

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Herr Prof. Dr. D. Häussinger

**Die hepatische Enzephalopathie als Funktionsstörung der Astrozyten:
Identifikation osmo- und ammoniumregulierter Gene
mittels differentieller mRNA-Analyse**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Sabine Kreuels

2005

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht unter dem Titel:

„Identification of osmosensitive and ammonia-regulated genes in rat astrocytes by Northern blotting and differential display reverse transcriptase-polymerase chain reaction“

Warskulat U, Kreuels S, Müller HW, Häussinger D.

Journal of Hepatology, 2001, 35: 358-366

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. W.H.M. Raab

Referent: Priv. Doz. Dr. rer.nat. U. Warskulat

Koreferent: Prof. Dr. D. Simon

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	Seite
I.1)	<i>Pathogenese der Leberzirrhose und der hepatischen Enzephalopathie</i>	4
I.2)	<i>Die Bedeutung der Astrozyten im Rahmen der hepatischen Enzephalopathie</i>	6
I.3)	<i>Entwicklung der Methode und Zielsetzung der Arbeit</i>	8
II.	Material und Methoden	
II.1)	<i>Materialien</i>	10
II.2	<i>Präparation und Kultivierung von Astrozyten aus der Ratte</i>	10
II.3)	<i>Isolierung von Gesamt-RNA aus Astrozyten</i>	11
II.4	<i>Differentielle mRNA-Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (DDRT-PCR)</i>	11
II.4.a)	<i>Reverse Transkription</i>	11
II.4.b)	<i>DNA-Amplifikation mittels PCR</i>	13
II.4.c)	<i>Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten in Polyacrylamidgelen</i>	15
II.4.d	<i>Silberfärbung von DNA in Polyacrylamidgelen</i>	15
II.5)	<i>Elution differentieller cDNA-Fragmente</i>	15
II.6)	<i>Reamplifizierung von geeluierten cDNA-Fragmenten</i>	16
II.7)	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	16
II.8)	<i>Aufreinigung von PCR-Produkten mittels Millipore-Ultrafiltration</i>	16
II.9)	<i>Klonierung von reamplifizierter DNA</i>	17
II.10)	<i>Selektion und Anzucht von Bakterienkolonien</i>	19
II.11)	<i>Präparation von Plasmid-DNA</i>	19
II.12)	<i>Restriktionsendonukleaseverdau von DNA</i>	19
II.13)	<i>Enzymatische Sequenzierung von DNA</i>	19
II.14)	<i>Datenbankrecherche</i>	20
II.15)	<i>Northern-Blot-Analyse</i>	20
II.16)	<i>Statistik</i>	21

III. Ergebnisse	
III.1) <i>Differentielle mRNA-Analyse zur Identifikation osmo- und ammoniumregulierter Gene in primären Astrozyten</i>	22
III.1.1) <i>Expression von RNA-Transkripten für Elongin A</i>	25
III.1.2) <i>Expression von RNA-Transkripten für Clusterin</i>	28
III.1.3) <i>Expression von RNA-Transkripten für kelch motif containing protein (KMCP)</i>	30
III.1.4) <i>Expression von RNA-Transkripten für prolin rich protein expressed in brain (PRPB)</i>	33
IV. Diskussion	35
V. Zusammenfassung	39
VI. Literaturverzeichnis	40
VII. Anhang	46
VIII. Abkürzungen	49
IX. Danksagung	51
X. Lebenslauf	52
XI. Zusammenfassung (Abstract)	53

I. EINLEITUNG

Die Leberzirrhose als Folgezustand verschiedener chronischer Lebererkrankungen ist mit einer Inzidenz von etwa 250/100.000/Jahr ein sehr häufiges und sozialmedizinisch bedeutsames Krankheitsbild (<1>). Allein in Deutschland leiden etwa 1,5 bis 2,5 Millionen Menschen an chronischen Lebererkrankungen; ca. 1 Millionen befinden sich im Endstadium der Erkrankung, der Leberzirrhose. Vergesellschaftet mit der fortschreitenden Leberzirrhose sind Veränderungen des zentralen Nervensystems, das heißt Veränderungen der Persönlichkeit und zerebralen Leistungsfähigkeit, zusammengefasst unter dem Begriff der hepatischen Enzephalopathie (HE).

I.1) Pathogenese der Leberzirrhose und der hepatischen Enzephalopathie

Morphologisches Korrelat der Leberzirrhose ist der Untergang des Leberzellgewebes im Sinne von Reduktion und Umstrukturierung funktionsfähigen Leberparenchyms. Auslöser ist eine kontinuierlich fortschreitende Zellnekrose, welche zur Entstehung diffuser Vernarbungsprozesse führt. Es bilden sich bindegewebige Septen und Regeneratknoten, die schließlich auch die vaskuläre und lobuläre Architektur der Leber zerstören.

Pathogenetisch sind eine Vielzahl schädigender Agentien bekannt, die diese progrediente Leberzellnekrose herbeiführen können: Chronischer Alkoholabusus, Infektionen mit hepatotropen Viren (Hepatitis-B-, Hepatitis-C-Virus, Delta-Virus), biliäre Erkrankungen, Autoimmun- oder Stoffwechselerkrankungen, aber auch Toxine (zu denen neben Giftstoffen auch zahlreiche Medikamente gehören). Hauptursache für die Entstehung einer Leberzirrhose ist in den Entwicklungsländern der chronische Verlauf einer Hepatitis-B-Infektion. In den Industrienationen ist zu 80 % der Fälle Alkoholabusus das auslösende Agens; ca. 190 der 250/100.000 jährlich neu auftretenden Fälle von Leberzirrhose sind ethyltoxischer Genese (<2>). Unter Abusus versteht man den langjährigen Konsum von mehr als 40 g (Männer) bzw. 20g (Frauen) reinem Alkohol/Tag. 40 g reiner Alkohol entsprechen bereits 1,0 l Bier bzw. 0,4 l Wein. Nach 20 Jahren regelmässigen Alkoholkonsums befinden sich 50 % der Menschen im irreversiblen Stadium der Erkrankung, der Leberzirrhose (<3>).

Funktionell bedeutet die Leberzirrhose sowohl einen parenchymatösen als auch einen zirkulatorischen Funktionsverlust. Die parenchymatöse Insuffizienz bedingt eine

unzureichende Synthese respektive einen ungenügenden Abbau der in der Leber verstoffwechselten Substanzen. Klinisch manifest wird dies z.B. durch eine veränderte Fettverteilung aufgrund des verminderten Steroidabbaus, durch vermehrte Blutungsneigung aufgrund fehlender Synthese von Gerinnungsfaktoren oder durch die Ausbildung eines Ikterus aufgrund von Leberzellnekrosen. Die Zerstörung der vaskulären Architektur der Leber bedingt eine Widerstandserhöhung im portalen Kreislauf. Die portale Hypertension verursacht die Ausbildung von Kollateralkreisläufen; es entstehen Varizen bevorzugt im Bereich des Magens (Corpus-, Fundusvarizen) sowie Ösophagusvarizen. Hieraus können sich weitere Komplikationen entwickeln: Blutungen aus den Kollateralkreisläufen, Splenomegalie, Aszites. Das Lebenszeitrisiko für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms liegt zwischen 25 % bei ethyltoxischer Genese der Zirrhose und 50-55 % bei viraler Ätiologie (<3>).

Die unzureichende Entgiftungsfunktion der Leber manifestiert sich zerebral unter dem Erscheinungsbild der hepatischen Enzephalopathie (HE). Eine Schlüsselrolle spielt hierbei die mangelhafte Ammoniakentgiftung (<4> bis <7>). Aber auch weitere, im Darm entstehende Substanzen wie Mercaptane, Phenole sowie physiologisch vorkommende Stoffe (Fettsäuren, GABA) können von der insuffizienten Leber nicht mehr ausreichend abgebaut bzw. entgiftet werden, überschreiten schließlich die Blut-Hirn-Schranke und wirken im ZNS toxisch (<8>). Desweiteren kommt es zu vermehrter Ausschüttung intrazerebraler Neurotransmitter, vor allem von Serotonin und GABA, sowie zu einem Anstieg an GABA- und Glycinrezeptoren. Dies sowie die Zunahme sogenannter „falscher“ Neurotransmitter (z.B. Oktopamin) werden für die psychischen und neurologischen Symptome verantwortlich gemacht (<6>,<9> bis <12>). Klinisch stellt sich die HE als Störung der Bewusstseinslage sowie der intellektuellen Funktion und des Verhaltens dar (<7>). Ausschlaggebend für die Stadieneinteilung ist das Ausmaß der Vigilanzstörungen sowie der neuromuskulären Veränderungen (*Tabelle 1*).

Grad	Bewusstsein	intellektuelle Funktion	Verhalten / Persönlichkeit	neuromuskuläre Zeichen
0	normal	normal	normal	normal
I	geistesabwesend, Schlafstörungen	verminderte Aufmerksamkeit	Euphorie, Ängstlichkeit	gestörte Handschrift, Tremor
II	Somnolenz	Desorientierung für Zeit und Ort	deutliche Verhaltensstörung	Asterixis, Ataxie, Hyporeflexie
III	Stupor	grobe Desorientierung (zur Person)	massive Persönlichkeitsveränderungen	Hyperreflexie, Rigor, fehlender Babinski-Reflex
IV	Koma	--	--	fehlende Antwort

Tabelle 1:

Stadieneinteilung der HE unter klinischen Gesichtspunkten:

Einteilung der Schweregrade einer hepatischen Enzephalopathie anhand des mentalen Status und neuromuskulärer Zeichen (modifiziert nach <13>)

I.2) Die Bedeutung der Astrozyten im Rahmen der HE

Astrozyten, die Makroform der Neuroglia, sind sternförmige, zur Phagozytose fähige Zellen. Die Verbindung der Astrozyten mit Neuronen und Blutgefäßen dient dem Stoffaustausch. Sie bilden die sogenannte Gliagrenzmembran (*Membrana limitans gliae superficialis et perivascularis*, Blut-Hirn-Schranke). Im Rahmen der Detoxifikation kommt den Astrozyten eine besondere Bedeutung zu: Als einzige Zellpopulation im ZNS sind sie in der Lage, Ammoniak aus dem Plasma aufzunehmen und durch eine ATP abhängige Amidierungsreaktion (Glutamat → Glutamin) zu eliminieren. Die dazu notwendige Glutaminsynthetase ist ausschließlich im endoplasmatischen Retikulum der Astrozyten lokalisiert. Im Rahmen der Leberzirrhose kommt es zur Akkumulation von Ammoniak bzw. Glutamin in den Astrozyten. Glutamin führt zu Störungen der zellulären Homöostase im Sinne einer Astrozytenschwellung und bereits frühzeitig zur Entwicklung eines Hirnödems (<5>, <7>, <10>, <14> bis <18>). Veränderungen des Zellvolumens der Astrozyten werden

jedoch nicht nur durch Glutamin, sondern auch z.B. durch Benzodiazepine oder Hyponatriämie induziert. Diese führen ebenfalls rasch zur Entstehung eines zerebralen Ödems sowie sekundär zu Beeinträchtigungen neuronaler Funktionen (<9>, <10>, <19> bis <26>). Störungen der Zellhydratation, ob durch extrazelluläre Osmolaritätsänderungen oder Akkumulation toxischer Substrate intrazellulär, verändern maßgeblich die Regulation der Zellfunktionen. Dies betrifft nicht nur den Zellstoffwechsel sondern auch die Ebenen der Signaltransduktion und Genexpression (<27> bis <36>).

Die „swelling-Hypothese“ zur Pathogenese der HE besagt, dass sowohl durch die Ammoniakakkumulation als auch zahlreiche weitere Faktoren (s.o.) eine Astrozytenschwellung ausgelöst wird, welche eine Kaskade neuronaler Veränderungen nach sich zieht (<9>, <19>, <37>). So ist beispielsweise die Kommunikation zwischen Astrozyten und Neuronen allein durch die Verringerung des Extrazellulärtraumes im Rahmen der Astrozytenschwellung erheblich erschwert. Tierexperimentelle Untersuchungen belegen die zentrale Bedeutung der Astrozytenschwellung in der Pathogenese der HE (<24>, <27>). Durch Hemmung der Glutaminsynthetase kann die Astrozytenschwellung antagonisiert und die neurologischen Symptome der HE können deutlich reduziert werden (<38> bis <44>).

Histologisch zeigt die Astroglia neben vergrößerten chromatinarmen Kernen und prominenten Nukleoli intranukleäre Glykogeneinschlüsse. Die Schwellung der Astroglia, die man als sogenannte „Alzheimer-II-Glia“ bezeichnet, ist nicht pathognomonisch für die HE. Sie tritt auch im Rahmen anderer Erkrankungen auf (<45>).

Die Fülle der bereits vorliegenden Arbeiten lässt entscheidende Zusammenhänge zwischen Zellschwellung sowie dem Einfluss toxischer Substrate, hier vor allem Ammoniak, auf Abläufe im astrozytären Zellstoffwechsel und die Genexpression vermuten. Das Ausmaß der Auswirkungen von Zellvolumenänderungen auf die Genexpression ist jedoch noch größtenteils ungeklärt.

1.3) Entwicklung der Methode und Zielsetzung der Arbeit

Die Umsetzung genetischer Informationen entscheidet über sämtliche im Organismus ablaufende Vorgänge: Entwicklung und Differenzierung, Homöostase, Reaktionen auf äußere Einflüsse, Alterungsprozesse sowie den natürlichen, den sogenannten programmierten Zelltod (Apoptose) aber auch über pathologische Veränderungen wie z.B. die Entstehung eines Karzinoms. Höhere Organismen besitzen einen Pool von etwa 30.000 verschiedenen Genen, von denen in jeder einzelnen Zelle etwa 15.000 exprimiert werden. Aus diesem Grunde ist die Analyse von Veränderungen der Genexpression in der Zelle von höchstem Interesse für die Erforschung von Erkrankungen.

