

Aus dem Institut für Physiologie
(Direktor Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Stefan Gründer)

Präkonditionierung des ASIC-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms in Kortexneuronen der Maus durch Azidose

Von der Medizinischen Fakultät der
Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Medizin genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Hendrik Paczkowski

aus Hamm (Westfalen)

Berichter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Stefan Gründer
Prof. Dr. med. Mark Coburn

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juni 2013

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek
online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zerebrale Ischämie und neuronaler Zelltod	1
1.1.1	Intrazelluläres Kalzium	1
1.1.2	Rolle von Glutamat & NMDA-Rezeptoren	1
1.1.3	Azidose und ischämischer Zelluntergang	2
1.2	Acid-Sensing Ion Channels	2
1.2.1	ASICs im zentralen Nervensystem	3
1.2.2	ASICs in der Pathophysiologie der zerebralen Ischämie	4
1.2.3	ASICs in der Pathophysiologie anderer zentralnervöser Er- krankungen	5
1.2.4	ASICs im peripheren Nervensystem	5
1.3	Weitere Elemente der neuronalen Kalziumregulation	6
1.3.1	Spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanäle	6
1.3.2	Das endoplasmatische Retikulum als intrazellulärer Kalzium- Speicher	7
1.4	Präkonditionierung und ischämische Toleranz	9
2	Zielsetzung	10
3	Material & Methoden	11
3.1	Material	11
3.1.1	Materialien für die Molekularbiologie	11
3.1.2	Materialien für die in vivo-Kultur der Kortexneurone	12
3.1.3	Chemikalien für Badlösungen	13
3.1.4	Materialien für das Fura-2-Imaging in Neuronen	13
3.1.5	Pharmaka	14
3.1.6	Donor-Mäuse für die Gewinnung von Kortexneuronen	14
3.2	Methoden	14
3.2.1	Kultur der Kortexneurone aus neugeborenen Mäusen	14
3.2.2	Präkonditionierung der Kortexneurone	16
3.2.3	Ca^{2+} -Imaging in neuronaler Zellkultur	16
3.2.4	RNA-Gewinnung aus den primärkultivierten Kortexneuronen und Herstellung der cDNA	22
3.2.5	konventionelle PCR	25
3.2.6	Genotypisierung der neugeborenen Donor-Mäuse	26
3.2.7	Quantitative PCR (qPCR; auch Echt-Zeit- oder Real-Time- PCR)	29

4	Ergebnisse	32
4.1	Fura-2-Imaging an primärkultivierten Kortexneuronen	32
4.1.1	Zytosolische Ca^{2+} -Antwort nach Applikation extrazellulärer Azidose	32
4.1.2	Effekt der Präkonditionierung durch Azidose für verschiedene Zeiträume auf die säureinduzierte Ca^{2+} -Antwort	33
4.1.3	Effekt von Amilorid auf die säureinduzierte Ca^{2+} -Antwort . .	34
4.1.4	Effekt von Nimodipin auf die säureinduzierte Ca^{2+} -Antwort .	35
4.1.5	Effekt von Thapsigargin auf die säureinduzierte Ca^{2+} -Antwort	39
4.1.6	Fura-2-Imaging in ASIC ^{-/-} -Mäusen	42
4.2	qPCR	46
5	Diskussion	48
5.1	Der säureinduzierte Ca^{2+} -Anstieg in Neuronen	48
5.2	Mechanismen des säureinduzierten Ca^{2+} -Anstiegs in Kortexneuronen	49
5.3	ASIC-Untereinheiten in Kortexneuronen	50
5.4	Präkonditionierung durch extrazelluläre Azidose	51
5.5	Methodenkritik zur Durchführung der qPCR	53
5.6	Ausblick	54
6	Zusammenfassung	57
	Literatur	59

1 Einleitung

1.1 Zerebrale Ischämie und neuronaler Zelltod

1.1.1 Intrazelluläres Kalzium

Das Verständnis der Pathophysiologie des ischämisch verursachten Zelluntergangs von Neuronen, wie er etwa beim ischämischen Schlaganfall vorkommt, hat sich in den letzten Jahren stark gewandelt. Eine über die Jahre weitgehend konstante Feststellung ist jedoch, dass zerebrale Ischämie in Neuronen zur Überladung mit Ca^{2+} -Ionen und darüber zum Zelltod führt [Lobner and Lipton, 1993, Siesjö et al., 1995, Xiong et al., 2004]. Physiologischerweise wird die zytosolische Kalziumkonzentration in Neuronen innerhalb enger Grenzen um ca. 100 nM gehalten [Zündorf and Reiser, 2011]. Transiente Anstiege in der zytosolischen Kalzium-Konzentration sind für viele vitale Funktionen neuronaler Netzwerke unerlässlich, beispielsweise synaptische Plastizität, Lernprozesse [Zündorf and Reiser, 2011] oder auch die Umwandlung von elektrischen in chemische Signale an der Präsynapse [Matveev et al., 2011]. Eine lang anhaltende Überladung mit Ca^{2+} -Ionen jedoch aktiviert in Neuronen Enzyme und Signalkaskaden, die letztendlich zum Zelltod führen [Bano and Nicotera, 2007]. Im Laufe der Jahre gab es verschiedene Modelle, um den Zusammenhang von Ischämie und neuronaler Ca^{2+} -Überladung zu erklären, und auch heute ist der Mechanismus noch nicht vollständig verstanden [Li et al., 2011].

1.1.2 Rolle von Glutamat & NMDA-Rezeptoren

Lange Zeit herrschte die Meinung vor, dass die wesentliche Ursache für den ischämischen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und des damit verbundenen neuronalen Zelltods in der Aktivierung von NMDA-Rezeptoren (NMDAR) durch den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat zu sehen ist [Goldberg et al., 1987, Choi and Rothman, 1990]. Es konnte gezeigt werden, dass unter ischämischen Bedingungen die zerebrale Glutamat-Konzentration ansteigt [McCulloch, 1992]. In Tier-Experimenten konnte durch die Applikation von NMDAR-Antagonisten ein neuroprotektiver Effekt gegenüber Ischämie nachgewiesen werden [Foster et al., 1988, Park et al., 1988b, Park et al., 1988a]. Zwar ließen sich diese experimentellen Daten nicht von allen Arbeiten reproduzieren [Jensen and Auer, 1988, Nellgård et al., 1991], dennoch wurden durch diese Entdeckung große Hoffnungen auf neue klinische Therapieansätze beim ischämischen Schlaganfall geweckt. Das Zeitfenster für eine NMDAR-antagonistische Therapie lag im Tierexperiment bei ca. 2 h [Steinberg et al., 1995]. In den sich anschließenden klinischen Studien ließ sich für verschiedenste NMDA-Rezeptor-Antagonisten enttäuschenderweise kein neuroprotektiver Effekt bei der Behandlung von ischämischen Schlaganfällen feststellen [Muir and Lees, 2003, Hoyte et al., 2004].

Interessanterweise gibt es mittlerweile tierexperimentelle Hinweise, dass - im Gegenteil - die pharmakologische Behandlung mit einem NMDAR-Agonisten beginnend 24 h nach der Ischämie einen günstigen Einfluss auf das somatosensorische und kognitive Ergebnis nach zerebraler Ischämie hat [Dhawan et al., 2011].

1.1.3 Azidose und ischämischer Zelluntergang

Unter ischämischen Bedingungen kommt es im Gehirn aufgrund von anaerober Glykolyse mit Laktatproduktion, Hydrolyse von ATP und fehlendem Abtransport von Kohlendioxid zur Akkumulation von Protonen im extrazellulären Raum; dabei kann der pH-Wert auf bis zu 6,0 abfallen [Rehncrona, 1985, Nedergaard et al., 1991b]. Auch konnte schon vor langer Zeit gezeigt werden, dass Azidose im extrazellulären Raum zum neuronalen Zelltod führen kann [Goldman et al., 1989, Nedergaard et al., 1991a]. Mit der Beschreibung von säureaktivierten Ionenkanälen (Acid-Sensing Ion Channels, ASICs) wurde eine neue Verbindung von Ischämie bzw. Azidose einerseits und neuronaler Ca^{2+} -Überladung und neuronalem Zelltod andererseits entdeckt [Waldmann et al., 1997b, Xiong et al., 2004].

1.2 Acid-Sensing Ion Channels

Acid-sensing Ion Channels (ASICs) sind durch extrazelluläre Säure aktivierbare Kationenkanäle [Waldmann et al., 1997a]. Sie gehören zur Superfamilie der DEG/ENaC-Ionenkanäle [Kellenberger and Schild, 2002] und finden sich bei Mitgliedern des Stamms der Chordatiere [Coric et al., 2008]. Die Sequenz der ASICs ist bei Säugetieren gut konserviert [Kellenberger and Schild, 2002]. Bei Nagetieren kodieren vier Gene (ACCN1-4) - z.T. über alternatives Spleißen - für sechs verschiedene Proteine (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3, ASIC4) [Kellenberger and Schild, 2002]. Ein funktioneller Kanal besteht wahrscheinlich aus 3 Untereinheiten, zumindest konnte dies für die Kristallstruktur des ASIC1a-Homomers gezeigt werden [Jasti et al., 2007]. ASICs werden durch einen Abfall des extrazellulären pH-Wertes aktiviert und zeigen daraufhin einen transienten Kationen-Einstrom mit größter Permeabilität für Na^+ -Ionen (siehe Abb. 1) [Waldmann et al., 1997b]. Je nach Zusammensetzung der Untereinheiten des Kanals zeigen sich funktionelle Unterschiede etwa in der pH-Sensitivität oder der Desensitivierungs-Kinetik [Askwith et al., 2004, Hesselager et al., 2004, Xiong et al., 2008]. Wie alle Mitglieder der DEG/ENaC-Superfamilie lassen sich auch ASICs durch das Diuretikum Amilorid reversibel inhibieren [Waldmann et al., 1997b, Kellenberger and Schild, 2002, Xiong et al., 2008]. Der halbmaximale Effekt der Blockade wird bei $\text{IC}_{50} = 3\text{-}60 \mu\text{M}$ erreicht [Waldmann et al., 1997a, Waldmann et al., 1997b, Bolshakov et al., 2002], einer Konzentration, bei der jedoch auch andere Membranproteine wie etwa der $\text{Na}^+\text{-H}^+$ - oder der $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauscher beeinflusst werden [Xiong et al., 2008].

1.2.1 ASICs im zentralen Nervensystem

In Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS) werden die Untereinheiten ASIC1a, -2a und -2b exprimiert [Baron et al., 2002], wobei sowohl ASIC1a-Homomere, als auch ASIC1a/2a- und ASIC1a/2b-Heteromere gebildet werden [Askwith et al., 2004, Li et al., 2010b]. Dabei scheint die Anwesenheit von ASIC1a-Untereinheiten für die Funktionalität des Ionenkanals und den Ioneneinstrom im ZNS essentiell zu sein [Askwith et al., 2004]. ASIC1a-Homomere werden ab einem Abfall des pH-Wertes unter 7,0 aktiviert und zeigen eine halbmaximale Aktivierung bei $\text{pH}_{50} = 6,2\text{-}6,8$ [Waldmann et al., 1997b, Benson et al., 2002]. Es ist also anzunehmen, dass der Abfall des pH-Wertes unter ischämischen Bedingungen auf bis zu 6,0 [Nedergaard et al., 1991b, Rehn-crona, 1985] für ihre Aktivierung ausreichend wäre. ASIC1a-Homomere und ASIC1a/2b-Heteromere besitzen neben

der Na^+ -Leitfähigkeit auch eine Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen [Waldmann et al., 1997b, Sherwood et al., 2011] und führen bei Aktivierung in Neuronen zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration [Yermolaieva et al., 2004, Xiong et al., 2004]. Der Ca^{2+} -Einstrom durch ASICs selbst ist jedoch klein (mit einem Permeabilitätsquotienten von $P_{\text{Na}^+}/P_{\text{Ca}^{2+}} = 18,5$) und vor allem sekundär vermittelter Ca^{2+} -Einstrom scheint für den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verantwortlich zu sein [Bässler et al., 2001, Samways et al., 2009]. Dabei könnte von Bedeutung sein, dass der säureaktivierte Kationeneinstrom über ASICs in Neuronen ausreichend ist, das Membranpotential so weit zu depolarisieren, dass Aktionspotentiale ausgelöst werden können [Baron et al., 2002, Weng et al., 2010] und dadurch andere Mechanismen am Ca^{2+} -Einstrom (z.B. spannungsabhängige L-Typ Kalzium-Kanäle; siehe 1.3.1) beteiligt sein könnten.

Der durch einen kurzen Säure-Stimulus induzierte Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ist transient [Li et al., 2010b] und das Neuron ist in der Lage durch aktive Transportprozesse (etwa durch die Ca^{2+} -ATPase des endoplasmatischen Retikulums oder den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher in der Plasmamembran) die

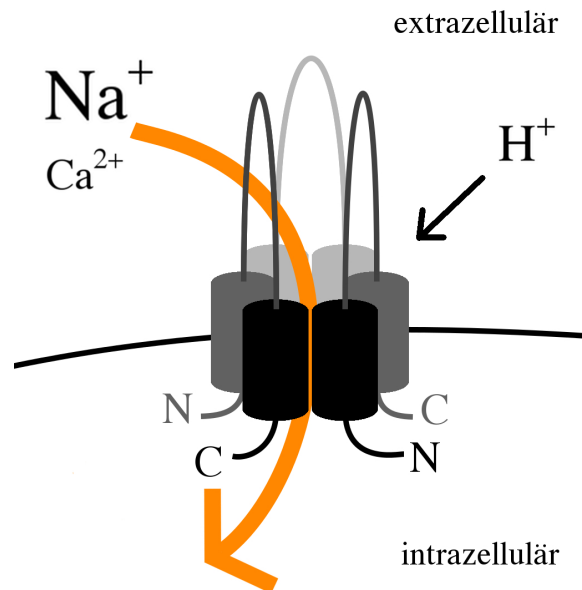


Abbildung 1: **Ein funktioneller ASIC-Kanal aus drei Untereinheiten.** Die Pore für den Ioneneinstrom wird aus den jeweils zwei Transmembrandomänen der drei Untereinheiten gebildet. Zytosolische N- und C-Termini und extrazelluläre Loop-Strukturen der ASIC-Proteine. Extrazelluläre Protonen aktivieren den Kanal, sodass ein transienter Kationen-Einstrom in die Zelle entsteht.

ursprüngliche Ca^{2+} -Konzentration wiederherzustellen. Eine mehrere Minuten andauernde extrazelluläre Azidose führt in Wildtyp-Neuronen (WT-Neurone) jedoch zu höheren Ca^{2+} -Spiegeln als in $\text{ASIC1}^{-/-}$ -Neuronen [Yermolaieva et al., 2004]. Physiologischerweise spielt der ASIC1a-vermittelte Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine Rolle bei synaptischer Plastizität und Lernprozessen [Wemmie et al., 2002].

ASIC2a-Homomere haben eine niedrige Protonen-Affinität mit einer halbmaximalen Aktivierung bei $\text{pH}_{50} = 4,4$ [Lingueglia et al., 1997], daher ist kaum mit einer Aktivierung in vivo unter ischämischen Umständen zu rechnen. Jedoch modulieren sie pH-Sensitivität, Amplitude und Desensitisierungszeit von ASIC1a-Untereinheiten, wenn sie mit diesen Heteromere bilden [Askwith et al., 2004, Li et al., 2010b]. ASIC2b-Homomere zeigen keine säureaktivierten Ströme [Coscoy et al., 1999, Hesselager et al., 2004]. Der Beteiligung von ASIC2b-Untereinheiten an Heteromeren zusammen mit ASIC1a-Untereinheiten werden jedoch ebenfalls modulatorische Einflüsse auf die Eigenschaften von ASIC1a zugeschrieben [Sherwood et al., 2011].

1.2.2 ASICs in der Pathophysiologie der zerebralen Ischämie

Für die Erforschung der Rolle von ASICs in der Pathophysiologie des ischämischen Zelltods erwies es sich als äußerst nützlich, dass das Polypeptid Psalmotoxin 1 (PcTx1), ein Bestandteil eines Vogelspinnengifts, als ein potenter und selektiver Blocker von ASIC1a-Homomeren und ASIC1a/2b-Heteromeren beschrieben wurde [Escoubas et al., 2000, Sherwood et al., 2011]. Mithilfe dessen konnte gezeigt werden, dass unter ischämischen Bedingungen in vivo säuresensible ASIC1a-Homomere und ASIC2b/1a-Heteromere aktiviert werden und es konsekutiv zum Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und zum neuronalen Zelltod kommt [Xiong et al., 2004, Sherwood et al., 2011]. Obgleich der Großteil der ASIC-vermittelten Kationenströme im ZNS transient ist und nur für wenige Sekunden anhält [Baron et al., 2002], erbrachte die pharmakologische Blockade von ASIC1a-Homomeren durch Psalmotoxin-1 im Ischämie-Tierexperiment eine Reduktion des Infarkt Volumens um bis zu 60% [Xiong et al., 2004]. Ebenso führte ein Anheben des zerebralen pH-Wertes unter Ischämie-Bedingungen zu einer Reduktion des Infarktvolumens [Pignataro et al., 2007], sodass davon auszugehen ist, dass extrazelluläre Azidose ein entscheidender Faktor in der Pathophysiologie des ischämischen Zelltods von Neuronen ist. Die Applikation von Psalmotoxin in einem Zeitfenster von bis zu 5 h nach Beginn der Ischämie führt zu einer Reduktion des Infarktvolumens von mindestens 50% [Pignataro et al., 2007, Simon and Xiong, 2006]. Das potentielle therapeutische Zeitfenster für die ASIC-Blockade befindet sich damit in einer ähnlichen Größenordnung wie das erweiterte Zeitfenster von 4,5 h für die systemische Lyse nach ischämischem Schlaganfall [Hacke et al., 2008] und übersteigt das deutlich kürzere Zeitfenster der Neuroprotektion durch NMDAR-Antagonisten von nur 2 h [Stein-

berg et al., 1995]. Neben diesen tierexperimentell gewonnenen Daten konnte auch an menschlichen Kortexneuronen die ASIC1a-abhängige Neurotoxizität von Azidose mit Ca^{2+} -Überladung nachgewiesen werden [Li et al., 2010a].

Der ASIC-vermittelte neuronale Zelltod ist unabhängig vom NMDAR-vermittelten und die Blockade beider Kanäle zeigt im Tierexperiment einen additiven neuroprotektiven Effekt [Pignataro et al., 2007, Xiong et al., 2004]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine NMDAR-abhängige, über die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Protein Kinase II (CaMKII) vermittelte Phosphorylierung von ASIC1a sowohl den säureinduzierten ASIC-Strom als auch das Ausmaß des säureinduzierten neuronalen Zelluntergangs verstärkt [Gao et al., 2005].

Inzwischen wird die Rolle der ASIC-vermittelten Azidotoxizität in der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls als bedeutender eingeschätzt als die Rolle der NMDAR-vermittelten Exzitotoxizität [Simard et al., 2007, Simon, 2006, Wang and Xu, 2011]. Es bleibt abzuwarten, ob sich die aus diesen in Laborexperimenten entstandenen Hoffnungen auf neue Therapieansätze des ischämischen Schlaganfalls durch selektive Blockade von ASICs [Xiong et al., 2007] in klinischen Studien bestätigen lassen.

1.2.3 ASICs in der Pathophysiologie anderer zentralnervöser Erkrankungen

Neben der prominenten Rolle von ASIC1a beim ischämisch bedingten neuronalen Zelltod ist noch bei einer Reihe anderer neuropsychiatrischer Erkrankungen eine Beteiligung von ASICs beschrieben worden: so bei der Demyelinisierung und axonalen Schädigung bei Multipler Sklerose [Friese et al., 2007, Vergo et al., 2011], der Huntingtin-Polyglutamin-Aggregation und Neurodegeneration bei Chorea Huntington [Wong et al., 2008], malignen Gliomen [Kapoor et al., 2009], über die Amygdala vermittelten Angstreaktionen [Maren, 2009, Grégoire and Matricon, 2009, Ziemann et al., 2009] und Depression [Coryell et al., 2009]. ASIC1a scheint auch für die Beendigung von epileptischen Anfällen durch Gewebeazidose essentiell zu sein [Ziemann et al., 2008]. Wie auch im Kontext des ischämischen neuronalen Zelltods stellen ASICs bei vielen dieser pathologischen Zustände das entscheidende Bindeglied zwischen Gewebeazidose und Anstieg des intrazellulären Kalziums her.

1.2.4 ASICs im peripheren Nervensystem

Im peripheren Nervensystem (PNS) ist neben der auch im ZNS anzutreffenden Expression von ASIC1a-, ASIC2a- und ASIC2b-Untereinheiten [Benson et al., 2002, Babiniski et al., 2000, Deval et al., 2004] insbesondere auch die Expression von ASIC3-Untereinheiten beschrieben [Xie et al., 2002, Benson et al., 2002]. Funktionelle ASIC3-Homomere werden bei $\text{pH}_{50} = 6,7$ halbmaximal aktiviert [Sutherland et al., 2001] und gehören damit zu den säuresensitivsten ASIC-Kanälen. Die säureaktivier-

ten Ströme durch ASIC3-Homomere und ASIC2b-/ASIC3-Heteromere zeigen zunächst einen größeren, transienten Anteil, welcher dann abnimmt und in einen kleineren, jedoch anhaltenden Anteil übergeht. Diese anhaltenden Ströme („sustained currents“) sistieren erst nach Wiederanstieg des extrazellulären pH-Wertes [Waldmann et al., 1997a, Lingueglia et al., 1997]. Im PNS sind ASICs an verschiedenen Prozessen beteiligt, die eine Detektion von Azidose erfordern: ASIC1 und ASIC3 finden sich im Glomus caroticum und spielen dort eine Rolle bei der Chemozeption von pH-Wert und Hyperkapnie [Tan et al., 2007], womit eine mögliche Verbindung zur zentralen Atemregulation gegeben ist. Damit tragen ASICs bedeutend zur systemischen Regulation des Säure-Base-Haushalts bei [Tresguerres et al., 2010]. Daneben sind insbesondere ASIC3-Untereinheiten an der Nozizeption bei Migräne [Yan et al., 2011] und bei kardialer Ischämie [Sutherland et al., 2001], sowie dem säureinduzierten Schmerzempfinden in der Skelettmuskulatur [Light et al., 2008, Fujii et al., 2008] und der Haut [Price et al., 2001, Jones et al., 2004] beteiligt. Interessanterweise konnte passend zu diesen Erkenntnissen auch für manche Analgetika aus der Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) bzw. Cyclooxygenase-Inhibitoren (COX-Inhibitoren) wie etwa Acetylsalicylsäure, Diclofenac oder Flurbiprofen [Voilley et al., 2001, Jones et al., 2004] und auch für das Lokalanästhetikum Lidocain [Lin et al., 2011] nachgewiesen werden, dass sie ASIC-Ströme inhibieren (und z.T. auch die Expression von ASICs vermindern) und dadurch zu ihrem antinozizeptiven Effekt beitragen. Darüber hinaus ist ASIC2 für die Funktion der Barorezeptoren am Aortenbogen erforderlich und dadurch an der systemischen Blutdruckregulation beteiligt [Lu et al., 2009]. Die Beteiligung von ASIC2 an der Chemozeption der Geschmacksqualität „sauer“ wird noch kontrovers beurteilt [Lin et al., 2002, Richter et al., 2004, Shimada et al., 2006].

1.3 Weitere Elemente der neuronalen Kalziumregulation

1.3.1 Spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanäle

Neben den NMDA-Rezeptoren und manchen ASICs können auch spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (LTCC, Ca_V1) einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle ermöglichen [Striessnig et al., 2006]. In Neuronen des ZNS werden vor allem die Isoformen $\text{Ca}_V1.2$ und $\text{Ca}_V1.3$ exprimiert; diese werden durch Depolarisation auf ca. -37 mV bis -4 mV aktiviert und führen zu einem Anstieg der lokalen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration [Catterall et al., 2005]. LTCC unterscheiden sich pharmakologisch von anderen spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen dadurch, dass sie durch Dihydropyridine wie Amlodipin, Nifedipin oder Nimodipin blockiert werden können [Striessnig et al., 2006]. Im ZNS sind LTCCs im Zusammenhang mit synaptischer Plastizität [Sinnegger-Brauns et al., 2004] sowie Etablierung [Langwieser et al., 2010] und Auslöschung [Busquet et al., 2008] von konditionierter Angst beschrieben. Es gibt auch Hinweise, dass LT-

CCs an der Pathophysiologie des ischämischen neuronalen Zelluntergangs beteiligt sind [Wu et al., 2011]. Auffallend ist, dass unter all diesen (patho-)physiologischen Bedingungen auch ASICs eine Rolle spielen (siehe 1.2), was den Gedanken an einen gemeinsamen Mechanismus mit sequenzieller Beteiligung beider Kanäle nahelegt.

Die säureinduzierten ASIC-Ströme in Neuronen des ZNS reichen aus, um Aktionspotentiale auszulösen. Damit wäre auch zu erwarten, dass - entweder direkt über ASIC-bedingte Depolarisation oder indirekt über die ASIC-bedingte Generierung von Aktionspotentialen - LTCCs aktiviert und diese zu einer Potenzierung des Ca^{2+} -Einstroms führen würden (siehe Abbildung 2). In neuronaler Zellkultur konnte jedoch kein Effekt von LTCCs auf die Amplitude des säureinduzierten Ca^{2+} -Einstroms festgestellt werden [Yermolaieva et al., 2004, Mari et al., 2010]. In den Arbeiten zum säureinduzierten Zelluntergang wurden LTCCs bei den Ischämie-Versuchen in Kultur pharmakologisch blockiert [Xiong et al., 2004, Li et al., 2010a], in den in vivo Experimenten jedoch unbeeinflusst gelassen, sodass hier keine Aussage zum Beitrag der LTCCs zum ischämischen Zelltod in vivo getroffen werden kann.

