HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Expression von Biomarkern für Seneszenz in mit Ammoniak-behandelten Rattenastrozyten und in humanem *post mortem* Hirnmaterial von Leberzirrhosepatienten mit und ohne hepatischer Enzephalopathie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ayse Karababa

aus Wuppertal

Juli 2014

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Dieter Häussinger

Korreferent: Prof. Dr. William Martin

Tag der mündlichen Prüfung:

Auszüge aus dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

als Posterbeitrag

Karababa, A.; Görg, B.; Häussinger, D. Seneszenzmarker in mit Ammoniak behandelten kultivierten Rattenastrozyten und *post mortem* Hirngewebe von Leberzirrhosepatienten mit Hepatischer Enzephalopathie. Januar 2014, Tübingen.

in Originalarbeiten

Görg, B.; Karababa, A.; Shafigullina, A.; Bidmon, H.J.; Häussinger, D. (2014): Ammonia-induced senescence in cultured rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. Glia (akzeptiert).

Für meine Familie

und

im Gedenken an meinen Großvater
Mehmet Serbet

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1	HE-präzipitierende Faktoren.	**2**
2	Unterteilung der Schweregrade der HE nach West-Haven-Kriterien.	**4**
3	Pathogenesemodell zur hepatischen Enzephalopathie.	**10**
4	Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus verschiedener Isoformen des TrkB Rezeptors.	**12**
5	Schematische Darstellung des Zellzyklus (A) und der einzelnen Mitosephasen (B).	**16**
6	Regulation des Zellzyklus durch Cyclin/CDK-Komplexe und beteiligte Inhibitoren.	**18**
7	Übersicht seneszenzauslösender Faktoren.	**25**
8	Delta-Delta-C_t ($\Delta\Delta C_t$)Methode zur relativen Quantifizierung.	**44**
9	Schematische Darstellung der enzymatischen Umsetzung von X-Gal durch die β-Galaktosidase.	**48**
10	Strukturformel von 5-*Dodecanoylaminofluorescein-di*-β-*D-galactopyranoside* (C_{12}FDG) und 5-*Dodecanoylaminofluorescein* (C_{12}F).	**48**
11	Schematische Darstellung der Laktatdehydrogenase (LDH)-katalysierten Reaktionen.	**49**
12	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies mittels *MitoSOX™ Red*.	**52**
13	Strukturformel von (A) Hoechst34580 und (B) *MitoTracker® Green*.	**52**
14	Einfluss von NH_4Cl auf die Astrozytenvitalität.	**59**
15	Wirkung von NH_4Cl auf Apoptose kultivierter Rattenastrozyten.	**61**
16	Messung des DNA Gehalts in unbehandelten oder mit NH_4Cl-behandelten kultivierten Rattenastrozyten.	**62**
17	Wirkung von Ammoniak auf die Proliferation kultivierter Rattenastrozyten.	**63**
18	Pharmakologische Charakterisierung der durch Ammoniak vermittelten Proliferationshemmung kultivierter Rattenastrozyten.	**65**

19	Wirkung von CH_3NH_3Cl und FCS auf die Astrozytenproliferation.	**66**
20 und 21	Einfluss von Ammoniak auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in kultivierten Rattenastrozyten.	**67-68**
22	Subzelluläre Lokalisation der ROS Bildung in NH_4Cl-behandelten kultivierten Rattenastrozyten.	**69**
23	Nachweis mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies Bildung in kultivierten Rattenastrozyten.	**70**
24 und 25	Einfluss von Ammoniak auf die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase in kultivierten Rattenastrozyten.	**71-72**
26	Einfluss von NH_4Cl auf die Phosphorylierung und intrazelluläre Lokalisation von p53 in kultivierten Rattenastrozyten.	**73**
27	Pharmakologische Charakterisierung der durch NH_4Cl-vermittelten p53-Serinphosphorylierung.	**74**
28	Einfluss von Ammoniak auf die mRNA Expressionslevel Seneszenz-assoziierter Gene in kultivierten Rattenastrozyten.	**75-76**
29	Pharmakologische Charakterisierung NH_4Cl-induzierter Expressionsänderungen Seneszenz-assoziierter Gene.	**77**
30	Einfluss von Ammoniak auf die Expression und zelluläre Lokalisation des p21 Proteins.	**79**
31	Pharmakologische Charakterisierung der durch NH_4Cl-vermittelten Expressionssteigerung des p21 Proteins.	**80**
32	Wirkung von NH_4Cl auf die Expression des TrkB-Rezeptors in kultivierten Rattenastrozyten.	**81-82**
33	Schematische Darstellung des experimentellen Versuchsablaufs zur Überprüfung der Wirkung von NH_4Cl auf die durch BDNF-induzierbare Proliferation.	**82**
34	Einfluss von NH_4Cl auf die BDNF-vermittelte Proliferation kultivierter Rattenastrozyten.	**83**
35	Einfluss von BDNF auf die Zellmorphologie kultivierter Rattenastrozyten.	**84**
36	Einfluss von NH_4Cl auf die BDNF-vermittelte Änderung des G-und F-Aktingehalts kultivierter Rattenastrozyten.	**85**
37	Wirkung von NH_4Cl auf die Expression des EGF-Rezeptors in kultivierten Rattenastrozyten.	**86-87**
38	Schematische Darstellung des experimentellen Versuchsablaufs zur Überprüfung der Wirkung von NH_4Cl auf die durch EGF- induzierbare Proliferation.	**87**

39	Einfluss von NH_4Cl auf die EGF-vermittelte Proliferation kultivierter Rattenastrozyten.	**88**
40	Expressionslevel der Seneszenz-assoziierten Gene GADD45α, p53, p21 und p27 in humanem *post mortem* Hirngewebe von Kontrollpatienten und Patienten mit Leberzirrhose mit und ohne HE.	**89-90**
41	Korrelation der mRNA Expressionslevel von p53 und GADD45α in humanem *post mortem* Hirngewebe vom Patienten mit Leberzirrhose mit HE.	**90**
42	Expressionslevel der mit Seneszenz-assoziierten Gene GADD45α und p21 in humanem *post mortem* Hirngewebe von Kontrollpatienten und Patienten mit Leberzirrhose mit und ohne HE.	**91**
43	Mechanismen der durch Ammoniak induzierten Seneszenz in kultivierten Rattenastrozyten.	**99**

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
1	Übersicht der verwendeten Primär-und Sekundärantikörper.	**30-31**
2	Übersicht der verwendeten Realtime-PCR Primer.	**35-36**
3	Zusammensetzung der Lösungen für die Herstellung von PAA-Gelen.	**39**
4	Reaktionsgemisch für die Realtime-PCR.	**43**
5	Verwendete Einstellungen bei der Durchführung der Realtime-PCR.	**43**
6	Patientendemographie, Todesursache und Ätiologie der Zirrhose bei Leberzirrhosepatienten mit oder ohne HE.	**55-56**
7	Leber- und Gehirnpathologie und Begleiterkrankungen bei Kontrollpatienten und Patienten mit Leberzirrhose mit oder ohne HE.	**56-57**
8	Reversibilität der durch NH_4Cl-vermittelten Wachstumshemmung kultivierter Rattenastrozyten.	**64**
9	Pharmakologische Charakterisierung der durch NH_4Cl-induzierten Expressionsänderung der Lamine A und B1.	**78**

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ANOVA	*Analysis of variance*, Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA-AM	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N´,N´-tetraazetat azetoxymethyl ester
Bcl-2	*B-cell lymphoma 2*, B-Zell Lymphom 2
BDB	DNA-Bindungsdomäne
BDL	*Bile duct ligation*; Gallengangsligatur
BDNF	*Brain derived neurotrophic factor*, vom Gehirn stammender neurotropher Faktor
Bp	Basenpaar/e
BSA	*Bovine serum albumin* ; Rinderserum
C_{12}FDG	*5-dodecanoylaminofluorescein di-ß-D-galactopyransoide*
Ca^{2+}	Kalzium
CDK	*Cyclin-dependent kinase*, Cyclin-abhängige Kinase
CDKI	*Cyclin-dependent kinase inhibitor*, Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen
cDNA	*copy desoxyribonucleic acid*; Komlementäre Desoxyribonukleinsäure
C/EBPα	*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*, CCAAT/verstärkte-Proteinbindung alpha
C/EBPβ	*CCAAT/enhancer-binding protein beta*, CCAAT/verstärkte-Proteinbindung beta
CH_3NH_3Cl	Methylammoniumchlorid
Cip/Kip	*CDK inhibitory polypeptides/kinase inhibitory proteins* CDK-inhibitorisches Peptid/ Kinase-inhibitorisches Protein
CNTF	*Ciliary neurotrophic factor*, Ciliare neurotrophe Faktor
CR1/CR2	Cystein reiche Subdomäne 1 bzw. 2
Cy3	Indocarbozyanin
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	*Enhanced chemiluminescence*, verbesserte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGF	*Epidermal growth factor*, Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	*Epidermal growth factor receptor*, Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraazetat
Erk	Extrazellular Signal-regulierte Kinase
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FCS	*Fetal calf sera*; fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GABA	γ-Aminobuttersäure
GADD45α	*Growth-arrest and DNA damage-induicible protein 45 alpha*, Wachstumsstillstand- und DNA-Schaden-induzierbares Protein 45 alpha
G-Aktin	Globuläres Aktin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GlcNac	N-azetyl-Glukosamin
GS	Glutaminsynthetase
h	*Hora*, Stunde(n)
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HE	Hepatische Enzephalopathie
HPRT1	Hypoxanthine ribosyl transferase 1
HRPOD	Meerrettich Peroxidase
IF	Immunofluoreszenz
IGF	*Insulin-like growth factor*, Insulinähnliche Wachstumsfaktoren
INK4	*Inhibitor of CDK4*, CDK4 Inhibitor
kDa	Kilodalton
L1/L2	Leucin-reiche L-Subdomäne
LAS2	*Lysis and F-actin Stabilization* 2, Lyse und F-Aktin Stabilisierung 2

LDH	Laktatdehydrogenase
LSM	Laser-Scanning Mikroskop
MAP	*Mitogen-activated protein*, Mitogen-aktiviertes Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
mBDNF	*mature Brain derived neurotrophic factor*
mdm2	*Murine double minute gen2*
Min	Minute(n)
MPT	*Mitochondrial permeability transition*, mitochondrialer Permeabilitätstransition
MR	Magnetresonanz
mRNA	*Messenger ribonucleic acid*, Messenger-Ribonukleinsäure
MSO	Methioninsulfoximin
MTF-1	Metall-responsiver Transkriptionsfaktor 1
MTK1/MEKK4	*Mitogen-activated protein kinase kinase 4*
NaCl	Natriumchlorid
NAD^+	Nicotinamide adenine dinukleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinukleotide phosphat
NaF	Natriumfluorid
NGF	*Nerve growth factor*, Nervenwachstumsfaktor
NH_3	Ammoniak
NH_4^+	Ammonium
NH_4Cl	Ammoniumchlorid
NKCC1	Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter
NLS	*Nuclear localization signal*, Kernlokalisierungssignal
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NSW	*New South Wales*
NT	Neurotrophin
NTF	Neurotrophe Faktoren
O_2^-	Anionradikal
OH	Hydroxylradikal

OIS	Onkogen-induzierte Seneszenz
P16/CDKN2A	*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*
p21/CDK1	*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1*
p27/CDK1B	*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*
p38	Proteinkinase 38
$p38^{MAPK}$	*p38 mitogen-activated protein kinase*, Mitogen-aktivierte Protein Kinase p38
p53	Tumorsuppressorprotein p53
p53R2/RRM2B	*Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 B*
p.a	*pro analysi*
PAA	Polyacrylamid
PBR	Peripherer Benzodiazepinrezeptor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	*Proliferating cell nuclear antigen*
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDL	Poly-D-Lysin
pH	*Potentia hydrogenii*
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC	Phospholipase
PNS	Peripheres Nervensystem
p-p53	Phosphoprotein p53
pRb, Rb	Retinoblastom-Protein
*pro*BDNF	*Pro Brain derived neurotrophic factor*
PTN	Proteintyrosinnitrierung
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
Ras	*Rat sarcoma*
RNA	Ribonukleinsäure
RNOS	Reaktive Stick- und Sauerstoff Spezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	R*ounds per minute*, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	*Realtime* PCR, Echtzeit-PCR

SA-β-Gal	Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase
SD	Standartabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	*Standard error of the mean*; Standardfehler des Mittelwertes
SHE	Subklinische hepatische Enzephalopathie
SP1	Spezifitätsprotein-1
SR-SIM	*Super resolution structured illumination mikroskopy*
STAT	*Signal Transducers and Activators of Transcription*, Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
Tab	Tabelle
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBS-T	*Tris buffered saline - tween20*
TdT	Terminale Deoxynukleotidtransferase
TEMED	N,N,N‘,N‘-tetramethylendiamin
TGF-β	*Transforming Growth Factor* β, Transformierender Wachstumsfaktor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
tPA	*tissue type plasminogen activator*, gewebespezifischer Plasminogenaktivator
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminoethan
TrkB	Tyrosinrezeptorkinase B
$TrkB_{FL}$	*Full length TrkB*; TrkB-Kinase
$TrkB_T$	Trunkierte Form des TrkB
TUNEL	*Terminal-Transferase-Uridine-Nick-End Labeling*
U	Unit
w/o	W*ithout*
WB	Western-Blot
X-Gal	*5-Brom-4-chlor-3-indolyl*-β-*D-galactopyranosid*
ZNS	Zentralnervensystem

Die Standardeinheiten des SI-Systems wurden nicht aufgenommen. Fremdsprachige Begriffe sind kursiv dargestellt.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis I

Tabellenverzeichnis III

Abkürzungsverzeichnis IV

1. Einleitung 1

1.1 Hepatische Enzephalopathie 1
1.1.1 Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie 4
1.1.2 Oxidativer/nitrosativer Stress bei der hepatischen Enzephalopathie (HE) 7
1.1.3 Funktionale Konsequenzen der Wechselwirkung von osmotischem und oxidativem Stress in Astrozyten 8
1.2 Neurotrophe Faktoren (NTF) 10
1.2.1 Der TrkB-Rezeptor 11
1.2.2 Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) 12
1.3 Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) 14
1.3.1 Der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) 15
1.4 Proliferation, Zellzyklus und Zellteilung 15
1.4.1 Ablauf des Zellzyklus 16
1.4.2 Die Regulation des Zellzyklus 17
1.4.3 Antimitogene Faktoren: Das Tumorsuppressorprotein p53 21
1.4.4 Antimitogene Faktoren: Growth arrest and DNA damage-inducible protein α 23
1.5 Zelluläre Seneszenz 24
1.5.1 Arbeitshypothese: Astrozytenseneszenz bei der hepatischen Enzephalopathie 27
1.6 Zielsetzung der Arbeit 27

2. Material und Methoden 28

2.1 Material 28
2.1.1 Chemikalien 28
2.1.2 Antikörper 30
2.1.3 Molekularbiologische Kits 31
2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen 32
2.1.5 Spezielle Materialien und Geräte 33
2.1.6 Oligonukleotide für die Realtime-PCR (Primer) 35

2.2 Methoden 37
2.2.1 Präparation und Kultivierung von Astrozyten aus dem zerebralen Rattenkortex 37
2.2.2 Western-Blot Analyse 38
2.2.3 Densitometrische Quantifizierung 42
2.2.4 Realtime-PCR 42
2.2.5 Immunfluoreszenzanalyse 44
2.2.6 ELYRA-Superhochauflösende Mikroskopie 45
2.2.7 VivaTome^{TM} Mikroskopie 45
2.2.8 Astrozytenproliferation 46
2.2.9 ß-Galaktosidaseaktivität 47

2.2.10 Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) Aktivität 49
2.2.11 TUNEL Färbung 50
2.2.12 Nachweis der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies mittels *MitoSOX*^{TM} 51
2.2.13 Aktinpolymerisation 53
2.2.14 Deglykosylierung 54
2.2.15 *Post mortem* Hirngewebe 55
2.2.16 Array-basierte Transkriptomanalyse 57
2.2.17 Statistische Auswertung 58

3. Ergebnisse 59

3.1 Einfluss von Ammoniak auf die Vitalität kultivierter Rattenastrozyten 59
3.1.1 Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand 59
3.1.2 Nachweis von Apoptose in kultivierten Rattenastrozyten 60
3.2 Einfluss von Ammoniak auf die Proliferation kultivierter Rattenastrozyten 62
3.2.1 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit und Reversibilitätstest 62
3.2.2 Pharmakologische Charakterisierung der NH_4Cl-vermittelten Proliferationshemmung kultivierter Rattenastrozyten 64
3.3 Einfluss von Ammoniak auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in kultivierten Rattenastrozyten 66
3.3.1 Charakterisierung der durch NH_4Cl vermittelten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in kultivierten Rattenastrozyten 66
3.3.2 Subzelluläre Lokalisierung der ROS-Bildung in NH_4Cl-behandelten Astrozyten 68
3.4 Einfluss von Ammoniak auf die Expression von Seneszenzbiomarkern in kultivierten Rattenastrozyten 70
3.4.1 β-Galaktosidaseaktivität 70
3.4.2 Wirkung von Ammoniak auf die Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins p53 72
3.4.3 Einfluss von Ammoniak auf die Expression senesezenzassoziierter, zellzyklusinhibitorischer Gene und Proteine 74
3.5 Wirkung von Ammoniak auf die Reaktionsfähigkeit kultivierter Rattenastrozyten gegenüber Wachstumsfaktoren 81
3.5.1 Einfluss von Ammoniak auf den BDNF Signalweg 81
3.5.2 Einfluss von Ammoniak auf den EGF/EGF-Rezeptor Signalweg 86
3.6 Quantifizierung Seneszenz-assoziierter Gene in *post mortem* Hirnproben von Leberzirrhosepatienten mit oder ohne HE 88

4. Diskussion 92

4.1 Ammoniak vermittelt Astrozytenseneszenz 92
4.2 Bedeutung der Bildung von oxidativem Stress für die durch Ammoniak vermittelte Astrozytenseneszenz 93
4.3 Beteiligte intrazelluläre Signaltransduktionselemente in der durch Ammoniak vermittelten Astrozytenseneszenz 95
4.4 Einfluss von Ammoniak auf die Expression zellzyklusinhibitorischer, p53 induzierter Faktoren in kultivierten Rattenastrozyten 96
4.5 Einfluss von Ammoniak auf die Wachstumsfaktorabhängige Proliferation kultivierter Rattenastrozyten 97

4.6 Zusammenfassung: Mechanismen der ammoniakvermittelten Astrozytenseneszenz in kultivierten Rattenmechanismen 99
4.7 *In vivo* Relevanz 100
4.8 Ausblick 102

5. Zusammenfassung 103

6. Summary 105

7. Literaturverzeichnis 106

8. Danksagung 139

1. Einleitung

1.1 Hepatische Enzephalopathie

Die hepatische Enzephalopathie (HE) ist ein neuropsychiatrisches Syndrom, welches in Folge eines akuten Leberversagens oder einer chronischen Leberschädigung auftreten kann (Hazell *et al*., 1999; Ferenci *et al.*, 2002; Häussinger *et al*., 2005b).

Das akute Leberversagen kann durch eine Hepatitisvirusinfektion oder Lebertoxine (Medikamente wie z.B. Paracetamol oder Pilztoxine) ausgelöst werden. In Folge der stark eingeschränkten Leberfunktion steigen die systemischen Ammoniakspiegel im Blut rasch an. Im Gehirn wird Ammoniak von der in Astrozyten exprimierten Glutaminsynthetase entgiftet. Die erhöhte systemische Ammoniakkonzentration induziert in der Folge eine verstärkte Bildung und Akkumulation von Glutamin im Astrozyten und damit verbunden eine Astrozytenschwellung. Die Astrozytenschwellung kann die Ausbildung eines klinisch offenkundigen zerebralen Ödems induzieren und der intrakranielle Druck ansteigen. Aufgrund der Rigidität des Schädels kann der Hirnstamm dekompressiert werden und in Folge dessen der Tod eintreten (Shawcross *et al*., 2005).

Das chronische Leberversagen wird sehr häufig durch dauerhaften Alkoholmissbrauch oder durch chronische Entzündungen der Leber, z.B. durch Hepatitisviren, verursacht. In der Folge kommt es zur Ausbildung einer Leberzirrhose, die durch knotige Umbauprozesse gekennzeichnet ist, welche die Gewebearchitektur und Funktion der Leber beeinträchtigt. Die Verschlechterung der Leberfunktion geht einher mit einer verminderten Synthese von essentiellen Blutbestandteilen wie z.B. Blutgerinnungsfaktoren und Albumin, was wiederum zu charakteristischen Komplikationen der Leberzirrhose führen kann, wie z.B. Aszites oder Blutungen. In Deutschland erkranken jährlich ca. 15.000 - 30.000 Menschen an Leberzirrhose (Gerok *et al.*, 1991). Man geht davon aus, dass ca. 30-70% aller Patienten mit Leberzirrhose im Laufe der Erkrankung eine HE entwickeln (Ott, 1984; Pietrowsky *et al*., 1991). Die Schwere der HE-Symptomatik ist abhängig von der Anwesenheit auslösender Faktoren und dem Ausmaß des Leberschadens (Häussinger *et al*., 1997, 2000 und 2005a). Zu den eine hepatische Enzephalopathie auslösenden Faktoren gehören einerseits die gestörte Entgiftungsfunktion der Leber, aber

auch HE-präzipitierende Faktoren wie z.B. gastrointestinale Blutungen oder eine erhöhte Eiweißaufnahme (vgl. Abbildung 1).

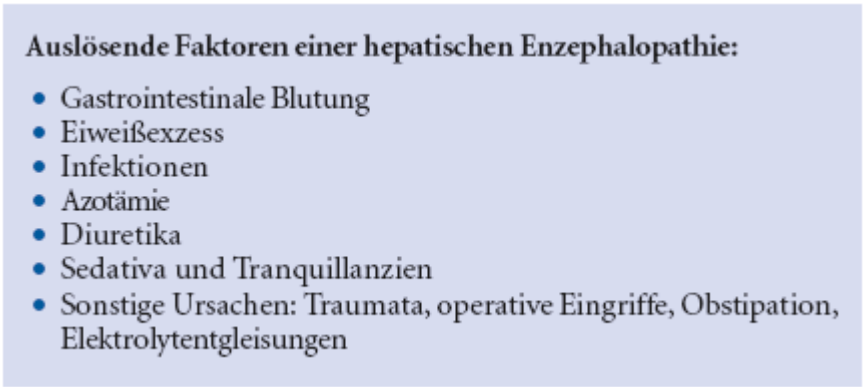


Abb. 1: HE-präzipitierende Faktoren (Wettstein *et al*., 2003a).

Nach heutigem Kenntnisstand ist die hepatische Enzephalopathie die Folge einer Hydratationsstörung der Astrozyten und der Ausbildung eines geringgradigen glialen Ödems (Häussinger *et al*., 1994a, 2000), welches einher geht mit einer Verschlechterung psychomotorischer Fähigkeiten, wie z.B. der Abnahme der Reaktionsfähigkeit und einer Beeinträchtigung von intellektuellen und kognitiven Funktionen. Letztere machen sich durch Konzentrationsschwäche, Beeinträchtigung des logischen Denkens und vermehrte Aufmerksamkeitsdefizite bemerkbar (Amodio *et al*., 2005; Weissenborn *et al*., 2005).

Die hepatische Enzephalopathie wird anhand ihrer Ätiologie nach dem CHILD-Score klassifiziert (Child *et al*., 1964; Cholongitas *et al*., 2005). Beruht die hepatische Enzephalopathie auf einem akuten Leberversagen spricht man vom Typ A, Typ B ist durch einen portosystemischen Bypass und Typ C durch eine portale Hypertonie oder eine chronische Lebererkrankung bedingt. Typ C kann man wiederum in drei Unterklassen einteilen: die minimale, persistierende und episodische HE. Bei der episodisch auftretenden HE handelt es sich um eine Störung, die durch HE-präzipitierende Faktoren wie Infektionen, Azidosen, Eiweißexzesse, gastrointestinale Blutungen oder Hyper- oder Hypokalämie verursacht wird. (Ferenci *et al*., 2002; Häussinger *et al*., 2002; Wettstein *et al*., 2003b). Neben der erwähnten Klassifizierung der HE in die Typen A-C unterscheidet man zusätzlich die subklinische (latente) von der manifesten HE (Ferenci *et al*., 2002; Häussinger *et al*., 2002; Wettstein *et al*., 2003b).

Zur Diagnostik der subklinischen HE (SHE), werden psychometrische und neurophysiologische Tests durchgeführt. In diesem Stadium der Erkrankung sind noch keine klinisch offenkundigen neuropsychiatrischen Veränderungen erkennbar (Häussinger *et al*., 2002). Die Diagnostik der subklinischen HE ist bedeutsam, da diese Patienten in ihrer Leistungsfähigkeit und ihrer Fahrtauglichkeit beeinträchtigt sein können (Kircheis *et al*., 2009).

Die manifeste hepatische Enzephalophathie kann unter Verwendung der West-Haven-Kriterien in Abhängigkeit der Schwere der Symptome in Stadien eingeteilt werden (Conn *et al*., 1994) (Abbildung 2). Da die Beurteilung der Schweregrade HE 0 - II nicht objektivierbar ist, wurde eine vereinfachte Unterteilung in „geringgradig“ und „hochgradig“ vorgeschlagen (Häussinger, 2006). Die HE-Grade 0 - II werden dabei der „geringgradigen“ HE zugeteilt, die Grade III und IV der „hochgradigen“ HE. Zur Beurteilung des Schweregrades der HE hat sich die Flimmerfrequenz-Messung als objektive, physikalische Messmethode etabliert (Kircheis *et al*., 2002; Häussinger, 2006). Der Patient fixiert dabei eine oszillierende Lichtquelle, deren Frequenz im Laufe der Zeit abnimmt. Bereits bei Patienten mit geringgradiger HE ist die Frequenz, bei der sie das „Flimmern“ wahrnehmen können, im Vergleich zu Personen ohne HE, signifikant reduziert. Je schwerer der Grad der HE ist, desto weiter nimmt die wahrgenommene Flimmerfequenz ab (Kircheis *et al*., 2014).

Grad der Enzephalopathie	Bewusst-seinslage	Intellekt	Verhalten	neuromuskuläre Störungen	Neuropsychometrie
Grad 0 (keine HE)	unauffällig	unauffällig	unauffällig	nicht nachweisbar	unauffällig
Grad 0 (SHE) (keine manifeste HE)	unauffällig	unauffällig	unauffällig	nicht nachweisbar	pathologische Testresultate
Grad I (geringgradig manifeste HE)	Schlafstörungen, Schläfrigkeit, Schlaflosigkeit, Umkehrung des Schlaf-Wachrhythmus	verminderte Konzentration, verminderte Aufmerksamkeit, verminderte Reaktions-geschwindigkeit	zunehmende Erschöpfung, Euphorie oder Depression, Geschwätzigkeit, Reizbarkeit	gestörte Feinmotorik, einschlägiges Fingerzittern, Schriftänderung	pathologische Testresultate
Grad II (mittelgradig manifeste HE)	Verlangsamung, starke Schläfrigkeit, träger Gedankenfluss, Lethargie	kein Zeitgefühl, Rechnen beeinträchtigt, Erinnerungslücken	Enthemmung, Persönlichkeits-änderung, Angst, Teilnahms-losigkeit	Zunahme des Händezitterns, verwaschene Sprache, verminderte Reflexe, verstärkter Muskeltonus	pathologische Testresultate
Grad III (schwere, manifeste HE, Vorstufe des Komas)	Desorientiertheit, stärkste Schläfrigkeit, Bewusstseins-eintrübung, Verwirrtheit, Bewegungslosigkeit, z.T. „Erstarrungen"	fortschreitende Erinnerungslücken (z.B. für die Erkrankung), Unfähigkeit zu Rechnen	Desorientiertheit (zeitlich und örtlich) Wahnvor-stellungen, Aggressionen	verstärkte Reflexe, Zunahme krankhafter Fremdreflexe, unwillkürliche rhyth-mische Augen-bewegung (Augenzittern), Augenflattern, Muskelkrämpfe, fortschreitende Spastik	keine psychometrischen bzw. computerpsycho-metrischen Untersuchungen durchführbar
Grad IV (schwerste Form der manifesten HE, Koma)				Pupillenerweiterung, Streckkrämpfe, Nackensteifigkeit	keine psychometrischen bzw. computerpsycho-metrischen Untersuchungen durchführbar
	Bewusstlosigkeit	**keine Funktion**	**erloschen**	**Erlöschen der Reflexe, Tonusverlust**	

Abb. 2: Unterteilung der Schweregrade der HE nach West-Haven-Kriterien. Dargestellt ist das klinisches Spektrum der zerebralen und neuromuskulären Beeinträchtigung bei HE, die der Unterteilung in Schweregrade zugrunde liegt (Häussinger, 2006).

1.1.1 Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie

Die bei der Pathogenese der HE zugrundeliegenden Mechanismen sind bis heute nur unvollständig verstanden. Gesichert ist jedoch, dass die HE Folge einer Astrozytenfunktionsstörung ist, welche sich unter dem Einfluss von Ammoniak und weiteren die HE-präzipitierenden Faktoren ausbildet und in dessen Folge sekundär neuronale Funktionen beeinträchtigt werden (Wettstein *et al.*, 1996). Die Funktionsstörung der Astrozyten geht mit morphologischen Veränderungen einher und Zellen, die eine solche morphologische Veränderung zeigen, nennt man Alzheimer Typ II Astrozyten (Norenberg *et al.*, 1981; Hazell *et al.*, 1999; Wettstein *et al.*, 2003b; Panickar *et al.*, 2005; Häussinger, 2006a).

Alzheimer Typ II Astrozyten sind charakterisiert durch vergrößerte Zellkerne mit randständigem und abnorm verdichtetem Chromatin. Auch in Tiermodellen zur HE, in denen eine Hyperammonämie durch eine portokavale Anastomose induziert wird, beobachtet man im Gehirn die Ausbildung von Alzheimer-Typ II Astrozyten (Cordoba *et al*., 1996). Die molekularen Mechanismen, die der Bildung von Alzheimer Typ II Astrozyten zugrunde liegen, sind unbekannt, aber im Tiermodell korreliert die Häufigkeit des Auftretens dieser Zellen im Gehirn mit der systemischen Ammoniakkonzentration (Hazell *et al*., 1999; Schliess *et al*., 2006). Im Gegensatz zu Astrozyten sind bei Neuronen bislang keine morphologischen Veränderungen beschrieben worden.

Der in der zirrhotischen Leber nicht ausreichend abgebaute Ammoniak spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der HE (Butterworth *et al*., 1987; Albrecht *et al*., 2006; Schliess *et al*., 2006) und für die Beeinträchtigung der zerebralen Neurotransmission. In Abhängigkeit des Vorliegens einer akuten oder chronischen Leberfunktionsstörung kann Ammoniak die Neurotransmission unterschiedlich beeinflussen und entweder eine Hyperexzitation oder eine Neuroinhibition verursachen (Butterworth, 2007).

Der überwiegende Großteil des systemisch anfallenden Ammoniaks (bis zu 75%) wird in der intestinalen Flora des Dickdarms durch anaerobe Bakterien produziert (Center *et al*., 1990). Darüber hinaus wird Ammoniak beim Abbau von Proteinen (Proteolyse) in der Leber freigesetzt (Gerber *et al*., 2000). Der Ammoniak gelangt über den Pfortaderkreislauf in die Leber, wo er durch die Leberzellen aus dem Portalblut extrahiert wird und im Harnstoffzyklus entgiftet wird (Häussinger *et al*., 1984). Ammoniak, der aufgrund der begrenzten Harnststoffsynthesekapazität nicht abgebaut werden kann, gelangt zu den perivenös gelegenen Scavenger-Zellen in der Leber, die ihn mit Hilfe der Glutaminsynthetase (GS) in Glutamin fixieren. Die Leberfunktionsstörung bei Zirrhose bedingt nicht nur eine verminderte Entgiftungsleistung des Harnstoffzykluses, sondern auch eine Störung der Glutaminbildung in den perivenös gelegenen Scavenger-Zellen. In der Folge kann Ammoniak die Leber unverstoffwechselt passieren wodurch die systemischen Ammoniakkonzentrationen stark ansteigen (Häussinger, 1983, 1984). Je nach pH-Wert des Blutes liegt Ammoniak zu verschiedenen Anteilen entweder protoniert (Ammonium, NH_4^+) oder ionisiert als Gas (NH_3) vor. Ammoniak, welcher über den Blutkreislauf das Gehirn

erreicht, kann ionisiert über Diffusion die Blut-Hirn-Schranke passieren, während die protonierte Form über Transportsysteme das Hirnparenchym erreichen kann (Tilman, 2001).

Beim Gesunden mit normaler Leberfunktion existiert ein Gleichgewicht zwischen Bildung und Abbau von Ammoniak, so dass Serumammoniakkonzentrationen von etwa 30µmol/l im peripheren Blut im Allgemeinen nicht deutlich überschritten werden. Eine verringerte Leberfunktion bei Patienten mit Leberzirrhose ist mit erhöhten Serumammoniakspiegeln assoziiert (Ong *et al*., 2003), allerdings korrelieren die Serumammoniakspiegel bei Leberzirrhosepatienten nicht eindeutig mit dem HE-Schweregrad (Nicolao *et al*., 2003; Ong *et al*., 2003). Bis heute sind die Ursachen für die unterschiedlichen Ammoniaktoleranzen unbekannt. Möglicherweise spielen hier genetische Polymorphismen in den im Ammoniakstoffwechsel involvierten Enzymen eine Rolle (Romero-Gómez *et al.,* 2010).

Astrozyten machen ca. 50% der Hirnmasse aus. Durch ihren engen Kontakt zu Blutgefäßen im Gehirn sind sie an der Ausbildung der Blut-Hirnschranke beteiligt (Janzer *et al*., 1987; Trentin, 2006). Eine wichtige Aufgabe der Astrozyten besteht darin Ammoniak mit Hilfe der exklusiv von ihnen im Gehirn exprimierten Glutaminsynthetase (GS) zu entgiften (Norenberg *et al*., 1979). Die erhöhten systemischen Ammoniakkonzentrationen bei Patienten mit Hyperammonämie bewirken eine verstärkte Glutaminbildung in den Astrozyten. Nach heutiger Auffassung spielt die Akkumulation von osmotisch-wirksamem Glutamin in Astrozyten eine wichtige Rolle bei der Enstehung einer astroglialen Hydratationsstörung und der Ausbildung eines geringgradigen chronischen Gliaödems, welches ohne klinisch offenkundige Hirndrucksymptomatik einhergeht. (Häussinger *et al*., 1994a; Norenberg, 1996; Wettstein *et al*., 2003a).

Die bei HE durch Ammoniak auftretende Hydratationsstörung der Astrozyten ist mit einer volumenregulatorischen Freisetzung des organischen Osmolyts *myo*-inositol, verbunden (Häussinger *et al*., 1994a). Hierdurch wird der Osmolytpool und damit das volumenregulatorische Potential der Astrozyten erschöpft (Häussinger *et al.*, 1994a, 2000). In der Folge wird der Astrozyt empfindlich gegenüber weiteren, eine Astrozytenschwellung auslösenden, HE-relevanten Faktoren wie z.B. Liganden des peripheren Benzodiazepinrezeptors (PBR), Neurosteroiden, Hyponaträmie und inflamatorischen Zytokinen (z.B. TNF-α) (Häussinger *et al*., 2000; Häussinger *et al*., 2008).

Dies erklärt, warum sehr heterogene Faktoren wie Ammoniak, Sedativa, Infektionen, Diuretika und Blutungen etc. eine HE verursachen können, da diese eine HE-präzipitierenden Faktoren synergetische Effekte auf die Ausbildung einer Astrozytenschwellung auslösen können (Häussinger *et al*., 2000). Während der astrogliale Osmolytpool bei Patienten ohne Leberschädigung die schwellungsinduzierende Wirkung dieser Faktoren abmildern und eine Astrozytenschwellung verhindern kann, dekompensiert der derangierte Osmolythaushalt beim Leberzirrhotiker unter Einwirkung weiterer eine Astrozytenschwellung auslösenden Faktoren (Häussinger *et al*., 1994b, 2000).

Bereits geringe Veränderungen des Zellvolumens haben eine große Wirkung auf den Metabolismus verschiedener Zelltypen (Häussinger *et al*., 2011). Die Zellschwellung übt auch einen großen Einfluss auf den Astrozytenmetabolismus aus. So konnte gezeigt werden, dass eine Astrozytenschwellung z.B. die Glykogensynthese, die intrazelluläre Zn^{2+}- und Ca^{2+}-Homöostase, intrazelluläre Signalkaskaden und die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies beeinflusst (Schliess *et al*., 1996, 2004; Sinning *et al*., 1997; Morales *et al*., 1998; Dombro *et al*., 2000; Xu *et al*., 2001; Kruczek *et al*., 2009).

1.1.2 Oxidativer/nitrosativer Stress bei der hepatischen Enzephalopathie (HE)

Eine Vielzahl von Untersuchungen unterschiedlicher Arbeitsgruppen belegen, dass die Pathogenese der HE nicht nur mit einer Astrozytenschwellung assoziiert ist, sondern auch mit der astroglialen und zerebralen Bildung von oxidativ/nitrosativem Stress (Murthy *et al*., 2001; Schliess *et al*., 2002, 2004, 2006; Görg et al., 2003, 2006; Norenberg *et al*., 2003; Häussinger *et al*., 2005a; Reinehr *et al*., 2007). Ammoniak, inflammatorische Zytokine, Hyponatriämie und Benzodiazepine bewirken eine Zellschwellung und die Synthese reaktiver Stick- und Sauerstoffverbindungen (RNOS) in Astrozyten (Musavi *et al*., 1998; Murthy *et al*., 2001; Schliess *et al*., 2002, 2004; Görg *et al*., 2003, 2006; Reinehr *et al*., 2007). Die Entstehung von RNOS ist mit einer gesteigerten vesikulären Glutamatausschüttung aus den Astrozyten und einer autokrinen Stimulation von NMDA-Rezeptoren verbunden. Diese führt zu einer Steigung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration und Aktivierung einer in Astrozyten exprimierten NADPH-Oxidase (Schliess *et al*., 2002; Reinehr *et al*., 2007; Görg *et al*., 2008, 2010a). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Astrozytenschwellung *per se* die Bildung von RNOS induziert (Schliess *et al*., 2004; Reinehr *et al*., 2007; Kruczek *et al*., 2009).

Da RNOS potente Induktoren einer Zellschwellung sind, wurde postuliert, dass die HE Folge eines sich selbst amplifizierenden Kreislaufs zwischen oxidativ/nitrosativem und osmotischem Stress ist (Häussinger *et al*., 2006; Häussinger *et al*., 2008). Hieraus resultieren eine Reihe von funktional bedeutsamen Konsequenzen wie z.B Modifikation an Proteinen und der RNA und eine Beeinflussung der Zink-abhängigen Gentranskription HE-relevanter Gene (Schliess *et al*., 2002, 2004; Görg *et al*., 2003, 2008; Kruczek *et al*., 2009; Häussinger *et al*., 2010). In der Summe bewirken diese Mechanismen eine Funktionsstörung der Astrozyten mit Auswirkung auf die astrozytäre/neuronale Kommunikation und Neurotransmission.

Jüngere Arbeiten belegen, dass diese an Astrozytenzellkulturen gezeigten Wirkungen HE-relevanter Faktoren auch in *post mortem* Hirnproben von Leberzirrhosepatienten mit HE nachgewiesen werden können, nicht aber beim Leberzirrhosepatienten ohne HE zu finden sind (Görg *et al*., 2010a, 2013).

1.1.3 Funktionale Konsequenzen der Wechselwirkung von osmotischem und oxidativem Stress in Astrozyten

RNOS-Spezies wie z.B. Peroxynitrit ($ONOO^-$) können eine Nitrierung spezifischer Tyrosinreste in Proteinen (PTN) herbeiführen, die einen Einfluss auf die Aktivität und Funktion des entsprechenden Proteins haben kann (Radi *et al*., 2013). An kultivierten Rattenastrozyten, aber auch in unterschiedlichen Tiermodellen zur HE wurde gezeigt, dass HE-relevante Faktoren wie pro-inflammatorische Zytokine (Görg *et al.*, 2006), Benzodiazepine (Görg *et al*., 2003) und Ammoniak (Schliess *et al*., 2002) sowie eine experimentell hervorgerufene Zellschwellung (Schliess *et al*., 2004) eine Tyrosinnitrierung spezifischer Proteine auslöst (Abbildung 3). Zu denen durch eine PTN modifizierten Proteinen gehören z.B. die Glyzerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH), der periphere Benzodiazepinrezeptor, die Glutaminsynthetase (GS), der Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter (NKCC1) und die MAP-Kinase Erk-1 (Schliess *et al.*, 2002; Jayakumar *et al*., 2006). Sowohl die Nitrierung der Glutaminsynthetase, als auch des NKCC1 hat eine aktivitätsbeeinflussende Wirkung. Während die Tyrosinnitrierung der Glutaminsynthetase mit einem Aktivitätsverlust des Enzyms einhergeht (Schliess *et al*., 2002; Görg *et al*., 2007),

wurde vermutet, dass die NKCC1 Aktivierung ähnlich einer Phosphorylierung mit einer verstärkten Transportaktivität des NKCC1 einhergeht (Jayakumar *et al*., 2006).

Durch HE-relevante Faktoren ausgelöste Bildung von RNOS bewirkt eine Zinkfreisetzung aus Proteinen (Kruczek *et al*., 2009). Durch den damit verbundenen Anstieg der intrazellularen Konzentration freier Zinkionen werden die Transkriptionsfaktoren SP1 (Spezifitätsprotein-1) und MTF-1 aktiviert (Kruczek *et al*., 2009). SP1 transloziert in den Zellkern und steigert die Expression des peripheren Benzodiazepinrezeptors (PBR) (Giatzakis *et al*., 2004; Kruczek *et al*., 2009). Eine erhöhte Expression von PBR Bindungsstellen wurde im Gehirn von Zirrhosepatienten mit HE nachgewiesen (Cagnin *et al*., 2001). Der PBR ist an der Induktion der mitochondrialen Permeabilitätstransition (MPT) und der Neurosteroidsynthese beteiligt (Bender *et al*., 1998; Ahboucha *et al*., 2004). Dies ist von pathogenetischer Relevanz, da bei komatösen HE-Patienten zerebral erhöhte Neurosteroidkonzentrationen gefunden wurden, die auf eine verstärkte Aktivierung des PBR zurückgeführt werden könnten (Ahboucha *et al*., 2002). Da Neurosteroide Liganden des GABA-Rezeptors sind, wurden erhöhte zerebrale Neurosteroidkonzentrationen bei HE-Patienten in Zusammenhang gebracht mit der bei HE anzutreffenden verstärkten GABAergen Neurotransmission (Butterworth, 2007).