Bis vor einigen Jahren stand hierfür nur die Methode der subtraktiven oder differentiellen Hybridisierung zur Verfügung (<46> bis <48>). Sie erlaubt jedoch lediglich den Vergleich zwischen zwei Zellspezies und kann auch nur qualitative Unterschiede herausstellen. Dies bedeutet, dass nur untersucht werden kann, ob in der einzelnen Zelle genetische Informationen in Form von mRNA vorliegen, die die andere Zellspezies nicht aufweist. Eine Aussage über das Ausmaß der Genexpression kann man allerdings nicht machen. Die Methode der differentiellen mRNA-Analyse (<49>) ermöglicht nicht nur die Untersuchung aller von einer einzigen Zelle exprimierten mRNA, sondern auch die Erforschung jeglicher Änderungen der Genexpression in einer Zelle, d.h. quantitative Unterschiede z.B. im Zuge zellulärer Prozesse. Liang und Pardee (<49>) gehen davon aus, dass prinzipiell jede mRNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben werden kann und anschließend eine Amplifikation mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*) erfolgen kann. Nach mathematischen Berechnungen zusammengestellte Primerkombinationen werden genutzt, bei denen jedes Primerpaar eine gewisse Chance hat, eine bestimmte Anzahl von Sequenzen in dem Pool von cDNA zu identifizieren. Ein solches Primerpaar besteht immer aus einem sogenannten 3'-Primer, der in typischer Weise an die Poly-A-Sequenz der mRNA bindet und einem 5'-Primer, welcher in unterschiedlicher Entfernung zum 3'-Primer bindet. So entstehen verschieden lange cDNA-Stücke, die elektrophoretisch aufgetrennt werden können. Die Methode der differentiellen mRNA-Analyse wurde modifiziert und erweitert zur *differential display reverse transkriptase-PCR-Methode (DDRT-PCR, <50>)*.

In der vorliegenden Arbeit sollten mittels *DDRT-PCR* Aufschlüsse über die komplexen Veränderungen der Genexpression in Astrozyten unter dem Einfluss von Ammoniak sowie Veränderungen des Zellvolumens gewonnen werden. Neben einem normoosmolaren Kontrollansatz (305mosmol/l) wurden primäre Astrozyten der Ratte hypoosmolarem Medium

(205mosmol/l) sowie normosmolarem Medium unter Zugabe von 5 mmol/l Ammoniumchlorid ausgesetzt. Die Expression der durch *DDRT-PCR* identifizierten osmo- und ammoniumregulierten Gene sollte durch Northern-Blot-Analysen überprüft und charakterisiert werden (siehe Abschnitt **I.2**).

II) MATERIAL UND METHODEN

II.1) Materialien

Die Chemikalien und Biochemikalien wurden von Qiagen (Hilden), Biometra (Göttingen), Eurogentec (Seraing, Belgien), Roche (Mannheim), Amersham-Pharmacia (Freiburg), Invitrogen (San Diego, USA), Applied Biosystems (Weiterstadt), Millipore (Eschborn), Biochrom (Berlin), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen oder von der hauseigenen Apotheke in der höchst verfügbaren Reinheit.

II.2) Präparation und Kultivierung von Astrozyten aus der Ratte

Primäre Hirnastrozyten wurden durch die Arbeitsgruppe für molekulare Neurobiologie (Abteilungsleiter Prof. Dr. H.W. Müller, Neurologische Klinik, Universitätsklinikum Düsseldorf) aus den Großhirnhemisphären neugeborener Wistarratten isoliert wie in <51> beschrieben. Die Kultivierung erfolgte in 250 ml Gewebekulturflaschen in *Dulbecco's modified eagles medium* (Biochrom, Berlin) unter Zusatz von 10 % fötalem Rinderserum bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. Die Reinheit der Zellkulturen wurde durch immunzytochemisches Färben von *glial fibrillary acidic proteins* (GFA-Proteinen) bestimmt und betrug >95 %. Das Kulturmedium wurde dreimal pro Woche ausgetauscht. Nach etwa 2 bis 3 Wochen waren die Kulturen nahezu konfluent und die Zellen wurden mittels 0,5% Trypsin in Kalzium freiem Phosphatpuffer (PBS) vom Flaschenboden gelöst und in Gewebekulturplatten mit je 6 Vertiefungen (Costar, Cambridge, Großbritannien) subkultiviert. Um Unterschiede in der Genexpression zu detektieren, wurden die Zellen unter verschiedenen Testbedingungen inkubiert: Neben einem unbehandelten normoosmolaren Kontrollansatz (305 mosmol/l) wurde ein Teil der Astrozyten für 8 bzw. 72 Stunden hypoosmolarem (205 mosmol/l) sowie normoosmolarem Medium unter Zusatz von Ammoniumchlorid (5mmol/l) ausgesetzt. Die Osmolarität wurde durch Veränderung der NaCl-Konzentration variiert.

II.3) Isolierung von Gesamt-RNA aus Astrozyten

Die Gesamt-RNA aus Rattenastrozyten wurde extrahiert mittels *RNeasy Total RNA kits* (Qiagen, Hilden) nach Protokoll des Herstellers.

II.4) Differentielle mRNA-Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (DDRT-PCR)

II.4a) Reverse Transkription

Die Transkription der mRNA in cDNA erfolgte mittels spezifischem Startermolekülset *Gene Exscreen Primer Kit* (Biometra, Göttingen) wie bei Bauer et al. beschrieben (<50> und ***Abbildung 1***).

200 ng RNA wurden mit 0,25 µmol/l 3'-Primer (s. ***II.4.b*** und ***Tabelle 2***) für 10 min. bei 70°C und für weitere 3 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch dazu pipettiert zu einem Gesamtvolumen von 20 µl (1x Reaktionspuffer (Eurogentec, Seraing, Belgien), 5mmol/l MgCl₂, 50 U RNase-Inhibitor, 5 mmol/l dNTPs (Pharmacia, Freiburg), 20 U AMV Reverse Transkriptase (Promega, Heidelberg)). Nach Durchmischung erfolgte eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur, anschließend für 60 min bei 42 °C und für 5 min bei 95°C. Das Gemisch wurde auf Eis abgekühlt und die DNA sofort amplifiziert oder bei -20 °C gelagert.

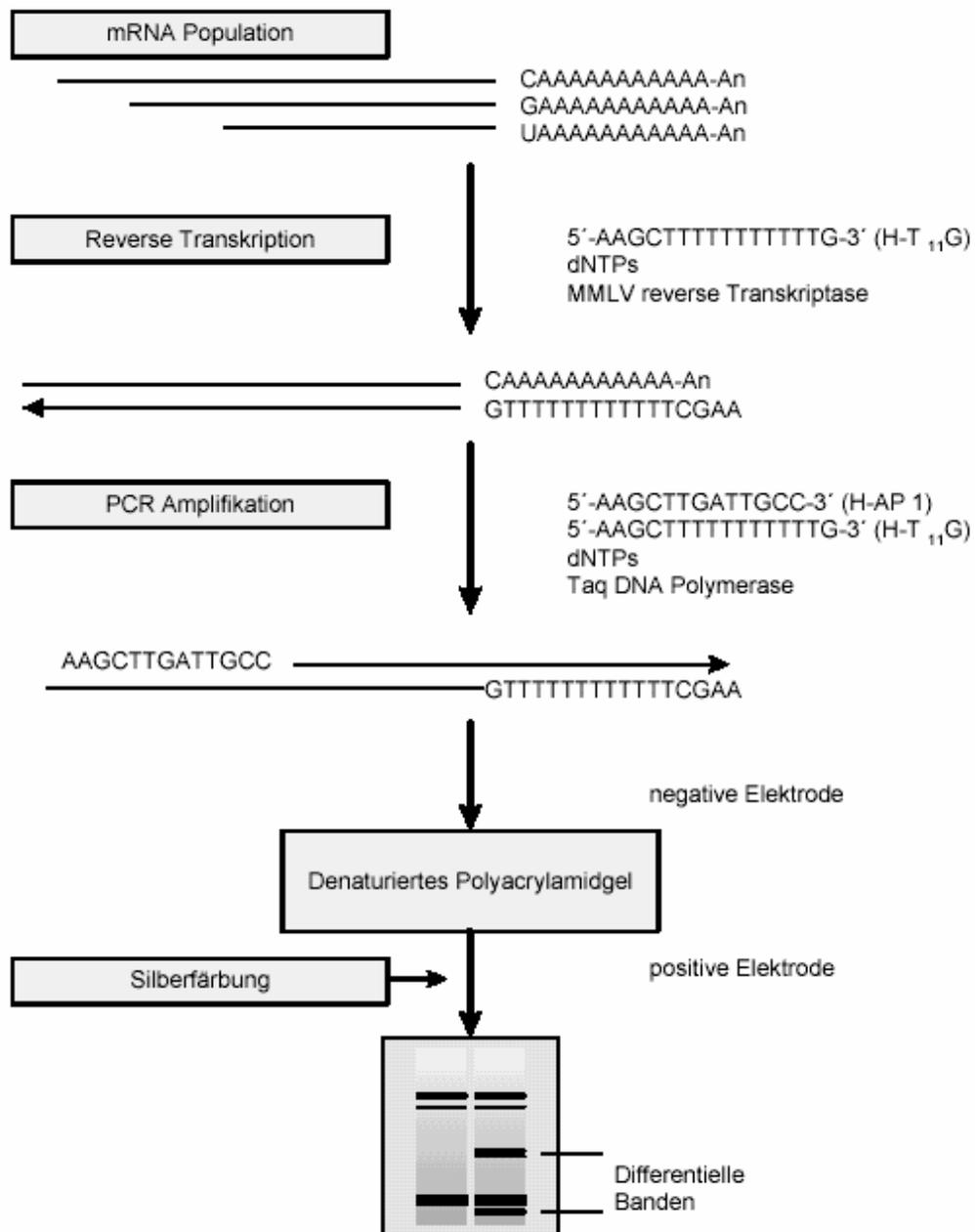


Abbildung 1:

Schematische Darstellung der Durchführung der differentiellen mRNA-Analyse:

Die Transkription der mRNA in c-DNA erfolgt wie in II.4 beschrieben mittels Startermolekülset, die anschließende Vervielfältigung der cDNA mittels PCR. Die cDNA-Fragmente werden im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Banden werden mittels Silberfärbung dargestellt, um gegenüber dem Kontrollansatz differenzielle Banden sichtbar zu machen.

II.4.b) DNA - Amplifikation mittels PCR

Die PCR wurde in 10 µl Reaktionsansätzen durchgeführt (1x Reaktionspuffer, 0,1 mmol/l dNTP's, 1,5 mmol/l MgCl₂, 1 U Taq-Polymerase (Eurogentec), 3 µl einer 1:10 Verdünnung der jeweiligen cDNA mit dem entsprechend **II.4.a)** eingesetzten 0,25 µmol/l 3'-Primer sowie 0,25 µmol/l 5'-Primer, **Tabelle 2**).

Die Reaktion erfolgte im *Thermocycler PE 9600* (Perkin Elmer, Überlingen), welcher zunächst für 10 min auf 94 C° vorgeheizt wurde. Anschließend wurden 40 Zyklen durchlaufen mit je:

30 sec bei 94° C (Denaturierung), 60 sec bei 40° C (Annealing), 30 sec bei 72° C (Polymerisation), die Reaktion wurde beendet durch Herunterkühlen auf 4 C°.

Die Primer für die einzelnen Reaktionen wurden aus 26 verschiedenen 5'-Primern (**Tabelle 2**: U 1-26) sowie 12 verschiedenen 3'-Primern (**Tabelle 2**: D 1-12) ausgewählt (Biometra, Göttingen). Nach Voruntersuchungen und mathematischen Berechnungen (<50>) erwiesen sich diese Primer als die Geeignetesten, eine bestimmte Anzahl von Sequenzen in dem Pool von cDNA zu identifizieren (**Tabelle 2**; *modifiziert*). Die 3'-Primer bestehen aus einer Aufeinanderfolge von 11 Thyminbasen (T₁₁-; s. Tab. 2) sowie 2 variablen Basen am 3'-Ende (CA, CG, CT, CC, GA, GG, GT, GC, AA, AG, AT, AC). Diese Aufeinanderfolge gewährleistet die Bindung des Primers an die Poly-A-Sequenz, während die 5'-Primer Dekamere aus unterschiedlichen Basen sind, die in verschiedener Entfernung zum 3'-Primer binden. So entstehen unterschiedlich lange cDNA-Stücke, die anschließend elektrophoretisch aufgetrennt werden können.

	3'-DownstreamPrimer (D)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	T 11-	C	CG	CT	CC	GA	GG	GT	GC	A	AG	AT	AC	
	A	A								A				
5'-UpstreamPrimer (U)	1	TAC AAC GAG G	x	x	x		x	x	x	x			x	x
	2	TGG ATT GGT C		x	x		x	x	x	x			x	x
	5	GGA ACC AAT C	x	x	x		x	x						
	6	AAA CTC CGT C	x	x	x		x	x						
	8	TGG TAA AGG G	x		x									
	9	TCG GTC ATA G	x		x									
	10	GGT ACT AAG G		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x
	11	TAC CTA AGC G		x	x		x	x			x	x	x	x
	12	CTG CTT GAT G	x	x	x		x	x	x	x	x			
	13	GTT TTC GCA G	x		x									
	14	GAT CAA GTC C	x		x									
	15	GAT CCA GTA C	x	x										
	16	GAT CAC GTA C	x	x	x		x	x	x	x	x			
	17	GAT CTG ACA C	x	x										
	18	GAT CTC AGA C	x	x										
	19	GAT CAT AGC C	x	x										
	20	GAT CAA TCG C	x		x									
	21	GAT CTA ACC G	x		x									
	22	GAT CGC ATT G	x	x										
	23	GAT CTG ACT G	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x
	24	GAT CAT GGT C	x	x	x		x	x			x	x	x	x
	25	GAT CAT AGC G	x											
	26	GAT CTA AGG C	x	x										

Tabelle 2:

Auflistung der 5'-Primer U 1 bis U 26 sowie 3'-Primer D 1 bis D12.

Die 3'-Primer bestehen alle aus einer Aufeinanderfolge von 11 Thymidinbasen (T₁₁), variabel sind nur die beiden endständigen Basen. Die 5'-Primer sind Dekamere aus unterschiedlichen Basen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primerkombinationen sind mit einem „x“ markiert. Es wurden insgesamt 108 Primerkombinationen eingesetzt.

II.4.c) Elektrophoretische Auftrennung von PCR - Produkten in Polyacrylamidgelen

Um Unterschiede in der Genexpression unter den verschiedenen Testbedingungen zu detektieren, erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der cDNA-Fragmente in einem 10%igen Polyacrylamidgel (PAA-Gel, *Clean Gel DNA Analysis Kit*, Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Herstellerangaben.

Je 5 µl PCR-Produkt wurden mit 2 µl *Sequenzier-Stop-Lösung* (*Clean Gel DNA Analysis Kit*) aufgetragen und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Größenbestimmung im Gel wurden 1 µg DNA-Längenstandard aufgetragen (*Smart ladder*, Eurogentec). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 V (23 mA) für 10 min und 15 °C. Danach wurde die Spannung auf 600 V (30mA) erhöht und nach weiteren 50 min bei 15 °C wurde der Lauf beendet.

II.4.d) Silberfärbung von DNA in Polyacrylamidgelen

Zur Darstellung der cDNA-Fragmente in den PAA-Gelen wurde eine Silberfärbung gemäß Standardprotokoll (*Silver Staining Protocol for Nucleic Acids*, Amersham-Pharmacia, Freiburg) durchgeführt.