1.3.2 Das endoplasmatische Retikulum als intrazellulärer Kalzium-Speicher

Es ist bekannt, dass Ca^{2+} -Einstrom von extrazellulär in Neuronen zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) durch den Ryanodin-Rezeptor (RyR) führt (sog. calcium induced calcium release, CICR) und dass dieser Mechanismus zu den Fluktuationen in der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration beispielsweise infolge von neuronalen Aktionspotentialen beiträgt [Sandler and Barbara, 1999]. Der Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Depolarisation von hippokampalen Neuronen ist zumindest zum Teil durch eine direkte Interaktion von LTCC und RyR und die dadurch vermittelte Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER bedingt [Berrouit and Isokawa, 2009]. In vitro Experimente ergaben auch Hinweise, dass CICR zu der ischämischen Ca^{2+} -Überladung von Neuronen beitragen könnte [Bull et al., 2008]. Ein Beitrag von CICR auch zu dem ASIC-vermittelten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Neuronen konnte bisher nicht ausgeschlossen werden [Yermolaieva et al., 2004]. CICR stellt also einen weiteren potentiellen Mechanismus dar, der unter ischämischen Bedingungen zu einem Anstieg der neuronalen Ca^{2+} -Konzentration führen könnte (siehe Abbildung 2).

Eine etablierte Methode, um experimentell den Ca^{2+} -Einstrom aus dem ER auszuschalten, ist die pharmakologische Blockade der sarko-/endoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA) mittels Thapsigargin [Inesi et al., 2005, Thastrup et al., 1990]; dadurch wird das ER als intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher entleert und kann daraufhin nicht mehr zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration beitragen.

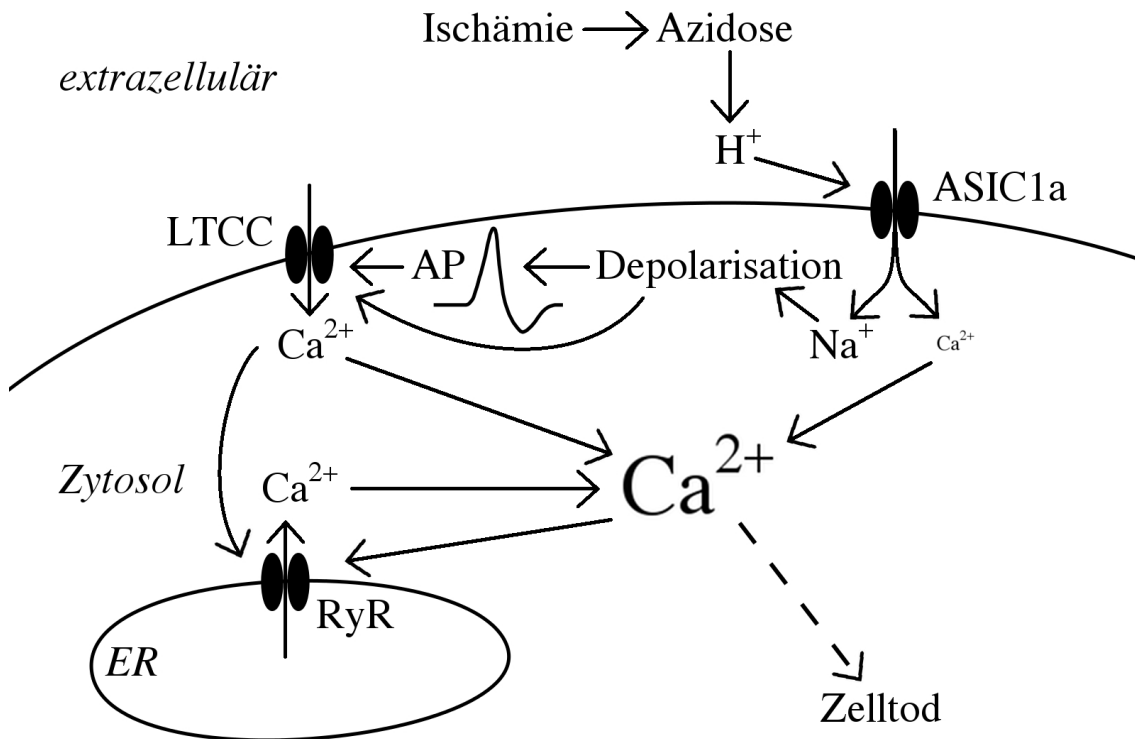


Abbildung 2: **Potentielle Mechanismen des ASIC-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms in Neuronen unter ischämischen Bedingungen.** Bei zerebraler Ischämie kommt es im extrazellulären Raum zur Azidose. Extrazelluläre Protonen (H^+) aktivieren ASIC1a-Homotrimere (ASIC1a); es kommt zum Einstrom von überwiegend Na^+ - und wenigen Ca^{2+} -Ionen. Die Zelle wird depolarisiert. Es werden spannungsabhängige L-Typ Kalzium-Kanäle (LTCC) - ggf. über den Zwischenschritt eines Aktionspotentials (AP) - aktiviert. Diese vermitteln einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen von extrazellulär und lösen über den Ryanodin-Rezeptor (RyR) einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) aus.

1.4 Präkonditionierung und ischämische Toleranz

Unter Präkonditionierung im Zusammenhang mit zerebraler Ischämie versteht man, dass ein subletaler Stimulus (z.B. eine subletale Ischämie) einen neuroprotektiven Effekt gegenüber einer folgenden letalen Ischämie induziert („ischämische Toleranz“). Dass es diese Art von Neuroprotektion gegenüber Ischämie gibt, wurde erstmals 1990 beschrieben [Kitagawa et al., 1990] und konnte mehrfach in vitro in Zellkultur [Bruer et al., 1997] und an Hirnschnitten [Xu et al., 2002] sowie in vivo [Kitagawa et al., 1991, Matsushima and Hakim, 1995] bestätigt werden. In einer klinischen Studie gelang es sogar zu belegen, dass Patienten mit ischämischem Schlaganfall, die zuvor eine transitorische ischämische Attacke (TIA) erlitten hatten, ein besseres neurologisches Endergebnis hatten als Schlaganfall-Patienten ohne vorangegangene TIA [Moncayo et al., 2000]. Aufgrund des Intervalls zwischen subletaler und letaler Ischämie und der Länge des Zeitraums mit erhöhter Toleranz gegenüber ischämischer Schädigung unterteilt man in frühe, für Minuten anhaltende (wahrscheinlich durch posttranslationale Modifikation bedingte) und verzögerte, mehrere Tage anhaltende (wahrscheinlich durch Veränderungen auf Ebene der Genexpression bedingte) ischämische Toleranz [Steiger and Hänggi, 2007]. Mittlerweile hat sich ein umfangreiches Wissen zu den zellulären Mechanismen der Präkonditionierung und der ischämischen Toleranz angesammelt [Davis and Patel, 2003, Lehotský et al., 2009, Correia et al., 2010, Bhuiyan and Kim, 2010]. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass nicht nur Präkonditionierung durch Ischämie, sondern auch Präkonditionierung durch Azidose gegenüber darauf folgender Ischämie neuroprotektiv ist [Zhang et al., 2012].

Wenige Arbeiten haben sich bisher mit der Rolle von ASICs bei Präkonditionierung und ischämischer Toleranz beschäftigt: Es konnte gezeigt werden, dass ischämische Präkonditionierung zu einer Verstärkung der ischämisch bedingten Hochregulation von ASIC2-Untereinheiten in Kortexneuronen auf mRNA- und Protein-Ebene führt [Miao et al., 2010]. Es konnte auch gezeigt werden, dass ischämische Präkonditionierung zu einer Herunterregulation von ASIC1a-Untereinheiten auf mRNA- und Protein-Ebene führt [Pignataro et al., 2011]. Die Hochregulation von weniger säuresensiblen ASIC2-Untereinheiten und die Herunterregulation von den säuresensibleren ASIC1a-Untereinheiten könnten Mechanismen sein, die zu der verzögerten ischämischen Toleranz beitragen.

Der Einfluss von Präkonditionierung auf den durch Ischämie beziehungsweise Azidose ausgelösten Einstrom von Ca^{2+} -Ionen von extrazellulär über LTCC oder aus dem ER mittels CICR wurde bisher nicht untersucht.

2 Zielsetzung

Vier Fragestellungen sollen mit dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Spielen Ca^{2+} -Einstrom von extrazellulär über spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (L-type Ca^{2+} -channels, LTCCs) oder die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (calcium-induced calcium-release, CICR) aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) eine Rolle bei dem säureinduzierten, ASIC-vermittelten Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in Kortexneuronen?
2. Welchen Einfluss hat die Präkonditionierung mittels Azidose für verschiedene Zeiträume auf den säureinduzierten, ASIC-vermittelten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Kortexneuronen?
3. Wird der Beitrag von Ca^{2+} -Einstrom über LTCCs bzw. CICR aus dem ER zum Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch diese Präkonditionierung verändert?
4. Wird durch die Präkonditionierung mittels Azidose in den Kortexneuronen die Expression der ASIC-Untereinheiten 1a, 2a und 2b reguliert?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Imaging-Versuche mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 an primärkultivierten Kortexneuronen der Maus durchgeführt. Es wurden die Effekte von Amilorid, Nimodipin und Thapsigargin auf den säureinduzierten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in den Kortexneuronen untersucht. Die Kortexneurone wurden durch Inkubation bei $\text{pH}_{\text{Präkond.}} = 6,0$ für 1 h, 6 h und über Nacht präkonditioniert. Mittels quantitativer PCR wurden die Expressionsniveaus der Transkripte für die Untereinheiten ASIC1a, - 2a und -2b registriert.

3 Material & Methoden

3.1 Material

3.1.1 Materialien für die Molekularbiologie

- Kit zur RNA-Gewinnung: RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande)
- RNase freie Eppendorf-Gefäße (Starlab, Ahrensdorf, Deutschland)
- DEPC-behandeltes H₂O (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Spektrophotometer: Nanodrop 1000 (NanoDrop Products, Wilmington, Delaware, USA)
- Reverse Transkription: SuperScript III First Strand Synthesis System for RT PCR (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA)
- Kit für konventionelle PCR: Kapa HiFi PCR (Peqlab, Erlangen, Deutschland)
- Thermocycler für konventionelle PCR: Biometra T300 (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Loading Buffer für Agarosegel: Gel Loading Dye Blue 6x (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA)
- 100 bp DNA ladder (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA)
- Agarose NEEO Ultra-Qualität (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Tris Base, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Eisessig (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- SDS, Natriumdodecylsulfat (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Proteinase K (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- RedSafe Nucleic Acid Staining Solution 20.000x (Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg, Deutschland)
- Geldoc: Universal Hood II (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany)
- qPCR-Kit: LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz)

- LightCycler Hybridisierungssonden (TIB Molbiol, Berlin)
- qPCR-Thermocycler: LightCycler 1.5 (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz)
- qPCR-Software: LightCycler Run 5.32 (Idaho Technology, Salt Lake City, Utah / Hoffman-La Roche, Basel, Schweiz)
- Primer für konventionelle PCR und qPCR (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland); Sequenzen siehe 3.2.5.2

3.1.2 Materialien für die *in vivo*-Kultur der Kortexneurone

- 12 mm-Deckgläser (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland)
- Methanol (VWR, West Chester, Pennsylvania, USA)
- 15 ml-Falcon-Röhrchen (BD, Franklin Lakes, USA)
- 50 ml-Falcon-Röhrchen (BD, Franklin Lakes, USA)
- 40 mm-Schalen (TPP, Trasadingen, Schweiz)
- 60 mm-Schalen (BD Falcon, Franklin Lakes, New Jersey, USA)
- HBSS, Hank's Balanced Salt Solution (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA)
- PBS, Phosphate Buffered Saline (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA)
- Neurobasal A Medium 1x (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA)
- L-Glutamin (200 *mmol/L*; Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA)
- B-27 supplement 50x (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA)
- Horse serum (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA)
- Laminin (0,5 *mg/mL*; Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz)
- Poly-L-Ornithin-Hydrobromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Trypsin, aus Schweinepankreas (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Pasteurpipetten, ungestopft, dampfsterilisiert
- Pasteurpipetten, gestopft, dampfsterilisiert
- MES buffer solution (0,5 *mol/L*; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 0,20 μ m-Filter (Corning Incorporated, New York, USA)
- 0,45 μ m-Filter (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA)

- Inkubatoren:
 - MCO-5AC UV (Sanyo, München, Deutschland)
 - CB 150 (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
- Mikroskop für die Präparation der Mäuse: Zeiss Stemi DV4 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

3.1.3 Chemikalien für Badlösungen

- NaCl (VWR, West Chester, Pennsylvania, USA)
- KCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- HEPES, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- MES, 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- CaCl₂ (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- MgCl₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Glukose (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- TMA-OH, Tetramethylammoniumhydroxid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- HCl (1 mol/L; Merck, Darmstadt, Deutschland)

3.1.4 Materialien für das Fura-2-Imaging in Neuronen

- Inverses Mikroskop: Olympus XI 71 (Olympus, Tokyo, Japan)
- Objektiv: Olympus UApo/340 20x (Olympus, Tokyo, Japan)
- Fura-Filter 510 nm: AHF 400DCLP D510/40 (AHF, Tübingen, Deutschland)
- digitale CCD Kamera: Sensicam qe (PCO AG, Kelheim, Deutschland)
- Software:
 - Till Vision 4.0.1.3. (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland)
 - Microsoft Excel für Mac 12.2.8. (Microsoft, Redmond, Washington, USA)
- Monochromator: Polychrome V (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland)
- Pumpe: Reglo Analog (Ismatec, Glattbrugg, Schweiz)
- Mikromanipulator SM I (Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland)

- Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Fura-2-AM (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA)

3.1.5 Pharmaka

- Amilorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Nimodipin (Tocris, Bristol, England)
- Thapsigargin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

3.1.6 Donor-Mäuse für die Gewinnung von Kortexneuronen

Trächtige Mäuse (C57BL/6) wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Kortexneurone wurden von neugeborenen Mäusen an Tag 1-3 nach der Geburt gewonnen.

Des weiteren wurden ASIC1^{-/-}-Mäuse verwendet, bei denen das ACCN2-Gen ausgeschaltet wurde. Das ACCN2-Gen kodiert die Transkripte für die Proteine ASIC1a und ASIC1b.

3.2 Methoden

3.2.1 Kultur der Kortexneurone aus neugeborenen Mäusen

3.2.1.1 Vorbereitung der Deckgläser und Kulturschalen

Um das Anheften und das Überleben der Neurone in den Kulturschälchen zu ermöglichen, mussten die Oberflächen der Schälchen mit Bestandteilen der physiologischen Extrazellulärmatrix beschichtet werden.

Die 12 mm-Deckgläser wurden zunächst zur Entfettung in Methanol eingelegt und anschließend dampfsterilisiert. Jeweils 4-5 Deckgläser wurden in eine 40 mm-Schale gelegt. Die 60 mm-Schalen erhielten keine zusätzliche Behandlung vor der Beschichtung.

Die 60 mm-Schalen und die 12 mm-Deckgläser in 40 mm Schalen wurden durch das gleiche Verfahren beschichtet. Die applizierten Volumina waren 2 ml für eine 60 mm-Schale und ca. 50-70 μ L pro Deckglas:

1. Poly-L-Ornithin (10 μ g/L, in H₂O gelöst) für 30 min bei 37°C
2. Waschen mit HBSS
3. Laminin (auf 10 μ g/L in PBS verdünnt) für 30 min bei 37°C
4. Waschen mit HBSS
5. Waschen mit Neurobasal A Medium

6. Vorlegen von Präpmedium (3 ml pro 60 mm-Schale, 1 ml pro 40 mm-Schale; Herstellung siehe 3.2.1.2) für anschließendes Aussäen der Zellsuspension

3.2.1.2 Medien für die Kultur der Kortexneurone

- **Medium für die Präparation der Kortexneurone (Präpmedium):**

50 ml Neurobasal Medium wurde mit 125 μ l L-Glutamin (200 mM; Endkonzentration: 500 μ M) und mit 2,5 ml Pferdeserum versetzt.

- **Medium für die Zellkultur der Kortexneurone (Kulturmedium):**

50 ml Neurobasal Medium wurde mit 125 μ l L-Glutamin (200 mM; Endkonzentration: 500 μ M) und 1 ml B-27 supplement 50x versetzt.

Vor Gebrauch wurden die Medien filtriert (Filtergröße 0,20 μ m).

3.2.1.3 Präparation und Zellkultur der Kortexneurone

Die Präparation und anschließende Übernahme der Kortexneurone in Zellkultur wurde unter der Sterilbank durchgeführt, um mikrobielle Kontaminationen zu vermeiden. Die Instrumente für die Präparation wurden vor Benutzung mit 70%-igem Ethanol desinfiziert.

Die 1-3 Tage alten Mäuse wurden mit einer Schere dekapitiert. Der Schädel wurde von dorsal mit einem medianen Scherenschnitt, beginnend am Foramen magnum, eröffnet. Es folgten zwei weitere Schnitte mit der Schere vom Foramen magnum in Richtung rechtes und linkes Ohr, um eine möglichst große Öffnung zu erhalten. Die bedeckende Kopfhaut wurde beiderseits mit einer Pinzette vom Einschnitt zur Seite weggezogen. Mit einem Spatel wurde das Gehirn vorsichtig aufgeladen und in HBSS-gefüllte 40 mm-Schälchen (auf Eis) überführt. Unter dem Mikroskop (8-fache Vergrößerung) wurden die beiden Großhirnhemisphären mit Pinzetten vom Rest des Gehirns getrennt. Anschließend wurden die Meningen von den Hemisphären abgezogen. Die Hemisphären wurden durch Gegeneinanderschneiden zweier Pinzetten in kleine Stücke getrennt. Die so zerkleinerten Kortexhälften wurden in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und darin 2 mal mit HBSS gewaschen. Nun wurde einmal mit Trypsin (150 μ g/mL; in HBSS gelöst) gewaschen. Dann wurde das Gewebe für 8 min bei 37°C mit Trypsin verdaut. Um den enzymatischen Prozess zu beenden, wurde einmal mit Präpmedium und anschließend zweimal mit HBSS gewaschen. Nun wurden ca. 2-3 ml Präpmedium hinzugegeben und die Neurone wurden mit polierten Pasteurpipetten (3 Stück, mit abnehmendem Öffnungsdurchmesser, gestopft) durch wiederholtes Aufziehen weiter mechanisch vereinzelt, bis sich eine trübe Suspension ergab. Diese wurde auf mindestens 8 ml mit Präpmedium aufgefüllt und die Neurone auf den beschichteten Coverslips bzw. 60 mm-Schalen nach folgenden Richtwerten ausgesät:

- für die Zellkultur zum späteren Fura-2-Imaging: 1 Hemisphäre auf zwei 35 mm-Schalen

- für die Zellkultur zur späteren RNA-Isolierung: 2 Hemisphären auf eine 60 mm-Schale

Nach 30 min bei 37°C und 5% CO₂ wurde das gesamte Medium abgesaugt, einmal mit Kulturmedium gespült und dann die endgültige Menge Kulturmedium hinzugegeben (2 ml pro 40 mm-Schale; 6 ml pro 60 mm-Schale).

Die Neurone wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in Kultur gehalten. Am 4. und 8. Tag in Kultur wurde 50% des Mediums durch frisches Kulturmedium ersetzt. Am 10.-12. Tag in Kultur wurden die Neurone für das Fura-2-Imaging bzw. die RNA-Gewinnung benutzt. Zu diesem Zeitpunkt exprimieren die Neurone elektrophysiologisch nachweisbar ASICs [Alvarez de la Rosa et al., 2003, Li et al., 2010b].

3.2.2 Präkonditionierung der Kortexneurone

Das Präkonditionierungsmedium wurde auf Basis des Kulturmediums hergestellt. MES buffer solution (500 mM) wurde 1:100 in Kulturmedium verdünnt, sodass sich ein Kulturmedium mit einer MES-Konzentration von 5 mmol/L ergab. Dann wurde mit HCl (1 mol/L) der pH-Wert auf 6,0 eingestellt. Vor Gebrauch wurde das Präkonditionierungsmedium nochmals filtriert (Filtergröße: 0,20 µm). Die folgende Applikation des Mediums wurde unter sterilen Bedingungen unter der Zellkultur-Bench durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden.

Die Deckgläser mit der Zellkultur für das Imaging wurden 1 h, 6 h oder am Abend vor dem Versuch (o.n.-Wert) in einer 40 mm-Schale mit Präkonditionierungsmedium eingelegt und bis zum Versuch bei 37°C und 5% CO₂ gehalten.

Das Medium der Zellkultur für die RNA-Isolation (60 mm-Schalen) wurde in gleichem zeitlichen Abstand komplett abgesaugt, durch 5 mL Präkonditionierungsmedium ersetzt und ebenfalls bis zur RNA-Isolation bei 37°C und 5% CO₂ gehalten.

3.2.3 Ca²⁺-Imaging in neuronaler Zellkultur

3.2.3.1 Prinzip des Fura-2-Fluoreszenz-Imagings

Als Ca²⁺-sensitiver Fluoreszenzfarbstoff wurde Fura-2-AM (Fura-2-Acetoxy-methylester) eingesetzt. Fura-2-AM ist eine lipophile Ester-Verbindung, die durch die Zellmembran diffundieren kann. Im Zytosol wird die Ester-Verbindung durch unspezifische Esterasen gespalten, sodass eine hydrophile Substanz entsteht, die in der Zelle gefangen ist und dort als Ca²⁺-Sensor fungieren kann. Die Anregung erfolgte mit den Wellenlängen $\lambda_1 = 340$ nm und $\lambda_2 = 380$ nm. Die Wellenlänge des gemessenen emittierten Lichts betrug $\lambda_{Emiss.} = 510$ nm. Mit zunehmender Ca²⁺-Konzentration nimmt F_{340} (die Intensität der Fluoreszenz nach Anregung mit 340 nm) zu, wohingegen F_{380} (die Intensität der Fluoreszenz nach Anregung mit 380 nm) abnimmt und vice versa. Die Intensitäten der Fluoreszenzen sind daneben auch noch in propor-

tionaler Weise von der Zelldicke und der Fura-2-Konzentration in der Zelle abhängig. Um das Problem dieser unbekannten Größen zu umgehen, wurde der Quotient $\frac{F_{340}}{F_{380}}$ gebildet. Dieser ist weder von der Zelldicke noch der Fura-2-Konzentration abhängig. Außerdem ist er über einen weiten Bereich direkt proportional zur Ca^{2+} -Konzentration. Für unsere Zwecke wurde der Quotient noch etwas modifiziert, um die Hintergrundfluoreszenz von nicht-neuronalem Gewebe und auch die Eigenfluoreszenz von Amilorid herauszurechnen:

$$\text{Ratio } 340/380 := \frac{F_{\text{Neuron},340} - F_{\text{Hintergrund},340}}{F_{\text{Neuron},380} - F_{\text{Hintergrund},380}}$$

$F_{\text{Hintergrund}}$ wurde über einer ausgewählten Fläche ohne zelluläre Strukturen auf dem Deckgläschen gemessen. Der Wert *Ratio* 340/380 als Maß für die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration wurde gegen die Zeit aufgetragen. *Ratio* 340/380 ist eine einheitenlose Größe.

3.2.3.2 Beladen der Neurone mit Fura-2-AM

2 μL der Pluronic-Stammlösung (25 mg Pluronic F-127 in 100 μL DMSO gelöst, d.h. 250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) und 3 μL der Fura-Stammlösung (50 μg bzw. 50 nmol Fura-2-AM in 50 μL DMSO gelöst; also 1 nmol/ μL) wurden in 2 mL Badlösung (pH = 7,45) gegeben, sodass sich folgende Zusammensetzung ergab:

Pluronic:	250 mg/L
Fura-2-AM:	1,5 $\mu\text{mol}/\text{L}$
DMSO	0,25%

In dieser Lösung wurden die Deckgläser mit der Zellkultur für 15 min bei 37°C, 5% CO_2 und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.2.3.3 Badlösungen für das Imaging

Die beim Imaging eingesetzte Standardbadlösung zur Perfusion der Deckgläser enthielt folgende Zusammensetzung:

NaCl	100 mM
KCl	5,4 mM
HEPES	10 mM
MES	10 mM
CaCl_2	2 mM
MgCl_2	1 mM
D-Glukose	5,5 mM

Für die Standardbadlösung wurde der pH-Wert mit TMA-OH (Tetramethylammoniumhydroxid) auf 7,45 eingestellt. Für die Lösung, mit der die säureinduzierte Ca^{2+} -Antwort in den Neuronen hervorgerufen wurde, wurde der pH-Wert mit TMA-OH auf 6,0 bzw. 5,0 eingestellt.

Um die Ca^{2+} -Antwort in Neuronen mittels hoher K^{+} -Konzentration zu induzieren, wurde folgende Lösungs-Zusammensetzung gewählt:

NaCl	85,4 mM
KCl	20 mM
HEPES	10 mM
MES	10 mM
CaCl_2	2 mM
MgCl_2	1 mM
D-Glukose	5,5 mM

Der pH-Wert wurde mit TMA-OH auf 7,45 eingestellt.

Vor Gebrauch wurden alle Lösungen filtriert (Filter 0,45 μm).

3.2.3.4 Versuchsaufbau für das Fura-2-Imaging

Das Deckglas mit der Fura-2-beladenen Zellkultur wurde unter einem inversen Mikroskop (Olympus IX 71) betrachtet. Die Belichtung im Fluoreszenzmodus ($\lambda_1 = 340 \text{ nm}$ und $\lambda_2 = 380 \text{ nm}$) wurde durch den computergesteuerten Monochromator übernommen. Das emittierte Licht wurde durch ein Objektiv mit 20-facher Vergrößerung (Objektiv: Olympus UApo/340) und anschließend einen 510 nm-Filter gelenkt und durch eine nachgeschaltete, digitale Kamera (Sensicam qe) registriert. Die zeitlich korrekte Abfolge von Belichtung und Aufnahme wurde durch die Till Vision-Software koordiniert. Bei allen Versuchen betrug die Bildaufnahme-Frequenz 0,2 Hz. Die Anregungsintensität wurde während der Versuche auf 100% gestellt.