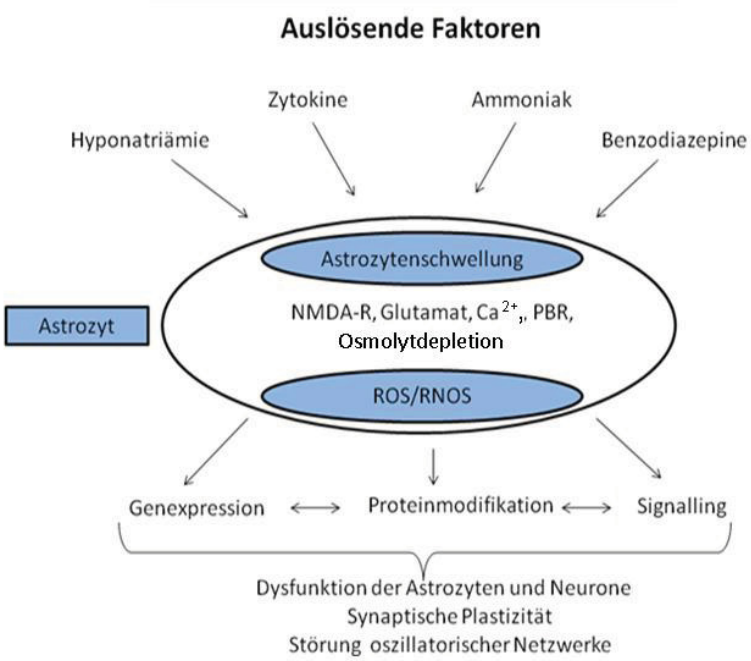


Abb. 3: Pathogenesemodell zur hepatischen Enzephalopathie. Die Wirkung HE-auslösender Faktoren konvergiert auf der Ebene der Induktion einer Astrozytenschwellung und der Bildung von RNOS. Hierdurch wird ein sich selbst verstärkender Kreislauf in Gang gesetzt, der in einer gemeinsamen Endstrecke eine Vielzahl von funktional bedeutsamen Konsequenzen nach sich zieht, die in der Gesamtheit Astrozytenfunktionen und die astroglial/neuronale Kommunikation stören und oszillatorische Netzwerke beeinträchtigen. (Modifiziert nach Häussinger *et al*., 2008).

1.2 Neurotrophe Faktoren (NTF)

Während Nervenzellen spezialisiert sind auf die Speicherung, Verarbeitung und Weiterleitung von Informationen, können Gliazellen die Neurotransmission durch Freisetzung von Botenstoffen aktiv beeinflussen. Gleichzeitig sind sie unabdingbar für die Aufrechterhaltung einer metabolischen Homöostase welche essentiell ist für die Neurotransmission (Barres *et al*., 1999; Fields *et al*., 2002; Auld *et al*., 2003). Durch Zell-Zell-Kontakte und spezifische Signalmoleküle können Neurone und Astrozyten unter physiologischen Bedingungen miteinander interagieren. Die neurotrophen Faktoren (NTF) stellen eine wichtige Klasse von Signalmolekülen dar, die bei dieser interzellulären Kommunikation eine bedeutsame Rolle spielen (Ip *et al*., 1993).

Aufgrund funktioneller und struktureller Homologien werden die neurotrophen Faktoren in unterschiedliche Familien gegliedert wie z.B. der Familie der Neurotrophine (NT), welche aus den Neurotrophinen NT-3 NT-4/5, NT-6, NT-7, dem *nerve growth factor* (NGF) und dem *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) gebildet wird. Die Neurotrophine NT-6 und NT-7 spielen vermutlich bei Säugetieren keine größere Bedeutung (Gillespie *et al*., 2005). Neurotrophine sind an der Differenzierung von Nervenzellen beteiligt (Heller *et al*., 1996; Bibel *et al*., 2000; Wiese *et al*., 2004), stabilisieren synaptische Kontakte und modulieren die synaptische Aktivität (Theonen *et al*., 1993; Sendtner, 1998). Diese Eigenschaften machen Neurotrophine essentiell für die Ausbildung von neuronalen Netzwerken.

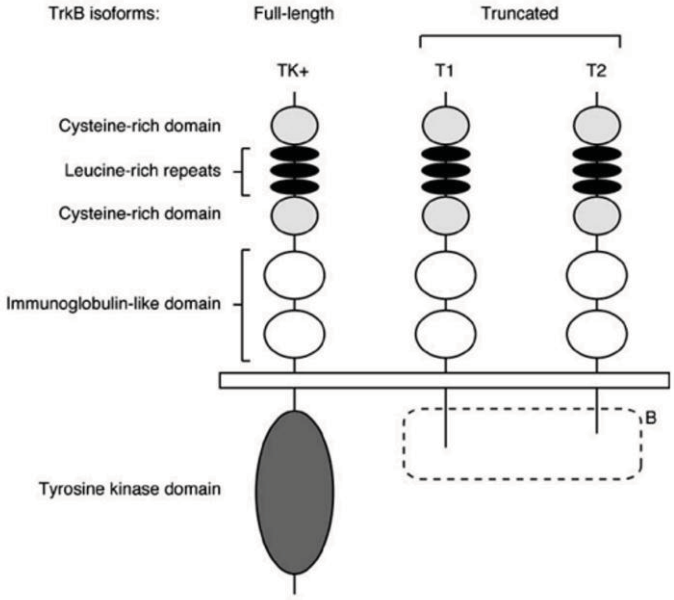
Neurotrophine werden aus glykosylierten Neurotrophinvorläufern (*Pro*-Neurotrophine) gebildet und haben ein Molekulargewicht zwischen 31-35kDa. Mit Hilfe von Konvertasen werden die Vorläufer in „reife“ und damit wirksame Neurotrophine gespalten (Chao *et al*., 2002). Die reifen Formen haben ein Molekulargewicht zwischen 13,2-15,9kDa und können extrazellulär durch Bildung von Disulfidbrücken dimerisieren, aber auch Heterodimere bilden (z.B. zwischen NT3 und BDNF) (Barde, 1990; Robinson *et al*., 1999). Die Heterodimere weisen eine kombinierte biologische Aktivität auf, die aber gemessen an den Homodimeren vermindert ist (Jungbluth *et al*., 1994).

1.2.1 Der TrkB-Rezeptor

Der TrkB-Rezeptor gehört zur Familie der Neurotrophinrezeptoren, die aus 4 Mitgliedern ($p75^{NTR}$, TrkA, B und C) gebildet wird. Bislang sind drei verschiedene TrkB-Isoformen bekannt, die durch alternative Spleißvorgänge aus der Vorläufer mRNA gebildet werden (Abbildung 4). $TrkB_{FL}$ (*full-length* TrkB) wird vorwiegend von Neuronen im Zentralnervensystem (ZNS) exprimiert und wird nach Bindung von BDNF über eine intrazelluläre Kinasedomäne aktiviert in dessen Folge die Expression spezifischer Gene getriggert wird (Leal *et al*., 2014). Die trunkierte („verkürzte“) Spleißvariante des TrkB ($TrkB_T$ (*truncated* TrkB)) besitzt diese katalytische Tyrosinkinasedomäne hingegen nicht (Middlemas *et al*., 1991), ist aber in der Lage, G-Protein-abhängig intrazelluläre Ca^{2+} Fluktuationen zu induzieren und hierüber signalregulatorische Mechanismen zu aktivieren (Rose *et al*., 2003). Durch Bildung eines Heterodimers mit dem $TrkB_{FL}$ kann der $TrkB_T$ aber auch die Kinaseaktivität des *full-length*-TrkB-Rezeptors in Neuronen inhibieren (Eide *et al*., 1996).

Während der $TrkB_{FL}$ vorwiegend neuronal exprimiert wird, ist die trunkierte Isoform auch in Gliazellen zu finden. Der $TrkB_T$ wird in zwei Splicevarianten exprimiert ($TrkB_{T1}$ und $TrkB_{T2}$) (Baxter *et al.*, 1997). Beide Varianten können Heterodimere mit dem $TrkB_{FL}$ eingehen (Armanini *et al.*, 1995). Die komplexen Wechselwirkungen der TrkB-Isoformen und deren funktionale Bedeutung sind bis heute nicht vollständig verstanden.

Der TrkB wird posttranslational durch N-Glykosylierung modifiziert (Rudge *et al.*, 1994; Rose *et al.*, 2003). Die Funktion der TrkB N-Glykosylierung ist aber bislang nicht eindeutig aufgeklärt werden.



<u>Abb. 4:</u> Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus verschiedener Isoformen des TrkB Rezeptors. TK+ : TrkB Rezeptor mit Kinase Untereinheit. $TrkB_T$: trunkierter (verkürzter) TrkB-Rezeptor ohne intrazelluläre Kinase Untereinheit. T1,2: Isoformen des $TrkB_T$. (Ohira *et al.*, 2009).

1.2.2 *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF)

Brain-derived Neurotrophic Factor ist ein Neurotrophin (Barde *et al.*, 1982), das aus einem 32kDa großen Vorläuferprotein (*pro*BDNF) gespalten wird (Matsumoto *et al.*, 2008). Das reife Protein (mBDNF) wird ubiquitär im ZNS und im peripheren Nervensystem (PNS) gebildet, insbesondere jedoch im sich entwickelnden zerebralen Kortex und im Hippocampus im adulten Hirn. BDNF kann an Synapsen aktivitätsabhängig in der *pro*BDNF

und mBDNF Form freigesetzt werden. Das unreife Vorläuferprotein *pro*BDNF kann im synaptischen Spalt durch den bei synaptischer Aktivitität gleichzeitig freigesetzten gewebespezifischen Plasminogenaktivator (tPA) zu mBDNF extrazellulär proteolytisch gespalten und dadurch aktiviert werden.

BDNF wird in verschiedenen Hirnzelltypen (Astrozyten, Mikroglia, Neurone) synthetisiert. In Neuronen spielt BDNF eine essentielle Rolle bei grundlegenden biologischen Prozessen wie z.B. bei Differenzierung und Wachstum (Becker *et al*., 1998) und ist involviert in Lernprozesse und Gedächtnisbildung (Bekinschtein *et al*., 2013). Eine reduzierte BDNF-Expression, wie sie bei einigen neurologischen Erkrankungen beschrieben wurde, wie z.B. Morbus Alzheimer (Zuccato *et al*., 2009), ist mit kognitiver Dysfunktion assoziiert.

BDNF vermittelt seine biologischen Wirkungen durch Induktion einer Dimerisierung von TrkB-Monomeren, die sich in der Plasmamembran befinden. Dadurch aktiviert BDNF die Rezeptortyrosinkinaseaktivität des full length-TrkB, die von einer Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosinreste des Rezeptors begleitet wird. In der Folge wird eine Signalkaskade ausgelöst, in die verschiedene Proteine involviert sind, wie z.B. die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase), die Serin/Threonin- Proteinkinase AKT (Thiel *et al*., 2005) oder die Phospholipase PLC-γ1 (Bibel *et al*., 2000).

In Neuronen moduliert diese Signalkaskade synaptische Plastizität durch Inhibition GABAerger Neurotransmission durch Förderung der präsynaptischen Freisetzung von Glutamat (Wardle *et al*., 2003) und durch Verstärkung der synaptischen Plastizität durch Modulation der Morphologie und Stabilisierung glutamaterger Synapsen (Lu *et al*., 2005).

Astrozyten exprimieren im Gegensatz zu Neuronen überwiegend die trunkierte TrkB Isoform T1, die keine Rezeptortyrosinkinaseaktivität besitzt (Rudge *et al*., 1994; Rose *et al*., 2003). Die BDNF-Freisetzung an der Synapse kann eine Signalkaskade in benachbarten Astrozyten auslösen. Hier bewirkt die Aktivierung des $TrkB_{T1}$ eine Erhöhung des zytosolischen Kalziumspiegels durch Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Kompartimenten (Rose *et al*., 2003). Obwohl die funktionalen Konsequenzen dieses Ca^{2+} Signals ungeklärt sind, wurde postuliert, dass sie einen wichtigen Beitrag zur interastrozytären Kommunikation im Gehirn beitragen könnte (Rose *et al*., 2003).

Astrozyten sind an der neuronalen Transmission durch Wiederaufnahme, Ausschüttung, Synthese und Recycling von *pro*/mBDNF an den Synapsen beteilig (Bergami *et al*., 2008). Inflammatorische Faktoren wie Prostanoide, oxidativer Stress und L-Glutamat förern die Freisetzung von *pro*/mBDNF (McNaught *et al*., 2000; Toyomoto *et al*., 2004; Jean *et al*., 2008).

Während BDNF die Glutamatfreisetzung steigert und auf diese Weise zur Entstehung von oxidativ/nitrosativem Stress beitragen kann (Pascual *et al*., 2001, Kim *et al*., 2002), verstärkt oxidativer Stress wiederum die Transkription von BDNF (Nott *et al*., 2008; Furini *et al*., 2009)

Bis heute ist nicht bekannt, welche Rolle BDNF in der Pathogenese der HE spielt. In einer neueren Untersuchung wurden im Hippocampus gallengangsligierter-Ratten verminderte BDNF mRNA Spiegel gefunden, die mit einer reduzierten Lernfähigkeit der Tiere assoziiert waren. Die Behandlung dieser Tiere mit dem anti-inflammatorischen und anti-oxidativ wirksamen Cannabinoid Cannabidiol bewirkte sowohl eine Normalisierung der BDNF-Spiegel als auch der Lernfähigkeit der Tiere (Magen, *et al*., 2009). In Neuronen bewirkt Ammoniak eine Störung der durch BDNF ausgelösten und durch TrkB vermittelten Signalkaskade (Sánchez-Pérez *et al*., 2006). Unbekannt ist hingegen, ob HE-relevante Faktoren den BDNF-Signalweg auch in kultivierten Rattenastrozyten beeinflussen.

1.3 Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF)

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF (*epidermal growth factor*)) ist ein Polypeptid aus 53 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 60kDa (Savage *et al*., 1972). Die Polypeptidkette beinhaltet drei interne Disulfidbrücken mit sechs konservierten Cystein-Resten, welche wichtig für die Funktion von EGF sind (Taylor *et al*., 1972). EGF wurde erstmals 1962 von Stanley Cohen als hitze- und säurestabiles Protein aus der Unterkieferspeicheldrüse der Maus isoliert und als Zahn-Lid Faktor charakterisiert (Cohen, 1962). *In vitro* wurde gezeigt, dass das EGF-Protein die Proliferation von Epithelzellen beeinflusst, daher wurde es als *epidermal growth factor* bezeichnet (Cohen, 1964). EGF beeinflusst jedoch nicht nur die Proliferation in Epidermalzellen, sondern ubiquitär in allen Zelltypen im Organismus.

1.3.1 Der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR)

Der reife EGF Rezeptor ist ein transmembranäres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 170kDa und besteht aus einer Kette von etwa 1200 Aminosäuren. Der EGFR besteht wie alle Rezeptortyrosinkinasen aus einer extrazellulären, einer transmembranären und einer intrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne wird in vier Subdomänen unterteilt, die wiederum aus zwei Leucin-reichen L-Subdomänen (L1, L2) und zwei Cystein-reichen CR-Subdomänen (CR1, CR2) bestehen (Ward *et al*., 1995). Die Ligandenbindungsstelle des EGFR befindet sich in der Cystein-reichen Subdomäne der extrazellulären Domäne (Thompson *et al*., 1985), während die Leucin-reichen Subdomänen an der Regulation der Rezeptordimerisierung beteiligt sind (Lax *et al*., 1989). Die transmembranäre Domäne besteht aus hydrophoben Aminosäuren und spielt eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der Rezeptordimere und der Signalweiterleitung (Sternberg *et al*., 1989; Mendrola *et al*., 2002; Penuel *et al*., 2002). Die für die Tyrosinkinase-Aktivität verantwortliche intrazelluläre Domäne setzt sich aus einer ATP- und einer Substratbindungsstelle zusammen. (Ullrich *et al*. 1984). Über Tyrosinphosphorylierung von Signalproteinen werden extrazelluläre Signale in den intrazellulären Raum weitergeleitet, wodurch verschiedene Zellfunktionen, wie z.B. Zellwachstum, Differenzierung, Migration und Apoptose beeinflusst werden (Yarden *et al*., 2001). Neuere Arbeiten zeigen, dass der EGF-Rezeptor N-glykosyliert wird. Die Funktion dieser Modifikation ist jedoch unklar (Zhen *et al*., 2003; Liu *et al*., 2011).

1.4 Proliferation, Zellzyklus und Zellteilung

Die Zellproliferation beschreibt die Entwicklung und Vermehrung von Zellen durch Zellteilung. In jedem Organismus ist die Fähigkeit der Zellproliferation zur Erhaltung von Form, Größe und Funktion von Organen unverzichtbar, da stetig alte und beschädigte Zellen durch neue ersetzt werden müssen. Dieser Vorgang wird als Homöostase bezeichnet. Vor einer Zellteilung (Mitose) durchlaufen die Zellen den Zellzyklus. Hierbei wachsen die Zellen und verdoppeln ihre Erbinformation. Während der Mitose wird jeweils eine Hälfte der verdoppelten Erbinformation an die Tochterzellen weitergegeben. Die Mitose erfolgt nur dann, wenn sowohl das Genom unversehrt ist, als auch die Umgebungsbedingungen hierfür geeignet sind.

1.4.1 Ablauf des Zellzyklus

Der Zellzyklus besteht aus zwei Phasen, der Mitose (M-Phase) und der Interphase (Zwischenphase). Die Interphase unterteilt sich ihrerseits in drei Unterphasen: Gap1 (G1-Phase), DNA-Synthese-Phase (S-Phase) und Gap2 (G2-Phase) (Abbildung 5A).

Der Zellzyklus startet mit der G1-Phase in der die Zelle ihre Biomasse proteinbiosyntheseabhängig vermehrt und eine Überprüfung der DNA auf Fehler stattfindet. Der Großteil der Körperzellen befindet sich vor Beginn der G1-Phase in einer Ruhephase (G0-Phase) in der die Zellen ihre Teilungsaktivität einstellen, aber prinzipiell regenerationsfähig bleiben. Dieser Zustand kann dauerhaft sein, wie z.B. bei einigen spezialisierten Muskelzellen, aber auch nur transient sein, so dass die Zellen nach entsprechender Stimulation wieder in die G1-Phase des Zellzyklus eintreten können. Auf die G1-Phase folgt die S-Phase (Synthesephase), bei der einer Verdopplung der Erbinformation bzw. der Chromosomen erfolgt. Die S-Phase ist beendet, sobald jedes Chromosom vollständig dupliziert wurde. Die Zelle tritt nun in die G2-Phase ein, indem sie insbesondere für die Teilung benötigte Proteine bildet und damit die Zelle für die nachfolgende Mitose-Phase vorbereitet. In der Mitose-Phase werden die duplizierten Chromosomen gleichmäßig auf die entstehenden Tochterzellen aufgeteilt. Die Mitose-Phase selbst kann dabei wiederum in die Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase untergliedert werden (Abbildung 5B).

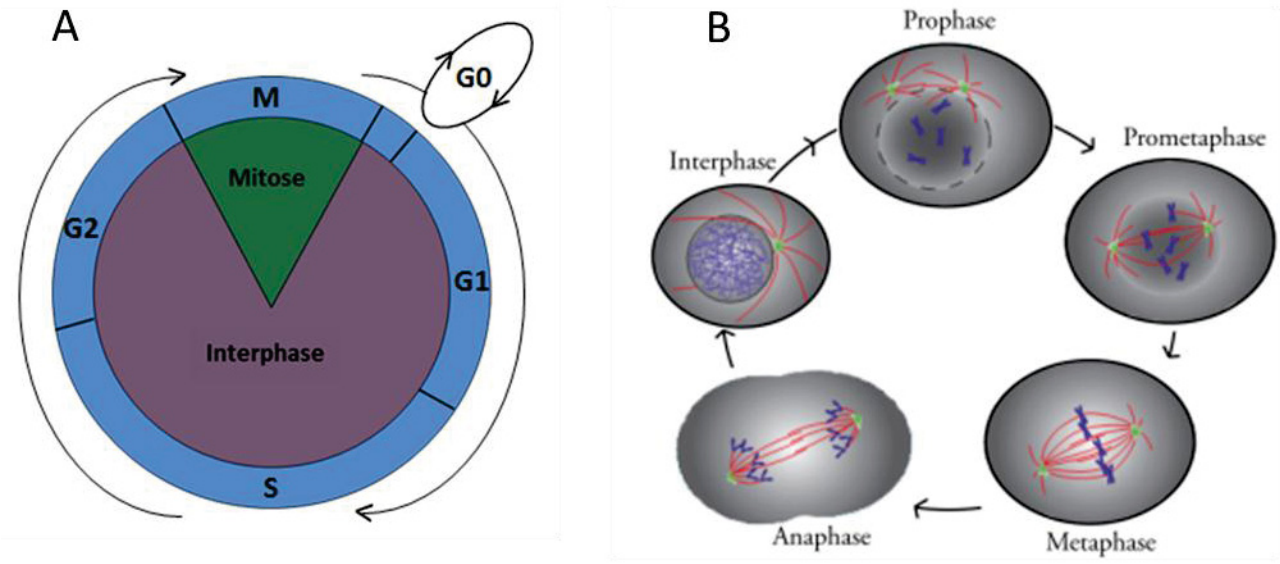


Abb. 5: Schematische Darstellung des Zellzyklus (A) und der einzelnen Mitosephasen (B) (Modifiziert nach Gadde *et al*., 2004).

In der Prophase werden die Chromosomen durch Spiralisierung und Verkürzung in eine Transportform überführt. Die Zentrosomen, die für den Chromosomentransport erforderlich sind, wandern zu den gegenüberliegenden Polen der Zelle und bilden den Spindelapparat aus (Blangy *et al*., 1995). In der Prometaphase lösen sich die Kernmembran und die Kernkörperchen bevor sich die Chromosomen in der nachfolgenden Metaphase in der Äquatorialebene der Zelle anordnen. Diese Anordnung ist für eine gleichmäßige Verteilung der Chromosomenhälften und Chromatiden auf die beiden Tochterzellen essentiell. Durch die Spindelfasern wird das Zentromer eines jeden Chromatids mit den Zellpolen verbunden. In der Anaphase trennen sich die Chromosomenhälften (Chromatiden) mit Hilfe des Spindelapparates, so dass beide Zellpole einen gleichmäßigen Anteil an Chromosomenhälften erhalten. In der Telophase gehen die Chromosomen durch Entspiralisierung von ihrer Transportform in ihre Arbeitsform über. Abschließend wird die Kernmembran gebildet bevor es zur endgültigen Teilung der beiden neu gebildeten Zellen in der Äquatorialebene kommt. Diesen letzten Abschnitt der Zellteilung bezeichnet man auch als Zytokinese.

1.4.2 Die Regulation des Zellzyklus

1.4.2.1 Promitogene Faktoren: Cyclin-abhängige Kinasen (CDK)

Der Zellzyklus wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) gesteuert, die zur Familie der Serin/Threoninkinasen gehören. Die Aktivität der CDKs wird durch regulatorische Untereinheiten kontrolliert, welche in Abhängigkeit der entsprechenden Zellzyklusphase die Komplexierung von CDKs mit Cyclinen ermöglichen, woraus eine Aktivierung der CDKs resultiert (Johnson *et al*., 1999).

Bislang wurden in Säugerzellen 9 CDK Isoformen (1-9) und zehn Cyclin-Klassen (A-T) identifiziert. Cycline sind Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 35 bis 90kDa und besitzen einen sequenzhomologen Bereich von 100 Aminosäuren, der sogenannten Cyclin-Box. Die Cyclin-Box ist für die Bindung und Aktivierung einer CDK wichtig. In jeder Zellzyklusphase werden spezifische Cycline exprimiert. Im Verlauf der Zellteilung verändert sich deren Expressionsstärke, während die CDK-Expressionslevel über den gesamten Zellzyklus konstant bleibt. Während der G1-Phase wird insbesondere CDK4- und CDK6-bindendes Cyclin D gebildet. Beim Übergang von der späten G1-Phase in die frühe S-Phase

wird das CDK2-bindende Cyclin E und beim Übergang zur S-Phase wird das CDK2-bindende Cyclin A gebildet. Im Übergang von der G2- in die M-Phase werden die Cycline A und B gebildet welche CDK1 binden und aktivieren (Abbildung 6).

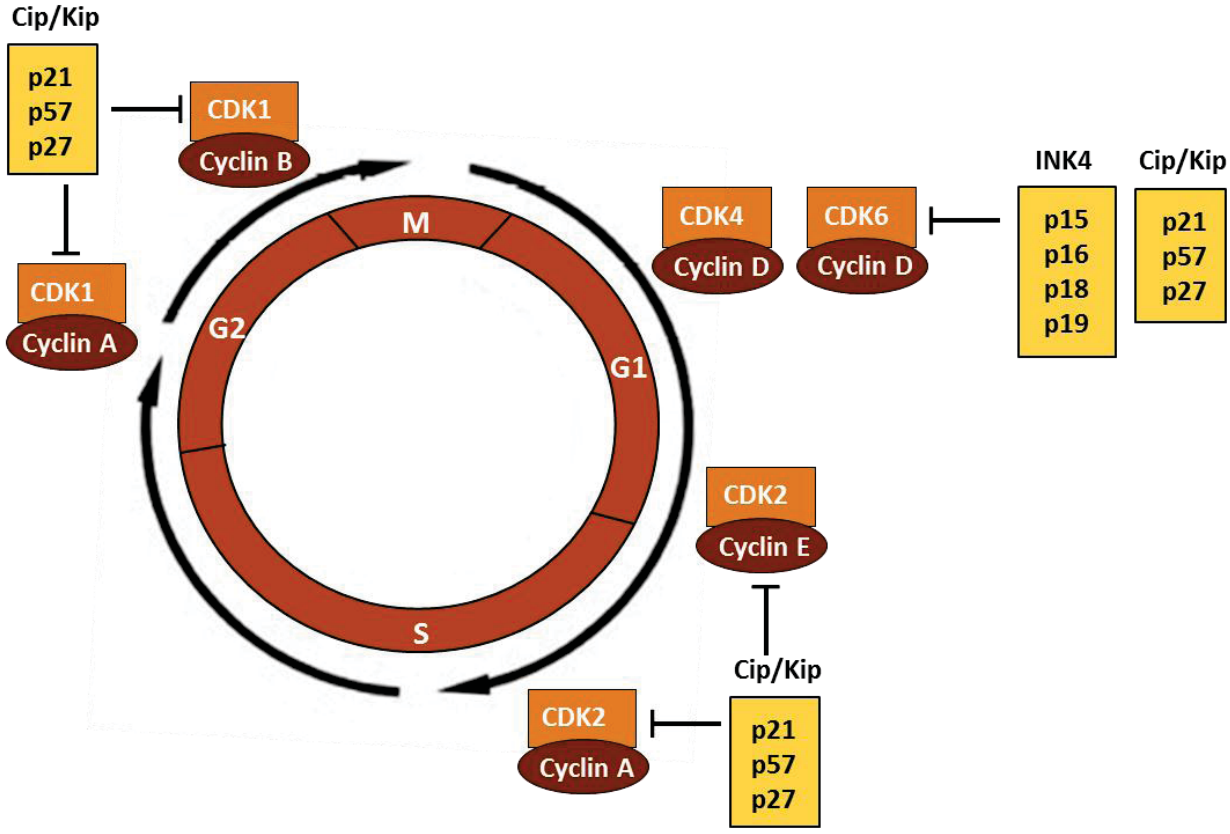


Abb. 6: Regulation des Zellzyklus durch Cyclin/CDK-Komplexe und beteiligte Inhibitoren (Modifiziert nach Malumbres *et al.*, 2005).

Cyclin-CDK-Komplexe regulieren alle Phasen des Zellzyklus durch Phosphorylierung entsprechender Zielproteine und etablieren darüber sogenannte Zellzykluskontrollpunkte (Ekholm *et al.*, 2000). Es werden drei Kontrollpunkte im Zellzyklus unterschieden. Der erste befindet sich vor dem Eintritt in die S-Phase (G1-S Kontrollpunkt), der zweite vor der M-Phase (G2-M Kontrollpunkt) und der letzte Kontrollpunkt befindet sich in der M-Phase an der Stelle an dem der Eintritt in die Anaphase erfolgt (Spindel-Kontrollpunkt). Der G1-S Kontrollpunkt dient dazu sicherzustellen, dass eine Zelle den Zellzyklus vollständig durchlaufen kann. Am G2-M Kontrollpunkt wird überprüft, ob ein Eintritt in die M-Phase erfolgen kann. Am letzten Kontrollpunkt (Spindel-Kontrollpunkt) wird die korrekte

Chromosomenanlagerung überprüft, die notwendig ist für eine einheitliche Verteilung der Chromosomen an die Tochterzellen. Unterschiedliche Formen von Stress (chemisch/physikalisch) können einen Stopp des Zellzyklus an diesen Kontrollpunkten herbeiführen, wodurch sichergestellt wird, dass der Zellzyklus nur unter den physiologisch notwendigen Bedingungen durchlaufen wird. Auf diese Weise können zellschädigende Bedingungen den Zellzyklus stoppen und eine Apoptose in diesen Zellen auslösen.

1.4.2.2 Antimitogene Faktoren: Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen

Die Cyclin-CDK-Komplexe können durch Bindung von CDK-Inhibitoren (CDKI, *cyclin dependent kinase inhibitor*) in ihrer Aktivität gehemmt werden (Cheng *et al*., 1999). Die CDKI werden in zwei Subfamilien unterteilt: die INK4- und die Cip/Kip-Familie (Carnero *et al*., 1998; Hengst *et al*., 1998).

Die INK4-Familie (*inhibitor of CDK4*) umfasst vier Mitglieder: $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$ und $p19^{INK4d}$ (Canepa *et al*., 2007). Diese sind an der Regulation des Zellzyklus in der frühen G1-Phase beteiligt und führen nach Bindung an die katalytischen Untereinheiten der CDKs zur Blockierung der Funktion von CDK4 und CDK6 (Abbildung 6).

Zur Cip/Kip-Familie (*CDK inhibitory polypeptides/kinase inhibitory proteins*) gehören die in dieser Arbeit untersuchten Proteine $p21^{Cip/WAF-1}$ (p21, Gen: cdkn1a) und $p27^{Kip1}$ (p27, Gen: cdkn1b) sowie das in der vorliegenden Arbeit nicht untersuchte Protein $p57^{Kip2}$ (p57, Gen: cdkn1c). p21, p27 und p57 sind in sämtliche Phasen des Zellzyklus involviert und können mit ihrer homologen aminoterminalen Domäne an die CDKs 1, 2, 4 und 5 binden diese inaktivieren (Abbildung 6) (Dynlacht *et al*., 1997; Denicourt *et al*., 2004). Die Cip/Kip-Proteine besitzen im N-terminalem Bereich eine konservierte CDK- und Cyclin-Bindungsdomäne. Diese ermöglicht im Gegensatz zur INK4-Familie sowohl die Wechselwirkung mit der Kinase als auch mit der Cyclin-Untereinheit. Die carboxyterminale Domäne (C-terminale Domäne) weist hingegen eine nur geringe Sequenzhomologie auf. Die Aktivität der Cip/Kip-Proteine wird durch verschiedene posttranslationale Modifikationen an der carboxyterminalen Domäne reguliert (Hengst *et al*., 1998). So erhöht die Phosphorylierung von Threonin 187 am carboxyterminalen Ende die Proteinstabilität von p27 (Montagnoli *et al*., 1999). Carboxyterminal verfügen p21, p27 und p57 über Kernlokalsierungssequenzen (NLS, *nuclear localization signal*), welche essentiell sind für den

Import der Proteine in den Nukleus (Reynisdottir *et al*., 1997; Zeng *et al*., 2000). Die Proteine p21 und p27 sind ubiquitär im Organismus vorkommende negative Regulatoren des Zellzyklus. p21 ist hauptsächlich in Zellzyklus-Kontrollpunkten und in Differenzierungsvorgängen invovliert, während p27 eine wichtige Rolle beim Restriktionskontrollpunkt in unterschiedlichen Zelltypen spielt (Chu *et al*., 2008). Am Restriktionspunkt (Kontrollpunkt des Zellzyklus) wird entschieden, ob ausreichend Nährstoffe für die Zellteilung verfügbar sind und die Zelle den Zellzyklus durchlaufen kann. Die Funktion von p57 ist bisher noch vollständig geklärt, allerdings wird dieses Protein insbesondere in sich differenzierenden Zellen exprimiert (Lee *et al*., 1995).

p21 wurde im Jahre 1993 endeckt und ist damit der am längsten bekannte CDK-Inhibitor aus der Cip/Kip-Familie. p21 spielt eine bedeutsame Rolle im Zellzyklus und der Proliferation, reguliert aber auch Apoptose und Zelldifferenzierung. p21 kann kontextabhängig aktivierend, wie auch hemmend auf Apoptose und Zelldifferenzierung einwirken (Dotto, 2000). Da p21 die Zellproliferation in seneszenten Zellen inhibiert, wurde p21 auch CIP1 (*CDK-interacting protein 1*) genannt (Harper *et al*., 1993). Im Gegensatz zu den CDKIs p27 und p57 vermittelt p21 den p53-induzierten Zellzyklus-Arrests (WAF, *wild-type p53 activated factor*). Diese Eigenschaft von p21 beruht auf seiner Fähigkeit Komplexe zu bilden mit Cyclinen, CDKs, DNA-Synthese Inhibitoren (PCNA, *proliferating cell nuclear antigen*), Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren (Dotto, 2000).

Die Aktivität von p21 wird über das Expressionsniveau, posttranslational durch Phosphorylierung sowie intrazelluläre Lokalisation reguliert. In diesem Zusammenhang kann eine Phosphorylierung am Serin 146 die Stabilität des p21 Proteins erhöhen (Zhou *et al.*, 2001). Demgegenüber verringert eine Phosphorylierung am Threonin 145 die Zellzyklus-inhibitorische Aktivität von p21 durch Komplexierung der CDKs 1,2,4 und 6. Die p21 Genexpression wird maßgeblich durch den Transkriptionsfaktor Tumorsuppressor-Protein p53 (Tp53) reguliert, welches im Promotorbereich des p21 Gens bindet und die Transkription initiiert (El-Deiry *et al*., 1993; Bargonetti *et al*., 2002). Allerdings kann die transkriptionelle Regulation von p21 auch p53-unabhängig über Sp1, STATs, C/EBPα und C/EBPβ vermittelt erfolgen (Gartel *et al*., 1999). Im Gegensatz zu p53, regulieren die vorherig genannten Transkriptionsfaktoren die p21 Genexpression bei Differenzierungsprozessen verschiedener Zelltypen (Chellappan *et al*., 1998). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Onkogene

die p21-Expression regulieren (z.B c-myc, Gfi1, Bcr-Abl) (Wu *et al*., 2003; Duan *et al*., 2005b; Phalke *et al*., 2012).

Die zellzyklushemmende Wirkung von p21 geht jedoch nicht nur auf die Inaktivierung von Cyclin-CDK-Komplexen zurück, sondern auch auf seine Fähigkeit mit der carboxyterminalen Domäne mit dem Kernprotein *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) zu interagieren (Luo *et al.,* 1995). PCNA ist essentiell für die DNA-Synthese und vermittelt die Bindung der DNA-Polymerase δ an die DNA in der S-Phase des Zellzyklus. p21 bindet an PCNA und hemmt dessen Interaktion mit der DNA-Polymerase δ, in dessen Folge der Zellzyklus in der S-Phase inhibiert arretiert wird (Waga *et al.*, 1994; Gulbis *et al*., 1996; Cayrol *et al*., 1998). Die Bindung von p21 an PCNA kann aber über Phosphorylierung von p21 am Threonin 145 durch die Akt-Kinase verhindert werden (Rössing *et al*., 2001). Desweiteren vermindert diese Phosphorylierung die p21-abhängige Inhibition von Cyclin-CDK-Komplexen (Hengst *et al*., 1998)

1.4.3 Antimitogene Faktoren: Das Tumorsuppressorprotein p53

p53 wurde erstmalig 1979 von Lane und Kollegen beschrieben (Lane *et al*., 1979) und ist bis heute das meistuntersuchte Tumorsuppressorgen. p53 besitzt ein Molekulargewicht von 53kDa. Es setzt sich aus 393 Aminosäuren zusammen, die mehrere Proteindomänen bilden: eine Transaktivierungsdomäne, eine DNA-Bindungsdomäne und eine Oligomerisierungsdomäne. Die Transaktivierungsdomäne befindet sich am N-Terminus und ist für die Induktion von p53-Zielgenen erforderlich (Fields *et al*., 1990). Die DNA-Bindungsdomäne befindet sich zentral in der Aminosäuresequenz und vermittelt die Bindung an Konsensusbereiche im Promoterbereich p53-regulierter Gene (el-Deiry *et al*., 1992). Die Oligomerisierungsdomäne befindet sich im C-terminalen Bereich des Peptids und ist insbesondere für die Tetramerisierung von p53 erforderlich (Jeffrey *et al*., 1995). Die Tetramerisierung von p53-Molekülen ermöglicht die optimale Bindung an die DNA (Chène, 2001).

Zu den Zielgenen, deren Expression durch p53 reguliert werden gehören die Zellzyklusregulatoren $p21^{CIP1/WAF1}$, GADD45α, PCNA, CyclinD1, 14-3-3sigma, der EGF Rezeptor, das Onkogen mdm2, die pro-apoptotischen Gene BAX, PUMA, BAK sowie die

Ribonukleotid-Reduktase p53R2 (el-Deiry *et al*., 1993; Hollander *et al*., 1993; Wu *et al*., 1993).

p53 blockiert den Zellzyklus insbesondere in der S-Phase durch Transkriptionssteigerung der CDKI $p21^{CIP1/WAF1}$. Dieser Mechanismus ist äußerst bedeutsam für die Reparatur von DNA-Schäden und häufig ursächlich für zelluläre Seneszenz (Gilbert, 2000). Nach erfolgreicher DNA-Reparatur sinken die p53-Expressionslevel und subsequent auch die Transkription von p21 und der Zellzyklus kann abgeschlossen werden. Interessanterweise ist eine sehr starke und langanhaltende Expressionssteigerung von p53 auch in Zusammenhang gebracht worden mit der Aktivierung von Genen der Bcl-2 Familie, wie dem mit Apoptose assoziierten Gen BAX (Miyashita *et al*., 1995; Chipuk *et al*., 2005; Geng *et al*., 2010). Es wurde vermutet, dass die langanhaltende und außergewöhnlich hohe Expression von p53 Ausdruck einer irreversiblen Schädigung der Zelle ist und daher die betroffene Zelle durch Apoptose eleminiert wird (Aylon *et al*., 2007; Zhang *et al*., 2011).

Da p53 durch verschiedenartige posttranslationale Proteinmodifikationen modifiziert werden kann (Zhang *et al*., 2007, 2009) die unterschiedliche Auswirkungen auf die Aktivität des Proteins haben, kann vermutet werden, dass nicht nur das Expressionsniveau alleinig für die spezifischen Wirkungen von p53 verantwortlich ist.

Die Halbwertszeit von p53 liegt im Bereich von 30 Minuten, und das Protein ist nur in geringen Mengen in ruhenden, nicht aktiv proliferierenden Zellen nachzuweisen (Kim *et al*., 2001). DNA-Schäden induzieren eine Phosphorylierung von p53 am Serinrest 392 welche durch die Mitogen-aktivierte Protein (MAP) Kinase p38 ($p38^{MAPK}$) vermittelt wird. MAP-Kinasen sind Serin/Threonin-spezifische Proteinkinasen, welche weitreichend involviert sind in die Regulation der Zellzyklusphasen, der Apoptose, der Differenzierung sowie dem Wachstum von Zellen (Chen *et al*., 2001; Pearson *et al*., 2001). Die Aktivierung der p38 erfolgt insbesondere durch zellulären Stress (z.B. UV-Strahlung, osmotischer Stress, reaktive Stick- und Sauerstoffspezies) und Zytokine (z.B TNFα, TGF-β) (Han *et al*., 1994; Rouse *et al*., 1994; Raingeaud *et al*., 1995; Zarubin *et al*., 2005) und kann Apoptose vermitteln (Chen *et al*., 2001; Johnson *et al*., 2002). Nach Aktivierung akkumulieren die MAP-Kinasen im Zellkern, wo sie nukleäre Transkriptionsfaktoren phosphorylieren können und so die Transkription zellzyklus-regulatorischer Gene induzieren (Davis *et al*., 1995).

Der Abbau von p53 erfolgt insbesondere durch das Onkoprotein mdm2 (*murine double minute gen2*) (Barak *et al*., 1993; Oren, 1999). Das mdm2-Protein ist eine E3-Ubiquitin-Ligase, welche an das Tumorsuppressorgen p53 im Bereich der Transaktivierungs-Domäne bindet und die Ubiquitinierung und den proteosomalen Abbau von p53 induziert (Kubbutat *et al*., 1997). Die durch Zellstress induzierte Phosphorylierung von p53 am Serinrest 15 (Dumaz *et al*., 1999; Lakin *et al*., 1999) bewirkt eine Stabilisierung von p53 indem es die Interaktion mit mdm2 blockiert und so den proteosomalen Abbau verhindert (Oren, 1999).

1.4.4 Antimitogene Faktoren: Growth arrest and DNA damage-inducible protein α

Das *growth arrest and DNA damage-inducible protein* GADD45 wird in 3 Isoformen exprimiert: α, β, γ (Takekawa *et al*., 1998; Zhan *et al*., 1999) die eine Sequenzhomologie von 55% - 57% aufweisen (Zhan *et al*., 1994; Hoffman *et al*., 2007). Alle Isoformen besitzen ein Molekulargewicht von ca. 18kDa und sind sowohl im Zellkern wie auch im Zytosol lokalisiert. Sie dienen als Stresssensoren und werden durch Zytokine, genotoxische Substanzen und DNA-Schäden induziert (Liebermann *et al*., 2011; Salvador *et al*., 2013) und spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Zellzyklus sowie der Apoptose (Hoffman *et al*., 2007). Bis heute ist die Funktionsweise der GADD45-Proteine nicht vollständig verstanden. GADD45α, nicht aber GADD45β und GADD45γ wurde als transkriptionelles Zielgen von p53 beschrieben (Schneider-Stock *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2006;). Die Transkription von GADD45α kann aber sowohl durch p53-abhängige aber auch durch unabhängige Mechanismen vermittelt sein. GADD45α bindet auch an den Promotor von PCNA, dem Regulator der DNA-Reparatur und Replikation und steigert die Genexpression von PCNA (Vairapandi *et al*., 2000). GADD45α interagiert aber auch selbst mit PCNA und bewirkt auf noch unbekannte Weise so eine Erhöhung der Nukleotid-Exzisions-Reparaturaktivität von PCNA (Hollander *et al*., 1993; Liebermann *et al*., 2011).

GADD45α interagiert mit dem CDK2(CDK1)/cyclinB-Komplex (Zhan *et al*. 1999; Yang *et al*., 2000; Vairapandi, *et al*., 2002; Tamura *et al*., 2012). Durch diese Interaktion wird die Kinaseaktivität von CDK2 gehemmt, was zu einem Zellzyklus-Arrest in der G2/M-Phase des Zellzyklus führt (Jin *et al.*, 2000).