II.5) Elution differentieller cDNA-Fragmente

DNA-Banden gleicher Größe, die im Vergleich zum normoosmolaren Kontrollansatz unterschiedlich konzentriert erschienen, wurden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in 20 µl Aqua bidest. aufgenommen. Anschließend wurden die Proben 2 min bei 95 ° erhitzt und danach für 1 min bei 1000 x g zentrifugiert (Tischzentrifuge Mikro 24-48, Hettich, Tuttlingen).

II.6) Reamplifizierung von geluerten cDNA-Fragmenten

Die eluierten und in Aqua bidest. aufgenommenen DNA-Fragmente wurden in einer weiteren PCR auf ihre Spezifität hin überprüft. In einem Volumen von 50 µl Reaktionsgemisch wurden 10 µl des Eluats sowie die analog zur ersten PCR-Reaktion entsprechenden 3'- und 5'-Primer verwendet (je 0,25 µmol/l 3'- bzw. 5'-Primer, 1x Reaktionspuffer, 0,2 mmol/l dNTP's, 1,5 mmol/l MgCl₂, 2,5 U Taq-Polymerase). Die Reaktion erfolgte im *Thermocycler PE 9600* wie unter ***II.4.b)*** beschrieben.

II.7) Agarosegelelektrophorese

Die Identifikation und Auftrennung der PCR-Produkte wurde in einem 1-2%igen Agarosegel in TAE-Puffer (40 mmol/l Tris, 0,11 % (v/v) Essigsäure, 1 mmol/l EDTA pH 8,0) durchgeführt. Die Geltaschen wurden mit je 16,5 µl Lösung beladen (15 µl Probenvolumen plus 1,5 µl 10 x DNA-Auftragspuffer (0,25% (w/v) Bromphenol, 0,25% (w/v) Xylencyanol, 30% (v/v) Glycerin, 890 mmol/l Tris/HCl, 890 mmol/l Borsäure, 25 mmol/l Na-EDTA, pH 8,0). Für die Längenberechnung der DNA wurde 5 µl DNA-Längenstandard zusätzlich aufgetragen (*Smart Ladder*; Eurogentec). Unter Zusatz von 0,2 µg/ml Ethidiumbromid (Roche, Mannheim) wurden die Banden unter UV-Licht (300 nm) visualisiert und fotografisch festgehalten (*Polaroid MP4+ Instant Camerasystem*).

II.8) Aufreinigung der PCR-Produkte mittels Millipore-Ultrafiltration

Die Aufreinigung der PCR-Produkte als Vorbereitung für die Klonierung erfolgte mit Hilfe der Filtereinheit *Ultrafree-MC 30.000 NMWL* (Millipore, Eschborn) gemäß Protokoll des Herstellers. Das Retentat betrug am Ende ca. 5 µl, welche in 30µl Aqua bidest. steril aufgenommen und bis zur Klonierung bei -20 C° eingefroren wurden.

II.9) Klonierung von reamplifizierter DNA

Für die Klonierung der differentiellen geleluierten cDNA - Fragmente wurde der *TOPO TA Cloning Kit* (Invitrogen, San Diego, USA) verwendet. Die TA-Klonierung (Taq amplifizierte Klonierung) macht sich die Eigenschaft der bei der PCR eingesetzten Taq-Polymerase zunutze, an den 3`-Enden des PCR-Produkts ein überzähliges Adenosin anzuhängen (**Abbildung 2**). In Kombination mit einem entsprechend linearisierten Vektor mit „überstehendem“ Thymidin-Ende wird eine besonders effektive Ligation erreicht. 4 µl des PCR-Produktes wurden gemäß Anleitung des Herstellers mit 1 µl *salt solution* sowie 1 µl Vektor *pCR-XL-TOPO* (beides *TOPO TA Cloning Kit*, Invitrogen, San Diego, USA) versetzt. Die Hälfte eines Ansatzes wurde zu den kompetenten Zellen (*TOP 10 E.coli-cells*, Invitrogen, San Diego, USA) gemäß Protokoll des Herstellers gegeben und die Transformation durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen auf *Luria-Bertani*-Nährböden (LB: 0,5 % w/v NaCl, 1 % w/v Trypton, 1,5 % w/v Agar, 0,5 % w/v Hefeextrakt und 35 µg/ml Zeozin, pH 7,5) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert (<52>).

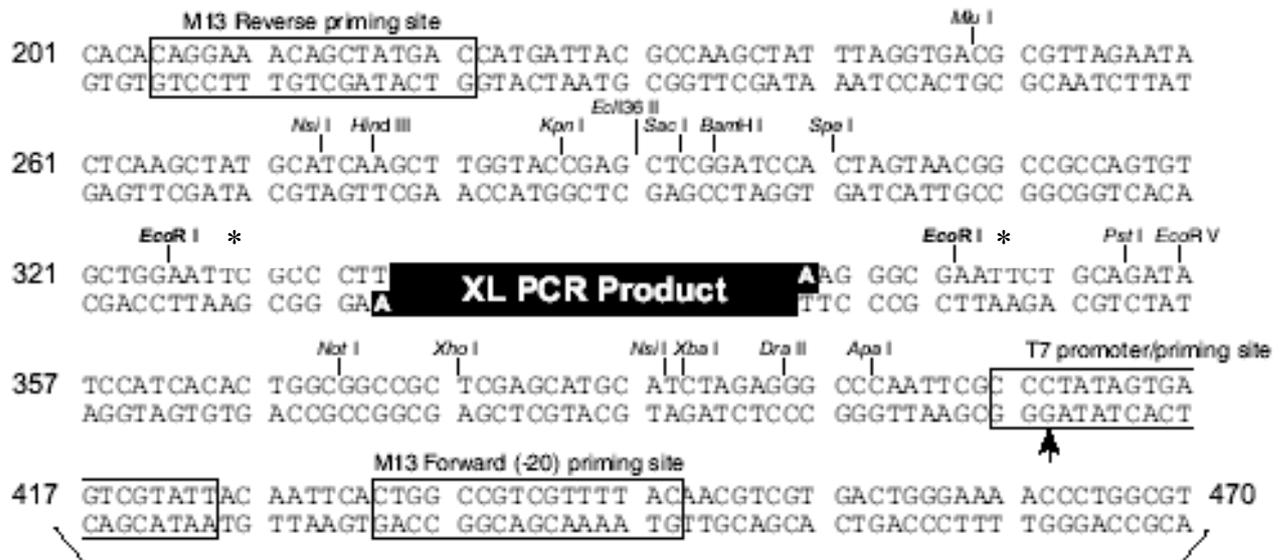


Abbildung 2:

Karte des pCR-XL-TOPO-Vektors.

Die Karte zeigt eine Übersicht des Klonierungsvektors *pCR-XL-TOPO* mit seiner *multicloning*-Sequenz. Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen sind angegeben, die der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen EcoR I ist mit einem * markiert (s. II.12). Die Gesamtlänge des Vektors beträgt 3519 Nukleotide.

II.10) Selektion und Anzucht von Bakterienkolonien

Ausgewählte Bakterienkolonien wurden mittels Impföse in je 2ml LB-Zeozin-Medium (35 µg /ml) übertragen (<52>). Die Anzucht der Bakterien erfolgte im Rundschtüttler über Nacht bei 37 °C und 220 rpm.

II.11) Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode von *Current Protocols in Molecular Biology* (<53>) mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) gemäß Anbieterprotokoll.

II.12) Restriktionsendonukleaseverdau von DNA

Der Restriktionsansatz enthielt 0,5-1,0 µg Plasmid-DNA/10µl in 1x Reaktionspuffer H mit 0,5-5 U Restriktionsenzym *Eco R I* / µg DNA (Roche, Mannheim). Die Plasmid-DNA wurde eine Stunde bei 37 °C verdaut. Anschließend erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der DNA wie in **II.7**) beschrieben.

II.13) Enzymatische Sequenzierung von DNA

Als DNA-Sequenzierungsmethode wurde die enzymatische Sequenzierung mit universellen fluoreszenzmarkierten Sequenzierprimern gemäß <54> eingesetzt. Alle Reaktionen wurden mit dem *ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die Sequenzanalyse der klonierten Genfragmente erfolgte mit *M13-forward Primer* sowie *M13-reverse Primer* (Amersham Pharmacia, Freiburg).

Die Vorbereitung der Reaktionskomponenten sowie der Proben erfolgte gemäß Protokoll des Herstellers für die automatische Sequenzgelelektrophorese mit *ABI 373* (Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Sequenzierreaktion wurde im *Thermocycler PE 9600* durchgeführt wie in <50> beschrieben. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mittels Ethanol-/Acetat-Fällung aufgereinigt. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen, die Pellets wurden in

einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Sie wurden entweder sofort der automatischen Sequenzgelelektrophorese zugeführt oder bei 4°C gelagert.

Die Herstellung des Polyacrylamidgels sowie die Vorbereitung der Glasplatten erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers für die automatische Sequenzgelelektrophorese mit dem *ABI 373*-Sequenzierautomaten. Die Pellets wurden vor dem Auftragen auf das Gel 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert, gründlich durchmischt (Vortexer) sowie kurz zentrifugiert und für 5 min bei 90 °C denaturiert, anschließend sofort in Eiswasser gestellt. Der Lauf erfolgte über 8 h bei 2500 V, 40mA, 30 W. Nach Beendigung wurden die Fluoreszenzsignale mittels *Sequencing Analysis Software* (Applied Biosystems, Weiterstadt) analysiert.

II.14) Datenbankrecherche

Die Sequenzanalysen erfolgten anhand der Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Die Programme BLASTN und BLASTX (<54>) wurden für Homologievergleiche mit Sequenzen in den Datenbanken des *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) sowie des *National Institute of Health* (NIH) *genetic sequence database* (GenBank) verwendet.

II.15) Northern Blot Analyse

Gesamt-RNA aus nahezu konfluenten primären Astrozytenkulturen wurde mittels *Rneasy Total RNA-Kit* (Qiagen, Hilden) nach Protokoll des Herstellers isoliert. Desweiteren wurde Gewebe aus Gehirn, Duodenum, Leber, Milz, Niere und Hoden der Wistarratten isoliert und jeweils 1 g des entsprechenden Gewebes wurde sofort nach der Präparation in 10 ml Guanidin-Isothiocyanat-Lösung auf Eis mittels eines Ultra-Turrax-Gerätes homogenisiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA wie in <55> beschrieben isoliert. Die Northern-Blot-Methode sowie die Hybridisierung der Nukleinsäuren wurden gemäß <32> und <33> durchgeführt.

II.16) Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Mindestens drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde der zweiseitige Student-t-Test angewendet. $P < 0,05$ wurde als signifikant verschieden bewertet.

III.1) Differentielle mRNA-Analyse zur Identifikation osmo- und ammoniumregulierter Gene in primären Astrozyten

Die differentielle mRNA-Analyse (*differential display polymerase chain reaction*, DDRT-PCR) wurde für die Identifizierung osmo- und ammoniumregulierter Gene in primären Astrozyten eingesetzt. Sie ermöglicht die Detektion von Unterschieden in der Genexpression zwischen verschiedenen Versuchsansätzen. Primäre Astrozyten wurden in normoosmolarem Medium angezüchtet (305 mosmol/l) und für 8 bzw. 72 Stunden in demselben bzw. hypoosmolarem (205mosmol/l) oder normoosmolarem Medium unter Zusatz von 5mmol/l Ammoniumchlorid inkubiert (***Abbildung 3***). Die Gesamt-RNA wurde extrahiert, revers transkribiert und mittels PCR mit insgesamt 108 ausgewählten Primerpaaren amplifiziert (***Tabelle 2***). 17 cDNA-Fragmente zeigten unter den beschriebenen Versuchsbedingungen differierende mRNA-Spiegel (cDNA 1-17, ***Tabelle 3***). Sie wurden nach Klonierung sequenziert. Eine Suche in der NCBI-Datenbank ergab eine über 92%ige Übereinstimmung für 4 dieser cDNA- Fragmente, benannt UW 16, UW 17, UW 27 und SK 29 mit Abschnitten von Genen, die für Elongin A (<57>), Clusterin (<58>), *kelch motif containing protein* (KMCP, <59>) und *prolin rich protein expressed in brain* (PRPB, <60>) kodieren. Keine wesentlichen Übereinstimmungen mit bekannten Genen wurden für die übrigen 13 cDNA-Fragmente gefunden (siehe ***VII***).

cDNA:	Klon Nr.:	Fragment- größe:	Primer- kombination:	Access. Nummer:	Homologien mit:
1	UW16	161 bp	U24 /D11	L 46816	Elongin A
2	UW17	266 bp	U24 /D11	L08235	Clusterin
3	UW27	298 bp	U26 /D11	AB026190	KMCP
4	UW28	432 bp	U25 /D11		*
5	UW35	286 bp	U25 /D11		*
6	UW48	188 bp	U24 /D12		*
7	SK1	351 bp	U16 /D 5		*
8	SK10	265 bp	U24 /D 6		*
9	SK14	288 bp	U24 /D 5		*
10	SK16	176 bp	U16 /D 7		*
11	SK17	162 bp	U16 /D 7		*
12	SK21	174 bp	U 2 / D 5		*
13	SK23	321 bp	U 2/ D 5		*
14	SK27	236 bp	U 1/ D 8		*
15	SK34	340 bp	U 3/ D 8		*
16	SK29	217 bp	U 1/ D 8	AF085348	PRPB
17	SK38	203 bp	U 1/ D 8		*

Table 3:

Liste der cDNA-Produkte, die nach Klonierung sequenziert wurden

17 cDNA-Fragmente zeigten unter dem Einfluss von Hypoosmolarität bzw. Ammoniak im Vergleich zum Kontrollansatz eine unterschiedliche Ausprägung der Genexpression. Sie wurden kloniert wie in **II.9)** beschrieben und anschließend enzymatisch sequenziert. Der Vergleich mit der NCBI-Datenbank ergab für 4 dieser Klone, benannt UW 16, UW 17, UW 27 und SK 29 eine mehr als 92 %ige Übereinstimmung mit den bereits bekannten Genen Elongin A, Clusterin, *kelch motif containing protein* (KMCP) sowie *prolin rich protein expressed in brain* (PRPB). Die gesamte Sequenz der Gene kann unter der angegebenen Accession-Nr. in der NCBI-Datenbank eingesehen werden. Für die übrigen 13 cDNA-Fragmente konnten bisher keine wesentlichen Übereinstimmungen im Vergleich mit bekannten Genen festgestellt werden (mit * markiert).

