

Ammonium-induzierte Veränderungen der Kalium- und Calciumhomöostase in Hirnschnitten der Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nicole Haack
aus Oberhausen

Düsseldorf, Mai 2014

Aus dem Institut für Neurobiologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Christine Rose, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Klein, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2014

Abstract

Hepatic encephalopathy (HE) is a complex neurological disorder caused by liver failure, which is attributed to an increase of extracellular ammonium ($[\text{NH}_4^+]$). There is evidence that NH_4^+ induces disturbance of ion-homeostasis in general and some of the symptoms during the HE seem to arise just by this disturbance. For example NH_4^+ induces an increase in intracellular sodium concentration and changes in pH in neurons and astrocytes (Kelly and Rose 2010). The aim of this study was to investigate the NH_4^+ -induced changes of extracellular potassium concentration ($[\text{K}^+]_o$) and intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$).

$[\text{K}^+]_o$ was determined by K^+ -sensitive microelectrodes, but all available K^+ -sensors were affected by NH_4^+ . So we developed a formula to calculate this NH_4^+ -induced artifact. In this study we determined for the first time the NH_4^+ -induced dysregulation of $[\text{K}^+]_o$. We were able to show that NH_4^+ induced a transient $[\text{K}^+]_o$ -increase in the hippocampus of acute mouse brain slices. After this transient increase, $[\text{K}^+]_o$ slowly declined to the baseline. Upon NH_4^+ removal, $[\text{K}^+]_o$ temporarily decreased below the baseline. Pharmacological experiments indicate that the NH_4^+ -induced increase in $[\text{K}^+]_o$ is due to a reduction of the Na^+/K^+ -ATPase-mediated inward transport of K^+ , and that an increased pump activity after NH_4^+ washout is responsible for the $[\text{K}^+]_o$ undershoot.

Astrocyte Ca^{2+} is an important mediator of neuron-glia interaction and neural plasticity. So in the second part of the study, we analyzed the effect of NH_4^+ on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of astrocytes in different brain regions, determined by calcium imaging with the indicator dye Fura-2. Astrocytes of hippocampus and cortex were identified by staining with the vital dye SR101; cerebellar Bergmann glia cells were identified based on their morphology. In all brain regions studied, NH_4^+ induced a small, but persistent elevation in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The major mechanisms of generation of the NH_4^+ -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase is NMDA receptor activation and release of Ca^{2+} from intracellular stores.

Taken together, our experiments demonstrate that NH_4^+ evokes complex changes in $[\text{K}^+]_o$ and $[\text{Ca}^{2+}]_i$. These changes lead to an impairment of ion-homeostasis, which might contribute to the altered excitability, or to the disturbance of neurotransmission, both are observed during HE.

Zusammenfassung

Hepatische Enzephalopathie (HE) ist eine komplexe neurologische Störung, die durch Lebersversagen induziert wird. Als Ursache für die HE gilt eine Erhöhung des extrazellulären Ammoniums ($[\text{NH}_4^+]_o$). Es gibt Hinweise, dass NH_4^+ die Ionen-Homöostase beeinflusst und einige der HE-Symptome scheinen nur durch diese Störungen zu entstehen. So induziert NH_4^+ eine Zunahme der intrazellulären Natriumkonzentration und verändert die pH-Werte in Neuronen und Astrozyten (Kelly und Rose 2010). In der vorliegende Studie wurden die NH_4^+ -induzierten Veränderungen der extrazellulären Kalium-Konzentration ($[\text{K}^+]_o$), und der intrazellulären Calcium-Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), untersucht.

Die $[\text{K}^+]_o$ wurde mittels K^+ -sensitiven Mikroelektroden gemessen, doch jeder K^+ -Sensor detektiert NH_4^+ ebenfalls. Daher entwickelten wir eine Formel, um dieses NH_4^+ -induzierte Artefakt herauszurechnen. In der Tat, konnten wir so zum ersten Mal die NH_4^+ -induzierten Veränderungen der $[\text{K}^+]_o$ untersuchen. Somit konnten wir zeigen, dass NH_4^+ einen transienten $[\text{K}^+]_o$ -Anstieg im Hippocampus, in akuten Schnitten des Mäusegehirns, induziert. Nach dem transienten Anstieg sank $[\text{K}^+]_o$ auf den Ruhewert zurück. Das Auswaschen des NH_4^+ führte zu einem temporären $[\text{K}^+]_o$ -Unterschuss. Pharmakologische Experimente deuten darauf hin, dass der NH_4^+ -induzierte $[\text{K}^+]_o$ -Anstieg auf eine Verringerung des K^+ -Transportes durch die Na^+/K^+ -ATPase und der $[\text{K}^+]_o$ -Unterschuss durch eine erhöhte Pumpaktivität der Na^+/K^+ -ATPase bedingt ist.

Innerhalb der Astrozyten ist Ca^{2+} ein wichtiger Mediator der Neuro-Glia-Interaktion und der neuronalen Plastizität. Daher untersuchten wir, im zweiten Teil der Studie, mittels Fluoreszenzmessung mit Fura-2, die Wirkung von NH_4^+ auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Astrozyten der verschiedenen Hirnregionen. Astrozyten des Hippocampus und Kortex wurden durch Färbung mit dem Vitalfarbstoff SR101 identifiziert; Bergmann-Gliazellen des Kleinhirns durch ihre Morphologie. In allen untersuchten Hirnregionen induzierte NH_4^+ eine kleine, aber anhaltende Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, die durch eine Öffnung der NMDA-R und Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern bedingt ist.

Zusammengenommen zeigen unsere Experimente, dass NH_4^+ komplexe Störungen der $[\text{K}^+]_o$ und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induziert. Die Beeinflussung der K^+ bzw. Ca^{2+} -Homöostase, könnte zu der gesteigerten neuronalen Erregung oder zu der Störung der Neurotransmission beitragen, die während der HE beobachtet werden können.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	1
1. Einleitung	2
1. 1. Hepatische Enzephalopathie	2
1. 2. Funktionen der Astrozyten unter physiologischen Bedingungen und während der HE	4
1. 2. 1. K^+ -Homöostase	5
1. 2. 2. Beeinflussung der K^+ -Homöostase durch NH_4^+	6
1. 2. 3. HE beeinflusst die Wasser-Homöostase	8
1. 2. 4. Neuro- und Gliotransmitter	9
1. 2. 5. Glutamat-Glutamin-Zyklus	10
1. 2. 6. HE beeinflusst den Glutamat-Glutamin-Zyklus	12
1. 2. 7. Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle	13
1. 2. 8. HE beeinflusst den Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle	14
1. 2. 9. Die Ca^{2+} -Homöostase in Astrozyten	14
1. 2. 10. HE beeinflusst die Ca^{2+} -Homöostase in Astrozyten	16
2. Ziel der Studie	19
3. Publikationen	20
3. 1. Kir4.1 channels mediate a depolarization of hippocampal astrocytes under hyperammonemic conditions in situ. Stephan J, Haack N, Kafitz KW, Durry S, Koch D, Hochstrate P, Seifert G, Steinhäuser C, Rose CR <i>Glia</i> 60(6):965-78 (2012)	20
3. 2. Preparation, Calibration and Application of Potassium-Selective Microelectrodes Haack und Rose, dazu eingeladenes Buchkapitel in <i>Microelectrodes: Techniques, Structures for Biosensing and Potential Applications</i> Nova Publishing (2014)	36
3. 3. Dysbalance of astrocyte calcium under hyperammonemic conditions Haack N, Dublin P, Rose CR eingereicht	56
4. Zusammenfassung der Forschungsergebnisse und Diskussion	96

4.	1.	Veröffentlichte Forschungsergebnisse.....	96
4.	1.	1. Mögliche Mechanismen des NH_4^+ -induzierten $[\text{K}^+]_o$ - oder $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs.....	99
4.	1.	2. Mögliche Mechanismen des NH_4^+ -induzierten $[\text{K}^+]_o$ -Anstiegs.....	99
4.	1.	3. Mögliche Mechanismen des NH_4^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs.....	100
4.	2.	Unveröffentlichten Forschungsergebnisse.....	101
5.		Konsequenzen für die Pathologie der HE.....	103
6.		Literaturverzeichnis.....	104
		Danksagung.....	125
		Eidesstattliche Versicherung.....	126

Erklärung

Teile dieser Doktorarbeit enthalten die Ergebnisse aus Experimenten mit K^+ -ionsensitiven Mikroelektroden, die bereits in folgenden Diplomarbeiten veröffentlicht wurden:

1.: Haack, Nicole; Februar, 2010; “Einfluss von Ammonium auf die extrazelluläre Kaliumhomöostase im Hippocampus”; Institut für Neurobiologie der Heinrich-Heine-Universität

2.: Koch, Daniel; Februar, 2011: “Mechanismen Ammonium-induzierter extrazellulärer Kalium-Änderungen im Hippocampus der Maus”; Institut für Neurobiologie der Heinrich-Heine-Universität.

In der Veröffentlichung „Kir4.1 channels mediate a depolarization of hippocampal astrocytes under hyperammonemic conditions in situ.” wurden die Ergebnisse von 134 Experimenten mit K^+ -ionsensitiven Mikroelektroden verwendet. Es folgt eine genaue Auflistung, wann diese Experimente durchgeführt wurden:

	Diplom N. Haack	Diplom D. Koch	Während der Promotion
0,5 mM			2
1 mM	4		
2,5 mM	4		
5 mM	25	15	16
10 mM	5		3
20 mM	6		1
P3-4	5		
P7-10			7
P13-16			4
TTX	2		2
DLAP5 CNQX	2		2
Bumetanid	4		
Furosemid		7	1
Barium		8	3
C57BL6 Kir4.1 -/-		6	
Anzahl an Experimenten:	57	36	41
%	43	27	31

Für die Veröffentlichung erfolgten 31% der Experimente, 57 % der Auswertung und die abschließende Statistik sowie die abschließende Gesamtinterpretation der Daten, während meiner Promotion.

1. Einleitung

1.1. Hepatische Enzephalopathie

Hepatische Enzephalopathie (HE) ist eine durch chronisches oder akutes Leberversagen hervorgerufene neurologische Erkrankung, die zu einem Funktionsverlust innerhalb verschiedener Hirnareale führt. Die Symptome sind vielseitig und reichen von motorischen Beeinträchtigungen, über Gedächtnis- und Lernstörungen bis hin zu Veränderungen der Persönlichkeit. Die chronische HE entsteht durch eine sich langsam entwickelnde, anhaltende Schädigung der Leber, wie sie z. B. Patienten mit einer durch übermäßigen Alkoholkonsum verursachten Leberzirrhose zeigen. Die akute HE entsteht durch ein akutes Leberversagen, meist als Folge von Leberverletzungen, viraler Hepatitis, Vergiftung (z. B. Ecstasy, Pilzgifte oder Chemikalien), oder Medikamenteneinnahme (z. B. Paracetamol). Aber auch Komplikationen in der Schwangerschaft können zu einem Leberversagen führen (HELLP-Syndrom, Benannt nach den Symptomen: Hämolyse (**h**aemolysis), erhöhten Leberwerten (**e**levated liver function test) und niedrigen Thrombozytenzahlen (**l**ow **p**latelet count), einhergehend mit hypoxischer Leberzellschädigung; Pschyrembel 259. Auflage).

Die klinischen Symptome und deren Schweregrade werden nach der „West-Haven-Systematik“ in vier Stadien eingeteilt (siehe Tab. 1; Ferenci et al. 2002, Häussinger und Schliess 2008, Hilgard und Gerken 2004, Schellinger et al. 2003).

West-Haven-Einteilung der hepatischen Enzephalopathie (HE)		Tab. 1: Stadien der HE nach West-Haven-Kriterien (Schellinger et al. 2003)
Latente HE	Keine offensichtlichen neurologischen Ausfälle, psychometrische Tests pathologisch	
Manifeste HE		
Stadium I	Schlafstörungen, Eu- und Dysphorie, Apathie, Konzentrationsstörungen, Ruhelosigkeit, Akathisie, Angst, Erregbarkeit, Ziellosigkeit, Fingertremor und Beeinträchtigung des Schreibvermögens	
Stadium II	Offensichtliche Persönlichkeitsveränderungen, zeitliche Desorientiertheit, Gähnen und Müdigkeit, Gedächtnisstörungen, Nesteln, Grimassieren, Ataxie, Flapping-Tremor	
Stadium III	Zeitliche und örtliche Desorientiertheit, unartikulierte Sprache, Rigidität, Hyperreflexie, deutliche Verwirrtheit, Somnolenz bis Sopor	
Stadium IVa	Bewusstlosigkeit und Koma mit erhaltenen Reaktionen auf Schmerzreize	
Stadium IVb	Bewusstlosigkeit und Koma und Verlust der Reaktionen auf Schmerzreize	

Die Leber ist das wichtigste Entgiftungsorgan des Körper und ein Leberversagen führt dazu, dass viele toxische Stoffe nicht mehr ausgeschieden werden können. Eines der Toxine die nur mittels einer intakten Leber ausgeschieden werden kann ist Ammoniak (NH₃) bzw. Ammonium (NH₄⁺). In funktionsfähigen Mitochondrien der Hepatozyten wird NH₃ während des Harnstoffzyklus zu Harnstoff umgewandelt und über den Urin ausgeschieden. Wird diese

Umwandlung gestört, so steigt die $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -Konzentration an und gelangt über die Blut-Hirn-Schranke (BHS), ins Gehirn.

Durch die BHS gelangt NH_3 indem es frei über die Zellmembranen diffundiert, allerdings liegen bei einem physiologischem pH-Wert von ca. 7,2 mehr als 98 % in der impermeablen NH_4^+ -Form vor (Brookes 2002, Lang et al. 1998, Ott und Larsen 2003). Doch auch NH_4^+ kann durch verschiedene Kanäle und Transporter die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Felipo und Butterworth 2002, Fries et al. 2014, Marcaggi und Coles 2001, Ott und Larsen 2004, Phelps et al. 1977, Szerb und Butterworth 1992; wegen der höheren Konzentration wird nachfolgend NH_4^+ benutzt).

Viele akute HE-Symptome können im Tierversuch durch eine NH_4^+ -Applikation ausgelöst werden und Hyperammonämie beeinflusst viele zelluläre Funktionen (Albrecht und Jones 1999, Butterworth 1998, Felipo und Butterworth 2002, Norenberg 1998, Szerb und Butterworth 1992, Zieve 1987).

Die NH_4^+ -Konzentration im Gehirn von Gesunden und HE-Patienten ist unbekannt. Es gibt keine Möglichkeit, diese ohne chirurgischen Eingriff zu messen. Die Angaben zur NH_4^+ -Konzentration im Blutplasma variieren erheblich, da sie stark von Probenentnahme und Messtechnik beeinflusst werden (Clemmesen et al. 1999, Ganda und Ruderman 1976, Kundra et al. 2005, Malcolm et al. 1959, Ong et al. 2003, Phear et al. 1955). Zwei Untersuchungen mit ähnlichen Werten ergaben im arteriellen Blut von 8 Patienten mit akuten Leberversagen einen $[\text{NH}_4^+]$ -Anstieg von 0,010 - 0,047 mM auf $0,226 \pm 0,029$ mM (Kundra et al. 2005) und im arteriellen Blut von 14 Patienten mit einer Gehirnhernie einen $[\text{NH}_4^+]$ -Anstieg von $0,023 \pm 0,004$ mM auf $0,230 \pm 0,058$ mM (Clemmesen et al. 1999).

In Tierexperimenten konnte durch Leberversagen ebenfalls ein $[\text{NH}_4^+]$ -Anstieg induziert werden (Ehrlich et al. 1980, Hindfeld et al. 1977, Holmin und Siesjö 1974, Mans et al. 1979, 1994). Oft zitiert wird hier ein Experiment von Swain und Mitarbeitern (1992 A), die in Versuchen an Ratten, nach chirurgischer Auslösung einer akuten HE, einen Anstieg der NH_4^+ -Konzentration in der Hirnrinde von 0,7 mM auf 5,4 mM feststellten.

HE induziert vor allem Funktionsstörungen in Gliazellen, denn in Neuronen wurden keine signifikanten funktionellen Veränderungen beobachtet (Felipo und Butterworth 2002, Häussinger et al. 2000, Norenberg et al. 2008). In Zellkulturen, die mit 5 mM NH_4Cl inkubiert wurden, weisen die Ergebnisse sogar darauf hin, dass Astrozyten ein Absterben der Neuronen verhindern (Rao et al. 2005).

Während die chronische HE meist nur milde Symptome, dafür aber histologische Veränderungen in der Astrozyten-Morphologie induziert („Alzheimer Typ 2-Astrozyt“,

Albrecht und Jones 1999, Butterworth 1998, Felipo und Butterworth 2002), durchläuft eine akute HE innerhalb von Stunden oder Tagen die vier in Tabelle 1 gelisteten Stadien. Nach dem Stadium IVb folgt der Tod. Als Hauptursache für die Sterblichkeit gilt eine massive Schwellung der Astrozyten (Bender und Norenberg 1998, Blei et al. 1994, Ganz et al. 1989, Norenberg et al. 1991, Norenberg 1998, Swain et al. 1991, Traber et al. 1987). Diese Schwellung führt zur Ausbildung eines Hirnödems (Jalan et al. 2004, Vaquero et al. 2003), welches einen Anstieg des intrakraniellen Drucks auslöst (Larsen et al. 1996). Letztendlich führt eine Gehirnhernie bei 80-90% der Patienten zum Tode (Capocaccia und Angelico 1991, Norenberg et al. 2009). Astrozyten üben eine Vielzahl von Funktionen aus, die für das Überleben der Neurone essentiell sind. Viele dieser Funktionen werden während einer HE gestört.

