:13-25.
- Marinelli S, Pascucci T, Bernardi G, Puglisi-Allegra S, Mercuri NB (2005) Activation of TRPV1 in the VTA excites dopaminergic neurons and increases chemical- and noxious-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology* 30:864-870.
- Masaki T, Yoshimatsu H, Chiba S, Watanabe T, Sakata T (2001) Targeted disruption of histamine H1-receptor attenuates regulatory effects of leptin on feeding, adiposity, and UCP family in mice. *Diabetes* 50:385-391.
- McCormick DA (1992) Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Prog Neurobiol* 39:337-388.
- McCormick DA, Williamson A (1991) Modulation of neuronal firing mode in cat and guinea pig LGNd by histamine: possible cellular mechanisms of histaminergic control of arousal. *J Neurosci* 11:3188-3199.
- McElin TW, Horton BT (1945) Clinical observations on the use of benadryl; a new antihistamine substance. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 20:417-429.
- McNicholas CM, MacGregor GG, Islas LD, Yang Y, Hebert SC, Giebisch G (1998) pH-dependent modulation of the cloned renal K⁺ channel, ROMK. *Am J Physiol* 275:F972-F981.
- Mele T, Juric DM (2013) Identification and pharmacological characterization of the histamine H3 receptor in cultured rat astrocytes. *Eur J Pharmacol* 720:198-204.
- Meng QY, Wang W, Chen XN, Xu TL, Zhou JN (2009) Distribution of acid-sensing ion channel 3 in the rat hypothalamus. *Neuroscience* 159:1126-1134.

Menigoz A, Boudes M (2011) The expression pattern of TRPV1 in brain. *J Neurosci* 31:13025-13027.

Miklos IH, Kovacs KJ (2003) Functional heterogeneity of the responses of histaminergic neuron subpopulations to various stress challenges. *Eur J Neurosci* 18:3069-3079.

Mileykovskiy BY, Kiyashchenko LI, Siegel JM (2005) Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron* 46:787-798.

Mohebbi N, Benabbas C, Vidal S, Daryadel A, Bourgeois S, Velic A, Ludwig MG, Seuwen K, Wagner CA (2012) The proton-activated G protein coupled receptor OGR1 acutely regulates the activity of epithelial proton transport proteins. *Cell Physiol Biochem* 29:313-324.

Monnier M, Sauer R, Hatt AM (1970) The activating effect of histamine on the central nervous system. *Int Rev Neurobiol* 12:265-305.

Montenarh M, Löffler G (2007) Nukleotide und Nukleinsäuren. In: *Biochemie und Pathobiochemie*. (Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, Hrsg.), 8., völlig neu bearb. Aufl, S. 165-170. Heidelberg: Springer.

Morgese MG, Cassano T, Cuomo V, Giuffrida A (2007) Anti-dyskinetic effects of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: role of CB(1) and TRPV1 receptors. *Exp Neurol* 208:110-119.

Mulkey DK, Wenker IC (2011) Astrocyte chemoreceptors: mechanisms of H⁺ sensing by astrocytes in the retrotrapezoid nucleus and their possible contribution to respiratory drive. *Exp Physiol* 96:400-406.

Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.

Muzzi M, Felici R, Cavone L, Gerace E, Minassi A, Appendino G, Moroni F, Chiarugi A (2012) Ischemic neuroprotection by TRPV1 receptor-induced hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:978-982.

Neher E, Sakmann B (1976) Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres. *J Physiol* 258:705-729.

Nemoto EM, Frinak S (1981) Brain tissue pH after global brain ischemia and barbiturate loading in rats. *Stroke* 12:77-82.

Nieuwenhuys R, Voogd J, van Huijzen C (2008) *The Human Central Nervous System*, 4. Aufl., S. 289-298, Berlin (u.a.): Springer.

Nilius B, Voets T (2005) TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflugers Arch* 451:1-10.

Numberger M, Draguhn A (1996) Patch-clamp-Technik. S. 103-106, Heidelberg (u.a.): Spektrum, akad. Verl.