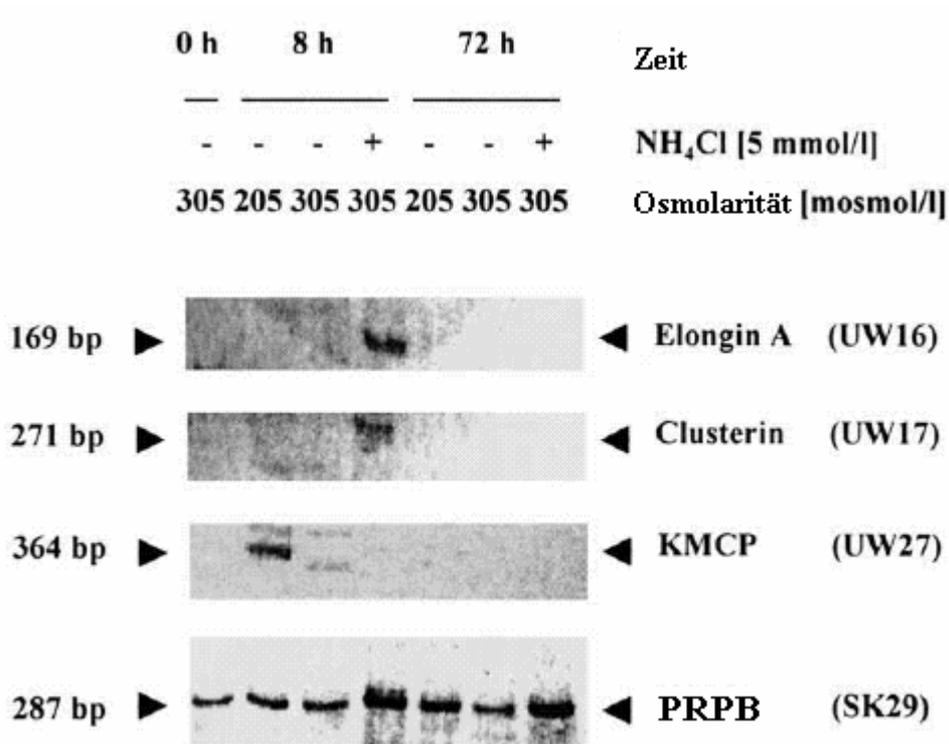


Abbildung 3:

Auftrennung von DDRT-PCR-Produkten in 10%igem Polyacrylamidgel.

Primäre Astrozyten wurden in normoosmolarem Medium angezüchtet (305 mosmol/l) und zum Zeitpunkt 0 für 8 bzw. 72 Stunden demselben bzw. hypoosmolarem (205mosmol/l) Medium oder normoosmolarem Medium unter Zusatz von 5mmol/l Ammoniumchlorid zugeführt. Die Gesamt-RNA wurde extrahiert, revers transkribiert und mittels PCR mit ausgewählten Primerpaaren (GeneExScreen, Biometra) amplifiziert (aus <61>).

III.1.1) Expression von RNA-Transkripten für Elongin A

Das 161 bp große Amplifikationsprodukt UW 16 entspricht den Nukleotidpositionen 519-680 der mRNA von Elongin A (**Abbildung 4**). Zur Amplifikation wurde das Primerpaar U24/D11 verwendet. Ammoniumchlorid führt in Rattenastrozyten zu einem signifikanten zeitabhängigen Anstieg der Elongin A mRNA-Spiegel verglichen mit dem normoosmolaren Kontrollansatz. Geringe, aber doch signifikante Unterschiede (19+/-5%) wurden ebenso nach 24 -stündiger hypoosmolarer Inkubation in den Astrozyten gefunden (**Abbildung 5**). Elongin A-mRNA wird außerdem auch in anderen Geweben der Ratte wie Hoden, Milz, Niere und Duodenum exprimiert. (**Abbildung 6**). Elongin A ist als Transkriptionsfaktor für den ungestörten Ablauf des Zellzyklus von Bedeutung (<62> bis <65>).

```
UW 16: 5   tcatgggtcacgagaggagagatgaaaggaagaggtgtcacaaagtgtcaccaccatattc 64
          |||
Elong: 519 tcatgggtcacgagaggagagatgaaaggaagaggtgtcacaaagtgtcaccaccatattc 578

UW 16: 65   ttcagacccccgagtcgctctgactatgggtcatgttcaatctcctccaccttcaagtcccca 124
          |||
Elong: 579 ttcagacccccgagtcgctctgactatgggtcatgttcaatctcctccaccttcaagtcccca 638

UW 16: 125  tcaaatgtatacagacctctctaggtccccagagatggacca 166
          |||
Elong: 639 tcaaatgtatacagacctctctaggtccccagagatggacca 680
```

Abbildung 4:

Sequenzvergleich zwischen der Sequenz des Klons UW 16 mit den Nukleotidpositionen 519-680 von Elongin A

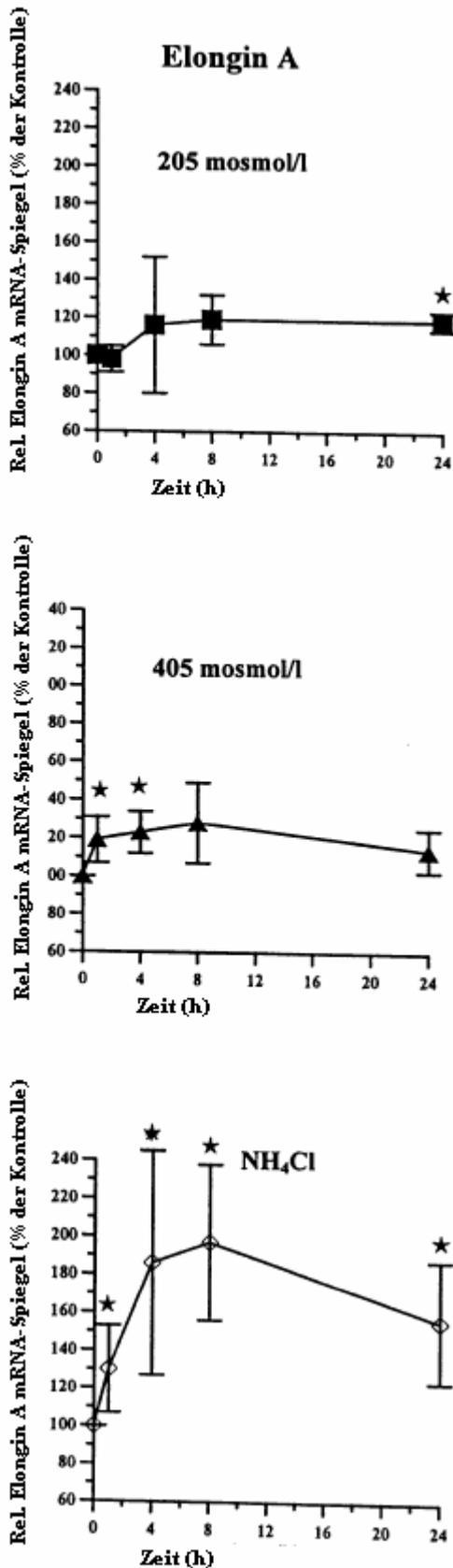
Die Nukleotidpositionen 5-166 der Sequenz des Klons UW 16 zeigen eine vollständige Übereinstimmung mit den Nukleotidpositionen 519-680 von Elongin A mRNA (aus <61>).

Abbildung 5:

Zeitlicher Verlauf der Effekte von Hypoosmolarität (oben), Hyperosmolarität (Mitte) und Ammoniak (unten) auf die Elongin-A-mRNA-Spiegel in Rattenastrozyten.

Die Zellen wurden in normoosmolarem Medium (305mosmol/l) mit oder ohne Ammoniumchlorid (5mmol/l), hypo- (205mosmol/l) oder hyperosmolarem (405mosmol/l) Medium inkubiert. Die Osmolarität wurde durch Veränderung der NaCl-Konzentration variiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA isoliert und eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Die mittleren mRNA-Werte bei normoosmolarer Inkubation wurden gleich 100 % gesetzt; alle anderen mittleren mRNA-Werte wurden in prozentuale Relation dazu gestellt. Die angegebenen Werte entsprechen \pm SEM und resultieren aus 4-5 verschiedenen Experimenten pro Versuchsbedingung. Mit einem * markierte Werte sind signifikant unterschiedlich vom Kontrollwert ($P < 0,05$)

Wie die nebenstehenden Grafiken zeigen, steigen die Spiegel von Elongin A unter allen Versuchsbedingungen zwar zeitlich unterschiedlich, jedoch signifikant an.



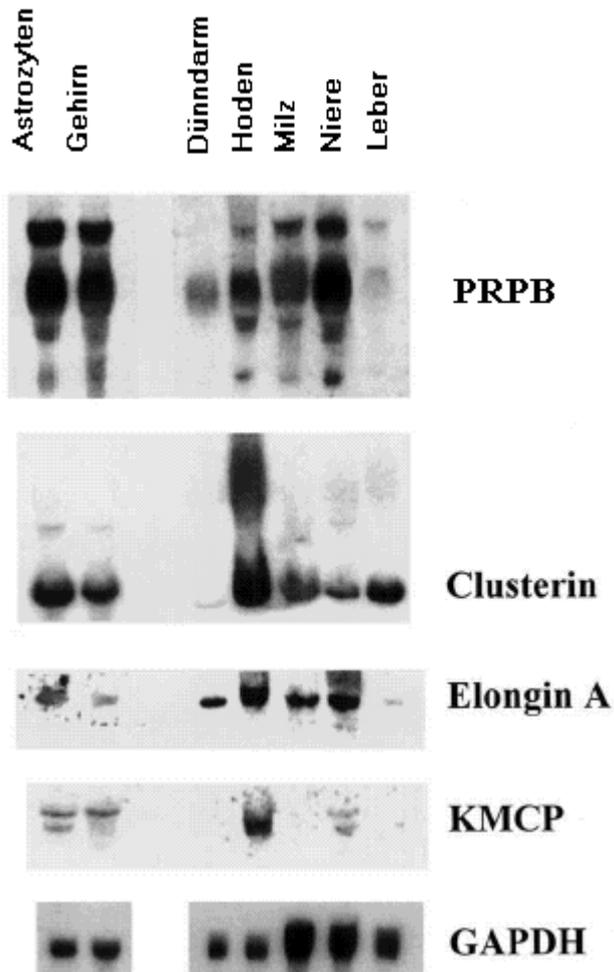


Abbildung 6 :

Detektion von mRNA-Spiegeln mittels Northern-Blot-Analyse in verschiedenen Geweben der Ratte

Northern-Blot-Analyse der mRNA von PRPB, Clusterin, Elongin A, KMCP und GAPDH. Dazu wurden Astrozyten, Gehirn, Dünndarm, Hoden, Milz, Niere und Leber von Wistarratten isoliert und die Gesamt-RNA präpariert. Es wurden 15 µg Gesamt-RNA pro Laufspur eingesetzt (aus <61>).

III.1.2) Expression von RNA-Transkripten für Clusterin

Der Klon UW 17 wurde amplifiziert mit der Primerkombination U24/D11. Er ist identisch mit den Nukleotidpositionen 348 bis 614 der mRNA des 1644 bp großen sulfatisierten Glykoproteins Clusterin (auch beschrieben als *testosteron repressed protsate message 2* oder Apolipoprotein oder *sulfated glycoprotein*; <66>, <67>) Eine Ausnahme stellt der Basenaustausch an Position 601 (T->C) dar, der in dem Ersatz Asn -> Asp an Codon 102 resultiert (**Abbildung 7**). Wie in der Northern-Blot-Analyse gezeigt, stellt sich ein geringer, aber signifikanter Anstieg von 20-30 % in der Clusterin-mRNA-Konzentration sowohl durch Hypoosmolarität als auch durch Ammoniumchlorid dar und zwar 4 Stunden nach Wechsel des Mediums, verglichen mit dem Kontrollansatz (**Abbildung 8**). Eine Clusterin-mRNA wurde außerdem detektiert in Hirn, Hoden, Milz, Niere und Leber, in geringem Umfang auch im Dünndarm der Ratte (**Abbildung 6**). Zusätzlich wurden mRNA-Signale, die für Clusterin-Isoformen kodieren, im Hoden gefunden. Clusterin ist von Bedeutung für die Zytoprotektion. Es dient als Proteinschutz unter verschiedenen Stressbedingungen und wird bei neurodegenerativen Erkrankungen vermehrt exprimiert (<66>, <68> bis <70>).

```
UW 17: 5   catggtcctgggagagcaggagttctctgacaatgagctccaagaactgtccactcaagg 64
          |||
Clust: 348 catggtcctgggagagcaggagttctctgacaatgagctccaagaactgtccactcaagg 407

UW 17: 65   aagtaggtatgttaataaggagattcagaacgccgtccaggggggtgaagcacataaagac 124
          |||
Clust: 408 aagtaggtatgttaataaggagattcagaacgccgtccaggggggtgaagcacataaagac 467

UW 17: 125  cctcatagaaaaaaccaacgcagagcgcaagtccctgctcaacagtttagaggaagccaa 184
          |||
Clust: 468 cctcatagaaaaaaccaacgcagagcgcaagtccctgctcaacagtttagaggaagccaa 527

UW 17: 185  aaagaagaaagaggggtgctctagatgacaccagggattctgaaatgaagctgaaggcttt 244
          |||
Clust: 528 aaagaagaaagaggggtgctctagatgacaccagggattctgaaatgaagctgaaggcttt 587

UW 17: 245  cccggaagtgtgtgacgagacatgat 271
          |||
Clust: 588 cccggaagtgtgtaacgagacatgat 614
```

Abbildung 7:

Sequenzvergleich zwischen dem Klon UW 17 mit den Nukleotidpositionen 348-614 von Clusterin

Die Nukleotidpositionen 5 bis 271 des Klons UW 17 zeigen eine 99% ige Übereinstimmung mit den Nukleotidpositionen 348 bis 614 der mRNA von Clusterin. Ein Basenaustausch zeigt sich an Position 601.