1.5 Zelluläre Seneszenz

Zelluläre Seneszenz wurde als irreversibler Zellzyklusarrest bei „gealterten“ Zellen beschrieben, durch den die betroffenen Zellen die Fähigkeit zur Proliferation verlieren , aber trotzdem über einen langen Zeitraum metabolisch aktiv bleiben. Die Seneszenz ist insbesondere charakterisiert durch die Unfähigkeit der Zellen DNA zu Synthetisieren (Matsumura *et al.*, 1979; Sherwood *et al.*, 1988). Das Phänomen der Seneszenz geht auf den US-amerikanischen Gerontologe Leonard Hayflick und seine Kollegen zurück, die in den 60er Jahren an menschlichen Fibroblasten beobachteten, dass „gesunde“ eukaryontische Zellen eine limitierte Teilungsfähigkeit aufweisen (Hayflick *et al.*, 1961). Sie bezeichneten ihre Entdeckung, dass Fibroblasten nach vielen Zellteilungszyklen zwar weiterleben, sich aber nicht mehr weiter teilen können, als das sogenannte „Hayflick-Limit“ (Hayflick *et al.*, 1965).

Nach heutiger Auffassung existieren zwei unterschiedliche Formen der zellulären Seneszenz. Bei der „replikativen Seneszenz“, welche als Folge wiederholter Zellteilungen einsetzt, wird das zelluläre Seneszenz-Programm nach Verkürzung der Telomere auf eine kritische Länge ausgelöst (Martens *et al.*, 2000). Dadurch kommt es zu einem terminalen (irreversiblen) Wachstumsarrest. Telomere sind chromosomenstabilisierende Nukleoproteinkomplexe aus repetitiven DNA-Sequenzen mit spezifischen Bindungsproteinen an den Chromosomenenden (Blackburn, 1991). Das Enzym Telomerase stellt nach DNA-Replikation die Chromosomenenden wieder her. Da die Telomere bei jeder DNA-Replikation nicht vollständig kopiert werden, werden die Chromosomenenden bei jeder Zellteilung geringfügig verkürzt. Diese Verkürzung ist letztlich ursächlich für die Hemmung der Telomeraseaktivität und der verminderten Proliferationsrate (Hahn *et al*., 1999).

Im Gegensatz zur vorhergehend beschriebenen „replikativen“ Seneszenz wird die prämature Seneszenz unabhängig von einer Telomerverkürzung durch Onkogene, Zellgifte oder reaktive Stick- und Sauerstoffspezies vermittelt (Abbildung 7) (Campisi *et al.*, 2009; Sedelnikova *et al.*, 2010). Im Gegensatz zur replikativen Seneszenz, bei der ein irreversibler Wachstumsarrest vorliegt (Sherwood *et al*., 1988), ist die prämature Seneszenz prinzipiell reversibel, wenn die auslösenden Faktoren beseitigt bzw. die DNA-Schäden beseitigt sind (Goligorsky *et al*., 2009). Da sowohl der morphologische und funktionale Phänotyp, als auch die dem Zellzyklusarrest zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bei replikativer und

prämaturer Seneszenz übereinstimmen, können beide Seneszenzformen oberflächlich nicht voneinander unterschieden werden (Toussaint *et al*., 2002).

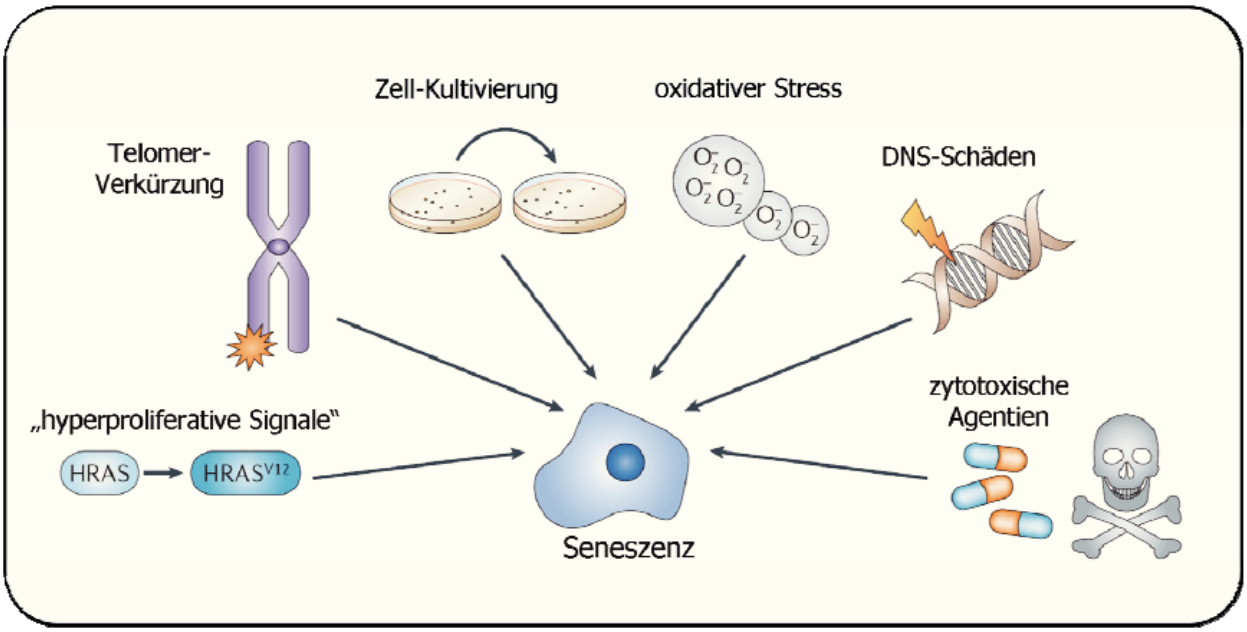


Abb. 7: Übersicht seneszenzauslösender Faktoren. Seneszenz auslösende Faktoren sind heterogen (Modifiziert nach Collado *et al*., 2006).

Zu den charakteristischen morphologischen und funktionalen Änderungen seneszenter Zellen gehören eine atypische Zell- und Zellkernmorphologie, ein erhöhte Zell- und Zellkernvolumen, die Ausbildung vakuolärer Strukturen im Zytoplasma (Goldstein, 1990) und eine verminderte „Reaktionsfähigkeit" gegenüber Wachstumsfaktoren und Botenstoffe.

Die Zellkernmorphologie bei Seneszenz ist auch charakteristisch für das Hutchinson-Gilford-Syndrom (HGPS) / *Progeria infantilis*. Bei diesem Syndrom führen Mutationen im für das Kernhüllenproteins Lamin A kodierenden Gens zur Bildung einer verkürzten Lamin A Variante (Progerin), die in der Zellkernhülle akkumuliert (De Sandre-Giovannoli *et al*., 2003; Eriksson *et al*., 2003). Diese Akkumulation ist wiederum mit der Bildung von oxidativ/nitrosativem Stress (Trigueros-Motos *et al*., 2011; Lattanzi *et al*., 2012) und morphologischen Veränderungen des Zellkerns assoziiert. Obwohl die Funktionen von Lamin A noch nicht vollständig bekannt sind, wird vermutet, dass die Bildung des Progerins Lamin A-abhängige DNA-Reparaturmechanismen beeinträchtigt und die Seneszenz Folge akkumulierender DNA-Schäden darstellt (De Sandre-Giovannoli *et al*., 2003; Eriksson *et al*., 2003; Benson *et al*., 2010; Kuilman *et al*., 2010; Schreiber *et al*., 2013).

Eine weitere charakteristische Veränderung seneszenter Zellen ist die verstärkte Aktivität der lysosomalen, Seneszenz-assoziierten ß-Galaktosidase (SA-ß-Gal) mit pH-Optimum bei pH 6.0 (Dimri *et al*., 1995). Die Messung der SA-ß-Gal Aktivität stellt einen fest etablierten Biomarker für Seneszenz dar (Dimri *et al*., 1995; Campisi *et al*., 2007). Die der erhöhten Aktivität der SA-β-Gal zugrunde liegenden Mechanismen sind gegenwärtig unbekannt.

Die Seneszenz ist charakterisiert durch eine verstärkte Expression von den Zellzyklus inhibierenden Faktoren, wie z.B. von p53, p16, p21 und GADD45α (Herbig *et al*., 2004; Duan *et al*., 2005a). Der Zellzyklusarrest, bzw. eine Seneszenz, kann dabei einerseits durch die Proteine p53, p21, GADD45α oder andererseits über das p16 Protein erfolgen. Sowohl p21, als auch p16 inhibieren die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) und induzieren darüber einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase des Zellzyklus (Bond *et al*., 2004). Die Aktivierung von Rb-Proteinen erfolgt durch eine Dephoshorylierung.

Die Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 kann ein wichtiger Faktor bei der Induktion von Seneszenz darstellen. p53 wird durch Phosphorylierung aktiviert und akkumuliert in der Folge im Zellkern, wo es die Transkription wachstumshemmender Zielgene induziert wie dem p21 Protein in dessen Folge Rb aktiviert wird (Webley *et al.*, 2000).

Zur Bedeutung von Astrozytenseneszenz für neuronale Erkrankungen existieren bislang nur wenige Hinweise. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Astrozytenseneszenz mit neuronalen Störungen bei altersbedingten oder neurodegenerativen Krankheiten, wie z.B. Morbus Alzheimer, assoziiert ist (Bhat *et al*., 2012). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine Astrozytenseneszenz *per se* in Abwesenheit anderer Faktoren die Synapsenreifung und Neurotransmission stört (Kawano *et al*., 2012). So fanden Kawano und Kollegen (2012), dass in Gegenwart seneszenter Astrozyten der Pool an Neurotransmittervesikel an der präsynaptischen Membran (der sog. Ready Releasible Pool) deutlich verringert ist. Diese Vesikel können ihren Inhalt unmittelbar nach Stimulation des Neurons in den synaptischen Spalt freisetzen und so eine elektrische Erregung im benachbarten Neuron auslösen (Kawano *et al*., 2012). In Gegenwart seneszenter Astrozyten ist die Anzahl dieser Vesikel drastisch reduziert und auch die daraus resultierende Erregung deutlich abgeschwächt (Kawano *et al*., 2012). Da eine lang anhaltende verminderte

synaptische Erregung mit strukturellen Änderungen, wie z.B. einer verringerten Synapsendichte, einhergeht (Kawano *et al*., 2012), kann angenommen werden, dass eine Astrozytenseneszenz eine Beeinträchtigungen neuronaler Strukturen hervorruft, die selbst nach Auflösung der Astrozytenseneszenz persistieren können

1.5.1 Arbeitshypothese: Astrozytenseneszenz bei der hepatischen Enzephalopathie

Bislang existieren keine Untersuchungen zur Seneszenz bei hepatischer Enzephalopathie. Interessanterweise existieren aber Hinweise auf Kernanomalien in Astrozyten im Gehirn von Patienten mit Leberzirrhose und HE (Butterworth *et al*., 1987; Norenberg *et al*., 1987) und die HE ist mit der zerebralen Bildung von oxidativ/nitrosativem Stress assoziiert (Schliess *et al*., 2002; Görg *et al*., 2008, 2010b; Häussinger *et al*., 2010), welcher potentiell eine Seneszenz zu induzieren vermag (Schreiber *et al*., 2013).

Da jüngere Arbeiten belegen, dass neuronale Beeinträchtigungen beim Leberzirrhotiker nach Auflösung einer akuten HE-Episode nicht vollständig revertieren (Bajaj *et al*., 2010; Riggio *et al*., 2011) wurde in der vorliegenden Doktorarbeit die Arbeitshypothese aufgestellt, dass die persistierende Beeinträchtigung neuronaler Funktionen bei Zirrhosepatienten nach Auflösung einer akuten HE-Episode Folge einer durch Astrozytenseneszenz vermittelten Beeinträchtigung der neuronalen Vernetzung darstellen könnte.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, zu untersuchen ob die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie mit einer Astrozytenseneszenz assoziiert ist. Eine Astrozytenseneszenz sollte durch Analyse etablierter Seneszenzbiomarker mechanistisch an Ammoniak-exponierten kultivierten Rattenastrozyten überprüft werden und die eine Seneszenz auslösenden Faktoren sowie die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen charakterisiert werden. Die Überprüfung der *in vivo* Relevanz der an Zellkulturen erhobenen Befunde sollten an *post mortem* Hirnproben von Kontrollpatienten und Zirrhosepatienten mit bzw. ohne hepatischer Enzephalopathie nachgewiesen erfolgen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid 4K-Lösung (30%)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ammonium Persulfate	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Apocynin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bafilomycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
BDNF	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bradford Protein Assay	BioRad, München, Deutschland
BSA	PAA-Laboratories, Linz, Deutschland
C_{12}FDG	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
CellMask™ Orange	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dual Color Protein Standard	Bio-Rad, München, Deutschland
EGF	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
FCS	PAA , Linz, Deutschland

Glyzin	Merck, Darmstadt, Deutschland
H_2O_2	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Hoechst34580	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Immersionsöl	Zeiss, Jena, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Latrunculin B	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methylammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
MitoSox™ Red	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MitoTracker ® Green	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MSO	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NaCl	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NADH	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS (mit/ ohne Ca^{2+}/Mg^{2+})	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penizillin/Streptomycin	Cytogen, Sinn, Deutschland
Poly-D-Lysin	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Ponceau-S-Färbelösung	Serva, Heidelberg, Deutschland
Protease inhibitor coctail tablets	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Pyruvat	Merck, Darmstadt, Deutschland
SB203580	Merck, Darmstadt, Deutschland

SDS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
SYBR Green	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TNFα	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Triethanolamin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris	VWR BDH Prolabo Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Triton-X 100	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin/EDTA (0,05%/ 0,02% in PBS)	Cytogen, Sinn, Deutschland
Tunikamyzin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.2 Antikörper

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Primär-und Sekundärantikörper. WB: Western-Blot, IF: Immunfluoreszenz, mAb: monoklonaler Antikörper, pAb: polyklonaler Antiklörper.

Primärantikörper	Wirt	Hersteller	Anwendung
BDNF, mAb	Kaninchen	Epitomics, Burlingame, USA	WB, 1:5000 in TBST+ 10% BSA
EGFR, pAb	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	WB, 1:2500 in TBST+ 10% BSA
GAPDH, mAb	Maus	Meridian Life Science, Memphis, USA	WB, 1:5000 in TBST+ 10% BSA
p21, mAb	Maus	LifeSpan BioSciences Inc., Eching, Deutschland	IF: 1:100 in PBS +Ca^{2+}/+Mg^{2+} + 10% BSA + 0.1% Triton-X 100
p-p53, pAb	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	IF: 1:100 in PBS +Ca^{2+}/+Mg^{2+} + 10% BSA + 0.1% Triton-X 100
TrkB, mAb	Maus	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland	WB, 1:5000 in TBST+ 10% BSA

Sekundärantikörper/ Fluroszenzfarbstoffe	Wirt	Hersteller	Anwendung
Anti Kaninchen HRPOD gekoppelt (Zweitantikörper)	Ziege	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	WB, 1:10000 in TBST+ 10% BSA
Anti Maus HRPOD gekoppelt (Zweitantikörper)	Ziege	Biorad, München, Deutschland	WB, 1:10000 in TBST+ 10% BSA
Hoechst34580	-	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	IF: 1:5000 in PBS $+Ca^{2+}/+Mg^{2+}$ + 10% BSA + 0.1% Triton-X 100

2.1.3 Molekularbiologische Kits

G-Actin/ F-Actin *in vivo* Assay Kit	Cytoskeleton Inc., Denver, USA
In situ Cell Death Detektion Kit	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
N-Glycosidase F Deglycosylation Kit	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
QuantiTect®Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNAse-free DNAse Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy®Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Senescence-Galactosidase staining Kit	Cell Signaling, Frankfurt am Main, Deutschland
Western Lightning Plus ECL™	Amersham,Waltham, Niederlande

2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

2.1.4.1 Lösungen für die Western-Blot Analyse

10x Blottingpuffer:

10mmol/l SDS; 3,86mmol/l Glyzin; 4,78mmol/l Tris

1x Blottingpuffer:

500ml 10x Blottpuffer; 1000ml Methanol; ad 3500ml dH_2O

5x Elekrophoresepuffer:

1,73mmol/l SDS; 125mmol/l Tris; 1,25mmol/l Glyzin

10x TBS:

1,98mmol/l Tris; 1,488mmol/l NaCl; pH 7,6

Waschpuffer:

Tris-gepufferte Hochsalzlösung (TBS) + 0,1% Tween

Hier nicht aufgeführte Chemikalien zur Herstellung von Pufferlösungen wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) in *pro analysi* (p.a.)-Qualität bezogen.

2.1.5 Spezielle Materialien und Geräte

Material	Hersteller
24-Wellplatte	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Cell Strainer, 70µM Nylon	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Deckgläser für die Mikroskopie	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim, Deutschland
Einkanal-Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einmalspritze (1ml, 20ml, 50ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Einwegküvetten	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Glaspipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Ibidi-Schale (∅35mm, Plastik, Glas)	Ibidi, Planegg, Deutschland
MatTek-Schale (∅55mm, Plastik, Glas)	MatTek Corporation, Ashland, USA
Nitrocellulose Transfer Membran Protran®	Whatman, Dassel, Deutchland
Objektträger für die Mikroskopie	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Pipettenspitzen	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
QIAshredder Säulen	Qiagen, Hilden, Deutschland
Reaktionsgefäße (Safe lock)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röhrchen (Greiner, 14ml, 50ml)	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Sterilfilter (Filtropur, 0,20µm)	Millipore, Eschborn, Deutschland
Stripetten (5, 10, 25ml)	Corning Costar GmbH, Bodenheim
Whatman Filterpapier	Whatman, Dassel, Deutschland

Zellkulturflasche (cellstar)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschalen (∅60mm, ∅100mm)	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Zellschaber	Corning Costar GmbH, Bodenheim
Zentrifugationsröhrchen (∅13x51mm, Plastik)	Beckman, Krefeld, Deutschland

Geräte	**Hersteller**
Analysenwaage (Kern 770)	Kern & Sohn, Balingen-Frmmern, Deutschland
Brutschrank (Heracell150)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Cell Observer (Z1)	Zeiss, Jena, Deutschland
Elektrophoresekammer (Biometra)	Biometra, Göttingen, Deutschland
ELYRA (PS1)	Zeiss, Jena, Deutschland
Filterphotometer (ECOM 6122)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Fluorimeter (Fluoroskan Ascent™ FL)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Kodak Digital Image Station (4000MM)	Eastman Kodak Co., Rochester,USA
Konfokales Laserscanning Mikroskop (LSM520 meta)	Zeiss, Jena, Deutschland
Magnetrührer (MR 2000)	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Microarray (Whole Human Genome Array)	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland

Nanodrop (1000 Spectrophotometer)	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Phasenkontrast-Mikroskop (AXIO Vert.A1)	Zeiss, Jena, Deutschland
pH-Meter (330)	WTW , Weilheim, Deutschland
Präzisionswaage Kern (440-47N)	Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland
Realtime-PCR (ABI 7500)	Applied Biosystems, Carlsbad,California
Roller (SRT1)	Stuart Scientific, Staffordshire, USA
Schlauchpumpe (505 S)	Watson-Marlow, Rommerskirchen, Deutschland
Schüttler (GFL-3017)	Hilab, Düsseldorf, Deutschland
Spektrophotometer (Ultrospec 2100 pro)	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Ultrazentrifuge (J2-HS)	Beckman Coulter Inc., Krefeld, Deutschland
VivaTome^{TM} Fluoreszenz Mikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Zentrifuge (5415D)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (Rotina 420R)	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.1.6 Oligonukleotide für die Realtime-PCR (Primer)

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Realtime-PCR Primer. (r): *Rattus norvegicus*, (h): *Homo sapiens*.

Target cDNA	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	GenBank accession no.
Pan-BDNF (r)[1]	GATGAGGACCAGAAGGTTCG	TCCAGCAGAAAGAGCAGAGG	NM_012513
$TrkB_{FL}$ (r)[1]	TATGCTGTGGTGGTGATTGC	TTGGAGATGTGGTGGAGAGG	M55291

$TrkB_{T1}$ (r)[1]	AGTTGGCGAGACATTCCAAG	GGCAACAGTAGTCCCAGGAG	M55292
$TrkB_{T2}$ (r)[1]	AGTTGGCGAGACATTCCAAG	TCATCATAAATCCAGGCACTTC	M55293
HPRT1(r)[2]	TGCTCGAGATGTCATGAAGGA	CAGAGGGCCACAATGTGATG	NM_012583.2
P21 (r)	GAGGCCTCTTCCCCATCTTCT	AATTAAGACACACTGAATGAAGGCTAAG	NM_08078.2
P21 (h)[3]	GGAAGACCATGTGGACCTGT	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA	BT0006719.1
P27 (h)[3]	GCCCTCCCCAGTCTCTCTTA	TCAAAACTCCCAAGCACCTC	AY004255.1
GADD45α (r)[4]	TCTGTTGCGAGAACGACATC	TGTGATGAATGTGGGTTCGT	NM_024127.2
GADD45α (h)[5]	GAGAGCAGAAGACCGAAAGGA	CAGTGATCGTGCGCTGACT	AY135686.1
GADD45β (r)[4]	GCTGGCCATAGACGAAGAAG	TGACAGTTCGTGACCAGGAG	NM_001008321.1
GADD45γ (r)[4]	TCGCACAATGACTCTGGAAG	AGGGTCCACATTCAGGACT	NM_001077640.1
Cyclin D1 (r)[6]	TGCTTGGGAAGTTGTGTTGG	AATGCCATCACGGTCCCTAC	NM_171992.4
Lamin A (r)	ATGGGAAAGATGGGGAAGG	AGATGGGAAGTGGGAATGAAG	X76297.1
Lamin A (h)[7]	GGTGCGCTCAGTGACTGTGGTTGA	GCGCGAGCGCAGGTTGTA	NM_170707.3
Lamin B1 (r)	TCTCTCCAAGTCCTTCTTCCC	TCTTCCACATCAACTCTCTTCC	XM_006254745.1
HPRT1 (h)[2]	TGCTGAGGATTTGGAAAGGT	CTCGAGCAAGACGTTCAGTCC	NM_000194.2

[1] (Wei *et al*., 2010); [2] (Zemtsova *et al*., 2011); [3] (Mizuno *et al*., 2009); [4] (Ozawa *et al*., 2011); [5] (Cheng *et al*., 2013); [6](Wang *et al*., 2011); [7] (Wegner *et al*., 2010)

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation und Kultivierung von Astrozyten aus dem zerebralen Rattenkortex

Für die Präparation von primären Astrozyten wurden Großhirnhemisphären von neugeborenen Wistarratten (Matthiessen *et al*., 1989) verwendet. Nach Dekapitation wurde der Schädel der Ratte für ca. 10 Sekunden in eine 70%ige Ethanollösung gelegt und nachfolgend die Kopfhaut entfernt. Anschließend wurde nach Öffnung des Schädels das freiliegende Hirn entnommen und mittels einer Stereolupe wurden die Hemisphären entlang der Sagitallinie voneinander getrennt. Die Meningen wurden vorsichtig mit zwei Pinzetten entfernt. Mit einem Skalpell wurde danach das aus beiden Hemisphären gewonnene Material grob zerkleinert in 10ml DMEM + 10%Penicillin/Streptomycin und 10%FCS aufgenommen und 1 Minute bei 1500U/Min zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand verworfen, die Zellsuspension und das Gewebepellet in 2ml frischem Zellkulturmedium (10%Penicillin/Streptomycin + 10%FCS) aufgenommen und mittels einer Pasteurpipette durch mehrmaliges auf- und abpipettieren trituiert. Nach Zugabe von 8ml DMEM (1000mg/l D-Glucose, 10%FCS) wurde die erhaltene Zellsuspension durch eine sterile Nylongaze mit einer Maschenweite von 60µm filtriert. Nach dieser Prozedur wurde das Homogenisat auf zwei Gewebekulturflaschen gesplittet und anschließend mit Medium auf ein Volumen von 20ml aufgefüllt. Die Zellen wurden für sieben Tage in einem Brutschrank unter Wasserdampfsättigung von 95% und einem CO_2-Gehalt von 10% bei 37°C kultiviert. Um die Reinheit der Astrozytenkulturen zu erhöhen wurden die Flaschen für 12 Stunden bei 200U/Min geschüttelt. Dadurch kommt es zur Abtrennung von residualen Mikrogliazellen, Oligodendrozyten und in der Kultur verbliebenen Neuronen von den Astrozyten (Booher *et al*., 1972). Die Durchführung alle präparativen Tätigkeiten erfolgte unter einer Sterilbank. Die Astrozyten wurden nach Bildung eines subkonfluenten Monolayers mittels EDTA/Trypsin (0,05%/0,02% in PBS) von der Zellkulturflasche abgelöst (5 Minuten Inkubation) und im Verhältnis 1:2 auf neue Zellkulturflaschen ausgesät. Anschließend wurden die zur Konfluenz angewachsenen Zellen auf unbeschichtete Zellkulturschalen (∅100mm, ∅60mm) oder Deckgläser (∅12mm) ausplattiert. Das Astrozytenkulturmedium (DMEM+ 10%FCS) wurde dreimal pro Woche gewechselt. Das Wachstum der Zellen wurde kontinuierlich mit Hilfe eines Phasenkontrast-Mikroskopes kontrolliert.

2.2.2 Western-Blot Analyse

2.2.2.1 Prinzip

Der Western-Blot dient der qualitativen und semiquantativen Analyse der Expression von Proteinen unter Verwendung von spezifisch gegen das entsprechende Protein gerichteten Antikörpern. Mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)) werden Proteine in einem elektrischen Feld gemäß ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Die Proteine werden im Anschluss daran aus dem Gel durch Anlegen eines elektrischen Gradienten auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (*Blotting*). Die Membran wird nachfolgend mit Antikörpern inkubiert, die das Zielprotein auf der Membran erkennen (Primärantikörper). Anschließend erfolgt die Detektion des Primärantikörpers über eine Chemilumineszenzreaktion, welche durch die Meerrettich-Peroxidase (HRPOD), die am sekundären Antikörper gebunden ist, katalysiert wird. Die Lichtemission, die bei dieser Reaktion entsteht, ermöglicht eine Detektion und relative Quantifizierung der Proteinexpression. Anhand des Molekulargewichtsmarkers kann die Größe des detektierten Proteins geschätzt und die Spezifität des Nachweises überprüft werden.

2.2.2.2 Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten Rattenastrozyten

Zur Extraktion von Proteinen aus Astrogliakulturen wurden die Zellen auf 60mm Schalen ausplattiert und mit 300µl Proteinlysierungspuffer (10mmol/l Tris/HCl Puffer (pH 7,4); 1% Triton X-100; 150mmol/l NaCl; 1mmol/l EDTA; 1mmol/l EGTA; 20mmol/l NaF; 0,2mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid und 0,5% Nonidet-P-40) unter Verwendung eines Zellschabers aufgeschlossen. Das Lysat wurde durch mehrmaliges Pipettieren homogenisiert und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 20.000g für 10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und im Überstand die Proteinkonzentration gemessen.

2.2.2.3 Proteinbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine in den einzelnen Lysaten erfolgte unter Verwendung des BIO-RAD-Proteinbestimmungsassays (BIO-RAD, München, Deutschland) nach Bradford (1976). Jede Probe wurde im Triplikat gemessen. Für die Messung wurden die Proben in einer Einwegküvette in einem Verhältnis von 1:200 (Probe/Bradford-Reagenz) verdünnt und gemischt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von λ=595nm in einem Spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) gemessen und daraus anhand einer Standardkurve die Proteinkonzentration bestimmt. In Abhängigkeit des zu detektierenden Proteins lag die eingesetzte Proteinmenge im Bereich von 30-110µg. Vor dem Auftragen auf das Gel wurde die Probe mit SDS-Auftragspuffer (220mmol/l Tris/HCl (pH 8,8); 22,5mmol/l EDTA; 9% SDS; 40% Glycerin; 0,125% Bromphenolblau; 200mmol/l DTT) durchmischt, gevortext und bei 95°C für 3 Minuten gekocht.

2.2.2.4 Herstellung der Elektrophoresegele

In Abhängigkeit des Molekulargewichts des zu detektierenden Proteins wurden Trenngele mit unterschiedlichen Anteilen an Polyacrylamid (PAA) hergestellt (8-12%).

Die Zusammensetzung der Gele ist in der nachfolgenden Tabelle 3 aufgelistet.

Tab. 3 : Zusammensetzung der Lösungen für die Herstellung von PAA-Gelen.

Substanz	Trenngel (15ml)			Sammelgel (5ml)
	8%	10%	12%	
$H_2O_{Bidest.}$	6,9	5,9	4,9	3,4
30% (w/v) PAA	4,0	5,0	6,0	0,83
1,5mol/l Tris-Puffer (pH 8,8)	3,8	3,8	3,8	-
1,0mol/l Tris-Puffer (pH 6,8)	-	-	-	0,63
10% (w/v) SDS	0,15	0,15	0,15	0,05
10% (w/v) APS	0,15	0,15	0,15	0,05
TEMED	0,009	0,006	0,006	0,005

Für die Herstellung der Gele wurde zwischen zwei Glasplatten (Biometra, Göttingen, Deutschland) das flüssige Trenngel gegossen und zur Glättung der Oberfläche 500µl Isopropanol auf das noch flüssige Trenngel gegeben. Das überschüssige Isopropanol wurde nach der Polymerisation/Aushärtung des Trenngels dekantiert und das Gel mittels Aqua Bidest gewaschen. Das Sammelgel wurde auf das polymerisierte Trenngel gegossen und ein Kamm zur Aussparung von Geltaschen eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in der Elektrophoresekammer befestigt und diese mit Gelelektrophoresepuffer (17,3mmol/l SDS; 125mmol/l Tris; 1,25mol/l Glycin) befüllt.

2.2.2.5 Gelelektrophorese

Die Proben wurden mittels einer Hamilton-Spritze in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Zur Überprüfung des Molekulargewichts wurde ein Größenstandard verwendet (*Dual Color Protein Standard*, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland). Nach dem Befüllen der Probentaschen wurde eine elektrische Spannung von 120V angelegt, bis die Proben vollständig in das Gel eingewandert waren. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte dann bei 160-200V. Die Elektrophorese war mit Erreichen der Lauffront am unteren Ende des Gels abgeschlossen. In Abhängigkeit der PAA Konzentration des Gels und der angelegten Spannung dauerte die Elektrophorese zwischen 2-6 Stunden.

2.2.2.6 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran

Die Durchführung des Proteintransfers aus dem PAA-Gel auf eine Nitrozellulosemembran (*Nitrozellulose Transfer Membran Protran®*, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) erfolgte in einer Elektroblotting-Kammer nach dem *Semidry-blotting* Prinzip. Zunächst soll der Aufbau des Blots erklärt werden: Bei dem verwendeten System stellt die untere Elektrophoreseplatte die Anode und die obere Platte die Kathode der Blottapparatur dar (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland). Zwischen diese Platten wurden sechs Lagen in Elektrophoresepuffer (39mmol/l Glycin; 48mmol/l Tris/HCl; 0,03% SDS; 20% Methanol) getränktes Filterpapier (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) auf die untere Platte gelegt. Anschließend wurden darauf die Nitrozellulosemembran, die zuvor in Aqua Bidest aktiviert und im Anschluss daran für wenige Sekunden im Transferpuffer inkubiert worden war gelegt und darauf das PAA-Gel gelegt. Auf das Gel wurden weitere sechs Lagen in Blottingpuffer

getränktes Filterpapier gelegt. Bei einer Stromstärke von I = 0,8mA/cm^2 wurde der Transfer für 2 oder 3 Stunden durchgeführt. Zur Sicherstellung eines ordnungsgemäßen Blottingvorgangs wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau S Reagenz angefärbt. Dadurch wurden die transferierten Proteine auf der Membran sichtbar. So konnte die Qualität des Transfers überprüft und Membranen mit ungleichmäßigem Transfer aussortiert werden.

2.2.2.7 Immundetektion von Proteinen

Die Nitrozellulosemembran wurde für 10 Minuten mit einer TBS-T (Tris 20mmol/l; pH7,5; NaCl 150mmol/l; 0,1% Tween-20; 10% BSA) Lösung blockiert. Dadurch wurden freie Bindungsstellen für Proteine auf der Membran gesättigt. Der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000-1:5000 in TBS-T mit einem BSA-Anteil von 10% BSA eingesetzt. Auf einem Schüttler bzw. einem Roller wurde die Membran anschließend für 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) mit der Antikörperlösung inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran dreimalig mit TBS-T für jeweils 10 Minuten gewaschen. Danach wurde die Membran mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten HRPOD-gekoppelten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:10000 in TBS-T (mit 10% BSA) inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran unter Schütteln bzw. Rollen für 2 Stunden bei RT inkubiert. Durch erneutes dreimaliges Waschen der Membran (für jeweils 10 Minuten) mit TBS-T wurde überschüssiger, nicht gebundener Zweitantikörper entfernt. Die Detektion der Immunkomplexe erfolgte unter Verwendung des *Western Lightning Plus ECL^{TM} Kit* (Waltham, USA). Die Lichtemission wurde digital mit der *Kodak Digital Image Station* 4000MM (Eastman Kodak Co., Rochester, USA) aufgezeichnet.

Nach Detektion des Zielproteins wurde die gleiche Membran mit einem monoklonalen, gegen die GAPDH gerichteten Antikörper (1: 5000 in TBS-T, 10% BSA) für 1 Stunde inkubiert. Nach Waschen der Membran wurde der Blot mit einem monoklonalen gegen Maus-Immunglobuline-gerichteten, HRPOD-gekoppelten Antikörper (1:10000 in TBS-T; 10% BSA) inkubiert. Am Ende der Inkubation wurde die Membran erneut gewaschen und die Chemilumineszenz wie vorher beschrieben detektiert.

2.2.3 Densitometrische Quantifizierung

Die densitometrische Auswertung der Bandenintensität erfolgte mittels der *Kodak Digital Image Station* 4000MM und der Auswertungssoftware Kodak MI Software (v.4.0.3) (Eastman Kodak Co., Rochester, USA).

2.2.4 Realtime-PCR

2.2.4.1 Prinzip

Die quantitative *Realtime*-PCR (qPCR) basiert auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion und erlaubt eine Quantifizierung der amplifizierten DNA-Moleküle. Die Amplifikation wurde in dieser Doktorarbeit mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs *SYBR Green* detektiert, welcher nach Anregung mit Licht der Wellenlänge λ=494nm an doppelsträngige DNA bindet und dadurch fluoresziert. Nach jedem Amplifikationszyklus wird die *SYBR Green* Fluoreszenzintensität λ=521nm bestimmt. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals ist dabei proportional zur Menge der Amplifikate (Heid *et al.,* 1996). Die Quantifizierung der Amplifikate muss in der exponentiellen Phase der PCR erfolgen, da sich hier mit jedem Zellzyklus die Menge an Produkt verdoppelt. Der Threshold der hierfür gesetzt werden muss wurde automatisiert von der ABI Software SDS Version 1.4 Patch 2 bestimmt und über die $\Delta\Delta C_T$-Methode ermittelt (Livak *et al*., 2001).

2.2.4.2 Durchführung

RNA kultivierter Astrozyten wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert. Mittels Nanodrop wurde die extrahierte RNA durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm quantifiziert. Die cDNA wurde mit Hilfe des *First Strand cDNA-Synthesis-Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) unter Verwendung von 1µg RNA synthetisiert und diese in der PCR eingesetzt. Die Durchführung der Realtime-PCR erfolgte am ABI 7500 (Applied Biosystems) unter Verwendung eines *Standard-PCR-Mixes*. Dieser setzt sich wie folgt zusammen:

Tab. 4: Reaktionsgemisch für die Realtime-PCR.

Komponente	Volumen in µl
cDNA (1:6 verdünnt, 10ng/µl)	1,2
Primer forward (10pmol/µl)	1,0
Primer reverse (10pmol/µl)	1,0
2 x SYBR Green	12,5
Nuklease-freies Wasser	9,3
Gesamtvolumen	25

Aus diesem Reaktionsansatz wurden in jedes Well einer 96-Well Reaktionsplatte (Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien) 25µl gegeben. Jedes untersuchte Gen wurde in jeder Probe im Duplikat gemessen. Anschließend wurde die 96-Wellplatte mit einer durchsichtigen Folie verschlossen, in den ABI 7500 Cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien) überführt und die PCR unter den nachfolgenden Bedingungen durchgeführt:

Tab. 5: Verwendete Einstellungen bei der Durchführung der Realtime-PCR.

RT-PCR			
Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Denaturation	50	2 Minuten	
Denaturation	95	10 Minuten	40
Annealing	95	15 Sekunden	
Elongation	60	1 Minuten	

Am Ende der PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um zwischen den korrekten Produkten und Artefakten (wie z.B. Primerdimere) differenzieren zu können. Dabei lösen sich Helizes der doppelsträngigen DNA durch langsames Erhitzen (schmelzen). Währenddessen wird die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Das „schmelzen“ beruht auf einer Denaturierung des DNA Doppelstranges, die charakteristisch für das Amplifikat ist und eine spezifische Schmelztemperatur aufweist. Dabei dissoziert der Fluoreszenzfarbstoff von der DNA und es kommt zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität. Ist die PCR erfolgreich und spezifisch verlaufen, wird ein einzelner Peak erkennbar, der die Synthese eines spezifischen

Produktes anzeigt. Die relative Quantifizierung der Amplifikate wurde mittels Delta-Delta-C_t-($\Delta\Delta C_t$) Methode durchgeführt (Livak *et al*., 2001). Hierbei wurde die Expression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes *Housekeeping-Gen* (HPRT (Hypoxanthine ribosyl transferase)) bezogen. Aus den Delta C_t (ΔC_t) Werten beider Gruppen wurde der $\Delta\Delta C_t$-Wert und der Expressionsunterschied zwischen beiden Gruppen durch die Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ermittelt.

ΔC_t = C_t Zielgen-C_t Referenzgen
$\Delta\Delta C_t$ = ΔC_t Behandlung– ΔC_t Kontrolle
Ratio = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Abb. 8: Delta-Delta-C_t ($\Delta\Delta C_t$)Methode zur relativen Quantifizierung.

2.2.5 Immunfluoreszenzanalyse

2.2.5.1 Prinzip

Zur Lokalisation von Proteinen in Zellen wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Hierbei bindet ein primärer Antikörper an das Epitop eines spezifischen Proteins. Der sekundäre, mit einem Fluorochrom markierte Antikörper erkennt hingegen den primären Antikörper. Die Elektronen des Fluorochroms werden durch Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt. Nach Abfall der Elektronen auf das anfängliche Energieniveau werden Photonen freigesetzt, welche als „Fluoreszenz“ detektierbar sind.

2.2.5.2 Durchführung

Rattenastrozyten wurden auf MatTek Schalen (∅55mm, Plastik) ausplattiert und wie entsprechend angegeben experimentell behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol für 5 Minuten bei RT fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (+Mg^{2+}/+Ca^{2+}) wurden die Zellen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in einer PBS-Lösung (+Mg^{2+}/+Ca^{2+}), die 10% BSA enthielt, für 10-30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für zwei Stunden mit den Primärantikörpern (p21 (mAb, 1:50) und p53 (pAb 1:100)) in PBS (+Mg^{2+}/+Ca^{2+})+ 10% BSA bei RT inkubiert. Pro MatTek Schale wurden 300µl Antikörperlösung verwendet. Nach Inkubation wurden die Zellen dreimalig mit PBS (+Mg^{2+}/+Ca^{2+}) gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen mit dem

Fluorochrom-konjugierten (FITC-bzw. CY3) Sekundärantikörper (1:100-1:200 in PBS + BSA 10%) für 2 Stunden bei RT inkubiert.

Zellkerne wurden mit Hoechst34580 (1:5000) angefärbt. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen dreimalig mit PBS ($+Mg^{2+}/+Ca^{2+}$) gewaschen, um nicht gebundene, überschüssige Sekundärantikörper wegzuspülen. Um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern wurden 2ml PBS ($+Mg^{2+}/+Ca^{2+}$) in jede MatTek Schale pipettiert und die Fluoreszenz bei 250-facher Vergrößerung mit einem *Cellobserver*. Z1 Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) und der *Software AxioVision* aufgenommen.

2.2.6 ELYRA-Superhochauflösende Mikroskopie

ELYRA „*super resolution structured illumination microscopy*“ (SR-SIM) stellt ein modernes hochauflösendes Mikroskopie-Verfahren dar, welches eine spezialisierte Beleuchtungstechnik mit nachfolgender mathematischer Berechnungstechnik nutzt.

Die ELYRA Aufnahme in dieser Arbeit wurde unter Verwendung geeigneter Deckgläser durchgeführt (Peter Oehmen GmbH, Dicke: 170±5µm, ∅13mm), auf denen die Zellen ausplattiert worden waren. Die Errechnung der SIM-Bilder erfolgte mittels ZEN Software (ZEISS, Jena, Deutschland) unter Verwendung der nachfolgenden Parameter: PSF: 0; PSF: *File*; *Baseline_Cut*: 1; SR_*Frequency_Weighting*: 1; *Auto_Noise_Filter*: 1; *Sectioning*: 100, 83, 83; *Max_Isotropy*: 0; *Noise_Filter-Channel* 515.521824: -4.1559; *Noise_Filter-Channel* 459.592025: -4.7384; *Noise_Filte -Channel* 578.617841: -4.3939.

2.2.7 VivaTome™ Mikroskopie

Die *VivaTome™* Mikroskopie ist eine Mikroskopiertechnik, die die Darstellung dynamischer Prozesse an lebenden Proben und Organismen ermöglicht. Mit Hilfe der VivaTome™ Einheit können optische Schnittbilder mit einer hohen Aufnahmegeschwindigkeit und ähnlich der konfokalen Mikroskopie aufgezeichnet werden.

Das *VivaTome* verwendet eine Kaltlichtquelle, wodurch eine probenschonende Anregung der Fluorochrome ermöglicht wird. Die Beleuchtung erfolgt durch eine sich mit hoher Geschwindigkeit drehenden Scheibe, auf der sich ein Gittermuster befindet. Dabei dringt sowohl das Anregungs- wie auch das Emissionslicht der Probe durch die Scheibe. Das Anregungslicht gelangt durch die Lochblende auf die abzubildende Ebene und regt die

Fluorochrome in der Probe an. Gleichzeitig wird Emissionslicht aus anderen als der abzubildende Ebene daran gehindert zurück auf das Objektiv zu treffen. Zusätzlich wird Licht, dass nicht aus der zu fokussierenden Ebene stammt, separat aufgefangen und verwendet um aus dem Bild, welches die Information der fokalen Ebene enthält, das Streulicht, welches aus anderen Ebenen stammt, herauszurechnen.