Oberleithner H (2009) Salz- und Wasserhaushalt. In: Physiologie. (Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagel S, eds), 6. Aufl., S. 399-401. Stuttgart: Thieme.

Ohshima Y, Iwase M, Izumizaki M, Ishiguro T, Kanamaru M, Nakayama H, Gejyo F, Homma I (2007) Hypoxic ventilatory response during light and dark periods and the involvement of histamine H1 receptor in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:R1350-R1356.

Ohtsu H, et al. (2001) Mice lacking histidine decarboxylase exhibit abnormal mast cells. *FEBS Lett* 502:53-56.

Panula P, Rinne J, Kuokkanen K, Eriksson KS, Sallmen T, Kalimo H, Relja M (1998) Neuronal histamine deficit in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 82:993-997.

Panula P, Yang HY, Costa E (1984) Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:2572-2576.

Parmentier R, Kolbaev S, Klyuch BP, Vandael D, Lin JS, Selbach O, Haas HL, Sergeeva OA (2009) Excitation of histaminergic tuberomammillary neurons by thyrotropin-releasing hormone. *J Neurosci* 29:4471-4483.

Parmentier R, Ohtsu H, Djebbara-Hannas Z, Valatx JL, Watanabe T, Lin JS (2002) Anatomical, physiological, and pharmacological characteristics of histidine decarboxylase knock-out mice: evidence for the role of brain histamine in behavioral and sleep-wake control. *J Neurosci* 22:7695-7711.

Parpaite T, Cardouat G, Mauroux M, Gillibert-Duplantier J, Robillard P, Quignard JF, Marthan R, Savineau JP, Ducret T (2015) Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch*.

Paschke R, Voigt K (2009) Endokrines System. In: Physiologie. (Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagel S, Hrsg.), 6. Aufl., S. 529-554. Stuttgart: Thieme.

Paterson DS, Hilaire G, Weese-Mayer DE (2009) Medullary serotonin defects and respiratory dysfunction in sudden infant death syndrome. *Respir Physiol Neurobiol* 168:133-143.

Paukert M, Babini E, Pusch M, Grunder S (2004) Identification of the Ca²⁺ blocking site of acid-sensing ion channel (ASIC) 1: implications for channel gating. *J Gen Physiol* 124:383-394.

Peretz A, Suss-Toby E, Rom-Glas A, Arnon A, Payne R, Minke B (1994) The light response of *Drosophila* photoreceptors is accompanied by an increase in cellular calcium: effects of specific mutations. *Neuron* 12:1257-1267.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26:509-515.

Pfaffl M, Hageleit M (2001) Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters* 23:275-282.

Pignataro G, Simon RP, Xiong ZG (2007) Prolonged activation of ASIC1a and the time window for neuroprotection in cerebral ischaemia. *Brain* 130:151-158.

Prast H, Philippu A (1991) Does brain histamine contribute to the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 343:307-310.

Price MP, McIlwrath SL, Xie J, Cheng C, Qiao J, Tarr DE, Sluka KA, Brennan TJ, Lewin GR, Welsh MJ (2001) The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron* 32:1071-1083.

Rasmussen R (2001) Quantification on the LightCycler. In: *Rapid Cycle Real-Time PCR: methods and applications.* (Meuer S, Wittwer C, Nakagawara KI, Hrsg.), S. 21-34. Berlin (u.a.): Springer.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245:154-160.

Sanchez JF, Krause JE, Cortright DN (2001) The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience* 107:373-381.

Saugstad JA, Roberts JA, Dong J, Zeitouni S, Evans RJ (2004) Analysis of the membrane topology of the acid-sensing ion channel 2a. *J Biol Chem* 279:55514-55519.

Saxena H, Deshpande DA, Tiegs BC, Yan H, Battafarano RJ, Burrows WM, Damera G, Panettieri RA, Dubose TD, Jr., An SS, Penn RB (2012) The GPCR OGR1 (GPR68) mediates diverse signalling and contraction of airway smooth muscle in response to small reductions in extracellular pH. *Br J Pharmacol* 166:981-990.