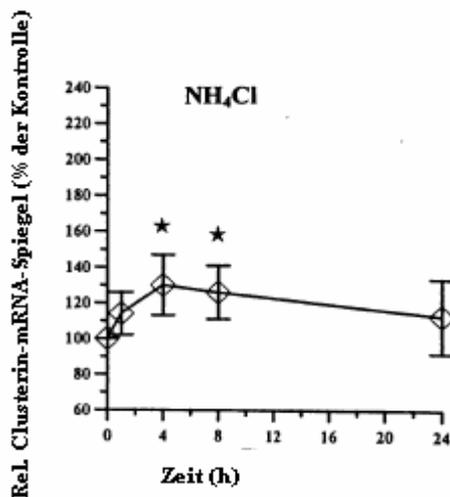
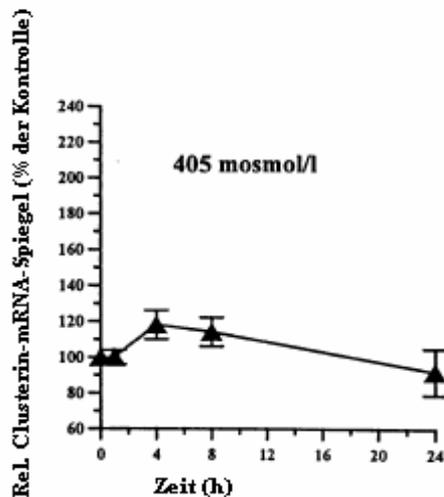
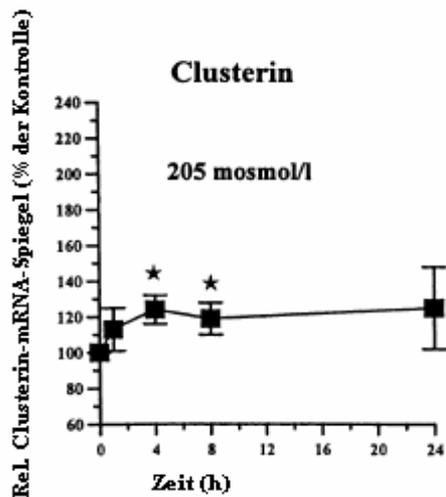


Abbildung 8:

Zeitlicher Verlauf der Effekte von Hypoosmolarität (oben), Hyperosmolarität (Mitte) und Ammoniak (unten) auf die Clusterin-mRNA-Expression in Rattenastrozyten.

Die Zellen wurden in normoosmolarem Medium (305mosmol/l) mit oder ohne Ammoniumchlorid (5mmol/l), hypo- (205mosmol/l) oder hyperosmolarem (405mosmol/l) Medium inkubiert. Die Osmolarität wurde durch Veränderung der NaCl-Konzentration variiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA isoliert und eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Die mittleren mRNA-Werte bei normoosmolarer Inkubation wurden gleich 100 % gesetzt; alle anderen dazu in prozentualer Relation. Die angegebenen Werte entsprechen \pm SEM und resultieren aus 4-5 verschiedenen Experimenten pro Versuchsbedingung. Mit einem * markierte Werte sind signifikant unterschiedlich vom Kontrollwert ($P < 0,05$). Ein geringer, jedoch signifikanter Anstieg von 20-30% zeigt sich unter dem Einfluss von Hypoosmolarität sowie Ammoniumchlorid mit einem Maximum nach 4 Stunden.

III.1.3) Expression von RNA-Transkripten für kelch motif containing protein (KMCP)

Der 364 Basenpaare große Klon UW 27, amplifiziert durch die Primerkombination U 26/ D11 (**Abbildung 11**) entspricht zu 92 % der Nukleotidsequenz 856 bis 1154 der für das menschliche *kelch motif containing protein* (KMCP) kodierenden mRNA. Auf Proteinebene wurde eine 97 %ige Übereinstimmung gefunden. Allerdings fanden sich nur wenige Ähnlichkeiten zur KMCP-mRNA für die Nukleotide in Position 1 - 65 des UW 27. Wie durch die DDRT-PCR in Astrozyten nachgewiesen, wurde eine KMCP-mRNA-Expression vor allem durch Hypoosmolarität induziert. In der Northern-Blot-Analyse zeigten sich sowohl bei Hypo- als auch Hyperosmolarität um nahezu 80 % erhöhte mRNA-Spiegel im Gegensatz zum normoosmolaren Medium nach 1 bis 24 Stunden. Im Gegensatz zu Clusterin, Elongin A und PRPB wurden die mRNA-Spiegel des KMCP durch Ammoniumchlorid nicht wesentlich verändert (**Abbildung 12 A, B**). Die Funktion des KMCP ist noch nicht hinreichend geklärt. Allgemein nehmen Kelchmotiv beinhaltende Proteine an verschiedenen Zellfunktionen wie Organisation von Plasmamembranen und Zellstrukturen sowie an der Genexpression teil (<59>, <71>, <72>).

```

      U25→
UW27: 1 gatcatagcgcctatgggggtcccgaaggaacacctaggttgtgcagtgtaccaggacat 60
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
KMCP: 775 tccagtgatgagctaaacgttcgcagtgaagaacaagtgttcaatgcagtgatggcctgg 834

UW27: 61 gatctatacagatattcaggaaagacgtcctcagttaccccaggtgctgcagcacgtccgc 120
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
KMCP: 835 gtcaaatacagatattcaggaaagacgtcctcaattaccccaggtgctgcagcatgttcgt 894

UW27: 121 ctgcctttgcttagtcccaagttcctggtgggcaccgtaggctctgaccccctcattaaa 180
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
KMCP: 895 ttgcctttgcttagtcccaagttcctggtcggcacagtaggctctgatcccctcatcaa 954

UW27: 181 agtgatgaagaatgctggagacttggtagatgaggctaaaaactacctccttttgcctcaa 240
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
KMCP: 955 agtgatgaagaatgcagagacttggtagatgaggctaaaaactacctcctattgccgcaa 1014

UW27: 241 gagcgacctttaatgcaagggcctcggacaagccacggaaacccatccgatgctggagaa 300
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
KMCP: 1015 gaacgaccactaatgcaaggaaccaaggacgagaccacggaaacccatccgatgtggggaa 1074

UW27: 301 gtgctctttgcagttggtggttgggtgcagtgagatgccatttccagtggtgaacgctat 360
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
KMCP: 1075 gtactctttgcagttggtggttgggtgcagtgagatgccatttccaatggtgaacgatat 1134
      gcgata
      ←U25
      ctag
UW27: 361 gatc 364
      | | | |
KMCP: 1135 gatc 1138

```

Abbildung 11:
Sequenzvergleich zwischen dem Klon UW 27 und der Nukleotidsequenz 856-1154 des KMCP.

Identische Nukleotide sind durch Querstriche angezeigt und die Sequenzen der zur Amplifikation verwendeten Primer sind unterstrichen.

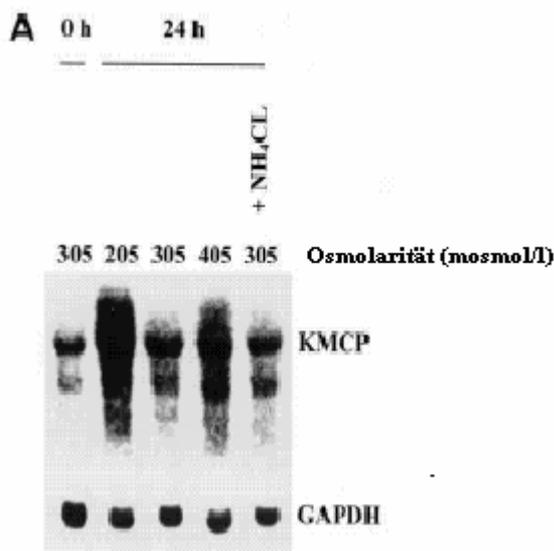


Abbildung 12 A:

Effekte der Osmolaritätsveränderungen auf KMCP- und GAPDH-mRNA Spiegel in primären Rattenastrozyten.

Die Zellen wurden über 24 Stunden in unterschiedlich osmolarem Medium sowie unter Zusatz von 5 mmol/l Ammoniumchlorid inkubiert. Die Osmolaritätsänderungen wurden durch Änderungen der NaCl-Konzentration erreicht. Anschließend wurde die RNA isoliert und der Northern-Blot-Analyse für KMCP sowie GAPDH zugeführt (10µg RNA pro Laufspur. Aus <61>).

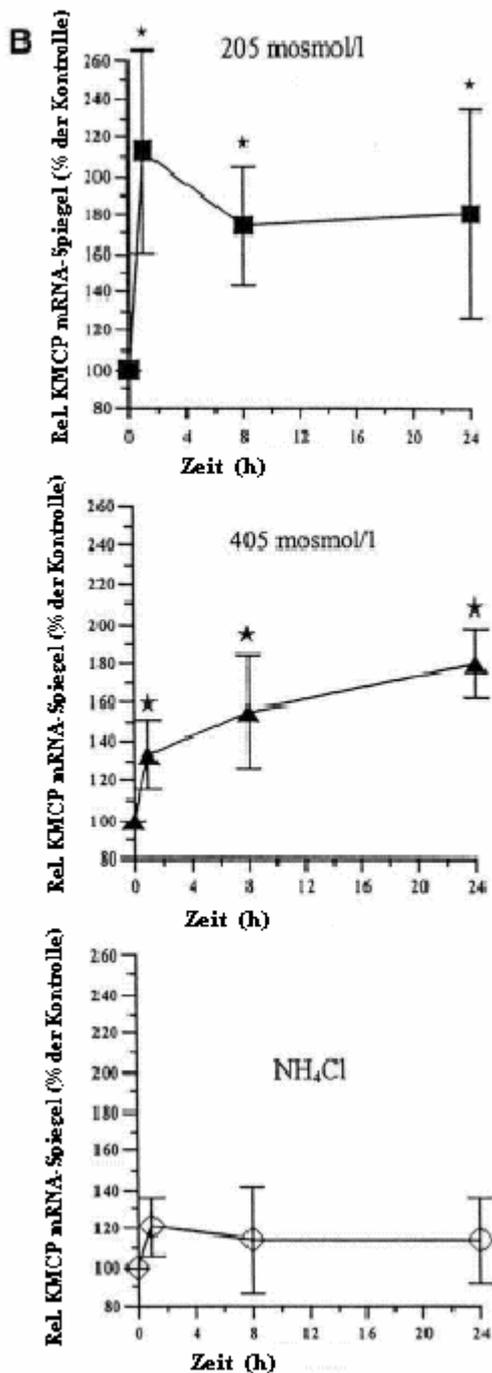


Abbildung 12 B:
Zeitlicher Verlauf der Effekte von Hypoosmolarität (oben), Hyperosmolarität (Mitte) und Ammoniak (unten) auf die mRNA-Expression in Rattenastrozyten.

Die Zellen wurden in normoosmolarem Medium (305mosmol/l) mit oder ohne Ammoniumchlorid (5mmol/l), hypo- (205mosmol/l) oder hyperosmolarem (405mosmol/l) Medium inkubiert. Die Osmolarität wurde durch Veränderung der NaCl-Konzentration variiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA isoliert und eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Die mittleren mRNA-Werte bei normoosmolarer Inkubation wurden gleich 100 % gesetzt; alle anderen mRNA-Werte wurden in prozentualer Relation dazu angegeben. Die angegebenen Werte entsprechen \pm SEM und resultieren aus 4-5 verschiedenen Experimenten pro Versuchsbedingung. Mit einem * markierte Werte sind signifikant unterschiedlich vom Kontrollwert ($P < 0,05$).

Sowohl hypo- als auch hyperosmolares Medium führen zu bis zu 80 % erhöhten mRNA-Spiegeln für KMCP. Keine signifikanten Veränderungen wurden unter dem Einfluss von Ammoniumchlorid festgestellt.

III.1.4) Expression von RNA-Transkripten für prolin rich protein expressed in brain (PRPB)

Das 287 Basenpaare lange Amplifikationsprodukt SK 29 (*Abbildung 9*) wurde amplifiziert mit der Primerkombination U1/D8. Die Sequenz von SK 29 ist zu 97 % identisch mit der Nukleotidsequenz 10-217 der cDNA von Maus-PRPB (aus <61>). Beide Sequenzen waren identisch auf Proteinebene mit Ausnahme einer Asn → Ser-Transition an Kodon 20. Die Northern-Blot-Analyse zeigte einen zeitabhängigen Anstieg der mRNA-Spiegel von 29 +/- 6 % in hypoosmolarem Medium sowie einen Anstieg von 64 +/-38 % unter Inkubation mit Ammoniumchlorid nach 8 Stunden. Demgegenüber beeinflusste ein hyperosmolares Medium die PRPB-Expression nicht signifikant (*Abbildung 10*). Verschiedene PRPB-Transkripte kodieren für letztlich 4 PRPB-Isoformen, die vermehrt in Astrozyten, Gehirn, Hoden, Milz und Niere, weniger in Duodenum und Leber der Ratte exprimiert werden (*Abbildung 6*). PRPB wird in verschiedenen Bereichen des Gehirns exprimiert, zudem stellen prolinreiche Proteine Transkriptionsfaktoren dar und können mit osmoregulativen Proteinen interagieren (<60>, <73>).

```

SK 29:  1  tttttttgccccaactgcataactcagagctctatcgcccaagctttgttcatccaggggct 60
          D8 →

SK 29: 61  gccacagtccccaccatgaacagcaaaggtcaatatccaacacagcctacctaccctgtg 120
          |          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
PRTB:  1  ggactcagagccaccatgaacagcaaaggtcaatatccaacacagcctacctaccctgtg 60

SK 29: 121  cagcctcctgggagtcagtatatcctcagaccttacatcttccccaggctccaccctat 180
          || |||||||||||||| |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
PRTB:  61  caacctcctgggaatccagtatatcctcagaccttacatcttctcaggtccaccctat 120

SK 29: 181  actgatgctccacctgcataactcagagctctatcgtccaagctttgttcatccaggggct 240
          |||||||||||||||||| |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
PRTB: 121  actgatgctccacctgcataatcagagctctatcgtccaagctttgttcatccaggggct 180

          ← U1
          ggagcaacat
SK 29: 241  gccacagtccccaccatgtcagctgcatttctggcgctcattgta 287
          |||||||||||||||||| |||||||||||||||||| ||||
PRTB: 181  gccacagtccccaccatgtcagctgcatttctggcgctcattgta 227

```

Abbildung 9:
Sequenzvergleich zwischen dem Klon SK 27 und der Nukleotidsequenz 10-217 von PRPB
 Es zeigt sich eine 97% ige Übereinstimmung der Nukleotidpositionen 70-277 des Klons SK 29 mit der Nukleotidsequenz 10-217 von PRPB mRNA. Identische Nukleotide sind durch Verbindungslinien dargestellt. Die für die Amplifikation verwendeten Primersequenzen D8/U1 sind unterstrichen.