Die Perfusion der Mikroskopkammer wurde über einen Mikromanipulator direkt auf die betrachteten Zellen eingestellt, sodass ein schneller Lösungsaustausch über dem gesamten Sichtfeld sichergestellt war. Die Perfusionspumpe (Reglo Analog) wurde so eingestellt, dass Zulauf- und Ablaufgeschwindigkeit der Badlösung gleich war und damit ein konstanter Flüssigkeitspegel in der Kammer sichergestellt war.

3.2.3.5 Auswahl des Versuchsareals in der neuronalen Zellkultur

Zunächst wurde im Fluoreszenzmodus (kontinuierliche Belichtung mit $\lambda_2 = 380 \text{ nm}$, 30% Intensität) auf dem Deckglas ein geeignetes Sichtfeld für den Versuch ausgewählt. Dabei wurde insbesondere darauf geachtet, dass die Hintergrundfluoreszenz zwischen den Neuronen möglichst gering war. Eine hohe Hintergrundfluoreszenz wäre möglicherweise ein Hinweis auf Überwucherung mit nicht-neuronalen Zellen gewesen, die ein Hindernis für den Lösungswechsel dargestellt hätte.

3.2.3.6 Protokolle für den Lösungswechsel beim Fura-2-Imaging

- **Säureinduzierte Ca^{2+} -Antwort in Kortexneuronen:**

Um die ASICs zu aktivieren, wurden die Kortexneurone mit Badlösungen mit

$pH_1 = 6,0$ und mit $pH_2 = 5,0$ superfundiert:

Zeit	pH
0 s	7,45
100 s	6,0
300 s	7,45
500 s	5,0
700 s	7,45
800 s	Ende

- **Säureinduzierte Ca^{2+} -Antwort in Anwesenheit von Amilorid:**

Es wurde eine Stammlösung Amilorid (5 mM in H_2O) hergestellt; diese wurde 1:50 in den Badlösungen mit den verschiedenen pH-Werten verdünnt, sodass eine Endkonzentration von 100 μM erreicht wurde. Das Protokoll war folgendermaßen:

Zeit	pH	Pharmakon
0 s	7,45	
100 s	6,0	
300 s	7,45	
500 s	5,0	
700 s	7,45	
850 s	7,45	+ Amilorid
1.000 s	6,0	+ Amilorid
1200 s	7,45	+ Amilorid
1400 s	5,0	+ Amilorid
1600 s	7,45	+ Amilorid
1750 s	7,45	
1900 s	6,0	
2100 s	7,45	
2300 s	5,0	
2500 s	7,45	
2700 s	Ende	

- **Säureinduzierte Ca^{2+} -Antwort in Anwesenheit von Nimodipin:**

Es wurde eine Stammlösung (10 mM in DMSO) hergestellt; diese wurde 1:2.000 in den Badlösungen mit den verschiedenen pH-Werten verdünnt, sodass eine Endkonzentration von 5 μM zum Einsatz kam:

Zeit	pH	Pharmakon
0 s	7,45	
100 s	6,0	
300 s	7,45	
500 s	5,0	
700 s	7,45	
850 s	7,45	+ Nimodipin
1000 s	6,0	+ Nimodipin
1200 s	7,45	+ Nimodipin
1400 s	5,0	+ Nimodipin
1600 s	7,45	+ Nimodipin
1800 s	Ende	

Da uns die Reversibilität der Nimodipin-Blockade nicht bekannt war, wurde nicht wie bei den Amilorid-Versuchen nach dem Einsatz des Pharmakons nochmals mit den beiden pH-Werten aktiviert. Um die Veränderung in der Ca^{2+} -Amplitude, die allein durch die zweimalige Applikation von Azidose und nicht durch die Zugabe von Nimodipin bedingt war, berechnen zu können, wurden Kontrollmessungen durchgeführt. Diese beinhalteten den gleichen zeitlichen Ablauf der pH-Wechsel, jedoch wurde kein Nimodipin eingesetzt.

- **Säureinduzierte Ca^{2+} -Antwort in Anwesenheit von Thapsigargin:**

Es wurde eine Stammlösung von Thapsigargin (1 mM in DMSO) hergestellt; zum Einsatz kam eine Endkonzentration von 1 μM . Die Bindung von Thapsigargin an die endoplasmatische Ca^{2+} -ATPase ist irreversibel [Thastrup et al., 1990]. Um auszuschließen, dass sich Reste von Thapsigargin aus Vorversuchen in den Perfusionsschläuchen hielten und bereits zu Beginn des Versuchs einen Effekt auf die Neurone ausübten, wurde Thapsigargin (2 μM in Badlösung mit $\text{pH} = 7,45$ verdünnt) direkt in die Mikroskopkammer appliziert. Dabei wurde nochmals ca. 1:2 in dem Kammervolumen verdünnt, sodass die Endkonzentration von 1 μM zustande kam. Nach jedem Versuch mit Thapsigargin wurde die Mikroskopkammer zunächst mit reinem Ethanol und dann mit Badlösung gespült, um mögliche Rückstände des Pharmakons herauszuwaschen. Der zeitliche Ablauf der Versuche war folgendermaßen:

Zeit	pH	Pharmakon
0 s	7,45	
100 s	6,0	
300 s	7,45	
500 s	5,0	
700 s	7,45	
800 s	7,45	+ Thapsigargin
1000 s	7,45	
1100 s	6,0	
1300 s	7,45	
1500 s	5,0	
1700 s	7,45	
1900 s	Ende	

Da die Thapsigargin-Blockade irreversibel ist, wurden Kontrollmessungen durchgeführt, um die Veränderung in der Ca^{2+} -Amplitude, die allein auf die wiederholte Applikation von den beiden sauren Badlösungen zurückzuführen war, berechnen zu können. Diese hatten den gleichen zeitlichen Ablauf, jedoch wurde nach 800 s kein Thapsigargin hinzugefügt.

- **Säureinduzierte Ca^{2+} -Antwort in ASIC1^{-/-}-Neuronen:**

Die Knockout-Neurone wurden ohne pharmakologische Beeinflussung gemessen:

Zeit	pH
0 s	7,45
100 s	6,0
300 s	7,45
500 s	5,0
700 s	7,45
1000 s	6,0
1200 s	7,45
1400 s	5,0
1600 s	7,45

- **Induzieren der Ca^{2+} -Antwort mit hochmolarem K^{+} :**

Um die spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanäle zu aktivieren, wurden die Kortexneurone durch Badlösung mit $[\text{K}^{+}] = 20 \text{ mM}$ depolarisiert. Die Superfusion mit kaliumreicher Badlösung dauerte 20 s. Anschließend wurde wieder mit normaler Badlösung superfundiert.

3.2.3.7 Auswertung der Fura-2-Experimente

Mit Hilfe der Till Vision-Software wurde der Ausgabewert *Emission 340/380* (siehe 3.2.3.1) als Funktion der Zeit für jeden Versuch generiert. Die weitere Auswertung

wurde in Excel durchgeführt. Bei allen Imaging-Versuchen wurden die *Amplituden* des Ca^{2+} -Peaks nach Superfusion mit $\text{pH}_1 = 6,0$ und $\text{pH}_2 = 5,0$ bzw. 20 mM K^+ bestimmt. Dazu wurde zunächst aus den 8 Bildern (40 s) vor dem Lösungswechsel der Mittelwert als *Baseline* bestimmt. Neurone mit einer initialen *Baseline* ≥ 600 wurden als geschädigt eingestuft und gingen nicht weiter in die Statistik ein. Der anschließende *Peak* wurde als das Maximum der folgenden 15 Bilder (75 s) ermittelt. Dann wurde die Differenz gebildet:

$$\textit{Amplitude} = \textit{Peak} - \textit{Baseline}$$

Die zeitlichen Verläufe der *Emission 340/380* wurden für jedes Neuron nochmals einzeln begutachtet. Zellen, die eine unruhige *Baseline* zeigten oder deren Peak nicht von vorherigen spontanen Schwankungen in der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration unterschieden werden konnte, wurden aus der weiteren Statistik ausgeschlossen. Gleiches gilt für Neurone deren Ca^{2+} -Konzentration im Laufe des Versuchs kontinuierlich anstieg oder deren Peak eine untypische Konformation aufwies. Zellen, deren 1. *Amplitude* ≤ 50 war, wurden als nicht-antwortend eingestuft und gingen nicht in Mittelwerte von Amplituden mit ein.

Es wurde darauf geachtet, aus einer Präparation möglichst alle 4 Bedingungen der Präkonditionierung (0 h, 1 h, 6 h, o.n.) zu messen. An Stellen, wo dies nicht gelang, wird ausdrücklich darauf hingewiesen (siehe Ergebnisteil).

Die statistische Auswertung wurde mittels t-Test durchgeführt. Ein $p \leq 5\%$ wurde als signifikant erachtet.

3.2.4 RNA-Gewinnung aus den primärkultivierten Kortexneuronen und Herstellung der cDNA

Bei der Gewinnung und Weiterbearbeitung der RNA wurde auf saubere Arbeitsweise, insbesondere durch Gebrauch von Einmalhandschuhen und gestopften Pipettenspitzen, geachtet, um Kontaminationen mit ubiquitär vorkommenden RNAsen zu vermeiden.

3.2.4.1 RNA-Gewinnung aus der Zellkultur der Kortexneurone

Die RNA-Gewinnung wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen durchgeführt, wobei die QIAshredder spin column und die RNeasy spin column, sowie verschiedene Waschpuffer des Kits zum Einsatz kamen. Die Schritte waren, wie folgt:

1. Zellkultur auf Eis
2. Absaugen des Kulturmediums, Waschen mit 5 mL HBSS, Absaugen des HBSS
3. Zugabe von 600 μL RLT Buffer
4. Abschaben der Zellen

5. Überführen der Zellsuspension in die QIAshredder spin column
6. 2 min Zentrifugieren bei 16.100 min^{-1}
7. Zelllysate mit 600 μL 70%-igem Ethanol versetzen und durch mehrfaches Pipettieren mischen
8. 700 μL der Zelllysate-Ethanol-Mischung in die RNeasy spin column überführen, 30 s Zentrifugieren bei 10.000 min^{-1}
9. Eluat verwerfen
10. den Rest der Zelllysate-Ethanol-Mischung in die RNeasy spin column überführen, 30 s Zentrifugieren bei 10.000 min^{-1}
11. Eluat verwerfen, Zugabe von 700 μL RW1-Puffer, 30 s Zentrifugieren bei 10.000 min^{-1}
12. Eluat verwerfen, Zugabe von 500 μL RPE-Puffer, 30 s Zentrifugieren bei 10.000 min^{-1}
13. Eluat verwerfen, Zugabe von 500 μL RPE-Puffer, 2 min Zentrifugieren bei 10.000 min^{-1}
14. die RNeasy spin column wird in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß überführt
15. Zugabe von 30 μL DEPC- H_2O , 1 min Zentrifugieren bei 10.000 min^{-1}

Die aufgefangene RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.2.4.2 Beurteilung der RNA-Qualität

Zur Beurteilung der RNA-Qualität wurde die RNA auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde 1 μL RNA mit 4 μL DEPC- H_2O und 1 μL Loading-Buffer für 10 min auf 65°C erhitzt. Anschließend wurde die RNA auf 1%-igem Agarosegel (Herstellung siehe 3.2.5.3) bei 80 V ca. 15-20 min elektrophoretisch aufgetrennt. Konnte man die ribosomalen Doppelbanden erkennen, wurde die RNA als intakt betrachtet und konnte weiterverwendet werden.

3.2.4.3 Messen der RNA-Konzentration

Bevor die RNA revers transkribiert wurde, wurde an einem Nanodrop-Spektrometer die Konzentration der RNA bestimmt.

3.2.4.4 cDNA-Synthese

Die reverse Transkription (RT) wurde mit dem SuperScript III-Kit der Firma Qia-gen nach der beiliegenden Gebrauchsanweisung durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass nicht mehr als 5 µg Gesamt-RNA in einen Ansatz gelangten, wie es von den Herstellerangaben gefordert wurde. Die RT-Reaktion wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Zunächst wurden folgende Reagenzien in einem 200 µL-Gefäß zusammenpipettiert:

bis zu 5 µg Gesamt-RNA	n µL
oligo(dT) ₂₀ -Primer (50 µM)	1 µL
dNTP-Mix (10 mM)	1 µL
DEPC-H ₂ O	bis 10 µL
2. Das Reaktionsgefäß wurde im Thermocycler für 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend für mindestens 1 min auf 4°C gekühlt.
3. Für jedes Reaktionsgefäß wurde folgender cDNA-Synthese-Mix (je 10 µL) zusammenpipettiert:

RT Buffer (10x)	2 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 µL
DTT (0,1 M)	2 µL
RNaseOUT (40 U/µL)	1 µL
SuperScript III RT (200 U/µL)	1 µL
4. Jedem Reaktionsgefäß wurden 10 µL des cDNA-Synthese-Mix hinzugefügt.
5. Inkubation im Thermocycler:
 - (a) 50 min bei 50°C
 - (b) 5 min bei 85°C zur Beendigung der Reaktion
 - (c) Pause bei 4°C
6. Zugabe von 1 µL RNase H zu jedem Reaktionsgefäß, Inkubation für 20 min bei 37°C

Für jede Synthese wurden Negativkontrollen ohne RT-Enzym durchgeführt. Die cDNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

3.2.4.5 Kontrolle der cDNA-Synthese mittels HPRT-PCR

Um den Erfolg der RT-Reaktion zu überwachen, wurde eine konventionelle PCR (siehe 3.2.5) mit einem intronüberspannenden Primerpaar für HPRT, einem ubiquitär exprimierten Gen, durchgeführt. Bei Vorliegen reiner cDNA sollte ein Fragment von 248 bp entstehen. Sollte eine Verunreinigung mit genomischer DNA vorliegen,

entstünde ein Fragment von ca. 1.200 bp. Bei Verunreinigung mit genomischer DNA entstünde des weiteren auch in der Negativkontrolle der RT-Reaktion ein Produkt.

Die cDNA wurde nur weiterverwendet, wenn in der HPRT-PCR genau ein Produkt von ca. 248 bp entstanden war und die Negativkontrolle kein Produkt ergeben hatte.

3.2.5 konventionelle PCR

3.2.5.1 Pipettierschema und Cyclereinstellungen

Für die konventionelle PCR wurde das Kapa HiFi PCR Kit der Firma Peqlab benutzt. Folgendes Pipettierschema kam bei allen Primerpaaren (außer der Genotypisierung, siehe dafür 3.2.6.2) zum Einsatz:

H ₂ O	33,5 µL
5x Puffer (KapaHiFi Fidelity Buffer)	10,0 µL
dNTP-Mix (je 10 mM)	1,5 µL
Primer forward (10 µM)	1,5 µL
Primer reverse (10 µM)	1,5 µL
Kapa-HiFi-Polymerase (1 U/µL)	1,0 µL
Template	1,0 µL
50,0 µL	

Die Einstellungen für den Thermocycler waren für alle durchgeführten konventionellen PCR-Reaktionen folgende (für die Genotypisierung siehe 3.2.6.2):

1.	initiale DNA-Denaturierung	98°C	3 min	35 Zyklen
2.	DNA-Denaturierung	98°C	40 s	
3.	Annealing	62°C	40 s	
4.	Elongation	72°C	20 s	
5.	finale Elongation	72°C	5 min	
6.	Kühlen	4°C	unbegrenzt	

3.2.5.2 PCR-Primer

Die Primer, deren Bezeichnungen mit mASIC bzw. mit mCaV beginnen, wurden so gewählt, dass ihre Bindungssequenz eine Stelle beinhaltet, an der ein Intron herausgespleißt wurde; sie sollten somit selektiv für cDNA sein. Es wurden folgende Primer benutzt:

Primer	Sequenz 5'→3' (Anzahl der Nukleotide)
HPRT_forw.	GCTGGTGAAAAGGACCTCT (19)
HPRT_rev.	CACAGGACTAGAACACCTGC (20)
mASIC1a_forw.	GCGCTGAAGACTTCAAAGTGG (21)
mASIC1b_forw.	TCCCCACAACCTTCTCAGTGG (20)
mASIC1_rev.	GATGAGCCTCTGCTCCTGG (19)
mASIC2a_forw.	CATCAGCGCTGCCTTCATGG (20)
mASIC2b_forw.	CAGCATGCTGGAGTTCCTGC (20)
mASIC2_rev.	ACTGGCTGTGGATCTGAACC (20)
mCaV1.2_forw.	GTGGCCAGAGCTGCTG (16)
mCaV1.2_rev.	TTCCACACATTGTCTCTGG (19)
mCaV1.3_forw.	TGGCCCGCGTTGCTG (15)
mCaV1.3_rev.	ATTCAACACACTGACGCTG (19)
mCaV1.2_forw2.	TATGGACTGGTTCAAGAGAG (20)
mCaV1.2_rev2.	AATGCAGTTACCGATTCTCG (20)
mCaV1.3_forw2.	AATGCAGGTGGTCTGTGG (18)
mCaV1.3_rev2.	GAATCCTTAGGAAAGTGATGG (21)
GAPDHex1 F	TGTCAGCAATGCATCCTGCA (20)
GAPDHex1 S	GGAAGGGCTCATGACCACA (19)
GAPDHex1,2r	GATGTCATCATACTTGGCAGGTTTC (25)
ASIC-18	CATGTCACCAAGCTCGACGAGGTG (24)
ASIC-53	CCGCCTTGAGCGGCAGGTTTAAAGG (25)
ASIC-NEO	TGGATGTGGAATGTGTGCGA (20)

3.2.5.3 Elektrophorese auf Agarosegel

Zusammensetzung des TAE-Puffer (in wässriger Lösung):

Tris Base 40 mM
Essigsäure 10 mM
EDTA 1 mM

Zur Gelherstellung wurde TAE-Puffer mit 1% (Gewicht) Agarose erhitzt. Dann wurde zum späteren Anfärben der DNA RedSafe (20.000x) in 20.000-facher Verdünnung beigemischt. Das Gel wurde gegossen und für ca. 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Nun wurde das PCR-Produkt aufgetragen und für ca. 20 min bei 100 V der Größe nach aufgetrennt. Zur Orientierung lief auf jedem Gel eine 100 bp-DNA-Leiter mit. Unter UV-Beleuchtung (Bio-Rad Universal Hood II) wurden die entstandenen Produkte betrachtet und dokumentiert.

3.2.6 Genotypisierung der neugeborenen Donor-Mäuse

Alle Mäuse, deren Neurone in Versuchen verwendet wurden und von denen nicht sicher bekannt war, dass sie homozygote Träger eines intakten ASIC1-Gens waren,

wurden einer Genotypisierung unterzogen. Dafür wurden die Enden ihrer Schwänze gekappt; aus deren Lysat wurde DNA für eine anschließende PCR gewonnen. Pro Maus wurden jeweils zwei PCRs durchgeführt; dabei wurden zwei verschiedene 5'-Primer (ASIC-18 und ASIC-NEO) und ein gemeinsamer 3'-Primer (ASIC-53) benutzt. Im ausgeschalteten ASIC1-Gen wurde die Sequenz, in der auch der Wildtyp-spezifische Primer ASIC-18 bindet, durch eine Neomycin-Kassette ersetzt, an welche der Primer ASIC-NEO spezifisch für das ausgeschaltete ASIC1-Gen bindet.

3.2.6.1 DNA-Isolation aus Donor-Mäusen

Proteinase-K-Puffer wurde in folgender Zusammensetzung verwendet:

Tris 10 mM

EDTA 5 mM

SDS 6,9 mM

NaCl 200 mM

Der pH-Wert wurde auf 8,5 eingestellt.

TE-Puffer wurde in folgender Zusammensetzung verwendet:

Tris 10 mM

EDTA 1 mM

Der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.

Die DNA-Isolation lief in folgenden Schritten ab:

1. Proteinase K wurde 1:100 in Proteinase-K-Puffer verdünnt (10 μ L Proteinase K in 1 mL Puffer).
2. pro Mäuseschwanz wurden 500 μ L dieser Proteinase-Puffer-Lösung verwendet
3. über Nacht Inkubation im Schüttler bei 55°C und 300 min⁻¹
4. Vortexen des Lysats
5. 20 min Zentrifugieren bei 14.000 min⁻¹
6. der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß mit 500 μ L Isopropanol (100%) überführt
7. es wurde gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert
8. 10 min Zentrifugieren bei 14.000 min⁻¹
9. der Überstand wurde verworfen
10. das Pellet wurde mit 500 μ L Ethanol (70%) gewaschen
11. 10 min Zentrifugieren bei 14.000 min⁻¹

12. das Ethanol wurde vorsichtig mit der Pipette abgenommen
13. 30 s Zentrifugieren bei 14.000 min^{-1}
14. das Pellet wurde bei geöffnetem Deckel unter der Zellkultur-Bench getrocknet
15. das DNA-Pellet wurde in $100 \mu\text{L}$ TE-Puffer aufgenommen

Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.6.2 PCR zur Genotypisierung

Die Primerkombination ASIC-18 und ASIC-53 war spezifisch für das intakte ASIC1-Gen, wohingegen die Kombination ASIC-53 und ASIC-NEO spezifisch für das ausgeschaltete ASIC1-Gen war (Sequenzen der Primer siehe 3.2.5.2).

Folgendes Pipettierschema wurde für den PCR-Ansatz verwendet:

H ₂ O	14,0 μL
5x Puffer (KapaHiFi Fidelity Buffer)	5,0 μL
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,5 μL
Primer forward (10 μM)	1,0 μL
Primer reverse (10 μM)	1,0 μL
Kapa-HiFi-Polymerase (1 U/ μL)	0,5 μL
DNA (1:10 verdünnt)	3,0 μL
25,0 μL	

Als Negativkontrolle wurde eine Wasserprobe und als Positivkontrolle die DNA einer Maus bekannten Genotyps mitgeführt.

Der Ablauf im Thermocycler war folgendermaßen:

1.	initiale DNA-Denaturierung	98°C	3 min	30 Zyklen
2.	DNA-Denaturierung	98°C	30 s	
3.	Annealing	62°C	30 s	
4.	Elongation	72°C	15 s	
5.	finale Elongation	72°C	5 min	
6.	Kühlen	4°C	unbegrenzt	

Anschließend wurde das PCR-Produkt auf 1%-igem Agarosegel einer Elektrophorese unterzogen (siehe 3.2.5.3). Zeigte sich nur eine Bande bei der Primerkombination, die für das intakte ASIC1-Gen spezifisch war (ASIC-18 und ASIC-53), war das zugehörige Tier homozygot für ASIC1. Zeigte sich nur eine Bande bei der Primerkombination, die für das ausgeschaltete ASIC1-Gen spezifisch war (ASIC-NEO und ASIC-53), war das ASIC1-Gen im zugehörigen Tier ausgeschaltet (ASIC1^{-/-}). Wenn bei beiden Primerkombinationen eine Bande entstand, war das zugehörige Tier heterozygot; Neurone dieser Mäuse wurden nicht für Experimente benutzt.

3.2.7 Quantitative PCR (qPCR; auch Echt-Zeit- oder Real-Time-PCR)

Die qPCR wurde mit dem LightCycler FastStart DNA Master HybProbe Kit in einem LightCycler 1.5 durchgeführt.

3.2.7.1 Prinzip der qPCR mit dem LightCycler-System

Das Prinzip der LightCycler-qPCR beruht auf der Verwendung zweier Hybridisierungs sonden. Bei diesen handelt es sich um Oligonukleotide, die komplementär zur gesuchten DNA zwischen den beiden Primern und in geringem Abstand voneinander gelegen gewählt werden. An der weiter 5'-gelegenen Sonde befindet sich am 3'-Ende ein Fluorescein (FL). Am 5'-Ende der weiter 3'-gelegene Sonde befindet sich ein LC Red 640 (LC640). Beide Moleküle sind Fluorophore. Im Sinne eines FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) können diese beiden als Donor (FL) und Akzeptor (LC640) fungieren: mit der Anregungswellenlänge von $\lambda_1 = 470$ nm wird das Fluorescein (FL) zur Fluoreszenz bei $\lambda_2 = 530$ nm angeregt. Haben die beiden Sonden an das gesuchte Amplikon gebunden und befinden sie sich somit in direkter Nachbarschaft, dient das Emissionslicht λ_2 des Fluoresceins (Donor) als Anregungslicht für die Fluoreszenz des LC640 (Akzeptor) bei $\lambda_3 = 640$ nm. LC Red 640 kann nicht direkt durch λ_1 zur Fluoreszenz angeregt werden. Am Ende eines jeden PCR-Zyklus wird die Fluoreszenz des Fluorescein bei $\lambda_2 = 530$ nm (F_2) und die des LC640 bei $\lambda_3 = 640$ nm (F_3) gemessen. Ausgabewert ist:

$$\frac{F_3}{F_2} := \frac{\text{Fluoreszenz bei } \lambda_3}{\text{Fluoreszenz bei } \lambda_2}$$

Dieser Quotient wird als Maß für die Anzahl der entstandenen Amplikate verwendet und als Funktion der Zyklenzahl C ($\frac{F_3(C)}{F_2(C)}$) aufgetragen.

Nach Abschluss der Kettenreaktion wird eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt. Dabei wird die Temperatur mit $0,2^\circ\text{C}/s$ von 50°C auf 85°C erhöht. Die kontinuierlich gemessene Fluoreszenz wird gegen die Temperatur aufgetragen. Jedes Sondenpaar hat in Abhängigkeit von ihrer Sequenz einen spezifischen Schmelzpunkt, an dem es von der DNA dissoziiert. In der Schmelzkurve ergibt sich ein charakteristisches Maximum. Findet man dieses Maximum vor, kann davon ausgegangen werden, dass ein korrektes PCR-Produkt entstanden ist.