Schaeffer M, Langlet F, Lafont C, Molino F, Hodson DJ, Roux T, Lamarque L, Verdie P, Bourrier E, Dehouck B, Baneres JL, Martinez J, Mery PF, Marie J, Trinquet E, Fehrentz JA, Prevot V, Mollard P (2013) Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:1512-1517.

Schartl M (2009) Gentechnik, Gendiagnostik, Genterapie. In: *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen.* (Schartl M, Gessler M, von Eckardstein A, Hrsg.), S. 445-447. München: Elsevier, Urban & Fischer.

Schneider EH, Neumann D, Seifert R (2014) Modulation of behavior by the histaminergic system: lessons from H(1)R- and H(2)R-deficient mice. *Neurosci Biobehav Rev* 42:252-266.

Schone C, Cao ZF, Apergis-Schoute J, Adamantidis A, Sakurai T, Burdakov D (2012) Optogenetic probing of fast glutamatergic transmission from hypocretin/orexin to histamine neurons in situ. *J Neurosci* 32:12437-12443.

Schone C, Venner A, Knowles D, Karnani MM, Burdakov D (2011) Dichotomous cellular properties of mouse orexin/hypocretin neurons. *J Physiol* 589:2767-2779.

Schumacher MA, Moff I, Sudanagunta SP, Levine JD (2000) Molecular cloning of an N-terminal splice variant of the capsaicin receptor. Loss of N-terminal domain suggests functional divergence among capsaicin receptor subtypes. *J Biol Chem* 275:2756-2762.

Sergeeva OA, Amberger BT, Eriksson KS, Scherer A, Haas HL (2003) Co-ordinated expression of 5-HT_{2C} receptors with the NCX1 Na⁺/Ca²⁺ exchanger in histaminergic neurones. *J Neurochem* 87:657-664.

Sergeeva OA, Amberger BT, Vorobjev VS, Eriksson KS, Haas HL (2004) AMPA receptor properties and coexpression with sodium-calcium exchangers in rat hypothalamic neurons. *Eur J Neurosci* 19:957-965.

Sergeeva OA, Eriksson KS, Sharonova IN, Vorobjev VS, Haas HL (2002) GABA(A) receptor heterogeneity in histaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 16:1472-1482.

Sergeeva OA, Klyuch BP, Fleischer W, Eriksson KS, Korotkova TM, Siebler M, Haas HL (2006) P_{2Y} receptor-mediated excitation in the posterior hypothalamus. *Eur J Neurosci* 24:1413-1426.

Shan L, Bossers K, Unmehopa U, Bao AM, Swaab DF (2012) Alterations in the histaminergic system in Alzheimer's disease: a postmortem study. *Neurobiol Aging* 33:2585-2598.

Sherin JE, Shiromani PJ, McCarley RW, Saper CB (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science* 271:216-219.

Siegel JM, Boehmer LN (2006) Narcolepsy and the hypocretin system-where motion meets emotion. *Nat Clin Pract Neurol* 2:548-556.

Siesjo BK (1992) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg* 77:337-354.

Sikand P, Premkumar LS (2007) Potentiation of glutamatergic synaptic transmission by protein kinase C-mediated sensitization of TRPV1 at the first sensory synapse. *J Physiol* 581:631-647.

Skou JC (1989) The identification of the sodium-pump as the membrane-bound Na⁺/K⁺-ATPase: a commentary on 'The Influence of Some Cations on an Adenosine Triphosphatase from Peripheral Nerves'. *Biochim Biophys Acta* 1000:435-438.

Snyder PM, McDonald FJ, Stokes JB, Welsh MJ (1994) Membrane topology of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 269:24379-24383.

Song N, Zhang G, Geng W, Liu Z, Jin W, Li L, Cao Y, Zhu D, Yu J, Shen L (2012) Acid sensing ion channel 1 in lateral hypothalamus contributes to breathing control. *PLoS One* 7:e39982.

Southwell N (1948) Anthisan in treatment of asthma and hay-fever. *Br Med J* 1:877-880.

Speulda E, Wunnenberg W (1977) Thermosensitivity of preoptic neurones in a hibernator at high and low ambient temperatures. *Pflugers Arch* 370:107-109.