2.2.8 Astrozytenproliferation

2.2.8.1 Prinzip

Die Zellproliferation beruht auf einer Vermehrung der Zellmasse, der DNA und Teilung der Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Zellproliferation durch fluorimetrische Bestimmung des DNA-Gehalts mittels *Fluoroskan Ascent™* FL (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland) gemessen. Hierbei handelt es sich um eine etablierte und weit verbreitete Technik (Richards *et al*., 1985; Rago *et al*., 1990). Die Markierung der DNA erfolgte dabei durch Anfärbung der Zellen mit Hoechst34580.

2.2.8.2 Durchführung

Astrozyten wurden in einer Zellkulturflasche (250mm² Wachstumsfläche) bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Nachfolgend wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen durch Inkubation in einer Trypsinlösung von der Wachstumsfläche abgelöst (5ml, 37°C, 5 Minuten). Am Ende der Inkubation wurden 45ml Zellkulturmedium (1g/l Glucose DMEM mit 10% FCS) auf die Zellsuspension gegeben und Zellaggregate durch Trituieren aufgelöst und jeweils 1ml der zellhaltigen Suspension pro Well einer 24-Wellplatte gegeben. Nachfolgend wurde die 24-Wellplatte für 6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumaustausch mit Zellkulturmedium ohne FCS. Nach erneuter 30 minütiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit unterschiedlichen NH_4Cl-Konzentrationen in An- oder Abwesenheit der jeweils angegebenen Inhibitoren stimuliert oder blieben unbehandelt. Am Ende des Experiments wurden die adhärenten Zellen mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung für 5 Minuten bei RT und nachfolgend dreimalig mit PBS ($+Mg^{2+}/+Ca^{2+}$) gewaschen. DNA wurde nachfolgend durch Inkubation der Zelle für 15 Minuten bei 37°C mit Hoechst34580 (1:5000) angefärbt. Abschließend wurden die Zellen erneut dreimalig mit PBS ($+Mg^{2+}/+Ca^{2+}$) gewaschen. Die DNA Menge in den

Astrozytenkulturen wurde mittels fluorimetrischer Quantifizierung der Hoechst34850 Fluoreszenz (Exzitation: 380nm, Emission: 460nm) im *Fluoroskan Ascent™* FL (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland) gemessen. Für jede Versuchsbedingung wurden pro Präparation 3 individuelle Messungen durchgeführt und die mittleren Fluoreszenzintensitätswerte für weitere Berechnungen verwendet. Von den so erhaltenen Werten wurde die Hintergrundfluoreszenz der nicht mit Hoechst gefärbten Astrozyten subtrahiert.

2.2.9 ß-Galaktosidaseaktivität

2.2.9.1 Prinzip

Seneszente Zellen exprimieren eine β-Galaktosidase (β-Gal) Isoform mit einem charakteristischen pH-Optimum von pH 6 (Linskens *et al*., 1995). Der Nachweis einer β-Gal Aktivität bei pH 6 dient als Biomarker für Seneszenz (Dimri *et al*., 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurden die β-Gal-*Substrate 5-Dodecanoylaminofluorescein-di*-β-*D-galactopyranoside* (C_{12}FDG) und *5-Brom-4-chlor-3-indolyl*-β-*D-galactopyranosid* (X-Gal) verwendet. C_{12}FDG und X-Gal (Abbildung 9 und 10)sind lipophile ß-Galaktosidase Substrate, welche die Zellmembran vitaler Zellen permeieren. Nach intrazellulärer hydrolytischer Spaltung durch die β-Galaktosidase emittiert das Spaltprodukt von C_{12}FDG (C_{12}F) im grünen Spektrum nach Anregung bei 488nm und das Spaltprodukt von X-Gal (5-*Brom-4-chlor-indoxyl*) in ein lichtmikroskopisch erkennbares blaues Präzipitat. Beide Spaltprodukte sind nicht membrangängig und verbleiben daher in der Zelle (Matsumura *et al*., 1979; Munoz *et al*., 2007). Die Menge an gebildeten Spaltprodukten ist proportional zur Aktivität der Seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase bei pH 6 (Dimri *et al*., 1995).

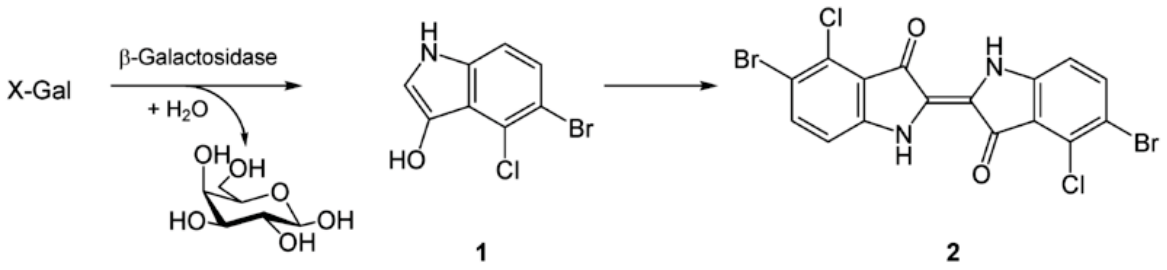


Abb. 9: Schematische Darstellung der enzymatischen Umsetzung von X-Gal durch die β-Galaktosidase. Durch Spaltung von X-Gal wird *5-Brom-4-chlor-indoxyl* gebildet (1). Dieses setzt nach Oxidation und Dimerisierung den blauen Indigofarbstoff *5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo* frei (2) (Quelle: http://en.wikipedia.org/wiki/File:X-Gal_reaction.png).

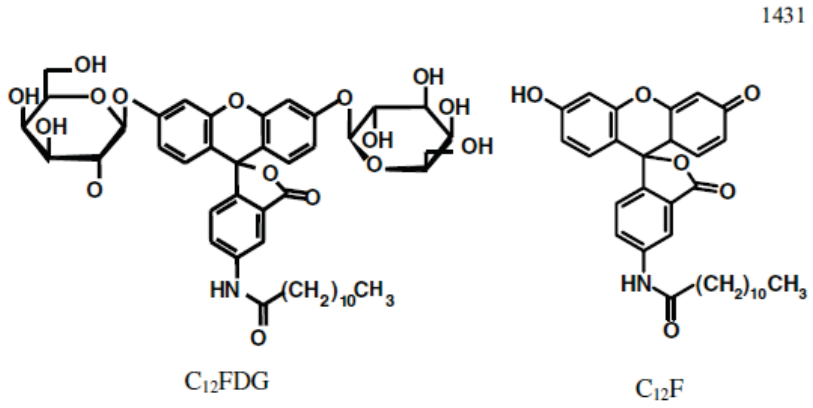


Abb. 10: Strukturformel von 5-*Dodecanoylaminofluorescein-di*-β-*D-galactopyranoside* (C_{12}FDG) und 5-*Dodecanoylaminofluorescein* (C_{12}F) (Okamoto *et al*., 2006).

2.2.9.2 Durchführung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der Seneszenz-assoziierten ß-Galaktosidase (SA-ß-Gal) unter Verwendung des *SA-ß-Gal Staining Kits* (Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die Umsetzung des β-Galaktosidasesubstrats *5-Brom-4-chlor-3-indolyl*-β-*D-galactopyranosid* lichtmikroskopisch erfasst.

In einem weiteren Ansatz wurde die SA-ß-Gal Aktivität nach Debacq-Chainiaux *et al*. (2009) bestimmt. Für beide SA-ß-Gal Aktivitätsnachweise wurden Rattenastrozyten auf Ibidi Schalen (∅35mm, Plastik) ausplattiert. Die Einstellung des pH-Werts in den Zellkulturen erfolgte durch Stimulation der Kulturen mit Bafilomycin A1 (100nmol/l, 1 Stunde, bei 37°C, 5% CO_2). Im Anschluss wurden die Astrozyten nach Zugabe von C_{12}FDG für weitere 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Am Ende der Inkubation wurden die Zellkerne mit Hoechst34580 (1:5000) angefärbt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS (+Mg^{2+}/+Ca^{2+})

gewaschen und mit Paraformaldehyd für 5 Minuten bei RT fixiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS (+Mg^{2+}/+Ca^{2+}) wurden die Zellen mit dem Cellobserver. Z1 Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) unter Verwendung einer 250-fachen Vergrößerung untersucht.

2.2.10 Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) Aktivität

2.2.10.1 Prinzip

Die L-Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein ubiquitär im Organismus in allen Zelltypen vorhandenes Enzym, welches die Umwandlung von Laktat zu Pyruvat bzw. von Pyruvat zu Laktat katalysiert. Bei dieser Reaktion ist NADH bzw. NAD^+ als Kofaktor beteiligt (Abbildung 11).

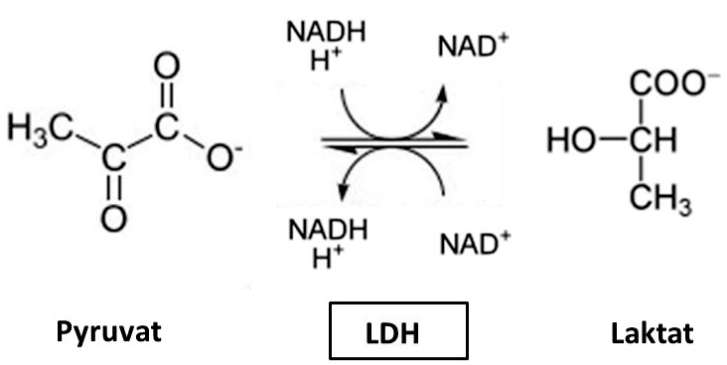


Abb. 11: Schematische Darstellung der Laktatdehydrogenase (LDH)-katalysierten Reaktionen (Modifiziert nach Quelle: http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/lactat-dehydrogenase).

Der Zelltod und der damit vergesellschaftete Membranintegritätsverlust ist mit einer Freisetzung des Enzyms assoziiert. Die Aktivität der LDH kann im Zellkulturüberstand gemessen werden (Matthew *et al.*, 1994) und dient als Indikator für den Grad der Zellschädigung. Die Messung erlaubt keinen Rückschluss, ob die Zellen durch Apoptose oder Nekrose zugrunde gegangen sind.

2.2.10.2 Durchführung

Die auf 100mm Schalen ausplattierten Rattenastrozyten wurden mit NH_4Cl (5mmol/l) für 72 Stunden stimuliert. Zur Induktion einer Zellschädigung (Positivkontrolle) wurden die Astrozyten mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2; 5mmol/l) für 1 Stunde behandelt. Zellüberstände

wurden am Ende der Experimente abgenommen und in 2ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. In einer Einwegküvette wurden 400µl Zellkulturüberstand und 500µl Testreagenz (211µmol/l NADH, 909µmol/l Pyruvat und 100mmol/l Triethanolamin-Puffer (pH 7,6) in Aqua Bidest) gegeben und mit einem kleinen Spatel luftblasenfrei homogen vermischt. Abschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von λ=340nm in einem Filterphotometer (ECOM 6122, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für jede Probe im Duplikat gemessen.

2.2.11 TUNEL Färbung

2.2.11.1 Prinzip

Durch die sog. TUNEL-Färbung (*Terminal-Transferase-Uridine-Nick-End-Labeling*) können apoptotische Zellen mittels Immunofluoreszenz nachgewiesen werden. Die Apoptose, auch „programmierter Zelltod" genannt, ist ein gerichteter Prozess in dessen Verlauf definierte Signalkaskaden aktiviert werden, die zum Untergang der Zelle führen (Gerdes *et al*., 1983; Steller *et al*., 1995). Während der Apoptose entstehen durch Endonukleaseaktivität DNA-Strangbrüche in der DNA, die von freien 3‘-Hydroxylenden (3‘-OH-Gruppen) flankiert werden. An diese freien 3‘-OH-Gruppen hängt das Enzym terminale Deoxynukleotidtransferase (TdT) fluoreszenzmarkierte Nukleotide an. Hierdurch wird es möglich, apoptotische Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie zu identifizieren und zu quantifizieren.

2.2.11.2 Durchführung

Auf Poly-D-Lysin (PDL) (0,1mg/ml) beschichtete Deckgläser wurden Rattenastrozyten ausplattiert und für 24, 48 oder 72 Stunden mit NH_4Cl (5mmol/l) behandelt. Nachfolgend wurden apoptotische Zellen mit einem kommerziellen Kit („*In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein*“, Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) nach Angaben des Herstellers identifiziert. Am Ende des Experiments wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert (4%, 1 Stunde, RT), dreimal mit PBS gewaschen und permeabilisiert (0,1% Triton-X, 0,1% Natriumzitrat in PBS). Nachfolgend wurden die Zellen mit 55µl „*Enzyme Solution*“ und 495µl „*Labeling Solution*“ für 2h bei 37°C inkubiert. Zellkerne wurden mittels Hoechst34580 (1:5000, 5 Minuten) angefärbt. Am Ende der Inkubation wurden die Zellen dreimalig mit PBS

gewaschen und die Deckgläser unter Verwendung von *Fluoromount-G Mounting*-Medium auf Objektträgern angebracht. Abschließend erfolgte eine mikroskopische Analyse der TUNEL-Färbung mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM510, Zeiss, Jena, Deutschland) bei 200-facher Vergrößerung.

2.2.12 Nachweis der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies mittels *MitoSOX™*

2.2.12.1 Prinzip

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) erfolgt in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle. Zu den reaktiven Sauerstoffspezies zählen Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Superoxid-Anionradikal (O_2^-) und das Hydroxylradikal (OH) (Schmidt, 2007).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können in vitalen Zellen mit dem ROS-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff *MitoSOX™ Red* detektiert werden. *MitoSOX™ Red* akkumuliert im Zellkern, in den Mitochondrien, befindet sich aber auch im Zytosol und wird durch Superoxidanionradikale oxidiert. Nach Oxidation bindet das Oxidationsprodukt an Nukleinsäuren, wodurch es zur Ausbildung einer charakteristisch roten Fluoreszenz nach Anregung mit Licht der Wellenlänge λ=568nm kommt (Abbildung 12).

Der Fluoreszenzfarbstoff *MitoTracker® Green* akkumuliert in Mitochondrien und verbleibt dort aufgrund der Bindung eines Chlormethylrestes an freie Thiolgruppen in Proteinen (Presley *et al*., 2003).

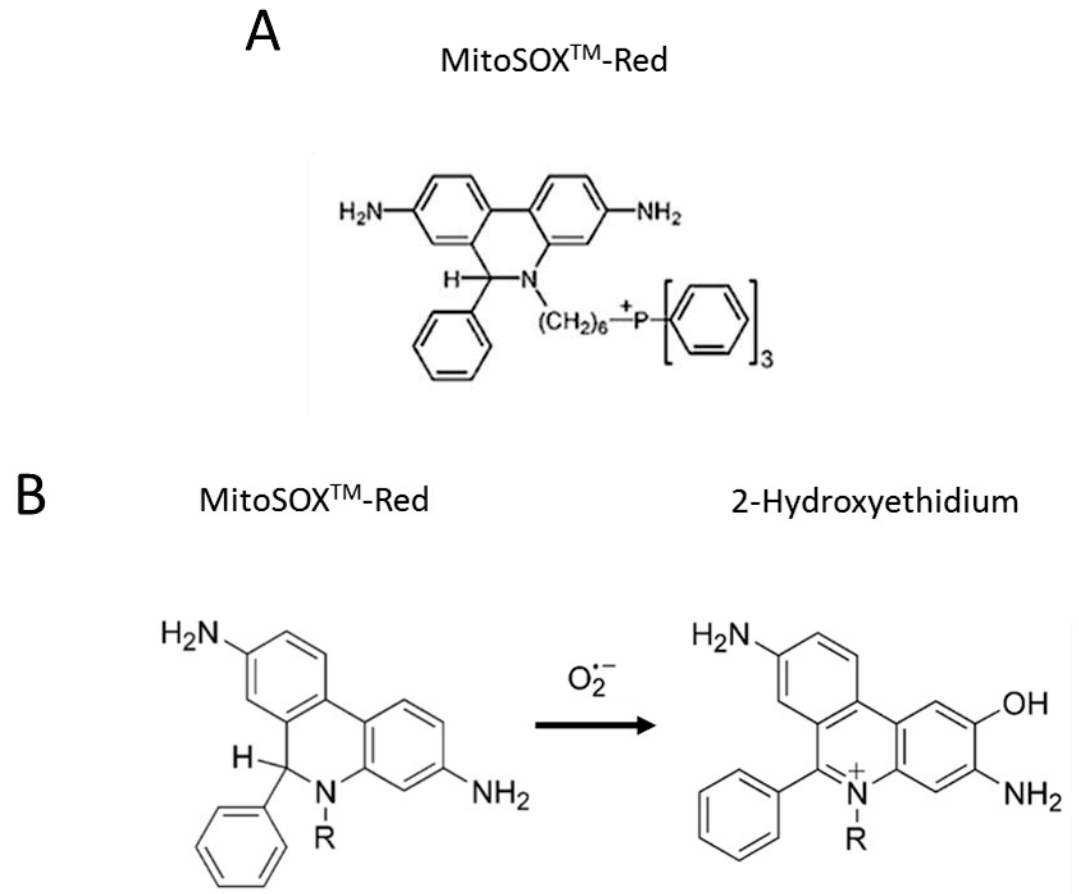


Abb. 12: **Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies mittels *MitoSOX™ Red*.** (A) Strukturformel *MitoSOX™ Red*. (B) *MitoSOX™ Red* reagiert mit Superoxidanionradikal unter Bildung des fluorogenen Substrats 2-Hydroxyethidium. R: Rest (Zielonka *et al*., 2010).

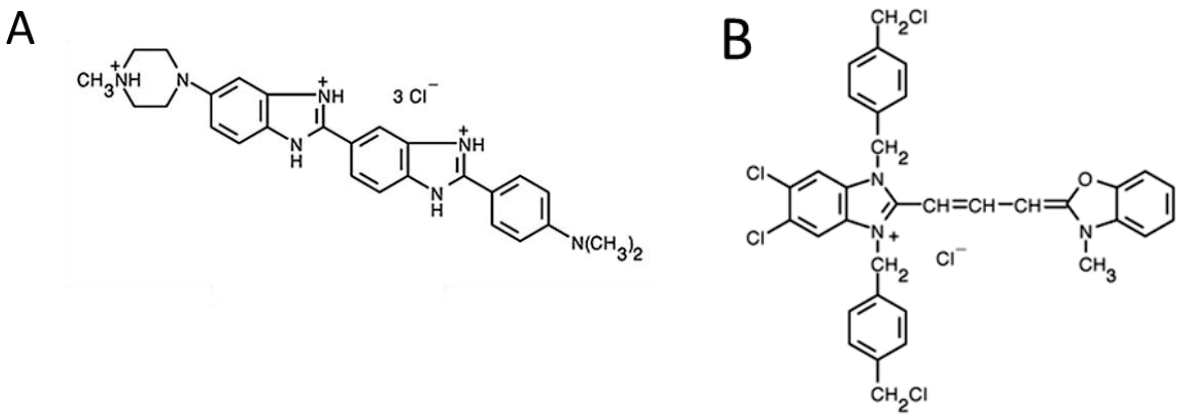


Abb. 13: Strukturformel von (A) Hoechst34580 und (B) *MitoTracker® Green* (Quelle: http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/H21486).

2.2.12.2 Durchführung

Kultivierte Rattenastrozyten wurden auf MatTek- und Ibidi-Schalen ausplattiert. Hierfür wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit 5ml Trypsin (Cytogen, Sinn, Deutschland) bei 37°C für 5 Minuten inkubiert. Nachfolgend wurden 14ml Zellkulturmedium (DMEM, 10% FCS) auf die Zellen gegeben und Zellaggregate durch Trituieren vereinzelt. Im Anschluss erfolgte eine weitere Verdünnung der Zellsuspension durch Zugabe von 6ml Zellkulturmedium (DMEM, 10% FCS). Auf eine MatTek Schale (∅55mm, Plastik) wurde 500µl und auf eine Ibidi Schale (∅35mm, Plastik, Glas) 1ml von der gewonnen Zellsuspension gegeben. Nachfolgend wurden die Zellen 3 Tage bis zur Konfluenz inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Zellkulturmedium ohne FCS gewaschen und für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert, bevor sie für die angegebenen Zeiträume mit NH_4Cl in An- und Abwesenheit weiterer Substanzen wie angegeben behandelt wurden oder blieben unbehandelt. Am Ende des Experiments wurden die vitalen Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff *MitoTracker® Green* (1µmol/l, 15 Minuten) und *MitoSOX™ Red* (0,5µmol/l, 10 Minuten) inkubiert. Zellkerne wurden mittels Hoechst34580 (1:5000, 5 Minuten) angefärbt. Am Ende des Experiments wurden die Zellen dreimalig mit Zellkulturmedium ohne FCS gewaschen und mittels *Cellobserver*. Z1 oder ELYRA PS1 (Zeiss, Jena, Deutschland) mikroskopiert.

Die Nukleare ROS-Bildung wurde automatisiert mit Hilfe eines selbstprogrammierten Java-Skripts für ImageJ (Rasband, WS, ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) quantifiziert. Dabei wurde im Bereich aller durch Hoechst34580 markierten Zellkerne die *MitoSOX™ Red* Fluoreszenzintensität gemessen.

Die Fluoreszenzintensität der unbehandelten Astrozyten (Kontrolle) wurde auf 1 gesetzt und die Intensität in behandelten Astrozyten wurde relativ zur Kontrolle angegeben.

2.2.13 Aktinpolymerisation

2.2.13.1 Prinzip

Aktin ist ein in allen eukaryotischen Zellen vorhandenes Strukturprotein und ein wesentliches Element des Zytoskeletts (Milligan *et al*., 1990). Es existiert in einer

monomeren Form (*globular Actin* = G-Aktin) oder bildet Polymere (*filamenteous Actin* = F-Aktin).

Zur Messung des Anteils monomerer und polymerer Aktinmoleküle werden Zellen mit einem Lysepuffer aufgespalten, welcher G- und F-Aktin stabilisiert. Durch Ultrazentrifugation kann das schwere F-Aktin pelletiert und so vom G-Aktin, welches sich im Überstand befindet, separiert werden. Im Pellet und Überstand kann dann Aktin mittels Western-Blot detektiert werden.

2.2.13.2 Durchführung

Rattenastrozyten wurden auf Zellkulturschalen (∅100mm) bis zur Konfluenz kultiviert und mit NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden), Tunikamyzin (1µg/ml, 16 Stunden) mit und ohne BDNF (50ng/ml, 20 Minuten) behandelt. Die relative Quantifizierung von F- und G-Aktin erfolgte unter Verwendung des Kits „ *G-Actin/F-Actin In Vivo Assay Kit*“ (Cytoskeleton, Inc., Denver, USA) nach Protokoll des Herstellers. Hierfür wurden die Astrozytenkulturen von der Kulturschale mit einem Zellschaber abgelöst und in 500µl Lysepuffer (LAS2 (*Lysis and F-actin Stabilization* 2)) aufgenommen. Die Probe wurde durch mehrmaliges vorsichtiges auf- und abpipettieren homogenisiert und danach für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben bei 350g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen und dann bei 100.000g für 1 Stunde bei 37°C ultrazentrifugiert. Im Überstand befindet sich nach Zentrifugation monomeres Aktin („*globular actin*“ = G-Aktin). Das Pellet wurde in 500µl F-Aktin Depolymerisationspuffer (FAD02) aufgenommen und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Dabei wurde die Lösung alle 15 Minuten durch vorsichtiges Schütteln des 1,5ml Reaktionsgefäßes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchmischt. Am Ende des Versuchs wurden die Proteinfraktionierungen mittels SDS-PAGE in einem elektrischen Feld gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und mittels Western-Blot detektiert und quantifiziert.

2.2.14 Deglykosylierung

2.2.14.1 Prinzip

Die Glykosylierung von Proteinen kann *in vitro* durch enzymatischen Abbau der an Proteinen gebundenen Zucker nachgewiesen werden (Deglykosylierungsreaktion). In dieser Arbeit

wurden Astrozytenproteinlysate mit N-Glycosidase F inkubiert, welche N-Glykosidische Bindungen aufspaltet. Im Western-Blot kann ein Molekularshift eines Proteins nach Inkubation mit N-Glycosidase F auf eine Deglykosylierung hinweisen.

2.2.14.2 Durchführung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Deglykosylierung unter Verwendung des *N-Glykosidase F Deglycosylation kits* (Roch, Diagnostics, Penzberg, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zuerst wurden in einem Reaktionsgefäß 5µl (70µg Protein) der zu untersuchenden Probe mit 5µl Denaturierungspuffer (Phosphatpuffer mit ionischem Detergenz, pH 8,6) vermischt. Nach Inkubation für 3 Minuten bei 95°C in einem Heizblock wurden die Proben mit 10µl des Reaktionspuffers vermischt bevor 10µl der N-Glykosidase F bzw. 10µl Reaktionspuffer ohne N-Glykosidase F bei den Kontrollen dazugegeben wurde. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Proben bei 37°C für 3 Stunden. Nach diesem Schritt wurde dann ein Anteil dieser Probe mit einer identischen Menge an SDS-Puffer versetzt und für 3 Minuten bei 95°C im Heizblock inkubiert. Im Anschluss daran wurden Proben mittels Western-Blot auf die Expression des BDNF-Rezeptors TrkB untersucht.

2.2.15 *Post mortem* Hirngewebe

Humanes *post mortem* Hirngewebe wurde im Rahmen des Körperspender-Programms der Anatomie der Universität Düsseldorf (Deutschland) oder durch das australische *New South Wales* (NSW) *Tissue Resource Centre* zur Verfügung gestellt. Detaillierte Informationen zu den Patienten, die in dieser Untersuchung eingeschlossen wurden, sind in Tabelle 6 und 7 aufgelistet.

Tab. 6: Patientendemographie, Todesursache und Ätiologie der Zirrhose bei Leberzirrhosepatienten mit oder ohne HE. 7 Kontrollen, 4 Patienten mit Zirrhose ohne HE und 8 Patienten mit Zirrhose mit HE wurden vom *New South Wales* (NSW) *Tissue Resource Centre* (University of Sydney, Australia) bezogen. Ko: Kontrolle; Zr: Zirrhose; Gr: Gruppe; Geschl.: Geschlecht.

Fall	Patienten Gr	Alter	Geschl.	Todesursache	Ätiologie
1	Ko	56	♂	Koronare Herzerkrankung	-

2	Ko	60	♀	Koronare Herzerkrankung	-
3	Ko	63	♂	Koronare Herzerkrankung	-
4	Ko	63	♂	Koronare Herzerkrankung	-
5	Ko	49	♀	vermutlich arrhythmogene, rechtsventrikuläre Dysplasie	-
6	Ko	48	♂	Koronare Herzerkrankung	-
7	Ko	52	♂	unbekannt	-
1	Zr ohne HE	46	♂	Alkoholvergiftung	Alkohol
2	Zr ohne HE	52	♂	Alkoholvergiftung	Alkohol
3	Zr ohne HE	37	♂	Alkoholvergiftung	Alkohol
4	Zr ohne HE	57	♂	Koronare Herzerkrankung, Bronchopneumonie	Alkohol
1	Zr mit HE	73	♂	Blutendes Ulkus, Koronare Herzerkrankung	Alkohol
2	Zr mit HE	50	♂	Gastrointestinale Blutung	Alkohol
3	Zr mit HE	51	♂	Lungenentzündung	Alkohol
4	Zr mit HE	75	♀	Leberversagen, Nierenfunktionsstörung, Spontane bakterielle Peritonitis	Alkohol
5	Zr mit HE	49	♀	Akutes oder chronisches Leberversagen	Alkohol
6	Zr mit HE	60	♂	Medikamentenvergiftung	Alkohol
7	Zr mit HE	47	♀	Pneumonie	Alkohol
8	Zr mit HE	67	♀	Gastrointestinale Blutung, Niereninfektion	Alkohol

Tab. 7: Leber- und Gehirnpathologie und Begleiterkrankungen bei Kontrollpatienten und Patienten mit Leberzirrhose mit oder ohne HE. 7 Kontrollen, 4 Patienten mit Zirrhose ohne HE und 8 Patienten mit Zirrhose mit HE sowie die entsprechenden Pathologien und klinischen Informationen wurden vom NSW *Tissue Resource Centre* (University of Sydney, Australia) bezogen. Diese Proben wurden makroskopisch und/oder mikroskopisch untersucht (Australisches Hirnspenderprogramm, *New South Wales* (NSW) *Tissue Resource Centre*). Ko: Kontrolle; Zr: Zirrhose.

Fall	Patienten Gr	Leber und Gehirn Pathologie/Begleiterkrankungen
1	Ko	Milde makrovesikuläre Steatose, unauffällige Hirnpathologie
2	Ko	Milde makrovesikuläre Steatose, unauffällige Hirnpathologie, Insulinabhängiger Diabetes mellitus
3	Ko	Milde Steatose, unauffällige Hirnpathologie, akute koronare Herzkrankheit
4	Ko	Mittelgradige makrovesikuläre Steatose, unauffällige Hirnpathologie, akute koronare Herzkrankheit
5	Ko	unauffällige Leberpathologie, unauffällige Hirnpathologie
6	Ko	unauffällige Leberpathologie, unauffällige Hirnpathologie
7	Ko	Milde Steatose, unauffällige Hirnpathologie, Colitis ulcerosa
1	Zr ohne HE	Zirrhose, Steatose, unauffällige Hirnpathologie, Thrombozytopenie, Milzvergrößerung, Varizen

2	Zr ohne HE	Zirrhose, Steatose, unauffällige Hirnpathologie
3	Zr ohne HE	Gemischte mikro- und makronoduläre Zirrhose, Fettleber, akute makrovesikuläre Steatose, mittelgradige zerebellare Degeneration
4	Zr ohne HE	Zirrhose, unauffällige Hirnpathologie, Cholestase, Gelbsucht, Bronchopneumonie
1	Zr mit HE	Zirrhose, makrovesikuläre Steatose, unauffällige Hirnpathologie, Ösophagusvarizen, Magengeschwüre
2	Zr mit HE	Zirrhose, Steatose, Cholestase, Kleinhirnartrophie, Hirnpathologie mit mikroskopischen Hinweisen auf Vorliegen einer HE
3	Zr mit HE	Zirrhose, akute Steatose, Varizen, Lungenentzündung, Anämie, Hirnpathologie mit mikroskopischen Hinweisen auf Vorliegen einer HE
4	Zr mit HE	Zirrhose, Diabetes mellitus, Hirnpathologie mit mikroskopischen Hinweisen auf Vorliegen einer HE
5	Zr mit HE	Zirrhose, markierte Steatose, Alzheimer Typ 2 Astrozyten, milde Kleinhirnartrophie, Gelbsucht, Geschwür der Ösophagus
6	Zr mit HE	Zirrhose, Steatose, Hirnpathologie mit mikroskopischen Hinweisen auf Vorliegen einer HE
7	Zr mit HE	Zirrhose, Fettleber, Steatohepatitis, Hepatomegalie, Kleinhirnartrophie, Hirnpathologie mit mikroskopischen Hinweisen auf Vorliegen einer HE
8	Zr mit HE	Zirrhose, Alzheimer Typ 2 Astrozyten, Pfortaderthrombose, Mallory-Körper

2.2.16 Array-basierte Transkriptomanalyse

Zur Erfassung weiterer Genexpressionsänderungen im Gehirn von Patienten mit Zirrhose mit oder ohne HE im Vergleich zu Kontrollpatienten wurde eine *Agilent Whole Human Genome Micro Array* Analyse durchgeführt. Diese Analyse wurde im Rahmen eines Service von der Firma Miltenyi-Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) durchgeführt. Gesamt-RNA wurde aus dem zerebralen Kortex humaner *post mortem* Hirnproben mittels *RNeasy®Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die RNA Konzentration und der Grad der Verunreinigung der isolierten RNA Proben wurde spektrophotometrisch unter Verwendung des Nanodrops bestimmt. Anschließend wurde eine RNA-Qualitätsanalyse mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzer (BMFZ, Universität Düsseldorf) durchgeführt, und die RNA *Integrity Number* (RIN) für jede Probe ermittelt.

Die aufgereinigte und qualitätsüberprüfte Probe wurde an Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) übergeben, die eine unabhängige Überprüfung der Qualität und RNA Konzentration in den Proben durchführten und nachfolgend eine Genexpressionsanalyse für jede einzelne Probe unter Verwendung des *One-Colour-Agilent-Microarrays* anfertigen.

Hierfür wurden die RNA Proben mit einem fluoreszierenden Cy3-Farbstoff markiert. Die so markierte cRNA wurde auf 8x60k Oligomicroarrays hybridisiert. Der Microarray ist mit RNA-komplementären Oligos aller bekannten humanen Gene in einer Matrix beschichtet. Die Cy3-Fluoreszenzintensität der gebundenen cRNAs auf den jeweiligen Bereichen des Microarrays, die mit Oligos markiert sind, wurde mit einem Agilent Scanner System erfasst. Für die bioinformatische Analyse der Expressionsdaten des Arrays wurde die Expressionsstärke einer Probe normiert auf den Median der Intensitätswerte aller Proben und farbcodiert dargestellt.

2.2.17 Statistische Auswertung

Alle Werte sind als Mittelwerte $\pm$ SEM (*standard error of the mean*, Standardfehler) angegeben. Der SEM stellt den Quotient aus Standartabweichung (SD) einer Stichprobe und der N-ten Wurzel dar. N ist dabei die Anzahl an unabhängigen Versuchen. Für die statistische Analyse wurden mindestens 3 unabhängige Versuche (unabhängige Zellpräparationen) verwendet. Die Berechnung der Signifikanz der Daten erfolgte mittels *t*-Test (zweiseitig, ungepaart).

Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, erfolgte die statistische Auswertung durch einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA: *analysis of variance*). Dabei wurde ein α-Fehler von $p \leq 0{,}05$ als statistisch signifikant gewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen Excel (Microsoft, München, Deutschland) und *GraphPad Prism* 4.0 (GraphPad Software, Kalifornien, USA).

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von Ammoniak auf die Vitalität kultivierter Rattenastrozyten

3.1.1 Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand

Zur Untersuchung des Einflusses einer Behandlung kultivierter Rattenastrozyten mit NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) auf die Zellvitalität, wurde die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH), die beim Zelluntergang freigesetzt wird, im Zellkulturüberstand gemessen.

Wie in Abbildung 14 gezeigt, kommt es gegenüber unbehandelten Kontrollen zu keiner signifikant gesteigerten LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) behandelter kultivierter Rattenastrozyten. Im Gegensatz dazu bewirkt die Behandlung der Astrozyten mit H_2O_2 in einer zytotoxischen Konzentration (5mmol/l) für 1 Stunde (Positivkontrolle) einen signifikanten Anstieg der LDH-Aktivität.

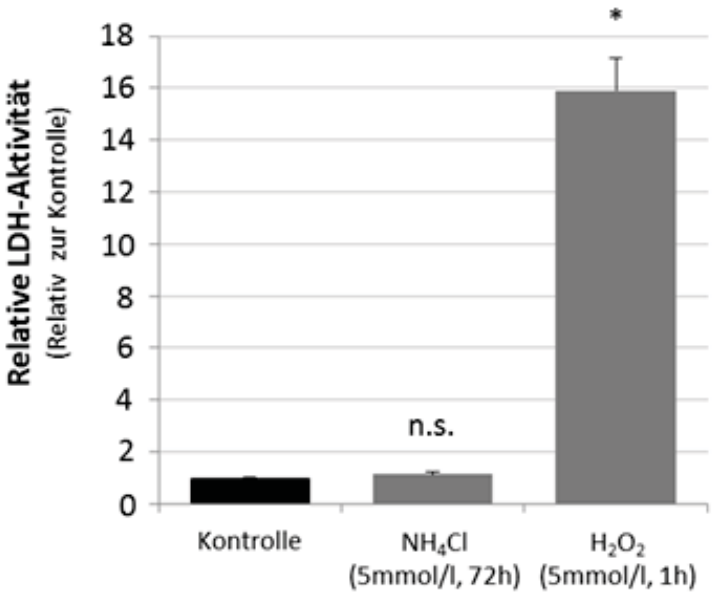


Abb. 14: Einfluss von NH_4Cl auf die Astrozytenvitalität. Astrozyten wurden entweder mit NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) oder H_2O_2 (5mmol/l, 1 Stunde) behandelt oder blieben unbehandelt für 72 bzw. 1 Stunden (Kontrolle). Die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) wurde im Zellkulturüberstand gemessen und ist relativ zur entsprechenden unbehandelten Kontrolle ausgedrückt. *: statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zur unbehandelten Kontrollen. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber unbehandelten Kontrollen (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

3.1.2 Nachweis von Apoptose in kultivierten Rattenastrozyten

Zur Überprüfung der apoptotischen Wirkung von Ammoniak auf kultivierte Astrozyten wurde die sog. TUNEL-Färbung (*Terminal Transferase Uridine-Nick-End-Labeling*) durchgeführt, wodurch apoptotische Zellen mittels Immunfluoreszenz Analyse nachgewiesen werden können.

Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, induziert NH_4Cl (5mmol/l, 24, 48 und 72 Stunden) in kultivierten Astrozyten keine verstärkte TUNEL-Immunoreaktivität gegenüber unbehandelten Kontrollen. Die Behandlung kultivierter Astrozyten für 1 Stunde mit DNAse (1500U/ml, Positivkontrolle) bewirkt hingegen eine sehr starke TUNEL-Immunoreaktivität in jedem mit Hoechts34580 gefärbten Zellkern.

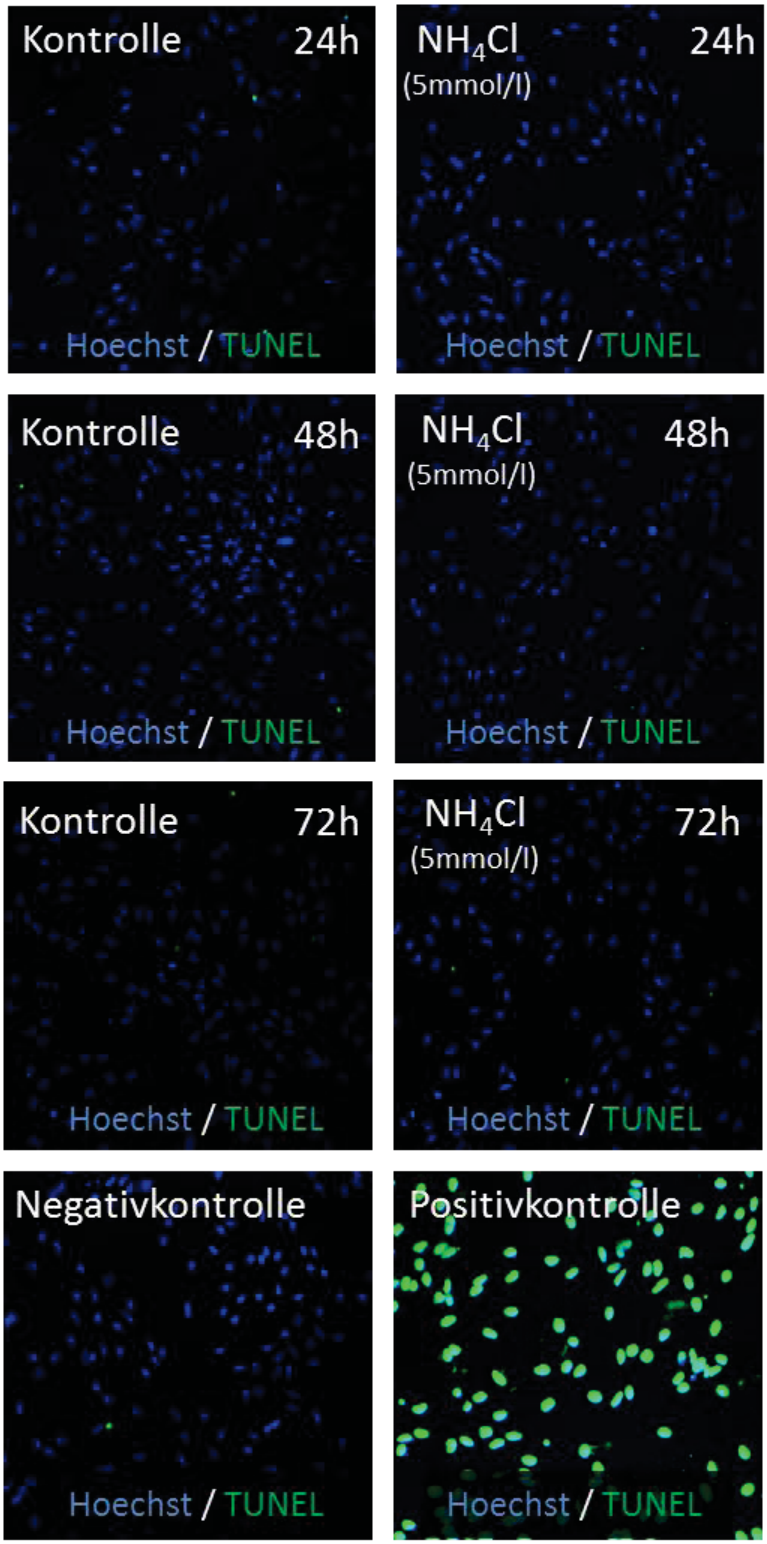


Abb. 15: Wirkung von NH_4Cl auf Apoptose kultivierter Rattenastrozyten. Astrozyten wurden für 24, 48 oder 72 Stunden mit NH_4Cl (5mmol/l) behandelt oder blieben für die entsprechenden Zeiträume unbehandelt (Kontrolle). Apoptotische Zellen wurden durch TUNEL markiert und fluoreszenzmikroskopisch erfasst. „Negativkontrolle“: TUNEL Reaktion in Abwesenheit von terminaler Deoxynukleotid transferase (TdT). „Positivkontrolle“: Herbeiführen von DNA Strangbrüchen durch DNAse Behandlung (DNAse I, 1500U/ml, 1 Stunde). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus insgesamt 3 unabhängigen Experimenten. (Vergrößerung: 250-fach) (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

3.2 Einfluss von Ammoniak auf die Proliferation kultivierter Rattenastrozyten

3.2.1 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit und Reversibilitätstest

Die Erfassung der Zellproliferation erfolgte durch fluorimetrische Quantifizierung des DNA-Gehalts in mit Hoechst34580 gefärbten kultivierten Astrozyten zum jeweils angegebenen Zeitpunkt.

Wie in Abbildung 16 gezeigt, steigt der DNA-Gehalt in den Astrozytenkulturen zeitabhängig verglichen mit dem DNA-Gehalt nach Aussaat der Zelle (=Start des Experiments t=0 Stunde). Verglichen mit unbehandelten Kontrollen ist die DNA-Synthese in mit NH_4Cl (5mmol/l) behandelten Astrozyten 48 und 72 Stunden nach Behandlung der Zellen um 45% vermindert.