Neben der Schmelzkurven-Analyse ist der Gebrauch von Hybridisierungs sonden ein weiterer Garant für die Spezifität der gemessenen Fluoreszenz für ein bestimmtes PCR-Produkt.

3.2.7.2 Durchführung der qPCR

Sequenzen der Hybridisierungs sonden:

Sonden-Name	Sequenz 5'->3'
GAPDH FL	CCAGAAGACTGTGGATGGCCCCT-FL
GAPDH LC	LC640-TGGAAAGCTGTGGCGTGATGGC-PH
ASIC1 FL	GTGTGGGGAGAGACTGATGAGACATCG-FL
ASIC1 LC	LC640-CGAAGCAGGCATCAAAGTGCAGATCCAC-PH
ASIC2 FL	GGGAAGTGTTACATGTTTAACTCAGGCGAGG-FL
ASIC2 LC	LC640-CCATCTTCTTCATCATCTATATCATCATCG-PH

Pipettierschema für den qPCR-Ansatz:

H ₂ O	10,4 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 µL
Sonde 1 (3 µM)	1,0 µL
Sonde 2 (3 µM)	1,0 µL
Primer forward (10 µM)	1,0 µL
Primer reverse (10 µM)	1,0 µL
Ready Mix	2,0 µL
Template	2,0 µL
20,0 µL	

Die verwendeten Primer waren die gleichen wie in der konventionellen PCR (siehe 3.2.5.2).

Der Ansatz wurde in Glaskapillaren überführt und diese in das LightCycler-Karussell gesteckt. Es wurde kurz zentrifugiert, um die Kapillaren zu fluten. Dann wurde das Karussell in den LightCycler gesetzt.

LightCycler-Protokoll:

1. Amplifikation:

(a)	DNA-Denaturierung	95°C	10 s	45 Zyklen
(b)	Annealing	62°C	20 s	
(c)	Elongation	72°C	20 s	

2. Schmelzkurvenbestimmung

3. Pause bei 40°C

3.2.7.3 Auswertung der qPCR

Da lediglich untersucht werden sollte, ob gewisse Gene durch die Präkonditionierung in ihrem Expressionsniveau herauf- oder herunterreguliert wurden, genügte eine relative Quantifizierung des Expressionsniveaus der untersuchten Gene. Für die relative Quantifizierung wurde eine Normierung auf das Expressionsniveau eines Haushaltsgens, in unserem Falle GAPDH, durchgeführt.

Der Ct-Wert (cycle threshold) für ein Gen wurde ähnlich wie bei anderen qPCR-Verfahren aus der Fluoreszenz-Zyklus-Kurve ($\frac{F_3(C)}{F_2(C)}$) als die Zyklenzahl ermittelt, bei der die Fluoreszenz zum ersten Mal das Hintergrundrauschen überstieg. Um die Expression von einem GenX in Relation zu der von GAPDH zu setzen, wurde vereinfachend folgende Formel gebraucht:

$$rel. Expressionsniveau_{GenX} = \frac{2^{-Ct_{GenX}}}{2^{-Ct_{GAPDH}}} = 2^{(Ct_{GAPDH} - Ct_{GenX})}$$

Voraussetzung für den Gebrauch dieser Formel ist, dass die Effizienz beider Reaktionen (GAPDH-PCR und GenX-PCR) gleich 100% ist, d.h. dass sich die Kopienzahl mit jedem Zyklus verdoppelt. Diese Annahme ist keineswegs trivial und zu Beginn einer qPCR-Messreihe sollte für jede Primer-DNA-Kombination die Effizienz mit einer DNA-Verdünnungsreihe bestimmt werden. Unterscheiden sich die Effizienzen von GAPDH- und GenX-PCR, wird also GAPDH pro Zyklus um den Faktor n_{GAPDH} und GenX um den Faktor n_{GenX} vervielfacht, muss obige Formel angepasst werden:

$$rel. Expressionsniveau_{GenX} = \frac{n_{GenX}^{-Ct_{GenX}}}{n_{GAPDH}^{-Ct_{GAPDH}}} = \frac{n_{GAPDH}^{Ct_{GAPDH}}}{n_{GenX}^{Ct_{GenX}}}$$

Zudem ist es erstrebenswert, den Ct-Wertes eines Gens in einer bestimmten cDNA als den Mittelwert aus 3 identischen Ansätzen zu bestimmen (Triplikat-Messungen). Die relativen Expressionsniveaus sollten zudem aus mehreren cDNAs (und damit auch mehreren RNAs) bestimmt und gemittelt werden, um den Einfluss von Fluktuationen im Expressionsmuster, die nicht durch die Präkonditionierung bedingt waren, zu minimieren.

4 Ergebnisse

Alle Werte werden als Mittelwert $\pm$ Standardfehler angegeben. In den Abbildungen gibt die Anzahl der Sterne (*) das Signifikanzniveau an: * $\hat{=}$ $p < 0,05$; ** $\hat{=}$ $p < 0,01$; *** $\hat{=}$ $p < 0,001$. Die Zahl n gibt die Anzahl der gemessenen Neurone an. Die Zahl N gibt die Anzahl der Präparationen an, aus denen die primärkultivierten Kortexneurone gewonnen wurden.

4.1 Fura-2-Imaging an primärkultivierten Kortexneuronen

4.1.1 Zytosolische Ca^{2+} -Antwort nach Applikation extrazellulärer Azidose

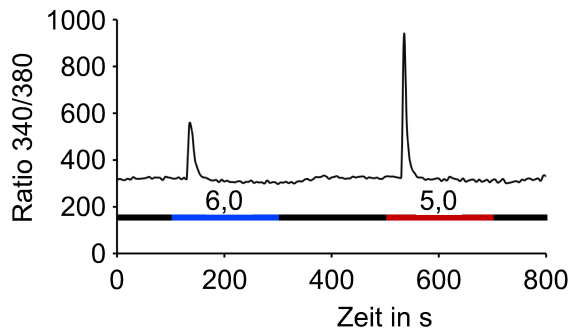


Abbildung 3: Verlauf der Ca^{2+} -Konzentration in einem Kortexneuron nach Superfusion von Badlösungen mit $\text{pH}_1 = 6,0$ und $\text{pH}_2 = 5,0$

Um die Reaktion der fluorometrisch gemessenen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Kortexneuronen auf extrazelluläre Azidose zu untersuchen, wurden zwei verschiedene saure pH-Werte gewählt, mit denen die Neurone für jeweils 3 min und 20 s (200 s) superfundiert wurden: $\text{pH}_1 = 6,0$ (ein auch pathophysiologisch auftretender pH-Wert [Rehncrona, 1985, Nedergaard et al., 1991b]) und $\text{pH}_2 = 5,0$ (um eine maximale Aktivierung neuronaler ASICs zu erreichen [Li et al., 2010b]). Dazwischen wurde der

pH-Wert der Badlösung immer wieder auf den Ausgangswert $\text{pH}_{\text{basal}} = 7,45$ zurückgeführt. Abbildung 3 zeigt den typischen Verlauf der *Ratio 340/380* als Antwort auf diese pH-Werte in einem Kortexneuron.

Im Fura-2-Imaging zeigten sich nach Superfusion von Badlösungen mit den beiden sauren pH-Werten transiente, weniger als 1 min andauernde Anstiege der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration („säureinduzierte Ca^{2+} -Amplitude“; siehe Abb. 3). Der Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration währte also deutlich kürzer als die Anwesenheit der extrazellulären Azidose. Die fluorometrisch bestimmte Ca^{2+} -Amplitude des transienten zytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs betrug $280,2 \pm 14,8$ bzw. $311,5 \pm 13,3$ nach Superfusion mit $\text{pH}_1 = 6,0$ bzw. $\text{pH}_2 = 5,0$. Der Unterschied zwischen den pH 6,0- und pH 5,0-induzierten Amplituden war dabei signifikant ($p < 0,001$).

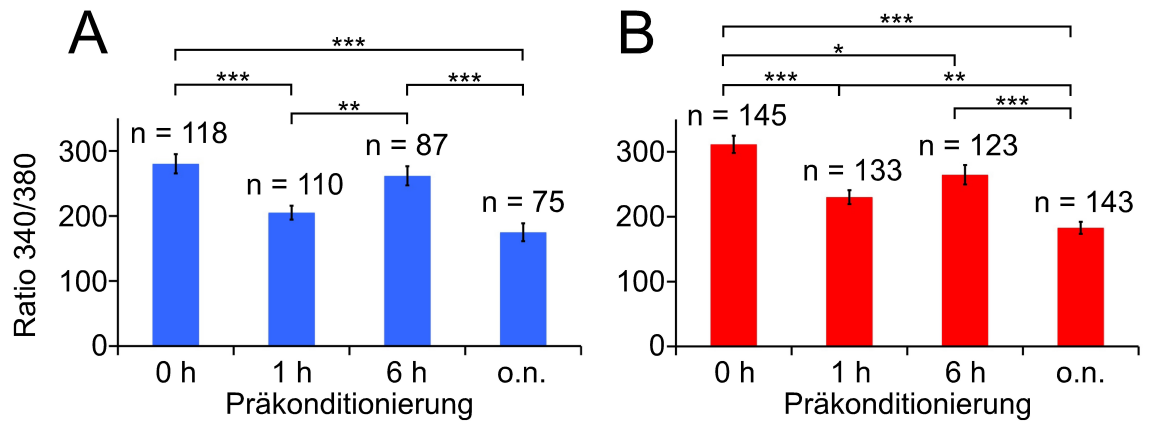


Abbildung 4: **Einfluss von saurer Präkonditionierung auf die säureinduzierten Ca²⁺-Amplituden in Kortexneuronen.**

Saure Präkonditionierung bei $pH = 6,0$ für 1 h, 6 h und über Nacht (o.n.); Kontrolle (0 h). A: Ca²⁺-Amplituden nach Superfusion von Badlösung mit $pH_1 = 6,0$. B: Ca²⁺-Amplituden nach Superfusion von Badlösung mit $pH_2 = 5,0$; N = 9.

4.1.2 Effekt der Präkonditionierung durch Azidose für verschiedene Zeiträume auf die säureinduzierte Ca²⁺-Antwort

Um die Auswirkung von Präkonditionierung durch extrazelluläre Azidose (im Folgenden „Präkonditionierung“ genannt) auf die Ca²⁺-Antwort zu untersuchen, wurden die Kortexneurone unmittelbar vor dem Imaging für 1 h, 6 h bzw. über Nacht (>12 h, „o.n.“) bei $pH_{Präkond.} = 6,0$ inkubiert.

Präkonditionierung für 1 h bzw. über Nacht, jedoch nicht für 6 h führte zu einer signifikanten Abnahme der pH 6,0-induzierten Ca²⁺-Amplitude auf $205,1 \pm 10,7$ (1 h) bzw. $175,0 \pm 13,8$ (o.n.). Bemerkenswert ist, dass eine sechsstündige Präkonditionierung im Vergleich zu einer einstündigen Präkonditionierung zu einem signifikanten Wiederanstieg der pH 6,0-induzierten Ca²⁺-Amplitude von $205,1 \pm 10,7$ auf $261,7 \pm 14,7$ führte ($p < 0,01$). Präkonditionierung für 1 h, 6 h sowie über Nacht führte zu einer signifikanten Reduktion der pH 5,0-induzierten Ca²⁺-Amplitude auf $230,2 \pm 10,8$ (1 h) bzw. $182,8 \pm 9,2$ (o.n.); auch hier konnte ein Wiederanstieg der pH 5,0-induzierten Ca²⁺-Amplitude von $230,2 \pm 10,8$ nach einstündiger Präkonditionierung auf $264,6 \pm 15,0$ nach sechsstündiger Präkonditionierung beobachtet werden, wenn auch dieser Unterschied nicht signifikant war ($p = 0,060$). Die jeweils kleinste säureinduzierte Ca²⁺-Amplitude fand sich mit $175,0 \pm 13,8$ ($pH_1 = 6,0$) bzw. $182,8 \pm 9,2$ ($pH_2 = 5,0$) nach Präkonditionierung über Nacht. Nach den Präkonditionierungen für 1 h, 6 h und über Nacht war der Unterschied zwischen den pH 6,0- und pH 5,0-induzierten Ca²⁺-Amplituden jeweils nicht mehr signifikant.

Betrachtete man die Subpopulationen der Kortexneurone unterteilt nach der Größe ihrer pH 5,0-induzierten Ca²⁺-Amplitude, waren diese annähernd entsprechend einer Gaußschen Normalverteilung mit einem Maximum um eine Ca²⁺-Amplitude von 200 bis 400 verteilt (siehe Abb. 5, „0 h“). Aus dieser Normalverteilung

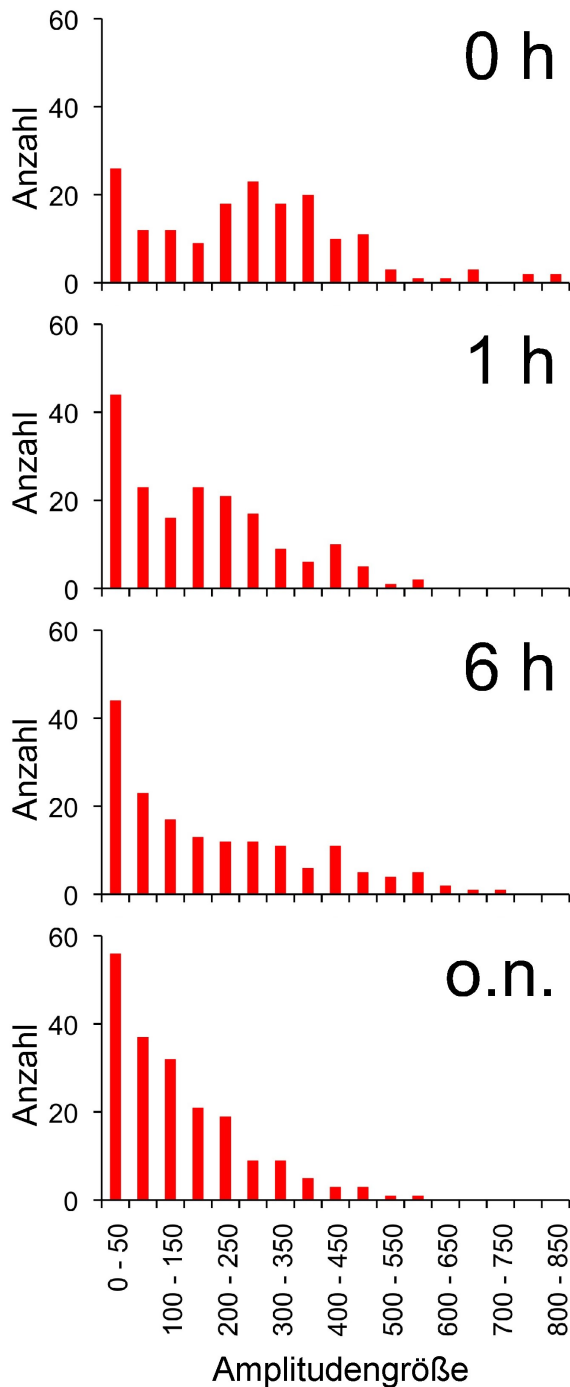


Abbildung 5: Einfluss von saurer Präkonditionierung auf die Verteilung der Größen der Ca^{2+} -Amplituden nach Superfusion von Badlösung mit $\text{pH}_2 = 5,0$. $n = 171$ (0 h), $n = 177$ (1 h), $n = 167$ (6 h), $n = 196$ (o.n.); $N = 9$.

fielen die Neurone heraus, deren $\text{pH } 5,0$ -induzierten Ca^{2+} -Amplitude kleiner als 50 war und die daher als „nicht antwortend“ eingestuft wurden. Durch einstündige Präkonditionierung wurde das Maximum der Normalverteilung nach links auf etwa 100 bis 300 verschoben. Nach sechsstündiger Präkonditionierung ließ sich dieser Gipfel kaum noch von der Gruppe an Neuronen unterscheiden, deren $\text{Amplitude} < 50$ war. Gleichzeitig gab es nach sechsstündiger Präkonditionierung Neurone, deren $\text{pH } 5,0$ -induzierte Amplitude größer als 600 war; solche gab es nach Präkonditionierung für 1 h oder über Nacht nicht. Präkonditionierung über Nacht erbrachte eine weitere Linksverschiebung zu kleineren Amplituden. Mit der Länge der Präkonditionierung nahm die Anzahl der Neurone mit einer $\text{Amplitude} < 50$ von 15% (ohne Präkonditionierung) über 25% (1 h) und 26% (6 h) auf 29% (o.n.) zu.

4.1.3 Effekt von Amilorid auf die säureinduzierte Ca^{2+} -Antwort

Um zu untersuchen, ob ASICs bei der säureinduzierten Ca^{2+} -Antwort in Kortexneuronen eine Rolle spielen, wurde Amilorid als reversibler und unspezifische Blocker [Waldmann et al., 1997b, Kellenberger and Schild, 2002] in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt; bei dieser Konzentration werden ca. 80% der säureaktivierten ASIC-Ströme in Neuronen blockiert [Xiong

et al., 2004]. Um den Effekt von Amilorid auf die säureinduzierte Ca^{2+} -Amplitude von einem durch die wiederholte Säureapplikation bedingten Effekt unterscheiden zu können, wurden die Neurone sowohl vor als auch nach der Anwesenheit von

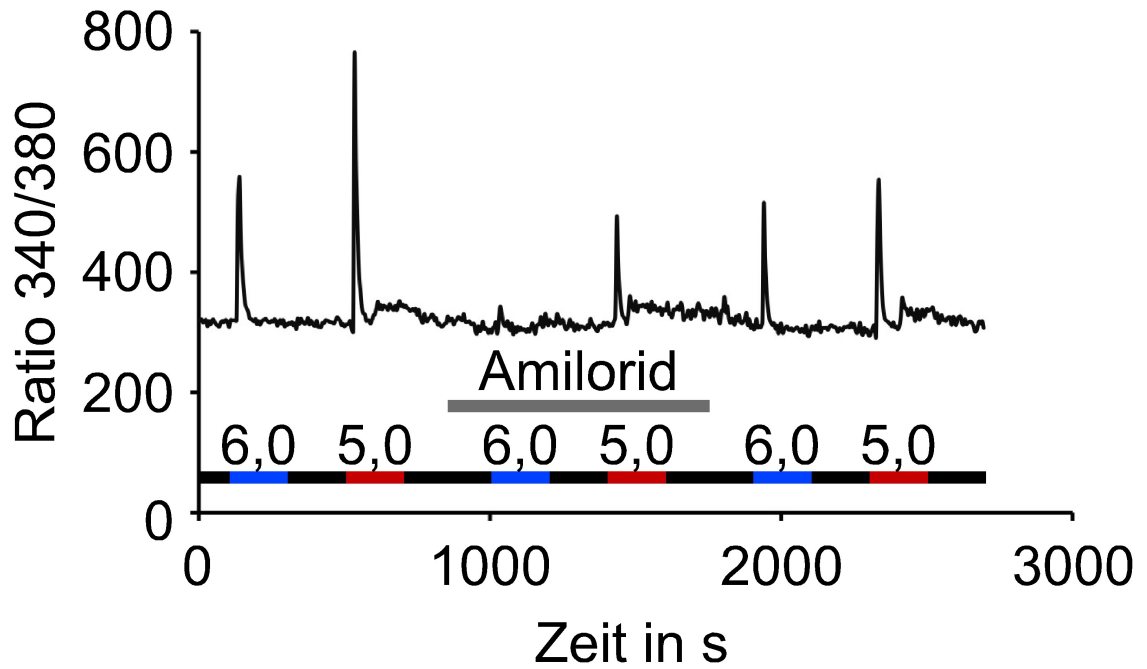


Abbildung 6: **Reversible Blockade der säureinduzierten Ca^{2+} -Amplituden in einem Kortexneuron durch 100 μM Amilorid.**

Amilorid in der Badlösung jeweils mit $\text{pH}_1 = 6,0$ und $\text{pH}_2 = 5,0$ superfundiert. Die Ca^{2+} -Amplitude in Anwesenheit von Amilorid wurde dann mit dem Mittelwert der Ca^{2+} -Amplituden vorher und nachher verglichen. Ein Beispiel für eine typische Messkurve sowie das Versuchsprotokoll findet sich in Abbildung 6.

Es ließen sich etwa 78% bzw. 69% der pH 6,0- bzw. pH 5,0-induzierten Ca^{2+} -Amplitude in Neuronen durch die Anwesenheit von 100 μM Amilorid inhibieren (vergleiche Abb. 7). Auch nach Präkonditionierung für 1 h, 6 h und über Nacht konnte der größte Anteil sowohl der pH 6,0- als auch der pH 5,0-induzierten Ca^{2+} -Amplitude inhibiert werden. Die relativen Ca^{2+} -Amplituden in Anwesenheit von Amilorid normiert auf die zugehörige Ca^{2+} -Amplitude in Abwesenheit von Amilorid sind in Abbildung 8 dargestellt. Die in Anwesenheit von Amilorid verbleibende durch pH 6,0-induzierte Ca^{2+} -Amplitude wurde durch die verschiedenen Präkonditionierungen nicht signifikant beeinflusst. Nach Präkonditionierung über Nacht ließ sich jedoch ein signifikant größerer Anteil der pH 5,0-induzierten Ca^{2+} -Amplitude durch Amilorid inhibieren.

4.1.4 Effekt von Nimodipin auf die säureinduzierte Ca^{2+} -Antwort

Um die Rolle von spannungsabhängigen L-Typ Kalzium-Kanälen (LTCC) bei der säureinduzierten Ca^{2+} -Amplitude in den Kortexneuronen zu untersuchen, wurde Nimodipin als spezifischer Blocker der LTCCs [Striessnig et al., 2006] in einer Konzentration von 5 μM eingesetzt.

Da uns die Reversibilität der Nimodipin-Blockade nicht bekannt war, wurde auf

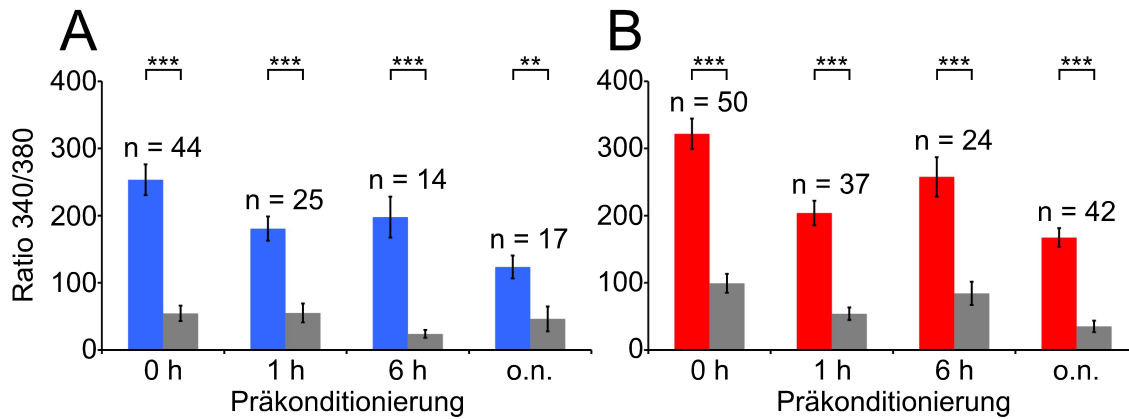


Abbildung 7: **Einfluss von 100 μM Amilorid auf die säureinduzierten Ca^{2+} -Amplituden in Kortexneuronen ohne und mit saurer Präkonditionierung.** Farbig: Mittelwerte der säureinduzierten Ca^{2+} -Amplituden vor und nach Applikation von Amilorid; grau: säureinduzierte Ca^{2+} -Amplituden in Anwesenheit von Amilorid. A: Ca^{2+} -Amplituden nach Superfusion von Badlösung mit $\text{pH}_1 = 6,0$. B: Ca^{2+} -Amplituden nach Superfusion von Badlösung mit $\text{pH}_2 = 5,0$. N = 3.

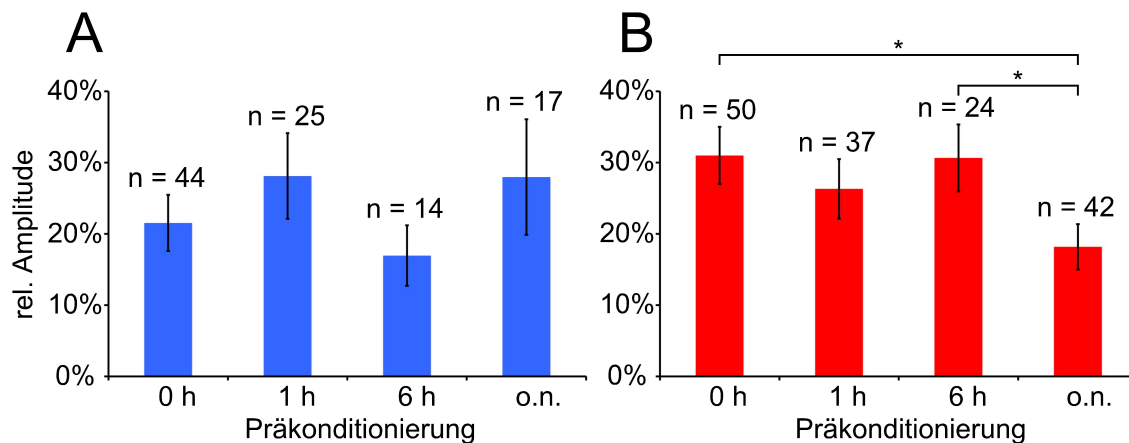


Abbildung 8: **Auswirkung der sauren Präkonditionierung auf den Amilorid-resistenten Anteil der säureinduzierten Ca^{2+} -Amplituden in Kortexneuronen.** Dargestellt sind die in Anwesenheit von 100 μM Amilorid verbleibenden säureinduzierten Ca^{2+} -Amplituden normiert auf die Mittelwerte der Kontrollmessungen. A: nach Superfusion von Badlösung mit $\text{pH}_1 = 6,0$. B: nach Superfusion von Badlösung mit $\text{pH}_2 = 5,0$. N = 3.