Staines WA, Daddona PE, Nagy JI (1987) The organization and hypothalamic projections of the tuberomammillary nucleus in the rat: an immunohistochemical study of adenosine deaminase-positive neurons and fibers. *Neuroscience* 23:571-596.

Steiner AA, Turek VF, Almeida MC, Burmeister JJ, Oliveira DL, Roberts JL, Bannon AW, Norman MH, Louis JC, Treanor JJ, Gavva NR, Romanovsky AA (2007) Nonthermal activation of transient receptor potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors. *J Neurosci* 27:7459-7468.

Stevens DR, Eriksson KS, Brown RE, Haas HL (2001) The mechanism of spontaneous firing in histamine neurons. *Behav Brain Res* 124:105-112.

Suzuki G, Chen Z, Sugimoto Y, Fujii Y, Kamei C (1999) Effects of histamine and related compounds on regional cerebral blood flow in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 21:613-617.

Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR (2007) The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* 6:357-372.

Tabarean IV, Sanchez-Alavez M, Sethi J (2012) Mechanism of H₂ histamine receptor dependent modulation of body temperature and neuronal activity in the medial preoptic nucleus. *Neuropharmacology* 63:171-180.

Takahashi K, Lin JS, Sakai K (2006) Neuronal activity of histaminergic tuberomammillary neurons during wake-sleep states in the mouse. *J Neurosci* 26:10292-10298.

Thakkar MM, Delgiacco RA, Strecker RE, McCarley RW (2003a) Adenosinergic inhibition of basal forebrain wakefulness-active neurons: a simultaneous unit recording and microdialysis study in freely behaving cats. *Neuroscience* 122:1107-1113.

Thakkar MM, Winston S, McCarley RW (2003b) A1 receptor and adenosinergic homeostatic regulation of sleep-wakefulness: effects of antisense to the A1 receptor in the cholinergic basal forebrain. *J Neurosci* 23:4278-4287.

Theoharides TC, Konstantinidou AD (2007) Corticotropin-releasing hormone and the blood-brain-barrier. *Front Biosci* 12:1615-1628.

Tojima H, Kuriyama T, Fukuda Y (1991) Differential respiratory effects of HCO₃⁻ and CO₂ applied on ventral medullary surface of rats. *J Appl Physiol* (1985) 70:2217-2225.

Tokhtaeva E, Clifford RJ, Kaplan JH, Sachs G, Vagin O (2012) Subunit isoform selectivity in assembly of Na,K-ATPase alpha-beta heterodimers. *J Biol Chem* 287:26115-26125.

Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531-543.

Torrealba F, Yanagisawa M, Saper CB (2003) Colocalization of orexin a and glutamate immunoreactivity in axon terminals in the tuberomammillary nucleus in rats. *Neuroscience* 119:1033-1044.

Toth A, Boczan J, Kedei N, Lizanecz E, Bagi Z, Papp Z, Edes I, Csiba L, Blumberg PM (2005) Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 135:162-168.

Tresguerres M, Buck J, Levin LR (2010) Physiological carbon dioxide, bicarbonate, and pH sensing. *Pflugers Arch* 460:953-964.

Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Nishigaki M, Shibata Y, Shimada S (2002) Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors. *J Clin Invest* 110:1185-1190.

Vanni-Mercier G, Gigout S, Debilly G, Lin JS (2003) Waking selective neurons in the posterior hypothalamus and their response to histamine H3-receptor ligands: an electrophysiological study in freely moving cats. *Behav Brain Res* 144:227-241.

Vina E, Parisi V, Cabo R, Laura R, Lopez-Velasco S, Lopez-Muniz A, Garcia-Suarez O, Germana A, Vega JA (2013) Acid-sensing ion channels (ASICs) in the taste buds of adult zebrafish. *Neurosci Lett* 536:35-40.

Vorobjev VS, Sharonova IN, Haas HL (1996) A simple perfusion system for patch-clamp studies. *J Neurosci Methods* 68:303-307.