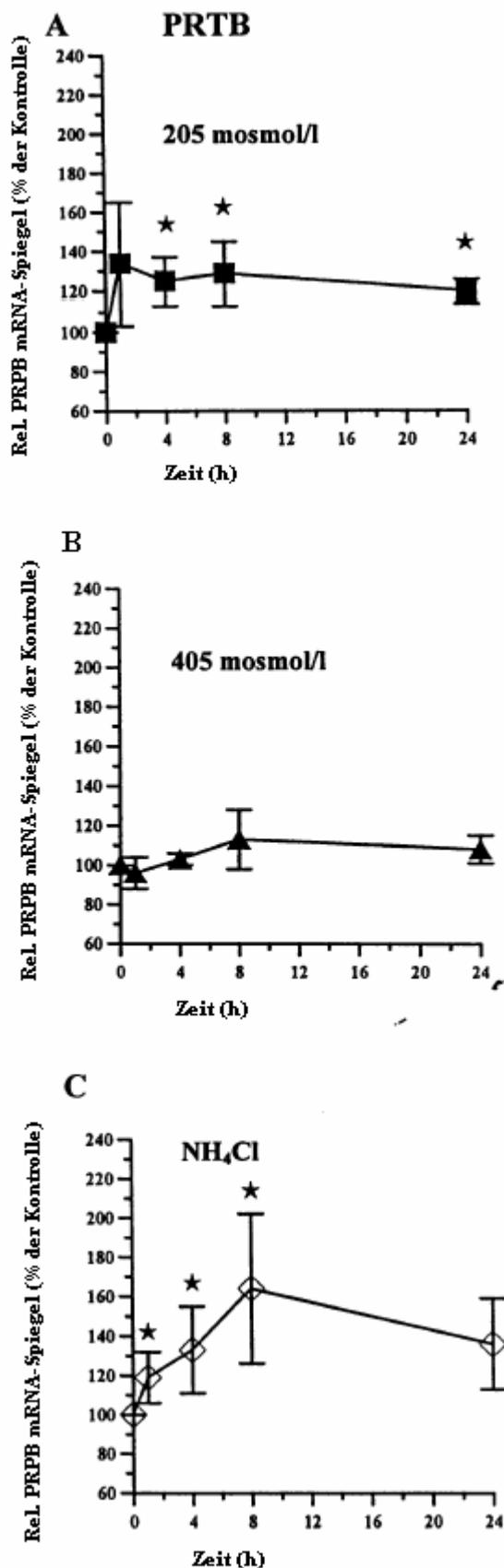


Abbildung 10:

Zeitlicher Verlauf der Effekte von Hypo- (oben), Hyperosmolarität (Mitte) und Ammoniak (unten) auf die PRPB-mRNA-Expression in Rattenastrozyten.

Die Zellen wurden in normoosmolarem Medium (305mosmol/l) mit oder ohne Ammoniumchlorid (5mmol/l), hypo- (205mosmol/l) oder hyperosmolarem (405mosmol/l) Medium inkubiert. Die Osmolarität wurde durch Veränderung der NaCl-Konzentration variiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA isoliert und eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Die mittleren mRNA-Werte wurden gleich 100 % gesetzt; alle anderen mittleren mRNA-Werte wurden in prozentualer Relation dazu angegeben. Die angegebenen Werte entsprechen \pm SEM und resultieren aus 4-5 verschiedenen Experimenten pro Versuchsbedingung. Mit einem * markierte Werte sind signifikant unterschiedlich vom Kontrollwert ($P < 0,05$).

PRPB zeigt signifikant erhöhte mRNA-Spiegel in hypoosmolar inkubierten Astrozyten sowie besonders unter dem Einfluss von Ammoniumchlorid.

IV. DISKUSSION

Die Hepatische Enzephalopathie (HE) als Funktionsstörung der Astrozyten tritt bereits frühzeitig im Rahmen einer Leberzirrhose auf. Aufgrund des unzureichenden hepatischen Stoffwechsels steigt die Konzentration an Ammoniak im Blut. Astrozyten sind als einzige Zellpopulation des ZNS in der Lage, zerebral akkumulierendes Ammoniak über eine Glutaminsynthese zu entgiften. Ansteigende Glutaminspiegel verursachen eine Astrozytenschwellung, die bereits vor klinischer Manifestation der HE bei Patienten mit Leberzirrhose auftritt (<19>, <45>, <82>).

Die Methode des DDRT-PCR wurde angewandt, um Gene in primären Rattenastrozyten zu identifizieren, die auf Veränderungen des Zellvolumens und/oder auf Ammoniumzugabe mit vermehrter bzw. verminderter Expression reagieren. Hohe Konzentrationen an Ammonium führen zu einer Zellschwellung, jedoch können diese den Zellstoffwechsel zusätzlich zellvolumenunabhängig beeinflussen (<74>). Nach Klonierung und Sequenzierung wurden 4 osmo- bzw. ammoniumabhängige Gene identifiziert, die im Datenbankvergleich Homologien mit bereits bekannten Genen zeigten: Diese kodieren für Elongin A, Clusterin, *kelch motif containing protein* (KMCP) und *prolin rich protein expressed in brain* (PRPB).

Die mRNA-Spiegel von Elongin A, Clusterin und PRPB zeigen unter dem Einfluss von Ammoniumchlorid und Hypoosmolarität eine relevante Zunahme ihrer Konzentration wie in Northern-Blot-Analysen gezeigt wurde. Die mRNA-Expression von KMCP ist osmoreguliert, wird aber durch Ammoniumchlorid nur unwesentlich beeinflusst.

Im Vergleich mit normoosmolaren Kontrollansätzen steigen die mRNA-Spiegel von Elongin A während Hypoosmolarität sowie in Ammoniumchlorid enthaltendem Medium an. Der Elongin-Komplex stimuliert die Rate von Transkription und Elongation der RNA-Polymerase II. Er besteht aus den Einheiten A, B und C mit weiteren Untereinheiten. Elongin A zeigt sich als die aktive Transkriptionskomponente und Elongin B und C als regulative Untereinheiten (<62>, <63>, <75>). Elongin A mRNA wird ubiquitär exprimiert, das Protein ist auf dem Zellkern lokalisiert. Die Vermutung, dass Elongin A in allen Genen zu einem Anstieg der mRNA-Kettenverlängerung führt, konnte durch in-vivo-Studien nicht bestätigt werden. Dennoch reguliert Elongin A die Transkription in zahlreichen Genen (<64>, <65>). Es ist nicht essentiell für die Lebensfähigkeit einer Zelle, jedoch notwendig für den geordneten Ablauf des Zellzyklus. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass Elongin A mRNA in Astrozyten vermehrt durch Hypoosmolarität und Ammonium exprimiert wird. Welche Bedeutung dies für die Transkription weiterer Gene hat, ist bisher nicht geklärt. Es wurde bereits die negative Beeinflussung durch das von Hippel-Lindau-

Tumorsuppressorprotein auf den Elongin-Komplex gezeigt: Es kann fest an den Elongin B/C-Komplex binden und somit die Aktivierung von Elongin A verhindern (<63>).

Clusterin ist ein sulfatisiertes Glykoprotein der Grössenordnung 70-80 kD. Es wird vor allem an Stellen von Gewebeschädigung oder bei zellulärem Stress exprimiert, was zu der Annahme führt, es spiele eine Rolle im Rahmen der Zytoprotektion (<67> bis <70>). Clusterin ist assoziiert mit Lipiden im Zytoplasma und in der Zerebrospinalflüssigkeit. Darüber hinaus wird es in Form von Lipidpartikeln von Hepato- und Astrozyten sezerniert. Seine cholesterinähnlichen Eigenschaften dienen offensichtlich als Proteinschutz unter Stressbedingungen. Ansteigende Clusterinkonzentrationen stehen in Verbindung mit dem programmierten Zelltod in verschiedenen Geweben (<67>, <68>). Clusterin wird außerdem vermehrt exprimiert bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen einschließlich Morbus Alzheimer, Epilepsie und Retinitis pigmentosa (<67>, <69>, <70>). Bei der Alzheimer-Erkrankung steigt die Clusterinexpression und das Protein wird in β -Amyloidablagerungen gefunden. Bei an Alzheimer erkrankten Patienten wurden in Biopsien von Cortex und Hippocampus um 40 % höhere Konzentrationen an Clusterin als in der Kontrolle gefunden (<69>, <70>). In der vorliegenden Studie wurde eine ammoniumchlorid- und hypoosmolaritätinduzierte Heraufregulierung der Clusterin-mRNA-Spiegel von etwa 30% in Astrozyten nachgewiesen. Es sollte angemerkt werden, dass diese Versuche nur einen Kurzzeiteffekt der für die HE relevanten Faktoren darstellen, da die Inkubationszeit maximal 24 Stunden betrug. Interessanterweise wurde berichtet, dass ähnlich wie Clusterin zwei weitere Apolipoproteine (D und E) Veränderungen in ihrer Expression im Gehirn der Ratte erfahren als Antwort auf Störungen der Zellfunktion (<76>, <77>). Bei Kompression des *Nervus Ischiadicus* beispielsweise steigt die Konzentration an Apolipoprotein D im Zuge der Regeneration des Nerven auf das 40-fache an gegenüber nicht geschädigten Ischiadicusnerven (<76>). Während der ZNS-Entwicklung steigt bei der Ratte die Konzentration an Apolipoprotein E an, aber, als spezifische Antwort auf Störungen z.B. des Zellstoffwechsels verschwindet dieses Protein plötzlich aus den Zellkernen der Astroglia (<77>).

Desweiteren identifizierte die vorliegende Arbeit KMCP als ein osmosensitives Gen in Astrozyten, welches offensichtlich nur wenig durch hohe extrazelluläre Ammoniumkonzentrationen beeinflusst wird. Sowohl hypo- als auch hyperosmolares Medium führen nach 1-24 Stunden zu bis zu 80 % höheren mRNA-Spiegeln als unter Normalbedingungen. KMCP-cDNA wurde unlängst aus menschlichem Gehirn isoliert und wurde bisher nur in der Genbank Database beschrieben (<59>). In der vorliegenden Studie

wurden 2 KMCP-mRNA Transkripte in Rattenstrozyten, Hoden und Niere entdeckt, aber nur eines fand sich im gesamten Hirngewebe. Im Duodenum, Leber und Milz wurde keine KMCP-mRNA Expression gefunden.

Die Funktion des KMCP ist bislang noch nicht geklärt. KMCP enthält mehrere sogenannte Kelchmotive, welche aus einem sechsblättrigen Tandemelement bestehen. Ein Kelchmotiv wurde als erstes in der Sequenz des Drosophila Kelch ORF 1 Proteins (<71>) identifiziert. Die wiederholten Kelchmotive erscheinen in zahlreichen verschiedenen Polypeptiden und enthalten zahlreiche potentielle Protein-Protein-Kontaktseiten. Mitglieder der Kelchrepeatsuperfamilie sind sowohl intrazellulär als auch membranständig und nehmen an zahlreichen Zellfunktionen teil: In der Koordination von Morphologie und Wachstum, in der Organisation von Plasmamembranen oder Organellstrukturen. Sie spielen eine Rolle in der Genexpression, werden von Viren benutzt und können so an der viralen Pathogenese beteiligt sein (<72>, <78>). Da einige dieser Mechanismen ebenso durch die Zellhydratation reguliert werden, ist es durchaus denkbar, dass KMCP ebenso in diesen osmoregulierten Stoffwechsel einbezogen ist. Weiterhin sind verschiedene Mitglieder der Kelchmotiv-Familie assoziiert mit Aktin und dem zytoskelettalen Netzwerk (<72>, <78>). Im Kontrast dazu führt eine Ammoniak induzierte Zellschwellung zu einer Herabregulierung von GFAP, einem astrozytenspezifischen intermediären Filamentprotein (<79>).

PRPB wurde bislang nur in verschiedenen Bereichen des Gehirns der Maus sowie in der humanen Myeloblasten-Zelllinie KG1 (<60>, <80>) identifiziert. Während der Embryogenese der Maus wird es außerdem im Verlaufe der Entwicklung des Herzens exprimiert (<60>). In der adulten Maus zeigt sich eine unterschiedlich starke Expression in den verschiedenen Bereichen des Gehirns, in anderen Geweben wird PRPB nicht exprimiert, so dass die Vermutung nahe liegt, dass PRPB von großer Bedeutung für die Gehirnfunktion ist (<60>). Andererseits zeigten PRPB-Knockout-Mäusen keine offensichtlichen Anomalien. Sie sind lebensfähig und fertil (<60>). Daraus lässt sich schließen, dass PRPB zumindest keine essentielle Funktion im Gehirn der Mäuse hat. In der vorliegenden Studie fanden sich 4 verschiedene Isoformen der PRPB-mRNA der Ratte und zwar nicht nur im Gehirn sondern auch in anderen Geweben. Hier sind weitere Untersuchungen angezeigt um die unterschiedlichen PRPB-mRNA Strukturen zwischen Ratte und Maus zu differenzieren. Wie die Bezeichnung schon nahelegt, ist die dominierende Aminosäure des PRPB-Proteins das Prolin mit 18 %. Prolinreiche Proteine kommen in zahlreichen Organismen vor. Einige von ihnen stellen Transkriptionsfaktoren dar (<73>). Diese Proteine weisen die Eigenschaft auf, hydrophobe Regionen innerhalb direkter Protein-Protein-Interaktionen zu bilden, d.h. sie

haben die Möglichkeit der Interaktion mit osmoregulativen Proteinen. Die genaue Identifikation der Funktion des PRPB bleibt noch zu detektieren, möglicherweise mit Hilfe der Genanalyse verwandter Gene.

Insgesamt zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die DDRT-PCR ein sinnvolles Werkzeug ist, um Veränderungen der mRNA-Spiegel in Rattenastrozyten zu analysieren. Die Identifikation von osmo- und ammoniumregulierten Genen offeriert die Möglichkeit, unerkannte molekulare Mechanismen der HE aufzudecken. Weiter Nachforschungen sind notwendig, um die Funktion der identifizierten Gene für die HE aufzuklären. Möglichkeiten bieten sich bereits in Form der cDNA-Arrays (<81>) und Genchips sowie eines in -vivo arbeitenden Modells.

V.) Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Gene in primären Astrozyten identifiziert, welche durch Veränderungen des Zellvolumens sowie unter dem Einfluss von Ammoniak Unterschiede in ihrer Expression aufweisen.