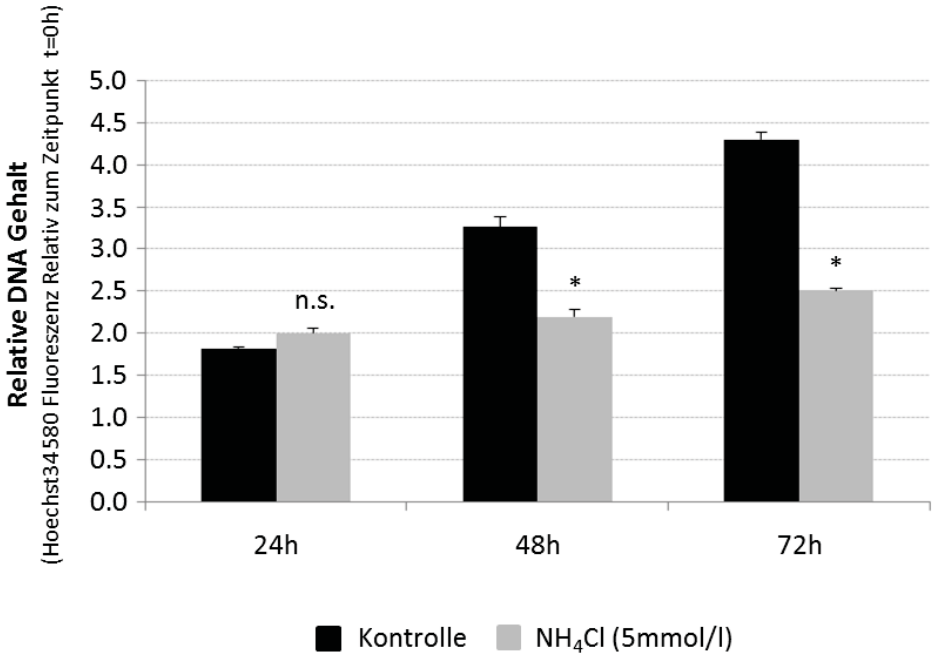
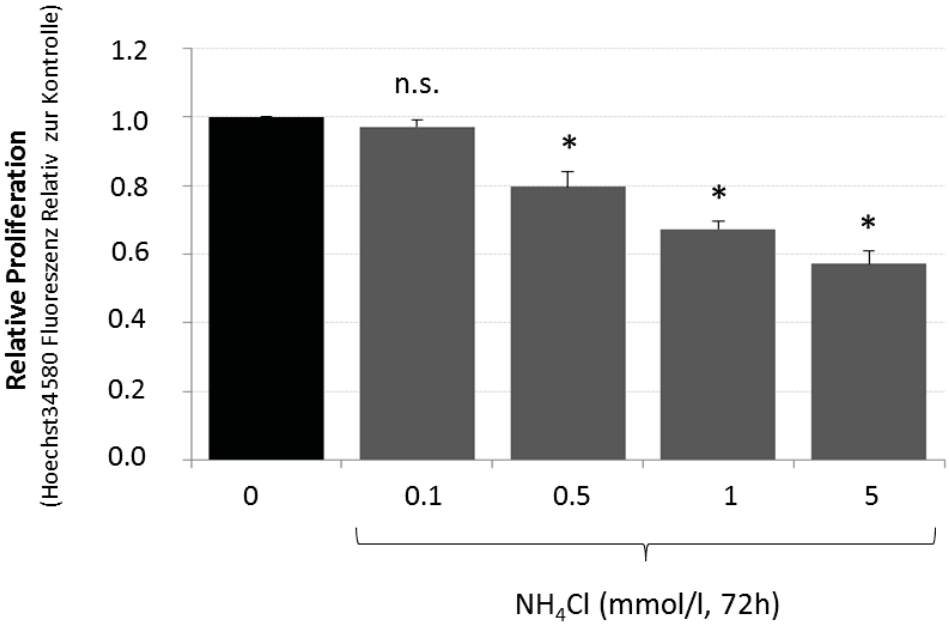


Abb. 16: Messung des DNA Gehalts in unbehandelten oder mit NH_4Cl-behandelten kultivierten Rattenastrozyten. Kultivierte Rattenastrozyten wurden für 24, 48 oder 72 Stunden entweder mit NH_4Cl (5mmol/l) behandelt oder blieben unbehandelt. DNA wurde durch Hoechst34580 angefärbt, fluorimetrisch quantifiziert und relativ ausgedrückt zur Hoechst34580 Intensität, die 6 Stunden (t=0 Stunde) nach Ausplattieren der Zellen gemessen wurde. *: statistisch signifikant gegenüber unbehandelten Kontrollen der jeweiligen Zeitpunkte. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber unbehandelten Kontrollen (Entnommen aus Görg *et al.*, 2014).

Wie in Abbildung 17 gezeigt, bewirkt eine NH_4Cl Konzentration von 0,5mmol/l in Rattenastrozyten innerhalb von 72 Stunden eine signifikante Hemmung der Astrozyten-proliferation um ca. 20% gegenüber unbehandelten Kontrollen.



<u>Abb. 17:</u> Wirkung von Ammoniak auf die Proliferation kultivierter Rattenastrozyten. Astrozyten wurden mit unterschiedlichen NH_4Cl-Konzentrationen kultiviert und der DNA-Gehalt der Kulturen wurde mittels Hoechst34580 fluorimetrisch quantifiziert. Die Hoechst34580 Fluoreszenz in mit NH_4Cl (5mmol/l)-behandelten Astrozyten ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ausgedrückt. *: statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber unbehandelten Kontrollen. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber unbehandelten Kontrollen (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

Wie in Tabelle 8 erkennbar ist, normalisiert sich die Proliferationsrate Ammoniak-behandelter Astrozyten nach Entfernung des Ammoniaks zeitabhängig, beginnend bei 72 Stunden.

Tab. 8: Reversibilität der durch NH_4Cl-vermittelten Wachstumshemmung kultivierter Rattenastrozyten. Astrozyten wurden für 72 Stunden entweder mit NH_4Cl (5mmol/l) behandelt oder blieben unbehandelt, bevor das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen für weitere 72 bzw. 144 Stunden in DMEM mit oder ohne NH_4Cl (5mmol/l) weiterkultiviert wurden. Die Hoechst34580 Fluoreszenz in mit NH_4Cl (5mmol/l)-behandelten Astrozyten ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ausgedrückt. *: statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber unbehandelten Kontrollen. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber unbehandelten Kontrollen (Entnommen aus Görg *et al.*, 2014).

	Kontrolle -	**NH_4Cl** (5mmol/l, 72h) -	**NH_4Cl** (5mmol/l, 72h) 72h nach Wegnahme	**NH_4Cl** (5mmol/l, 72h) 144h nach Wegnahme
Proliferation	1,00±0,0	0,57±0,04 *	0,75±0,02 $^{n.s.}$	0,99±0,03 $^{n.s.}$

3.2.2 Pharmakologische Charakterisierung der NH_4Cl-vermittelten Proliferationshemmung kultivierter Rattenastrozyten

Eine mögliche Bedeutung der intrazellulären Glutaminbildung für die durch NH_4Cl-vermittelte Proliferationshemmung wurde mit Hilfe des Glutaminsynthetasehemmstoffs Methioninsulfoximin (MSO) überprüft. Während der Glutaminsynthetasehemmstoff MSO (3mmol/l, 30Min Vorinkubation, 72 Stunden) alleine keine Auswirkung auf die Astrozytenproliferation zeigte, verhinderte er die Astrozytenproliferationshemmung in mit NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) behandelten Zellen nahezu vollständig (Abbildung 18). Die Rolle einer Aktivierung von $p38^{MAPK}$ und NADPH Oxidase in der durch NH_4Cl (5mmol/l) vermittelten Astrozytenproliferationshemmung wurde mit Hilfe des $p38^{MAPK}$ Inhibitors SB203580 (10µmol/l, 30Min Vorinkubation) und dem NADPH Oxidase Inhibitor Apocynin (300µmol/l, 30Min Vorinkubation) überprüft. Wie in Abbildung 18 gezeigt, hemmen sowohl Apocynin, als auch SB203580 die durch NH_4Cl (5mmol/l) vermittelte Proliferationshemmung kultivierter Astrozyten in unterschiedlichem Ausmaß. Während SB203580 die durch NH_4Cl (5mmol/l) vermittelte Proliferationshemmung vollständig aufhob, verminderte Apocynin die Proliferationshemmung um 20 % gegenüber Apocynin behandelten Kontrollen.

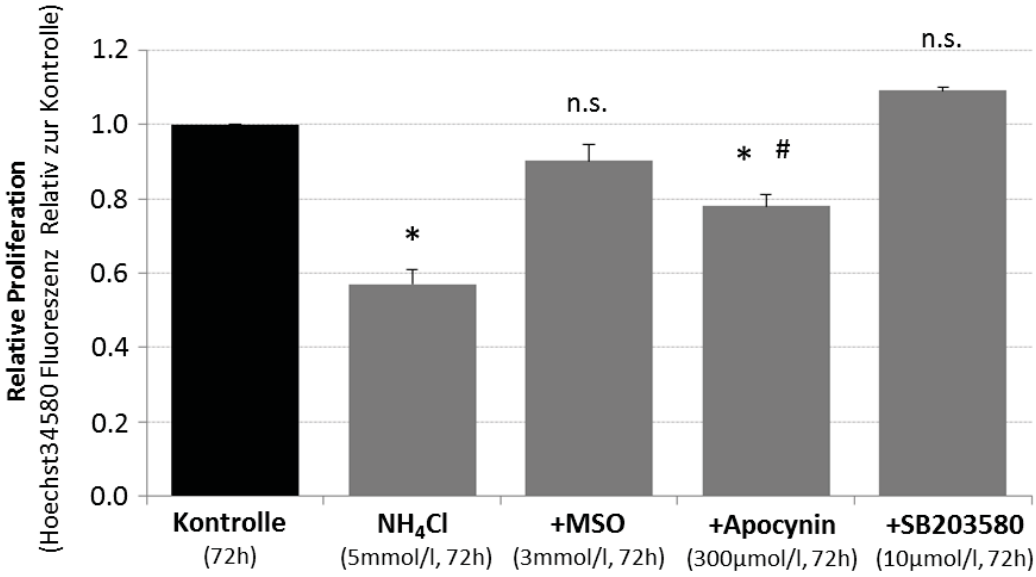


Abb. 18: Pharmakologische Charakterisierung der durch Ammoniak vermittelten Proliferationshemmung kultivierter Rattenastrozyten. Astroyzten wurden in An- oder Abwesenheit von MSO (3mmol/l, 30Min Vorinkubation), Apocynin (300µmol/l, 30Min Vorinkubation) oder SB203580 (10µmol/l, 30Min Vorinkubation) mit NH_4Cl (5mmol/l) für 72 Stunden behandelt oder blieben unbehandelt. Die Astrozytenproliferation wurde mittels Hoechst34580 Fluoreszenz fluorimetrisch quantifiziert und ist ausgedrückt in Relation zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelt oder MSO, Apocynin oder SB203580 in Abwesenheit von NH_4Cl). *: statistisch signifikant unterschiedlich zur jeweiligen nicht mit NH_4Cl-behandelten Kontrolle. #: statistisch signifikant unterschiedlich zu NH_4Cl-behandelten Astrozyten. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber der jeweiligen Kontrolle (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

Zur Überprüfung der Auswirkung einer intrazellulären pH-Wert Verschiebung auf die Proliferation wurden Astrozyten mit Methylammoniumchlorid (CH_3NH_3Cl) (5mmol/l) behandelt.

Wie in Abbildung 19 erkennbar ist, steigerte die Behandlung kultivierter Astrozyten mit CH_3NH_3Cl (5mmol/l) die Astrozytenproliferation um ca. 40% gegenüber unbehandelten Kontrollen. Als Positivkontrolle wurden Astrozyten mit Fetalem Kälberserum (FCS, 10%) behandelt, welches nicht nur nach 24 Stunden sondern auch nach 48 und 72 Stunden zu einem signifikanten Anstieg des DNA-Gehalts der Astrozyten führt.

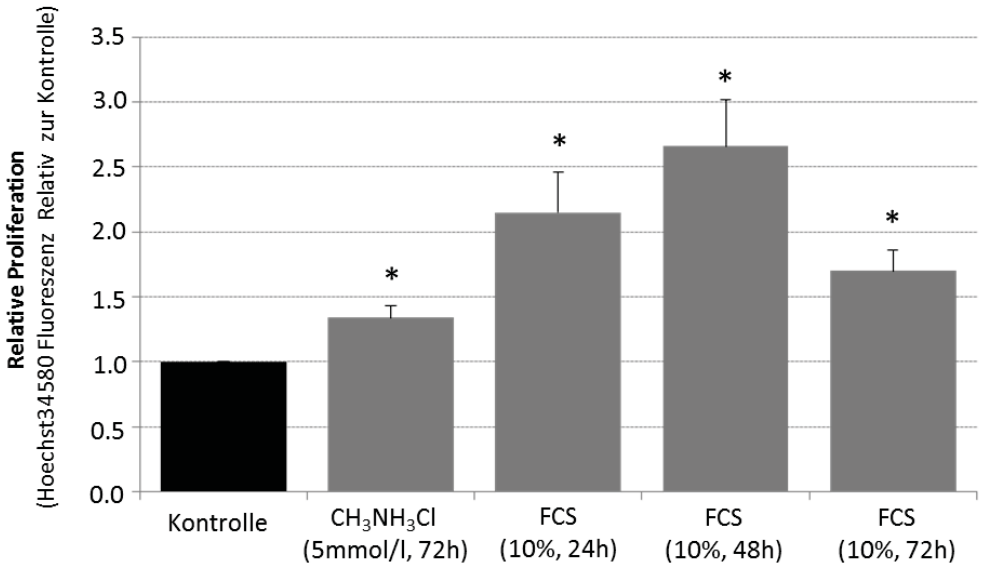


Abb. 19: Wirkung von CH_3NH_3Cl und FCS auf die Astrozytenproliferation. Astrozyten wurden mit CH_3NH_3Cl (5mmol/l) für 72 Stunden oder FCS (10%, Positivkontrolle) für 24, 48 oder 72 Stunden behandelt oder blieben unbehandelt für die entsprechenden Zeitpunkte. Die Astrozytenproliferation wurde mittels Hoechst34580 Fluoreszenz fluorimetrisch quantifiziert. Die Hoechst34580 Fluoreszenz in behandelten Astrozyten ist ausgedrückt in Relation zur jeweilige unbehandelten Kontrolle. *: statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber unbehandelten Kontrollen. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber unbehandelten Kontrollen (Entnommen aus Görg *et al.*, 2014).

Die Ergebnisse zeigen eine Glutaminsynthetase-, $p38^{MAPK}$- und NADPH Oxidase-vermittelte Hemmung der Astrozytenproliferation in NH_4Cl (5mmol/l) behandelten Astrozyten. Intrazelluläre pH-Verschiebungen, die durch NH_4Cl vermittelt werden, hatten keinen proliferationshemmenden Effekt.

3.3 Einfluss von Ammoniak auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in kultivierten Rattenastrozyten

3.3.1 Charakterisierung der durch NH_4Cl vermittelten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in kultivierten Rattenastrozyten

Der Einfluss von Ammoniak auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in vitalen Zellen wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes *MitoSOX™ Red* überprüft. Mit diesem Farbstoff kann die Bildung reaktiver Sauerstoffzpezies (ROS) in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle, wie z.B im Zellkern, den Mitochondrien und im Zytosol, mittels Immunofluoreszenz analysiert werden.

Die Immunofluoreszenzanalyse zeigte einen Anstieg der *MitoSOX™ Red* Fluoreszenz in NH_4Cl (5mmol/l, 24 Stunden)-behandelten Astrozyten gegenüber unbehandelten Kontrollen (Abbildung 20). Eine verstärkte ROS-Bildung wurde auch nach 72 Stunden NH_4Cl (5mmol/l)-Behandlung in Astrozyten beobachtet (1,75±0,28).

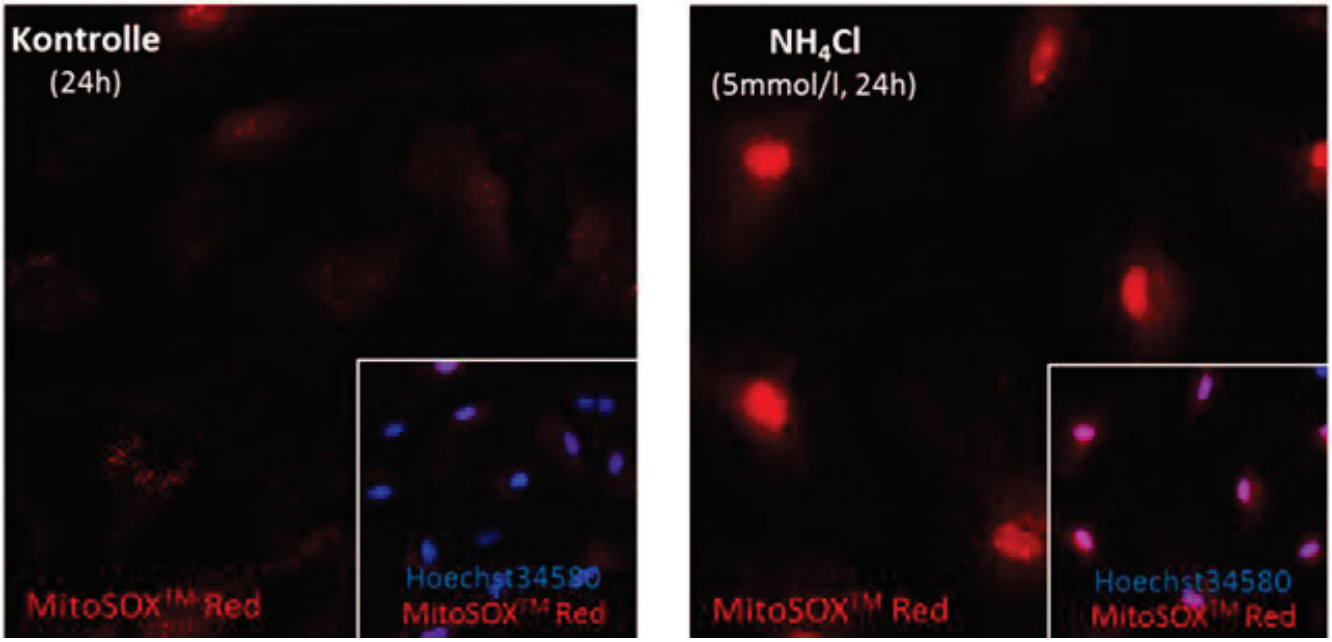


Abb. 20: Einfluss von Ammoniak auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in kultivierten Rattenastrozyten. Astrozyten wurden mit NH_4Cl (5mmol/l) für 24 Stunden behandelt, bevor die ROS-Bildung mittels Fluoreszenzmikroskopie und dem ROS-sensitiven Farbstoff wie in Material und Methoden beschrieben in vitalen Rattenastrozyten nachgewiesen wurde. (Vergrößerung: 250-fach) (Entnommen aus Görg *et al.*, 2014).

In NH_4Cl (5mmol/l) behandelten Astrozyten zeigte sich gegenüber den Kontrollen eine deutlich gesteigerte *MitoSOX™ Red* Fluoreszenz, die nachfolgend automatisiert mittels ImageJ quantifiziert wurde. Die Behandlung mit NH_4Cl (5mmol/l) steigerte die nukleäre *MitoSOX™ Red* Fluoreszenz gegenüber unbehandelten Kontrollen um das 1,8-fache. Der durch NH_4Cl (5mmol/l)-vermittelte Anstieg der nukleären *MitoSOX™ Red* Fluoreszenz konnte sowohl durch Methioninsulfoximin (MSO, 3mmol/l, 30Min Vorinkubation) als auch durch Apocynin (300µmol/l, 30Min Vorinkubation) aufgehoben werden. Die Behandlung der Astrozyten mit CH_3NH_3Cl führte zu keinem Anstieg der *MitoSOX™ Red* Fluoreszenz (Abbildung 21).

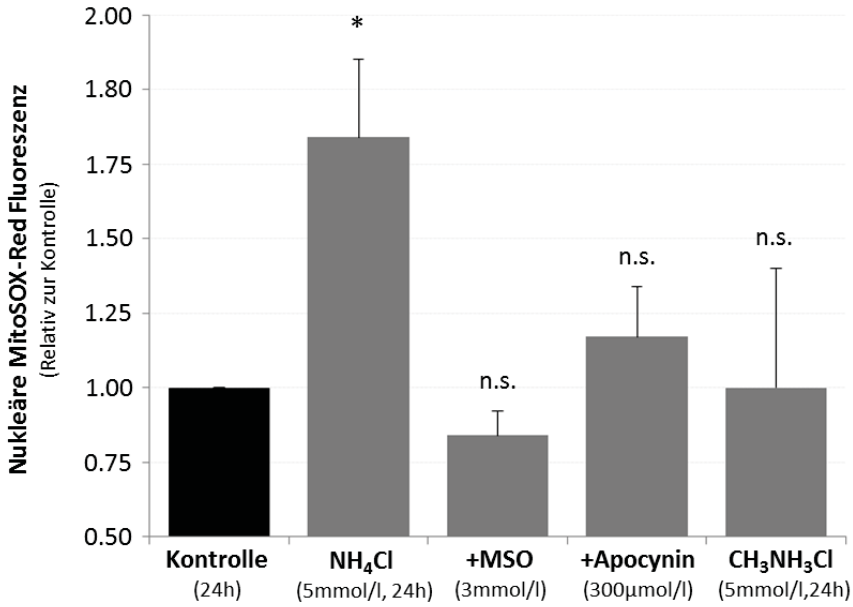


Abb. 21: Einfluss von Ammoniak auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in kultivierten Rattenastrozyten. Astrozyten wurden entweder mit NH_4Cl oder CH_3NH_3Cl (beides 5mmol/l) für 24 Stunden stimuliert oder blieben unbehandelt. Wo angegeben, wurden die Zellen mit MSO (3mmol/l) oder Apocynin (300µmol/l) für 30Min vorbehandelt, bevor die Astrozyten in Gegenwart der entsprechenden Substanz mit NH_4Cl (5mmol/l) für weitere 24 Stunden behandelt wurden. Reaktive Sauerstoffspezies wurden mittels *MitoSOX™ Red* fluoreszenzmikroskopisch in vitalen Astrozyten nachgewiesen und die nukleäre Fluoreszenz automatisiert mit Hilfe eines JAVA Script in ImageJ (Wayne Rusband, NIH, USA) quantifiziert. Die *MitoSOX™ Red* Fluoresezenz in NH_4Cl-behandelten Zellen ist in Relation zu den jeweils nicht mit NH_4Cl-behandelten Kontrollen angegeben. *: statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle (unbehandelt oder MSO- oder Apocynin-behandelt in Abwesenheit von NH_4Cl). n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber nicht mit NH_4Cl-behandelten Kontrollen (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

3.3.2 Subzelluläre Lokalisierung der ROS-Bildung in NH_4Cl-behandelten Astrozyten

Mittels hochauflösender *Superresolution Structured Ilumination* Mikroskopie (SR-SIM) wurde die Subzelluläre ROS Bildung in NH_4Cl (5mmol/l)-behandelten kultivierten Astrozyten lokalisiert. Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, führt die Behandlung der Astrozyten mit NH_4Cl (5mmol/l) für 24 Stunden zu einem Anstieg der *MitoSOX™ Red* Fluoreszenz sowohl im Zytosol, als auch im Zellkern. Gleichzeitig ist erkennbar, dass die angefärbten Mitochondrien in NH_4Cl (5mmol/l) behandelten Astrozyten größer sind als unter Kontrollbedingungen.

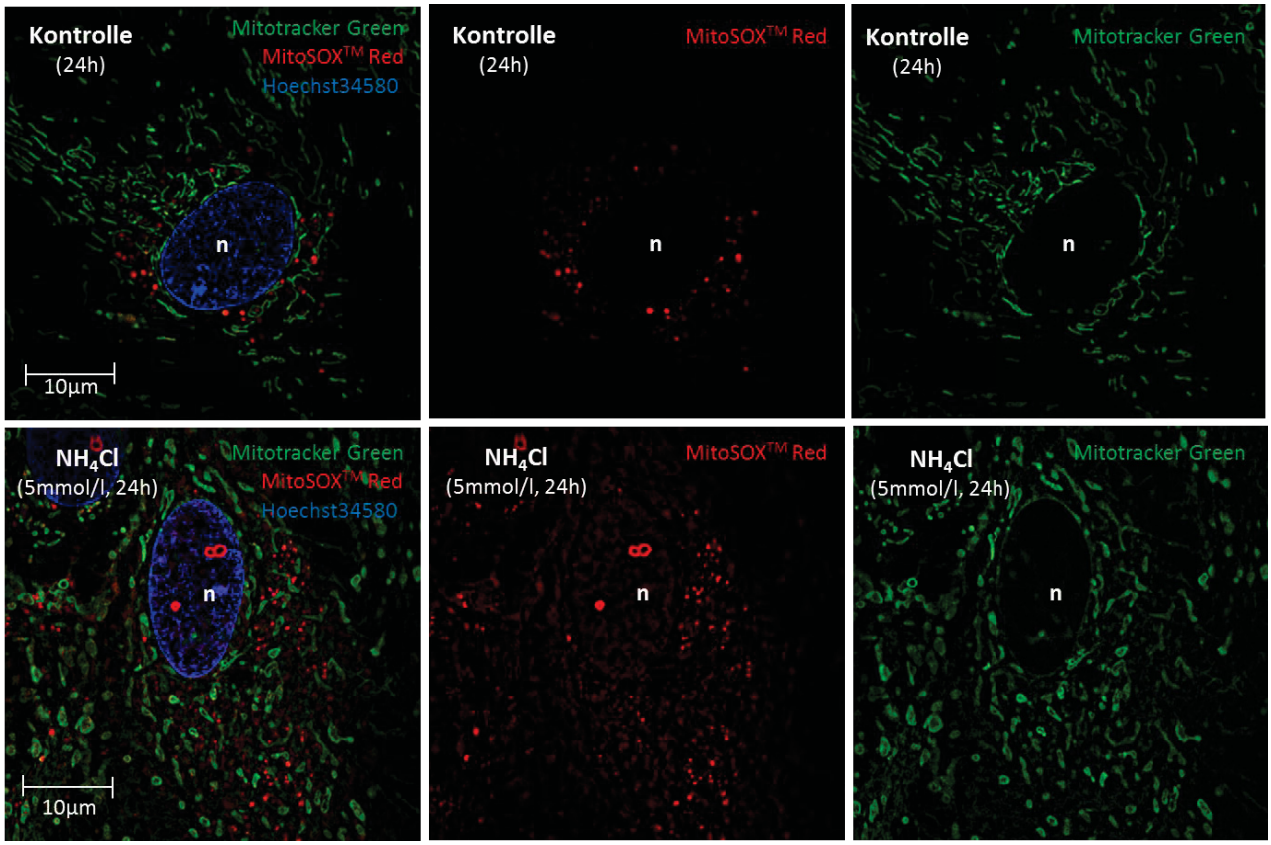


Abb. 22: Subzelluläre Lokalisation der ROS Bildung in NH_4Cl-behandelten kultivierten Rattenastrozyten. Nachweis der *MitoSOX™ Red* Fluoreszenz mittels Superresolution-Mikroskopie (SR-SIM) in unbehandelten (Kontrolle) oder mit NH_4Cl (5mmol/l, 24 Stunden)-behandelten vitalen Astrozyten. Mitochondrien wurden mit *Mitotracker® Green* und Zellkerne mittels Hoechst34580 gegengefärbt. (Vergrößerung: 1000-fach) (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

Abbildung 23 zeigt eine elektronische Vergrößerung einzelner Mitochondrien aus unbehandelten und mit NH_4Cl (5mmol/l)-behandelten Astrozyten. Die Aufnahme zeigt eine Volumenzunahme der Mitochondrien und eine gesteigerte mitochondriale *MitoSOX™ Red* Fluoreszenz in mit NH_4Cl behandelten Astrozyten.

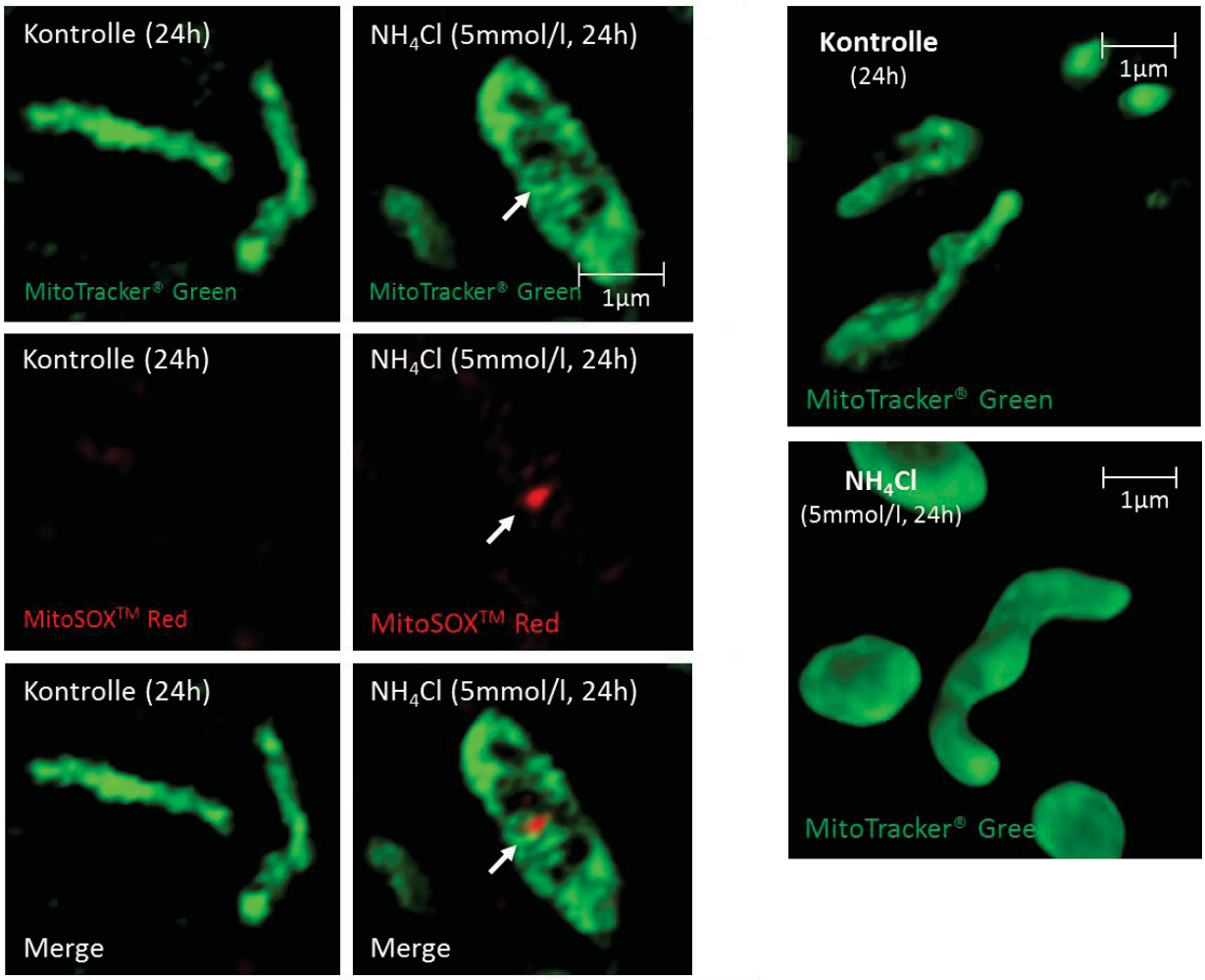


Abb. 23: Nachweis mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies Bildung in kultivierten Rattenastrozyten. Hochauflösende Darstellung der *Mitotracker® Green*- und *MitoSOX™ Red* Fluoreszenz in vitalen unbehandelten oder mit NH_4Cl (5mmol/l, 24 Stunden) behandelten Astrozyten. Rechts: Dreidimensionale Rekonstruktion von SR-SIM Stapelaufnahmen mittels Volocity-3D Software (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

3.4 Einfluss von Ammoniak auf die Expression von Seneszenzbiomarkern in kultivierten Rattenastrozyten

3.4.1 β-Galaktosidaseaktivität

Eine verminderte Proliferation ist ein Zeichen für zelluläre Seneszenz, welche assoziiert ist mit einer Hochregulation der β-Galaktosidase (β-Gal) (Chen, 2000; Kuilman *et al*., 2010). Die β-Gal Aktivität wurde in vitalen Zellen mit Hilfe des β-gal-Substrats *5 Dodecanoyl-aminofluorescein-di-β-D-galactopyranoside* (C_{12}FDG) quantifiziert, welches nach Spaltung grün fluoresziert nach Anregung bei einer Wellenlänge von 488nm.

Wie in der Immunofluoreszenzanalyse in Abbildung 24 erkennbar ist, führt die Behandlung kultivierter Astrozyten mit NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) zu einem Anstieg der C_{12}-aminofluorescein Fluoreszenz gegenüber unbehandelten Kontrollen. Dieser C_{12}FDG Fluoreszenzanstieg unterblieb vollständig in Astrozyten, die mit dem Glutaminsynthetase-hemmstoff MSO (3mmol/l, 30Min Vorinkubation) behandelt wurden und war nicht induzierbar durch CH_3NH_3Cl (5mmol/l).

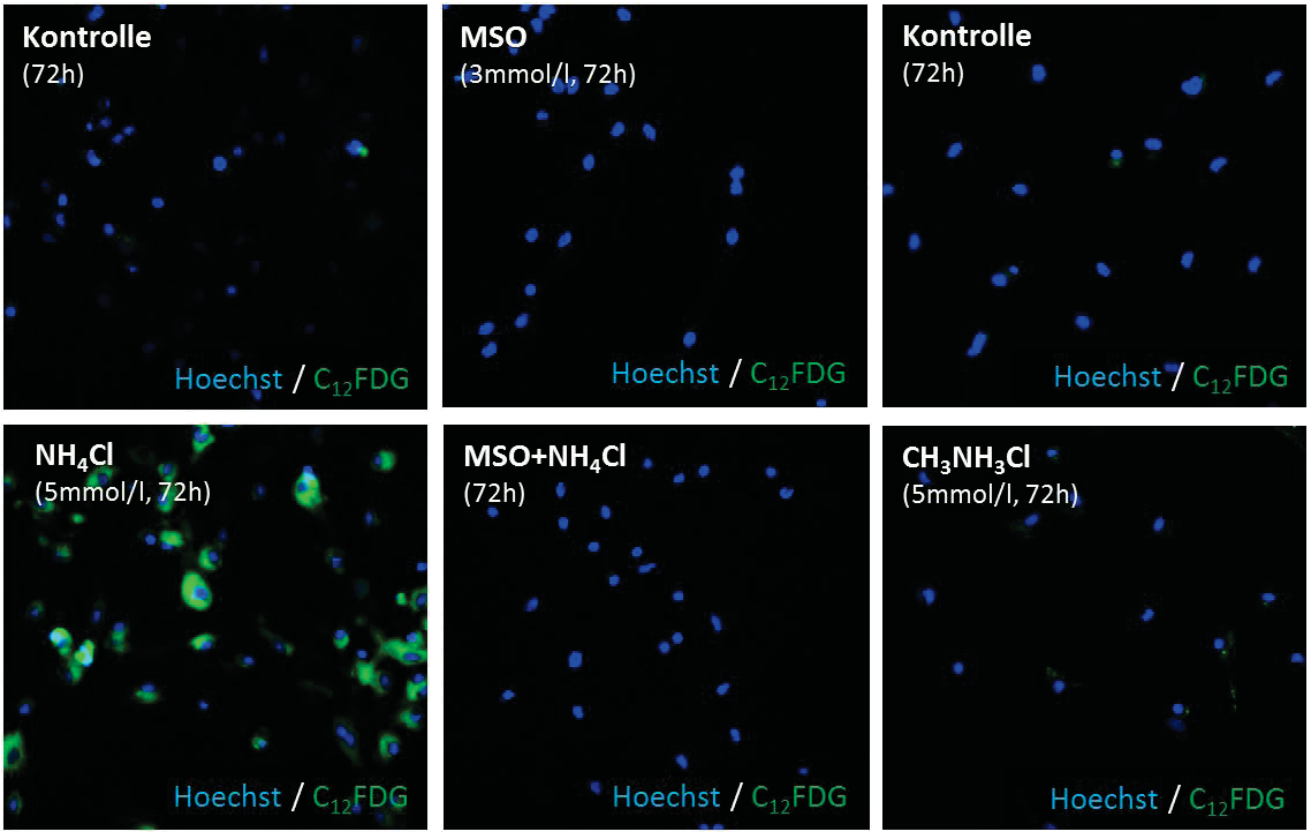


Abb. 24: Einfluss von Ammoniak auf die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase in kultivierten Rattenastrozyten. Astrozyten wurden mit NH_4Cl (5mmol/l) stimuliert oder blieben unbehandelt für 72 Stunden in An- oder Abwesenheit von MSO (3mmol/l, 30Min Vorinkubation). In einem weiteren Ansatz wurden Astrozyten für 72 Stunden mit CH_3NH_3Cl (5mmol/l) behandelt oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase wurde mit Hilfe des fluorogenen β-Gal-Substrats C_{12}FDG fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Zellkerne wurden mit Hoechst34580 angefärbt. (Vergrößerung: 250-fach) (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

Auch unter Verwendung des β-Gal Substrats *5-Brom-4-chlor-3-indolyl-ß-D-galactopyranosid* (X-Gal) wurde ein Anstieg des Umsetzungsprodukts *5,5`-dibromo-4,4`-dichloro-indigo* in NH_4Cl (5mmol/l)-behandelten kultivierten Astrozyten nach 72 Stunden Stimulation gegenüber unbehandelten Kontrollen gefunden (Abbildung 25).

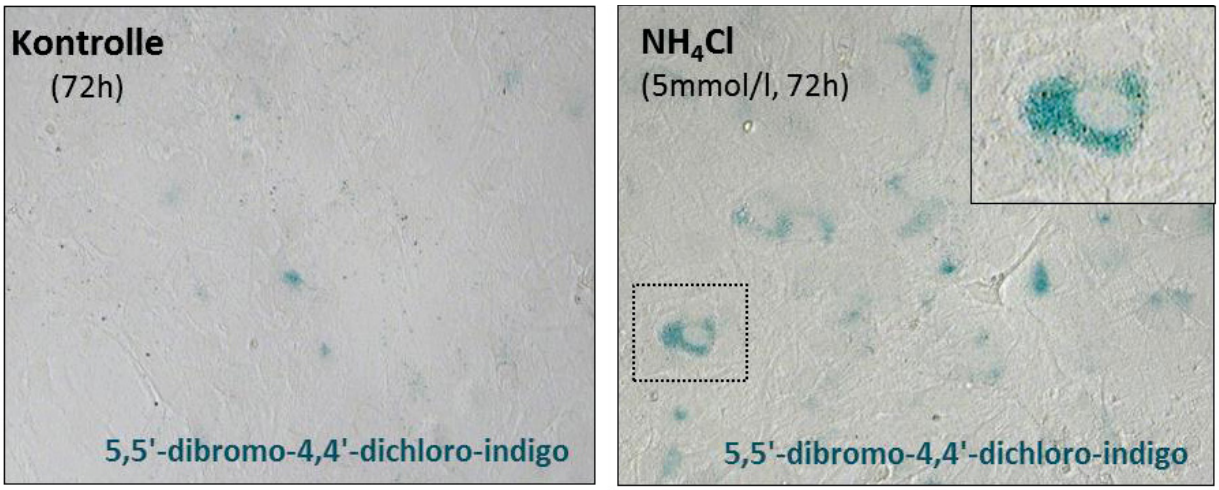


Abb. 25: Einfluss von Ammoniak auf die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase in kultivierten Rattenastrozyten. Astrozyten wurden mit NH_4Cl (5mmol/l) stimuliert oder blieben unbehandelt für 72 Stunden in An- oder Abwesenheit von MSO (3mmol/l, 30Min Vorinkubation). Die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase wurde durch Detektion von *5,5`dibromo-4,4`-dichloro-indigo* (X-Gal) lichtmikroskopisch nachgewiesen. Einsatz oben rechts: Vergrößerte Darstellung der mit einem Rahmen im rechten Bild markierten Region. (Vergrößerung: 250-fach) (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

Diese Ergebnisse deuten auf eine Ammoniak-induzierte Wachstumshemmung in kultivierten Astrozyten durch zelluläre Seneszenz hin.

3.4.2 Wirkung von Ammoniak auf die Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins p53

Die Zellproliferation steht unter Kontrolle des Tumorsuppressorproteins p53, welches den Zellzyklus steuert (Chen, 2000; Kuilman *et al*., 2010). Die Aktivierung von p53 erfolgt durch Phosphorylierung des Serinrests 392 durch die MAP Kinase p38 ($p38^{MAPK}$). In der Folge akkumuliert p53 im Zellkern, wo es die Transkription zellzyklusregulatorischer Gene induziert (Cox *et al*., 2010).

Wie in Abbildung 26 gezeigt, steigert NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) die nukleäre Anti-p[Ser392]-p53 Immunoreaktivität gegenüber unbehandelten Kontrollen um den Faktor 1,8-fach.

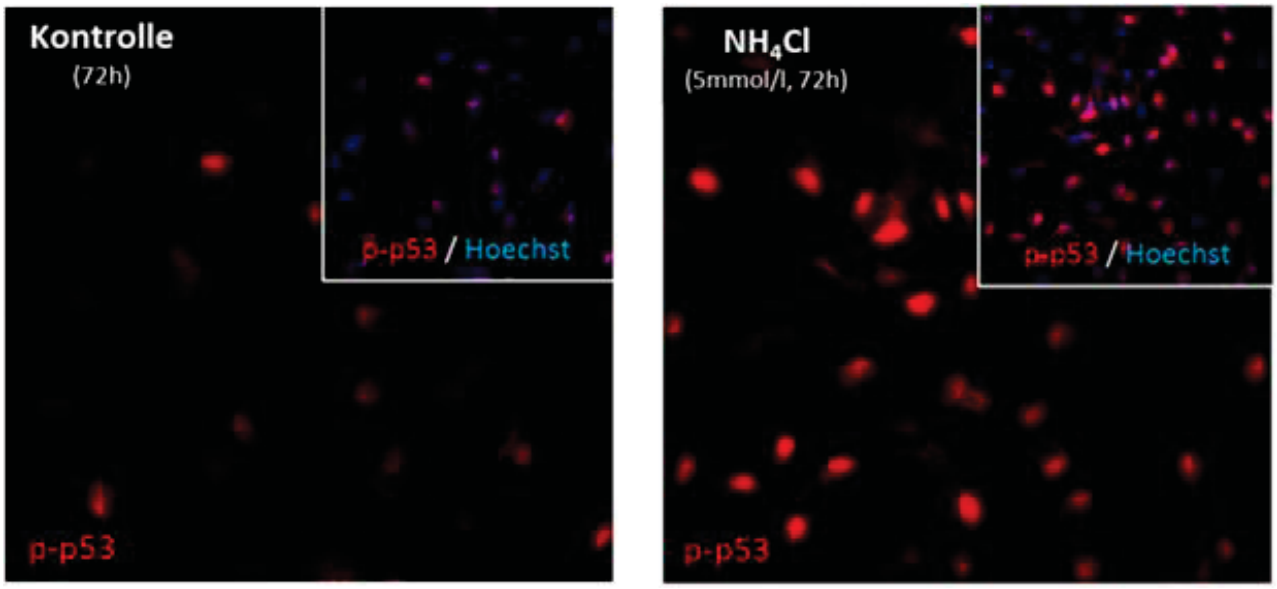


Abb. 26: Einfluss von NH_4Cl auf die Phosphorylierung und intrazelluläre Lokalisation von p53 in kultivierten Rattenastrozyten. Astrozyten blieben unbehandelt oder wurden mit NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) behandelt, bevor sie mit Paraformaldehyd fixiert und Serinphosphoryliertes p53 Protein (p-p53) mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen wurde. Zellkerne wurden mittels Hoechst34580 angefärbt. (Vergrößerung: 250-fach) (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

Der Anstieg der nukleären Anti-p[Ser392]-p53 Fluoreszenz in mit NH_4Cl (5mmol/l) behandelten Astrozyten konnte vollständig durch den Glutaminsynthetasehemmstoff MSO (3mmol/l, 30Min Vorinkubation), den $p38^{MAPK}$ Inhibitor SB203580 (10µmol/l, 30Min Vorinkubation) und den NADPH Oxidase Inhibitor Apocynin (3mmol/l, 30Min Vorinkubation) verhindert werden (Abbildung 27).