Vos MH, Neelands TR, McDonald HA, Choi W, Kroeger PE, Puttfarcken PS, Faltynek CR, Moreland RB, Han P (2006) TRPV1b overexpression negatively regulates TRPV1 responsiveness to capsaicin, heat and low pH in HEK293 cells. *J Neurochem* 99:1088-1102.

Waldmann R, Bassilana F, de WJ, Champigny G, Heurteaux C, Lazdunski M (1997a) Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem* 272:20975-20978.

Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M (1997b) A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* 386:173-177.

Waldmann R, Lazdunski M (1998) H⁽⁺⁾-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 8:418-424.

Walzog B, Fandrey J (2009) Blut: Ein flüssiges Organsystem. In: *Physiologie* (Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagel S, Hrsg.), 6. Aufl., S. 234-246. Stuttgart: Thieme.

Wang C, Hu HZ, Colton CK, Wood JD, Zhu MX (2004) An alternative splicing product of the murine *trpv1* gene dominant negatively modulates the activity of TRPV1 channels. *J Biol Chem* 279:37423-37430.

Wang F, Wan Q, Yao H, Liu J, Huang Y (1997) [Blocker of Na⁺/Ca²⁺ exchanger, benzamil, decreases Ca²⁺ influx and enhances the ability of hippocampal neuron against hypoxia]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi* 13:79.

Wang RI, Sonnenschein RR (1955) PH of cerebral cortex during induced convulsions. *J Neurophysiol* 18:130-137.

Wang W, Yu Y, Xu TL (2007) Modulation of acid-sensing ion channels by Cu(2+) in cultured hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience* 145:631-641.

Watanabe T, Taguchi Y, Shiosaka S, Tanaka J, Kubota H, Terano Y, Tohyama M, Wada H (1984) Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res* 295:13-25.

Wemmie JA, Askwith CC, Lamani E, Cassell MD, Freeman JH, Jr., Welsh MJ (2003) Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning. *J Neurosci* 23:5496-5502.

Wemmie JA, Chen J, Askwith CC, Hruska-Hageman AM, Price MP, Nolan BC, Yoder PG, Lamani E, Hoshi T, Freeman JH, Jr., Welsh MJ (2002) The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron* 34:463-477.

Williams JT, Colmers WF, Pan ZZ (1988) Voltage- and ligand-activated inwardly rectifying currents in dorsal raphe neurons in vitro. *J Neurosci* 8:3499-3506.

Williams RH, Burdakov D (2008) Hypothalamic orexins/hypocretins as regulators of breathing. *Expert Rev Mol Med* 10:e28.

Williams RH, Jensen LT, Verkhatsky A, Fugger L, Burdakov D (2007) Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10685-10690.

Wouterlood FG, Gaykema RP (1988) Innervation of histaminergic neurons in the posterior hypothalamic region by medial preoptic neurons. Anterograde tracing with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin combined with immunocytochemistry of histidine decarboxylase in the rat. *Brain Res* 455:170-176.

Wouterlood FG, Steinbusch HW, Luiten PG, Bol JG (1987) Projection from the prefrontal cortex to histaminergic cell groups in the posterior hypothalamic region of the rat. Anterograde tracing with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin combined with immunocytochemistry of histidine decarboxylase. *Brain Res* 406:330-336.

Wouterlood FG, Tuinhof R (1992) Subicular efferents to histaminergic neurons in the posterior hypothalamic region of the rat studied with PHA-L tracing combined with histidine decarboxylase immunocytochemistry. *J Hirnforsch* 33:451-465.

Xiong ZG, Pignataro G, Li M, Chang SY, Simon RP (2008) Acid-sensing ion channels (ASICs) as pharmacological targets for neurodegenerative diseases. *Curr Opin Pharmacol* 8:25-32.

Xiong ZG, Zhu XM, Chu XP, Minami M, Hey J, Wei WL, MacDonald JF, Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ, Simon RP (2004) Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell* 118:687-698.

Xu Y, Casey G (1996) Identification of human OGR1, a novel G protein-coupled receptor that maps to chromosome 14. *Genomics* 35:397-402.

Yang QZ, Hatton GI (1997) Electrophysiology of excitatory and inhibitory afferents to rat histaminergic tuberomammillary nucleus neurons from hypothalamic and forebrain sites. *Brain Res* 773:162-172.