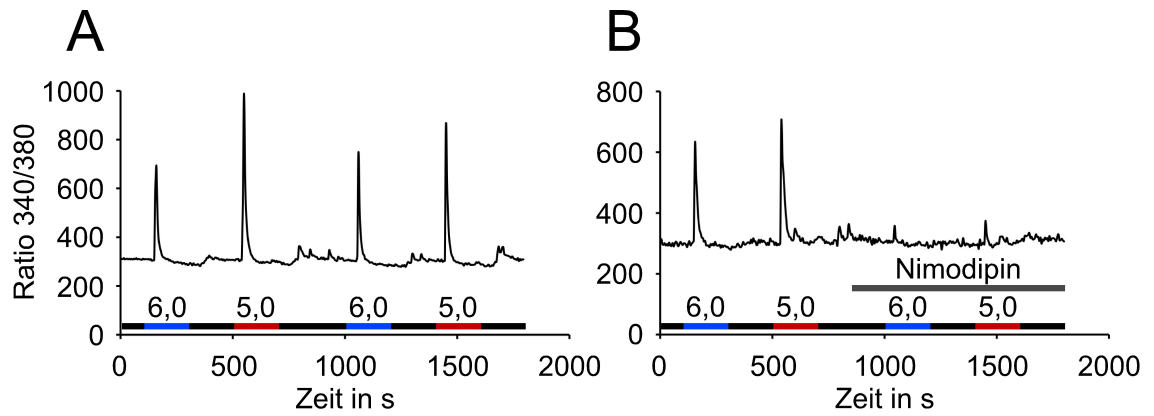


Abbildung 9: **Blockade der säureinduzierten Ca^{2+} -Amplituden in einem Kortexneuron durch 5 μM Nimodipin.** A: Kontrollmessung; B: Messung mit Nimodipin.

ein Protokoll analog zu den Versuchen mit Amilorid verzichtet, bei denen nach dem Einsatz des Pharmakons nochmals $pH_1 = 6,0$ und $pH_2 = 5,0$ ohne Pharmakon appliziert wurden. Um dennoch den Effekt von Nimodipin von dem allein durch wiederholte Superfusion mit sauren Badlösungen bedingten Effekt unterscheiden zu können, wurden Kontrollmessungen ohne Nimodipin durchgeführt (vergleiche 3.2.3.6). Beispiele einer typischen Messung mit und ohne Nimodipin sowie die zugehörigen Versuchsprotokolle finden sich in Abbildung 9. Verglichen wurden die säureinduzierten Ca^{2+} -Amplituden in Anwesenheit von Nimodipin und die säureinduzierten Ca^{2+} -Amplituden der Kontrolle jeweils normiert auf die vorangegangene durch den gleichen pH-Wert induzierte Ca^{2+} -Amplitude (siehe Abb. 10 C und F).

Wie auch durch Amilorid ließ sich ein Großteil (63% bzw. 87%) sowohl der pH 6,0- als auch der pH 5,0-induzierten Ca^{2+} -Amplitude durch Anwesenheit von Nimodipin inhibieren. Auch nach Präkonditionierung für 1 h, 6 h und über Nacht wurden die säureinduzierten Ca^{2+} -Amplituden durch Nimodipin um einen erheblichen Anteil reduziert. Die Aussagekraft dieser Daten wird dadurch eingeschränkt, dass die Daten der pH 6,0-induzierten Ca^{2+} -Amplituden lediglich aus einer Präparation stammten und somit präparationsspezifische Einflussfaktoren nicht auszuschließen sind.

Abbildung 11 stellt die säureinduzierten Ca^{2+} -Amplituden in Anwesenheit von Nimodipin normiert auf den Mittelwert der Kontrollmessung dar. Unter dem Vorbehalt der geringen Anzahl an Präparationen (s.o.) ließ sich eine Reduktion der in Anwesenheit von Nimodipin verbleibenden, pH 6,0-induzierten Ca^{2+} -Amplitude nach Präkonditionierung für 1 h, 6 h sowie über Nacht feststellen (siehe Abb. 11 A). Allerdings ließ sich unter aussagekräftigen Bedingungen ($N = 3$) kein Effekt von Präkonditionierung auf die in Anwesenheit von Nimodipin verbleibende, durch pH 5,0 induzierte Ca^{2+} -Amplitude beobachten (siehe Abb. 11 B).

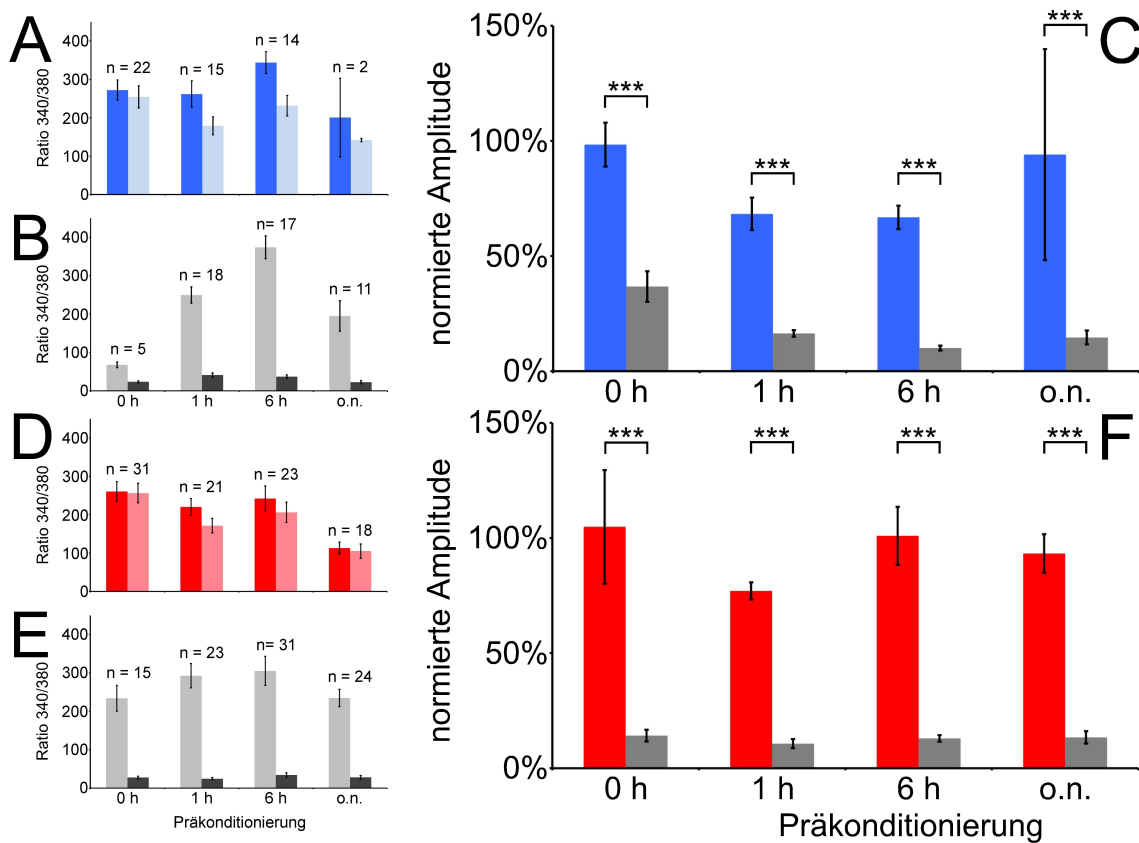


Abbildung 10: **Einfluss von 5 µM Nimodipin auf die säureinduzierten Ca²⁺-Amplituden in Kortexneuronen ohne und mit saurer Präkonditionierung.**

A: erste (blau) und zweite (hellblau) Ca²⁺-Amplituden nach Superfusion von Badlösung mit $pH_1 = 6,0$; Kontrollmessungen. B: erste (hellgrau) und zweite (dunkelgrau) Ca²⁺-Amplituden nach Superfusion von Badlösung mit $pH_1 = 6,0$ mit Anwesenheit von Nimodipin bei den zweiten Ca²⁺-Amplituden. C: auf die jeweils ersten Ca²⁺-Amplituden normierte zweite Ca²⁺-Amplituden nach Superfusion von Badlösung mit $pH_1 = 6,0$. Blau: Kontrollmessungen; grau: Ca²⁺-Amplituden in Anwesenheit von Nimodipin. N = 1.

D: erste (rot) und zweite (hellrot) Ca²⁺-Amplituden nach Superfusion von Badlösung mit $pH_2 = 5,0$; Kontrollmessungen. E: erste (hellgrau) und zweite (dunkelgrau) Ca²⁺-Amplituden nach Superfusion von Badlösung mit $pH_2 = 5,0$ mit Anwesenheit von Nimodipin bei den zweiten Ca²⁺-Amplituden. F: auf die jeweils ersten Ca²⁺-Amplituden normierte zweite Ca²⁺-Amplituden nach Superfusion von Badlösung mit $pH_2 = 5,0$. Rot: Kontrollmessungen; grau: Ca²⁺-Amplituden in Anwesenheit von Nimodipin. N = 3.

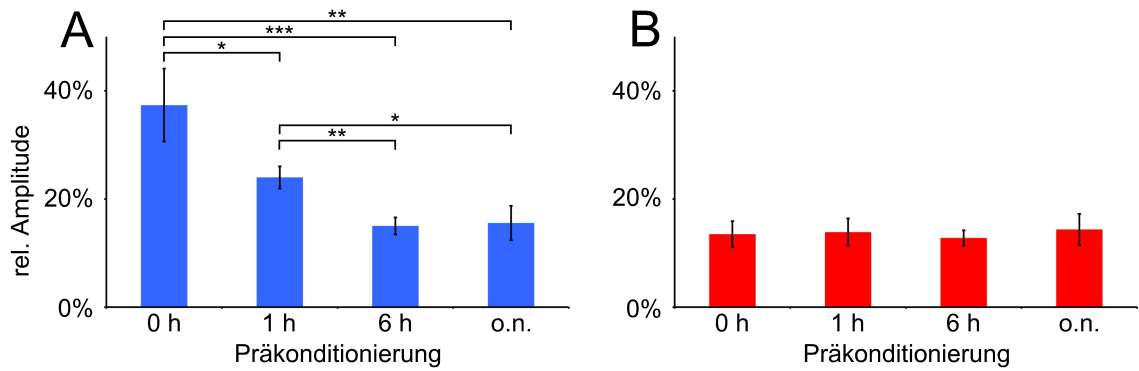


Abbildung 11: **Auswirkung der sauren Präkonditionierung auf den Nimodipin-resistenten Anteil der säureinduzierten Ca^{2+} -Amplituden in Kortexneuronen.** Dargestellt sind die in Anwesenheit von 5 μM Nimodipin verbleibenden säureinduzierten Ca^{2+} -Amplituden normiert auf die Mittelwerte der Kontrollmessungen. A: nach Superfusion von Badlösung mit $\text{pH}_1 = 6,0$; $N = 1$. B: nach Superfusion von Badlösung mit $\text{pH}_2 = 5,0$; $N = 3$. Die Anzahl der jeweils betrachteten Neurone kann man Abb. 10 entnehmen.

4.1.5 Effekt von Thapsigargin auf die säureinduzierte Ca^{2+} -Antwort

Um herauszufinden, ob eine Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER), einem intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, als Folge einer Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung (calcium induced calcium release, CICR) bei der säureinduzierten Ca^{2+} -Amplitude in Kortexneuronen beteiligt ist, wurde das ER mittels pharmakologischer Blockade der endoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase durch Thapsigargin entleert. Dazu wurde nach Superfusion von Badlösungen mit $\text{pH}_1 = 6,0$ und $\text{pH}_2 = 5,0$ für 3 min und 20 s (200 s) 1 μM Thapsigargin zur Badlösung hinzugefügt; dann wurde ein zweites Mal mit Badlösungen mit den beiden pH-Werten superfundiert. In der Kontrolle wurde kein Thapsigargin hinzugefügt. Ein Beispiel für eine Messung und die Versuchsprotokolle finden sich in Abbildung 12. Verglichen wurden die säureinduzierten Ca^{2+} -Amplituden nach Thapsigargin-Applikation mit den zweiten säureinduzierten Ca^{2+} -Amplituden der Kontrolle, beides auf die jeweilige erste Ca^{2+} -Amplitude normiert, die durch den gleichen pH-Wert hervorgerufen worden war.

Die Applikation von Thapsigargin führte unmittelbar zu einem anhaltenden, durch die Entleerung des ER bedingten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (siehe Abb. 12), wie es andere Arbeiten erwarten ließen [Thastrup et al., 1990].

Die säureinduzierten Ca^{2+} -Amplituden nach Applikation von Thapsigargin zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle ($77,8 \pm 4,6\%$ ohne gegenüber $74,9 \pm 3,8\%$ mit Thapsigargin bei den pH 6,0-induzierten Ca^{2+} -Amplituden und $98,3 \pm 13,6$ ohne gegenüber $80,5 \pm 4,2\%$ mit Thapsigargin bei den pH 5,0-induzierten Ca^{2+} -Amplituden). Nach Präkonditionierung für 1 h ließ sich durch Applikation von Thapsigargin die pH 6,0-induzierte Ca^{2+} -Amplitude signifikant verkleinern ($123,9 \pm 13,1\%$ Kontrolle, gegenüber $73,5 \pm 10,0\%$ mit Thapsigargin). Hierbei sollte

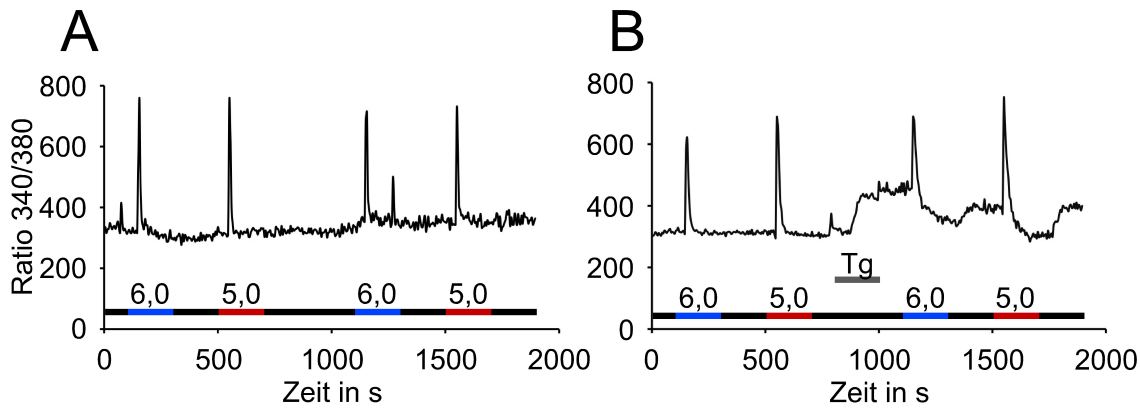


Abbildung 12: **Effekt von 1 μM Thapsigargin (Tg) auf die säureinduzierte Ca^{2+} -Amplituden in einem Kortexneuron.** A: Kontrollmessung; B: Messung mit Thapsigargin.

jedoch berücksichtigt werden, dass es in dieser Versuchsreihe zu einem bisher nicht beobachteten nicht-signifikanten Anstieg der pH 6,0-induzierten Ca^{2+} -Amplitude durch die einstündige Präkonditionierung von $77,9 \pm 4,6\%$ auf $107,8 \pm 17\%$ ($p = 0,055$) kam; dagegen hatte eine einstündige Präkonditionierung eine signifikante Reduktion der absoluten pH 6,0-induzierten Ca^{2+} -Amplituden (von $280,2 \pm 14,8$ auf $205,1 \pm 10,7$; $p < 0,001$; siehe Abschnitt 4.1.2) und in der Versuchsreihe mit Nimodipin eine signifikante Reduktion der relativen zweiten pH 6,0-induzierten Ca^{2+} -Amplituden (von $98,4 \pm 9,5\%$ auf $68,3 \pm 7,0\%$; $p < 0,05$; siehe 4.1.4) bewirkt.

Nach Präkonditionierung für 6 h oder über Nacht konnte die pH 6,0-induzierte Ca^{2+} -Amplitude durch Thapsigargin nicht signifikant geändert werden. Ebenso konnte nach keiner der drei verschiedenen Präkonditionierungen durch Thapsigargin eine signifikante Änderung der pH 5,0-induzierten Amplituden beobachtet werden. Diese Aussage wird dadurch eingeschränkt, dass die säureinduzierten Ca^{2+} -Antworten nach Präkonditionierung über Nacht aus nur einer Präparation erhoben wurden und somit keine statistisch sichere Aussage möglich ist.

Für Abbildung 14 wurden die Ca^{2+} -Amplituden nach Thapsigargin-Applikation auf den Mittelwert der Ca^{2+} -Amplitude der Kontrolle normiert. Der oben beschriebene Sachverhalt der nach einstündiger Präkonditionierung durch Thapsigargin inhibierbaren pH 6,0-induzierten Ca^{2+} -Amplitude spiegelte sich auch hier wieder. Daneben zeigte sich nach Präkonditionierung über Nacht die pH 6,0-induzierte Ca^{2+} -Amplitude durch Thapsigargin-Applikation vergrößert; hierbei sei wiederum darauf hingewiesen, dass die säureinduzierten Ca^{2+} -Antworten nach Präkonditionierung über Nacht aus nur einer Präparation stammen und dieser Unterschied nicht als statistisch abgesichert betrachtet werden kann. Die nach Thapsigargin-Applikation verbleibenden pH 5,0-induzierten Amplituden wurden durch die Präkonditionierung nicht signifikant beeinflusst.

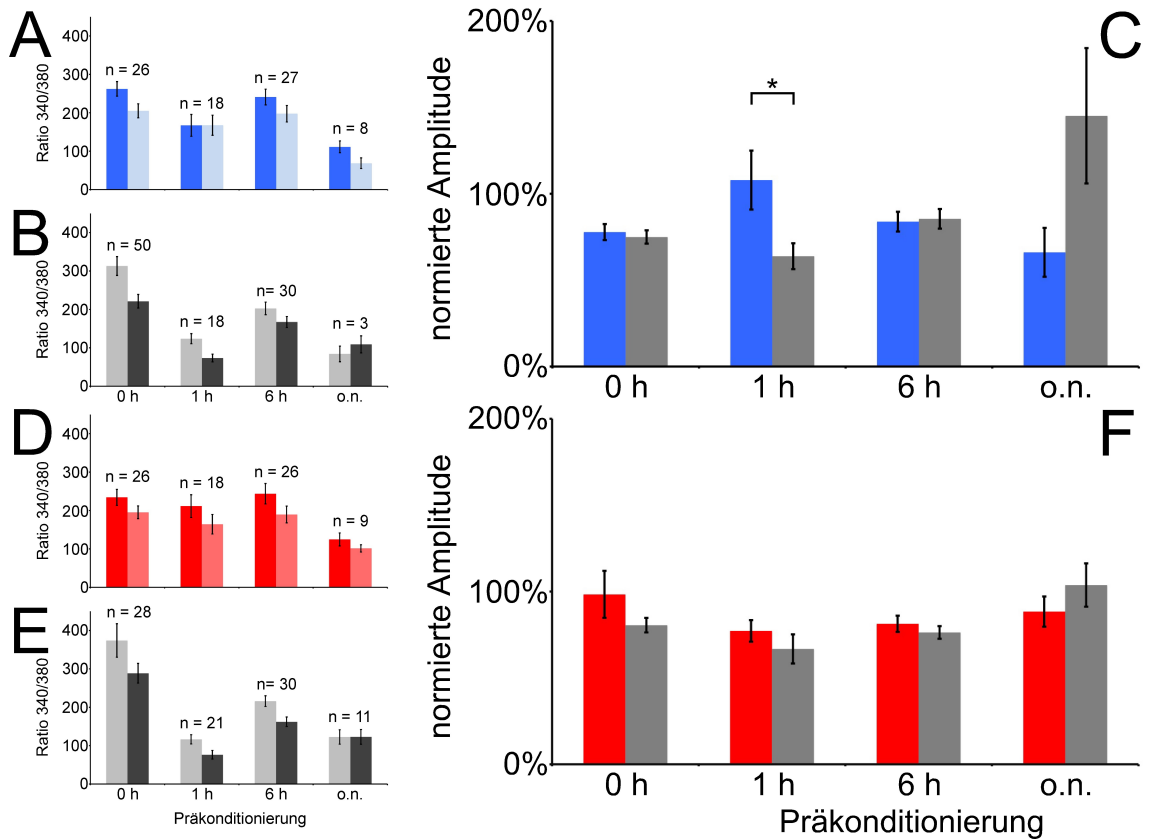


Abbildung 13: **Effekt von 1 µM Thapsigargin (Tg) auf die säureinduzierten Ca²⁺-Amplituden in Kortexneuronen ohne und mit saurer Präkonditionierung.**

A: erste (blau) und zweite (hellblau) Ca²⁺-Amplituden nach Superfusion von Badlösung mit pH₁ = 6,0; Kontrollmessungen. B: erste (hellgrau) und zweite (dunkelgrau) Ca²⁺-Amplituden nach Superfusion von Badlösung mit pH₁ = 6,0 mit Applikation von Tg vor den zweiten Ca²⁺-Amplituden. C: auf die jeweils ersten Ca²⁺-Amplituden normierte zweite Ca²⁺-Amplituden nach Superfusion von Badlösung mit pH₁ = 6,0. Blau: Kontrollmessungen; grau: Ca²⁺-Amplituden nach Applikation von Tg. N = 1.

D: erste (rot) und zweite (hellrot) Ca²⁺-Amplituden nach Superfusion von Badlösung mit pH₂ = 5,0; Kontrollmessungen. E: erste (hellgrau) und zweite (dunkelgrau) Ca²⁺-Amplituden nach Superfusion von Badlösung mit pH₂ = 5,0 mit Applikation von Tg vor den zweiten Ca²⁺-Amplituden. F: auf die jeweils ersten Ca²⁺-Amplituden normierte zweite Ca²⁺-Amplituden nach Superfusion von Badlösung mit pH₂ = 5,0. Rot: Kontrollmessungen; grau: Ca²⁺-Amplituden nach Applikation von Tg. N = 3.

N = 2 (0 h, 1 h, 6 h), N = 1 (o.n.).

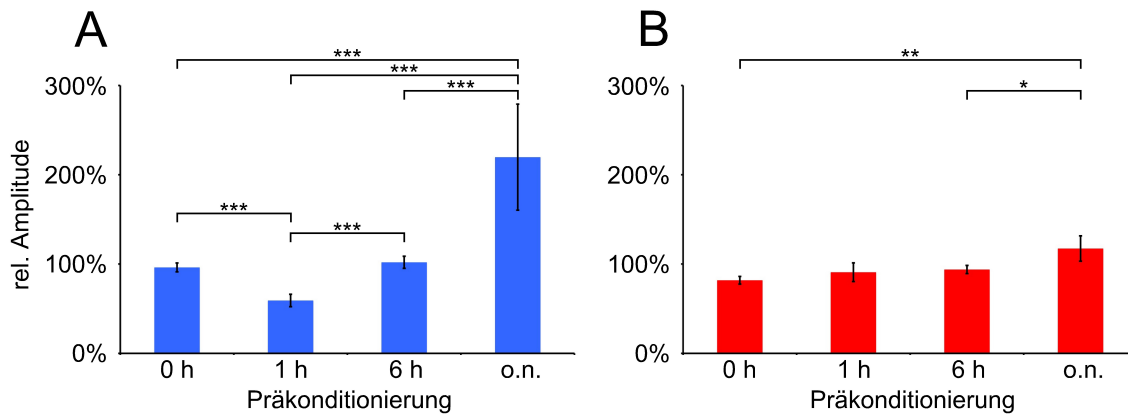


Abbildung 14: **Auswirkung der sauren Präkonditionierung auf die Thapsigargin-beeinflussten säureinduzierten Ca^{2+} -Amplituden in Kortexneuronen.**

Dargestellt sind die in Anwesenheit von 1 μM Thapsigargin verbleibenden säureinduzierten Ca^{2+} -Amplituden normiert auf die Mittelwerte der Kontrollmessungen. A: nach Superfusion von Badlösung mit $\text{pH}_1 = 6,0$. B: nach Superfusion von Badlösung mit $\text{pH}_2 = 5,0$. Die Anzahl der jeweils betrachteten Neurone kann man Abb. 13 entnehmen. $N = 2$ (0 h, 1 h, 6 h), $N = 1$ (o.n.).

4.1.6 Fura-2-Imaging in $\text{ASIC}^{-/-}$ -Mäusen

Um noch spezifischer die Abhängigkeit der säureinduzierten Ca^{2+} -Amplitude in Neuronen von der Anwesenheit von ASIC1 -Untereinheiten zu untersuchen, wurden Imaging-Versuche an $\text{ASIC1}^{-/-}$ -Neuronen durchgeführt.