1.2. Funktionen der Astrozyten unter physiologischen Bedingungen und während der HE

Astrozyten gehören neben Oligodendrozyten und Mikrogliazellen zur Zellpopulation der Gliazellen. Der Terminus Gliazelle ist abgeleitet aus dem griechischen Wort „gliokytoi“ für „Leim“, aber Gliazellen sind weit entfernt davon nur Leim zu sein. So wurden über die letzten Jahre hinweg viele Funktionen entdeckt. Ihren Namen verdanken die Astrozyten ihrer sternförmigen Morphologie. Sie verfügen über mehrere primäre Ausläufer, die in allen Richtungen strahlenförmig von dem Soma ausgehen. Von diesen Ausläufern gehen zudem viele kleine Verzweigungen ab. Diese morphologische Eigenschaft führt zu einer großen Zelloberfläche. Einige dieser Ausläufer kontaktieren die Blutgefäße, indem sie kleine Strukturen, die sogenannten Endfüße ausbilden (Kacem et al. 1998). Zusammen mit Endothelzellen, Perizyten und vaskulären glatten Muskelzellen, bilden sie die BHS und kontrollieren, welche Substanzen aus dem Blut ins Gehirn bzw. aus dem Gehirn ins Blut gelangen (Abbott et al. 2006). Die Astrozyten können zudem aus den Endfüßen vasoaktive Substanzen freisetzen, um damit den lokalen Blutfluss zu regulieren (Carmignoto und Gómez-Gonzalo 2010, Gordon et al. 2007). Von der Lage der Endfüße an den Blutgefäßen profitieren zwei weitere wichtige Funktionen: die Entfernung von K^+ -Ionen (K^+ -clearance) aus dem synaptischen Spalt und die Aufnahme von Glukose. Für diese beiden Funktionen ist eine weitere morphologische Eigenschaft der Astrozyten von entscheidender Bedeutung, nämlich dass Astrozyten durch Transmembranproteine, den Connexinen, miteinander

verbunden sind (elektrische Synapsen). Durch diese „gap junctions“ entsteht so ein dichtes astrozytäres Netzwerk (Giaume et al. 2010, Giaume und Theis 2010, Nagy et al. 2004, Sáez et al. 2003). Die Astrozyten sind dadurch elektrisch gekoppelt (Bennett et al. 2003, Sáez et al. 2003, Xu et al. 2010) und Moleküle die kleiner als 1,2 kDa sind (ATP, NAD, K^+ , Ca^{2+} , Glutamat (Hansson et al. 2000, Sáez et al. 2003) und Glukose (Dienel und Cruz 2003) können ungehindert durch das Synzytium diffundieren. Ein funktionsfähiges Synzytium ist z. B. enorm wichtig für die K^+ -Homöostase.

1.2.1. K^+ -Homöostase

Die extrazelluläre K^+ -Konzentration ($[K^+]_o$) beträgt ~ 3 mM und wird im Gehirn strikt reguliert. Während neuronaler Aktivität kann $[K^+]_o$ auf 10-12 mM ansteigen (Balestrino et al. 1986, Coles und Poulain 1991, Eduardo und Bennarroch 2005, Gardner-Medwin 1983, Heinemann und Lux 1975, Kofuji und Newman 2004). Ein Anstieg von $[K^+]_o$ führt zur Depolarisation der Zellmembranen und damit zu einer gesteigerten neuronalen Erregbarkeit. Eine Erregung der Neurone führt wiederum zu einer Steigerung der synaptischen Transmission und damit zur verstärkten Aktivierung postsynaptischer ionotroper Glutamat-Rezeptoren (iGluRs) des Typs α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isioxazolpropionsäure (AMPA-R) und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA-R). Zudem kann der $[K^+]_o$ -Anstieg zu einer Ansäuerung von Astrozyten und Neuronen führen (Kelly et al. 2009, Nagaraja und Brookes 1998, Pappas und Ransom 1994). Sowie durch eine Vasodilatation den zerebralen Blutfluss ansteigen lassen (Filosa und Blanco 2007). Des Weiteren wären Veränderungen im Energiemetabolismus (Takahashi 1995), sowie in der Proteinsynthese und der DNA-Replikation mögliche Folgen (Amédeé 1997, Walz 2000), weshalb die schnelle Entfernung des K^+ aus dem extrazellulären Raum von entscheidender Bedeutung ist.

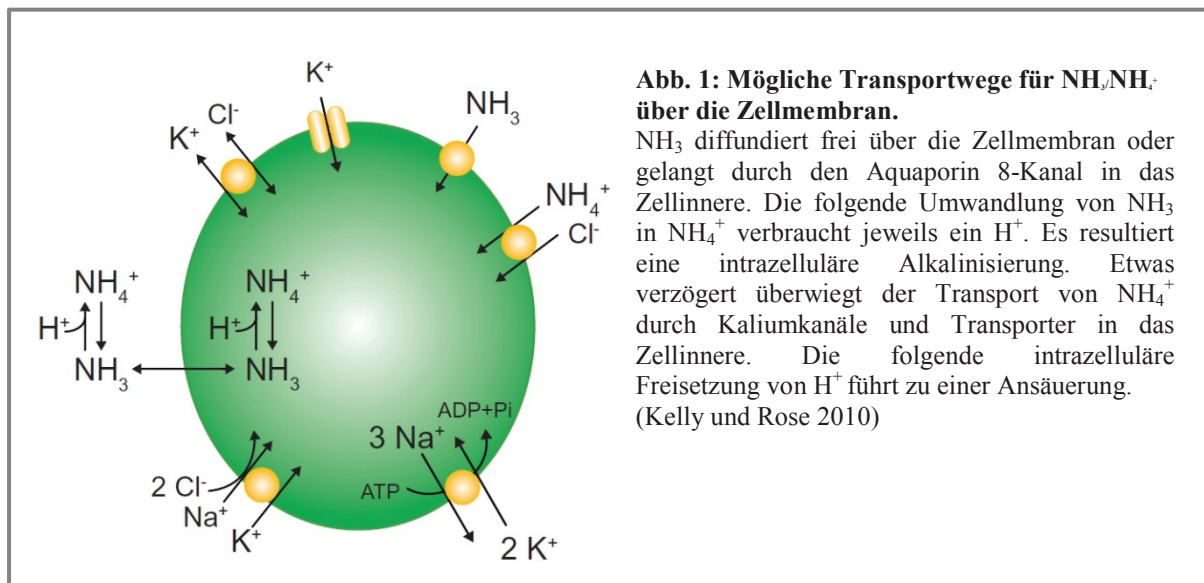
Die K^+ -Leck-Kanäle (iK_{2p}-Kanäle) der Astrozytenmembran sind während des Ruhemembranpotentials permanent geöffnet (Butt und Kalsi 2006, Lesage 2003, Talley 2001). Da die K^+ -Konzentration im intrazellulären Raum mit 100 mM (Walz 1992) wesentlich höher ist als im extrazellulären Raum, führt die elektromotorische Kraft zu einem K^+ -Ausstrom. Das Zurückpumpen von K^+ in die Astrozyten durch die Na^+ - K^+ -ATPase gleicht diesen K^+ -Ausstrom wieder aus.

Steigt durch neuronale Aktivität $[K^+]_o$ an, so wird ein Großteil des K^+ aus dem extrazellulären Raum durch die einwärts gleichrichtenden K^+ -Kanäle (K_{ir} -Kanäle) der Astrozyten entfernt. Nach der Aufnahme diffundiert K^+ durch die Gap junctions des Synzytiums und wird an einer Stelle mit geringer $[K^+]_o$, z. B. an den Blutgefäßen, durch die

Endfüße, wieder freisetzt („spatial buffering“, Ballanyi und Grafe 1987, D’Ambrosio et al. 2002, Dietzel et al. 1989, Gardner-Medwin 1983, Orkand 1966, Scemes und Spray 2012, Verkhratsky und Steinhäuser 2008, Wallraff et al. 2006). Auch die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ leistet einen kleinen Beitrag zur K^+ -clearance. Ein Anstieg von $[\text{Na}^+]_i$ (Takahashi 1995, Yarowsky et al. 1986) und/oder $[\text{K}^+]_o$ erhöht die Pumprate (Ballanyi et al. 1987, Ballanyi und Kettenmann 1990, D’Ambrosio et al. 2002, Kosenko 1994, Walz et al. 1983).

1.2.2. Beeinflussung der K^+ -Homöostase durch NH_4^+

NH_3 diffundiert frei über die Zellmembran. Zusätzlich existieren spezifische Membrankanäle durch die NH_3 ins Zellinnere gelangen kann (Abb.1, Aquaporin 8; Saparov et al. 2007). Dennoch gelangt auch das NH_4^+ in die Zellen, denn die ionalen Eigenschaften von NH_4^+ sind denen von K^+ so ähnlich, dass NH_4^+ durch dieselben Ionenkanäle wie K^+ fließen und von denselben Transportern bewegt werden kann (Abb. 1, Copper und Plum 1987, Felipo und Butterworth 2002, Marcaggi und Coles 2001, Milne et al. 1958, Ott und Larsen 2004).



Die Affinität der Transporter ist zwar für K^+ größer als für NH_4^+ (Latorre und Miller 1983), aber es konnte gezeigt werden, dass NH_4^+ durch K_{ir} -Kanäle diffundiert (Nagaraja und Brookes 1998, Stephan et al. 2012), sowie durch die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC1), die $\text{K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter (KCC), und der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in die Astrozyten transportiert wird (Kelly und Rose 2010). Die Beeinflussung der Transporter beeinträchtigt möglicherweise die K^+ -Homöostase und in der Tat beobachteten Alger und Nicoll, dass NH_4Cl -Applikation einen $[\text{K}^+]_o$ -Anstieg im Hippocampus auslöste (Alger und Nicoll 1983).

Der Anstieg der $[\text{NH}_4^+]_o$ und $[\text{K}^+]_o$ führt zu einer Aktivitätssteigerung des NKCC1 (Kelly et al. 2009, Su et al. 2000, 2002, Yan et al. 2003). Neben dem erhöhten Substratangebot steigert NH_4^+ durch Oxidation, Tyrosin-Nitrilisierung (Häussinger und Schliess 2005, Schliess et al. 2002) und Phosphorylierung von NKCC1 dessen Transportaktivität (Jayakumar 2008). Außerdem könnte ein Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ via Ca^{2+} /Calmodulin den NKCC1 beeinflussen (Amédee et al. 1997, Haas 1989, Haas und Forbush 1998, Su et al. 2000). Die gesteigerte Aktivität des NKCC1 führt zu einem Anstieg der $[\text{Na}^+]_i$ in den Astrozyten, was den Abtransport des Glutamat aus dem synaptischen Spalt vermindert (siehe 1.2.5 „Glutamat-Glutamin-Zyklus“; Kelly et al. 2009). Darüber hinaus könnte der Anstieg der $[\text{Cl}^-]_i$ die treibende Kraft für inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSPs) reduzieren, denn in der Tat ist während einer HE die synaptische Hemmung geschwächt, was zu einer neuronalen Aktivitätssteigerung führen kann (Bergeron et al. 2003, Liu et al. 2003, Payne et al. 1996, Russel 2000, Titz et al. 2006, Williams und Payne 2004).

Durch den Anstieg der $[\text{NH}_4^+]_o$, $[\text{K}^+]_o$ und $[\text{Na}^+]_i$, sowie durch Ca^{2+} -induzierte Signalkaskaden (Berridge 1994, Butterworth 2001, Felipo und Butterworth 2002, Hermenegildo et al. 2000, Kala 2000, Kosenko et al. 1994, Llansola 2007, Marcaida 1992, Monfort et al. 2002 A, Moser 1987, Rose 1997, Simard und Nedergaard 2004, Szerb und Butterworth 1992) wird ebenfalls die Aktivität der Na^+ - K^+ -ATPase erhöht (Kosenko 1994). Die gesteigerte Aktivität ist vermutlich ein Grund für die Abnahme der ATP-Konzentration, die während Tierexperimenten im Gehirn festgestellt wurde (Felipo und Butterworth 2002, Kosenko et al. 1993, Kosenko et al. 1994).

Die gesteigerten Transportraten des NKCC, KCC und der Na^+ - K^+ -ATPase führen zu einer erhöhten Aufnahme von Osmolyten. Diesen Osmolyten könnte ein Wassereinstrom folgen (Geck 1970, Schomberg et al. 2001, Su et al. 2000, 2002, Yan et al. 2003). Die Wasser-Homöostase muss also ebenfalls während einer HE gestört sein.

1.2.3. HE beeinflusst die Wasser-Homöostase

Astrozyten sind an der Kontrolle des Wasser-Gehaltes des Gehirns beteiligt (Simard und Nedergaard 2004). Zellschwellung führt über die normale physiologische Aktivität der KCC, zu einer regulatorischen Volumenabnahme („regulatory volume decrease“, RVD), denn normalerweise transportiert der KCC ein K^+ und Cl^- aus der Zelle hinaus und ein Wasserausstrom folgt. Zellschrumpfung führt zu einem regulatorischen Volumenanstieg („regulatory volume increase“, RVI), der im Wesentlichen durch den NKCC1 induziert wird. Hier folgt dem Na^+ , K^+ und Cl^- -Import ein Wassereinstrom.

Für die Regulation des Gesamt-Gehirnwassers ist die Nähe der Endfüße zu den Blutgefäßen wieder von entscheidender Bedeutung. In den Endfüßen sind neben Kir 4.1-Kanälen vor allem Wasserkanäle (Aquaporin-4, AQP4) exprimiert, durch die überschüssiges Wasser zu den Blutgefäßen hingerrichtet abgegeben werden kann (Amiry-Moghaddam und Ottersen 2003, Nagelhus et al. 2004, Zelenina 2010).

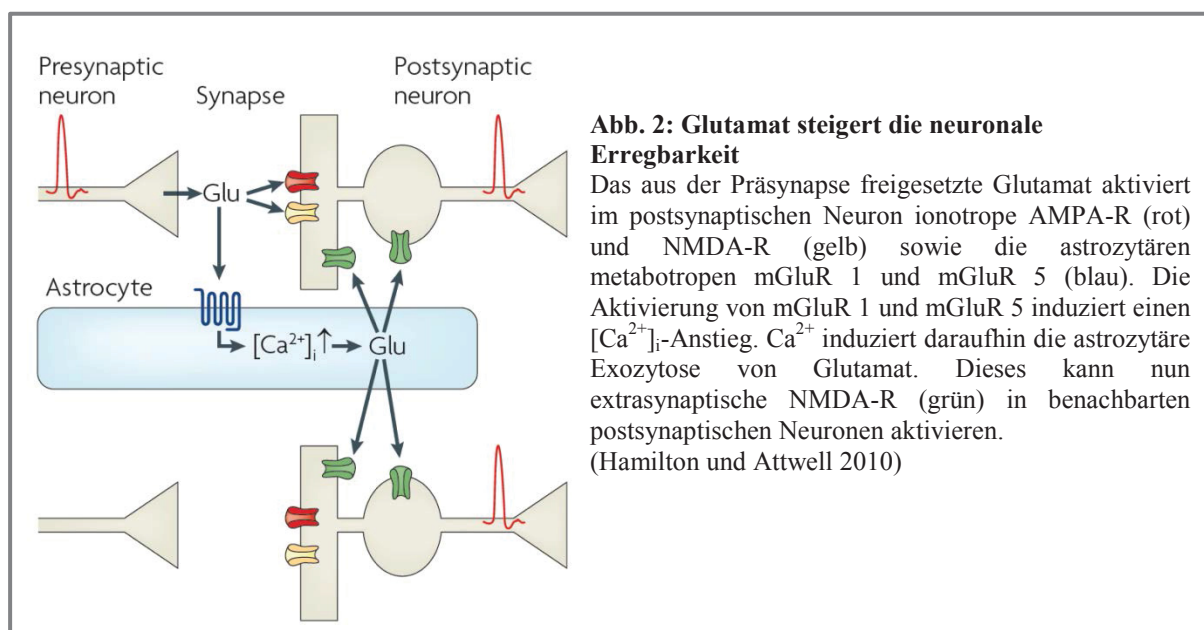
In verschiedenen Studien wurde nach NH_4^+ -Applikation eine Schwellung der Astrozyten beobachtet (Brusilow et al. 2010, Ganz et al. 1989, Jayakumar et al. 2006 B, Murthy und Norenberg 2002, Norenberg 1998). Die genauen Mechanismen sind unklar, aber es gibt verschiedene Theorien. Eine Theorie besagt, dass der NH_4^+ -induzierten Steigerung der NKCC1-Aktivität ein osmotisch induzierter Wassereinstrom folgen könnte (Jayakumar et al. 2008). Weitere Osmolyte können durch den KCC in die Astrozyten gelangen, denn Hyperammonämie führt zu einer Umkehrung des KCC, so dass er NH_4^+ und Cl^- in die Astrozyten transportiert (Kelly und Rose 2010).

Zwei weitere Theorien stammen aus dem Glutamat-Glutamin-Zyklus (siehe Kapitel 1.2.5) denn Inhibierung der Glutaminsynthetase (GS) mit Methioninsulfoximin (MSO) reduzierte die Akkumulation des Glutamins und auch die Astrozytenschwellung (Takahashi et al. 1991, Tanigami et al. 2005, Willard-Mack et al. 1996). Die eine Theorie besagt, dass die osmotische Aktivität des Glutamins für die Schwellung in Astrozyten verantwortlich ist und die andere Theorie besagt dass Glutamin solche Prozesse in Gang setzt, die zur Schwellung führen (Albrecht und Norenberg 2006, Bradford et al. 1989 Jayakumar et al. 2006 A, Zwingmann et al. 2004). Für die Theorie, dass Glutamin solche Prozesse in Gang setzt, sprechen Forschungsergebnisse, in denen die Inhibition der phosphat-aktivierten Glutaminase („phosphate-activated glutaminase“, PAG) die Bildung von radikalen Sauerstoffspezies (ROS, oxidativer Stress) verminderte. Zudem konnte sowohl die Öffnung der mitochondrialen Pore (mPTP siehe 1.2.10) als auch die Zellschwellung verhindert werden (Jayakumar et al. 2004, 2006 B, Rama Rao et al. 2005).