Im Rahmen der Leberzirrhose und hepatischen Enzephalopathie (HE) kommt den Astrozyten als Makroform der Neuroglia eine besondere Bedeutung zu: Als einzige Zellpopulation im ZNS vermögen sie Ammoniak, welches aufgrund des Entgiftungsdefizits der Leber vermehrt zerebral anflutet, zu eliminieren. Das dabei gebildete Glutamin führt jedoch zu einer Astrozytenschwellung, die nach der „swelling-Hypothese“ den Stoffaustausch beeinträchtigt. Ammoniak hat somit eine Schlüsselfunktion für die Entstehung und Progredienz der HE, weitere Faktoren sind jedoch ebenfalls von entscheidender Bedeutung. Die *differentielle mRNA-Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (DDRT-PCR)* ermöglicht die Detektion von Veränderungen der Genexpression unter verschiedenen Versuchsbedingungen. An isolierten primären Rattenastrozyten wurden die Auswirkungen von Zellvolumenänderungen sowie der Einfluss von Ammoniak auf die Genexpression untersucht. Dabei wurden vier, im Zusammenhang mit der HE bisher nicht bekannte Gene gefunden, die durch Veränderungen des Zellvolumens und/oder unter dem Einfluss von Ammoniak in ihrer Expression modulär wurden. Durch Sequenzvergleich mit der *NCBI*-Datenbank wurden sie als für Elongin A, Clusterin, *kelch motif containing protein* (KMCP) sowie *prolin rich protein expressed in brain* (PRPB) kodierend identifiziert. Die bisherigen Erkenntnisse zu diesen Proteinen lassen zum Teil entscheidende Funktionen im Organismus vermuten, so sind bereits erhöhte Clusterinspiegel im Rahmen anderer Erkrankungen des ZNS beschrieben. Elongin A ist als Transkriptionsfaktor im Zellzyklus von Bedeutung. KMCP hat zahlreiche intra- und extrazelluläre Funktionen und ist vermutlich auch in den osmoregulativen Stoffwechsel mit einbezogen. PRPB ist bislang nur wenig identifiziert, prolinreiche Proteine weisen jedoch hydrophobe Regionen auf, die insbesondere die Möglichkeit zur Interaktion mit osmoregulativen Proteinen haben.

Die Ergebnisse weisen die DDRT-PCR als geeignete Methode zur Analyse von Veränderungen der mRNA-Spiegel in Rattenastrozyten aus. Die Identifikation sowohl osmo- als auch ammoniumregulierter Gene offeriert die Möglichkeit, bisher unerkannte molekulare Mechanismen der HE zu identifizieren. Um die Funktion dieser identifizierten Gene im Zusammenhang mit der HE aufzuklären, sind weitere Nachforschungen im Rahmen eines *in-vivo* arbeitenden Modells notwendig.

VI.) Literaturverzeichnis

- < 1 > Bundesministerium für Gesundheit. Alkoholkonsum und alkoholbezogene Störungen in Deutschland. Schriftenreihe des BMG, Nomos-Verlag, 2000, Band 128.
- < 2 > Siegmund S, Teysen S, Singer MV. Alkoholassoziierte Organschäden: Gesundheitliche Folgen des moderaten Alkoholkonsums. *Der Internist* 2002, 43: 287-293.
- < 3 > Denk H. Toxische und medikamentöse Leberschäden. In: *Pathologie* (Herausgeber Böcker, Denk, Heitz) Urban&Schwarzenberg, 1997: 681 .
- < 4 > Norenberg MD. Astroglial dysfunction in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 1998, 13: 319-335.
- < 5 > Vaquero J, Chung C, Blei AT. Brain edema in acute liver failure: A window to the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Ann Hepatol* 2003, 2: 12-22.
- < 6 > Butterworth RF. Hepatic encephalopathy-a serious complication of alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health* 2003, 27: 240-246.
- < 7 > Shawcross DL, Balata S, Olde Damink SW, Hayes PC, Wardlaw J, Marshall I, Deut NE, Williams R, Jalan R. Low myo-inositol and high glutamine levels in brain are associated with neuropsychological deterioration after induced hyperammonemia. *Ann J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, 287: 503-509.
- < 8 > Ott P, Larsen FS. Blood-brain barrier permeability to ammonia in liver-failure: a critical reappraisal. *Neurochem Int* 2004, 44: 185-198.
- < 9 > Butterworth RF. Pathogenesis of hepatic encephalopathy: update on molecular mechanisms. *Indian J Gastroenterol* 2003, 22: 11-16
- <10 > Schliess F, Foster N, Görg B, Reinehr R, Häussinger D. Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes. *Glia* 2004, 47: 21-29.
- <11 > Kleihues P, Kiessling M, Wiestler O D. Toxische und metabolische ZNS-Schädigung. In: *Pathologie* (Herausgeber Böcker, Denk, Heitz) Urban&Schwarzenberg, 1997: 287-288.
- <12 > Jones EA. Ammonia, the GABA neurotransmitter system, and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2002, 17: 275-281.
- <13 > Ramadori G, Nolte W. Einteilung der Schweregrade einer hepatischen Enzephalopathie anhand des mentalen Status und neuromuskulärer Zeichen. In: *Innere Medizin* (Herausgeber Claassen, Diehl, Kochsiek) Urban&Schwarzenberg, 1998: 683, Tab.10.5-25.
- <14 > Murphy S. *Astrocytes—pharmacology and function.* San Diego: Academic Press, 1993.
- <15 > Nedergaard M. Direct signalling from astrocytes to neurons in

cultures of mammalian brain cells. *Science* 1994, 263:1768–1771.

- <16> Suarez I, Bodega G, Fernandez B. Glutamine synthetase in brain: effects of ammonia. *Neurochem Int* 2002, 41: 123-142.
- <17> Vaquero J, Chung C, Chahill ME. Pathogenesis of hepatic encephalopathy in acute liver failure. *Semin Liver Dis* 2003, 23: 259-270.
- <18> Brusilow SW. Hyperammonemic encephalopathy. *Medicine* 2002, 81: 240-249.
- <19> Häussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, vom Dahl S. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J Hepatol* 2000, 32: 1035–1038.
- <20> Häussinger D, Schliess F, Kircheis G. Pathogenesis of hepatic encephalopathy. *J Gastroenterol Hepatol* 2002, 17: 256-259.
- <21> Laubenberger J, Häussinger D, Bayer S, Gufler H, Hennig J, Langer M. Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain in symptomatic patients with liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1997, 112:1610–1616.
- <22> Norenberg MD, Baker L, Norenberg LOB, Blicharska J, Bruce-Gregorius JH, Neary JT. Ammonia-induced astrocyte swelling in primary culture. *Neurochem Res* 1991, 16: 833–836.
- <23> Norenberg MD, Bender AS. Astrocyte swelling in liver failure: role of glutamine and benzodiazepines. In: Ito U, editor. *Brain Edema IX*, Vienna 1994, 60: 24–27.
- <24> Kimelberg HK, Sankar P, O'Connor ER, Jalonen T, Goderic SK. Functional consequences of astrocyte swelling. *Prog Brain Res* 1992, 94: 57-68
- <25> Butterworth RF. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. *Metab Brain Dis* 2002, 17: 221-227.
- <26> Görg B, Foster N, Reinehr R et al.. Benzodiazepine-induced protein tyrosine nitration in rat astrocytes. *J Hepatol* 2003, 37: 334-342.
- <27> Chan H, Hazell AS, Desjardins P, Butterworth RF. Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurochem Int* 2000, 37: 243–248.
- <28> Knecht K, Michalak A, Rose C, Rothstein JD, Butterworth RF. Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neurosci Lett* 1997, 229: 201–203.
- <29> Häussinger D. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochem J* 1996, 313: 697–710.

- <30> Ferraris JD, Williams CK, Martin BM, Burg MB, Garcia-Perez A. Cloning, genomic organization, and osmotic response of the aldose reductase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 10742–10746.
- <31> Kwon HM, Yamauchi A, Uchida S, Preston AS, Garcia-Perez A, Burg MB, Handler S. Cloning of the cDNA for a Na⁺/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein. *J Biol Chem* 1992, 267: 6297–6301.
- <32> Warskulat U, Newsome W, Noe B, Stoll B, Häussinger D. Anisoosmotic regulation of hepatic gene expression. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1996, 267: 57–65.
- <33> Warskulat U, Weik C, Häussinger D. Myo-inositol is an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells) but not in RAW 264.7 mouse macrophages. *Biochem J* 1997, 326: 289–295.
- <34> Warskulat U, Zhang F, Häussinger D. Taurine is an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells). *J Hepatol* 1997, 26: 1340–3147.
- <35> Schliess F, Sinning R, Fischer R, Schmalenbach C, Häussinger D. Calcium-dependent activation of Erk-1 and Erk-2 following hypoosmotic astrocyte-swelling. *Biochem J* 1996, 320: 167–171.
- <36> Desjardins P, Belanger M, Butterworth RF. Alterations in expression of genes coding for key astrocytic proteins in acute liver failure. *J Neurosci Res* 2001, 66: 967-971.
- <37> Schliess F, Häussinger D. Hepatic encephalopathy and nitric oxide. *J Hepatol*, 2001, 34: 610-612
- <38> Master S, Gottstein J, Blei AT. Cerebral blood flow and the development of ammonia-induced brain edema in rats after portocaval anastomosis. *Hepatology* 1999, 30: 876-880.
- <39> Jalan R, Shawcross D, Davies N. The molecular pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Int J Biochem Cell Biol* 2003, 35: 1175-1180.
- <40> Murthy CR, Norenberg MD. Suppression of ammonia-induced swelling by aspartate but not by ornithine in primary cultures of rat astrocytes. *Neurochem Int* 2002, 41: 171-176.
- <41> Warren KS, Schenker S. Effect of an inhibitor of glutamine synthesis (methionine sulfoximine) on ammonia toxicity and metabolism. *J Lab Clin Med* 1964, 64: 442-449
- <42> Takahashi H, Koehler RC, Brusilow SW, Traystman RJ. Glutamine synthetase inhibition prevents cerebral oedema during hyperammonemia. *Acta Neurochir* 1990, 51: 346-347.

- <43> Isaacks RE, Bender AS, Kim CY, Shi YF, Norenberg MD. Effect of Ammonia and methionine sulfoximine on myo-inositol transport in cultured astrocytes. *Neurochem Res* 1999, 24: 51-59.
- <44> Willard MC, Koehler RC, Hirata T, Cork LC, Takahashi H, Traystman RJ, Brusilow SW. Inhibition of glutamine synthetase reduces ammonia-induced astrocyte swelling in rat. *Neuroscience* 1996, 71: 589-599.
- <45> Norenberg MD, Neary JT, Bender AS, Dombro RS. Hepatic encephalopathy: a disorder in glial-neuronal communication. In: Yu ACH, *Progress in brain research* 1992, 94: 261-269.
- <46> Zimmermann C R, Orr W C, Leclerc R F, Barnard E C, Timberlake W E. Molecular cloning and selection of genes regulated in *Aspergillus* development. *Cell* 1980, 21: 709-715.
- <47> St. John T P, Davis R W. Isolation of galactose-inducible DNA sequences from *Saccharomyces cerevisiae* by differential plaque filter hybridization. *Cell* 1979, 16: 443-452.
- <48> Strauss M, Hering S, Lubbe L, Griffin B E. Immortalization and transformation of human fibroblast by regulated expression of polyoma virus T antigens. *Oncogene* 1990, 5: 1223-1229.
- <49> Liang P, Pardee A B. Differential Display of Eucaryotic Messenger RNA by means of the Polymerase Chain Reaction. *Science* 1992, 257: 967-971.
- <50> Bauer D, Müller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P, Strauss M. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acid Research* 1993, 21: 4272-4280.
- <51> Matthiessen HP, Schmalenbach C, Müller HW. Astroglia-released neurite growth inducing activity for embryonic hippocampal neurons is associated with laminin bound in a sulfated complex and free fibronectin. *Glia* 1989, 2: 177-188.
- <52> Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press 1989.
- <53> Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidmann JG, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley & Sons 1994.
- <54> Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA Sequencing with chain termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977, 74: : 5463-5467.
- <55> Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci* 1988, 85: 2444-2448.
- <56> Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987, 162: 156-159.

- <57> Bradsher JN, Jackson KW, Conaway RC, Conaway JW. RNA polymerase II transcription factor SIII. I. Identification, purification, and properties. *J Biol Chem* 1993, 268: 25587–25593.
- <58> Collard MW, Griswold MD. Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells. *Biochem* 1987, 26: 3297–3303.
- <59> Yoshida K, Sugano S. Sequence published only in DataBase Acc. No. AB026190, 1999.
- <60> Yang W, Mansour SL. Expression and genetic analysis of *prtb*, a gene that encodes a highly conserved proline-rich protein expressed in brain. *Dev Dyn* 1999, 215: 108–116.
- <61> Warskulat U, Kreuels S, Müller HW, Häussinger D. Identification of osmosensitive and ammonia-regulated genes in rat astrocytes by northern blotting and differential display reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Hepatol* 2001, 35: 358–366.
- <62> Moreland RJ, Hanas JS, Conaway JW, Conaway RC. Mechanism of action of Polymerase II elongation factor Elongin. Maximal stimulation of elongation requires conversion of the early elongation complex to an Elongin-active form. *J Biol Chem* 1998, 273: 26610–26617.
- <63> Shilatifard A. Factors regulating the transcriptional elongation activity of RNA polymerase II. *FASEB J* 1998, 12: 1437–1446.
- <64> Tamura K, Miyata K, Sugahara K, Onishi S, Shuin T, Aso T. Identification of EloA-BP1, a novel Elongin A binding protein with an exonuclease homology domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 309: 189–195.
- <65> Yamazaki K, Aso T, Onishi Y, Ohno M, Tamura K, Shuin T, Kitajima S, Nakabeppu Y. Mammalian elongin A is not essential for cell viability but is required for proper cell cycle progression with limited alteration of gene expression. *J Biol Chem* 2003, 278: 13585–13589.
- <66> Michel D, Chabot JG, Moyse E, Danik M, Quirion R. Possible functions of a new genetic marker in central nervous system: the sulfated glycoprotein-2 (SGP-2). *Synapse* 1992, 11: 105–111.
- <67> Rosenberg ME, Silkensen J. Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *Int J Biochem Cell Biol* 1995, 27: 633–645.
- <68> Silkensen JR, Schwochau GB, Rosenberg ME. The role of clusterin in tissue injury. *Biochem Cell Biol* 1994, 72: 483–488.
- <69> Oda T, Pasinetti GM, Osterburg HH, Anderson C, Johnson SA, Finch CE. Purification and characterization of brain clusterin. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 204: 1131–1136.