4.1.6.1 Säureinduzierte Ca^{2+} -Antwort in $\text{ASIC1}^{-/-}$ -Kortexneuronen

Eine typische Messkurve für den Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in einem $\text{ASIC1}^{-/-}$ -Neuron in Reaktion auf Superfusion mit sauren Badlösungen findet sich in Abbildung 15, A. In keinem $\text{ASIC1}^{-/-}$ -Neuron ließen sich transiente Ca^{2+} -Amplituden durch Applikation von $\text{pH}_1 = 6,0$ oder $\text{pH}_2 = 5,0$ hervorrufen. Abbildung 16 zeigt einen Vergleich der Ca^{2+} -Antworten in WT- und $\text{ASIC1}^{-/-}$ -Kortexneuronen nach Superfusion von Badlösungen mit $\text{pH}_1 = 6,0$ oder $\text{pH}_2 = 5,0$. Dargestellt ist der Prozentsatz der untersuchten Neurone, die eine säureinduzierte Ca^{2+} -Amplitude von mindestens 50 zeigten („antwortend“). Abbildung 15, Teil B, zeigt den Verlauf der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eines formal als „antwortend“ registrierten Neurons: die vermeintliche säureinduzierte Ca^{2+} -Amplitude (Pfeil) lässt sich nicht sicher von den vorangehenden Fluktuationen in der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration unterscheiden; darüber hinaus lässt sie sich durch die folgenden pH-Wechsel nicht reproduzieren. Ähnliche Kurven finden sich für alle formal als „antwortend“ deklarierten $\text{ASIC1}^{-/-}$ -Neurone.

4.1.6.2 Durch Depolarisation hervorgerufene Ca^{2+} -Antwort in WT- und $\text{ASIC1}^{-/-}$ -Kortexneuronen

Um auszuschließen, dass die Abwesenheit der säureinduzierten Ca^{2+} -Amplituden in $\text{ASIC1}^{-/-}$ -Kortexneuronen nicht auf eine Beeinflussung des depolarisationsbe-

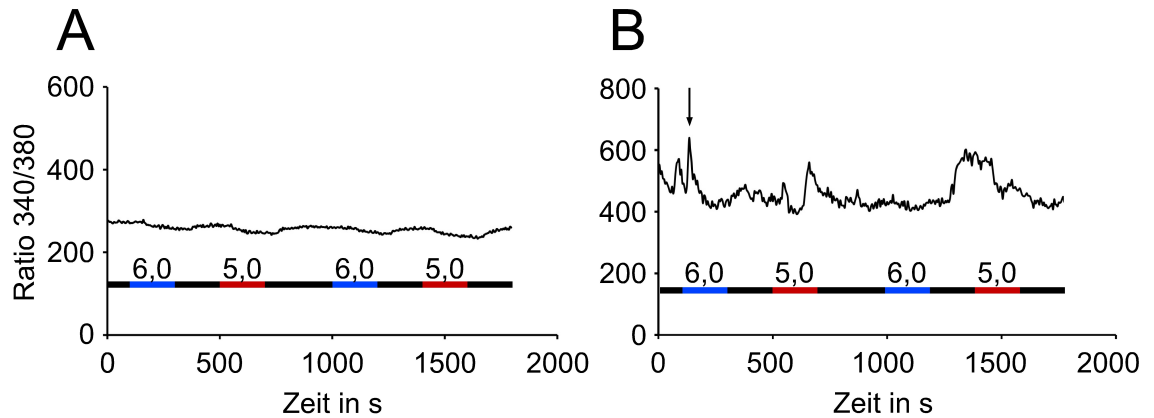


Abbildung 15: Verläufe der Ca²⁺-Konzentration in ASIC1^{-/-}-Kortexneuronen nach Superfusion von Badlösungen mit $pH_1 = 6,0$ und $pH_2 = 5,0$.

A: typischer Verlauf der Ca²⁺-Konzentration in einem ASIC1^{-/-}-Neuron. B: Beispiel für einen spontanen Gipfel in der Ca²⁺-Konzentration in einem ASIC1^{-/-}-Neuron (Pfeil). Dieser ist nicht eindeutig von der vorangehenden spontanen Ca²⁺-Fluktuation zu unterscheiden und durch nachfolgende pH-Wechsel nicht reproduzierbar.

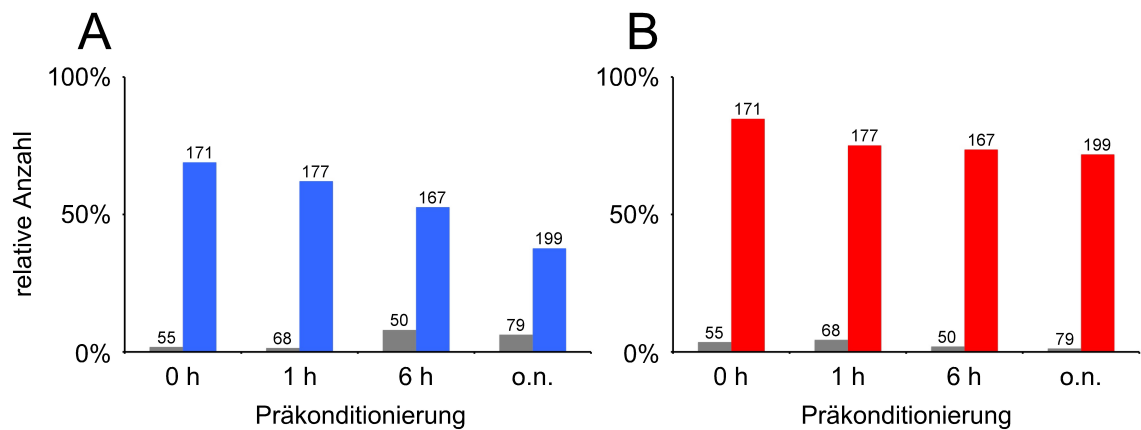


Abbildung 16: Vergleich der säureinduzierten Ca²⁺-Antworten in ASIC1^{-/-}-Kortexneuronen (grau) und in WT-Kortexneuronen (farbig) ohne und mit saurer Präkonditionierung.

Dargestellt ist die relative Anzahl der Kortexneurone, deren Amplitude ≥ 50 war („antwortend“). A: relative Anzahl der „antwortenden“ Kortexneurone nach Superfusion von Badlösung mit $pH_1 = 6,0$. B: relative Anzahl der „antwortenden“ Kortexneurone nach Superfusion von Badlösung mit $pH_2 = 5,0$. Die Zahlen über den Balken geben die Anzahl der betrachteten Neurone an, auf die sich die Prozentangaben beziehen; N = 3 (ASIC^{-/-}-Neurone; 0 h, 1 h, o.n.); N = 2 (ASIC^{-/-}-Neurone; 6 h); N = 9 (WT-Neurone).

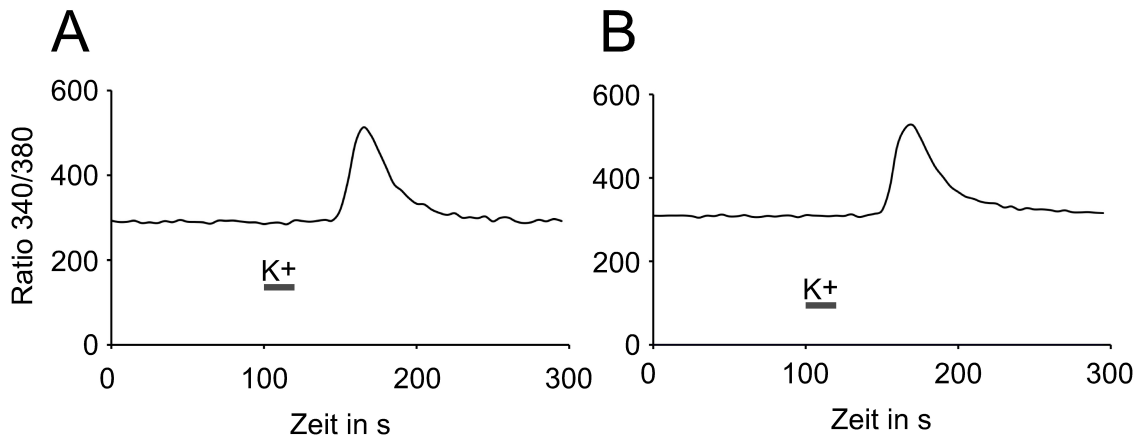


Abbildung 17: Die Ca^{2+} -Amplitude nach Depolarisation mittels Superfusion von Badlösung mit $[\text{K}^+] = 20 \text{ mM}$ unterscheidet sich nicht in WT- (A) und $\text{ASIC1}^{-/-}$ -Kortexneuron (B). Die Verzögerung zwischen K^+ -Applikation und Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration ist durch den Lösungstransport im Perfusionsschlauch bedingt.

dingten Ca^{2+} -Einstroms (etwa über LTCCs) zurückzuführen ist, wurde die Reaktion der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf einen kurzen depolarisierenden Stimulus in WT- und $\text{ASIC}^{-/-}$ -Neuronen verglichen. Dazu wurden WT- und $\text{ASIC}^{-/-}$ -Neurone für 20 s mit 20 mM K^+ superfundiert. Dies war ein geeigneter Stimulus, um eine Ca^{2+} -Antwort in WT- und $\text{ASIC1}^{-/-}$ -Kortexneuronen zu erhalten (siehe Abb.17).

Zwischen den K^+ -induzierten Ca^{2+} -Amplituden in WT- und $\text{ASIC}^{-/-}$ -Kortexneuronen gab es keinen signifikanten Unterschied ($398,8 \pm 33,9$ in WT-Neuronen gegenüber $348,7 \pm 19,2$ in $\text{ASIC}^{-/-}$ -Kortexneuronen; $p = 0,17$). Nach sechsständiger Präkonditionierung konnte in WT-Neuronen jedoch eine größere K^+ -induzierte Ca^{2+} -Amplitude als in $\text{ASIC}^{-/-}$ -Neuronen beobachtet werden ($427,0 \pm 34,0$ gegenüber $316,8 \pm 18,0$, $p < 0,01$).

In den WT-Kortexneuronen wurde die depolarisationsbedingte Ca^{2+} -Amplitude nach 1 h Präkonditionierung signifikant kleiner und nahm nach 6 h Präkonditionierung wieder signifikant zu (vergleiche Abb. 18, C). Der Anstieg der depolarisationsbedingten Ca^{2+} -Amplitude von einstündiger Präkonditionierung ($N_{1h} = 4$) zu sechsständiger Präkonditionierung ($N_{6h} = 3$) in den WT-Kortexneuronen war auch bei Betrachtung nur der ersten drei Präparationen signifikant ($N_{1h} = N_{6h} = 3$). In den $\text{ASIC}^{-/-}$ -Kortexneuronen wurden die K^+ -induzierten Ca^{2+} -Amplituden durch ein- bzw. sechsständige Präkonditionierung nicht signifikant verändert (siehe Abb. 18, B). Nach Präkonditionierung über Nacht ist die K^+ -induzierte Ca^{2+} -Amplitude in $\text{ASIC1}^{-/-}$ -Neuronen jedoch signifikant größer als nach sechsständiger Präkonditionierung. Da der o.n.-Wert jedoch nur aus 2 Präparationen erhoben wurde, lässt sich hier keine statistisch gesicherte Aussage treffen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die verschiedenen Zeiträume der Präkonditionierung die säureinduzierten und die depolarisationsbedingten Ca^{2+} -Amplituden in den WT-Kortexneuronen immer gleichsinnig beeinflussten (vergleiche Abb. 18,

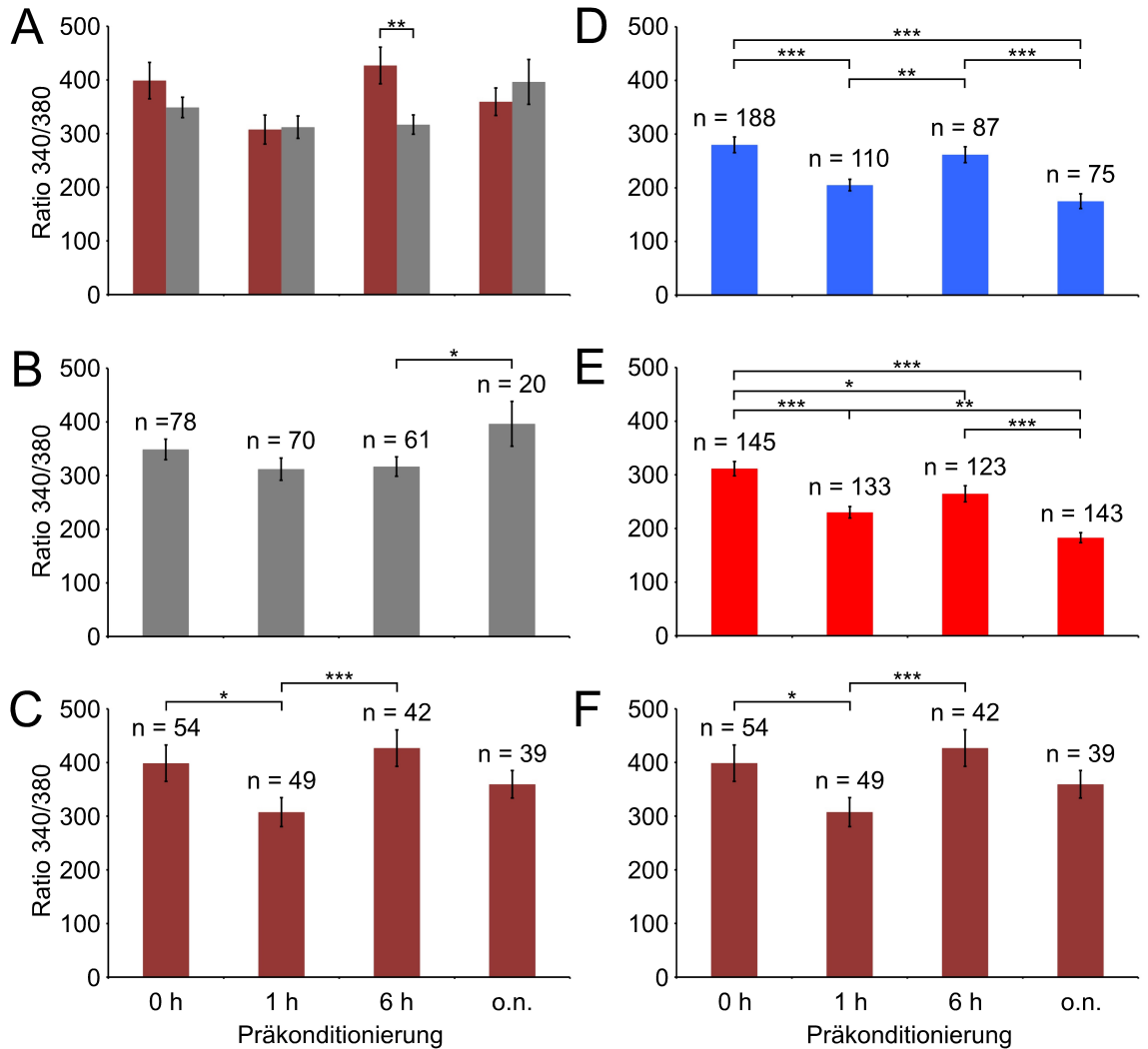


Abbildung 18: **Einfluss von saurer Präkonditionierung auf die säureinduzierten bzw. depolarisationsbedingten Ca^{2+} -Amplituden in WT- und $\text{ASIC1}^{-/-}$ -Kortexneuronen.**

A-C: Einfluss der Präkonditionierung mittels Azidose auf die Ca^{2+} -Amplituden nach Superfusion von Badlösung mit $[\text{K}^+] = 20 \text{ mM}$ in WT-Kortexneuronen (dunkelrot) und $\text{ASIC1}^{-/-}$ -Kortexneuronen (grau). $N = 4$ (WT-Kortexneurone; 0 h, 1 h); $N = 3$ (WT-Kortexneurone; 6 h, o.n.). $N = 4$ ($\text{ASIC1}^{-/-}$ -Kortexneurone; 0 h, 1 h, 6 h); $N = 2$ ($\text{ASIC1}^{-/-}$ -Kortexneurone; o.n.).

D-F: Gegenüberstellung des Effekts der Präkonditionierung mittels Azidose auf die Ca^{2+} -Amplituden von WT-Kortexneuronen nach Superfusion von Badlösung mit $\text{pH}_1 = 6,0$ (D), mit $\text{pH}_2 = 5,0$ (E) und mit $[\text{K}^+] = 20 \text{ mM}$ (F). $N = 9$ (D, E); $N = 4$ (F; 0 h, 1 h); $N = 3$ (F; 6 h, o.n.).

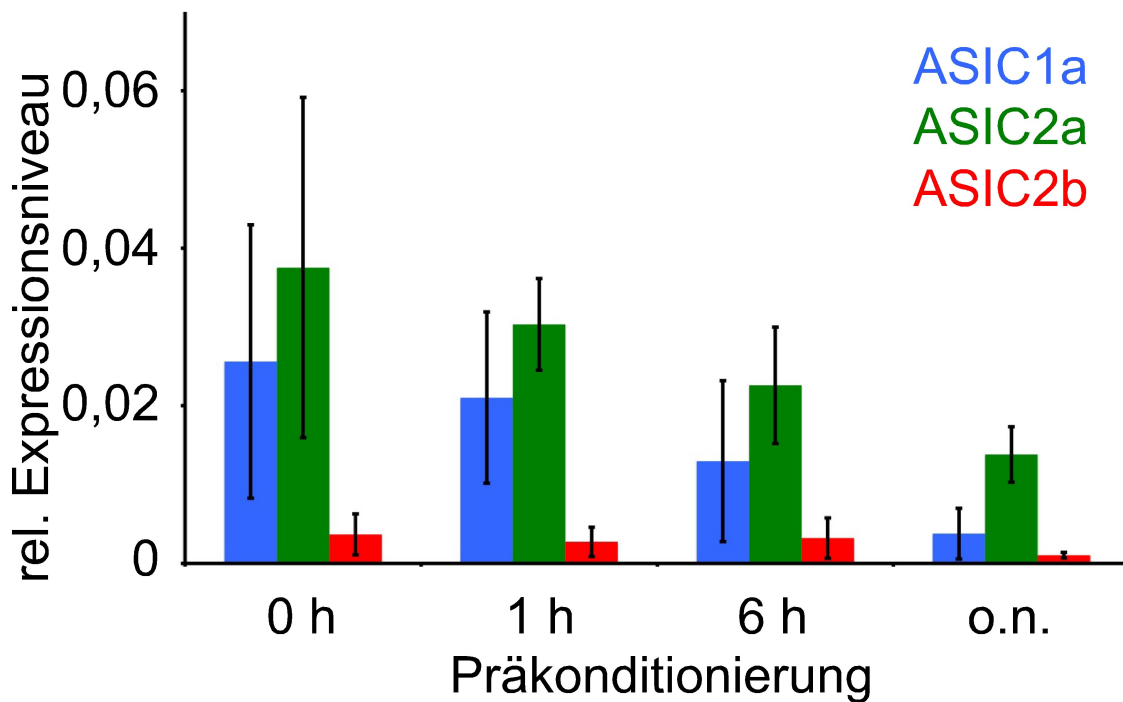


Abbildung 19: **Relative Expressionsniveaus der Transkripte für ASIC1a, -2a & 2b in WT-Kortexneuronen ohne und mit saurer Präkonditionierung.** Alle Werte normiert auf das Expressionsniveau der Transkripte für GAPDH. Mittelwerte aus jeweils einer Messung aus 2 verschiedenen cDNAs.

D-F). Zwar waren nicht bei jedem Stimulus die gleichen Unterschiede signifikant, der gleichsinnige Trend erscheint dennoch bemerkenswert.

4.2 qPCR

Um zu untersuchen, ob die im Fura-2-Imaging festgestellte Modulation der säureinduzierten Ca^{2+} -Amplitude durch saure Präkonditionierung von einer Veränderung des Expressionsniveaus der für die verschiedenen ASIC-Untereinheiten kodierenden mRNAs begleitet wurde, wurde eine relative Quantifizierung der mRNAs für ASIC1a, ASIC2a und ASIC2b durchgeführt (siehe 3.2.7). Bekanntermaßen werden durch ischämische Präkonditionierung die Expressionsniveaus dieser Untereinheiten in Neuronen beeinflusst [Miao et al., 2010, Pignataro et al., 2011]. Als Haushaltsgen wurde GAPDH benutzt.

Abbildung 19 zeigt die relativen Expressionsniveaus der drei ASIC-Transkripte zu den verschiedenen Zeitpunkten der Präkonditionierung. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede im relativen Expressionsniveau eines Transkripts zwischen den verschiedenen Präkonditionierungszeitpunkten.

Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Daten aus nur zwei verschiedenen cDNA-Proben. Die Ct-Werte dieser Messungen ließen sich in weiteren Messungen aus den gleichen cDNA-Proben nicht bestätigen. Vielmehr fanden sich deutlich erhöhte Ct-Werte in den Wiederholungen. Die dargestellten Daten stammen daher

nicht - wie üblich - aus Triplikat-Messungen, sondern Einzelmessungen.

5 Diskussion

5.1 Der säureinduzierte Ca^{2+} -Anstieg in Neuronen

Es ist seit längerem bekannt, dass es unter ischämischen Bedingungen im Gehirn zur Gewebeazidose, zu einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in den Neuronen und schließlich zum Zelltod der Neurone kommt [Rehncrona, 1985, Lobner and Lipton, 1993]. Dabei konnte insbesondere die lang anhaltende Gewebeazidose unter ischämischen Bedingungen als ein wesentlicher kausaler Faktor des neuronalen Zelltods identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass ein Wiederanheben des extrazellulären pH-Wertes nach zerebraler Ischämie in vivo zu einer Reduktion des Volumens des ischämischen Schlaganfalls führt [Pignataro et al., 2007]. Die Entdeckung der säure-reaktivierten Kationenkanäle ASICs lieferte einen vielversprechenden molekularen Mechanismus, über den die Gewebeazidose zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und schließlich dem Zelltod der Neurone führen könnte [Waldmann et al., 1997b]. Dass ASICs tatsächlich einen überragenden Effekt in der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls darstellen, legten in vivo-Experimente nahe, in denen die Blockade von ASIC1a-Homomeren und ASIC1a/2b-Heteromeren zu einer deutlichen Reduktion des Schlaganfallvolumens führte [Xiong et al., 2004, Pignataro et al., 2007, Sherwood et al., 2011].

Unklar ist hingegen bisher geblieben, auf welche Weise eine lang anhaltende Gewebeazidose zu einem ebenfalls für Minuten bis Stunden anhaltenden Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in den Kortexneuronen führen kann. Die säure-reaktivierten Kationenströme über ASICs in Kortexneuronen sind transient und spielen sich im Sekundenbereich ab [Li et al., 2010b]. Somit können diese Ströme für sich genommen für einen Minuten bis Stunden anhaltenden Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration kaum verantwortlich sein. In dieser Arbeit ließ sich durch kontinuierliche Superfusion mit saurer Badlösung ($\text{pH}_1 = 6,0$ bzw. $\text{pH}_2 = 5,0$) für 3 min und 20 s ein transients Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Kortexneuronen auslösen. Nach 1 min, noch unter Superfusion mit der sauren Badlösung kehrte die Ca^{2+} -Konzentration jedoch wieder auf den Ausgangswert zurück. Es konnte also kein auch nur für Minuten andauernder säureinduzierter Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in den Kortexneuronen dokumentiert werden. Eine mögliche Erklärung könnte eine Signalkaskade sein, die über einen transienten Azidose-induzierten Gipfel in der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration initiiert wird. Diese Signalkaskade könnte zu Veränderungen in den Neuronen führen, die eine erst nach Minuten beginnende Überladung mit Ca^{2+} -Ionen und schließlich den neuronalen Zelltod bewirken. Beispielsweise könnte die aus anderen Kontexten bekannte Ca^{2+} -abhängige Kaskade über Calmodulin, Calcineurin und NFAT eine Rolle spielen. Langzeit-Aufnahmen mittels Fura-2-Imaging in Neuronen unter Azidose könnten vielleicht erste Hinweise liefern, in welchem zeitlichen Rahmen es zur Überladung der Neurone mit Ca^{2+} -

Ionen kommt.

5.2 Mechanismen des säureinduzierten Ca^{2+} -Anstiegs in Kortexneuronen

Wie schon in anderen Arbeiten [Xiong et al., 2004] konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich der Großteil des transienten, säureinduzierten Anstiegs der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch Amilorid blockieren lässt. Dies deutet auf eine Rolle von ASICs beim säureinduzierten Ca^{2+} -Einstrom hin. Allerdings können durch Amilorid in der verwendeten Konzentration von 100 μM auch andere Membranmoleküle beeinflusst werden, die Einfluss auf die Regulation der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration haben, wie etwa der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher [Xiong et al., 2008]. Ein spezifischerer Hinweis darauf, dass ASIC1-Proteine eine Schlüsselrolle beim säureinduzierten Anstieg der intraneuronalen Ca^{2+} -Konzentration innehaben, ist die Bestätigung der Beobachtung, dass es in ASIC1^{-/-}-Neuronen nicht zu einem säureinduzierten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration kommt [Xiong et al., 2004]. In den Experimenten dieser Arbeit führte eine K^+ -vermittelte Depolarisation des Membranpotentials in ASIC1^{-/-}-Neuronen und in WT-Neuronen zu einer identischen Reaktion der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Somit ist nicht anzunehmen, dass es in den ASIC1^{-/-}-Neuronen zu einer Beeinflussung von spannungsabhängigen Ionenkanälen in der Zellmembran gekommen ist.