Die mPTP oder die durch oxidativen Stress aktivierte Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade (MAPK) könnte die AQP4-Expression steigern (Jayakumar et al. 2006 B, Pan et al. 2010, Rama Rao und Norenberg 2007). Experimente an kultivierten Astrozyten zeigten eine starke Korrelation zwischen AQP4-Expression und der NH_4^+ -induzierten Zellschwellung (Rama Rao et al. 2003, Rama Rao und Norenberg 2007), die durch Antioxidantien blockiert werden konnte (Arima et al. 2003).

1.2.4. Neuro- und Gliotransmitter

Astrozyten beeinflussen durch die Freisetzung von Neurotransmittern verschiedene Rezeptoren an prä- und postsynaptischen Neuronen. Als sogenannte Gliotransmitter wurden bereits Glutamat (Jourdain et al 2007, Kozlov et al. 2006), GABA (Kozlov et al. 2006), D-Serin (Oliet und Mothet 2006) und ATP (Coco et al. 2003) beschrieben (Hamilton und Attwell 2010, Volterra und Meldolesi 2005). Die Freisetzung erfolgt via Aktivierung der SNARE-Proteine (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor), die zu einer Vesikelfusion führen (zur Übersicht: Hamilton und Attwell 2010, Montana et al. 2004, Parpura und Zorec 2010, Volterra und Meldolesi 2005). So wurden schon Ca^{2+} und SNARE-Komplex abhängige Exozytosen von Glutamat, ATP und D-Serin beobachtet (Bezzi et al. 2004, Haydon und Carmignoto 2006, Mothet et al. 2005, Parpura und Zorec 2010). Gliotransmitter können die neuronale Erregbarkeit steigern (Abb. 2).



Die Freisetzung der Gliotransmitter führte zur Theorie der „*tripartite Synapse*“, nach der neben dem prä- und postsynaptischen Neuron, die Astrozyten als essentieller Partner für die Verarbeitung, Übertragung und Speicherung von Informationen gelten (Giaume et al.

2010, Halassa et al. 2007, Haydon 2001, Perea et al. 2009). So unterstützen und synchronisieren die Astrozyten die Informationsverarbeitung der Neurone (Fellin et al. 2004, Perea und Araque 2007, Panatier et al. 2011). Damit könnten Astrozyten sogar die Langzeit-Potenzierung (long-term potentiation, LTP) und Langzeit-Depression (long-term depression, LTD) beeinflussen (Chen et al. 2013, Henneberger et al. 2010, Yang et al. 2003), wodurch sie auch in der Generierung von Lern- und Gedächtnisinhalten involviert sein könnten (Gibbs et al. 2008).

1.2.5. Glutamat-Glutamin-Zyklus

Glutamat ist der wichtigste erregende Neurotransmitter im Gehirn. Die Freisetzung von Glutamat ist der Hauptweg für die Übertragung von neuronaler Aktivität (Ben-Ari 2001, 2002, Dumas 2005, Li und Sheng 2003) und vollkommen abhängig von einem einwandfrei funktionierenden Glutamat-Glutamin-Zyklus (Abb.3).

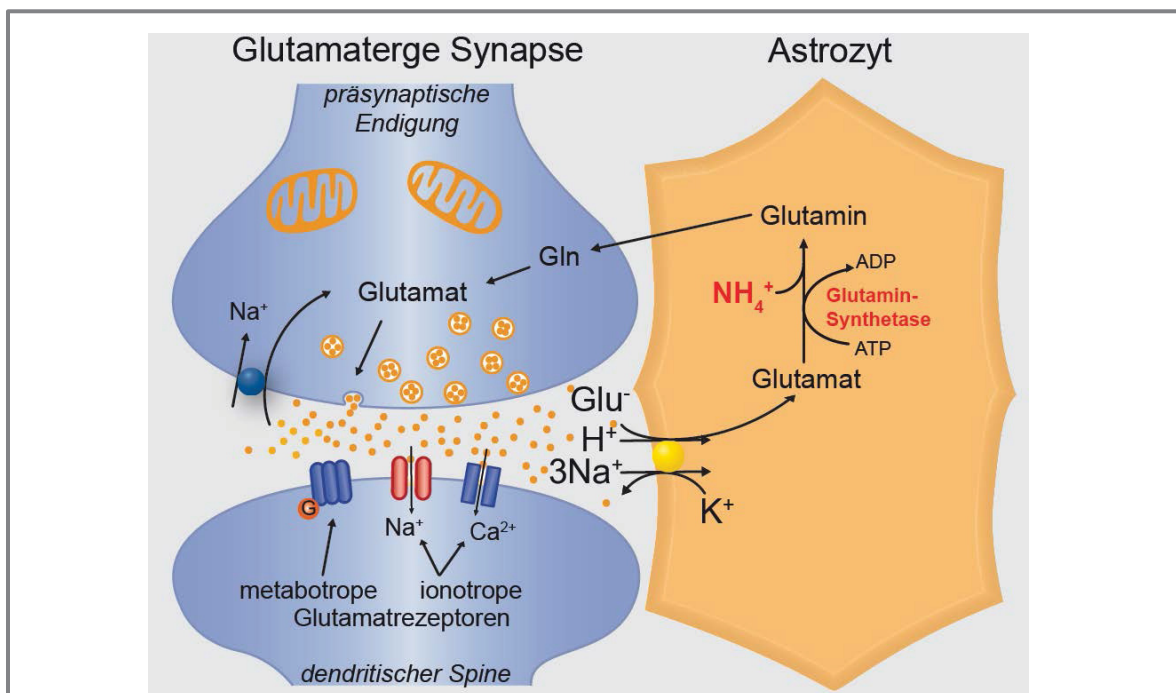


Abb. 3: Glutamat-Glutamin-Shuttle

An einer glutamatergen Präsynapse führt ein Aktionspotential zur Freisetzung von Glutamat. Glutamat diffundiert durch den synaptischen Spalt und aktiviert an der postsynaptischen Membran metabotrope und ionotrope Glutamat-Rezeptoren. Astrozyten exprimieren Glutamat-Transporter die Glutamat im Co-Transport mit drei Na⁺-Ionen und einem H⁺, sowie unter Antiport eines K⁺-Ions aufnehmen. In den Astrozyten werden Glutamat und NH₄⁺ durch das Enzym Glutaminsynthetase unter ATP-Verbrauch zu Glutamin gewandelt. Das Glutamin gelangt über Transporter wieder in die Neurone. Dort angekommen wird Glutamin durch das Enzym Glutaminase gespalten und setzt dabei ein NH₄⁺ wieder frei. (Kelly und Rose 2010)

Die Astrozyten liefern das Glutamin, das in den Neuronen zu Glutamat umgewandelt wird. Die Bereitstellung des Glutamins durch die Astrozyten ist von essentieller Bedeutung,

da Neurone aufgrund des Fehlens der Pyruvatcarboxylase, kein neues Glutamat aus Glukose herstellen können (Hertz et al. 1999, Schousboe et al. 1997).

Neuronale Aktivität führt zu einem $[\text{Glutamat}]_o$ -Anstieg im synaptischen Spalt. Die $[\text{Glutamat}]$ kann nur durch einen Glutamat-Abtransport wieder erniedrigt werden. Daher wird das Glutamat von hochaffinen sekundär aktiven Transportern der Astrozyten („excitatory aminoacid transporter“ EAAT; EAAT1 (GLAST) und EAAT2 (GLT)), oder Neuronen (EAAT3) aus dem synaptischen Spalt entfernt (Danbolt 2001, Tzingounis und Wadiche 2007). Die EAATs der Astrozyten sind effizienter als die der Neurone (Kojima et al 1999, Rothstein et al 1996) und somit sind vor allem Astrozyten für den schnellen Abtransport des Glutamat zuständig (Clements et al. 1992, Hertz et al. 1999). Dieser Transport ist an den Na^+ -Gradienten über der Membran gekoppelt (Camacho und Massieu 2006, Kelly et al. 2009) und erfolgt im Co-Transport mit drei Na^+ -Ionen und einem H^+ , sowie unter Antiport eines K^+ -Ions (Camacho und Massieu 2006, Danbolt 2001, Tzingounis und Wadiche 2007, Zerangue und Kavanaugh 1996).

Die schnelle Wiederaufnahme des freigesetzten Glutamats nach synaptischer Aktivität ist für das Überleben der Neurone und Astrozyten essentiell, da Glutamat neurotoxisch wirkt (Ankarcrona et al. 1995, Olney 1971). Diese Neurotoxizität entsteht durch eine Überstimulation der Glutamat-Rezeptoren, vor allem der NMDA-R. Eine zu lange Öffnung der NMDA-R führt zu einem pathologischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg, der Zellschäden und letztendlich Apoptose induziert (Camacho und Massieu 2006, Choi 1988 A, B, Lau und Tymianski 2010).

In den Astrozyten überträgt die GS (heute oft Glutamat-Ammonium-Ligase genannt), unter ATP-Verbrauch, NH_4^+ auf das Glutamat. Es entsteht wieder Glutamin. Die GS der Astrozyten ist sehr effizient, so dass 50 % des gesamten Glutamat-Pools innerhalb einer Minute zu Glutamin umgewandelt werden können (Cooper und Plum 1987), um schnell wieder den Neuronen zu Verfügung stehen zu können. Der Einbau des NH_4^+ erscheint auf den ersten Blick eine Detoxifikation zu sein, aber in Neuronen wird das Glutamin wieder durch die mitochondriale PAG zu Glutamat umgewandelt. Dabei spaltet PAG die Amidgruppe der Seitenkette des Glutamins, unter Aufnahme von Wasser und Freisetzung von NH_4^+ (hydrolytische Desaminierung). Unter physiologischen Bedingungen halten sich hier Entgiftung und Bildung von NH_4^+ die Waage. Wenn aber während der HE die $[\text{NH}_4^+]$ ansteigt, so wird der Glutamat-Glutamin-Zyklus empfindlich gestört.

1.2.6. HE beeinflusst den Glutamat-Glutamin-Zyklus

Während einer HE kann das Radikal Stickstoffmonoxid (NO) die Leistungsfähigkeit der GS vermindern (Ca^{2+} aktiviert via CaM die Stickstoffmonooxid-synthase siehe Kapitel 1.2.9; Felipo und Butterworth 2002, Kosenko et al. 2003, Miñana et al. 1997). Diese verminderte Leistungsfähigkeit wird jedoch durch das Überangebot von NH_4^+ mehr als ausgeglichen, so dass in Experimenten an isolierten Astrozyten ein Anstieg der GS-Aktivität um 32% beobachtet wurde (Subbalakshmi und Murthy 1983). Zudem wird das Glutamin in den Neuronen schlechter abgebaut, da die PAG durch die Endprodukte Glutamat und NH_4^+ gehemmt wird (Szerb und Butterworth 1992, Rose 2002, Subbalakshmi und Murthy 1983 fanden eine um 8% verminderte PAG-Aktivität). In verschiedenen Tierversuchen konnte daher ein Anstieg der $[\text{Glutamin}]_o$ und eine Verminderung der totalen $[\text{Glutamat}]_o$ im Hirngewebe beobachtet werden (Hindfelt et al. 1977, Lavoie et al. 1987, Kosenko et al. 1993, 1994, Mans et al. 1979, 1994, Ratnakumari et al. 1994, Swain et al. 1992 A, 1992 B, Watanabe 1984). Besonders kritisch ist der $[\text{Glutamin}]$ -Anstieg in den Mitochondrien. Hier setzt die hydrolytische Desaminierung der PAG das NH_4^+ in den Mitochondrien frei, so dass NH_4^+ gefangen ist und zur Produktion freier Radikale beiträgt (Hypothese des „Trojanischen Pferdes“ u.a. Albrecht und Norenberg 2006).

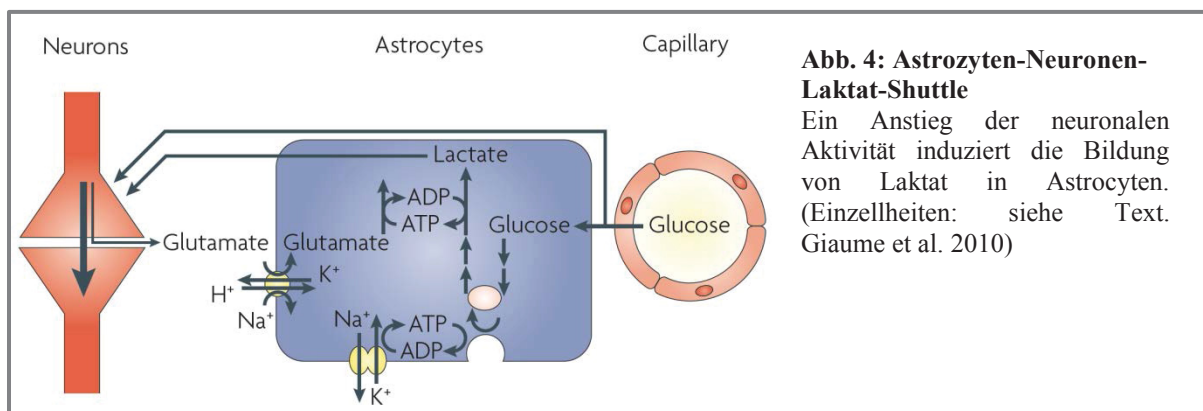
Während die totale $[\text{Glutamat}]$ im Hirngewebe abnimmt, wurde in Tierexperimenten ein Anstieg der $[\text{Glutamat}]_o$ beobachtet (De Knecht et al. 1994, Hermenegildo et al. 2000, Michalak et al. 1996, Suzuki et al. 1992 Tossman et al. 1987). Rose (Rose et al. 2005) kalkulierte, dass eine Perfusion mit 5 mM NH_4^+ zu einem Anstieg der $[\text{Glutamat}]_o$ auf bis zu 6-12 mM führt. Zum Vergleich: In Experimenten wurde, unter „physiologischen Bedingungen“, per Mikrodialyse, eine $[\text{Glutamat}]_o$ von 1-4 μM gemessen (Baker et al. 2002, Lerma et al. 1986, Nyitrai et al. 2006) und elektrophysiologische Experimente ergaben eine $[\text{Glutamat}]_o$ von 25 nM (Herman und Jahr 2007). Eine Aktivierung von Synapsen kann zu einer kurzfristigen Erhöhung des $[\text{Glutamat}]_o$ auf 170 μM - 1 mM im synaptischen Spalt führen (Choi et al. 2000, Clements et al. 1992).

Während einer HE wird die Ca^{2+} -abhängige Glutamat-Freisetzung durch NH_4^+ gesteigert. Das Glutamat für diese Freisetzung stammt aus Vesikeln, die bereits vor der Beeinflussung der Neubildung gefüllt wurden (Fan et al. 1990, Görg et al 2010, Rose 2002, Rose et al. 2005). Zudem induziert NH_4^+ einen $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg in Astrozyten, die den Na^+ -Gradienten und damit die Transportrate der Glutamat-Transporter schwächt. Ebenfalls diskutiert wird auch die Umkehrung der Transportrichtung (Bender und Norenberg 1996, Butterworth 2002, De Knecht 1994, Fan und Lavoie 1990, Hamberger 1979, Hermenegildo

1996, Kelly et al. 2009, Kosenko 1994, Mena und Cotman 1985, Michalak 1996, Monfort et al. 2002 B, Moroni et al. 1983, Mort et al. 2001, Oppong 1995, Rose 2002, Schmidt 1990, Szatkowski et al. 1990).

1.2.7. Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle

Neuronale Aktivität verbraucht Energie, aber die neuronale Aufnahme der Glukose aus den Blutgefäßen reicht nicht aus, um den erhöhten Energiebedarf abzudecken. Neben Glukose können Neurone auch Laktat zur Energiegewinnung nutzen. Die Bereitstellung von Laktat, ist Aufgabe der Astrozyten (Abb.4.). In ihren Endfüßen ist der Glukosetransporter GLUT-1 exprimiert, über den sie die Glukose aus dem Blut aufnehmen können (Vannucci et al. 1997). Aus der Glukose wird via Glykolyse Laktat, welches dann durch Monocarboxylattransporter (MCTs) in die Neurone transportiert wird.



Neuronale Aktivität, bzw. die Aufnahme des Glutamats aus dem synaptischen Spalt steigert die Aufnahme der Glukose aus den Blutgefäßen. So konnte nach Glutamat-Applikation eine gesteigerte GLUT-1 Aktivität beobachtet werden (Loaiza et al. 2003). Die Entfernung des Glutamats aus dem synaptischen Spalt erfolgt vor allem durch die astrozytären EAATs. Durch den Cotransport mit 3 Na⁺ steigt [Na⁺]_i an und führt zu einer gesteigerten Pumprate der Na⁺/K⁺-ATPase, so dass die ATP-Konzentration absinkt (Chatton et al. 2000). Eine Verminderung des ATPs aktiviert die anaerobe Glykolyse, was wiederum die Glukoseaufnahme in den Astrozyten steigert (Pellerin und Magistretti 1994). Neben einem [Na⁺]_i-Anstieg benötigt die Aktivitätssteigerung der GLUT1 auch einen Anstieg von [Ca²⁺]_i (Porras et al. 2008). Laut Gordon und Mitarbeiter (2008) maximiert eine erniedrigte Sauerstoff-Konzentration in Kombination mit einem [Ca²⁺]_i-Anstieg die astrozytäre Glykolyse und Laktat-Freisetzung („Lactate shuttle“ zur Übersicht siehe u.a.: Brown und Ransom 2007, Giaume et al. 2010, Pellerin und Magistretti 2012).

1.2.8. HE beeinflusst den Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle

Das Absinken der ATP-Konzentration während der HE (Chatton et al. 2000) müsste die Glukoseaufnahme aus den Gefäßen stimulieren. In Tierversuchen konnte beobachtet werden, dass während der HE die Glukose-Konzentration im Blutplasma, aber nicht im Gehirn ansteigt. Zudem konnte beobachtet werden, dass die Laktat-Konzentration sowohl im Blutplasma als auch im Gehirn ansteigt (Mans et al. 1994, Provent et al. 2007). Die Glukose im Gehirn wird möglicherweise sehr schnell zu Laktat verarbeitet. Alles deutet auf einen gesteigerten Energieverbrauch während einer HE hin (siehe Ott und Vilstrup 2014).