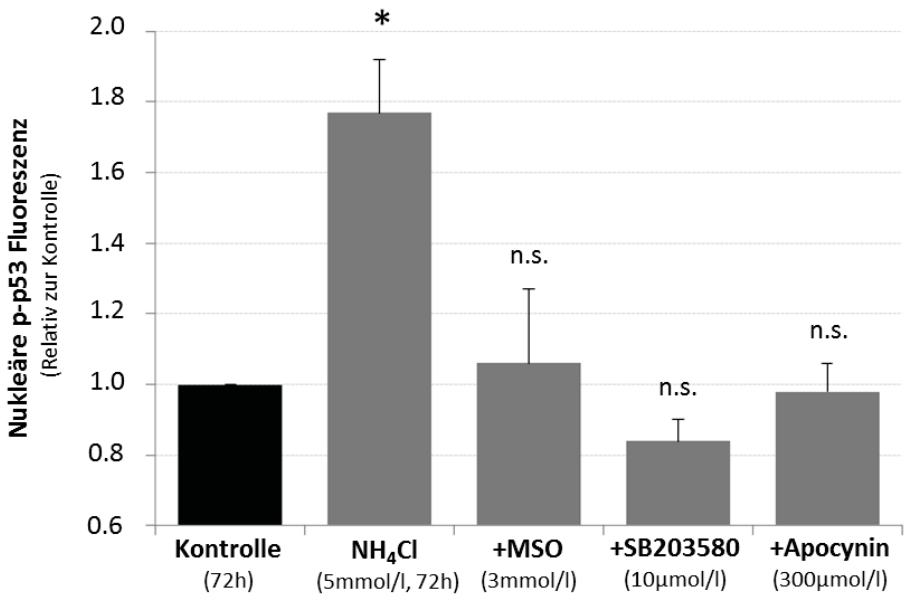


Abb. 27: Pharmakologische Charakterisierung der durch NH_4Cl-vermittelten p53-Serinphosphorylierung. Astrozyten wurden in An- oder Abwesenheit von MSO (3mmol/l, 30Min Vorinkubation), SB203580 (10µmol/l, 30Min Vorinkubation) oder Apocynin (300µmol/l, 30Min Vorinkubation) mit NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) behandelt oder blieben unbehandelt. Am Ende der Inkubation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und Serinphosphoryliertes p53 mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen und die nukleäre p-p53 Immunoreaktivität automatisiert mit einem JAVA-basiertem Script für ImageJ quantifiziert. Die p-p53 Immunoreaktivität in mit NH_4Cl-behandelten Zellen ist relativ zu den jeweils nicht mit NH_4Cl-behandelten Kontrollen angegeben. Zellkerne wurden mittels Hoechst34580 angefärbt. *: statistisch signifikant unterschiedlich zu unbehandelten Kontrollen. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber unbehandelten Kontrollen (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

Diese Ergebnisse zeigen, dass NH_4Cl Glutaminsynthetase-abhängig und $p38^{MAPK}$-vermittelt eine verstärkte Serinphosphorylierung und nukleäre Akkummulation von p53 bewirkt.

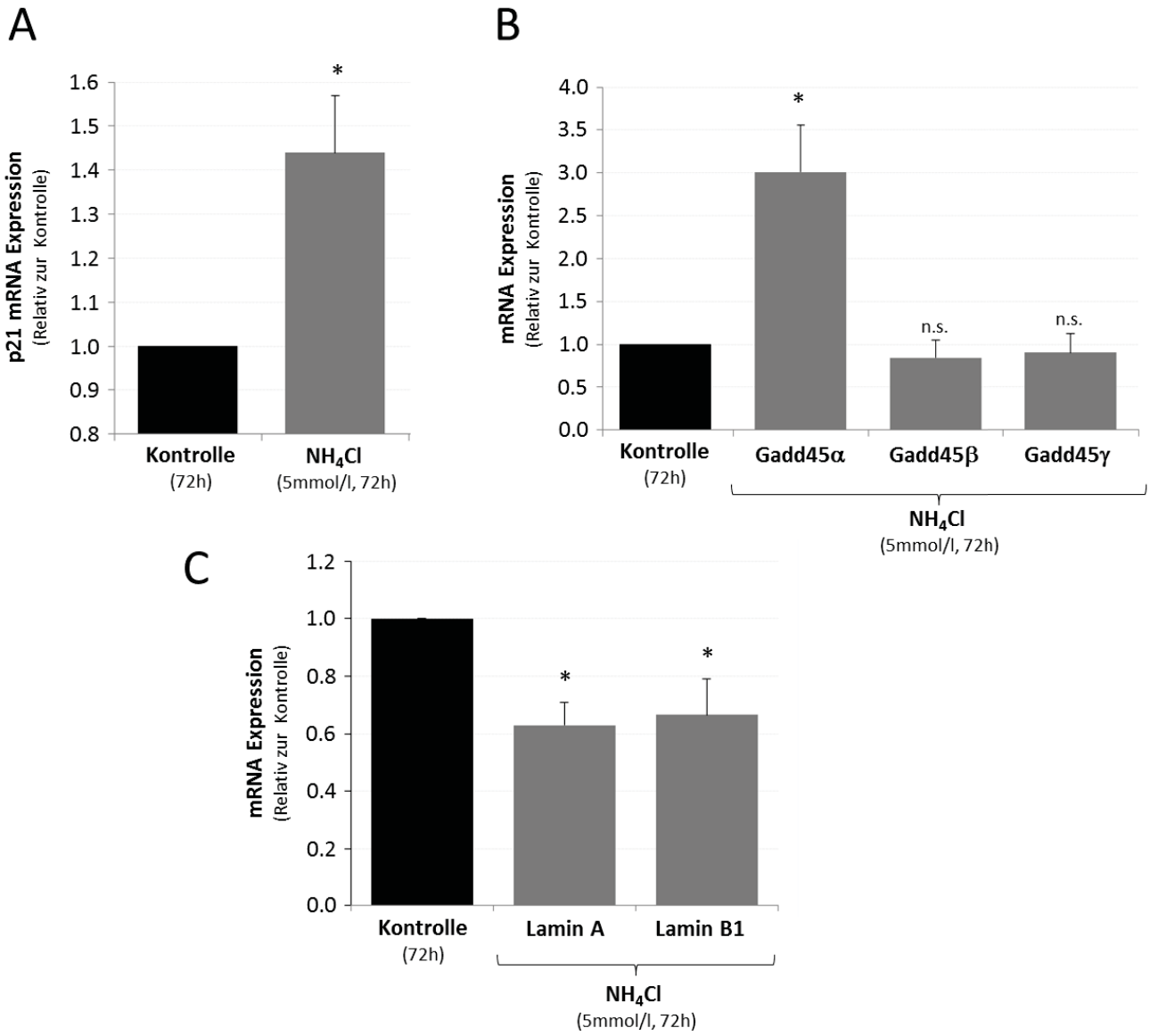
3.4.3 Einfluss von Ammoniak auf die Expression senesezenzassoziierter, zellzyklusinhibitorischer Gene und Proteine

3.4.3.1 Expression senesezenzassoziierter, zellzyklusinhibitorischer Gene

Die Aktivierung von p53 vermittelt einen Wachstumsstillstand durch Transkriptions-steigerung zellzyklusinhibitorischer Gene wie z.B p21 und GADD45α (Zhao *et al*., 2000). Die Lamin A und B Expressionen stellen etablierte Biomarker für zelluläre Seneszenz dar (Chen,

2000). Daher wurde die Wirkung von NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) auf die mRNA Expression von p21, GADD45α, β, γ sowie Lamin A und B1 mittels Realtime-PCR analysiert.

Wie in Abbildung 28 gezeigt, steigert die Behandlung kultivierter Astrozyten mit NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) die mRNA Expression von p21 (Abb. 28A) und GADD45α aber nicht von GADD45β oder GADD45γ (Abbildung 28B) und verringert die mRNA Expressionslevel von Lamin A und B1 (Abbildung 28C).



<u>Abb. 28:</u> Einfluss von Ammoniak auf die mRNA Expressionslevel Seneszenz-assoziierter Gene in kultivierten Rattenastrozyten. Quantifizierung der mRNA Expressionslevel von (A) p21, (B) GADD45α, β, γ und (C) Lamin A und B1 in mRNA-Präparationen kultivierter Astrozyten mittels Realtime-PCR. Astrozyten wurden entweder mit NH_4Cl (5mmol/l) stimuliert oder blieben unbehandelt (Kontrolle) für 72 Stunden. Die mRNA Expression der zu untersuchenden Gene wurde in jeder Probe auf das entsprechende Expressionsniveau des *Houskeeping Gens* HPRT1 normiert und ist in Relation zur unbehandelten Kontrolle

ausgedrückt. *: statistisch signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber unbehandelten Kontrollen (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

3.4.3.2 Pharmakologische Charakterisierung

Die NH_4Cl-vermittelte Expressionsänderung Seneszenz-assoziierter Gene wurde unter Verwendung des Glutaminsynthetasehemmstoffs MSO (3mmol/l, 30Min Vorinkubation), des NADPH-Oxidase Hemmstoffs Apocynin (300µmol/l, 30Min Vorinkubation) und des $p38^{MAPK}$ Hemmstoffs SB203580 (10µmol/l, 30Min Vorinkubation) charakterisiert.

Abbildung 29 zeigt, dass sowohl der Anstieg von GADD45α und p21 mRNA, sowie die Verringerung der Lamin A und B1 mRNA Expression (Tabelle 9) in NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) behandelten Astrozyten sensitiv ist gegenüber MSO (3mmol/l, 30Min Vorinkubation), Apocynin (300µmol/l, 30Min Vorinkubation) und SB203580 (10µmol/l, 30Min Vorinkubation). Die Behandlung kultivierter Astrozyten mit CH_3NH_3Cl (5mmol/l, 72 Stunden) änderte die Expression von GADD45α (Abbildung 29A), p21 (Abbildung 29B), Lamin A oder B1 (Tabelle 9) mRNA Expression hingegen nicht.

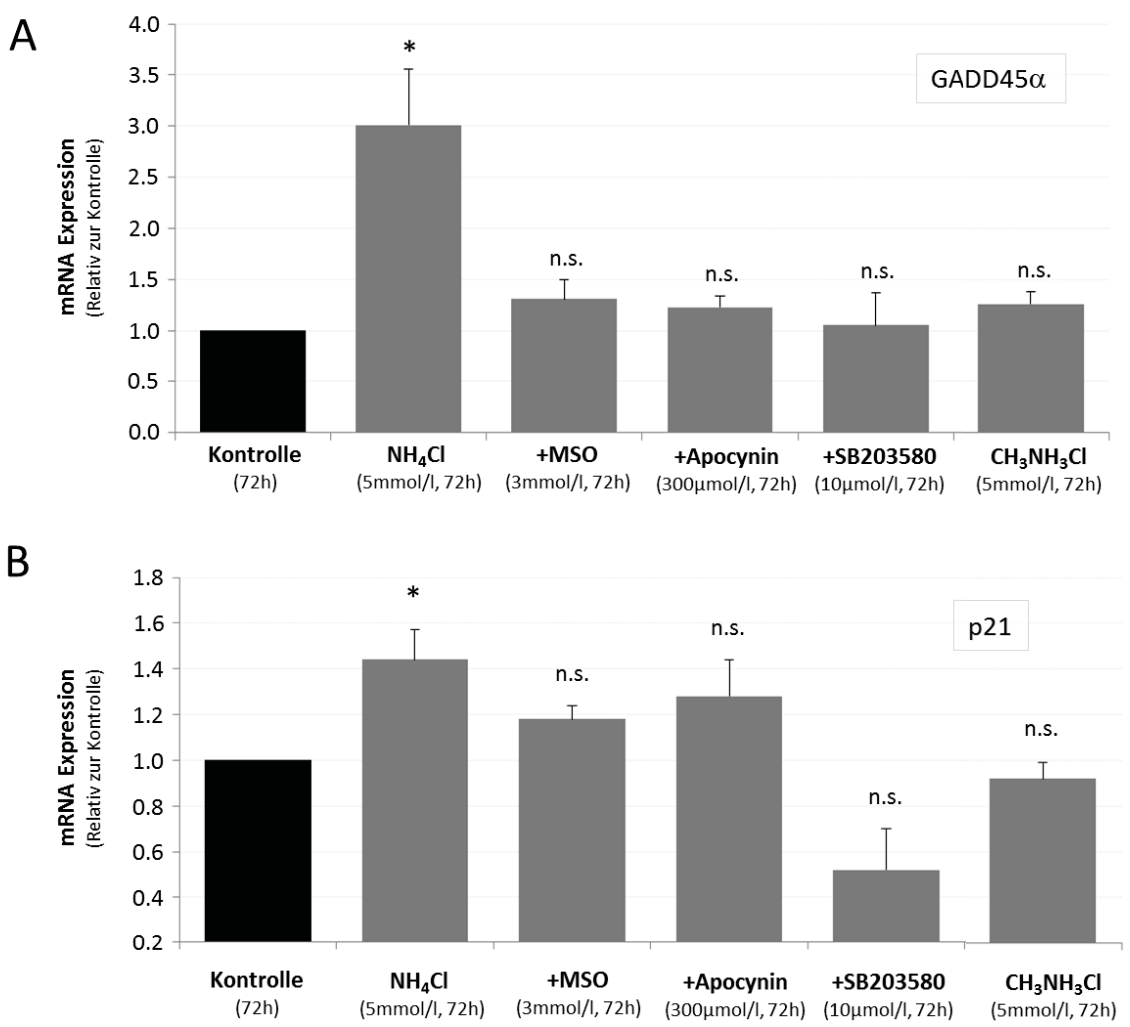


Abb. 29: Pharmakologische Charakterisierung NH_4Cl-induzierter Expressionsänderungen Seneszenz-assoziierter Gene. Quantifizierung der mRNA Expressionslevel von (A) GADD45α und (B) p21 in mRNA-Präparationen kultivierter Astrozyten mittels Realtime-PCR. Astrozyten wurden entweder mit CH_3NH_3Cl oder NH_4Cl (5mmol/l) stimuliert oder blieben unbehandelt (Kontrolle) für 72 Stunden. Wo angegeben, wurden die Zellen in An- oder Abwesenheit von MSO (3mmol/l, 30Min Vorinkubation), Apocynin (300µmol/l, 30Min Vorinkubation) oder SB203580 (10µmol/l, 30Min Vorinkubation) mit NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) behandelt oder blieben unbehandelt. Die mRNA Expression der zu untersuchenden Gene wurde in jeder Probe auf das entsprechende Expressionsniveau des *Houskeeping* Gens HPRT1 normiert und ist in Relation zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle ausgedrückt. *: statistisch signifikant unterschiedlich zur jeweiligen nicht mit NH_4Cl-behandelten Kontrolle. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber unbehandelten Kontrollen (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

Tab. 9: Pharmakologische Charakterisierung der durch NH_4Cl-induzierten Expressionsänderung der Lamine A und B1. Quantifizierung der mRNA Expressionslevel von Lamin A und B1 in mRNA-Präparationen kultivierter Astrozyten mittels Realtime-PCR. Astrozyten wurden entweder mit CH_3NH_3Cl oder NH_4Cl (5mmol/l) stimuliert oder blieben unbehandelt (Kontrolle) für 72 Stunden. Wo angegeben, wurden die Zellen in An- oder Abwesenheit von MSO (3mmol/l, 30Min Vorinkubation), Apocynin (300µmol/l, 30Min Vorinkubation) oder SB203580 (10µmol/l, 30Min Vorinkubation) mit NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) behandelt oder blieben unbehandelt. Die mRNA Expression der zu untersuchenden Gene wurde in jeder Probe auf das entsprechende Expressionsniveau des *Houskeeping* Gens HPRT1 normiert und ist in Relation zur unbehandelten Kontrolle ausgedrückt. *: statistisch signifikant unterschiedlich zur jeweiligen nicht mit NH_4Cl-behandelten Kontrolle. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber unbehandelter Kontrollen (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

	Kontrolle (72h)	**NH_4Cl** (5mmol/l, 72h)	**+MSO** (3mmol/l, 72h)	**+Apocynin** (300µmol/l, 72h)	**+SB203580** (10µmol/l, 72h)	**CH_3NH_3Cl** (5mmol/l,72h)
Lamin A	1,0±0,0	0,63±0,08 *	0,86±0,19 n.s.	1,05±0,05 n.s.	0,92±0,23 n.s.	0,98±0,05 n.s.
Lamin B1	1,0±0,0	0,67±0,12 *	0,83±0,13 n.s.	0,76±0,21 n.s.	1,23±0,02 n.s.	0,92±0,05 n.s.

3.4.3.3 Wirkung von NH_4Cl auf die Expression des p21 Proteins

Zur Überprüfung des Einflusses von NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) auf die Proteinexpression und nukleäre Akummulation des p21 Proteins wurden Immunofluoreszenzanalysen durchgeführt.

Wie in der Abbildung 30 dargestellt, steigert NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) die Expression und die nukleäre Akkumulation des p21 Proteins um den Faktor 1,8-fach.

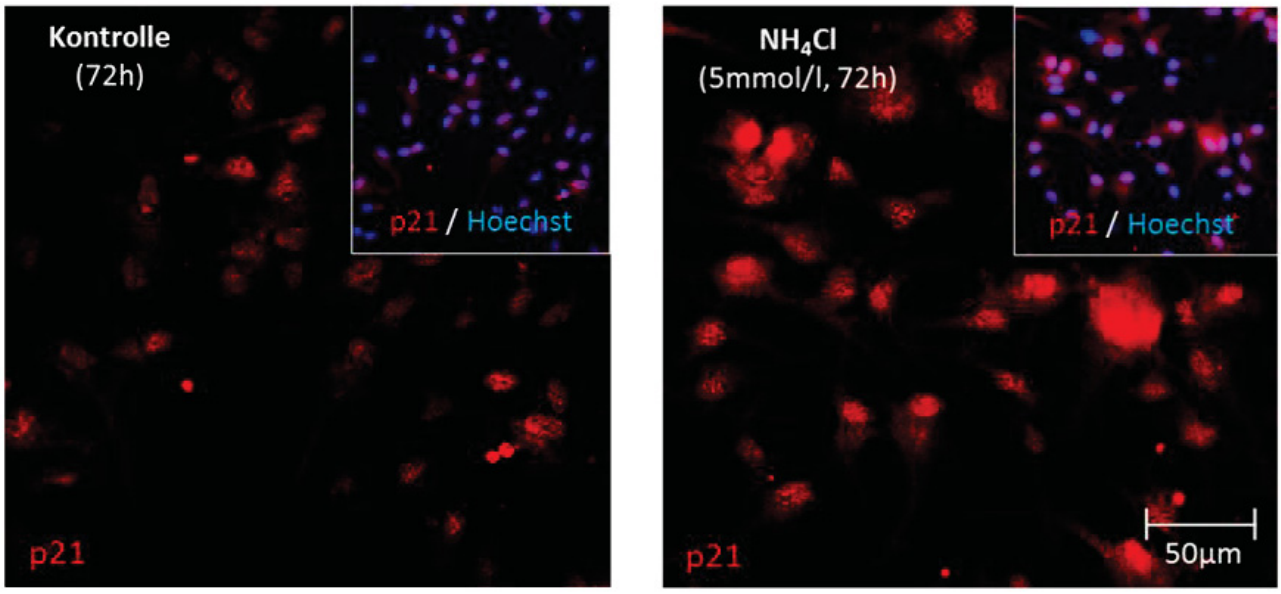


Abb. 30: Einfluss von Ammoniak auf die Expression und zelluläre Lokalisation des p21 Proteins. Astrozyten blieben unbehandelt oder wurden mit NH_4Cl (5mmol/l) für 72 Stunden behandelt, bevor die Expression des p21 Proteins mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen wurde. Zellkerne wurden mittels Hoechst34580 angefärbt. (Vergrößerung: 250-fach) (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

Wie in Abbildung 31 dargestellt, war der Anstieg der nukleären anti-p21 Immunofluoreszenz in mit NH_4Cl (5mmol/l) behandelten Astrozyten durch den Glutaminsynthetasehemmstoff MSO (3mmol/l, 30Min Vorinkubation), den $p38^{MAPK}$ Inhibitor SB203580 (10µmol/l, 30Min Vorinkubation) und den NADPH Oxidase Inhibitor Apocynin (3mmol/l, 30Min Vorinkubation) vollständig hemmbar.

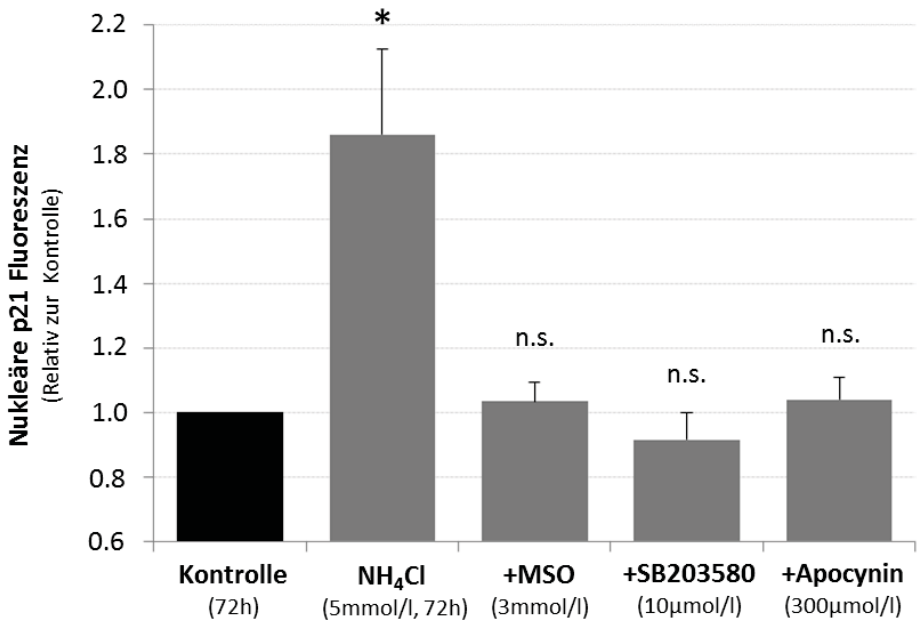


Abb. 31: Pharmakologische Charakterisierung der durch NH_4Cl-vermittelten Expressionssteigerung des p21 Proteins. Astrozyten wurden in An- oder Abwesenheit von MSO (3mmol/l, 30Min Vorinkubation), SB203580 (10µmol/l, 30Min Vorinkubation) oder Apocynin (300µmol/l, 30Min Vorinkubation) mit NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) behandelt oder blieben unbehandelt. Die Expression des p21 Proteins wurde mittels Immunfluoreszenzanalyse und Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen und die nukleäre p21 Immunoreaktivität wurde automatisiert mittels eines JAVA-basierten Scripts für ImageJ quantifiziert. Die p21-Immunoreaktivität in NH_4Cl-behandelten Zellen ist relativ zu den jeweils nicht mit NH_4Cl-behandelten Kontrollen angegeben. Zellkerne wurden mittels Hoechst34580 angefärbt. *: statistisch signifikant unterschiedlich zu unbehandelten Kontrollen. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber unbehandelten Kontrollen (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

Diese Ergebnisse zeigen, dass NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) zu einem Anstieg des mRNA Expressionsniveaus der p53-abhängigen zellzyklusinhibierenden Gene p21, GADD45α und einer nukleären Akkumulation von p21 auf Proteinebene führt. Gleichzeitig inhibiert Ammoniak die mRNA Expression der Lamine A und B1. Sowohl die Hochregulation der GADD45α und p21 mRNA und des p21 Proteins, als auch die Herunterregulation der Lamin A und B1 mRNA Level ist sensitiv gegenüber einer Hemmung der Glutaminsynthetase, NADPH-Oxidase und $p38^{MAP}$ Kinase.

3.5 Wirkung von Ammoniak auf die Reaktionsfähigkeit kultivierter Rattenastrozyten gegenüber Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren steigern die Proliferation durch Aktivierung des Zellzykluses und Förderung des Übergangs von einer ruhenden- (G0) in die proliferative-Phase (G1).

3.5.1 Einfluss von Ammoniak auf den BDNF Signalweg

3.5.1.1 Wirkung von Ammoniak auf die Expression des BDNF-Rezeptors TrkB

Der Wachstumsfaktor *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) vermittelt seine mitogenen Effekte durch Bindung an den *Tyrosin receptor Kinase B* (TrkB), einen membranständigen Rezeptor, der in Astrozyten in einer trunkierten Isoform ($TrkB_T$) exprimiert wird. Mit Hilfe der Western-Blot Analyse wurde der Einfluss von NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) auf die Expression des TrkB untersucht.

Wie in Abbildung 32 gezeigt, verringert die Behandlung kultivierter Rattenastrozyten mit NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) die Expression des $TrkB_T$. Gleichzeitig induziert die Behandlung der Astrozyten mit NH_4Cl (5mmol/l) eine anti-TrkB Immunoreaktivität im Molekulargewichtsbereich bei 50kDa ($TrkB_T$*), wie sie auch beobachtbar ist nach Behandlung mit dem Glykosyltransferase-Inhibitor Tunicamyzin (1µg/ml, 16 Stunden) (Abbildung 32).

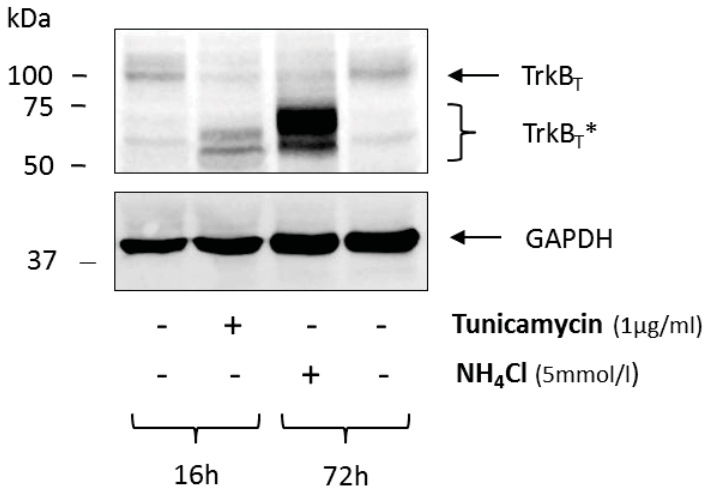


Abb. 32: Wirkung von NH_4Cl auf die Expression des TrkB-Rezeptors in kultivierten Rattenastrozyten. Nachweis des TrkB in Proteinlysaten unbehandelter oder mit NH_4Cl (5mmol/l) für 72 Stunden stimulierter, oder mit dem Glykosylierungshemmstoff Tunicamyzin

(1µg/ml) für 16 Stunden behandelter Rattenastrozyten im Western-Blot. $TrkB_T$*: Anti-$TrkB_T$ Immunoreaktivität mit reduziertem Molekulargewicht. Der Nachweis der GAPDH dient der Beladungskontrolle (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

Die Ergebnisse deuten auf eine Beeinträchtigung der Glykosylierung des TrkB durch NH_4Cl in kultivierten Astrozyten hin.

3.5.1.2 Wirkung von Ammoniak auf die durch BDNF-induzierte Proliferation

Die Auswirkung von NH_4Cl (5mmol/l) auf die durch BDNF-vermittelte Zellproliferation kultivierter Astrozyten erfolgte durch fluorimetrische Quantifizierung des DNA-Gehalts in unbehandelten und mit NH_4Cl behandelten Astrozyten. Hierfür wurde die DNA in den Zellen mit Hoechst34580 angefärbt.
Eine schematische Übersicht zum experimentellen Ablauf ist in Abbildung 33 dargestellt.

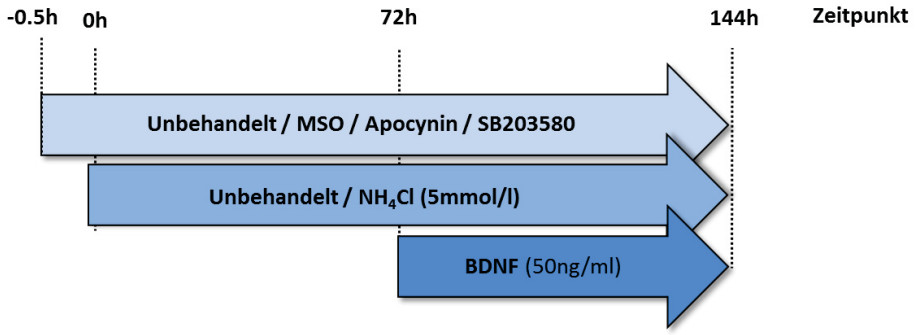


Abb. 33: Schematische Darstellung des experimentellen Versuchsablaufs zur Überprüfung der Wirkung von NH_4Cl auf die durch BDNF-induzierbare Proliferation. Kultivierte Rattenastrozyten wurden entweder mit NH_4Cl (5mmol/l) behandelt oder blieben unbehandelt für 72 Stunden in Gegenwart oder Abwesenheit von MSO (3mmol/l, 30 Min Vorinkubation), Apocynin (300µmol/l, 30 Min Vorinkubation) oder SB203580 (10µmol/l, 30 Min Vorinkubation) bevor eine Stimulation mit BDNF (50ng/ml) erfolgte, oder die Zellen für weitere 72 Stunden unbehandelt blieben (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

Wie in Abbildung 34 gezeigt, steigerte die Behandlung kultivierter Astrozyten mit BDNF (50ng/ml) für 72 Stunden die Proliferation um ca. 20% gegenüber unbehandelten Kontrollen. Eine Vorbehandlung der Astrozyten mit NH_4Cl (5mmol/l) für 72 Stunden verhinderte vollständig die durch BDNF (5ng/ml) induzierte Astrozytenproliferation. Die Hemmung der BDNF (50ng/ml) induzierten Astrozytenproliferation durch NH_4Cl wurde

vollständig durch den Glutaminsynthetasehemmstoff MSO (3mmol/l, 30Min Vorinkubation), den NADPH Oxidase Inhibitor Apocynin (300µmol/l, 30Min Vorinkubation) und den $p38^{MAPK}$ Inhibitor SB203580 (10µmol/l, 30 Min Vorinkubation) verhindert.

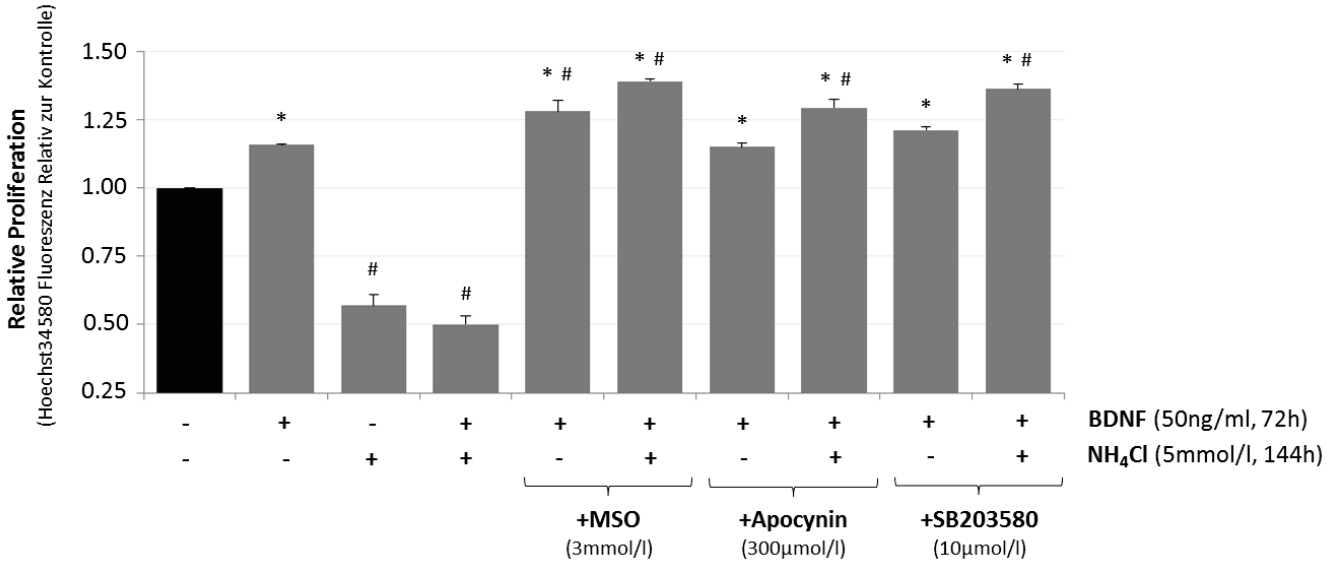


Abb. 34: Einfluss von NH_4Cl auf die BDNF-vermittelte Proliferation kultivierter Rattenastrozyten. Astrozyten wurden entweder mit NH_4Cl (5mmol/l) behandelt oder blieben unbehandelt in An- oder Abwesenheit von Methioninsulfoximin (MSO, 3mmol/l, 30Min Vorinkubation), Apocynin (300µmol/l, 30Min Vorinkubation) oder SB203580 (10µmol/l, 30Min Vorinkubation) für 72 Stunden. Nachfolgend wurden die Zellen entweder mit BDNF (50ng/ml) stimuliert oder blieben unbehandelt für weitere 72 Stunden. Die Astrozytenproliferation wurde durch fluorimetrische Quantifizierung der Hoechst34580 Fluoreszenz gemessen und ist ausgedrückt in Relation zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelt oder MSO, Apocynin oder SB203580 alleine). *: statistisch signifikant unterschiedlich zur jeweiligen nicht mit NH_4Cl-behandelten Kontrolle. #: statistisch signifikant unterschiedlich zu BDNF-behandelten Astrozyten. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber der jeweiligen Kontrolle (Entnommen aus Görg *et al.*, 2014).

Die Ergebnisse zeigen, dass Ammoniak die Glykosylierung des TrkB und die BDNF-induzierte Astrozytenproliferation hemmt. Hemmstoffe der Glutaminsynthetase, der NADPH Oxidase und der $p38^{MAPK}$ verhindern die durch NH_4Cl vermittelte Hemmung der BDNF-induzierten Proliferation in Astrozyten.

3.5.1.3 BDNF-induzierte Astrozytenmorphologie

BDNF induziert morphologische Veränderungen durch Reorganisation des Zytoskellets in Astrozyten (Ohira *et al*., 2007). Der Effekt von BDNF (50ng/ml) auf die Astrozytenmorphologie wurde mittels VivaTome™ Fluoreszenzmikroskopie in mit *CellMask™-Orange* angefärbten vitalen Astrozyten *in vitro* analysiert. *CellMask™-Orange* färbt die Plasmamembran von Zellen über einen nicht genauer beschriebenen Mechanismus. Wie in Abbildung 35 erkennbar, induzierte BDNF (50ng/ml) innerhalb von 20 Minuten die Bildung von Filopodien (Pfeile) in kultivierten Astrozyten. Demgegenüber zeigten unbehandelte Astrozyten keine morphologischen Veränderungen (Abbildung 35).

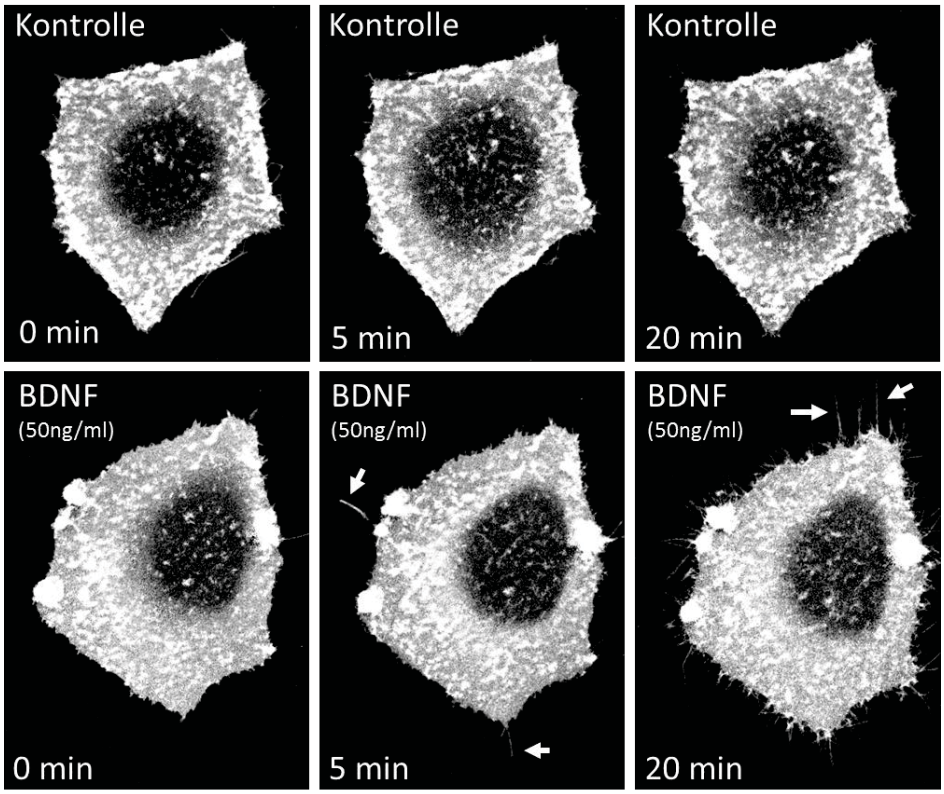


Abb. 35: Einfluss von BDNF auf die Zellmorphologie kultivierter Rattenastrozyten. Astrozyten wurden entweder mit BDNF (50ng/ml) behandelt oder blieben unbehandelt für bis zu 20 Minuten. Die Plasmamembran wurde mittels *CellMask™ Orange* angefärbt und mittels ViVaTome™ Fluoreszenz Mikroskopie analysiert (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

Der Einfluss von BDNF auf das astrogliale Zytosklett wurde mit Hilfe eines Assays überprüft, mit dem die relativen Anteile von polymerisiertem und unpolymerisiertem Aktin mittels Western-Blot Analyse bestimmt werden können.

Wie in Abbildung 36 dargestellt, steigert die Behandlung mit BDNF (50ng/ml) nach 20 Minuten den Anteil von filamentösem (F-) Aktin und vermindert gleichzeitig den Anteil von globulärem/monomerem (G-) Aktin. Die Vorbehandlung der Astrozyten mit NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) oder Tunicamyzin (1µg/ml, 16 Stunden) hemmte die BDNF vermittelte Erhöhung des F- und Verminderung des G-Aktin-Anteils in kultivierten Astrozyten.

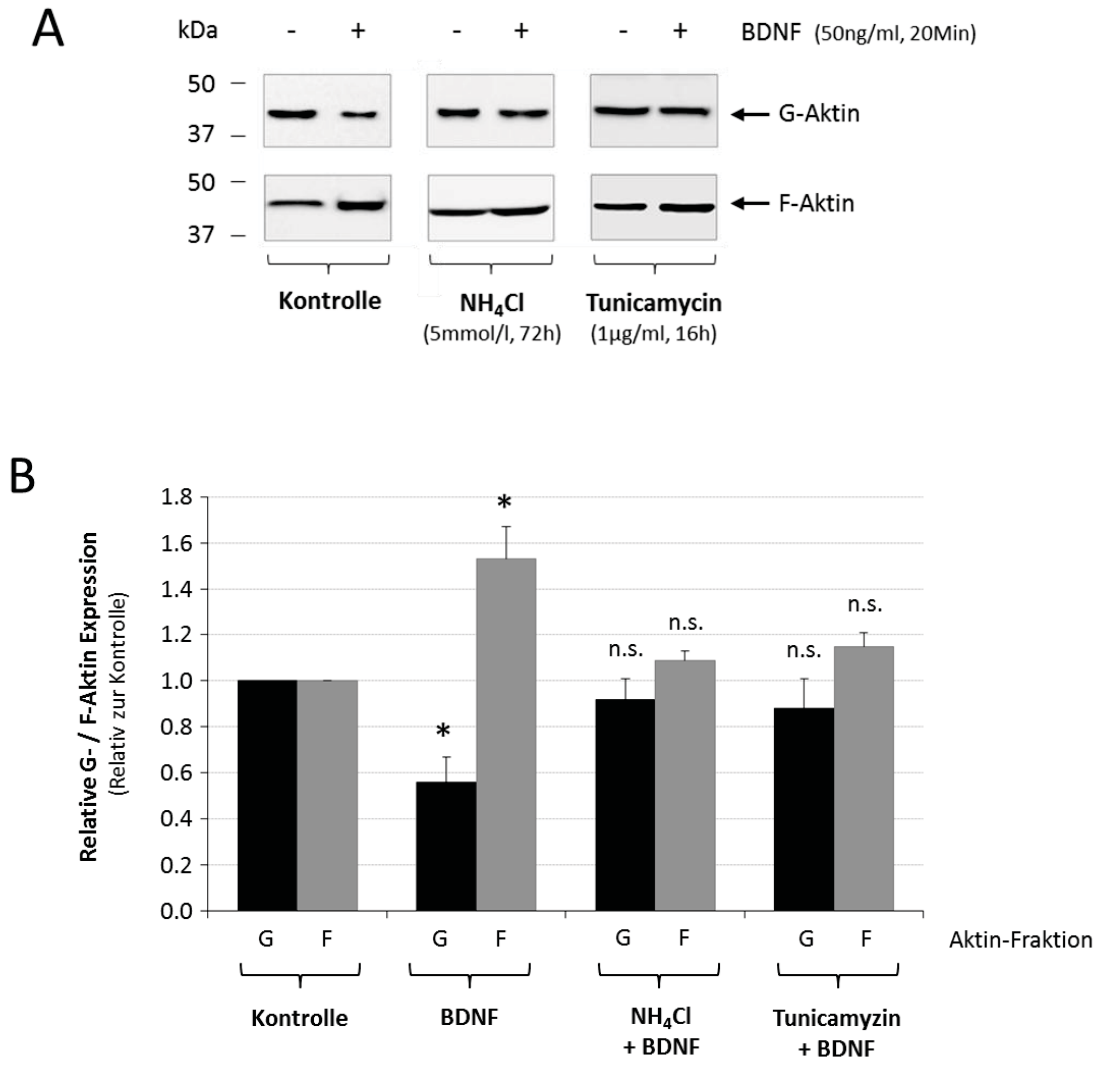


Abb 36: Einfluss von NH_4Cl auf die BDNF-vermittelte Änderung des G-und F-Aktingehalts kultivierter Rattenastrozyten. Astrozyten wurden entweder mit NH_4Cl (5mmol/l) oder Tunicamyzin (1µg/ml) behandelt oder blieben unbehandelt. Nachfolgend wurden die Zellen mit BDNF (50ng/ml) stimuliert oder blieben unbehandelt für weitere 20 Minuten. Die relativen Anteile von G- und F-Aktin wurden mittels Western-Blot analysiert (A) und densitometrisch quantifiziert (B). G- oder F-Aktin Gehalt in BDNF (50ng/ml)-behandelten Atsrozyten ist relativ zur Kontrolle angegeben. *: statistisch signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber unbehandelten Kontrollen (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

Diese Daten weisen auf eine Hemmung der durch BDNF-induzierten Reorganisation des Aktinzytoskeletts in mit NH_4Cl behandelten und den N-Glykosylierungshemmstoff Tunicamyzin-behandelten Astrozyten hin.