Der Kationeneinstrom über aktivierte ASICs in Kortexneuronen ist ausreichend Aktionspotentiale auszulösen [Baron et al., 2002, Weng et al., 2010]. Die im Gehirn exprimierten spannungsabhängigen LTCCs $\text{Ca}_v1.2$ und $\text{Ca}_v1.3$ werden durch Depolarisation des Membranpotentials aktiviert [Catterall et al., 2005]. Folglich wäre eine Potenzierung des säureinduzierten, ASIC-vermittelten Anstiegs der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch einen Ca^{2+} -Einstrom über LTCCs zu erwarten, zumal auch der Ca^{2+} -Einstrom über ASICs selbst eher vernachlässigbar zu sein scheint [Bässler et al., 2001, Samways et al., 2009]. In bisherigen Arbeiten konnte der säureinduzierte Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch pharmakologische Blockade der LTCCs mittels Nifedipin nicht beeinflusst werden [Yermolai-eva et al., 2004, Mari et al., 2010]. Abweichend hiervon konnten in dieser Arbeit 63% des pH 6,0-induzierten und 87% des pH 5,0-induzierten Anstiegs der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch 5 μM Nimodipin inhibiert werden. Möglicherweise tragen auch unter pathophysiologischen Bedingungen im ZNS, insbesondere bei zerebraler Ischämie LTCCs einen erheblichen Teil zum säureinduzierten Ca^{2+} -Einstrom in Kortexneuronen bei. Dazu wäre es interessant den Effekt eines spezifischen LTCC-Blockers wie beispielsweise Nimodipin auf das Infarktvolumen nach zerebraler Ischämie in vivo zu erfassen.

Der Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Neuronen infolge von Aktionspotentialen ist z.T. durch den Mechanismus des CICR mitbedingt, wobei aus dem

ER über RyRs Ca^{2+} -Ionen freigesetzt werden [Sandler and Barbara, 1999]. Es wurde beschrieben, dass in Neuronen eine direkte Interaktion von spannungsabhängigen LTCCs mit dem RyR zu dem durch Depolarisation bedingten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beiträgt [Berroult and Isokawa, 2009]. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine Aktivierung von LTCCs beim säureinduzierten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nahe. Somit liegt der Verdacht nahe, dass über eine Interaktion von aktivierten LTCCs und RyRs auch ein Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER in dem säureinduzierten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Kortexneuronen involviert sein könnten. Der Zusammenhang von extrazellulärer Azidose und Ca^{2+} -Einstrom aus dem ER ist in Neuronen bisher nicht untersucht. In dieser Arbeit konnte nach pharmakologischer Entleerung des ER durch 1 μM Thapsigargin keine Änderung der Amplitude des pH 6,0- bzw. pH 5,0-induzierten Anstiegs der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration registriert werden. Dies spricht überraschenderweise gegen einen Beitrag von Ca^{2+} -Einstrom aus dem ER zum säureinduzierten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration.

Zusammenfassend lassen sich folgende Feststellungen machen: für den säurebedingten Anstieg der intraneuronalen Ca^{2+} -Konzentration ist die Anwesenheit von ASIC1-Untereinheiten unabdingbar. Dabei scheint der quantitativ bedeutendere Einstrom von Ca^{2+} -Ionen jedoch über LTCCs zu erfolgen. Die Experimente dieser Arbeit legen nahe, dass eine Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER in diesem Kontext keine wesentliche Rolle zu spielen scheint. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass noch weitere zelluläre Mechanismen (beispielsweise reduzierter Ca^{2+} -Transport über den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher oder Ca^{2+} -Freisetzung aus den Mitochondrien) zu dem transienten Anstieg der neuronalen Ca^{2+} -Konzentration nach extrazellulärer Azidose beitragen.

5.3 ASIC-Untereinheiten in Kortexneuronen

In Kortexneuronen des zentralen Nervensystems werden funktionelle ASICs unter Beteiligung der Untereinheiten ASIC1a, -2a und 2b gebildet [Baron et al., 2002, Askwith et al., 2004, Li et al., 2010b]. ASIC1a-Homomere und ASIC1a/2b-Heteromere werden bei einem $\text{pH}_{50} = 6,2\text{-}6,8$ halbmaximal aktiviert [Waldmann et al., 1997b, Sherwood et al., 2011]; ASIC2a-Homomere dagegen erst bei $\text{pH}_{50} = 4,4$ [Lingueglia et al., 1997]. Wie aufgrund dieser Daten zu erwarten, war die Applikation der pH-Werte 6,0 und 5,0 in den Experimenten dieser Arbeit ausreichend, um einen säureinduzierten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in den Kortexneuronen hervorzurufen. Die Superfusion von Badlösung mit $\text{pH}_1 = 6,0$ erbrachte eine Ca^{2+} -Amplitude von $280,2 \pm 14,8$ in der Fluoreszenzmessung. Die Superfusion von Badlösung mit $\text{pH}_2 = 5,0$ rief eine Ca^{2+} -Amplitude von $311,5 \pm 13,3$ hervor. Der Unterschied war zwar signifikant, jedoch eher klein. Dieser Unterschied ließe sich einerseits durch eine maximale Aktivierung von ASIC1a-Homomeren und ASIC1a/2b-

Heteromeren erklären. Eine andere Erklärung wäre in einer zusätzlichen Aktivierung von ASIC2a-Homomeren zu finden. In elektrophysiologischen Experimenten in Kortexneuronen trat bei der Aktivierung der säureinduzierten Kationeneinströme ab pH-Werten um 4,0 eine Sättigung der Stromamplitude ein [Li et al., 2010b]. Es wäre interessant zu untersuchen, ab welchem pH-Wert auch für die säureinduzierte Ca^{2+} -Amplitude ein Sättigungseffekt auftritt. Bei funktionell relevanter Anwesenheit von ASIC2a-Homomeren in den Kortexneuronen wäre ein ähnlicher pH-Wert für den Sättigungseffekt der säureinduzierten Ca^{2+} -Amplitude wie in den elektrophysiologischen Messungen zu erwarten.

5.4 Präkonditionierung durch extrazelluläre Azidose

Seit langem sind die Phänomene der ischämischen Präkonditionierung und der ischämischen Toleranz bei zerebraler Ischämie bekannt [Kitagawa et al., 1990, Matsushima and Hakim, 1995]. Neuerdings wurde beschrieben, dass auch saure Präkonditionierung durch Exposition in CO_2 -angereicherter Atmosphäre einen neuroprotektiven Effekt gegenüber Ischämie in vivo hat [Zhang et al., 2012]. In der vorliegenden Arbeit konnte durch saure Präkonditionierung bei pH 6,0 über drei verschiedene Zeiträume (1 h, 6 h und über Nacht) die Amplitude der transienten, säureinduzierten Anstiege der Ca^{2+} -Konzentration modifiziert werden: nach saurer Präkonditionierung wurden die Amplituden des säureinduzierten Ca^{2+} -Anstiegs mit der Länge des Präkonditionierungszeitraums zunehmend kleiner. Eine Sonderstellung nahm die sechsstündige Präkonditionierung ein, nach der es zu einem Wiederanstieg der durch einstündige Präkonditionierung zunächst reduzierten Ca^{2+} -Amplitude kam. Zugleich existierten nach sechsstündiger Präkonditionierung einige Neurone mit einer pH 5,0-induzierten Ca^{2+} -Amplitude > 600 , welche nach Präkonditionierung für 1 h oder über Nacht nicht zu beobachten waren. Saure Präkonditionierung für 1 h oder über Nacht, weniger jedoch für 6 h scheint also zu einer Verkleinerung des durch extrazelluläre Azidose bedingten transienten Anstiegs der intraneuronalen Ca^{2+} -Konzentration zu führen.

Auch die durch hohe K^+ -Konzentration hervorgerufenen, depolarisationsinduzierten Ca^{2+} -Amplituden in WT-Kortexneuronen ließen sich durch Präkonditionierung mittels Azidose in gleicher Weise beeinflussen. In den $\text{ASIC1}^{-/-}$ -Neuronen blieben die depolarisationsinduzierten Ca^{2+} -Amplituden von der Präkonditionierung mittels Azidose jedoch unbeeinflusst. Dies legt einerseits nahe, dass die Modulation des Ca^{2+} -Einstroms durch saure Präkonditionierung ASIC1-abhängig ist. Andererseits ließ sich die unter Nimodipin-Blockade verbleibende pH 5,0-induzierte Ca^{2+} -Amplitude durch Präkonditionierung nicht ändern (die beobachteten Änderungen der pH 6,0-induzierten Amplituden durch Präkonditionierung müssen mit Vorsicht interpretiert werden, da sie nur aus einer Präparation stammen, siehe 4.1.4); es wurde also der durch Nimodipin blockierbare Anteil des Ca^{2+} -Einstroms moduliert.

Damit liegt die Vermutung nahe, dass die saure Präkonditionierung einen Effekt auf den spannungssensitiven Apparat der Zellmembran, insbesondere LTCCs, hat. Um diese Hypothese zu untersuchen, wäre es interessant, den Einfluss von saurer Präkonditionierung beispielsweise auf das Expressionsniveau der Transkripte für LTCCs oder die elektrophysiologischen Eigenschaften von LTCCs in WT- und ASIC1^{-/-}-Neuronen zu vergleichen.

Es ist beschrieben, dass ischämische Präkonditionierung zu einer verminderten Expression der säuresensitiveren ASIC1a-Untereinheiten ($pH_{50} = 6,2-6,8$ für ASIC1a-Homomere [Waldmann et al., 1997b, Benson et al., 2002]) und zu einer verstärkten Expression der weniger säuresensitiven ASIC2-Untereinheiten ($pH_{50} = 4,4$ für ASIC2a-Homomere [Lingueglia et al., 1997]) führt [Miao et al., 2010, Pignataro et al., 2011]. Der Effekt von saurer Präkonditionierung auf das Expressionsniveau der verschiedenen ASIC-Untereinheiten ließe sich - wie in dieser Arbeit bereits begonnen - am besten durch quantitative PCR und Western Blot bestimmen. Leider ließen sich in dieser Arbeit keine belastbaren Daten in der qPCR erheben.

Gegen eine Herunterregulation von ASIC1a-Untereinheiten und eine Hochregulation von ASIC2-Untereinheiten durch saure Präkonditionierung spricht jedoch folgende Beobachtung aus den Experimenten mit Fura-2-Imaging: der kleine, jedoch signifikante Unterschied zwischen den pH 6,0- und den pH 5,0-induzierten Ca^{2+} -Amplituden in den Kortexneuronen verschwindet nach Inkubation bei $pH_{Präkond.} = 6,0$ für 1 h, 6 h oder über Nacht. Nach der Präkonditionierung mittels Azidose erzielt also eine Aktivierung der neuronalen ASICs mit $pH_1 = 6,0$ bereits eine maximale Ca^{2+} -Amplitude in den Kortexneuronen. Dies spräche eher für eine verminderte Expression von weniger säuresensitiven ASIC2-Untereinheiten in der neuronalen Zellmembran.

In den Versuchen dieser Arbeit mit Fura-2-Imaging konnte beobachtet werden, dass saure Präkonditionierung zu einer Reduktion der Amplitude des säureinduzierten Anstiegs der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und zu einer Vergrößerung der Anzahl an Neuronen, deren Ca^{2+} -Amplitude kleiner als 50 war, führte. Interpretiert man das „Nicht-Antworten“ mancher Neurone als Überlebensvorteil, ließen sich diese Ergebnisse mit folgenden Hypothesen in Einklang bringen: auch durch saure Präkonditionierung werden oben genannte Veränderungen im Expressionsmuster von ASICs in Kortexneuronen verursacht; dadurch entsteht ein neuroprotektiver Effekt. Möglicherweise sind die „nicht antwortenden“ Neurone jedoch auch schon geschädigt und deshalb nicht zu einem säureinduzierten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration befähigt. Die Zunahme ihrer Anzahl nach saurer Präkonditionierung wäre dann nur ein Hinweis auf den zytotoxischen Effekt der sauren Präkonditionierung selbst. Um zwischen zytoprotektivem und zytotoxischem Effekt der sauren Präkonditionierung unterscheiden zu können, wären Vitalitäts- bzw. Letalitäts-Essays geeignet.

Der in dieser Arbeit zur Präkonditionierung der Neurone verwendete $pH_{Präkond.} = 6,0$ entspricht bereits dem unter ischämischen Bedingungen im Gehirn maximal auftretenden pH-Abfall [Rehncrona, 1985, Nedergaard et al., 1991b]. Klassischerweise versteht man unter Präkonditionierung jedoch einen subletalen Stimulus, der einen neuroprotektiven Effekt gegenüber einer darauffolgenden letalen Ischämie bewirkt. Es wäre daher sinnvoll zu untersuchen, welchen Effekt die Inkubation von Neuronen bei weniger sauren pH-Werten (beispielsweise pH 6,5 - 7,0) auf die säureinduzierten Ca^{2+} -Amplituden hat.

Auch nach saurer Präkonditionierung wurden in dieser Arbeit keine Hinweise auf einen Beitrag von Ca^{2+} -Einstrom aus dem ER zumindest zum pH 5,0-induzierten Ca^{2+} -Anstieg gefunden. Nach einstündiger Präkonditionierung konnte nach Thapsigargin-Applikation kleiner ausfallende pH 6,0-induzierte Ca^{2+} -Amplituden dokumentiert werden. Diese Beobachtung basiert jedoch auf Daten, welche im Widerspruch zu Daten aus den anderen Versuchsreihen stehen: in der Versuchsreihe mit Thapsigargin kam es zu einem bisher nicht beobachteten nicht-signifikanten ($p = 0,55$) Anstieg der pH 6,0-induzierten Ca^{2+} -Amplitude durch die einstündige Präkonditionierung. In den Versuchen ohne pharmakologische Beeinflussung, sowie auch in den Messreihen mit Nimodipin war es nach einstündiger Präkonditionierung dagegen zu einer signifikanten Reduktion der pH 6,0-induzierten Ca^{2+} -Amplituden gekommen. Um eine aussagekräftigere Untersuchung der Rolle von Ca^{2+} -Einstrom aus dem ER beim pH 6,0-induzierten Ca^{2+} -Anstieg zu erhalten, müsste dieser Versuch mit größerer Fallzahl wiederholt werden. Die bisherigen Ergebnisse legen jedoch nahe, dass auch nach saurer Präkonditionierung der überwiegende Anteil der Ca^{2+} -Ionen nach extrazellulärer Azidose über LTCCs und nicht aus dem ER ins neuronale Zytosol gelangen.

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit folgende Hypothesen: durch saure Präkonditionierung kommt es zu einer Modulation und insbesondere auch Reduktion des säureinduzierten Ca^{2+} -Einstroms in Neuronen; dies könnte einerseits durch die beschriebene Hochregulation von ASIC2-Untereinheiten und Herunterregulation von ASIC1a-Untereinheiten bedingt sein; andererseits könnte dabei auch eine ASIC1-abhängige Regulation von LTCCs eine Rolle spielen. Die Länge der Präkonditionierung mittels Azidose könnte mit darüber entscheiden, ob ein neuroprotektiver Effekt eintritt oder nicht.

5.5 Methodenkritik zur Durchführung der qPCR

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen zum Expressionsmuster der Transkripte für ASIC1a, -2a und -2b zeigten keine signifikanten Unterschiede durch Präkonditionierung mittels Azidose für 1 h, 6 h oder über Nacht.

Bei der Durchführung der qPCR nach dem Schema, wie es in Abschnitt 3.2.7 beschrieben ist, ist es bei dieser Arbeit immer wieder zu Problemen gekommen: zum

einen waren die gemessenen Ct-Werte - u.a. auch für das Haushaltsgen GAPDH - sehr hoch (bis über 40). So hohe Ct-Werte ließen sich anhand der Menge der revers transkribierten RNA nicht erwarten. Außerdem ist die Bestimmung der initial vorhandenen cDNA und damit des Expressionsniveaus der mRNA-Transkripte aus so hohen Ct-Werten äußerst ungenau. Das zweite wiederkehrende Problem war, dass sich die Ct-Werte für ein beliebiges Primerpaar aus ein und derselben cDNA-Probe mit dem hier verwendeten qPCR-Protokoll nicht reproduzieren ließen.

Zunächst wurde von degradiertem cDNA durch Kontamination mit DNAsen ausgegangen, sodass neue cDNA synthetisiert wurde. Dann wurde das Problem in der reversen Transkription der mRNA gesucht. Daher wurde die eingesetzte Gesamt-RNA-Menge verändert sowie eine reverse Transkription mit Zufalls-Hexamer-Primern anstelle von oligo-(dT)₂₀-Primern durchgeführt. Außerdem wurde mehrfach neue RNA aus primärkultivierten Kortexneuronen gewonnen, revers transkribiert und mittels qPCR analysiert. All diese Lösungsansätze führten jedoch nicht zu niedrigeren und reproduzierbaren Ct-Werten. Die hier gezeigten Ergebnisse der qPCR sind also bestenfalls als erste Hinweise für zukünftige Versuche zu verstehen. Keinesfalls können aus diesen Ergebnissen statistisch abgesicherte Aussagen zur Beeinflussung des Expressionsniveaus der ASIC-Untereinheiten in Kortexneuronen durch Präkonditionierung mittels Azidose gewonnen werden.

5.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnten die bereits bekannte Schlüsselrolle von ASIC1a-Untereinheiten beim säureinduzierten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Kortexneuronen bestätigt werden. Die pharmakologische Blockade von ASIC1a-Homomeren und ASIC1a/2b-Heteromeren scheint ein vielversprechender neuer Ansatz für die Therapie des ischämischen Schlaganfalls zu sein. Daneben konnte ein quantitativ bedeutender Beitrag von LTCCs zum säureinduzierten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Kortexneuronen gezeigt werden. Ob LTCCs auch beim ischämischen Schlaganfall zur Potenzierung des Ca^{2+} -Einstroms beitragen, bleibt noch ungeklärt. LTCCs als pharmakologische Zielproteine in der Therapie des ischämischen Schlaganfalls lassen in Anbetracht ihrer Expression insbesondere im Herz-Kreislauf-System einige systemische Nebenwirkungen erwarten; dennoch erscheint es sinnvoll, die Rolle der LTCCs beim ischämischen Schlaganfall experimentell näher zu betrachten.

Präkonditionierung mittels Azidose führte in dieser Arbeit abhängig von der Länge des Präkonditionierungszeitraums zu einer Modulation des säureinduzierten Ca^{2+} -Einstroms in Kortexneuronen. Ob sich durch Präkonditionierung mittels Azidose auch das Überleben von Neuronen unter sauren beziehungsweise ischämischen Bedingungen modifizieren oder sogar günstig beeinflussen lässt, muss in weiteren Arbeiten untersucht werden. Auf zellulärer Ebene wäre eventuell der Einfluss von

Präkonditionierung mittels Azidose auf die Funktion von spannungsabhängigen LT-CCs in der neuronalen Zellmembran ein interessantes Versuchsobjekt. Es sollte auch der Effekt von weniger sauren pH-Werten (etwa pH 6,5 - 7,0) für die Präkonditionierung der Neurone untersucht werden. Sollte sich die Hypothese der Neuroprotektion mittels saurer Präkonditionierung bestätigen lassen, wäre zu überlegen, wie sich eine solche Art der Präkonditionierung in ein klinisch brauchbares therapeutisches Konzept umsetzen ließe.

6 Zusammenfassung

Unter ischämischen Bedingungen kommt es im Gehirn zur Gewebeazidose. Durch Aktivierung der säureaktivierten Kationenkanäle ASICs kommt es in Neuronen zum transienten Einstrom von Ca^{2+} -Ionen und im Verlauf zum neuronalen Zelltod. Der genaue Mechanismus, über den die Aktivierung von ASICs durch Azidose zum Anstieg der neuronalen Ca^{2+} -Konzentration führt, ist nicht vollständig bekannt. Durch Präkonditionierung mittels Ischämie oder Azidose lässt sich in Neuronen ein neuroprotektiver Effekt gegenüber ischämischer Schädigung induzieren. Es gibt erste Hinweise, dass ischämische Präkonditionierung zu Veränderungen im Expressionsmuster von ASICs führen.

In dieser Arbeit wurde mittels Fura-2-Imaging an primärkultivierten WT- und $\text{ASIC1}^{-/-}$ -Kortexneuronen der Maus untersucht, welche anderen zellulären Mechanismen zum säureinduzierten Anstieg der neuronalen Ca^{2+} -Konzentration beitragen. Der Effekt von Präkonditionierung durch Azidose für verschiedene Zeiträume auf den fluorometrisch gemessenen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration und das durch qPCR ermittelte Expressionsniveau der ASIC-Untereinheiten 1a, 2a und 2b wurde erfasst.

Die Blockade von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen durch Nimodipin, nicht jedoch die Entleerung des endoplasmatischen Retikulums mittels Thapsigargin führte zu einer deutlichen Reduktion des säureinduzierten Anstiegs der neuronalen Ca^{2+} -Konzentration. In $\text{ASIC1}^{-/-}$ -Neuronen ließ sich durch Azidose kein Anstieg der neuronalen Ca^{2+} -Konzentration hervorrufen. Durch Präkonditionierung mittels Azidose konnte in Abhängigkeit vom Präkonditionierungszeitraum eine Reduktion des säureinduzierten Anstiegs der neuronalen Ca^{2+} -Konzentration bewirkt werden. Auch der depolarisationsinduzierte Anstieg der neuronalen Ca^{2+} -Konzentration konnte in gleicher Weise in WT-Neuronen, nicht jedoch in $\text{ASIC1}^{-/-}$ -Neuronen beeinflusst werden. Mittels qPCR ließ sich kein Einfluss von Präkonditionierung mittels Azidose auf die Regulation von ASIC1a, -2a oder 2b auf Transkriptionsebene feststellen.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der Großteil des säureinduzierten Anstiegs der Ca^{2+} -Konzentration in Neuronen durch sekundär aktivierte L-Typ Ca^{2+} -Kanäle vermittelt wird. Präkonditionierung mittels Azidose scheint vor allem auf den säureinduzierten Ca^{2+} -Einstrom über L-Typ Ca^{2+} -Kanäle in Neuronen einen Einfluss zu haben. Dieser Effekt der Präkonditionierung mittels Azidose ist wahrscheinlich ASIC1-abhängig. Diese Ergebnisse geben neue Hinweise auf die Rolle von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen beim ischämischen Zelltod von Neuronen und bei der Präkonditionierung mittels Azidose. Dem könnte in in vivo-Modellen der zerebralen Ischämie nachgegangen werden.

Literatur

- [Alvarez de la Rosa et al., 2003] Alvarez de la Rosa, D., Krueger, S. R., Kolar, A., Shao, D., Fitzsimonds, R. M., and Canessa, C. M. (2003). Distribution, subcellular localization and ontogeny of *asic1* in the mammalian central nervous system. *J Physiol*, 546(Pt 1):77–87.
- [Askwith et al., 2004] Askwith, C. C., Wemmie, J. A., Price, M. P., Rokhlina, T., and Welsh, M. J. (2004). Acid-sensing ion channel 2 (*asic2*) modulates *asic1* h⁺-activated currents in hippocampal neurons. *J Biol Chem*, 279(18):18296–305.
- [Babinski et al., 2000] Babinski, K., Catarsi, S., Biagini, G., and Séguéla, P. (2000). Mammalian *asic2a* and *asic3* subunits co-assemble into heteromeric proton-gated channels sensitive to *gd3*⁺. *J Biol Chem*, 275(37):28519–25.
- [Bano and Nicotera, 2007] Bano, D. and Nicotera, P. (2007). Ca²⁺ signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke*, 38(2 Suppl):674–6.
- [Baron et al., 2002] Baron, A., Waldmann, R., and Lazdunski, M. (2002). *Asic*-like, proton-activated currents in rat hippocampal neurons. *J Physiol*, 539(Pt 2):485–94.
- [Bässler et al., 2001] Bässler, E. L., Ngo-Anh, T. J., Geisler, H. S., Ruppersberg, J. P., and Gründer, S. (2001). Molecular and functional characterization of acid-sensing ion channel (*asic*) 1b. *J Biol Chem*, 276(36):33782–7.
- [Benson et al., 2002] Benson, C. J., Xie, J., Wemmie, J. A., Price, M. P., Henss, J. M., Welsh, M. J., and Snyder, P. M. (2002). Heteromultimers of *deg/enac* subunits form h⁺-gated channels in mouse sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(4):2338–43.
- [Berrouit and Isokawa, 2009] Berrouit, J. and Isokawa, M. (2009). Homeostatic and stimulus-induced coupling of the l-type ca²⁺ channel to the ryanodine receptor in the hippocampal neuron in slices. *Cell Calcium*, 46(1):30–8.
- [Bhuiyan and Kim, 2010] Bhuiyan, M. I. H. and Kim, Y. J. (2010). Mechanisms and prospects of ischemic tolerance induced by cerebral preconditioning. *Int Neurol*, 14(4):203–12.
- [Bolshakov et al., 2002] Bolshakov, K. V., Essin, K. V., Buldakova, S. L., Dorofeeva, N. A., Skatchkov, S. N., Eaton, M. J., Tikhonov, D. B., and Magazanik, L. G. (2002). Characterization of acid-sensitive ion channels in freshly isolated rat brain neurons. *Neuroscience*, 110(4):723–30.
- [Bruer et al., 1997] Bruer, U., Weih, M. K., Isaev, N. K., Meisel, A., Ruscher, K., Bergk, A., Trendelenburg, G., Wiegand, F., Victorov, I. V., and Dirnagl, U. (1997).