1.2.9. Die Ca^{2+} -Homöostase in Astrozyten

Ca^{2+} reguliert als intrazellulärer Botenstoff eine Vielzahl von essentiellen zellulären Funktionen, bis hin zur Apoptose (Berridge et al. 1998). Für die physiologische Funktion der Astrozyten ist es daher unumgänglich, dass die Ca^{2+} -Homöostase streng reguliert wird. Eine Übersicht der Ca^{2+} -Homöostase ist in Abb.5 wiedergegeben.

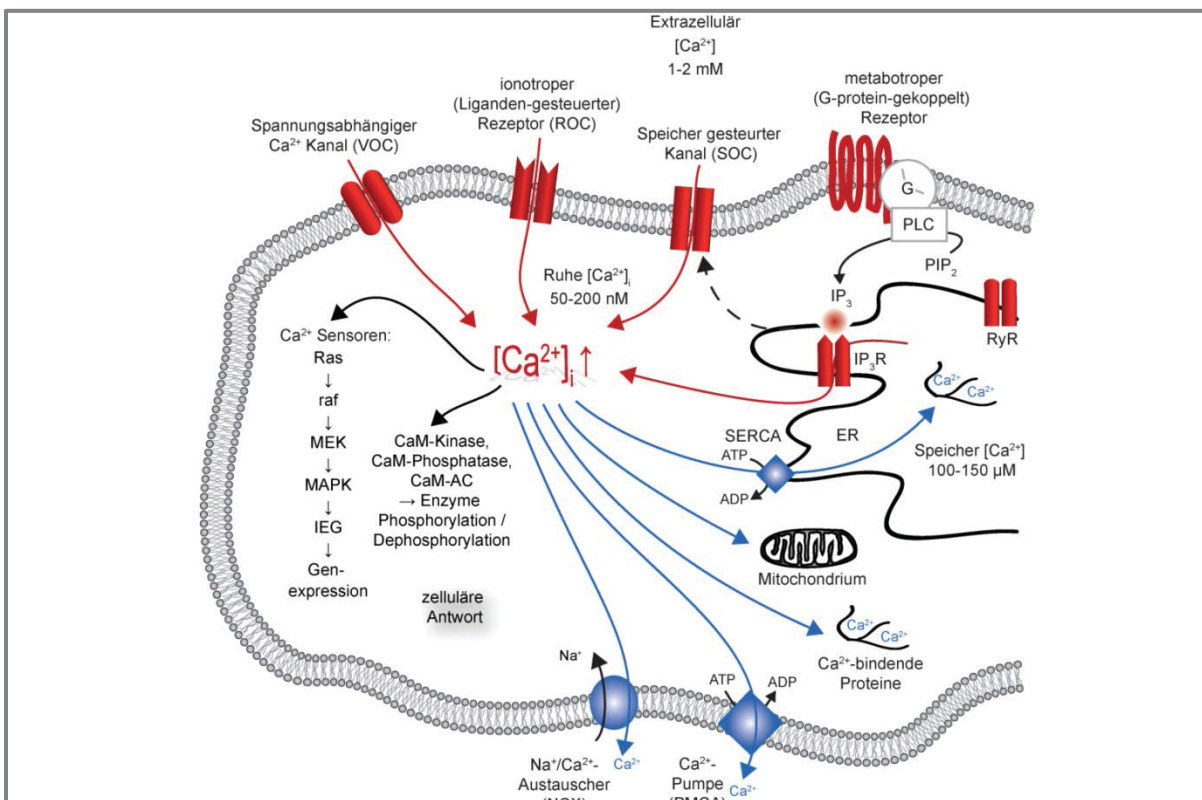


Abb.5 Übersicht über die Ca^{2+} -Homöostase

In rot dargestellt sind die Kanäle und Rezeptoren durch die ein Ca^{2+} -Einstrom erfolgen kann. Sowie die, durch den metabotropen Rezeptor induzierte, Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER. Die Mechanismen, die $[Ca^{2+}]_i$ niedrig halten, sind in blau dargestellt. Für den Rücktransport in den extrazellulären Raum sind vor allem der Na^+/Ca^{2+} -Austauscher und die Ca^{2+} -Pumpe der Plasmamembran zuständig. Zudem halten Ca^{2+} -Bindeproteine die freie $[Ca^{2+}]_i$ niedrig. Für Zellorganellen, die u.a. der Speicherung von Ca^{2+} dienen, sind hier als Beispiel ein Mitochondrium und das ER dargestellt. Ein $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg aktiviert verschiedene Signalkaskaden, die u.a. verschiedene Enzyme aktivieren oder deaktivieren und als Langzeiteffekt sogar die Genexpression beeinflussen. (Weitere Erklärungen im Text; Meier 2007, modifiziert)

Die freie $[Ca^{2+}]_i$ beträgt im Ruhezustand lediglich 50-200 nM, während $[Ca^{2+}]_o$ 1-2 mM beträgt (zur Übersicht: Carafoli 2004, Clapham 2007, Verkhratsky et al. 1998). Die niedrige $[Ca^{2+}]_i$ wird durch verschiedene Mechanismen gewährleistet. So binden cytosolische Ca^{2+} -Puffer wie Calbindin das Ca^{2+} und beeinflussen dadurch die räumlich-zeitlichen Eigenschaften von Ca^{2+} -Signalen. Zudem transportieren die Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX „sodium calcium exchanger“) und Ca^{2+} -Pumpen (PMCA, „plasma membrane calcium ATPase“) der Plasmamembran Ca^{2+} zurück in den extrazellulären Raum. Des Weiteren können Zellorganellen als Speicher dienen, z. B. die Mitochondrien (freie Konzentration in der Matrix $\sim 2 \mu M$, Chalmers und Nicholls 2003) oder das endoplasmatische Retikulum (ER). Die Ca^{2+} -Pumpen (SERCA = Sarcoplasmic/Endoplasmic reticulum calcium ATPase) in den Membranen des ER transportieren Ca^{2+} in das ER. Im ER beträgt die freie $[Ca^{2+}]$ etwa 100-150 μM (Berridge et al. 2000, Golovina und Blaustein 2000), da aber auch hier Ca^{2+} -Puffer wie Calreticulin (Gelebart et al. 2005) oder Calsequestrin (Kostyuk und Verkhratsky 1994) existieren, ist die gesamte $[Ca^{2+}]$ viel höher. Im ER/SR von Herzmuskelzellen erreicht die totale $[Ca^{2+}]$ im ER 1 mM, während die freie lediglich 200 μM beträgt (Michalak und Opas 2009).

Ein $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg kann entweder durch einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum erfolgen oder durch Ca^{2+} -Freisetzung aus den als Ca^{2+} -Speicher dienenden Zellorganellen bedingt sein. Ein Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum kann durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (VOC), durch ionotrope Rezeptoren (ROC „receptor-operated channels“) oder durch spezielle, Speicher-gesteuerte Kanäle erfolgen (SOC „store-operated channels“). Die SOCs werden durch die STIM-Proteine („stromal interacting molecule“) reguliert. Die STIM verbinden die Membran des ER mit der Plasmamembran und durch eine Abnahme der $[Ca^{2+}]$ im ER öffnen die STIM die SOCs (Carafoli 2004, Putney 2003, 2009, 2011, Vaca 2010).

In Astrozyten erfolgt ein $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg vor allem durch die Aktivierung von metabotropen Rezeptoren. Verschiedene Neurotransmitter-Rezeptoren sind mit einem heterotrimeren G-Protein gekoppelt. Bindet z. B. Glutamat an diesen Rezeptor (mGluR1 oder mGluR5), so aktiviert die G_α Untereinheit des G-Proteins die Phospholipase C (PLC). Die PLC spaltet daraufhin Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3). IP_3 öffnet die IP_3 -Rezeptoren (IP_3Rs) des ERs, die als Ca^{2+} -permeable Kationen-Kanäle fungieren (Wettschureck und Offermanns 2005). Für eine Aktivierung muss neben IP_3 auch Ca^{2+} auf der cytosolischen Seite des IP_3Rs binden (Berridge 2003, Hamilton 2005). IP_3 ist klein genug um durch gap junctions zu diffundieren und kann

so auch in benachbarten Astrozyten zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus den ER führen. Dadurch können im astrozytären Synzytium Ca^{2+} -Wellen entstehen, die wenn sie an den Endfüßen ankommen, die Blutgefäße beeinflussen (Bennett et al. 2003, Haydon 2001, Filosa und Blanco 2007).

In der Membran des ERs sind neben IP_3Rs auch Ryanodin-Rezeptoren (RyRs) exprimiert, die durch Bindung von Ca^{2+} geöffnet werden (Calcium induced calcium release, Blaustein und Golovina 2001).

Neben Neurotransmittern können auch ATP, Hormone, Wachstumsfaktoren, Chemokine und Prostaglandine einen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg in Astrozyten hervorrufen. Im Falle des ATPs können auch hier wieder Ca^{2+} -Wellen entstehen (Agulhon et al. 2008, Fiacco und McCarthy 2004, Bezzi et al. 1998, Porter und McCarthy 1997).

Ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induziert verschiedene zelluläre Prozesse, indem Ca^{2+} entweder direkt an Kanäle oder Transkriptionsfaktoren bindet, oder sogenannte Ca^{2+} -Sensorproteine wie Calmodulin (CaM) aktiviert. Durch die Bindung von Ca^{2+} verändert sich die Struktur des CaMs und kann so CaM-abhängige Kinase (CaMK), Phosphatase, die Adenylylcyclase, und die Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) aktivieren (Catterall und Few 2008, Clapham 2007, Verkhratsky et al. 1998). Astrozyten können aber auch nach einem Ca^{2+} -Signal z. B. vasoaktive Substanzen freisetzen, die je nach Substanz vasodilatatorisch oder vasokonstriktiv wirken und so den lokalen Blutfluss erhöhen oder erniedrigen (Gordon et al. 2007, Carmignoto und Gómez-Gonzalo 2010). Ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induziert auch durch die Aktivierung von kleinen guanine-nukleotid-Bindeproteinen (RAS-Proteine) Langzeiteffekte. RAS induzieren Phosphorylierungen, die letztendlich die Genexpression modellieren können (Finkbeiner und Greenberg 1996, Verkhratsky et al. 1998). Eine weitere Steuerung der Zellregulation entsteht durch Ca^{2+} -abhängige Signalkaskaden, die als Todessignal Apoptose auslösen (Orrenius et al. 2003).

1.2.10. HE beeinflusst die Ca^{2+} -Homöostase in Astrozyten

In verschiedenen Experimenten an Zellkulturen konnte bereits ein NH_4^+ -induzierter $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg beobachtet werden. Yang und Rose vermuteten, dass die NH_4 -induzierten Veränderungen des pH-Wertes zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER führen (Rose 2005, Yang et al. 1994; primäre Neuronenkulturen). Wobei Rose die durch die NH_3 -Diffusion anfänglichen Alkalinisierung verantwortlich macht und Yang die der Alkalinisierung folgende Ansäuerung. Rose induzierte in seinen Experimenten in kultivierten Astrozyten, durch

Applikation der starken Base Trimethylamine (TMA), sowohl pH_i als auch $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Veränderungen.

Etwas andere Ergebnisse lieferten dagegen Minelli und Mitarbeiter. Sie führten Experimente an kultivierten Mikrogliazellen durch und postulierten, dass NH_4^+ die PLC aktiviert. Das Spaltprodukt IP_3 , induziert daraufhin die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER (Minelli et al. 2000).

Der NH_4^+ -induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg könnte aber auch durch eine Aktivierung der NMDA-R erfolgen. In primären Kulturen von Astrozyten konnten Schliess und Mitarbeiter beobachten, dass BAPTA (1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis (acetoxymethyl ester); ein selektiver Chelator der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher) und MK-801 ((5S,10R)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate; selektiver nicht-kompetitiver NMDA-R Antagonist) den NH_4^+ induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg in den Mikrogliazellen verhinderten (Schliess et al. 2002). Weitere Hinweise auf eine Involvierung von NMDA-R lieferten Tierversuche, in denen verschiedene kompetitive und nicht-kompetitive Inhibitoren der NMDA-R den durch NH_4^+ induzierten Tod von Versuchstieren verhinderten (Hermenegildo 1996, Hermenegildo 2000, Hilgier 2004, Llansola 2007, Marcaida 1992).

Die Diskussion, ob Astrozyten NMDA-R exprimieren dauert noch immer an (Lalo et al. 2006, Lopez et al. 1997, Porter und McCarthy 1995, Schipke et al. 2001, Serrano et al. 2008, Shelton und McCarthy 1999, Steinhäuser und Gallo 1996, Review: Gallo und Ghiani 2000, Verkhratsky und Kirchhoff 2007).

Inwiefern NH_4^+ zur Öffnung der NMDA-R führt ist noch nicht vollständig geklärt (Fan und Szerb 1993, Llansola 2007, Lombardi et al. 1994). Für eine Aktivierung von NMDA-R muss das Membranpotential depolarisieren, denn beim Ruhemembranpotential ist der Ionenkanal durch einen Mg^{2+} -Block versperrt. Zudem muss der co-agonist Glyzin binden. Anscheinend reicht die durch NH_4^+ ausgelöste Depolarisation aus, um die Blockade des NMDA-R durch Mg^{2+} aufzuheben (Rodrigo et al. 2009). Durch einen Anstieg der extrazellulären Glyzin-Konzentration (Swain et al. 1992 B) wird die Aktivierung des NMDA-R begünstigt.

Eine Aktivierung von NMDA-Rs kann zu einem Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} sowie zu einem Ausstrom von K^+ führen. Die Überaktivierung der NMDA-R führt zu einem pathologischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg. Ca^{2+} kann via CaM das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase, (NOS für NO-Synthase) aktivieren. NO kann nun in den Astrozyten die Leistungsfähigkeit der GS vermindern (Felipo und Butterworth 2002, Kosenko et al. 2003, Miñana et al. 1997,

Schliess et al. 2002), oder die NO-sensitive Guanylylcyclase aktivieren. Dadurch steigt die Menge an Guanosin-Monophosphat an und so werden weitere Signalkaskaden im Hormonsystem oder Stoffwechsel aktiviert (cGMP; Felipo und Butterworth 2002).

Zudem kann der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg zu einer Ca^{2+} -Überladung der Mitochondrien führen. In den Mitochondrien interagiert Ca^{2+} wahrscheinlich mit dem Coenzyme Q der Atmungskette, so dass diese gestört wird und oxidativer Stress entsteht (Grijalba et al 1999, zur Übersicht Kowaltowski et al. 2001).

Die Ca^{2+} -Überladung führt zudem zur Öffnung von Kanälen in der Mitochondrien-Membran („permeability transition pore“, PTP), sodass die Permeabilität der Membran um ein Vielfaches ansteigt („mitochondrial permeability transition“, mPTP, Hansson et al. 2008, Murthy et al. 2001, Kowaltowski et al. 2001, Norenberg et al. 2008, Peng und Jou 2010). Durch diese Pore diffundiert das in den Mitochondrien gespeicherte Ca^{2+} in das Cytosol, so dass ein weiterer Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ erfolgt.

2. Ziel der Studie

Viele Funktionen der Astrozyten sind für das Überleben der Neurone essentiell und nicht wenige dieser Funktionen sind von einer intakten Ionenhomöostase abhängig. Vorherige Experimenten zeigten bereits, dass NH_4Cl -Applikation einen $[\text{K}^+]_o$ -Anstieg im Hippocampus (Alger und Nicoll 1983) induziert. Unklar blieb, wodurch NH_4^+ den $[\text{K}^+]_o$ -Anstieg induziert. $[\text{K}^+]_o$ -Anstieg führt zu einer gesteigerten neuronalen Erregbarkeit, zu einer intrazellulären Ansäuerung (Kelly et al. 2009, Nagaraja und Brookes 1998, Pappas und Ransom 1994), zu einem Anstieg des zerebralen Blutflusses (Filosa und Blanco 2007), zu Veränderungen des Energiemetabolismus (Takahashi 1995), der Proteinsynthese und der DNA-Replikation (Amédeé 1997, Walz 2000). Um die Mechanismen zu definieren, die den NH_4^+ -induzierten $[\text{K}^+]_o$ -Anstieg bedingen, wurden im ersten Teil der Studie Experimente mit K^+ -sensitiven Zweikanal-Mikroelektroden im *stratum radiatum* des Hippocampus von P3-4, P7-10, P13-16 und P19-21 Balb/c Mäusen durchführt.

Der zweite Teil dieser Studie untersucht den NH_4 -induzierten Ca^{2+} -Anstieg. Ca^{2+} ist der wichtigste intrazelluläre Messenger. Ein Ca^{2+} -Anstieg kann zur Exocytose von Gliatransmitter führen, vasodilatatorisch oder konstriktiv wirken, die Aktivität von Enzymen, Transportern und Kanäle beeinflussen, die Genexpression modellieren und letztendlich auch zum gesteuerten Zelltod führen (zur Übersicht über die Ca^{2+} -Homöostase: Berridge 2003, Carafoli 2004, Clapham 2007, Kostyuk und Verkhratsky 1994, Verkhratsky et al. 1998).

In den verschiedensten Zellkulturexperimenten wurde bereits gezeigt, dass NH_4^+ -Applikation einen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg auslösen kann (Minelli et al. 2000, Rose 2005, Schliess et al. 2002, Yang et al. 1994). Die Ergebnisse waren unterschiedlich und so induziert NH_4 den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg durch Verschiebungen des pH-Wertes, oder durch oxidativen Stress, durch NMDA-R-Aktivierung oder durch Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER. Zudem existieren keine Hyperammonämie Experimente in akuten Hirnschnitten. Eine weitere essentielle Frage die es zu beantworten galt war die, ob der NH_4^+ -induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg in verschiedenen Hirnregionen ähnliche Verläufe zeigt. Immerhin werden während einer HE verschiedenste Symptome an Patienten beobachtet, die ganz klar verschiedenen Hirnregionen zugeordnet werden können. So z. B. die Ataxie, die eine Beeinflussung des Cerebellums kennzeichnen kann, oder die Gedächtnisstörungen, die auf eine Abnahme der LTP im Hippocampus hindeuten. Um diese Fragen zu klären wurden Fluoreszenz Imaging Experimente mit dem Ca^{2+} sensitiven Farbstoff Fura-2-AM im *stratum radiatum* des Hippocampus, primären motorischen Cortex, sensorischen Cortex und Barrelcortex von P14-16 Balb/c Mäusen, durchführt.