3.5.2 Einfluss von Ammoniak auf den EGF/EGF-Rezeptor Signalweg

3.5.2.1 Wirkung von NH_4Cl auf die Expression des EGF-Rezeptors

Die Wirkung von NH_4Cl (5mmol/l) auf die Expression des EGF-Rezeptors (EGFR) erfolgte anhand von Western-Blot Analysen.

Wie in Abbildung 37 dargestellt ist, verringert NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) die Expression des EGFR Proteins um ca. 50%. Die NH_4Cl (5mmol/l) verminderte Expression des EGFR wurde vollständig durch den Glutaminsyntheasehemmstoff MSO (3mmol/l) aufgehoben.

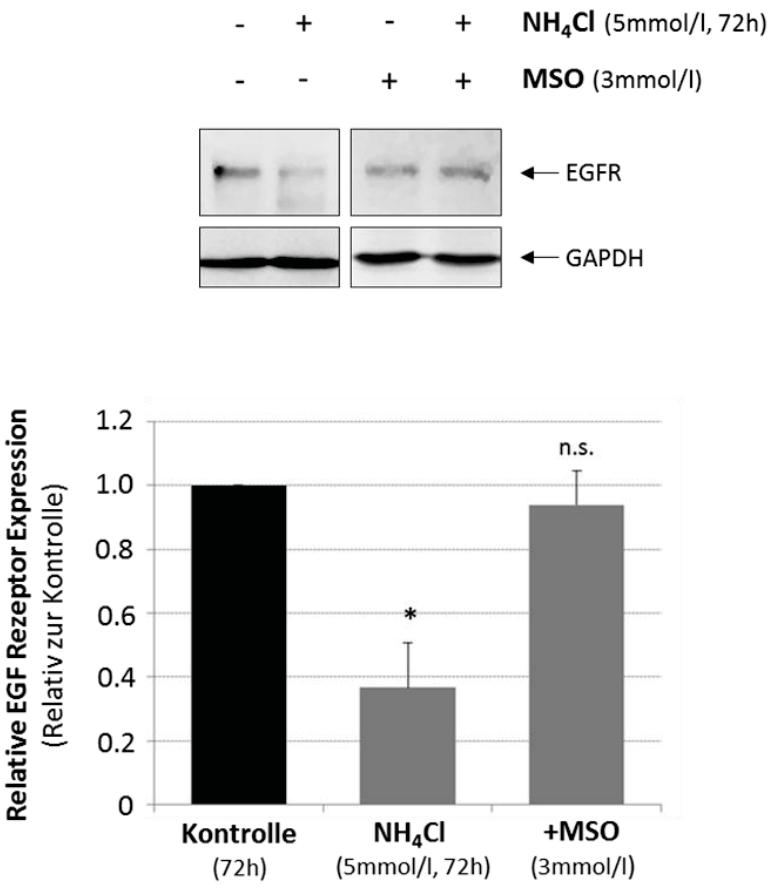


Abb. 37: Wirkung von NH_4Cl auf die Expression des EGF-Rezeptors in kultivierten Rattenastrozyten. Nachweis des EGF Rezeptors (EGFR) in Proteinlysaten unbehandelter oder mit NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden) stimulierter, oder mit dem N-Glykosylierungshemmstoff

Tunicamyzin (1µg/ml, 16 Stunden) behandelter Rattenastrozyten im Western-Blot. Der Nachweis der GAPDH diente als Beladungskontrolle. *: statistisch signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber unbehandelten Kontrollen (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

3.5.2.2 Wirkung von Ammoniak auf die durch EGF-induzierte Proliferation

Zur Uberprüfung der Wirkung von NH_4Cl (5mmol/l) auf die durch EGF-vermittelte Proliferation kultivierter Astrozyten wurde der DNA-Gehalt durch fluorimetrische Analyse in kultivierten Astrozyten gemessen. Die Markierung von DNA erfolgte durch Anfärbung der Zellen mit dem Kernfarbstoff Hoechst34580.

Eine schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs ist in Abbildung 38 gezeigt.

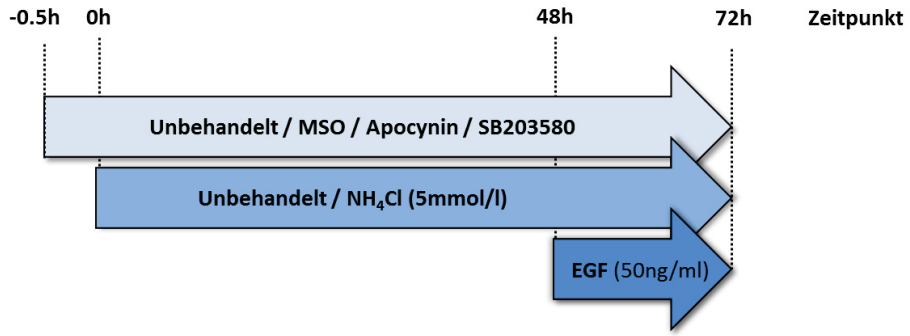


Abb. 38: Schematische Darstellung des experimentellen Versuchsablaufs zur Überprüfung der Wirkung von NH_4Cl auf die durch EGF-induzierbare Proliferation. Kultivierte Rattenastrozyten wurden entweder mit NH_4Cl (5mmol/l) behandelt oder blieben unbehandelt in Gegenwart oder Abwesenheit von MSO (3mmol/l, 30Min Vorinkubation), Apocynin (300µmol/l, 30Min Vorinkubation) oder SB203580 (10µmol/l, 30Min Vorinkubation) bevor eine Stimulation mit EGF (50ng/ml) erfolgte, oder die Zellen für weitere 24 Stunden unbehandelt blieben (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

Wie in Abbildung 39 gezeigt, steigert die Behandlung kultivierter Astrozyten mit EGF (50ng/ml) für 24 Stunden die Proliferation gegenüber unbehandelten Kontrollen. Dieser Effekt kann durch die Vorbehandlung der Astrozyten mit NH_4Cl (5mmol/l, 48 Stunden) vollständig aufgehoben werden. Die NH_4Cl vermittelte Hemmung der EGF (50ng/ml) induzierten Astrozytenproliferation wurde vollständig durch den Glutaminsynthetase-hemmstoff MSO (3mmol/l, 30Min Vorinkubation), den NADPH Oxidase Inhibitor Apocynin

(300µmol/l, 30Min Vorinkubation) und den $p38^{MAPK}$ Inhibitor SB203580 (10µmol/l, 30Min Vorinkubation) verhindert.

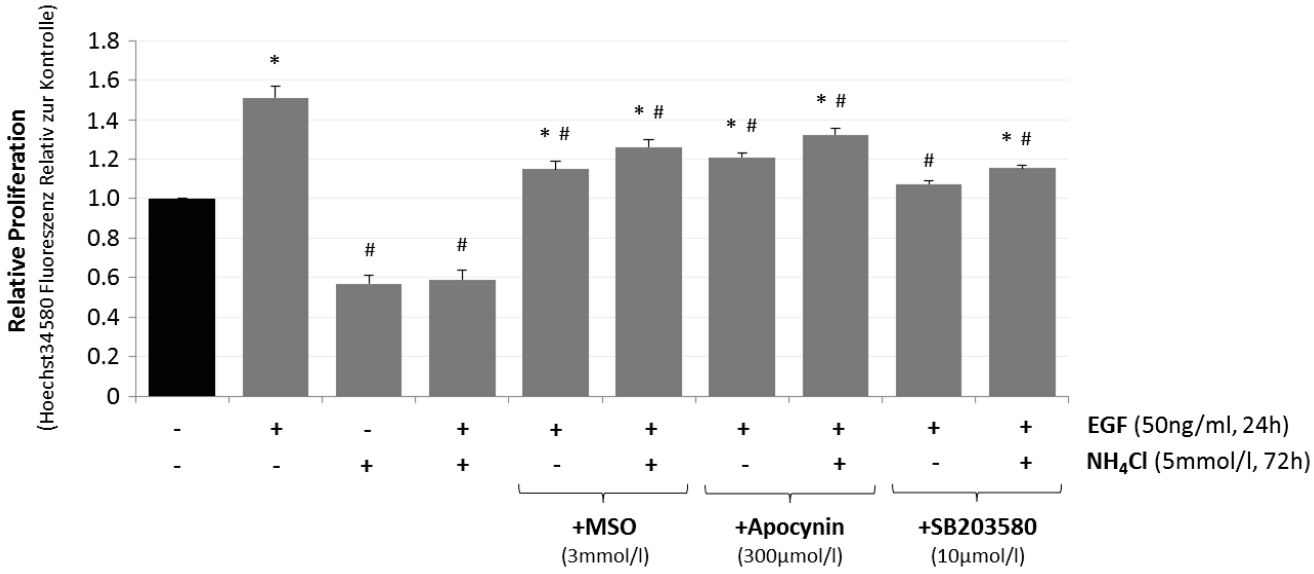


Abb. 39: Einfluss von NH_4Cl auf die EGF-vermittelte Proliferation kultivierter Rattenastrozyten. Astrozyten wurden entweder mit NH_4Cl (5mmol/l) behandelt oder blieben unbehandelt in An- oder Abwesenheit von Methioninsulfoximin (MSO, 3mmol/l, 30 Min Vorinkubation), Apocynin (300µmol/l, 30Min Vorinkubation) oder SB203580 (10µmol/l, 30Min Vorinkubation) für 72 Stunden. Nachfolgend wurden die Zellen entweder mit EGF (50ng/ml) stimuliert oder blieben unbehandelt für weitere 72 Stunden. Die Astrozytenproliferation wurde durch fluorimetrische Quantifizierung der Hoechst34580 Fluoreszenz gemessen und ist ausgedrückt in Relation zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelt oder MSO, Apocynin oder SB203580 alleine in Abwesenheit von NH_4Cl (5mmol/l)). *: statistisch signifikant unterschiedlich zur jeweiligen nicht mit NH_4Cl-behandelten Kontrolle. #: statistisch signifikant unterschiedlich zu EGF-behandelten Astrozyten. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber der jeweiligen Kontrolle (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

Die Ergebnisse zeigen, dass Ammoniak eine Herunterregulation des EGF-Rezeptors bewirkt, die durch Hemmstoffe der Glutaminsynthetase, der NADPH Oxidase und der $p38^{MAPK}$ verhindert werden kann.

3.6 Quantifizierung Seneszenz-assoziierter Gene in *post mortem* Hirnproben von Leberzirrhosepatienten mit oder ohne HE

Zur Überprüfung der *in vivo* Relevanz der an Zellkulturen erhobenen Befunde wurde die Expression der mit Seneszenz-assoziierten Gene GADD45α, p53, p21 und p27 in humanem *post mortem* Hirngewebe von Kontrollpatienten und Patienten mit Leberzirrhose mit HE und ohne HE mittels Realtime-PCR analysiert.

Wie in Abbildung 40 erkennbar, ist die mRNA Expression von GADD45α, p53 und p21 in *post mortem* Hirngewebe von Leberzirrhosepatienten mit HE gegenüber Patienten mit Leberzirrhose ohne HE signifikant gesteigert. Keine signifikant veränderten Genexpressionslevel gegenüber den Kontrollen wurde im Gehirn von Zirrhosepatienten ohne HE gefunden. Im Gegensatz dazu ist die mRNA Expression von p27 in Zirrhosepatienten mit oder ohne HE im Vergleich zu Kontrollen unverändert (Abbildung 40D).

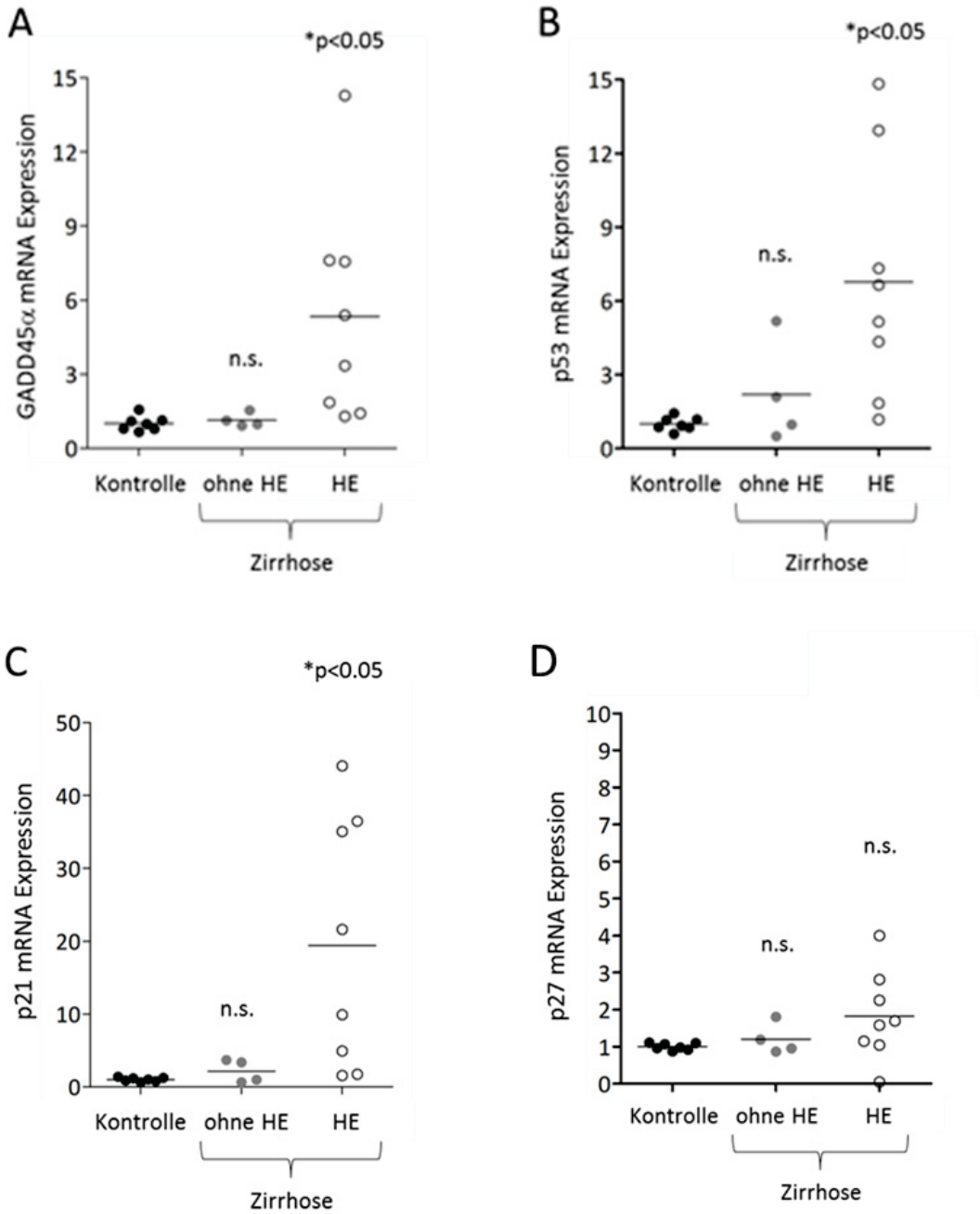


Abb. 40: Expressionslevel der Seneszenz-assoziierten Gene GADD45α, p53, p21 und p27 in humanem *post mortem* Hirngewebe von Kontrollpatienten und Patienten mit Leberzirrhose mit und ohne HE. RNA-Präparationen aus humanem *post mortem*

Hirngewebe von 7 Kontrollen, 8 Patienten mit Leberzirrhose mit HE und 4 Patienten mit Leberzirrhose ohne HE wurden mittels Realtime-PCR auf das mRNA Expressionsniveau von GADD45α, p53, p21 und p27 untersucht (A-D). Die mRNA Expression der zu untersuchenden Gene wurde in jeder Probe auf das entsprechende Expressionsniveau des *Houskeeping* Gens HPRT1 normiert und ist in Relation zu den unbehandelten Kontrollen ausgedrückt. *: statistisch signifikant unterschiedlich zu den Kontrollen. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber den Kontrollen (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

Das Expressionsniveau der Seneszenz-assoziierten Gene wurde mittels Korrelationsanalyse untersucht. Wie in Abbildung 41 gezeigt, besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen dem mRNA Expressionslevel von p53 und GADD45α in Zirrhosepatienten mit HE.

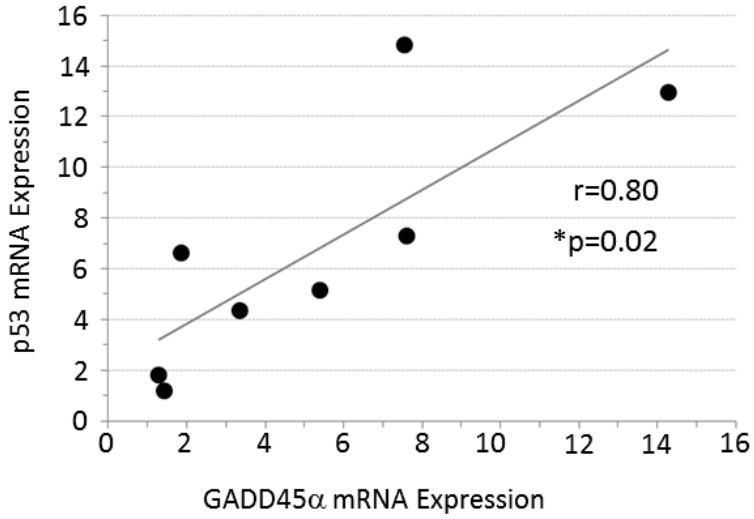


Abb. 41: Korrelation der mRNA Expressionslevel von p53 und GADD45α in humanem *post mortem* Hirngewebe vom Patienten mit Leberzirrhose mit HE. mRNA Expressionsniveaus * statistisch signifikante Korrelation. r: Korrelationskoeffizient (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

Unter Anwendung der Genchip Array Analyse wurden die Expressionslevel der mit Seneszenz-assoziierten Gene GADD45α und p21 in humanem *post mortem* Hirngewebe von Kontrollpatienten und Patienten mit Leberzirrhose mit und ohne HE überprüft. Die hier untersuchten Proben stammen aus den parietale/occipitale Lappen des zerebralen Kortex. Dabei wurden 8 Kontrollpatienten, 8 Zirrhosepatienten mit HE und 3 Zirrhosepatienten ohne HE untersucht.

Wie in Abbildung 42 dargestellt, ist die Expression von GADD45α und p21 im Hirngewebe von Leberzirrhosepatienten mit HE gegenüber Patienten ohne Leberzirrhose hochreguliert.

Keine veränderten Genexpressionslevel von GADD45α und p21 wurden im Gehirn von Zirrhosepatienten ohne HE gefunden.

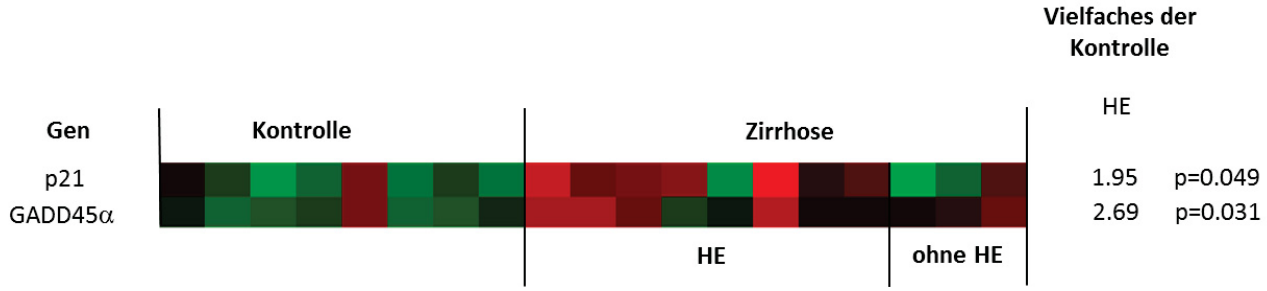


Abb. 42: Expressionslevel der mit Seneszenz-assoziierten Gene GADD45α und p21 in humanem *post mortem* Hirngewebe von Kontrollpatienten und Patienten mit Leberzirrhose mit und ohne HE. RNA wurde aus humanem *post morten* Hirngewebe von 8 Kontrollen, 8 Patienten mit Leberzirrhose mit HE und 3 Patienten mit Leberzirrhose ohne HE isoliert und mittels Agilent™ *Whole Human Genome Array* analysiert. Die Expression von p21 und GADD45α ist farbkodiert und in Relation zum Median der Werte aller Patienten dargestellt. Eine gegenüber dem Median aller Patienten erhöhte Expression ist rot, eine verringerte ist grün dargestellt. Rechte Seite: Normierung der Genexpressionslevel der Zirrhosepatienten mit HE auf die Kontrolle (Relativ zu den Kontrollen), p: Signifikanzniveau (Entnommen aus Görg *et al*., 2014).

Diese Ergebnisse deuten auf eine Hochregulation der Seneszenz-assoziierten Gene GADD45α, p21 und p53 im zerebralen Kortex von Zirhossepatienten mit HE aber nicht ohne HE hin.

4. Diskussion

In dieser Studie wurde der Effekt von Ammoniak, einem für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie (HE) bedeutsamen Zellgift, auf die Expression von Seneszenzbiomarkern in kultivierten Rattenastrozyten untersucht und zugrunde liegenden Mechanismen charakterisiert. An *post mortem* Hirnproben von Kontrollpatienten oder Zirrhosepatienten mit oder ohne hepatischer Enzephalopathie wurde die Expression von mit Seneszenz-assoziierten Genen untersucht.

4.1 Ammoniak vermittelt Astrozytenseneszenz

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Behandlung kultivierter Rattenastrozyten mit Ammoniak zeit- und konzentrationsabhängig Seneszenz induziert. Die Ammoniak-induzierte Seneszenz wurde durch verschiedene Surrogatmarker charakterisiert. Hierzu zählt in erster Linie die Hemmung der Zellteilung (Abbildung 16), aber auch ein Aktivitätsanstieg der mit Seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase (Abbildung 24 und 25). Von großer Bedeutung ist, dass eine Astrozytenproliferationshemmung bereits unter Verwendung von pathophysiologisch relevanten Ammoniakkonzentrationen (500µmol/l) herbeigeführt werden konnte (Abbildung 17).

Die Messung der Astrozytenteilung *in vitro* diente in der vorliegenden Arbeit als Surrogatmarker für Seneszenz. Hiermit sollte nicht die Zellteilung selber erfasst werden, sondern die Fähigkeit der Zellen zu proliferieren bzw. ihr proliferatives Potential beschrieben werden. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund wichtig, dass Astrozyten im gesunden Gehirn aufgrund von aus der Umgebung sezernierten Faktoren nur geringfügig im Sinne einer Erhaltung proliferieren (Sofroniew *et al*., 2009). Damit besitzen sie ein proliferatives Potenzial, welches sie von seneszenten Zellen unterscheidet. Dies wird deutlich bei Erkrankungen, die mit einer erhöhten Astrozytenproliferation einhergehen wie z.B. traumatischer Hirnschädigungen, bei denen es zur Ausbildung einer sogenannten "Glianarbe" kommen kann. Proliferierende Astrozyten findet man insbesondere im Bereich epileptischer Foki und nach Hirntraumata, wie z.B. dem Schlaganfall (de Lanerolle et al., 2010; Huang *et al*., 2014). Hierbei muss jedoch einschränkend angemerkt werden, dass bislang noch nicht vollständig geklärt ist, in wie weit und insbesondere in welchem Ausmaß

auch Stammzellen in diese sogenannten reaktiven Gliosen involviert sind (Ilkanizadeh *et al*., 2014).

Interessanterweise konnte die ammoniakvermittelte Aktivitätsteigerung der Seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase durch den Glutaminsynthetasehemmstoff Methioninsulfoximin (MSO) gehemmt werden und nicht durch Methylammoniumchlorid induziert werden, welches ähnliche intrazelluläre pH-Verschiebungen induziert wie Ammoniak (Nagaraja *et al*., 1998; Rose *et al*., 2005), aber nicht zu Glutamin metabolisiert werden kann. Damit weisen diese Befunde auf eine besondere Bedeutung für die durch Ammoniak-induzierte intrazelluläre Glutaminbildung bei der Astrozytenseneszenz hin. Dennoch kann gegenwärtig nicht ausgeschlossen werden, dass der Glutaminsynthetasehemmstoff MSO neben der Glutaminsynthetase-hemmung auch noch weitere, bislang unbekannte Effekte, auf andere Zellfunktionen ausüben könnte. In diesem Zusammenhang sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Bei der durch Ammoniak ausgelösten Seneszenz handelt es sich um keine replikative Seneszenz, die auf einem irreversiblen Verlust der Teilungsfähigkeit der Zellen beruht, wie sie z.B. durch Telomerverkürzung im Verlauf vieler aufeinanderfolgender Zellteilungen entstehen kann, sondern um eine prämature Seneszenz, wie sie durch Toxine ausgelöst werden kann. Hierfür spricht insbesondere, dass sich die Proliferation der Astrozyten nach Wegnahme des die Seneszenz auslösenden Ammoniaks zeitabhängig und verzögert normalisierte. Dieser Befund zeigt, dass die Teilungsfähigkeit der Zellen prinzipiell erhalten bleibt (Tabelle 8).

4.2 Bedeutung der Bildung von oxidativem Stress für die durch Ammoniak vermittelte Astrozytenseneszenz

Die prämature Seneszenz kann durch verschiedene Signalmechanismen wie z.B. der Bildung von oxidativem Stress induziert werden (Collado *et al*., 2006). Die HE ist eng mit der Bildung von oxidativ/nitrosativem Stress vergesellschaftet (Görg *et al*., 2010b, 2013). Marker für oxidativ/nitrosativen Stress wurden sowohl in mit Ammoniak behandelten kultivierten Astrozyten (Görg *et al*., 2008), in Tiermodellen zur HE (Kosenko *et al*., 1999; Görg *et al*., 2008), sowie in *post mortem* Hirnproben von Zirrhosepatienten mit HE (Görg *et al*., 2010b, 2013) gefunden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ammoniakvermittelte Astrozytenproliferationshemmung durch Hemmstoffe der Glutaminsynthetase (MSO) und der NADPH-Oxidase (Apocynin) gehemmt werden konnte (Abbildung 18). Kongruent dazu, induzierte Ammoniak eine durch MSO und Apocynin hemmbare Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die mittels des Superoxidanionenradikalsensitivem Fluoreszenzfarbstoffs *MitoSOX Red*^{TM} nachgewiesen werden konnte. Dieser Befund steht in Einklang mit vielen Berichten unterschiedlicher Gruppen, die eine durch Ammoniak vermittelte verstärkte Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies (RNOS) in Astrozyten gefunden haben (Murthy *et al*., 2001; Schliess *et al*., 2002). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die ammoniakabhängige RNOS Bildung Glutaminsynthese-vermittelt erfolgt und mit einer Aktivierung der NADPH-Oxidase assoziiert ist (Schliess *et al*., 2002; Reinehr *et al*., 2007; Görg *et al*., 2010b). Auf welche Weise Glutamin die NADPH-Oxidase aktivieren könnte, ist derzeitig völlig unklar.

Einige Autoren vermuten, dass Glutamin in Mitochondrien akkumuliert und dort die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) induziert. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig unter Verwendung von *MitoSOX Red*^{TM} nachgewiesen werden, dass es zur Bildung von ROS in den Mitochondrien kommt (Abbildung 20). Ob diese ROS-Bildung auf einer glutaminasevermittelten intramitochondrialen Ammoniakbildung beruht, wie sie in der sog. "Trojan Horse" Hypothese postuliert wird (Albrecht *et al*., 2006) ist derzeitig unbekannt und die Beantwortung dieser Frage erforderte einen direkten Nachweis der Glutaminaseexpression in Astrozytenmitochondrien. Dieser Nachweis ist bislang nicht erbracht worden. Obwohl das nicht zu Glutamin metabolisierbare Methylammoniumchlorid keine ROS Bildung in den Astrozyten 24h nach Behandlung induzierte (Abbildung 21), muss in Betracht gezogen werden, dass der Glutaminsynthetase-hemmstoff MSO neben einer Hemmung der Glutaminsynthetase weitere, bislang unbekannte Effekte in der Zelle bewirken könnte, die die ROS-Bildung beeinträchtigen könnten.

In der vorliegenden Arbeit war die mitochondriale ROS-Bildung Ammoniak-behandelter Astrozyten vergesellschaftet mit einer Schwellung der Mitochondrien (Abbildung 22 und 23). Aus Literaturbefunden ist bekannt, dass eine mitochondriale Schwellung Ausdruck einer beeinträchtigten Aktivität der Atmungskette darstellen kann,

welche essentiell für die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Potentials ist (Bai *et al*., 2001; Kuilman *et al*., 2010). Tatsächlich zeigen einige Arbeiten eine durch Ammoniak induzierte und glutaminvermittelte Beeinträchtigung des mitochondrialen Membranpotentials (Liu *et al*., 2009). Damit erhärten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Vermutung, dass Ammoniak mitochondriale Funktionen in kultivierten Rattenastrozyten beeinträchtigt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die ammoniakvermittelte ROS-Bildung in kultivierten Rattenastrozyten neben posttranslationalen Proteinmodifikationen, wie der Proteintyrosinnitrierung und der Oxidation von RNA auch Astrozytenseneszenz induziert. Ob diese funktionalen Konsequenzen der ROS-Bildung in direkter Beziehung zu einander stehen ist derzeitig unbekannt.

4.3 Beteiligte intrazelluläre Signaltransduktionselemente in der durch Ammoniak vermittelten Astrozytenseneszenz

Oxidativer Stress kann die Aktivität intrazellulärer Phosphatasen durch Oxidation von Thiolgruppen inhibieren. Diese Phosphataseninaktivierung kann mit einer Akkumulation phosphorylierter Proteine einhergehen (Rhee *et al*., 2005). Während in unterschiedlichen Zellsystemen gezeigt werden konnte, dass hiervon u.a. auch die MAP Kinase p38 betroffen ist, konnten andere Arbeiten belegen, dass Ammoniak in Astrozyten durch oxidativen Stress vermittelt eine Phosphorylierung der $p38^{MAP}$ Kinase vermittelt (Schliess *et al*., 2002; Görg *et al*., 2008). Interessanterweise ist eine verstärkte Phosphorylierung der $p38^{MAP}$ Kinase in einigen Zellsystemen mit Seneszenz in Verbindung gebracht worden (Chen *et al*., 2001; Johnson *et al*., 2002).
In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch Ammoniak-vermittelte Astrozytenproliferationshemmung durch pharmakologische Inaktivierung der p38 MAP-Kinase aufgehoben werden kann (Abbildung 18).

Ein Zielprotein der p38 MAP-Kinase stellt der zellzyklusregulatorische Transkriptionsfaktor Tumorsuppressorprotein p53 dar, bei dem eine $p38^{MAP}$ Kinase-vermittelte Phosphorylierung am Serinrest 392 die Bindung von p53 an DNA-Konsensussequenzen ermöglicht und dadurch die Transkription p53-abhängiger Gene vermittelt wird (Cox *et al*., 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ammoniak eine verstärkte Akkumulation und Serin-392 Phosphorylierung der p53 in kultivierten Rattenastrozyten bewirkt (Abbildung 26). Dieses Untersuchungsergebnis bestätigt Literaturbefunde, die mittels Western-Blot Analyse eine gesteigerte Expression von phosphoryliertem p53 in mit Ammoniak behandelten Astrozyten gezeigt haben (Panickar *et al*., 2009). In Übereinstimmung mit einer durch Glutamin vermittelten, NADPH-Oxidase abhängigen Bildung von oxidativem Stress und einer hiermit einhergehenden Aktivierung der p38 MAP-Kinase konnte die durch Ammoniak vermittelte Proliferationshemmung durch Hemmstoffe der Glutaminsynthetase (MSO), der NADPH-Oxidase (Apocynin) und der p38 (SB203580) aufgehoben werden (Schliess *et al*., 2002; Jayakumar *et al*., 2006; Reinehr *et al*., 2007; Görg *et al*., 2008, 2010b, Häussinger *et al*., 2010).

Obwohl gezeigt werden konnte, dass der p53-Hemmstoff α-Pifithrin die p53-Aktivierung in mit Ammoniak-behandelten Astrozyten zu hemmen mag (Panickar *et al*., 2009), kam der Hemmstoff in der vorliegenden Arbeit nicht zum Einsatz. Zum einen zeigen einige Literaturbefunde, dass α-Pifithrin in wässriger Lösung instabil ist (Sohn *et al*., 2009), und zum anderen stellen andere Befunde aus der Literatur die p53-Spezifität von α-Pifithrin in Frage (Gary *et al*., 2005; Walton *et al*., 2005; Mulligan *et al*., 2012).

Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass die p53-Aktivierung in mit Ammoniak-behandelten Astrozyten assoziiert ist mit einer verringerten Glutamataufnahme. Die Clearance von an Synapsen durch Neurone sezerniertes Glutamat ist äußerst bedeutsam für die Glutamathomöostase und die Neurotransmission (Nedergaard *et al*., 2002). Da einige mit einer Astrozytenseneszenz einhergehenden neurologischen Erkrankungen mit einer gestörten Glutamathomöostase vergesellschaftet sind (Costantini *et al*., 2009; Lü *et al*., 2009; Bhat *et al*., 2012), könnte vermutet werden, dass ein Verlust des astroglialen Glutamatuptakes ein charakteristisches Merkmal seneszenter Astrozyten darstellt. Diese Hypothese ist bislang jedoch nicht experimentell untersucht worden.

4.4 Einfluss von Ammoniak auf die Expression zellzyklusinhibitorischer, p53 induzierter Faktoren in kultivierten Rattenastrozyten

Die antiproliferative und seneszenzvermittelnde Wirkung von p53 kann auf die Transkription zellzyklushemmender Gene zurück zu führen sein. In der vorliegenden Arbeit

konnte gezeigt werden, dass Ammoniak Glutaminsynthese-, NADPH-Oxidase- und p38 MAP-Kinase-abhängig die Transkription Zellzyklus hemmender Faktoren wie GADD45α und p21 bewirkt. Die Hochregulation der p21 mRNA (Abbildung 29) war zudem mit einer verstärkten nukleären Akkumulation des Proteins in mit Ammoniak behandelten kultivierten Rattenastrozyten assoziiert (Abbildung 30). Diese Befunde legen nahe, dass Ammoniak den Zellzyklus hemmt und Seneszenz durch Hochregulation der zellzyklusinhibitorischen Faktoren GADD45α und p21 induziert. Die durch Ammoniak vermittelte Astrozytenproliferationshemmung war mit einer Glutaminsynthese-, NAPDH-Oxidase- und p38 MAP-Kinase abhängigen Abnahme der mRNA der die Kernmembran-konstituierenden Lamine A und B1 assoziiert (Tabelle 9). Während die Herrunterregulation von Lamin B1 ein etablierter Surrogatmarker für Seneszenz ist, (Chen *et al*., 2000; De Sandre-Giovannoli *et al*., 2003; Kuilman *et al*., 2010; Freund *et al*., 2012; Schreiber *et al*., 2013,) kann eine nukleäre Laminexpressionsstörung *per se* Seneszenz induzieren (Eriksson *et al*., 2003). Eine mutationsassoziierte Expressionsstörung nukleär exprimierter Lamine wird z.B. als ursächlich für das Hutchinson-Gilford Progeria Syndrom angenommen, welches mit Störungen der Kernmorphologie einhergeht (Dechat *et al*., 2007, Schreiber *et al*., 2013). Eine abnorme Zellkernmorphologie wurde ebenfalls in mit Ammoniak behandelten kultivierten Rattenastrozyten, in verschiedenen Tiermodellen zur HE und auch im Gehirn von Zirrhosepatienten mit hepatischer Enzephalopathie gefunden (Cavanagh *et al*., 1971, Butterworth, 2002). Interessanterweise konnte in portocaval anastomosierten Ratten, einem Tiermodell für die chronische hepatische Enzephalopathie, gezeigt werden, dass zerebrale Veränderungen der Astrozytenzellkernmorphologie mit dem Serumammoniakspiegel korreliert (Pilbeam *et al*., 1983).

Der Einfluss der verringerten Lamin A und B1 mRNA Level in mit Ammoniak behandelten Astrozyten auf die Expressionslevel der entsprechenden Proteine wurde in der gegenwärtigen Arbeit nicht untersucht. Ebenfalls offen bleibt, ob eine verringerte nukleäre Laminexpression funktional bedeutsam ist für die durch Ammoniak-induzierte Seneszenz.

4.5 Einfluss von Ammoniak auf die Wachstumsfaktorabhängige Proliferation kultivierter Rattenastrozyten

Wachstumsfaktoren wie EGF und BDNF sind hochpotente proliferationsmediierende Faktoren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ammoniak die EGF- und

BDNF-abhängige Proliferation kultivierter Rattenastrozyten vollständig unterdrückt (Abbildung 34 und 39). Dieser Effekt war mit einer Glutaminsynthese-abhängigen Herrunterregulation der Rezeptoren für EGF und BDNF (TrkB) assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation des TrkB auf einer durch Ammoniak vermittelten Glykosylierungsstörung des TrkB beruht.

Sowohl für EGF, als auch für BDNF konnte gezeigt werden, dass die Hemmung ihrer proliferationsinduzierenden Wirkung in mit Ammoniak behandelten Astrozyten vollständig verhindert werden konnte durch Hemmstoffe der Glutaminsynthetase, der NADPH-Oxidase und der p38 MAP-Kinase (Abbildung 34 und 39). Diese Ergebnisse sind kongruent zur Aufhebung der proliferationshemmenden Wirkung von Ammoniak durch Inhibition der Glutaminsynthetase, der NADPH-Oxidase und der p38 (Abbildung 18).

Neben proliferationsfördernden Effekten vermitteln Wachstumsfaktoren auch funktional bedeutsame morphologische Veränderung von Zellen, die assoziiert sind mit einer Reorganisation des Zytoskeletts (Ohira *et al*., 2007). So konnte gezeigt werden, dass von Neuronen an aktiven Synapsen freigesetztes BDNF die Morphologie benachbarter Astrozyten moduliert, und diese Veränderungen die Synapsen stabilisieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung kultivierter Astrozyten mit BDNF die Bildung feiner Zytoplasmaausläufer induziert und dies assoziiert ist mit der Polymerisation von Aktin. Die Hemmung der TrkB-Glykosylierung in Ammoniak- oder Tunicamycin-behandelten Astrozyten hob diesen Effekt auf. Diese Ergebnisse weisen einerseits auf die funktionale Bedeutung der TrkB-Glykosylierung hin und lassen gleichzeitig vermuten, dass die Hemmung der durch BDNF-vermittelten morphologischen Plastizität Ammoniak-behandelter Astrozyten einhergehen könnte mit einer verminderten Stabilität von Synapsen bei HE. Diese Hypothese wird gestützt durch Befunde aus der Literatur, die eine verringerte Spinedichte im zerebralen Kortex in einem Tiermodel zur hepatischen Enzephalopathie zeigen, die assoziiert war mit einer Beeinträchtigung kognitiver Funktionen (Ohira *et al*., 2007, Chen *et al*., 2014).

4.6 Zusammenfassung: Mechanismen der ammoniakvermittelten Astrozytenseneszenz in kultivierten Rattenmechanismen

Die durch Ammoniak vermittelte, glutaminsyntheseabhängige Bildung von oxidativem Stress aktiviert die MAP-Kinase p38 welche den Transkriptionsfaktor p53 phosphoryliert und dadurch eine nukleäre Akkumulation und DNA-Bindung von p53 vermittelt. p53 initiiert nachfolgend die Transkription zellzyklusinhibitorischer Gene wie p21 und GADD45α. Die Proteinprodukte dieser Gene arretieren den Zellzyklus durch Hemmung von den Zellzyklus steuernden Kinasen (CDK1, 2). Gleichzeitig inhibiert Ammoniak die durch EGF und BDNF vermittelte Astrozytenproliferation durch Herrunterregulation der entsprechenden Rezeptoren EGFR und TrkB (Abbildung 43).