Yanovsky Y, Zigman JM, Kernder A, Bein A, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Haas HL, Sergeeva OA (2012) Proton- and ammonium-sensing by histaminergic neurons controlling wakefulness. *Front Syst Neurosci* 6:23.

Yermolaieva O, Leonard AS, Schnizler MK, Abboud FM, Welsh MJ (2004) Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6752-6757.

Ziemann AE, Allen JE, Dahdaleh NS, Drebot II, Coryell MW, Wunsch AM, Lynch CM, Faraci FM, Howard MA, III, Welsh MJ, Wemmie JA (2009) The amygdala is a chemosensor that detects carbon dioxide and acidosis to elicit fear behavior. *Cell* 139:1012-1021.

Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 32:e103.

Zuo GF, Li MH, Zhang JX, Li B, Wang ZM, Wang Q, Xiao H, Chen SL (2013) Capsazepine concentration dependently inhibits currents in HEK 293 cells mediated by human hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated 2 and 4 channels. *Exp Biol Med (Maywood)* 238:1055-1061.



Acid- and ammonium-sensing by wake-on neurons of the posterior hypothalamus

A. Kernder, Y. Yanovsky, H.L. Haas and O.A. Sergeeva
Department of Neurophysiology, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University, 40225 Düsseldorf

INTRODUCTION:

The hypothalamus is an important command centre for energy administration and behavioural state. The two hypothalamic waking centres, orexin- and histamine-neurons provide complementary and synergistic control of wakefulness supporting different aspects of vigilance (1). The tuberomammillary nucleus (TMN), is the only source of histamine in the brain.

Extracellular levels of acid and CO₂ are fundamental physicochemical signals controlling vigilance and breathing. Acidification excites orexinergic neurons but the effect on histaminergic neurons are unknown.

In hepatic encephalopathy the liver failure leads to the accumulation of toxic substances, like ammonium, in the brain and patients show a disturbed regulation of wakefulness. Some acid-sensing mechanisms can be activated by ammonium (2) and hyperammonemia leads to intracellular acidification (3).

We studied the effect of physiological acidification (pH: 7.4-7.0) and an elevated ammonium level (5mM) on histaminergic neurons.

Acidification within the physiological range (7.4-7.0) excites histaminergic neurons to 165.7 ± 14.8 % of control firing (n=23). The magnitude of this excitation is similar to the action of ammonium chlorid (5mM) (177.3 ± 13.6 %), (n=16).

Our results are relevant for the understanding of neuronal mechanisms controlling H⁺/CO₂-induced arousal which are compromised in hepatic encephalopathy.

METHODS:

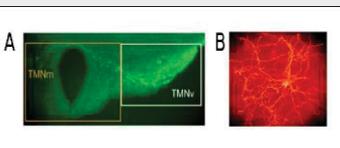


Fig. 1: (A) Hypothalamic slice stained with the rabbit-anti-histamine antibody. Staining visualised with the secondary donkey-anti-rabbit antibody conjugated to Alexa fluor 488. Patch clamp recordings are done from TMNventrolateral (TMNV). (B) Histaminergic neuron stained with the rabbit-anti-histamine antibody. Staining visualised with the secondary donkey-anti-rabbit antibody conjugated to cyanin 3.

The effects of physiological acidification (pH: 7.0) and an elevated ammonium level (5mM) are studied on histaminergic neurons using patch clamp recordings from brain slices (TMNV). The expressions of acid-sensing ion channels (ASIC), Na⁺/K⁺ ATPase subunits and TRPV1, which are involved in the mechanisms of chemosensing by histaminergic neurons, are analysed by single cell RT-PCR. The expression of mGluR and P2Y1 in histaminergic neurons was demonstrated before (4).

RESULTS:

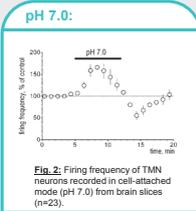


Fig. 2: Firing frequency of TMN neurons recorded in cell-attached mode (pH 7.0) from brain slices (n=23).