3. Publikationen

Aus Gründen des Kopierschutzes wurden für die Veröffentlichung dieser Dissertation die Publikationen entfernt und hier werden lediglich die Zusammenfassungen veröffentlicht.

1. Kir4.1 channels mediate a depolarization of hippocampal astrocytes under hyperammonemic conditions in situ.

Stephan J, Haack N, Kafitz KW, Durry S, Koch D, Hochstrate P, Seifert G, Steinhäuser C, Rose CR *Glia* 60(6):965-78 (2012)

Seite 22-35

Abstract

Increased ammonium (NH_4^+) concentration in the brain is the prime candidate responsible for hepatic encephalopathy (HE), a serious neurological disorder caused by liver failure and characterized by disturbed glutamatergic neurotransmission and impaired glial function. We investigated the mechanisms of NH_4^+ -induced depolarization of astrocytes in mouse hippocampal slices using whole-cell patch-clamp and potassium-selective microelectrodes. At postnatal days (P) 18-21, perfusion with 5 mM NH_4^+ evoked a transient increase in the extracellular potassium concentration ($[\text{K}^+]_o$) by about 1 mM. Astrocytes depolarized by on average 8 mV and then slowly repolarized to a plateau depolarization of 6 mV, which was maintained during NH_4^+ perfusion. In voltage-clamped astrocytes, NH_4^+ induced an inward current and a reduction in membrane resistance. Amplitudes of $[\text{K}^+]_o$ transients and astrocyte depolarization/inward currents increased from P3-4 to P18-21. Perfusion with 100 μM Ba^{2+} did not alter $[\text{K}^+]_o$ transients but strongly reduced both astrocyte depolarization and inward currents. NH_4^+ -induced depolarization and inward currents were also virtually absent in slices from Kir4.1 $-/-$ mice, while $[\text{K}^+]_o$ transients were unaltered. Blocking Na^+/K^+ -ATPase with ouabain caused an immediate and complex increase in $[\text{K}^+]_o$. Taken together, our results are in agreement with the hypothesis that reduced uptake of K^+ by the Na^+/K^+ -ATPase in the presence of NH_4^+ disturbs the extracellular K^+ homeostasis. Furthermore, astrocytes depolarize in response to the increase in $[\text{K}^+]_o$ and by influx of NH_4^+ through Kir4.1 channels. The depolarization reduces the astrocytes' capacity for channel-mediated flux of K^+ and for uptake of glutamate and might hereby contribute to the pathology of HE.

Impact Faktor im Jahr 2012: 5,07

Experimente mit K⁺-sensitiven Mikroelektroden

Ich war involviert in der Erstellung der Versuchspläne.

43% der Experimente stammen aus der Diplomarbeit Haack, Nicole; Februar, 2010;

“Influence of Ammonium on the Extracellular Potassium Homeostasis in the Hippocampus”.

27 % der Experimente stammen aus der Diplomarbeit: Koch, Daniel; Februar, 2011:

“Mechanisms of Ammonia-induced Extracellular Potassium Changes in the Hippocampus of Mouse”. 100 % der Auswertung dieser Experimente führte ich während meiner Promotion durch.

Analyse und Interpretation der Experimente mit K⁺-sensitiven Mikroelektroden

43% während der Diplomarbeit, 57 % und abschließende Statistik während der Promotion.

Gesamtinterpretation der Daten erfolgte während der Promotion.

Manuskript

Ich schrieb die erste Version des Kalium-Teils des Manuskripts während der Promotion.

Abbildungen

Ich designte die ersten Versionen der Abbildungen 1B, 1C, 1D, 2A, 4C und 5 D während meiner Promotion.

Überarbeitung

Ich war involviert in der Überarbeitung der Abbildungen 1B, 1C, 1D, 2A, 4C und 5 D und des Kalium-Teil des Manuskripts.

2. Preparation, Calibration and Application of Potassium-Selective Microelectrodes

Haack N und Rose CR, dazu eingeladenes Buchkapitel in *Microelectrodes: Techniques, Structures for Biosensing and Potential Applications* (Eds. Lei, K.F.). Nova Publishing, Hauppauge, NY (2014)

Seite 37-55

Abstract

In most animal cells, potassium ions are kept at concentrations of around 130 mM, while extracellular potassium concentrations are usually in the low mM range. In the brain, the resulting outwardly directed electrochemical gradient for potassium together with a selective potassium conductance of the plasma membrane is the basis for the highly negative membrane potential of neurons and glial cells. Consequently, maintenance of this gradient, and of low extracellular potassium concentrations, is a fundamental requirement for proper brain function. At the same time, excitatory electrical activity of neurons is accompanied by a loss of intracellular potassium and a resulting transient elevation in extracellular potassium, which is counteracted by potassium uptake into glial cells. Under many pathological conditions, this intricate interplay is disturbed and several neurological diseases can be causally linked to impairment of potassium homeostasis. To understand the properties and function of neural networks under physiological and pathophysiological conditions, determination of the extracellular potassium concentration and its activity-induced fluctuations is thus required. Double-barreled, potassium-selective microelectrodes are reliable tools for such measurement in the intact tissue. In the present chapter, we will provide a detailed description of the preparation of liquid carrier-based ion-selective microelectrodes with a tip diameter of about 1 μm .

Special emphasis will be given to the calibration of these electrodes including the testing of their ion specificity and the handling and correction of non-specific reactions to other ions or molecules. Finally, we will illustrate the application of potassium-selective microelectrodes for measurement of extracellular potassium transients in acute tissue slices of the mouse hippocampus evoked by inhibition of Na^+/K^+ -ATPase, application of receptor agonists or in response to ammonium (NH_4^+).

Experimente und Analyse der Experimente mit K^+ -sensitiven Mikroelektroden

Ich führte 100% der Experimente und der Auswertungen durch, die in der Publikation verwendet wurden.

Manuskript

Ich schrieb die erste Version des Manuskripts und war involviert in der Überarbeitung.

Abbildungen

Ich designte die ersten Versionen aller Abbildungen und war involviert in deren Überarbeitung.

3. Dysbalance of astrocyte calcium under hyperammonemic conditions

Haack N, Dublin P und Rose CR; eingereicht bei PLOS ONE

Seite 57-96

Abstract

Increased brain ammonium ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$) plays a central role in the manifestation of hepatic encephalopathy (HE), a complex syndrome associated with neurological and psychiatric alterations, which is primarily a disorder of astrocytes. Here, we analysed the influence of $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ on the calcium concentration of astrocytes in situ and studied the underlying mechanisms of $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -evoked calcium changes, employing fluorescence imaging with Fura-2 in acute tissue slices derived from different regions of the mouse brain. In the hippocampal stratum radiatum, perfusion with 5 mM $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ for 30 minutes caused a transient calcium increase in about 40% of astrocytes lasting about 10 minutes. Furthermore, the vast majority of astrocytes (~90%) experienced a persistent calcium increase by ~50 nM. This persistent increase was already evoked at concentrations of 1-2 mM $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, developed within 10-20 minutes and was maintained as long as the $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ was present. Qualitatively similar changes were observed in astrocytes of different neocortical regions as well as in cerebellar Bergmann glia. Inhibition of glutamine synthetase resulted in significantly larger calcium increases in response to $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, indicating that glutamine accumulation was not a primary cause. Calcium increases were not mimicked by changes in intracellular pH. Pharmacological inhibition of voltage-gated sodium channels, sodium-potassium-chloride-cotransporters (NKCC), the reverse mode of sodium/calcium exchange (NCX), AMPA- or mGluR5-receptors did not dampen $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -induced calcium increases. They were, however, significantly reduced by inhibition of NMDA receptors and depletion of intracellular calcium stores. Taken together, our measurements show that sustained exposure to $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ causes a sustained increase in intracellular calcium in astrocytes in situ, which is partly dependent on NMDA receptor activation and on release of calcium from intracellular stores. Our study furthermore suggests that dysbalance of astrocyte calcium homeostasis under hyperammonemic conditions is a widespread phenomenon, which might contribute to the disturbance of neurotransmission during HE.

Experimente

Ich war involviert in der Erstellung und Ausweitung der Versuchspläne.

Ich führte 96% der Experimente durch.

Analyse und Interpretation der Experimente

Ich führte 100% der Analysen und abschließende Statistik durch. Die Gesamtinterpretation der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Professor Rose.

Manuskript

Ich schrieb die erste Version des Manuskripts.

Abbildungen

Ich designte die ersten Versionen der Abbildungen.

Überarbeitung

Ich war involviert in der Überarbeitung des Manuskripts und der Abbildungen.

4. Zusammenfassung der Forschungsergebnisse und Diskussion

4.1 Veröffentlichte Forschungsergebnisse

In dieser Studie stellten wir uns die Frage, inwieweit Hyperammonämie die Kalium- sowie Calcium-Homöostase in akuten Hirnschnitten von Balb/c Mäusen beeinflusst. Einige der Experimente mit K^+ -sensitiven Zweikanal-Mikroelektroden im *stratum radiatum* des Hippocampus stammen aus Diplomarbeiten (Haack 2010, Koch 2011). Um aber einen sinnvollen Überblick zu geben, fließen diese Ergebnisse in der folgenden Diskussion mit ein.

Wir konnten zeigen, dass Perfusion mit 5 mM NH_4^+ einen transienten $[K^+]_o$ -Anstieg von ca. 1 mM induzierte. Nach ca. 5 min erreichte der $[K^+]_o$ -Anstieg ein Maximum und kehrte noch während der NH_4^+ -Applikation auf den Ruhewert von 2,5 mM zurück. Nach dem Auswaschen wurde ein $[K^+]_o$ -Unterschuss von ebenfalls ca. 1 mM beobachtet. Die Amplituden des $[K^+]_o$ -Anstieges zeigten sich linear konzentrationsabhängig von 1 bis 20 mM NH_4^+ , wobei $[K^+]_o$ -Anstieg und $[K^+]_o$ -Unterschuss korrelierten.

Der NH_4^+ -induzierte $[K^+]_o$ -Anstieg kann entweder durch eine Verstärkung des K^+ -Ausstroms oder durch Hemmung des K^+ -Einwärtstransports bedingt sein. Um die physiologischen Mechanismus zu erforschen, wurden die Experimente in unterschiedlichen Altersstufen, genetisch manipulierten Mäusen, sowie pharmakologische Experimente im *stratum radiatum* des Hippocampus durchgeführt (Eine Übersicht der pharmakologischen Experimente ist in Abb.6 dargestellt).

Im zweiten Teil dieser Studie wurden Fluoreszenz-Imaging Experimente mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fura-2-AM durchgeführt. Die Experimente erfolgten in Astrozyten des *stratum radiatum* des Hippocampus, des primären motorischen, somatosensorischen und Barrel Kortex, sowie in Bergmann Gliazellen des Kleinhirns. Alle Astrozyten wurden mittels Sulforhodamine 101 (SR101) identifiziert, lediglich die Bergmann Gliazellen wurden durch ihre Morphologie bestimmt. In jeder untersuchten Hirnregion traten, in einigen Zellen, kurz nach Beginn der 5 mM NH_4^+ -Applikation, unabhängig der Lage, der Morphologie, und der Ruhe- $[Ca^{2+}]_i$, transiente $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege auf. Die Transienten erreichten innerhalb von ca. 5 min ein Maximum und sanken noch in Gegenwart von NH_4^+ ab, so dass nach ca. 20 min ein stabiles Plateau erreicht wurde. Die Mehrzahl, der Astrozyten oder Bergmann-Gliazellen, zeigten einen monophasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg der ebenfalls nach ca. 20 min ein stabiles Plateau erreichte.

Diese $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten konnten weder nach der Applikation von 1, oder 2 mM NH_4^+ , noch während der stufenweisen Erhöhung von 0,5 auf 5 mM NH_4^+ , beobachtet werden. Wir gehen davon aus, dass diese Transienten einen artifiziellen Charakter haben, der durch die direkte 5 mM NH_4^+ -Applikation zu Stande kommt. Während der Manifestation einer HE würde die $[NH_4^+]$ nicht abrupt auf eine solch hohe Konzentration ansteigen, wodurch ein Auftreten diese Transienten im Gehirn von HE-Patienten, unwahrscheinlich erscheint.

Das durch Applikation von 1, oder 2 mM NH_4^+ induzierte Plateau hingegen war, ebenso wie das NH_4^+ -induzierte Plateau nach der stufenweisen Erhöhung, nicht signifikant unterschiedlich zu den durch 5 mM NH_4^+ induzierten Plateaus. Da wir zudem keine Unterschiede zwischen den Plateauphasen der mono- oder biphasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege feststellen konnten, fassten wir die Plateaus zusammen. So zeigte sich, dass der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg im Hippocampus und motorischen Kortex mit ca. 50 nM signifikant größer war als im sensorischen Kortex, den Bergmann Gliazellen, oder im Barrel Cortex (ca. 35-45 nM). Wodurch diese unterschiedlichen Ca^{2+} -Anstiege hervorgerufen wurden, wird weiterhin untersucht. Ein wichtiger Schritt hierbei war die Erforschung der Mechanismen, die den NH_4 -induzierten Ca^{2+} -Anstieg bedingen. Die folgenden Pharmakologischen Studien konzentrierten sich daher zu erst auf das Plateau. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die pharmakologischen Ca^{2+} -Imaging Experimente zudem in den Astrozyten des *stratum radiatum* des Hippocampus durchgeführt.

Der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg kann entweder durch einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum erfolgen oder durch Ca^{2+} -Freisetzung aus den als Ca^{2+} -Speicher dienenden Zellorganellen bedingt sein. Das, die $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch Verschiebungen des pH-Wertes ausgelöst wurden, konnte, für akute Hirnschnitte, verworfen werden, da Applikation von TMA zwar Verschiebungen des pH-Wertes aber nicht des $[Ca^{2+}]_i$ auslöste (Rose 2005, Yang et al. 1994). Eine Übersicht der pharmakologischen Experimente, mit deren Hilfe die Rezeptoren, Kanäle, Transporter und Speicher untersucht wurden, ist in Abb. 6 dargestellt.

4.1.1 Mögliche Mechanismen des NH_4^+ -induzierten $[\text{K}^+]_o$ - oder $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs

Zuerst wurde neuronale Aktivität als Verursacher ausgeschlossen, da Inhibition der spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen, durch TTX, weder den NH_4^+ -induzierten $[\text{K}^+]_o$ -Anstieg noch den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg beeinflusste.

Ebenfalls ausgeschlossen wurde, dass die Glutamin Ansammlung den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg bedingte. Dabei konnten wir feststellen, dass der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg, in Anwesenheit des Glutamin-Synthetase Inhibitor MSO, signifikant vergrößert war. Das lässt die Vermutung zu, dass die Applikation von 5 mM NH_4^+ nicht die Detoxifikation durch die astrozytäre Glutamin-Synthetase verminderte. Wenn in den Astrozyten die Glutamin-Synthetase aktiv die $[\text{NH}_4^+]_i$ erniedrigte, so stand weniger NH_4^+ zur Verfügung um den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg zu induzieren.

Als nächster Schritt wurden die iGlu-R überprüft. Bereits frühere Experimente zeigten, dass NH_4^+ die NMDA-R aktivierte während die AMPA-R gehemmt wurden (Fan und Szerb 1993, Llansola 2007, Lombardi et al. 1994). In der Tat entsprachen die Ergebnisse unserer Experimente diesen Befunden. So konnte durch Inhibierung der AMPA-R, mittels CNQX, gezeigt werden, dass weder ein K^+ -Ausstrom noch ein Ca^{2+} -Einstrom, durch die AMPA-R erfolgte. Eine Inhibition der NMDA-R, mittels AP-5, zeigte, dass zwar kein K^+ -Ausstrom durch die NMDA-R erfolgte, aber dafür ein Ca^{2+} -Einstrom. So reduzierte die Inhibition der NMDA-R den NH_4 -induzierten Ca^{2+} -Anstieg um 54%.

4.1.2 Mögliche Mechanismen des NH_4^+ -induzierten $[\text{K}^+]_o$ -Anstiegs

Ein $[\text{K}^+]_o$ -Anstieg könnte durch einen K^+ -Ausstrom durch die K_{ir} -Kanäle, oder durch ein Zurücklassen des K^+ erfolgen, da der NKCC1 während einer Hyperammonämie, anstelle des K^+ eher NH_4^+ in die Astrozyten transportiert (Kelly et al. 2009, Kelly und Rose 2010, Yan et al. 2001). Bei jungen Mäusen sind die K_{ir} -Kanäle und der NKCC1 nur sehr gering exprimiert. Zwischen P3-4, P7-10 und P13-16 stiegen die Amplituden des $[\text{K}^+]_o$ -Anstiegs an. Zwischen P13-16 und P18-21 konnte kein Unterschied mehr festgestellt werden. Die Kinetik betreffend konnte zwischen allen Altersgruppen kein Unterschied festgestellt werden. Der Unterschied in den Amplituden des $[\text{K}^+]_o$ -Anstiegs könnte entweder auf die geringere Anzahl an K_{ir} und der NKCC1 zurückzuführen sein, oder auf einen größeren Extrazellularraum in jungen Mäusen. Denn mit steigendem Alter verringert sich der Extrazellularraum, während die Tortuosität fast gleich bleibt (Bondareff and Pysh 1968, Pysh 1969, Syková et al. 1998, Syková and

Nicholson 2008). Dies würde erklären, warum die NH_4^+ -induzierten Amplituden mit steigender Altersgruppe zwischen P3 bis P13 zunehmen, während die Kinetik konstant blieb. Das freigesetzte K^+ verteilte sich ab P13 auf ein größeres Volumen, während die Kinetiken, die durch Freisetzung und Abtransport bedingt wurden, ab P3 gleich blieben.