- <70> Calero M, Rostagno A, Matsubara E, Zlokovic B, Frangione B, Ghiso J. Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech* 2000, 50: 305–315.
- <71> Xue F, Cooley L. Kelch encodes a component of intercellular bridges in *Drosophila* egg chambers. *Cell* 1993, 72: 681–693.
- <72> Adams J, Keso R, Cooley L. The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends Cell Biol* 2000, 10: 17–24.
- <73> Kay BK, Williamson MP, Sudol M. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* 2000, 14: 231–241.
- <74> Häussinger D, Kircheis G. Hepatische Enzephalopathie. *Praxis* 2002, 91: 957-963.
- <75> Aso T, Lane WS, Conaway JW, Conaway RC. Elongin (SIII): a multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II. *Science* 1995, 269: 1439–1443.
- <76> Spreyer P, Schaal H, Kuhn G, Rothe T, Unterbeck A, Olek K, Müller HW. Regeneration-associated high level expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of peripheral nerve. *EMBO J* 1990, 9: 2479–2484.
- <77> Stoll G, Muller HW. Macrophages in the peripheral nervous system and astroglia in the central nervous system of rat commonly express apolipoprotein E during development but differ in their response to injury. *Neurosci Lett* 1986, 72: 233–238.
- <78> Goode BL, Drubin DG, Barnes G. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol* 2000, 12: 63–71.
- <79> Neary JT, Whittemore SR, Zhu Q, Norenberg MD. Destabilization of glial fibrillary acidic protein mRNA in astrocytes by ammonia and protection by extracellular ATP. *J Neurochem* 1994, 63: 2021–2022.
- <80> Nomura N, Nagase T, Miyajima N, Sazuka T, Tanaka A, Sato S, et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. II. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0041-KIAA0060) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1. *DNA Res* 1994, 1:223–229.
- <81> Warskulat U, Görg B, Bidmon HJ, Müller HW, Schliess S, Häussinger D. Ammonia-induced heme-oxygenase-1 expression in cultured rat astrocytes and rat brain in vivo. *Glia* 2002, 40: 324 - 336.
- <82> Häussinger D, Warskulat U, Fischer F, Sinning R, Schliess F. Hepatic encephalopathy. In: *Update on Hepatobiliary Diseases* (ed. by Lam, Paumgartner, Wang). Kluwer academic publishers, Lancaster, United Kingdom, 1996.

VII.) Anhang

cDNA-Produkte, nach Klonierung sequenziert, bisher ohne Homologien:

Sequenzen der übrigen 10 cDNA-Fragmente, für die bisher in der NCBI-Datenbank keine relevanten Übereinstimmungen mit bereits bekannten Genen gefunden werden konnten. Die Buchstaben A, C, G und T stehen für die Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin, aus denen sich DNA zusammensetzt.

SK 1 (DNA-Fragmentlänge 351 bp):

```
GATCACGTACCCAGTTTACAAGTAGAGTTAGAAGGTAATTCAGGAGTTGTGCC
CTCCCTTCACTGAGAGGATTTTCAGAGATAAAACCCAGGTTGTCAGTCTTGATGGC
AAATGCTTATACACACTGAATCATCTCACGGGCTTGGAAATTTTTATTNATTTTTAA
ATGTTCAATTTACAACACTCAATGACTTTTTGGATGACATTTTCATACATAAATATCAT
CACACACTTTTCTTAGTGAGTCTTTAAAAATCTATGTGTAGGCATATATTTGTGTG
TTTGGGTGTGCACGCGCATATGTGTGTGCCTGCATGTATGTATATATGTGTGTTG
TACGTGATCAAGGGCGAATTC
```

SK 10 (DNA-Fragmentlänge 265 bp):

```
TATAGAAAATAGTNNAANGATGTCCCGANATNNNATNCACGCCGGAGACCGTAN
TNNGACNGACCGTGGCATTGTTGATNCNGNTTTNNGATCNCCCNGCNANTTCCNT
GTNAGTAGAANTCNCANTCCCCTCAANTGGAATCTGTNGNNTGACATCTTCTTNN
ATCNGANTGNGGTCTNATTCTATCCCTGCNTGCTACTNNCANATTGGNANCCTGA
ANTCTTTTTCATANCCCGGGTTCNCTTTCCACCAGAGCNTAGGTC
```

SK 14 (DNA-Fragmentlänge 288 bp):

```
GATCATGGTCTCAACNCNAAAGACAACCTNTCAACTTCNCACTTGTGGNCACTTT
CCTCCCTCANCCNTCACAAATCCAGGAACATGCNCAGTGNACCTGGTNCTTAGC
AAGGTGGGTNNGTGAACCGGGTGATTGCTTGTCTTTAGACTCNAAGCNCCGAGGA
AATCACAAGNTCACTANGGAACANTAACANACNAACCNTCGAACCANAAACCAA
AGGCNATGTGTCTGCATCCNAATTTCTGCTTTGAGCTTTACAGCACCCACGAACCTC
ATCTTCCCGGAAC
```

SK 16 (DNA-Fragmentlänge 176 bp):

```
GCCCTTTATTTTTTTTTGGNCCATTGAAANTATNNTATCCNTCCNTCCAGANTGAC
NNATAAANNATGGATTTTGTATTNATNGTCCGATGAANAATCTAAAATTGCTT
GAAACAGATTTNATCNCNCCCACNGTNTTAANCGGGGGANGANTGGGGANCATT
TTAAATATGG
```

SK 17 (DNA-Fragmentlänge 162 bp):

TGATCACGTACAGGAAGAANGTGTTTGCTTCGCGCTGGGTNCANGGTNTGTTCTT
GAAGCACANGGAAANATTCTAGAGAANATANTCAAAAAATGTCAGATNATCCAC
TCCACACCGGATANTGTGACTGACAGATTGTGGNATTGTTGATATAATTTCA

SK 21 (DNA-Fragmentlänge 174 bp):

TGGATTGGNCNCNAAACCTCTAAANANGATAAGGGAAAGTANATCAGAAGNNTC
NGTACTANAGTATACGTNTNCNGANANGTNAGGACNCANGCGTGTCCANATAGA
GTTCTNATTCTGANCTCCTGTGGGCAGGTTNATNCCACNCTGNCNCNTTCTGGACT
AACCAGGAC

SK 23 (DNA-Fragmentlänge 321 bp):

TGGATTGGTCGGTGTCATTTGATGAACTACACAGGCAGAACTAATANAGTACGAG
TCAATGTCCAGTTTATTCATTAACACTACGCTTGACACGTATGAATCACACAGACTGT
GTCCGTAAATAGACTAGACATATAATAAATATTGATTCANNCTTGCTNTATANA
ACTTTAAATTAGGTATATACGTTCTCCNTTCNAGTGAAACAAANAAAATGATGTC
NAAGGAGTTTCNTGTATATCACCAAGTAAAATGATATGGAGACAANTGGCTGGGT
GGAGCTTATCTGANAGAAAGAGAACTGTGAAATGTGAGCCCACGTC

SK 27 (DNA-Fragmentlänge 236 bp):

TACAACNAGGCGCCNAGAAATGCAACTGNTNTGGTGGGGACTGTGGCTACCCCN
GCTATTAACAAATCTTGGAAAANCAATCTCTNANTATACNTGTGGAGCACCCTA
GCTGGTGGCAGCCTGAGGAATATGTCNNGGTCTGACGAAATNCTGGACTCCCAGNA
NGNTGCACCCGGTGGGTNCGCNGTNTCNGATATTGTCCTCTGCNTGTTTCATGGTG
GGGACTGTGGCAGGCC

SK 34 (DNA-Fragmentlänge 340 bp):

CTTTCTACCCTGCCTTGTATCACTTGATATCAAACCTATAGGTACTTTTCCCTGTTCT
TAAGTATTTATTAACAAACATAACTTACAATAATTATATAATGTNTCATTATTTTA
TTTGATAATTTTATTTTTGTTGANACATAGCAAGCNTTTCATTTTCATCTNATTTT
TCACTATAAATAATATGGCAAAAAAAAAAAAAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCA
TCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTANAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTG
AGTCGTATTACAATTCNCTGGCCGTCGTTTTACNACGTCGTGACTGGGAAAACCCCT
GGCGTTACC

SK 38 (*DNA-Fragmentlänge 203 bp*):

TACANNGAGGCGCCAGGAAATGCAGCTGACATGGTGGGGACTGTGGCAGCCCCT
GGATGAACAAAGCTTGGACGATAGAGCTCTGAGTATGCAGGTGGAGCATCAGTA
TAGGGTGGAGCCTGAGGAAGATGTAAGGTCTGAGGATATACTGGATTCCCAGGA
GGCTGCACAGGGTAGGTAGGCTGTGTTGGGCAAANAA

VIII.) Abkürzungen:

A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestillata
bp	Basenpaar
C	Cytosin
cDNA	copyDNA
C°	Grad Celcius
ca.	circa
CO ₂	Kohlendioxid
d	Tag
DDRT-PCR	<i>differential display reverse transkriptase-polymerase chain reaction</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
ddNTP	Dideoxynucleosidtriphosphat
Eco R I	<i>Escherichia coli</i> Restriktionsendonuklease I
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz
EtBr	Ethidiumbromid
FBS	fötale Rinderserum
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFA	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
h	Stunde
HE	Hepatische Enzephalopathie
kb	Kilobasen
kD	Kilo-Dalton
KCl	Kaliumchlorid
KMCP	<i>kelch motif containing protein</i>
LB	<i>Luria Bertani</i>
m	milli
M	molar
mA	milli-Ampere

MgCl	Magnesiumchlorid
min.	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
Na-Acetat	Natriumacetat
NCBI	<i>national center for biotechnology information</i>
NIH	<i>national institute of health</i>
ng	Nanogramm
PAA	Polyacrylamid
PBS	Kalzium-freier Phosphatpuffer
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PRPB	<i>prolin rich protein expressed in brain</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
sec.	Sekunde
T	Thymin
TAE	Tris/Acid/EDTA
TBE	Tris/Borat/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	Tris-Salzsäure
U	Units
UV-Licht	Ultraviolettlicht
V	Volt
Vol	Volumen
W	Watt
ZNS	Zentralnervensystem
μ	mikro

IX.) Danksagung

Ich bedanke mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr.med.Dieter Häussinger für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für wertvolle Ratschläge bei der Durchführung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.Doz.Dr.rer.nat.Ulrich Warskulat für seine hervorragende fachliche Anleitung und Betreuung sowie die Bereitstellung der Northern-Blot-Analysen.

Herrn Prof.Dr.med.Hans-Werner Müller (Neurologische Klinik, Düsseldorf) danke ich für die Zusammenarbeit und das zur Verfügung gestellte Zellmaterial.

Allen Mitarbeitern des Labors für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie danke ich für ihr Interesse, rege Diskussionen, Unterstützung und Hilfestellung.

Vielen Dank außerdem an Frau Dr.rer.nat.Carola Schade für die Unterstützung bei speziellen Fragestellungen.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Familie, insbesondere meinem Freund Cäsar Jablonsky sowie meinen lieben Kommilitoninnen und Freundinnen Christiane Wirtz, Andrea Reinen, Katja Kröger und Sabine Braasch für die langjährige Treue und moralische Unterstützung !

X.) Lebenslauf

- 30.04.1971 geboren in Viersen
- 08/77 - 06/81 Besuch der katholischen Grundschule Tönisvorst-Vorst
- 08/81 - 06/91 Besuch des Gymnasiums Liebfrauenschule Grefrath-Mülhausen
- 18.06.1991 Abitur
- 10/91 -10/93 Lehranstalt für Diätassistenten, Medizinische Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- 23.09.1993 Staatliches Examen als Diätassistentin
- 11/93 - 08/94 Diätassistentin im St.Vinzenz-Krankenhaus, Düsseldorf
- 09/94 - 12/94 Gasthörerin Philosophische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- 01/95 - 12/95 Sprechstundenhilfe bei Dr.med.Lorrain, Düsseldorf
- 01/96 - 03/96 Diätassistentin im St. Vinzenz-Krankenhaus, Düsseldorf
- 04/96 - 10/02 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- 30.10.2002 3. Staatsexamen, Evangelisches Krankenhaus Bethesda, Duisburg
Wahlfach: Orthopädie
- 02/02 - 08/03 Ärztin im Praktikum, Klinik für Hand- und Unfallchirurgie
Florence-Nightingale Krankenhaus, Düsseldorf
- seit 01.12.04 Assistenzärztin, Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
Marienhospital, Bottrop

XI.) Zusammenfassung der Dissertation (Abstract)

Die hepatische Enzephalopathie als Funktionsstörung der Astrozyten:

Identifikation osmo- und ammoniumregulierter Gene mittels differentieller mRNA-Analyse

In der vorliegenden Arbeit wurden Gene in primären Astrozyten identifiziert, welche durch Veränderungen des Zellvolumens sowie unter dem Einfluss von Ammoniak Unterschiede in ihrer Expression erfahren.

Im Rahmen der Leberzirrhose und hepatischen Enzephalopathie (HE) kommt den Astrozyten als Makroform der Neuroglia eine besondere Bedeutung zu: Als einzige Zellpopulation im Zentralnervensystem (ZNS) vermögen sie Ammoniak, welches aufgrund des Entgiftungsdefizits der Leber vermehrt zerebral anflutet, zu eliminieren. Das dabei gebildete Glutamin führt jedoch zu einer Astrozytenschwellung, die nach der „swelling-Hypothese“ den Stoffaustausch beeinträchtigt. Ammoniak hat somit eine Schlüsselfunktion für die Entstehung und Progredienz der HE, weitere Faktoren sind jedoch ebenfalls von entscheidender Bedeutung. Die *differentielle mRNA-Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (DDRT-PCR)* ermöglicht die Detektion von Veränderungen der Genexpression unter verschiedenen Versuchsbedingungen. An isolierten primären Rattenastrozyten wurden die Auswirkungen von Zellvolumenänderungen sowie der Einfluss von Ammoniak auf die Genexpression untersucht. Dabei wurden vier, im Zusammenhang mit der HE bisher nicht bekannte Gene gefunden, die durch Veränderungen des Zellvolumens und/oder unter dem Einfluss von Ammoniak in ihrer Expression moduliert wurden. Durch Sequenzvergleich mit der *NCBI*-Datenbank (national center for biotechnology information) wurden sie als für *Elongin A*, *Clusterin*, *kelch motif containing protein* (KMCP) sowie *prolin rich protein expressed in brain* (PRPB) kodierend identifiziert. Die bisherigen Erkenntnisse zu diesen Proteinen lassen zum Teil entscheidende Funktionen im Organismus vermuten, so sind bereits erhöhte Clusterinspiegel im Rahmen anderer Erkrankungen des ZNS beschrieben. *Elongin A* ist als Transkriptionsfaktor im Zellzyklus von Bedeutung. KMCP hat zahlreiche intra- und extrazelluläre Funktionen und ist vermutlich auch in den osmoregulativen Stoffwechsel mit einbezogen. PRPB ist bislang nur wenig charakterisiert, prolinreiche Proteine weisen jedoch hydrophobe Regionen auf, die insbesondere die Möglichkeit zur Interaktion mit osmoregulativen Proteinen haben.

Die Ergebnisse weisen die DDRT-PCR als geeignete Methode zur Analyse von Veränderungen der mRNA-Spiegel in Rattenastrozyten aus. Die Identifikation sowohl osmo- als auch ammoniumregulierter Gene offeriert die Möglichkeit, bisher unerkannte molekulare Mechanismen der HE zu identifizieren. Um die Funktion dieser identifizierten Gene im Zusammenhang mit der HE aufzuklären, sind weitere Nachforschungen im Rahmen eines in-vivo arbeitenden Modells notwendig.

Düsseldorf, den 13.05.2005

genehmigt:

Priv. Doz. Dr. rer.nat. U. Warskulat