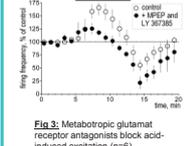


Fig. 6: Normalized firing frequency of TMN (response to ammonium chloride, 5mM), (n=16).

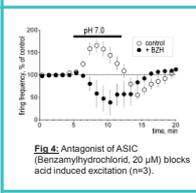


Fig. 3: Metabotropic glutamate receptor antagonists block acid-induced excitation (n=6).

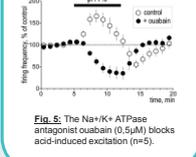


Fig. 5: The Na⁺/K⁺ ATPase antagonist ouabain (0.5μM) blocks acid-induced excitation (n=5).

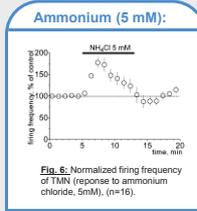


Fig. 7: Normalized firing frequency in control experiments and in the presence of mGluR antagonists (n=4).

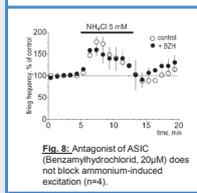


Fig. 8: Antagonist of ASIC (Benzamylhydrochlorid, 20μM) does not block ammonium-induced excitation (n=4).

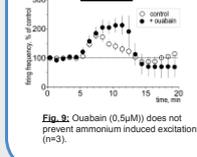


Fig. 9: Ouabain (0.5μM) does not prevent ammonium induced excitation (n=3).

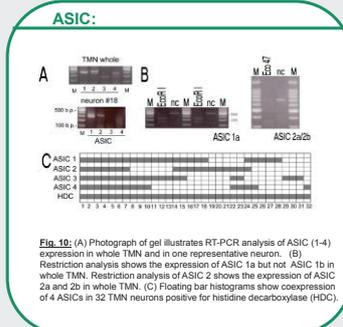


Fig. 10: (A) Photograph of gel illustrates RT-PCR analysis of ASIC 1-4 expression in whole TMN and in one representative neuron. (B) Restriction analysis shows the expression of ASIC 1a but not ASIC 1b in whole TMN. Restriction analysis of ASIC 2 shows the expression of ASIC 2a and 2b in whole TMN. (C) Floating bar histograms show coexpression of 4 ASICs in 32 TMN neurons positive for histidine decarboxylase (HDC).

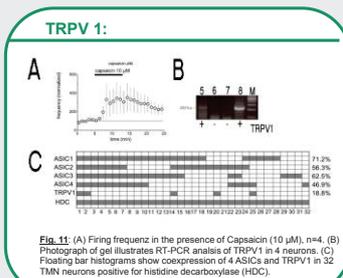


Fig. 11: (A) Firing frequency in the presence of Capsaicin (10 μM), n=4. (B) Photograph of gel illustrates RT-PCR analysis of TRPV1 in 4 neurons. (C) Floating bar histograms show coexpression of 4 ASICs and TRPV1 in 32 TMN neurons positive for histidine decarboxylase (HDC).

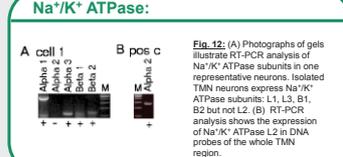
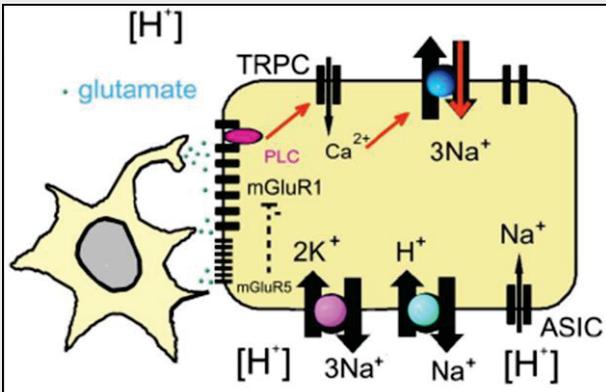


Fig. 12: (A) Photographs of gels illustrate RT-PCR analysis of Na⁺/K⁺ ATPase subunits in one representative neurons. Isolated TMN neurons express Na⁺/K⁺ ATPase subunits: L1, L3, B1, B2 but not L2. (B) RT-PCR analysis shows the expression of Na⁺/K⁺ ATPase L2 in DNA probes of the whole TMN region.