Eine Involvierung der K_{ir} -Kanäle konnte endgültig ausgeschlossen werden, da weder Inhibition der K_{ir} -Kanäle durch Ba^{2+} noch ein K_{ir} -Knockout in C57BL6 Kir4.1 $-/-$ Mäusen die Amplitude des $[\text{K}^+]_{\text{o}}$ -Anstiegs oder $[\text{K}^+]_{\text{o}}$ -Unterschuss beeinflussten. Der $[\text{K}^+]_{\text{o}}$ -Unterschuss resultiert somit auch nicht aus dem spatial buffering durch die K_{ir} -Kanäle.

Ebenfalls endgültig ausgeschlossen wurde eine Beteiligung des NKCC1, was nicht weiter überraschend ist, denn immerhin leistet er keinen Beitrag zur Kontrolle der Ruhe- $[\text{K}^+]_{\text{o}}$. Zudem wurde noch nie über eine Bidirektionalität berichtet, so dass ein K^+ -Auswärtstransport durch Änderung der Transportrichtung unwahrscheinlich ist. Da der $[\text{K}^+]_{\text{o}}$ -Unterschuss nicht durch Bumetanid beeinflusst wurde, ist der NKCC1 nicht an der Pufferung von $[\text{K}^+]_{\text{o}}$ beteiligt.

Als nächstes wurde ein K^+ -Auswärtstransport durch den KCC überprüft. Dieser konnte, mittels dem Inhibitor Furosemid, als Verursacher ausgeschlossen werden.

Als Verursacher für den NH_4^+ -induzierten $[\text{K}^+]_{\text{o}}$ -Anstieg blieb noch ein Zurücklassen des K^+ durch die Na^+ - K^+ -ATPase übrig. Die Na^+ - K^+ -ATPase ist für die Aufrechterhaltung der Ruhe- $[\text{K}^+]_{\text{o}}$ essentiell. Daher führte die Applikation des Na^+ - K^+ -ATPase Inhibitors Ouabain sofort zu einem $[\text{K}^+]_{\text{o}}$ -Anstieg. Dieser Anstieg zeichnete sich durch multiple Phasen aus. Zu keinem Zeitpunkt wurde während der Ouabain-Applikation ein Plateau erreicht, in dessen Phase eine weitere Applikation von NH_4^+ sinnvoll ausgewertet werden konnte. Der $[\text{K}^+]_{\text{o}}$ -Unterschuss könnte ebenfalls durch eine gestiegene Na^+ - K^+ -ATPase entstanden sein. Bereits in früheren Experimenten konnte beobachtet werden, dass einem $[\text{K}^+]_{\text{o}}$ -Anstieg ein $[\text{K}^+]_{\text{o}}$ -Unterschuss folgte, der auf eine gesteigerte Aktivität der Na^+ - K^+ -ATPase-Aktivität zurückgeführt wurde (D'Ambrosio et al. 2002, Heinemann und Lux 1975). Die Aktivität der Na^+ - K^+ -ATPase könnte durch den Anstieg der $[\text{Na}^+]_{\text{i}}$, $[\text{K}^+]_{\text{o}}$ und $[\text{NH}_4^+]_{\text{o}}$ stimuliert worden sein.

4.1.3 Mögliche Mechanismen des NH_4^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ -Anstiegs

Der NH_4^+ -induzierte $[\text{Na}^+]_{\text{i}}$ -Anstieg durch den NKCC1 (Kelly et al. 2009) könnte die Transportrichtung des Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) umkehren. Der NCX würde im reverse Modus Ca^{2+} in die Zelle transportieren (Kirischuk et al. 2012, Rojas et al. 2007, Rose und Karus 2013). Dies konnte ausgeschlossen werden, denn weder die Verhinderung des

NH_4^+ -induzierten $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieges, mittels Bumetanid, (Kelly et al. 2009) noch die Inhibition des reverse Modus des NCX, mittels KB-R7943, verminderten den NH_4^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg.

Nach der Überprüfung der iGlu-Rs wurde eine mögliche Aktivierung von mGlu-Rs untersucht. Die Astrozyten im Hippocampus exprimieren mGlu-R1 und mGlu-R5, die beide mit einem G-Protein verbunden sind. Die Aktivierung des G-Proteins führt dazu, dass die assoziierte Phospholipase C (PLC) das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP_3 induziert daraufhin einem Ca^{2+} -Ausstrom durch die IP_3 -Rezeptoren des ER. Eine Aktivierung der mGlu-R1 und mGlu-R5 konnte ausgeschlossen werden, wie Inhibition der mGlu-R1 und mGlu-R5, mittels MPEP, zeigte. Unwahrscheinlich erschien auch eine direkte Interaktion des NH_4^+ mit dem G-Protein, da nach Aktivierung des G-Proteins, durch AlF_4^- , NH_4^+ einen zusätzlichen Ca^{2+} -Anstieg induzierte. Dennoch musste NH_4^+ irgendwie einen Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER induzieren, denn nach Entleerung der Speicher mittels CPA war der NH_4 -induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg um 50% reduziert. NH_4^+ aktivierte also entweder die PLC, oder bewirkt die Spaltung von PIP_2 zu IP_3 und DAG, oder aktiviert selbst den IP_3 -Rezeptor. Die NH_4 -induzierte Entleerung der Speicher führte zu keinem „store-operated“ Ca^{2+} -Einstrom, denn eine Inhibition der Trp4-Kanäle, mittels La^{3+} , beeinflusste den NH_4 -induzierten Ca^{2+} -Anstieg nicht.

4.2. Unveröffentlichten Forschungsergebnisse

Um die Hypothese des ROS-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieges zu untersuchen erfolgten bereits einige Pilotmessungen. Da hier die Menge der Experimente noch nicht ausreicht und weitere Experimente durchgeführt werden müssen sind diese Ergebnisse noch nicht mit in die Veröffentlichung „Dysbalance of astrocyte calcium under hyperammonemic conditions“ eingeflossen. Dennoch sind, für eine bessere Übersicht, die Ergebnisse der ersten Experimente hier beschrieben.

In einem Versuchsansatz wurden mit dem Antioxidant Vitamin C (2 mM, n=6; N=2) die ROS abgefangen. Ein weiterer Ansatz war, mittels Superoxid-Dismutase (100 U/ml, n=34; N=4) die möglichen 2O_2^- zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff zu katalysieren. Beides verminderte den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg nicht. Es ist aber auch fraglich, ob ROS in diesen akuten Experimenten einen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg induzieren könnte. Experimente an kultivierten Astrozyten zeigten, unter hyperammonischen Bedingungen, bereits nach 3 min einen Anstieg an freien Radikalen (Kosenko et al. 1997, Rama Rao et al. 2003), oxidativer Stress dagegen trat erst viel später auf (Jayakumar et al 2006 B, 2004, Sathyasaikumar et al. 2007, Reddy et

al. 2004, zur Übersicht siehe Rama Rao et al. 2003). Eine weitere Überlegung, zur Validität dieser Hypothese, ist die, dass oxidativer Stress erst durch Ca^{2+} -Überladung der Mitochondrien entsteht. Diese Ca^{2+} -Überladung führt zur Ausbildung der mPTP (Hansson et al. 2008, Peng und Jou 2010), woraufhin das Ca^{2+} in das Zytosol diffundieren kann. In Zellkulturen führte Applikation von 5 mM NH_4^+ erst nach 4 Stunden zu einem Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials (Bai et al. 2001). Eine 30 minütige Applikationsdauer wäre vermutlich zu kurz, um die mPTP zu induzieren. Zudem besteht auch die Möglichkeit, dass der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg nicht ausreicht, denn in Experimenten an Leberzellen löste eine Infusion mit 42 μM CaCl_2 bereits nach 5 min die mPTP aus (Chalmers und Nicholls 2003). Das NH_4^+ -induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Plateau, in unserer Studie, erreichte $\sim 0,05 \mu\text{M}$, aber Kahlert und Reiser schätzen, dass die mPTP erst durch einen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg von über 50 μM ausgelöst werden könne (Kahlert und Reiser 2002).

5. Konsequenzen für die Pathologie der HE

Hyperammonämie-Experimente in Hirnschnitten sind bedeutsam, denn die Beeinflussungen des Ionenhaushaltes könnte für einige Symptome der HE verantwortlich sein. So könnte der in dieser Studie beobachtete $[K^+]_o$ -Anstieg zu der erhöhten neuronalen Erregbarkeit führen (Voskuyl und ter Keurs 1981, Balestrino et al. 1986, Kreisman und Smithn 1993, Walz 2000), die Teil der HE- Symptomatik ist. Gestützt wird diese Hypothese noch durch den Befund, dass NH_4^+ die Frequenz der Aktionspotentiale in den Pyramidenzellen des Hippocampus erhöht (Kelly und Church 2005).

Der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in den Astrozyten könnte die Neuron-Glia-Wechselwirkung beeinflussen. So wurde bereits berichtet, dass NH_4^+ zur Exocytose von Glutamat führt (Fan et al. 1990, Görg et al 2010, Rose 2002, Rose et al. 2005). Dies könnte ebenfalls einen Teil der Störung der Neurotransmission während der HE erklären.

In dieser Studie konnten wir zudem zeigen, dass 46% des NH_4 -induzierten Ca^{2+} -Anstieg durch die NMDA-R erfolgte. Es wurde bereits gezeigt, dass der NH_4^+ induzierter Tod von Versuchstieren durch Inhibition der NMDA-R verhindert werden konnte (Hermenegildo 1996, Hermenegildo 2000, Hilgier 2004, Llansola 2007, Marcaida 1992). Somit ist wohl die Aussage gerechtfertigt, dass der Ca^{2+} -Anstieg durch die NMDA-R die Kaskaden in Gang setzte, die letztendlich zum Tode der Versuchstiere führten.

Zudem ist es wahrscheinlich, dass eine länger andauernde Hyperammonämie und somit eine längerer andauernde $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung, doch noch zu einer $[Ca^{2+}]_i$ -Überladung der Mitochondrien führt. Wenn in den Mitochondrien Ca^{2+} mit dem Coenzyme Q der Atmungskette interagiert, würde zum einen die Produktion des ATPs abnehmen und zum anderen könnte auch oxidativer Stress entstehen (Grijalba et al 1999, zur Übersicht Kowaltowski et al. 2001).

6. Literaturverzeichnis

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 7(1):41-53
- Agulhon C, Petravicz J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, Casper KB, Fiacco TA, McCarthy KD (2008) What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron.* 59(6):932-46
- Albrecht J and Jones EA (1999) Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J. Neurol. Sci.* **170**:138–146
- Albrecht J and Norenberg MD (2006) Glutamine: A trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 44:788-794
- Alger BE and Nicoll RA (1983) Ammonia does not selectively block IPSPs in rat hippocampal pyramidal cells. *J Neurophysiol.* 49(6):1381-91
- Amédée T, Robert A, Coles JA (1997) Potassium homeostasis and glial energy metabolism. *Glia* 21: 46-55
- Amiry-Moghaddam M and Ottersen O. (2003) The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci.* 4(12):991-1001
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P (1995) Glutamate induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* 15(4):961-73
- Arima H, Yamamoto N, Sobue K, Umenishi F, Tada T, Katsuya H, Asai K. (2003) Hyperosmolar mannitol simulates expression of aquaporins 4 and 9 through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in rat astrocytes. *J Biol Chem.* 278(45):44525-34
- Bai G, Rama Rao KV, Murthy CR, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD (2001) Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res.* 66(5):981-91
- Baker DA, Xi ZX, Shen H, Swanson CJ, Kalivas PW (2002) The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. *J Neurosci.* 22(20):9134-41
- Ballanyi K, Grafe P and ten Bruggencate G (1987) Ion activities and potassium uptake mechanisms of glial cells in guinea-pig olfactory cortex slices. *J Physiol.* 382:159-174
- Ballanyi K and Kettenmann H (1990) Intracellular Na⁺ activity in cultured mouse oligodendrocytes. *J Neurosci Res.* 26(4):455-460

- Balestrino M, Aitken PG and Somjen GG (1986) The effects of moderate changes of extracellular K^+ and Ca^{2+} on synaptic and neural function in the CA1 region of the hippocampal slice. *Brain Res.* 377:229-239
- Ben-Ari Y (2001) Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci.* 24(6):353-60
- Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci.*(9):728-39
- Bender AS and Norenberg MD (1996) Effects of ammonia on Image -glutamate uptake in cultured astrocytes. *Neurochem. Res.* 21:567-573
- Bender AS and Norenberg MD (1998) Effect of benzodiazepines and neurosteroids on ammonia-induced swelling in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* 54:673-680
- Bennett MV, Contreras JE, Bukauskas FF, Sáez JC (2003) New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci.* 26(11):610-7
- Bergeron MJ, Gagnon E, Wallendorff B, Lapointe JY and Isenring P (2003) Ammonium transport and pH regulation by K^+ - Cl^- cotransporters. *Am J Physiol* 285:68-78
- Berridge MJ (1994) The biology and medicine of calcium signalling. *Mol Cell Endocrinol* 98:119-124
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998) Calcium-a life and death signal. *Nature* 395(6703):645-8
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Bio* 1:11-21
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003). Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517-527
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, Volterra A. (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* ;391(6664):281-5
- Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhäuser C, Pilati E, Volterra A (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci.* 7(6):613-20
- Blaustein MP and Golovina VA (2001) Structural complexity and functional diversity of endoplasmic reticulum $Ca(2+)$ stores. *Trends Neurosci.* 24(10):602-8

- Blei AT, Olafsson S, Therrien G, Butterworth RF (1994) Ammonia-induced brain edema and intracranial hypertension in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology*.19(6):1437-44
- Bondareff W and Pysh JJ (1968) Distribution of the extracellular space during postnatal maturation of rat cerebral cortex. *Anat Rec* 4:773-780
- Bradford HF, Ward HK and Foley P (1989) Gluaminase inhibition und the release of neurotransmitter glutamate from synaptosomes. *Brain Res* 476:29-34
- Brookes N (2002) Ammonium ion transport in Astrocytes : Functional implications Neuroglia in the aging brain, Jean De Vellis Humana Press Inc. S. 275-291
- Brusilow SW, Koehler RC, Traystman RJ, Cooper AJ (2010) Astrocyte Glutamine Synthetase: Importance in Hyperammonemic Syndromes and Potential Target for Therapy. *Neurother.* 7:452-470
- Brown AM and Ransom BR (2007) Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* (12):1263-71
- Butt AM and Kalsi A (2006) Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *J Cell Mol Med.* 10(1):33-44
- Butterworth RF (1998) Effects of hyperammonaemia on brain function. *J Inher Metab Dis* 21:6-20
- Butterworth RF (2001) Glutamate transporter and receptor function in disorders of ammonia metabolism. *Res Reviews* 7:276-279
- Butterworth RF (2002) Glutamate transporters in hyperammonemia. *Neurochem Int* 41:81-85
- Camacho A and Massieu L (2006) Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res.* 37(1):11-8
- Capocaccia L and Angelico M (1991) Fulminant hepatic failure. Clinical features, etiology, epidemiology, and current management, *Dig. Dis. Sci.* **36**:775–779
- Carafoli E. (2004) Calcium-mediated cellular signals: a story of failures. *Trends Biochem Sci.* 29(7):371-9
- Carmignoto G and Gómez-Gonzalo M (2010) The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling. *Brain Res Rev.* 63(1-2):138-48
- Catterall WA and Few AP (2008) Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron.* 59(6):882-901

- Chalmers S and Nicholls DG (2003) The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *J Biol Chem.* 278(21):19062-70
- Chatton JY, Marquet P, Magistretti PJ (2000) A quantitative analysis of L-glutamate-regulated Na⁺ dynamics in mouse cortical astrocytes: implications for cellular bioenergetics. *Eur J Neurosci.* 12(11):3843-53
- Chen J, Tan Z, Zeng L, Zhang X, He Y, Gao W, Wu X, Li Y, Bu B, Wang W, Duan S (2013) Heterosynaptic long-term depression mediated by ATP released from astrocytes. *Glia.* 61(2):178-91
- Choi DW (1988 A) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci.* 11(10):465-9
- Choi DW (1988 B) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1(8):623-34
- Choi S, Klingauf J, Tsien RW (2000) Postfusional regulation of cleft glutamate concentration during LTP at 'silent synapses'. *Nat Neurosci.* 3(4):330-6
- Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* 131(6):1047-58
- Clements JD, Lester RA, Tong G, Jahr CE, Westbrook GL (1992) The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science.* 258(5087):1498-501
- Clemmesen JO, Larsen FS, Kondrup J, Hansen BA, Ott P (1999) Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* 29(3):648-53
- Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, Verderio C (2003) Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem.* 278(2):1354-62
- Coles JA and Poulain DA (1991) Extracellular K⁺ in the supraoptic nucleus of the rat during reflex bursting activity by oxytocin neurones. *J Physiol* 439: 383-409
- Cooper A and Plum F (1987) Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol Rev* Vol 67:440-519
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 65(1):1-105
- D'Ambrosio R, Gordon DS and Winn HR (2002) Differential role of KIR channel and Na⁺/K⁺-pump in the regulation of extracellular K⁺ in rat hippocampus. *J Neurophysiol* 87:87-102