- Induction of tolerance in rat cortical neurons: hypoxic preconditioning. *FEBS Lett*, 414(1):117–21.
- [Bull et al., 2008] Bull, R., Finkelstein, J. P., Gálvez, J., Sánchez, G., Donoso, P., Behrens, M. I., and Hidalgo, C. (2008). Ischemia enhances activation by Ca^{2+} and redox modification of ryanodine receptor channels from rat brain cortex. *J Neurosci*, 28(38):9463–72.
- [Busquet et al., 2008] Busquet, P., Hetzenauer, A., Sinnegger-Brauns, M. J., Striessnig, J., and Singewald, N. (2008). Role of l-type Ca^{2+} channel isoforms in the extinction of conditioned fear. *Learn Mem*, 15(5):378–86.
- [Catterall et al., 2005] Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., and Striessnig, J. (2005). International union of pharmacology. xlviii. nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev*, 57(4):411–25.
- [Choi and Rothman, 1990] Choi, D. W. and Rothman, S. M. (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci*, 13:171–82.
- [Coric et al., 2008] Coric, T., Passamaneck, Y. J., Zhang, P., Di Gregorio, A., and Canessa, C. M. (2008). Simple chordates exhibit a proton-independent function of acid-sensing ion channels. *FASEB J*, 22(6):1914–23.
- [Correia et al., 2010] Correia, S. C., Santos, R. X., Perry, G., Zhu, X., Moreira, P. I., and Smith, M. A. (2010). Mitochondria: the missing link between preconditioning and neuroprotection. *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 2:S475–85.
- [Coryell et al., 2009] Coryell, M. W., Wunsch, A. M., Haenfler, J. M., Allen, J. E., Schnizler, M., Ziemann, A. E., Cook, M. N., Dunning, J. P., Price, M. P., Rainier, J. D., Liu, Z., Light, A. R., Langbehn, D. R., and Wemmie, J. A. (2009). Acid-sensing ion channel-1a in the amygdala, a novel therapeutic target in depression-related behavior. *J Neurosci*, 29(17):5381–8.
- [Coscoy et al., 1999] Coscoy, S., de Weille, J. R., Lingueglia, E., and Lazdunski, M. (1999). The pre-transmembrane 1 domain of acid-sensing ion channels participates in the ion pore. *J Biol Chem*, 274(15):10129–32.
- [Davis and Patel, 2003] Davis, D. P. and Patel, P. M. (2003). Ischemic preconditioning in the brain. *Curr Opin Anaesthesiol*, 16(5):447–52.
- [Deval et al., 2004] Deval, E., Salinas, M., Baron, A., Lingueglia, E., and Lazdunski, M. (2004). Asic2b-dependent regulation of asic3, an essential acid-sensing ion channel subunit in sensory neurons via the partner protein pick-1. *J Biol Chem*, 279(19):19531–9.

- [Dhawan et al., 2011] Dhawan, J., Benveniste, H., Luo, Z., Nawrocky, M., Smith, S. D., and Biegon, A. (2011). A new look at glutamate and ischemia: Nmda agonist improves long-term functional outcome in a rat model of stroke. *Future Neurol*, 6(6):823–834.
- [Escoubas et al., 2000] Escoubas, P., De Weille, J. R., Lecoq, A., Diochot, S., Waldmann, R., Champigny, G., Moinier, D., Ménez, A., and Lazdunski, M. (2000). Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na^+ channels. *J Biol Chem*, 275(33):25116–21.
- [Foster et al., 1988] Foster, A. C., Gill, R., and Woodruff, G. N. (1988). Neuroprotective effects of mk-801 in vivo: selectivity and evidence for delayed degeneration mediated by nmda receptor activation. *J Neurosci*, 8(12):4745–54.
- [Friesse et al., 2007] Friesse, M. A., Craner, M. J., Etzensperger, R., Vergo, S., Wemmie, J. A., Welsh, M. J., Vincent, A., and Fugger, L. (2007). Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Nat Med*, 13(12):1483–9.
- [Fujii et al., 2008] Fujii, Y., Ozaki, N., Taguchi, T., Mizumura, K., Furukawa, K., and Sugiura, Y. (2008). Trp channels and ASICs mediate mechanical hyperalgesia in models of inflammatory muscle pain and delayed onset muscle soreness. *Pain*, 140(2):292–304.
- [Gao et al., 2005] Gao, J., Duan, B., Wang, D.-G., Deng, X.-H., Zhang, G.-Y., Xu, L., and Xu, T.-L. (2005). Coupling between nmda receptor and acid-sensing ion channel contributes to ischemic neuronal death. *Neuron*, 48(4):635–46.
- [Goldberg et al., 1987] Goldberg, M. P., Weiss, J. H., Pham, P. C., and Choi, D. W. (1987). N-methyl-D-aspartate receptors mediate hypoxic neuronal injury in cortical culture. *J Pharmacol Exp Ther*, 243(2):784–91.
- [Goldman et al., 1989] Goldman, S. A., Pulsinelli, W. A., Clarke, W. Y., Kraig, R. P., and Plum, F. (1989). The effects of extracellular acidosis on neurons and glia in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab*, 9(4):471–7.
- [Grégoire and Matricon, 2009] Grégoire, S. and Matricon, J. (2009). Differential involvement of ASIC1a in the basolateral amygdala in fear memory and unconditioned fear responses. *J Neurosci*, 29(19):6053–4.
- [Hacke et al., 2008] Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Dávalos, A., Guidetti, D., Larrue, V., Lees, K. R., Medeghri, Z., Machnig, T., Schneider, D., von Kummer, R., Wahlgren, N., Toni, D., and ECASS Investigators (2008). Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 359(13):1317–29.

- [Hesselager et al., 2004] Hesselager, M., Timmermann, D. B., and Ahring, P. K. (2004). pH dependency and desensitization kinetics of heterologously expressed combinations of acid-sensing ion channel subunits. *J Biol Chem*, 279(12):11006–15.
- [Hoyte et al., 2004] Hoyte, L., Barber, P. A., Buchan, A. M., and Hill, M. D. (2004). The rise and fall of nmda antagonists for ischemic stroke. *Curr Mol Med*, 4(2):131–6.
- [Inesi et al., 2005] Inesi, G., Hua, S., Xu, C., Ma, H., Seth, M., Prasad, A. M., and Sumbilla, C. (2005). Studies of ca^{2+} atpase (serca) inhibition. *J Bioenerg Biomembr*, 37(6):365–8.
- [Jasti et al., 2007] Jasti, J., Furukawa, H., Gonzales, E. B., and Gouaux, E. (2007). Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature*, 449(7160):316–23.
- [Jensen and Auer, 1988] Jensen, M. L. and Auer, R. N. (1988). Ketamine fails to protect against ischaemic neuronal necrosis in the rat. *Br J Anaesth*, 61(2):206–10.
- [Jones et al., 2004] Jones, N. G., Slater, R., Cadiou, H., McNaughton, P., and McMahon, S. B. (2004). Acid-induced pain and its modulation in humans. *J Neurosci*, 24(48):10974–9.
- [Kapoor et al., 2009] Kapoor, N., Bartoszewski, R., Qadri, Y. J., Bebok, Z., Buben, J. K., Fuller, C. M., and Benos, D. J. (2009). Knockdown of *asic1* and epithelial sodium channel subunits inhibits glioblastoma whole cell current and cell migration. *J Biol Chem*, 284(36):24526–41.
- [Kellenberger and Schild, 2002] Kellenberger, S. and Schild, L. (2002). Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev*, 82(3):735–67.
- [Kitagawa et al., 1991] Kitagawa, K., Matsumoto, M., Kuwabara, K., Tagaya, M., Ohtsuki, T., Hata, R., Ueda, H., Handa, N., Kimura, K., and Kamada, T. (1991). ‘ischemic tolerance’ phenomenon detected in various brain regions. *Brain Res*, 561(2):203–11.
- [Kitagawa et al., 1990] Kitagawa, K., Matsumoto, M., Tagaya, M., Hata, R., Ueda, H., Niinobe, M., Handa, N., Fukunaga, R., Kimura, K., and Mikoshiba, K. (1990). ‘ischemic tolerance’ phenomenon found in the brain. *Brain Res*, 528(1):21–4.
- [Langwieser et al., 2010] Langwieser, N., Christel, C. J., Kleppisch, T., Hofmann, F., Wotjak, C. T., and Moosmang, S. (2010). Homeostatic switch in hebbian plasticity and fear learning after sustained loss of *cav1.2* calcium channels. *J Neurosci*, 30(25):8367–75.

- [Lehotský et al., 2009] Lehotský, J., Burda, J., Danielisová, V., Gottlieb, M., Kaplán, P., and Saniová, B. (2009). Ischemic tolerance: the mechanisms of neuroprotective strategy. *Anat Rec (Hoboken)*, 292(12):2002–12.
- [Li et al., 2010a] Li, M., Inoue, K., Branigan, D., Kratzer, E., Hansen, J. C., Chen, J. W., Simon, R. P., and Xiong, Z.-G. (2010a). Acid-sensing ion channels in acidosis-induced injury of human brain neurons. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30(6):1247–60.
- [Li et al., 2010b] Li, M., Kratzer, E., Inoue, K., Simon, R. P., and Xiong, Z.-G. (2010b). Developmental change in the electrophysiological and pharmacological properties of acid-sensing ion channels in cns neurons. *J Physiol*, 588(Pt 20):3883–900.
- [Li et al., 2011] Li, M.-h., Inoue, K., Si, H.-f., and Xiong, Z.-g. (2011). Calcium-permeable ion channels involved in glutamate receptor-independent ischemic brain injury. *Acta Pharmacol Sin*, 32(6):734–40.
- [Light et al., 2008] Light, A. R., Huguen, R. W., Zhang, J., Rainier, J., Liu, Z., and Lee, J. (2008). Dorsal root ganglion neurons innervating skeletal muscle respond to physiological combinations of protons, atp, and lactate mediated by asic, p2x, and trpv1. *J Neurophysiol*, 100(3):1184–201.
- [Lin et al., 2011] Lin, J., Chu, X., Maysami, S., Li, M., Si, H., Cottrell, J. E., Simon, R. P., and Xiong, Z. (2011). Inhibition of acid sensing ion channel currents by lidocaine in cultured mouse cortical neurons. *Anesth Analg*, 112(4):977–81.
- [Lin et al., 2002] Lin, W., Ogura, T., and Kinnamon, S. C. (2002). Acid-activated cation currents in rat vallate taste receptor cells. *J Neurophysiol*, 88(1):133–41.
- [Lingueglia et al., 1997] Lingueglia, E., de Weille, J. R., Bassilana, F., Heurteaux, C., Sakai, H., Waldmann, R., and Lazdunski, M. (1997). A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells. *J Biol Chem*, 272(47):29778–83.
- [Lobner and Lipton, 1993] Lobner, D. and Lipton, P. (1993). Intracellular calcium levels and calcium fluxes in the ca1 region of the rat hippocampal slice during in vitro ischemia: relationship to electrophysiological cell damage. *J Neurosci*, 13(11):4861–71.
- [Lu et al., 2009] Lu, Y., Ma, X., Sabharwal, R., Snitsarev, V., Morgan, D., Rahmouni, K., Drummond, H. A., Whiteis, C. A., Costa, V., Price, M., Benson, C., Welsh, M. J., Chapleau, M. W., and Abboud, F. M. (2009). The ion channel asic2 is required for baroreceptor and autonomic control of the circulation. *Neuron*, 64(6):885–97.

- [Maren, 2009] Maren, S. (2009). An acid-sensing channel sows fear and panic. *Cell*, 139(5):867–9.
- [Mari et al., 2010] Mari, Y., Katnik, C., and Cuevas, J. (2010). Asic1a channels are activated by endogenous protons during ischemia and contribute to synergistic potentiation of intracellular Ca^{2+} overload during ischemia and acidosis. *Cell Calcium*, 48(1):70–82.
- [Matsushima and Hakim, 1995] Matsushima, K. and Hakim, A. M. (1995). Transient forebrain ischemia protects against subsequent focal cerebral ischemia without changing cerebral perfusion. *Stroke*, 26(6):1047–52.
- [Matveev et al., 2011] Matveev, V., Bertram, R., and Sherman, A. (2011). Calcium cooperativity of exocytosis as a measure of Ca^{2+} channel domain overlap. *Brain Res*, 1398:126–38.
- [McCulloch, 1992] McCulloch, J. (1992). Excitatory amino acid antagonists and their potential for the treatment of ischaemic brain damage in man. *Br J Clin Pharmacol*, 34(2):106–14.
- [Miao et al., 2010] Miao, Y., Zhang, W., Lin, Y., Lu, X., and Qiu, Y. (2010). Neuroprotective effects of ischemic preconditioning on global brain ischemia through up-regulation of acid-sensing ion channel 2a. *Int J Mol Sci*, 11(1):140–53.
- [Moncayo et al., 2000] Moncayo, J., de Freitas, G. R., Bogousslavsky, J., Altieri, M., and van Melle, G. (2000). Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology*, 54(11):2089–94.
- [Muir and Lees, 2003] Muir, K. W. and Lees, K. R. (2003). Excitatory amino acid antagonists for acute stroke. *Cochrane Database Syst Rev*, (3):CD001244.
- [Nedergaard et al., 1991a] Nedergaard, M., Goldman, S. A., Desai, S., and Pulsinelli, W. A. (1991a). Acid-induced death in neurons and glia. *J Neurosci*, 11(8):2489–97.
- [Nedergaard et al., 1991b] Nedergaard, M., Kraig, R. P., Tanabe, J., and Pulsinelli, W. A. (1991b). Dynamics of interstitial and intracellular pH in evolving brain infarct. *Am J Physiol*, 260(3 Pt 2):R581–8.
- [Nellgård et al., 1991] Nellgård, B., Gustafson, I., and Wieloch, T. (1991). Lack of protection by the n-methyl-d-aspartate receptor blocker dizocilpine (mk-801) after transient severe cerebral ischemia in the rat. *Anesthesiology*, 75(2):279–287.
- [Park et al., 1988a] Park, C. K., Nehls, D. G., Graham, D. I., Teasdale, G. M., and McCulloch, J. (1988a). Focal cerebral ischaemia in the cat: treatment with the

- glutamate antagonist mk-801 after induction of ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 8(5):757–62.
- [Park et al., 1988b] Park, C. K., Nehls, D. G., Graham, D. I., Teasdale, G. M., and McCulloch, J. (1988b). The glutamate antagonist mk-801 reduces focal ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*, 24(4):543–51.
- [Pignataro et al., 2011] Pignataro, G., Cuomo, O., Esposito, E., Sirabella, R., Di Renzo, G., and Annunziato, L. (2011). Asic1a contributes to neuroprotection elicited by ischemic preconditioning and postconditioning. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 3(1):1–8.
- [Pignataro et al., 2007] Pignataro, G., Simon, R. P., and Xiong, Z.-G. (2007). Prolonged activation of asic1a and the time window for neuroprotection in cerebral ischaemia. *Brain*, 130(Pt 1):151–8.
- [Price et al., 2001] Price, M. P., McIlwrath, S. L., Xie, J., Cheng, C., Qiao, J., Tarr, D. E., Sluka, K. A., Brennan, T. J., Lewin, G. R., and Welsh, M. J. (2001). The drASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron*, 32(6):1071–83.
- [Rehncrona, 1985] Rehncrona, S. (1985). Brain acidosis. *Ann Emerg Med*, 14(8):770–6.
- [Richter et al., 2004] Richter, T. A., Dvoryanchikov, G. A., Roper, S. D., and Chaudhari, N. (2004). Acid-sensing ion channel-2 is not necessary for sour taste in mice. *J Neurosci*, 24(16):4088–91.
- [Samways et al., 2009] Samways, D. S. K., Harkins, A. B., and Egan, T. M. (2009). Native and recombinant asic1a receptors conduct negligible Ca^{2+} entry. *Cell Calcium*, 45(4):319–25.
- [Sandler and Barbara, 1999] Sandler, V. M. and Barbara, J. G. (1999). Calcium-induced calcium release contributes to action potential-evoked calcium transients in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*, 19(11):4325–36.
- [Sherwood et al., 2011] Sherwood, T. W., Lee, K. G., Gormley, M. G., and Askwith, C. C. (2011). Heteromeric acid-sensing ion channels (ASICs) composed of ASIC2b and ASIC1a display novel channel properties and contribute to acidosis-induced neuronal death. *J Neurosci*, 31(26):9723–34.
- [Shimada et al., 2006] Shimada, S., Ueda, T., Ishida, Y., Yamamoto, T., and Ugawa, S. (2006). Acid-sensing ion channels in taste buds. *Arch Histol Cytol*, 69(4):227–31.

- [Siesjö et al., 1995] Siesjö, B. K., Zhao, Q., Pahlmark, K., Siesjö, P., Katsura, K., and Folbergrová, J. (1995). Glutamate, calcium, and free radicals as mediators of ischemic brain damage. *Ann Thorac Surg*, 59(5):1316–20.
- [Simard et al., 2007] Simard, J. M., Tarasov, K. V., and Gerzanich, V. (2007). Non-selective cation channels, transient receptor potential channels and ischemic stroke. *Biochim Biophys Acta*, 1772(8):947–57.
- [Simon and Xiong, 2006] Simon, R. and Xiong, Z. (2006). Acidotoxicity in brain ischaemia. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 6):1356–61.
- [Simon, 2006] Simon, R. P. (2006). Acidotoxicity trumps excitotoxicity in ischemic brain. *Arch Neurol*, 63(10):1368–71.
- [Sinnegger-Brauns et al., 2004] Sinnegger-Brauns, M. J., Hetzenauer, A., Huber, I. G., Renström, E., Wietzorrek, G., Berjukov, S., Cavalli, M., Walter, D., Koschak, A., Waldschütz, R., Hering, S., Bova, S., Rorsman, P., Pongs, O., Singewald, N., and Striessnig J, J. ö. (2004). Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by l-type Ca^{2+} channels. *J Clin Invest*, 113(10):1430–9.
- [Steiger and Hänggi, 2007] Steiger, H.-J. and Hänggi, D. (2007). Ischaemic preconditioning of the brain, mechanisms and applications. *Acta Neurochir (Wien)*, 149(1):1–10.
- [Steinberg et al., 1995] Steinberg, G. K., Panahian, N., Pérez-Pinzón, M. A., Sun, G. H., Modi, M. W., and Sepinwall, J. (1995). Narrow temporal therapeutic window for nmda antagonist protection against focal cerebral ischaemia. *Neurobiol Dis*, 2(2):109–18.
- [Striessnig et al., 2006] Striessnig, J., Koschak, A., Sinnegger-Brauns, M. J., Hetzenauer, A., Nguyen, N. K., Busquet, P., Pelster, G., and Singewald, N. (2006). Role of voltage-gated l-type Ca^{2+} channel isoforms for brain function. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 5):903–9.
- [Sutherland et al., 2001] Sutherland, S. P., Benson, C. J., Adelman, J. P., and McCleskey, E. W. (2001). Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(2):711–6.
- [Tan et al., 2007] Tan, Z.-Y., Lu, Y., Whiteis, C. A., Benson, C. J., Chapleau, M. W., and Abboud, F. M. (2007). Acid-sensing ion channels contribute to transduction of extracellular acidosis in rat carotid body glomus cells. *Circ Res*, 101(10):1009–19.

- [Thastrup et al., 1990] Thastrup, O., Cullen, P. J., Drøbak, B. K., Hanley, M. R., and Dawson, A. P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -atpase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(7):2466–70.
- [Tresguerres et al., 2010] Tresguerres, M., Buck, J., and Levin, L. R. (2010). Physiological carbon dioxide, bicarbonate, and pH sensing. *Pflugers Arch*, 460(6):953–64.
- [Vergo et al., 2011] Vergo, S., Craner, M. J., Etzensperger, R., Attfield, K., Friese, M. A., Newcombe, J., Esiri, M., and Fugger, L. (2011). Acid-sensing ion channel 1 is involved in both axonal injury and demyelination in multiple sclerosis and its animal model. *Brain*, 134(Pt 2):571–84.
- [Voilley et al., 2001] Voilley, N., de Weille, J., Mamet, J., and Lazdunski, M. (2001). Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J Neurosci*, 21(20):8026–33.
- [Waldmann et al., 1997a] Waldmann, R., Bassilana, F., de Weille, J., Champigny, G., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997a). Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na^{+} channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem*, 272(34):20975–8.
- [Waldmann et al., 1997b] Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997b). A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature*, 386(6621):173–7.
- [Wang and Xu, 2011] Wang, Y.-Z. and Xu, T.-L. (2011). Acidosis, acid-sensing ion channels, and neuronal cell death. *Mol Neurobiol*, 44(3):350–8.
- [Wemmie et al., 2002] Wemmie, J. A., Chen, J., Askwith, C. C., Hruska-Hageman, A. M., Price, M. P., Nolan, B. C., Yoder, P. G., Lamani, E., Hoshi, T., Freeman, Jr, J. H., and Welsh, M. J. (2002). The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron*, 34(3):463–77.
- [Weng et al., 2010] Weng, J.-Y., Lin, Y.-C., and Lien, C.-C. (2010). Cell type-specific expression of acid-sensing ion channels in hippocampal interneurons. *J Neurosci*, 30(19):6548–58.
- [Wong et al., 2008] Wong, H. K., Bauer, P. O., Kurosawa, M., Goswami, A., Washizu, C., Machida, Y., Tosaki, A., Yamada, M., Knöpfel, T., Nakamura, T., and Nukina, N. (2008). Blocking acid-sensing ion channel 1 alleviates huntington’s disease pathology via an ubiquitin-proteasome system-dependent mechanism. *Hum Mol Genet*, 17(20):3223–35.

- [Wu et al., 2011] Wu, W.-N., Wu, P.-F., Chen, X.-L., Zhang, Z., Gu, J., Yang, Y.-J., Xiong, Q.-J., Ni, L., Wang, F., and Chen, J.-G. (2011). Sinomenine protects against ischaemic brain injury: involvement of co-inhibition of acid-sensing ion channel 1a and l-type calcium channels. *Br J Pharmacol*, 164(5):1445–59.
- [Xie et al., 2002] Xie, J., Price, M. P., Berger, A. L., and Welsh, M. J. (2002). DrASIC contributes to pH-gated currents in large dorsal root ganglion sensory neurons by forming heteromultimeric channels. *J Neurophysiol*, 87(6):2835–43.
- [Xiong et al., 2007] Xiong, Z.-G., Chu, X.-P., and Simon, R. P. (2007). Acid sensing ion channels—novel therapeutic targets for ischemic brain injury. *Front Biosci*, 12:1376–86.
- [Xiong et al., 2008] Xiong, Z.-G., Pignataro, G., Li, M., Chang, S.-y., and Simon, R. P. (2008). Acid-sensing ion channels (ASICs) as pharmacological targets for neurodegenerative diseases. *Curr Opin Pharmacol*, 8(1):25–32.
- [Xiong et al., 2004] Xiong, Z.-G., Zhu, X.-M., Chu, X.-P., Minami, M., Hey, J., Wei, W.-L., MacDonald, J. F., Wemmie, J. A., Price, M. P., Welsh, M. J., and Simon, R. P. (2004). Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell*, 118(6):687–98.
- [Xu et al., 2002] Xu, G.-P., Dave, K. R., Viviero, R., Schmidt-Kastner, R., Sick, T. J., and Pérez-Pinzón, M. A. (2002). Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures. *Brain Res*, 952(2):153–8.
- [Yan et al., 2011] Yan, J., Edelmayer, R. M., Wei, X., De Felice, M., Porreca, F., and Dussor, G. (2011). Dural afferents express acid-sensing ion channels: a role for decreased meningeal pH in migraine headache. *Pain*, 152(1):106–13.
- [Yermolaieva et al., 2004] Yermolaieva, O., Leonard, A. S., Schnitzler, M. K., Abboud, F. M., and Welsh, M. J. (2004). Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(17):6752–7.
- [Zhang et al., 2012] Zhang, C.-H., Fan, Y.-Y., Wang, X.-F., Xiong, J.-Y., Tang, Y.-Y., Gao, J.-Q., Shen, Z., Song, X.-H., Zhang, J.-Y., Shen, Y., Li, Q., Zhang, X., and Chen, Z. (2012). Acidic preconditioning protects against ischemia-induced brain injury. *Neurosci Lett*.
- [Ziemann et al., 2009] Ziemann, A. E., Allen, J. E., Dahdaleh, N. S., Drebot, I. I., Coryell, M. W., Wunsch, A. M., Lynch, C. M., Faraci, F. M., Howard, 3rd, M. A., Welsh, M. J., and Wemmie, J. A. (2009). The amygdala is a chemosensor that detects carbon dioxide and acidosis to elicit fear behavior. *Cell*, 139(5):1012–21.

- [Ziemann et al., 2008] Ziemann, A. E., Schnizler, M. K., Albert, G. W., Severson, M. A., Howard, 3rd, M. A., Welsh, M. J., and Wemmie, J. A. (2008). Seizure termination by acidosis depends on asic1a. *Nat Neurosci*, 11(7):816–22.
- [Zündorf and Reiser, 2011] Zündorf, G. and Reiser, G. (2011). Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal*, 14(7):1275–88.

Danksagungen

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Stefan Gründer für die Gelegenheit zum experimentell-wissenschaftlichen Arbeiten und die Bereitschaft, sich Zeit zu nehmen, wenn Probleme diskutiert werden mussten. Auch die aktive Teilnahme am wöchentlichen Journal-Club fand ich persönlich sehr bereichernd.

Dr. Mikael Schnizler danke ich für die Einarbeitung in die experimentellen Ansätze und die konstruktiven Anregungen zur Auswertung und Interpretation der erhobenen Daten.

Ich möchte mich bei Heike Feldhaus für die unkomplizierte Zusammenarbeit und die gegenseitige Unterstützung im Laboralltag bedanken.

Hannelore Heidtmann danke ich für die Einarbeitung in die Laborarbeit und die helfende Hand, wenn zwei Hände mal wieder nicht genug waren.

Beim gesamten Team der Physiologie Aachen möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft bei kleinen Fragen, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Laune bedanken.

Erklärung gemäß § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten in dem Institut für Physiologie des Universitätsklinikums Aachen hinterlegt sind.

Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 10 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, Herr Hendrik Paczkowski an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „Präkonditionierung des ASIC-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms in Kortexneuronen der Maus durch Azidose“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe: Durchführung sämtlicher dargestellter Experimente, sowie deren statistische Auswertung (ggf. nur die experimentellen Eigenanteile auflisten). Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind:

- Dr. M. Schnizler: Einarbeitung in das Fura-2-Imaging und die Präparation der Mäusekortexes
- H. Feldhaus: Einarbeitung in die PCR
- H. Heidtmann: Einarbeitung in die neuronale Zellkultur

Hendrik Paczkowski

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Herrn Hendrik Paczkowski

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Stefan Gründer