Fig. 13: Proton sensing cascade in TMN neurons. The primary chain of the acid induced excitation is the local release of glutamate, which can originate either from glia or from orexinergic /glutamatergic axons (5). The mGluR 1 activates (through PLC) non selective cation channels, most likely of the TRPC-type. The increased intracellular calcium is removed by the electrogenic Na⁺/Ca²⁺ exchanger, which leads to depolarisation and increased firing rate. The metabotropic glutamate receptor antagonists do not entirely block proton-induced excitation, so that we assume the additional role of ASIC and TRPV1. The inhibition of Na⁺/K⁺ ATPase by picrotoxin can contribute to the observed excitation of TMN.



CONCLUSIONS:

- Mechanism of proton- and ammonium-evoked excitation of TMN neurons are different.
- Acidification (pH: 7.0) increased the firing rate of TMN neurons to 165.7 ± 14.8 % of control firing rate (n=23).
- Metabotropic glutamate receptors, ASIC, Na⁺/K⁺ ATPase, TRPV1 are relevant for the proton sensing cascade in TMN neurons.
- Ammonium evoked transient increase in firing rate to 177.3 ± 13.6% of control (n=16).
- In contrast to the acidification-induced increase in firing rate, the excitation by ammonium was not prevented by mGluR-antagonists, benzamylhydrochloride or ouabain.

REFERENCES:

(1) Anacker C, Parmentier F, Duk K, Gaidon G, Buda C, Sastre JP, Akao H, Sergeeva OA, Yanagawa M, Chiu H, Franco P, Haas HL, Liu JS (2009) Orexin/hypocretin and histamine: distinct roles in the control of wakefulness demonstrated using knock-out mouse models. *J Neurosci* 29: 14422-14430.
 (2) Pridolicko VJ, Dani JA (2006) Acid-sensitive ionic channels in midbrain dopamine neurons are sensitive to ammonium, which may contribute to hyperammonemia damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11376-11380.
 (3) Kelly T, Rose CR (2010) Ammonium influx pathways into astrocytes and neurons of hippocampal slices. *Neurochem* 115: 1123-1136.
 (4) Sergeeva OA, Kiyun BP, Fleischner W, Eriksson KS, Korotkova TM, Stebler M, Haas HL (2006) P2Y receptor-mediated excitation in the posterior hypothalamus. *Eur J Neurosci* 24: 1413-1426.
 (5) Tomalba F, Yamagawa M, Saper CB (2003) Colocalization of orexin A and glutamate immunoreactivity in axon terminals in the tuberomammillary nucleus in rats. *Neuroscience* 119: 1033-1044.

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Frau Prof. Dr. Sergeeva und Herrn Prof. Dr. Haas für die Überlassung des Themas und ihre herausragende Betreuung.

Ich danke Dr. Yevgenij Yanovsky für seine außergewöhnliche Hilfe bei den *Patch-Clamp*-Ableitungen und Anette Scherer für die warme und herzliche Atmosphäre im Labor und ihre unschätzbare Unterstützung bei der Einarbeitung in die wissenschaftliche Methodik.

Außerdem bedanke ich mich bei Alisa Bein, die als Doktorandin mit mir zusammen im Labor gearbeitet hat und mir immer zur Seite stand. Zusammen mit ihr hat die Arbeit richtig Spaß gemacht.

Nicht zuletzt möchte ich mich sehr herzlich bei meinen Eltern, meiner Schwester und Jan Stupnanek bedanken, die mich ununterbrochen unterstützen und mir auch während meines Studiums und der Anfertigung der Dissertation stets tatkräftig zur Seite stehen. Vielen Dank für die konstruktive Kritik, die Aufmunterungen und für das Korrekturlesen der Arbeit.

Vielen Dank an die Forschungskommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, die diese Arbeit förderte.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 17.12.2015

Anna Luise Kernder