- De Knecht RJ, Schalm SW, van der Rijt CCD, Fekkes D, Dalm E and Hekking-Weyma I (1994) Extracellular brain glutamate during acute liver failure and during acute hyperammonemia simulating acute liver failure: An experimental study based on in vivo brain dialysis. *J. Hepatol.* 20:19-26
- Dienel GA and Cruz NF (2003) Neighborly interactions of metabolically-activated astrocytes in vivo. *Neurochem Int.* 43(4-5):339-54
- Dietzel I, Heinemann U and Lux HD (1989) Relations between slow extracellular potential changes, glial potassium buffering, and electrolyte and cellular volume changes during neuronal hyperactivity in cat brain. *Glia* 2:25-44
- Dumas TC (2005) Late postnatal maturation of excitatory synaptic transmission permits adult-like expression of hippocampal-dependent behaviors. *Hippocampus.* 15(5):562-78
- Eduardo E and Benarroch MD (2005) Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin Proc.* 80:1326-1338
- Ehrlich M, Plum F, Duffy TE (1980) Blood and brain ammonia concentrations after portacaval anastomosis. Effects of acute ammonia loading. *J Neurochem.* 34(6):1538-42
- Fan P, Lavoie J, Lé NL, Szerb JC and Butterworth RF (1990) Neurochemical and electrophysiological studies on the inhibitory effect of ammonium ions on synaptic transmission in slices of rat hippocampus: evidence for a postsynaptic action. *J Neurosci* 37:327-334
- Fan P and Szerb JC (1993) Effects of ammonium ions on synaptic transmission and on responses to quisqualate and N-methyl-D-aspartate in hippocampal CA1 pyramidal neurons in vitro. *Brain Res* 632:225-231
- Felipo V and Butterworth R (2002) Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol* 67:259-279
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron.* 43(5):729-43
- Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT (2002) Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology.* 35(3):716-21

- Fiacco TA and McCarthy KD (2004) Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 24(3):722-32
- Filosa JA and Blanco VM (2007) Neurovascular coupling in the mammalian brain. *Exp Physiol.* (4):641-6
- Finkbeiner S and Greenberg ME (1996) Ca²⁺-dependent routes to Ras: mechanisms for neuronal survival, differentiation, and plasticity? *Neuron.* 16(2):233-6
- Fries AW, Dadsetan S, Keiding S, Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS, Simonsen M, Ott P, Vilstrup H, Sørensen M (2014) Effect of glutamine synthetase inhibition on brain and interorgan ammonia metabolism in bile duct ligated rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 34(3):460-6
- Gallo V and Ghiani CA (2000) Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions *Trends in Pharmacological Sciences* 21,7,1:252-258
- Ganda OP and Ruderman NB (1976) Muscle nitrogen metabolism in chronic hepatic insufficiency. *Metabolism* 25(4):427-35
- Ganz R, Swain M, Traber P, DalCanto M, Butterworth RF, Blei AT (1989) Ammonia-Induced Swelling of Rat Cerebral Cortical Slices: Implications for the Pathogenesis of Brain Edema in Acute Hepatic Failure. *Metab Brain Dis.* 4(3):213-23
- Gardner-Medwin AR (1983) Analysis of potassium dynamics in mammalian brain tissue. *J Physiol* 335:393-426
- Geck P and Pfeifer B (1970) Na⁺/K⁺/2 Cl⁻-cotransport in animal cells - its role in volume regulation. *Ann NY Acad Sci* 456:166-182
- Gelebart P, Opas M, Michalak M. (2005) Calreticulin, a Ca²⁺-binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol.*37(2):260-6
- Giaume C and Theis M (2010) Pharmacological and genetic approaches to study connexin-mediated channels in glial cells of the central nervous system. *Brain Res Rev* 63:160-176
- Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. (2010) Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions *Nat Rev Neurosci* 2010; 11(2): 87-99
- Gibbs ME, Hutchinson D, Hertz L (2008) Astrocytic involvement in learning and memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev.* 32(5):927-44

- Görg, B., Morwinsky, A., Keitel, V., Schrör, K. und Häussinger, D. (2010): Ammonia triggers exocytotic release of L-glutamate from cultured rat astrocytes. *Glia* 58:691-705
- Golovina VA and Blaustein MP (2000) Unloading and refilling of two classes of spatially resolved endoplasmic reticulum Ca(2+) stores in astrocytes. *Glia*. 31(1):15-28
- Gordon GR, Mulligan SJ, MacVicar BA (2007) Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia* 55(12):1214-21
- Gordon GR, Choi HB, Rungta RL, Ellis-Davies GC, MacVicar BA (2008) Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* 456(7223):745-9
- Grijalba MT, Vercesi AE, Schreier (1999) Ca²⁺-induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca²⁺-stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. *Biochemistry* 38(40):13279-87
- Haack N (2010) Einfluss von Ammonium auf die extrazelluläre Kaliumhomöostase im Hippocampus. Diplomarbeit Institut für Neurobiologie der Heinrich-Heine-Universität
- Haas M (1989) Properties and diversity of (Na-K-Cl) cotransporters. *Annu Rev Physiol* 51:443-457
- Haas M and Forbush B (1998) The Na-K-Cl cotransporters. *J Bioen Biomemb* 30:161-172
- Häussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F and Dahl S (2000) Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J Hepatol* 32:1035-1038
- Häussinger D and Schliess F (2005) Astrocyte swelling and protein tyrosine nitration in hepatic encephalopathy. *Neurochem Int* 47. 1-2:64-70
- Häussinger D and Schliess F (2008) Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut* 57: 1156-1165
- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG (2007) The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med*. 13(2):54-63
- Hamberger A, Hedquist B and Nyström B (1979) Ammonium ion inhibition of evoked release of endogenous glutamate from hippocampal slices. *J. Neurochem.* **33**:1295-1302
- Hamilton SL (2005) Ryanodine receptors. *Cell Calcium* 38(3-4):253-60

- Hamilton NB and Attwell D (2010) Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat Rev Neurosci.* 11(4):227-38
- Hansson E, Muyderman H, Leonova J, Allansson L, Sinclair J, Blomstrand F, Thorlin T, Nilsson M, Rönnbäck L (2000) Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. *Neurochem Int.* 37(2-3):317-29
- Hansson MJ, Månsson R, Morota S, Uchino H, Kallur T, Sumi T, Ishii N, Shimazu M, Keep MF, Jegorov A, Elmér E (2008) Calcium-induced generation of reactive oxygen species in brain mitochondria is mediated by permeability transition. *Free Radic Biol Med.* 45(3):284-94
- Haydon PG (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2(3):185-93
- Haydon PG, Carmignoto G (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev.* 86(3):1009-31
- Heinemann U and Lux HD (1975) Undershoots following stimulus-induced rises of extracellular potassium concentration in cerebral cortex of cat. *Brain Res* 1:63-76
- Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA (2010) Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature.* 463(7278):232-6
- Herman MA and Jahr CE (2007) Extracellular glutamate concentration in hippocampal slice. *J Neurosci.* 27(36):9736-41
- Hermenegildo C, Marcaida G, Montoliu C, Grisolia S, Miñana MD and Felipo V (1996) NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice. *Neurochem. Res.* 21:1237-1244
- Hermenegildo C, Monfort P and Felipo V (2000) Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: characterization by in vivo brain microdialysis. *Hepatology* 31(3):709-715
- Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR (1999) Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res.* 57(4):417-28
- Hilgard P and Gerken G (2004) Hepatische Enzephalopathie. *Med Klin* 99: 591–602
- Hilgier W, Oja SS, Saransaari P and Albrecht J (2004) A novel glycine site-specific N-methyl-d-aspartate receptor antagonist prevents activation of the NMDA/NO/cGMP pathway by ammonia, *Brain Res.* 1015:186–188
- Hindfelt B, Plum F, and Duffy TE (1977) Effect of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portacaval shunts. *J Clin Invest.* 59(3):386-96

- Holmin T and Siesjö BK (1974) The effect of porta-caval anastomosis upon the energy state and upon acid-base parameters of the rat brain. *J Neurochem.* 22(3):403-12
- Jalan R, Olde Damink SW, Hayes PC, Deutz NE, Lee A (2004) Pathogenesis of intracranial hypertension in acute liver failure: inflammation, ammonia and cerebral blood flow. *J Hepatol* 41:613-620
- Jayakumar AR, Rama Rao KV, Schousboe A, Norenberg MD (2004) Glutamine induced free radical production in cultured astrocytes. *Glia* 46:296-301
- Jayakumar AR, Rama Rao KV, Murthy RK, Norenberg MD (2006 A) Glutamine in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Neurochem Int* 48:623-628
- Jayakumar AR, Panickar KS, Murthy ChR, Norenberg MD (2006 B) Oxidative stress and mitogen-activated protein kinase phosphorylation mediate ammonia-induced cell swelling and glutamate uptake inhibition in cultured astrocytes. *J Neurosci.* 26(18):4774-84
- Jayakumar AR, Liu M, Moriyama M, Ramakrishnan R, Forbush B, Reddy PV and Norenberg MD (2008) Na-K-Cl cotransporter-1 in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *J Biol Chem* 283:33874-33882
- Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nature Neurosci* 10:331-339
- Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G (1998) Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study *Glia* 23(1): 1-10
- Kahlert S and Reiser G (2002) Swelling of mitochondria in cultured rat hippocampal astrocytes is induced by high cytosolic Ca²⁺ load, but not by mitochondrial depolarization. *FEBS Lett.* 529(2-3):351-5
- Kala G, Kumarathasan R, Peng L, Leenen FH, Hertz L (2000) Stimulation of Na⁺,K⁺-ATPase activity, increase in potassium uptake, and enhanced production of ouabain-like compounds in ammonia-treated mouse astrocytes. *Neurochem Int* 36:203-211
- Kelly T and Church J (2005) The weak bases NH₃ and trimethylamine inhibit the medium and slow afterhyperpolarizations in rat CA1 pyramidal neurons. *Pflugers Arch* 451:418-427

- Kelly T, Kafitz KW, Roderigo C and Rose CR (2009) Ammonium-evoked alterations in intracellular sodium and pH reduce glial glutamate transport activity. *Glia*. 57(9):921-934
- Kelly T and Rose CR (2010): Intra- und extrazelluläre Ionenverschiebungen bei hepatischer Enzephalopathie und ihre funktionellen Folgen. Invited Review. *Neuroforum (Organ der Neurowiss. Gesellschaft): Volume 02/2010*
- Kirischuk S, Parpura V, Verkhratsky A (2012) Sodium dynamics: another key to astroglial excitability? *Trends Neurosci* 35:497-506
- Koch Daniel (2011) Mechanismen Ammonium-induzierter extrazellulärer Kalium-Änderungen im Hippocampus der Maus. Diplomarbeit Institut für Neurobiologie der Heinrich-Heine-Universität.
- Kofuji P and Newman EA (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129:1043-1054
- Kojima S, Nakamura T, Nidaira T, Nakamura K, Ooashi N, Ito E, Watase K, Tanaka K, Wada K, Kudo Y, Miyakawa H (1999) Optical detection of synaptically induced glutamate transport in hippocampal slices. *J Neurosci*. 19(7):2580-8
- Kosenko E, Kaminsky YG, Felipo V, Miñana MD, Grisolia S (1993) Chronic hyperammonemia prevents changes in brain energy and ammonia metabolites induced by acute ammonium intoxication. *Biochim Biophys Acta*. 1180(3):321-326
- Kosenko E, Kaminsky Y, Grau E, Miñana MD, Marcaida G, Grisolia S, Felipo V (1994) Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. *J Neurochem*. 63(6):2172-8
- Kosenko E, Kaminsky Y, Kaminsky A, Valencia M, Lee L, Hermenegildo C, Felipo V (1997) Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. *Free Radic Res*. 27(6):637-44
- Kosenko E, Llansola M, Montoliu C, Monfort P, Rodrigo R, Hernandez-Viadel M, Erceg S, Sánchez-Perez AM, Felipo V (2003) Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide, *Neurochem Int*. 43(4–5): 493-499
- Kostyuk P and Verkhratsky A (1994) Calcium stores in neurons and glia. *Neuroscience* 63(2):381-404
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE (2001) Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett*. 495(1-2):12-5

- Kozlov AS, Angulo MC, Audinat E, Charpak S (2006) Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes Proc Natl Acad Sci USA 103(26):10058-63
- Kreisman NR and Smith ML (1993) Potassium-induced changes in excitability in the hippocampal CA1 region of immature and adult rats. Brain Res Dev Brain Res 76:67-73
- Kundra A, Jain A, Banga A, Bajaj G, Kar P (2005) Evaluation of plasma ammonia levels in patients with acute liver failure and chronic liver disease and its correlation with the severity of hepatic encephalopathy and clinical features of raised intracranial tension. Clin Biochem. 38(8):696-9
- Lalo U, Pankratov Y, Kirchhoff F, North RA, Verkhratsky A. (2006) NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. J Neurosci 26:2673-2683
- Lang W, Blöck TM and Zander R (1998) Solubility of NH₃ and apparent pK of NH₄⁺ in human plasma, isotonic salt solutions and water at 37°C. Clin Chim Acta 273: 43-58
- Larsen FS, Adel HB, Pott F, Ejlersen E, Secher NH, Paulson OB, Knudsen EM (1996) Dissociated cerebral vasoparalysis in acute liver failure. A hypothesis of gradual cerebral hyperaemia. J Hepatol 25:145-151
- Latorre R and Miller C (1983). Conduction and selectivity in potassium channels . J. Membr. Biol . 71:11-30
- Lau A and Tymianski M (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. Pflugers Arch. 460(2):525-42
- Lavoie J, Giguère JF, Layrargues GP and Butterworth RF (1987) Amino acid changes in autopsied brain tissue from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. J. Neurochem. 49:692–697
- Lesage F (2003) Pharmacology of neuronal background potassium channels. Neuropharmacology 44:1-7
- Lerma J, Herranz AS, Herreras O, Abaira V, Martín del Río R (1986) In vivo determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis. Brain Res. 384(1):145-55
- Li Z and Sheng M (2003) Some assembly required: the development of neuronal synapses. Nat Rev Mol Cell Biol. 4(11):833-41
- Liu X, Titz S, Lewen A, Misgeld U (2003) KCC2 Mediates NH₄⁺ uptake in cultured rat brain neurons. J Neurophysiol 90:2785-2790

- Llansola M, Rodrigo R, Monfort P, Montoliu C, Kosenko E, Cauli O, Piedrafita B, El Mili N, Felipo V (2007) NMDA receptors in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 22(3-4):321-335
- Loaiza A, Porras OH, Barros LF (2003) Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. *J Neurosci.* 23(19):7337-42
- Lopez T, Lopez-Colome AM, Ortega A (1997) NMDA receptors in cultured radial glia. *FEBS Lett* 405:245-248
- Malcolm JE, Vernon FL, Merrifield AJ, Beatson TR (1959) Fulminating eclampsia treated by hypothermia. *Lancet.* 1(7078):863-4
- Mans AM, Saunders SJ, Kirsch RE and Biebuyck JF (1979) Correlation of plasma and brain amino acid and putative neurotransmitter alterations during acute hepatic coma in the rat. *J. Neurochem* 32(2): 285–292
- Mans AM, DeJoseph MR, Hawkins RA (1994) Metabolic abnormalities and grade of encephalopathy in acute hepatic failure. *J Neurochem* 63:1829-1838
- Marcaggi P and Coles JA (2001) Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. *Prog Neurobiol* 64:157-183
- Marcaida G, Felipo V, Hermenegildo C, Miñana MD and Grisolia S (1992) Acute ammonia toxicity is mediated by the NMDA type of glutamate receptors. *FEBS Lett.* 296:67-68
- Meier SD (2007) Inaugural-Dissertation an der Heinrich-Heine- Universität GABA-induced Ca²⁺ signaling in rat hippocampal astrocytes
- Mena EE and Cotman CW (1985) Pathologic concentrations of ammonium ions block L-glutamate uptake. *Exp. Neurol.* 89:259-260
- Michalak A, Rose C, Butterworth J and Butterworth RF (1996) Neuroactive amino acids and glutamate (NMDA) receptors in frontal cortex of rats with experimental acute liver failure. *Hepatology* 24:908-914
- Michalak M and Opas M (2009) Endoplasmic and sarcoplasmic reticulum in the heart. *Trends Cell Biol.* 19(6):253-9
- Milne MD, Scribner BH and Crawford MA (1958) Non-ionic diffusion and the excretion of weak acids and bases. *Am J Med* 24:709-729

- Miñana MD, Kosenko E, Marcaida G, Hermenegildo C, Montoliu C, Grisolia S, Felipo V (1997) Modulation of glutamine synthesis in cultured astrocytes by nitric oxide. *Cell. Mol. Neurobiol.* 17, 433–445
- Minelli A, Lyons S, Nolte C, Verkhratsky A, Kettenmann H (2000) Ammonium triggers calcium elevation in cultured mouse microglial cells by initiating Ca(2+) release from thapsigargin-sensitive intracellular stores. *Pflugers Arch.* 439(3):370-7
- Monfort P, Kosenko E, Erceg S, Canales JJ, Felipo V (2002 A) Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: role of NMDA receptors. *Neurochem Int* 41:95-102
- Monfort P, Muñoz MD, ElAyadi A, Kosenko E, Felipo V (2002 B) Effects of hyperammonemia and liver failure on glutamatergic neurotransmission. *Metab Brain Dis.* 17(4): 237-250
- Montana V, Ni Y, Sunjara V, Hua X, Parpura V (2004) Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci.* 24(11):2633-42
- Moroni F, Lombardi G, Moneti G and Cortesini C (1983) The release and neosynthesis of glutamic acid are increased in experimental models of hepatic encephalopathy. *J. Neurochem.* 40:850-854
- Mort D, Marcaggi P, Grant J, and Attwell D (2001) Effect of acute exposure to ammonia on glutamate transport in glial cells isolated from the salamander retina. *J Neurophys* 86:836-844
- Moser H (1987) Electrophysiological evidence for ammonium as a substitute for potassium in activating the sodium pump in a crayfish sensory neuron. *Can J Physiol Pharmacol.* 65:141-145
- Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G (2005) Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(15):5606-11
- Murthy CR, Rama Rao KV, Bai G, Norenberg MD (2001) Ammonia induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res.* 66(2):282-8
- Murthy CR and Norenberg MD (2002) Suppression of ammonia-induced swelling by aspartate but not by ornithine in primary cultures of rat astrocytes. *Neurochem Int.* 41(2-3):171-6
- Nagaraja TN and Brookes N (1998) Intracellular acidification induced by passive and active transport of ammonium ions in astrocytes. *J Physiol Cell Physiol* 274:883-891

- Nagelhus EA, Mathiisen TM, Ottersen OP (2004) Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience*. 129(4):905-13
- Nagy JI, Dudek FE, Rash JE (2004) Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res Brain Res Rev.* (1-3):191-215
- Norenberg MD (1998) Astroglial dysfunction in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 13(4):319-35
- Norenberg MD, Baker L, Norenberg LO, Blicharska J, Bruce-Gregorios JH, Neary JT (1991) Ammonia-induced astrocyte swelling in primary culture. *Neurochem Res* 16:833-836
- Norenberg MD, Rama Rao KV, Jayakumar AR (2008) Signalling factors in the mechanism of ammonia neurotoxicity. *Metab Brain Dis.* 2009 Mar;24(1):103-17
- Norenberg MD, Rama Rao KV, Jayakumar AR (2009) Signaling factors in the mechanism of ammonia neurotoxicity. *Metab Brain Dis* 24:103-117
- Nyitrai G, Kékesi KA, Juhász G (2006) Extracellular level of GABA and Glu: in vivo microdialysis-HPLC measurements. *Curr Top Med Chem.* 6(10):935-40
- Oliet SH and Mothet JP (2006) Molecular determinants of D-serine-mediated gliotransmission: from release to function. *Glia.* 54(7):726-37
- Olney JW (1971) Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 30(1):75-90
- Ong JP, Aggarwal A, Krieger D, Easley KA, Karafa MT, Van Lente F, Arroliga AC, Mullen KD (2003) Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *Am J Med.* 114(3):188-93
- Oppong KNW, Bartlett K, Record CO and Mardini HA (1995) Synaptosomal glutamate transport in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. *Hepatology* 22:553-558
- Orkand RK, Nicholls JG and Kuffler SW (1966) Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of Amphibia. *J Neurophysiol* 29:788–806
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(7):552-65
- Ott P and Larsen FS (2004) Blood–brain barrier permeability to ammonia in liver failure: a critical reappraisal. *Neurochem Int* 44:185-198

- Pan CF, Zhu SM, Zheng YY (2010) Ammonia induces upregulation of aquaporin-4 in neocortical astrocytes of rats through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Chin Med J* 123(14):1888-92
- Panatier A, Vallée J, Haber M, Murai KK, Lacaille JC, Robitaille R (2011) Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell*. 146(5):785-98
- Pappas CA and Ransom BR (1994) Depolarization-induced alkalization (DIA) in rat hippocampal astrocytes. *J Neurophysiol* 72:2816-2826
- Parpura V and Zorec R (2010) Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev.* (1-2):83-92
- Payne JA, Stevenson TJ, and Donaldson LF (1996) Molecular characterization of a putative K-Cl⁻ cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J Biol Chem* 271:16245-16252
- Pellerin L and Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(22):10625-9
- Pellerin L and Magistretti PJ (2012) Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab.* 32(7):1152-66
- Peng TI and Jou MJ (2010) Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann N Y Acad Sci.* 1201:183-8
- Perea G and Araque A (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*. 317(5841):1083-6
- Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32(8):421-31
- Peter O and Hendrik V (2014) Cerebral effects of ammonia in liver disease: current hypotheses. *Metabolic Brain Disease* Feb, 1-11
- Phear EA, Sherlock S, Summerskill WHJ (1955) Blood-ammonium levels in liver disease and hepatic coma. *Lancet* 7, 836-840
- Phelps ME, Hoffmann EJ and Raybaud C (1977) Factors which affect cerebral uptake and retention of ¹³NH₃. *Stroke* 8: 694-702
- Porrás OH, Ruminot I, Loaiza A, Barros LF (2008) Na⁺-Ca²⁺ cosignaling in the stimulation of the glucose transporter GLUT1 in cultured astrocytes. *Glia*. 56(1):59-68
- Porter JT and McCarthy KD (1995) GFAP-Positive Hippocampal Astrocytes In Situ Respond to Glutamatergic Neuroligands With Increases in [Ca²⁺], *Glia* 13:101-112

- Porter JT and McCarthy KD (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol.* 51(4):439-55
- Provent P, Kickler N, Barbier EL, Bergerot A, Farion R, Goury S, Marcaggi P, Segebarth C, Coles JA (2007) The ammonium-induced increase in rat brain lactate concentration is rapid and reversible and is compatible with trafficking and signaling roles for ammonium. *J Cereb Blood Flow Metab* 27(11):1830-40
- Pschyrembel klinisches Wörterbuch (2002) 259 Auflage, Berlin de Gruyter
- Putney JW (2003) Capacitative calcium entry in the nervous system. *Cell Calcium* 34:339-344
- Putney JW (2009) Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunol Rev* 231:10-22
- Putney JW (2011) The physiological function of store-operated calcium entry. *Neurochem Res* 36:1157-1165
- Pysh JJ (1969) The development of the extracellular space in neonatal rat inferior colliculus: an electron microscopic study. *Am J Anat.* 124(4):411-429
- Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg DM (2003) Ammonia neurotoxicity: role of the mitochondrial permeability transition. *Metab Brain Dis.* 18(2):113-27
- Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg MD (2005) Differential response of glutamine in cultured neurons and astrocytes. *J Neurosci Res* 79:193-199
- Rama Rao KV and Norenberg MD (2007) Aquaporin-4 in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 22(3-4):265-75
- Ransom BR (2004) Gap junctions 19: 299. *Neuroglia Kettenmann*, Oxford University Press
- Rao KV, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD (2005) Astrocytes protect neurons from ammonia toxicity. *Neurochem Res.* 30(10):1311-8
- Ratnakumari L, Qureshi IA, Butterworth RF (1994) Regional amino acid neurotransmitter changes in brains of spf/Y mice with congenital ornithine transcarbamylase deficiency. *Metab Brain Dis* 9(1):43-51
- Reddy PV, Murthy ChR, Reddanna P (2004) Fulminant hepatic failure induced oxidative stress in nonsynaptic mitochondria of cerebral cortex in rats. *Neurosci Lett.* 368(1):15-20
- Rodrigo R, Cauli O, Boix J, ElMlili N, Agusti A and Felipe V (2009) Role of NMDA receptors in acute liver failure and ammonia toxicity: Therapeutical implications. *Neurochemistry International.* 55:113-118

- Rojas H, Colina C, Ramos M, Benaim G, Jaffe EH, Caputo C, DiPolo R (2007) Na⁺ entry via glutamate transporter activates the reverse Na⁺/Ca²⁺ exchange and triggers Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in rat cerebellar Type-1 astrocytes. *J Neurochem.* 100(5):1188-202
- Rose C (2002) Increased extracellular brain glutamate in acute liver failure: decreased uptake or increased release? *Metabolic Brain Disease* 17: 251-261
- Rose C, Kresse W, Kettenmann H (2005) Acute insult of ammonia leads to calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes, an effect of pH. *Journal of biological chemistry*, 280: 20937-20944
- Rose CR (1997): Intracellular Na⁺ regulation in neurons and glia: Functional implications. *The Neuroscientist* 3:85-88
- Rose CR and Karus C (2013) Two sides of the same coin: sodium homeostasis and signaling in astrocytes under physiological and pathophysiological conditions. *Glia* 61:1191-1205
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16(3):675-86
- Russell JM (2000) Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev* 80:211-276
- Sáez JC, Contreras JE, Bukauskas FF, Retamal MA, Bennett MV (2003) Gap junction hemichannels in astrocytes of the CNS. *Acta Physiol Scand.* 179(1):9-22
- Saparov SM, Liu K, Agre P, Pohl P (2007) Fast and selective ammonia transport by aquaporin-8. *J Biol Chem.* 282(8):5296-5301
- Sathyasaikumar KV, Swapna I, Reddy PV, Murthy ChR, Dutta Gupta A, Senthilkumaran B, Reddanna P (2007) Fulminant hepatic failure in rats induces oxidative stress differentially in cerebral cortex, cerebellum and pons medulla. *Neurochem Res.* 32(3):517-24
- Scemes E and Spray DC (2012) Extracellular K⁺ and astrocyte signaling via connexin and pannexin channels. *Neurochem Res.* 37(11):2310-6
- Schellinger PD, Hartmann MK, Klingmann Ch, Meinck HM (2003) Hepatische Enzephalopathie. *Der Nervenarzt* 74(12): 1078-1087
- Schipke CG, Ohlemeyer C, Matyash M, Nolte C, Kettenmann H, Kirchhoff F (2001) Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *FASEB J* 15:1270-1272

- Schliess F, Görg B, Fischer R, Desjardins P, Bidmon H, Herrmann A, Butterworth R, Zilles K and Häussinger D (2002) Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J* 16(7):739-741
- Schmidt W, Wolf G, Grungreiff K, Meier M, Reum T (1990) Hepatic encephalopathy influences high-affinity uptake of transmitter glutamate and aspartate into the hippocampal formation. *Metab Brain Dis* 5:19-31
- Schomberg SL, Su G, Haworth RA, Sun D (2001) Stimulation of Na-K-2Cl Cotransporter in neurons by activation of non-NMDA ionotropic receptor and group-I mGluRs. *J Neurophysiol* 85:2563-2575
- Schousboe A, Sonnewald U, Civenni G, Gegelashvili G (1997) Role of astrocytes in glutamate homeostasis Implications for excitotoxicity. *Adv Exp Med Biol.* 429:195-206
- Serrano A, Robitaille R, Lacaille JC (2008) Differential NMDA-dependent activation of glial cells in mouse hippocampus. *Glia* 56:1648-1663
- Shelton MK and McCarthy KD (1999) Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors in situ. *Glia* 26(1):1-11
- Simard M and Nedergaard M (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *J Neurosci* 129:877-896
- Steinhäuser C and Gallo V (1996) News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci* 19:339-345
- Stephan J, Haack N, Kafitz KW, Durry S, Koch D, Hochstrate P, Seifert G, Steinhäuser C, Rose CR (2012) Kir4.1 channels mediate a depolarization of hippocampal astrocytes under hyperammonemic conditions in situ. *Glia* 60(6):965-78
- Su G, Haworth RA, Dempsey RJ and Sun D (2000) Regulation of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter in primary astrocytes by dibutyryl cAMP and high [K⁺]_o. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:1710-1721
- Su G, Kintner DB and Sun D (2002) Contribution of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter to high-[K⁺]_o-induced swelling and EAA release in astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:1136-1146
- Subbalakshmi GY and Murthy CR (1983) Acute metabolic effects of ammonia on the enzymes of glutamate metabolism in isolated astroglial cells. *Neurochem Int.* 5(5):593-7

- Suzuki K, Matsuo N, Moriguchi T, Takeyama N, Kitazawa Y, Tanaka T (1992). Changes in brain ECF amino acids in rats with experimentally induced hyperammonemia. *Metab Brain Dis* 7:63-75
- Swain MS, Blei AT, Butterworth RF and Kraig RP (1991) Intracellular pH rises and astrocytes swell after portacaval anastomosis in rats. *Am. J. Physiol.* 261:1491–1496
- Swain M, Butterworth RF, Blei AT (1992 A) Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology* 15:449-453
- Swain MS, Bergeron M, Audet R, Blei AT, Butterworth RF (1992 B) Monitoring of neurotransmitter amino acids by means of an indwelling cisterna magna catheter: a comparison of two rodent models of fulminant liver failure. *Hepatology* 16:1028-1035
- Syková E, Mazel T and Simonová Z. (1998) Diffusion constraints and neuron-glia interaction during aging. *Exp Gerontol* 33(7-8):837-51
- Syková E and Nicholson C (2008) Diffusion in brain extracellular space. *Physiol Rev* 88(4):1277-1340
- Szatkowski M, Barbour B and Attwell D (1990) Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* 348:443-446
- Szerb J and Butterworth R (1992) Effect of ammonium ion on synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 39: 135-153
- Talley EM, Solorzano G, Lei Q, Kim D and Bayliss DA (2001) CNS distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci* 21:7491–7505
- Takahashi H, Koehler RC, Brusilow SW, Traystman RJ (1991) Inhibition of brain glutamine accumulation prevents cerebral edema in hyperammonemic rats. *Am J Physiol* 261:H825-829
- Takahashi S, Driscoll BF, Law MJ and Sokoloff L (1995) Role of sodium and potassium ions in regulation of glucose metabolism in cultured astroglia. *Neurobiology Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4616-4620
- Tanigami H, Rebel A, Martin LJ, Chen TY, Brusilow SW, Traystman RJ, Koehler RC (2005) Effect of glutamine synthetase inhibition on astrocyte swelling and altered astroglial protein expression during hyperammonemia in rats. *Neuroscience* 131:437-449

- Titz S, Hormuzdi S, Lewen A, Monyer H and Misgeld U (2006) Intracellular acidification in neurons induced by ammonium depends on KCC2 function. *Eur J Neurosci* 23(2):454-464
- Tossman U, Delin A, Eriksson LS, Ungerstedt U (1987). Brain cortical amino acids measured by intracerebral dialysis in portocaval shunted rats. *Neurochem Res* 12:265-269
- Traber TG, Dal Canto MC, Ganger T, Blei AT (1987) Electron microscopic evaluation of brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant hepatic failure: ultrastructure and integrity of the blood-brain barrier. *Hepatology* 7:1272-1277
- Tzingounis AV and Wadiche JI (2007) Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci.* 8(12):935-47
- Vaca L (2010) SOCIC: the store-operated calcium influx complex. *Cell Calcium* 47:199-209
- Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA (1997) Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21(1):2-21
- Vaquero J, Chung C, Blei AT (2003) Brain edema in acute liver failure. A window to the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Ann Hepatol* 2:12-22
- Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev.*78(1):99-141
- Verkhratsky A and Kirchhoff F (2007) NMDA Receptors in Glia. *Neuroscientist* 13:28-37
- Verkhratsky A and Steinhäuser C (2008) Full-length review: Ion channels in glial cells. *Brain Research Reviews* 32:380–412
- Volterra A and Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci.* 6(8):626-40
- Voskuyl RA and ter Keurs HE (1981) Modification of neuronal activity in olfactory cortex slices by extracellular K⁺. *Brain Res* 230:372-377
- Wallraff A, Köhling R, Heinemann U, Theis M, Willecke K, Steinhäuser C (2006) The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci* 26(20):5438-5447
- Walz W and Hertz L (1983) Intracellular ion changes of astrocytes in response to extracellular potassium. *J Neurosci Res.* 10(4):411-23
- Walz W (1992) Mechanism of rapid K⁽⁺⁾-induced swelling of mouse astrocytes. *Neurosci Lett.* 135(2):243-6

- Walz W (2000) Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int* 36:291-300
- Watanabe A, Takei N and Higashi T (1984) Glutamic acid and glutamine levels in serum and cerebrospinal fluid in hepatic encephalopathy. *Biochem. Med.* 32:225-231
- Wettschureck N and Offermanns S (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev.* 85(4):1159-204
- Williams JR and Payne JA (2004) Cation transport by the neuronal K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2: thermodynamics and kinetics of alternate transport modes *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287:C919-C931
- Willard-Mack CL, Koehler RC, Hirata T, Cork LC, Takahashi H, Traystman RJ, Brusilow SW (1996) Inhibition of glutamine synthetase reduces ammonia-induced astrocyte swelling in rat. *Neuroscience* 71:589-599
- Xu G, Wang W, Kimelberg HK, Zhou M (2010) Electrical coupling of astrocytes in rat hippocampal slices under physiological and simulated ischemic conditions. *Glia* 58:481-493
- Yan Y, Dempsey RJ, Flemmer A, Forbush B and Sun D (2003) Inhibition of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter during focal cerebral ischemia decreases edema and neuronal damage. *Brain Res* 961:22-31
- Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, Poo M, Duan S (2003) Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(25):15194-9
- Yarowsky P, Boyne AF, Wierwille R, and Brookes N (1986) Effect of monensin on deoxyglucose uptake in cultured astrocytes: energy metabolism is coupled to sodium entry. *J Neurosci* 6:859-66
- Zerangue N and Kavanaugh MP (1996) Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 383(6601):634-7
- Zieve L (1987) Pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 2(3):147-65
- Zelenina M (2010) Regulation of brain aquaporins. *Neurochem Int.* (4):468-88
- Zwingmann C, Chatauret N, Rose C, Leibfritz D, Butterworth RF (2004) Selective alterations of brain osmolytes in acute liver failure: protective effect of mild hypothermia. *Brain Res* 999:118-12

Danksagung

Zum Abschluss möchte ich mich noch bedanken. Die Reihenfolge stellt keine abgestufte Wertschätzung dar, nur irgendwo muss man ja anfangen.

Besonders dankbar bin ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. C.R. Rose, für das konstruktive und motivierende Feedback während der Meetings und für die Unterstützung, während der Entstehung der drei Veröffentlichungen.

Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr. Thomas Klein, der sich bereit erklärt hat für meine Dissertation als Zweitgutachter zu fungieren.

Danke auch an den DFG für die Finanzierung des Projektes

Ein „Danke“ schulde ich auch vielen Menschen aus dem Labor.

Herrn Dr. Peter Hochstrate, der immer wieder mit seinem scharfen Sinn Fragen findet, die es zu beantworten gilt. Peter, Julia und Niklas muss ich danken, dass Sie sich bereit erklärt haben meine Dissertation Probe zu lesen.

Danke, Simone Durry und Claudia Roderigo für all die kleinen und großen Dinge, die ihr mir abgenommen habt und für den technischen Support.

Danke an den HE-Club und Jonathan Stephan, mit dem das erste Paper entstand.

Für die freundliche Atmosphäre die ein Leben im Labor einfacher macht möchte ich auch, Karl, Christian, Claudia, Miguel, Dirk, Behrouz, Daniel und Pavel, danken.

Ein großes „Danke“ geht auch an Eric und Patrick, die mir gezeigt haben, dass noch ein Leben neben der Arbeit existiert. Ich kann mir keinen besseren Büro-Mitbewohner vorstellen als Eric, der nicht nur Arbeitskollege sondern ein richtig guter Freund wurde. Patrick war in den letzten Phasen dieser Arbeit unermüdlich wenn es darum ging mich zu beruhigen.

Abschließend möchte ich meiner Mama, Gabriele Haack, danken. Da hier kein Danke ausreicht für all das was sie für mich getan hat, widme ich diese Arbeit meiner Mama.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellt worden ist.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 20.05.2014