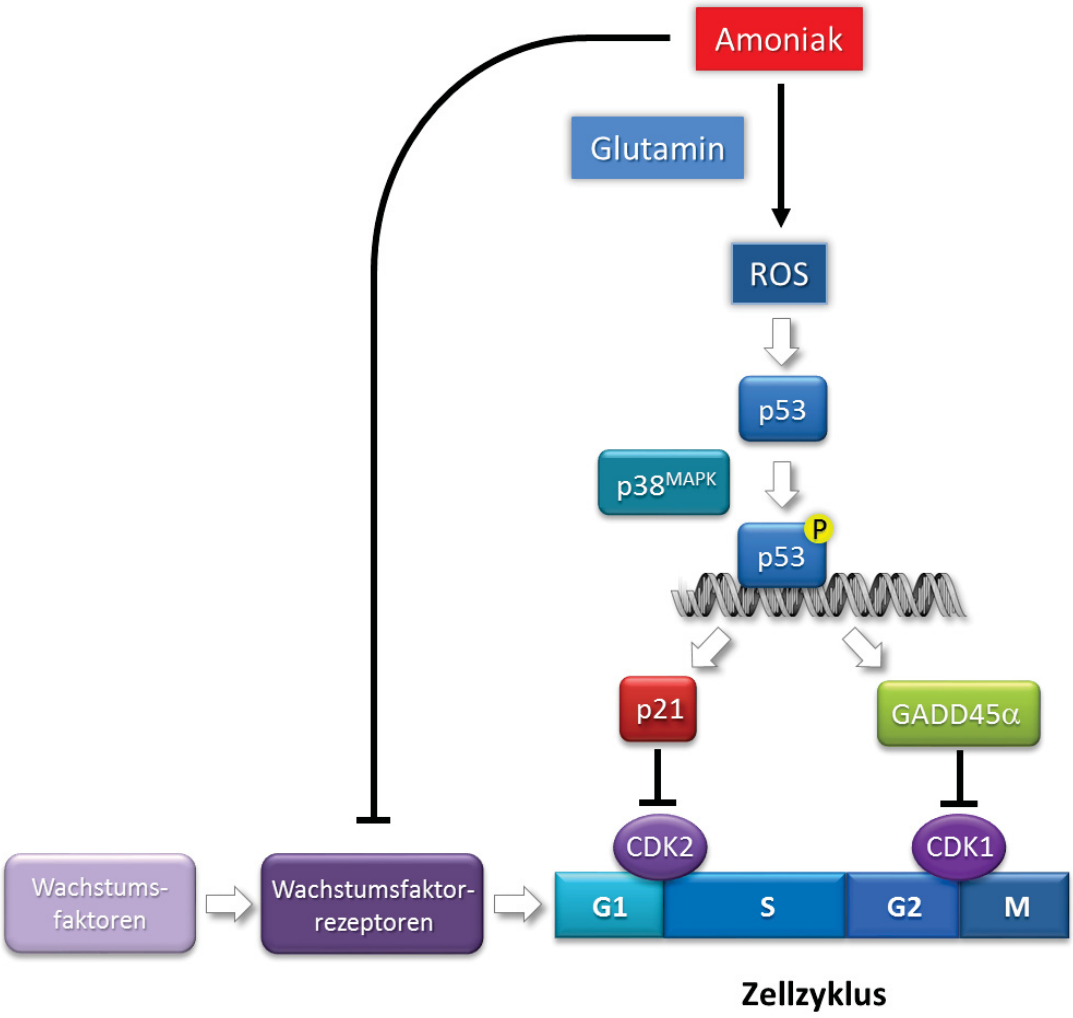


Abb. 43: Mechanismen der durch Ammoniak induzierten Seneszenz in kultivierten Rattenastrozyten (Entnommen aus Görg *et al.*, 2014).

4.7 *In vivo* Relevanz

Die in der vorliegenden Arbeit an Zellkulturen erhobenen Befunde wurden an *post mortem* Hirnbiopsien von Kontrollpatienten und Zirrhosepatienten mit oder ohne hepatischer Enzephalopathie überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA Expressionslevel der mit Seneszenz-assoziierten Gene GADD45α, p21 und des Tumorsuppressorproteins p53 in *post mortem* Hirngewebe aus dem Gyrus fusiforme von Zirrhosepatienten mit HE aber nicht von Zirrhosepatienten ohne HE signifkant erhöht sind (Abbildung 40A-C). In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikante lineare Korrelation zwischen den mRNA Expressionsniveaus von p53 und GADD45α gefunden (Abbildung 41). Da die Transkription von GADD45α p53 vermittelt erfolgt, könnte die Korrelation der p53 und GADD45α mRNA Expressionslevel auf eine verstärkte transkriptorische Aktivität von p53 hindeuten. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass das p53 Proteinexpressionsniveau in den humanen *post mortem* Hirnproben nicht weitergehend untersucht wurde.

Ein erhöhtes Genexpressionsniveau konnte für p53 und GADD45α mittels Genchipanalyse in *post mortem* Hirnproben von Zirrhosepatienten mit HE in einer weiteren, unabhängigen Patientenkohorte nachgewiesen werden (Abbildung 42). Bei dieser Kohorte wurden Hirnproben aus dem Parietal/Okzipitallappen des zerebralen Kortex untersucht.

Prinzipiell kann nicht ausgeschlossen werden, dass die therapeutische Behandlung der Patienten und/oder Begleiterkrankungen einen Einfluss haben könnten auf Genexpressionsveränderungen im Gehirn von Zirrhosepatienten mit hepatischer Enzephalopathie verglichen mit Kontrollpatienten, die keine neurologischen Erkrankungen oder Erkrankungen der Leber aufwiesen. Die individuelle Therapie der Patienten, die deutlichen Unterschiede in der Genexpression von Zirrhosepatienten mit und ohne HE, sowie die Konsistenz der in der Arbeit gefundenen Genexpressionsänderungen bei der vergleichsweise hohen Fallzahl sprechen aber gegen die Annahme, dass Begleiterkrankungen bzw. die Therapie der Patienten selber im Zusammenhang mit den Beobachtungen stehen.

Obwohl die Pathophysiologie der hepatischen Enzephalopathie prinzipiell reversibel ist, zeigen neuere Arbeiten, dass Kognitionsverluste bei Patienten mit hepatischer Enzephalopathie nach Auflösung akuter HE-Episoden partiell persistieren können (Bajaj *et*

al., 2010; Riggio *et al*., 2011). Diese dauerhafte Beeinträchtigung von Kognition und Gedächtnisleistung ist insbesondere mit neurodegenerativen Erkrankheiten assoziiert, bei denen Neurone in Folge inflammatorischer Prozesse degenerieren.

Im Gegensatz zu diesen Hirnerkrankungen existieren bislang jedoch keine Hinweise auf neurodegenerative Prozesse im Gehirn von Leberzirrhosepatienten mit hepatischer Enzephalopathie. Die Hochregulation anti-inflammatorischer Faktoren im Gehirn von Zirrhosepatienten mit HE (Görg *et al*., 2013) spricht außerdem gegen kognitive Beeinträchtigungen bei hepatischer Enzephalopathie als Folge inflammatorisch-vermittelter neuronaler Degeneration.

Die gestörte Neurotransmission bei der HE wird als Folge einer primären Funktionsstörung der Astrozyten angesehen, durch welche die astroglial/neuronale Kommunikation gestört wird und in der Folge oszillatorische Netzwerke im Gehirn derangieren (Häussinger *et al*., 2007, 2010; Butz *et al*., 2013). Tatsächlich verringert Astrozytenseneszenz *per se* die Neurotransmission (Kawano *et al*., 2012) und kürzlich gelang es in einem Tiermodel zur hepatischen Enzephalopathie eine veringerte Synapsendichte nachzuweisen (Chen *et al*., 2014).

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Reversibilität der Astrozytenseneszenz nach Wegnahme des Ammoniaks könnte im Gehirn zwar mit einer Normalisierung der Astrozytenfunktion einhergehen, aber gleichzeitig begleitet werden von persistierenden strukturellen Veränderungen des neuronalen Netzwerkes.

Ob die persistierende Beeinträchtigung kognitiver Funktionen bei HE alleinig auf einer Astrozytenseneszenz beruht, oder auch andere Zelltypen von Seneszenz betroffen sind, ist derzeitig unbekannt. Für diese Vermutung spräche, dass die ammoniakinduzierte Seneszenz Glutaminsynthese-abhängig verläuft, und die Glutaminsynthetase im Gehirn präferentiell in Astrozyten lokalisiert ist. Darüber hinaus konnte kürzlich in *post mortem* Hirnproben von Zirrhosepatienten mit HE proliferierende Mikroglia nachgewiesen werden. Gegen die Hypothese, dass Astrozyten die einzigen Zellen sind, die bei HE seneszent werden, spricht allerdings, dass oxidativer Stress, welcher als Seneszenz-mediierender Faktor in der vorliegenden Arbeit identifiziert wurde, auch in Neuronen im Gehirn von HE-Tiermodellen gefunden wird (Dennis *et al*., 2013). Die Aufklärung der bei hepatischer Enzephalopathie von Seneszenz betroffenen Zelltypen bedarf daher weitergehender Untersuchungen.

4.8 Ausblick

Die vorliegende Arbeit weist in Übereinstimmung mit zahlreichen Publikationen verschiedener Arbeitsgruppen oxidativem Stress eine wichtige Rolle in der Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie zu. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Bildung von oxidativem Stress bei hepatischer Enzephalopathie mit Seneszenz assoziiert ist. Da prinzipiell vermutet werden kann, dass die funktionalen Konsequenzen der Seneszenz vielfältig und auch zelltypspezifisch sind, bedarf es weiterführender Untersuchungen, die die Zelltypspezifität von Seneszenz bei HE und den Zusammenhang zwischen Astrozytenseneszenz und neuronalen Funktionsstörungen bei HE belegen.

5. Zusammenfassung

Die hepatische Enzephalopathie (HE) ist ein neuropsychiatrisches Syndrom, welches häufig im Gefolge eines akuten oder chronischen Leberversagens auftritt. Sie ist Folge einer Hydratationsstörung der Astrozyten und der Ausbildung eines geringgradigen zerebralen Ödems, welches eng assoziiert ist mit der Bildung von oxidativem/nitrosativem Stress.

Astrozyten nehmen eine zentrale Role in der Pathogenese der HE ein und neuere Arbeiten lassen vermuten, dass die Beeinträchtigung kognitiver Funktionen bei Zirrhosepatienten nach Auflösung einer manifesten HE nicht vollständig reversibel sein können.Da Astrozytenseneszenz bekanntermaßen mit lang anhaltenden Beeinträchtigungen von Neurotransmission und synaptischer Plastizität assoziiert ist, wurde in der vorliegenden Dissertation untersucht, ob die HE mit Astrozytenseneszenz assoziiert ist.

Die Charakterisierung von Seneszenz erfolgte durch Analyse etablierter Biomarker in mit Ammoniumchlorid stimulierten, kultivierten Rattenastrozyten und in *post mortem* Hirnbiopsien von Kontrollpatienten und Leberzirrhosepatienten mit oder ohne HE.

Die Behandlung mit NH_4Cl inhibierte die Astrozytenproliferation zeit- und konzentrationsabhängig um bis zu 45% (5mmol/l, 72 Stunden) verglichen mit unbehandelten Kontrollen. Gleichzeitig wurde eine deutliche Steigerung der Aktivität der mit Seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase in mit NH_4Cl (5mmol/l, 72 Stunden)-behandelten Astrozyten gemessen. Die Hemmung der Astrozytenproliferation durch Ammoniak ging einher mit einer verstärkten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, der Phosphorylierung und nukleären Akkumulation des Tumorsuppressorproteis p53 und einer verstärkten Transkription der zellzyklusinhibitorischen Gene GADD45α und p21 sowie einer Expressionssteigerung und nukleären Akkumulation des p21 Proteins.

Die Ammoniak-vermittelte Aktivierung von p53, die Expressionssteigerung der GADD45α und p21 mRNA und die Astrozytenproliferationshemmung waren sensitiv gegenüber einer Hemmung der Glutaminsynthetase, NADPH-Oxidase und $p38^{MAP}$ Kinase.

Die Behandlung kultivierter Astrozyten mit NH_4Cl (5mmol/l) verminderte die Proteinexpressionslevel der Rezeptoren, die den *epidermal growth factor* (EGF)- und *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) binden und hemmte gleichzeitig Glutaminsynthese-,

NADPH-oxidase- und p38-vermittelt die durch EGF und BDNF-induzierbare Astrozytenproliferation.

Erhöhte mRNA Expressionslevel der Seneszenz-assoziierten Gene GADD45α, p21 und p53 wurden in *post mortem* Hirnbiopsien von Leberzirrhosepatienten mit HE aber nicht in Zirrhosepatienten ohne HE gefunden.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die HE assoziiert ist mit Astrozytenseneszenz.

6. Summary

Hepatic encephalopathy (HE) is a frequent complication of liver cirrhosis and is due to a low grade cerebral edema associated with oxidative/nitrosative stress. Recent reports suggest that cognitive impairment in cirrhotic patients may not resolve completely after an attack of manifest HE. Since astrocyte dysfunction is central to the pathogenesis of HE and astrocytes are critically involved in synaptic plasticity, we tested for sustained impairment of astrocyte function by analysing expression levels of senescence biomarkers in ammonia-treated cultured rat astrocytes and in *post mortem* brain samples from cirrhotic patients with or without HE.

NH_4Cl time- and dose-dependently inhibited proliferation of cultured astrocytes by up to 45% (5mmol/l, 72h) and strongly increased senescence-associated β-galactosidase activity. Inhibition of astrocyte proliferation by ammonia was mediated by a methionine sulfoximine, oxidative stress- and $p38^{MAPK}$-dependent activation of p53 associated with enhanced transcription of cell cycle inhibitory genes GADD45α and p21. Mitochondria and the nucleus were identified as sources of oxygen radical formation after prolonged NH_4Cl exposure. Concurrently, NH_4Cl (5mmol/l)-treatment inhibited both, *epidermal growth factor* (EGF)- and *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF)-induced proliferation as well as BDNF-mediated astrocyte morphology changes through downregulation of the respective growth factor receptors EGFR and $TrkB_T$. Increased mRNA expression levels of senescence-associated genes were also found in *post mortem* brain samples from patients with liver cirrhosis with HE but not in those without HE.

The data suggest that ammonia toxicity and HE are associated with premature astrocyte senescence which may impair neurotransmission and contribute to persistence of cognitive disturbances after resolution of episodes of overt HE.

7. Literaturverzeichnis

Ahboucha, S.; Desjardins, P.; Chatauret, N.; Butterworth, R.F. (2002): Induction of "peripheral-type" benzodiazepine receptor expression and neurosteroid production in brain in liver failure. J Neurochem 81: 14, E.

Ahboucha, S.; Pomier-Layrargues, G.; Butterworth, R.F. (2004): Increased brain concentrations of endogenous (non-benzodiazepine) GABA-A receptor ligands in human hepatic encephalopathy. In: Metab Brain Dis 19 (3-4), S. 241–251.

Albrecht, J.; Norenberg; M.D. (2006): Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. In: Hepatology 44 (4), S. 788–794.

Amodio, P.; Gatta, A. (2005): Neurophysiological investigation of hepatic encephalopathy. In: Metab Brain Dis 20 (4), S. 369–379.

Armanini, M.P.; McMahon, S.B.; Sutherland, J.; Shelton, D.L.; Phillips, H.S. (1995): Truncated and catalytic isoforms of trkB are co-expressed in neurons of rat and mouse CNS. Eur J Neurosci 7:1403–1409.

Auld, D.S.; Robitaille, R. (2003): Glial Cells and Neurotransmission: An Inclusive View of Synaptic Function. Neuron 40:389–400.

Aylon, Y.; Oren, M. (2007): Living with p53, dying of p53. Cell 130:597-600.

Bai, G.; Rama Rao, K.V.; Murthy, C.R.; Panickar, K.S.; Jayakumar, A.R.; Norenberg, M.D. (2001): Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rat astrocytes. J Neurosci Res 66: 981–991.

Bajaj, J.S.; Schubert, C.M.; Heuman, D.M.; Wade, J.B.; Gibson, D.P.; Topaz, A.; Saeian, K.; Hafeezullah, M.; Bell, D.E.; Sterling, R.K.; Stravitz, R.T.; Luketic, V.; White, M.B.; Sanyal, A.J.

(2010): Persistence of cognitive impairment after resolution of overt hepatic encephalopathy. Gastroenterology 138:2332–2340.

Barak, Y.; Juven, T.; Haffner, R.; Oren, M. (1993): Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. Embo J 12:461–468.

Barde, Y.A. (1990): The nerve growth factor family. Prog Growth Factor Res 2:237–248.

Barde, Y.A.; Edgar, D.; Thoenen, H. (1982): Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. In:The EMBO Journal 1 (5), S. 549–553.

Bargonetti, J.; Manfredi, J.J. (2002): Multiple roles of the tumor suppressor p53. Curr Opin Oncol 14:86–91.

Barres, B.A.; Raff, M.C. (1999): Axonal control of oligodendrocyte development J. Cell Biol 147:1123–1128.

Baxter, G,T.; Radeke, M.J.; Kuo, R.C.; Makrides, V.; Hinkle, B.; Hoang, R.; Medina-Selby, A.; Coit, D.; Valenzuela, P.; Feinstein, S.C. (1997): Signal Transduction Mediated by the Truncated trkB Receptor Isoforms, trkB.T1 and trkB.T2. J Neurosci 17:2683–2690.

Becker, E.; Rosa, M.; Soler, V.; Yuste, J.;Giné, E.; Sanz-Rodrı´guez; C.S.; Egea, J.; Martı´n-Zanca, D.; Comella, J. (1998): Development of survival responsiveness to brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin 3 and neurotrophin 4/5, but not to Nerve Growth Factor, in cultured motoneurons from chick embryo spinal cord. J Neurosci 18:7903–7911.

Bekinschtein, P.; Cammarota, M.; Medina, J.H. (2013) BDNF and memory processing. Neuropharmacology 76:677-83.

Bender, A.S.; Norenberg, M.D. (1998): Effect of benzodiazepines and neurosteroids on ammonia-induced swelling in cultured astrocytes. In: J Neurosci Res 54, S. 673–680.

Benson, E.K.; Lee, S.W.; Aaronson, S.A. (2010): Role of progerin-induced telomere dysfunction in HGPS premature cellular senescence. Journal of Cell Science 123:2605-2612.

Bergami, M.; Santi, S.; Formaggio, E.; Cagnoli, C.; Verderio, C.; Blum, R.; Berninger, B.; Matteoli, M.; Canossa, M. (2008): Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes. JCB 183:213-221.

Bhat, R.; Crowe, E.P.; Bitto, A.; Moh, M.; Katsetos, C.D.; Garcia F.U.; Johnson, F.B.; Trojanowski, J.Q.; Sell, C.; Torres, C. (2012): Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. PLoS One 7:e45069.

Bibel, M.; Barde, Y.A. (2000): Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the Vertebrate nervous system. Genes Dev 14: 2919–2937.

Blackburn, E.H. (1991): Structure and function of telomeres. Nature 350(6319): 569–573.

Blangy, A.; Lane, H.A.; d'Herin, P.; Harper, M.; Kress, M.; Nigg, E.A. (1995): Phosphorylation byp34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. Cell 83:1159–1169.

Bond, J.; Jones, C.; Haughton, M.; DeMicco, C.; Kipling, D.; Wynford-Thomas, D. (2004): Direct evidence from siRNA-directed "knock down" that p16(INK4a) is required for human fibroblast senescence and for limiting ras-induced epithelial cell proliferation. Exp Cell Res 292:151–156.

Booher, J.; Sensenbrenner, M. (1972): Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. Neurobiology 2(3):97–105.

Butterworth, R.F.; Giguère, J.F.; Michaud, J.; Lavoie, J.; Layrargues, G.P. (1987): Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. Neurochem Pathol (1-2):1-12.

Butterworth, R.F. (2002): Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. Metab Brain Dis 17:221–227.

Butterworth, R.F. (2007): Neuronal cell death in hepatic encephalopathy. In: Metab Brain Dis 22 (3-4), S. 309–320.

Butz, M.; May, E.S.; Häussinger, D.; Schnitzler, A. (2013): The slowed brain: cortical oscillatory activity in hepatic encephalopathy. Arch Biochem Biophys 536:197–203.

Cagnin, A.; Taylor-Robinson, S.D.; Forton, D.M.; BanatiIn, R.B (2001): In vivo quantification of cerebral 'peripheral benzodiazepine binding site' in minimal hepatic encephalopathy: a [11C]R-PK11195 positron emission tomography study. J Hepatol 34:334la

Campisi, J.; d'Adda di Fagagna, F. (2007): Cellular senescence: when bad things happen to good cells. Nat Rev Mol Cell Biol 8:729–740.

Campisi, J.; Vijg, J. (2009): Does damage to DNA and other macromolecules play a role in aging? If so, how? J Gerontol A Biol Sci Med Sci 64:175–178.

Canepa, E.T.; Scassa, M.E.; Ceruti, J.M.; Marazita, M.C.; Carcagno, A.L.; Sirkin, P.F.; Ogara, M.F. (2007): INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. IUBMB Life 59:419–426.

Carnero, A.; Hannon, G.J. (1998): The INK4 family of CDK inhibitors. Curr Top Microbiol Immunol 227:43–55.

Cavanagh, J.B.; Kyu, M.H. (1971): Type II Alzheimer change experimentally produced in astrocytes in the rat. J Neurol Sci 12:63–75.

Cayrol, C.; Knibiehler, M.; Ducommun, B. (1998): p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. Oncogene 16:31-320.

Center, S.A.; Magne, M.L. (1990): Historical, physical examination, and clinicopathologic features of portosystemic vascular anomalies in the dog and cat. In: Semin Vet Med Surg Small Anim 5 (2), S. 83–93.

Chao, M.V.; Bothwell, M. (2002): Neurotrophins: To Cleave or Not to Cleave. Minireview. In: Neuron 33, S. 9–12.

Chellappan, S.P.; Giordano, A;, Fisher, P.B. (1998): Role of cyclin-dependent kinases and their inhibitors in cellular differentiation and development. Curr Top Microbiol Immunol 227:57-103.

Chen, Q.M. (2000): Replicative senescence and oxidant-induced premature senescence. Beyond the control of cell cycle checkpoints. Ann N Y Acad Sci 908:111–125.

Chen, Z.; Gibson, T.B.; Robinson, F.; Silvestro, L.; Pearson, G.; Xu, B.; Wright, A.; Vanderbilt, C.; Cobb, M.H. (2001): MAP kinases. Chem Rev 101: 2449-2476.

Chen, P.; Hutter, D.; Yang, X.; Gorospe, M.; Davis, R. J.; Liu, Y. (2001): Discordance between the binding affinity of mitogen-activated protein kinase subfamily members for MAP kinase phosphatase-2 and their ability to activate the phosphatase catalytically. J Biol Chem 276:29440–29449.

Chen, J.R.; Wang, B.N.; Tseng, G.F.; Wang, Y.J.; Huang, Y.S.; Wang, T.J. (2014): Morphological changes of cortical pyramidal neurons in hepatic encephalopathy. BMC Neurosci 15:15.

Chène, P. (2001): The role of tetramerization in p53 function. Oncogene 20:2611-2617.

Cheng, D.; Zhao, L.; Zhang, L.; Jiang, Y.; Tian, Y.; Xiao, X.; Gong, G. (2013): p53 controls hepatitis C virus non-structural protein 5A-mediated downregulation of GADD45α expression via the NF-κB and PI3K-Akt pathways. J Gen Virol 94:326–335.

Cheng, M.; Olivier, P.; Diehl, J.A.; Fero, M.; Roussel, M.F.; Roberts, J.M.; Sherr, C.J. (1999): The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. EMBO J 18:1571–1583.

Child, C.G.; Turcotte, J.G. (1964): Surgery and portal hypertension. In Child CG. *The liver and portal hypertension*. Philadelphia: Saunders, pp. 50–64.

Chipuk, J.E.; Bouchier-Hayes, L.; Kuwana, T.; Newmeyer, D.D.; Green, D.R. (2005): PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. Science 309:1732-1735.

Cholongitas, E.; Papatheodoridis, G.V.; Vangeli, M.; Terreni, N.; Patch, D.; Burroughs, A.K. (2005): Systematic review: The model for end-stage liver disease--should it replace Child-Pugh's classification for assessing prognosis in cirrhosis?. Alimentary pharmacology & therapeutics 22:1079–89.

Chu, I.M.; Hengst, L.; Slingerland, J.M. (2008): The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. Nat Rev Cancer 8:253-67.

Cohen, S. (1962): Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new born animal. J Biol Chem 237:1555–1562.

Cohen, S. (1964): Isolation and biological effects of an epidermal growth-stimulating protein. National Cancer Institute Monograph 13:13–27.

Collado, M.; Serrano, M. (2006): The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. Nat Rev Cancer 6:472–476.

Conn, H.O.; Bircher, J. (1994): Quantifying the severity of hepatic encephalopathy: syndromes and therapies. In: Conn H.O. and Bircher J., editors. Medi-ed Press: Bloomington IL, S. 373–383.

Cordoba, J.; Gottstein, J.; Blei, A.T. (1996): Glutamine, myo-inositol, and organic brain osmolytes after portocaval anastomosis in the rat: implications for ammonia-induced brain edema. Hepatology 24:919-23.

Costantini, C.; Lorenzetto, E.; Cellini, B.; Buffelli, M.; Rossi, F.; Della-Bianca, V. (2009): Astrocytes regulate the expression of insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1-R) in primary cortical neurons during in vitro senescence. J Mol Neurosci 40:342–352.

Cox, M.L.; Meek, D.W. (2010): Phosphorylation of serine 392 in p53 is a common and integral event during p53 induction by diverse stimuli. Cell Signal 22:564–571.

Davis, R.J. (1995): Transcriptional regulation by MAP kinases. Mol Reprod Dev 42:459-467.

de Lanerolle, N.C.; Lee, T.S, Spencer, D.D. (2010): Histopathology of Human Epilepsy. In: Epilepsia 51 (Suppl. 5), S. 37.

De Sandre-Giovannoli, A.; Bernard, R.; Cau, P.; Navarro, C.; Amiel, J.; Boccaccio, I.; Lyonnet, S.; Stewart, C.L.; Munnich, A.; Le Merrer, M.; Levy. N. (2003): Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. Science 300:2055.

Debacq-Chainiaux, F.; Erusalimsky, J.D.; Campisi, J.; Toussaint, O. (2009): Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-betagal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. Nat Protoc 4:1798–1806.

Dechat, T.; Shimi, T.; Adam, S.A.; Rusinol, A.E.; Andres, D.A.; Spielmann, P.; Sinensky. M.S.; Goldman, R.D. (2007): Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging. Proc Natl Acad Sci USA 104:4955–4960.

Denicourt, C.; Dowdy, S.F. (2004): Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. Genes Dev 18:851–855

Dennis, C.V.; Sheahan, P.J.; Graeber, M.B.; Sheedy, D.L.; Kril, J.J.; Sutherland, G.T. (2013): Microglial proliferation in the brain of chronic alcoholics with hepatic encephalopathy. Metab Brain Dis [Epub ahead of print].

Dimri, G.P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E.E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira-Smith, O. (1995): A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 92:9363–9367.

Dombro, R.S.; Bender, A.S.; Norenberg, M.D. (2000): Association between cell swelling and glycogen content in cultured astrocytes. In: Int J Dev Neurosci 18, S. 161–169.

Dotto, G.P. (2000): p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? Biochim Biophys Acta 1471:43–56.

Duan, J.; Zhang, Z.; Tong, T. (2005a): Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H2O2 involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. Int J Biochem Cell Biol 37:1407–1420.

Duan, Z.; Zarebski, A.; Montoya-Durango, D.; Grimes, H.L.; Horwitz, M. (2005b): Gfi1 coordinates epigenetic repression of p21Cip/WAF1 by recruitment of histone lysine methyltransferase G9a and histone deacetylase 1. Mol Cell Biol 25:10338–10351.

Dumaz, N.; Meek, D.W. (1999):Serine 15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. In: Embo J, pp 6867-7085.

Dynlacht, B.D.; Ngwu, C.; Winston, J.; Swindell, E.C.; Elledge, S.J.; Harlow, E.; Harper, J.W. (1997): Purification and analysis of CIP/KIP proteins. Methods Enzymol 283:230–244.

Eide, F.F.; Vining, E.R.; Eide, B.L.; Zang, K.; Wang, X.Y.; Reichardt, L.F. (1996): Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. J Neurosci 16:3123–3129.

Ekholm, S.V.; Reed, S.I. (2000): Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. Current Opinion in Cell Biology 12:676–684.

el-Deiry, W.S.; Kern, S.E.; Pietenpol, J.A.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. (1992): Definition of a consensus binding site for p53. Nat Genet 1:45–49.

el-Deiry, W.S.; Tokino, T.; Velculescu, V.E.; Levy, D.B.; Parsons, R.; Trent, J.M.; Lin, D.; Mercer, W.E.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 75:817–825.

Eriksson, M.; Brown, W.T.; Gordon, L.B.; Glynn, M.W.; Singer, J.; Scott, L.; Erdos, M.R.; Robbins, C.M.; Moses, T.Y.; Berglund, P.; Dutra, A.; Pak, E.; Durkin, S.; Csoka, A.B.; Boehnke, M.; Glover, T.W.; Collins, F.S (2003): Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. Nature 423:293–298.

Ferenci, P.; Lockwood, A.; Mullen, K.; Tarter, R.; Weissenborn, K.; Blei, A.T. (2002): Hepatic encephalopathy-definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of theworking party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. Hepatology 35:716–721.

Fields, R.D.; Stevens-Graham, B. (2002): New insights into neuron-glia communication Science 298: S.556–562.

Fields, S.; Jang, S.K. (1990): Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. Science 249:1046–1049.

Freund, A.; Laberge, R.M.; Demaria, M.; Campisi, M. (2012): Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. Mol Biol Cell 23: 2066–2075.

Furini, C.R.; Rossato, J.I.; Bitencourt, L.L.; Medina, J.H.; Izquierdo, I.; Cammarota M. (2009): Beta-adrenergic receptors link NO/sGC/PKG signaling to BDNF expression during the consolidation of object recognition long-term memory. Hippocampus 20:672–683.

Gadde, S.; Heald, R. (2004): Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. Curr Biol 14:R797–805.

Gartel, A.L.; Tyner, A.L. (1999): Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. Exp Cell Res 246:280–289.

Gary, R.K.; Jensen, D.A. (2005): The p53 inhibitor pifithrin-alpha forms a sparingly soluble derivative via intramolecular cyclization under physiological conditions. Mol Pharm 2:462–474.

Geng, Y.; Walls, K.C.; Ghosh, A.P.; Akhtar, R.S.; Klocke, B.J.; Roth, K.A. (2010): Cytoplasmic p53 and Activated Bax Regulate p53-dependent, Transcription-independent Neural Precursor Cell Apoptosis. J Histochem Cytochem 58:265–275.

Gerber, T.; Schomerus, H. (2000): Hepatic encephalopathy in liver cirrhosis: pathogenesis, diagnosis and management. In: Drugs 60 (6), S. 1353–1370.

Gerdes, J.; Schwab, U.; Lemke, H.; Stein, H. (1983): Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer 31:13–20.

Gerok, W.; Blum, H.E.; Offensperger, W.; Offensperger, S.; Andus, T.; Gross, V.; Heinrich, P.C. (1991): Hepatologie. Neuere Forschungsergebnisse in ihrer Bedeutung für das Verständnis von Leberkrankheiten. In: Naturwissenschaften 78, S. 241–249.

Giatzakis, C.; Papadopoulos, V. (2004): Differential utilization of the promoter of peripheral-type benzodiazepine receptor by steroidogenic versus nonsteroidogenic cell lines and the role of Sp1 and Sp3 in the regulation of basal activity. In: Endocrinology 145, S. 1113–1123.

Gilbert, S.F. (2000): Developmental Biology, 10th ed. Sunderland, MA USA: Sinauer Associates, Inc. Publishers, S. 588.

Gillespie, L.N.; Shepherd R.K. (2005): Clinical application of neurotrophic factors: the potential for primary auditory neuron protection. Eur J Neurosci 22:2123–2133.

Goldstein, S. (1990): Replicative senescence: The human broblast comes of age. In: Science 249, S. 1129–1133.

Goligorsky, M.S.; Chen, J.; Patschan, S. (2009): Stress-induced premature senescence of endothelial cells: a perilous state between recovery and point of no return. Curr Opin Hematol 16:215–219.

Görg, B.; Foster, N.; Reinehr, R.; Bidmon, H.J.; Höngen, A.; Häussinger, D.; Schliess, F. (2003): Benzodiazepine-induced protein tyrosine nitration in rat astrocytes. In: Hepatology 37, S. 334–342.

Görg, B.; Bidmon, H.J.; Keitel, V.; Foster, N.; Goerlich, R.; Schliess, F.; Häussinger, D. (2006): Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes. In: Arch Biochem Biophys 449, S. 104–114.

Görg, B.; Qvartskhava, N.; Voss, P.; Grune, T.; Häussinger, D.; Schliess, F. (2007): Reversible inhibition of mammalian glutamine synthetase by tyrosine nitration. In: FEBS Lett 581, S. 84-90.

Görg, B.; Qvartskhava, N.; Keitel, V.; Bidmon, H.J.; Selbach, O.; Schliess, F. (2008): Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo. Hepatology 48:567–579.

Görg, B.; Morwinsky, A.; Keitel, V.; Qvartskhava, N.; Schrör, K.; Häussinger, D. (2010a): Ammonia triggers exocytotic release of L-glutamate from cultured rat astrocytes. Glia 58:691–705.

Görg, B.; Qvartskhava, N.; Bidmon, H.J.; Palomero-Gallagher, N.; Kircheis, G.; Zilles, K.; Häussinger, D. (2010b): Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. Hepatology 52:256–265.

Görg, B.; Bidmon, H.J; Häussinger, D. (2013): Gene expression profiling in the cerebral cortex of patients with cirrhosis with and without hepatic encephalopathy. Hepatology 57:2436–2447.

Görg, B.; Karababa, A.; Shafigullina, A.; Bidmon, H.J.; Häussinger, D. (2014): Ammonia-induced senescence in cultured rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. Glia 2014.

Gulbis, J.M.; Kelman, Z.; Hurwitz, J.; O'Donnell, M.; Kuriyan, J. (1996): Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. Cell 87:297-306.

Hahn, W.C.; Stewart, S.A.; Brooks, M.W.; York, S.G.; Eaton, E.; Kurachi, A.; Beijersbergen, R.L.; Knoll, J.H.; Meyerson, M.; Weinberg, R.A. (1999): Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. Nat Med 5:1164–1170.

Han, J.; Lee, J.D.; Bibbs, L.; Ulevitch, R.J. (1994): A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. Science 265:808-811.

Harper, J.W.; Adami, G.R.; Wie, N.; Keyomarsi. K.; Elledge, S.J. (1993): The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 75:805–816.

Häussinger, D. (1983): Hepatocyte heterogeneity in glutamine and ammonia metabolism and the role of an intercellular glutamine cycle during ureogenesis in perfused rat liver. In: Eur J Biochem 133, S. 269–275.

Häussinger, D.; Gerok, W. (1984): Hepatocyte heterogeneity in ammonia metabolism: impairment of glutamine synthesis in CCl4 induced liver cell necrosis with no effect on urea synthesis. In: Chem Biol Interact 48, S. 191–194.

Häussinger, D.; Laubenberger, J.; Vom Dahl, S.; Ernst, T.; Bayer, S.; Langer, M.; Gerok, W.; Hennig, J. (1994a): Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. Gastroenterology 107:1475–1480.

Häussinger, D.; Stoll, B.; Vom Dahl, S.; Theodoropoulos, P. A.; Markogiannakis, E.; Gravanis, A.; Lang, F.; Stournaras, C. (1994b): Effect of hepatocyte swelling on microtubule stability and tubulin mRNA levels. In: Biochem. Cell Biol 72, S. 12–19.

Häussinger, D.; Warskulat, U.; Schliess, F. (1997): Osmosignalling and osmolytes in liver and astrocytes. Adv Exp Med Biol 420:195–215.

Häussinger, D.; Kircheis, G.; Fischer, R.; Schliess, F.; Vom Dahl, S. (2000): Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? In: J Hepatol 32, S. 1035–1038.

Häussinger, D.; Kircheis, G. (2002): Hepatische Enzephalopathie. In: Praxis (Bern 1994) 91 (22), S. 957–963.

Häussinger, D.; Görg, B.; Reinehr, R.; Schliess, F. (2005a): Protein tyrosine nitration in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. In: Metab Brain Dis 20, S. 285–294.

Häussinger, D.; Schliess, F. (2005b): Astrocyte swelling and protein tyrosine nitration in hepatic encephalopathy. In: Neurochem Int 47, S. 64–70.

Häussinger, D. (2006): Hepatische Enzephalopathie. In Praxis (Bern 1994) 95, S. 1543–1549.

Häussinger, D. (2006): Low grade cerebral edema and the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. Hepatology 43:1187-90.

Häussinger, D.; Blei, A.T. (2007): Hepatic Encephalopathy. In: Rodes J., Benhamou J.P., Blei A.T., Reichen J., Rizzetto M., editors. Textbook of Hepatology. Oxford, S. 728–760.

Häussinger, D.; Schliess, F. (2008): Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. In: Gut 57, S. 1156–1165.

Häussinger, D.; Görg, B. (2010): Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 13:87–92.

Häussinger, D.; Reinehr, R. (2011): Osmotic regulation of bile acid transport, apoptosis and proliferation in rat liver. Cell Physiol Biochem 28:1089-1098.

Hayflick, L.; Moorhead, P.S. (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res 25:585–621.

Hayflick, L. (1965): The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. Exp Cell Res 37:614–636.

Hazell, A.S. und Butterworth, R.F. (1999): Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanisms. In: Proc Soc Exp Biol Med 222, S. 99–112.

Heid, C.A.; Stevens, J.; Livak, K.J.; Williams, P.M. (1996): Real time quantitative PCR. Genome Res 6:986–994.

Heller, S.; Ernsberger, U.; Rohrer, H. (1996): Extrinsic signals in the developingnervous system: the role of neurokines during neurogenesis. Perspect Dev Neurobiol 4:19–34.

Hengst, L.; Reed, S.I. (1998): Inhibitors of the Cip/Kip family. Curr Top Microbiol Immunol 227:25–41.

Herbig, U.; Jobling, W.A.; Chen, B.P.; Chen, D.J.; Sedivy, J.M. (2004): Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1),but not p16(INK4a). In: Molecular cell 4, S. 501–513.

Hoffman, B.; Liebermann, D.A. (2007): Role of gadd45 in myeloid cells in response to hematopoietic stress. Blood Cells Mol Dis 39:344–347.

Hollander, M.C.; Alamo, I.; Jackman, J.; Wang, M.G.; McBride, O.W.; Fornace, A.J. (1993): Analysis of the mammalian gadd45 gene and its response to DNA damage. J Biol Chem 268:24385–24393.

Huang, L.; Wu, Z.B.; Zhuge, Q.; Zheng, W.; Shao, B.; Wang, B.; Sun, F.; Jin, K. (2014): Glial scar formation occurs in the human brain after ischemic stroke. Int J Med Sci 11:344–348.

Ilkanizadeh, S.; Lau, J.; Huang, M.; Foster, D.J.; Wong, R.; Frantz, A.; Wang, S.; Weiss, W.A.; Persson, A.I. (2014): Glial progenitors as targets for transformation in glioma. Adv Cancer Res 121:1–65.

Ip, N.Y.; Li, Y.; Yancopoulos, G.D.; Lindsay, R.M. (1993): Cultured hippocampal neurons show responses to BDNF, NT- 3, and NT-4, but not NGF. J Neurosci 13:3394–3405.

Jackson, J.G.; Pereira-Smith, O.M. (2006): p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts. Cancer Res 66:8356–8360.

Janzer, R.C.; Raff, M.C. (1987): Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. In: Nature 325, S. 253–257.

Jayakumar, A.R.; Panickar, K.S.; Murthy, Ch.R.; Norenberg, M.D. (2006): Oxidative stress and mitogen-activated protein kinase phosphorylation mediate ammonia-induced cell swelling and glutamate uptake inhibition in cultured astrocytes. J Neurosci 26:4774–4784.

Jean, Y.Y.; Lercher, L.D.; Dreyfus, C.F. (2008): Glutamate elicits release of BDNF from basal forebrain astrocytes in a process dependent on metabotropic receptors and the PLC pathway. Neuron Glia Biol 4:35–42.

Jeffrey, P.D.; Gorina, S.; Pavletich, N.P. (1995): Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. Science 267:1498–1502.

Jin, S.; Antinore, M.J.; Lung, F.D., Dong, X.; Zhao, H.; Fan, F.; Colchagie, A.B.; Blanck, P.; Roller, P.P.; Fornace, A.J.; Jr.; Zhan, Q. (2000): The GADD45 inhibition of Cdc2 kinase correlates with GADD45-mediated growth suppression. J Biol Chem 275:16602–16608.

Johnson, D.G.; Walker, C.L. (1999): Cyclins and cell cycle checkpoints. In: Annu Rev Pharmacol Toxicol 39, S. 295–312.

Johnson, G.L.; Lapadat, R. (2002): Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases. Science 298:1911–1912.

Jungbluth, S.; Bailey, K.; Bake, Y.A. (1994): Purification and characterisation of a brain-derived neurotrophic factor/ neurotrophin-3 (BDNF/NT-3) heterodimer. In: Eur J Biochem 221, S. 677–685.

Kawano, H.; Katsurabayashi, S.; Kakazu, Y.; Yamashita, Y.; Kubo, N.; Kubo, M.; Okuda, H.; Takasaki, K.; Kubota, K.; Mishima, K.; Furjiwara, M.; Harata, N.C.; Iwasaki, K. (2012): Long-term culture of astrocytes attenuates the readily releasable pool of synaptic vesicles. PLoS One 7:e48034.

Kim, H.; You, S.; Farris, J.; Foster, L.K.; Foster, D.N. (2001): Post-transcriptional inactivation of p53 in immortalized murine embryo fibroblast cells. Oncogene 20:3306-3310.

Kim, S.H.; Won, S.J.; Sohn, S.; Kwon, H.J.; Lee, J.Y.; Park, J.H.; Gwag, B.J. (2002): Brain-derived neurotrophic factor can act as a pronecrotic factor through transcriptional and translational activation of NADPH oxidase. J Cell Biol 159:821–831.

Kircheis, G.; Wettstein, M.; Timmermann, L.; Schnitzler, A.; Häussinger, D. (2002): Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopathy. Hepatology 35:357–366.

Kircheis, G.; Knoche, A.; Hilger, N.; Manhart, F.; Schnitzler, A.; Schulze, H.; Häussinger, D. (2009): Hepatic encephalopathy and fitness to drive. Gastroenterology 2009 Nov 137:1706-15.e1–9.

Kircheis, G.; Hilger, N.; Häussinger, D. (2014). Value of Critical Flicker Frequency and Psychometric Hepatic Encephalopathy Score in Diagnosis of Low-Grade Hepatic Encephalopathy. Gastroenterology 146: 961-969.

Kosenko, E.; Kaminski, Y.; Lopata, O.; Muravyov, N.; Felipo, V. (1999): Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication. Free Radic Biol Med 26:1369–1374.

Kruczek, C.; Görg, B.; Keitel, V.; Pirev, E.; Kröncke, K.D.; Schliess, F.; Häussinger, D. (2009): Hypoosmotic swelling affects zinc homeostasis in cultured rat astrocytes. Glia 57:79–92.

Kubbutat, M.H.; Jones, S.N.; Vousden, K.H. (1997): Regulation of p53 stability by Mdm2. Nature 387:299–303.

Kuilman, T.; Michaloglou, C.; Mooi, W.J.; Peeper, D.S. (2010): The essence of senescence. Genes Dev 24:2463–2479.

Lakin, N.D.; Jackson, S.P. (1999): Regulation of p53 in response to DNA damage. Oncogene 18(53):7644-7655.

Lane, P.; Crawford, L.V. (1979): T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. In: Nature Band 278, S. 261–263.

Lattanzi, G.; Marmiroli, S.; Facchini, A.; Maraldi, N.M. (2012): Nuclear damages and oxidative stress: new perspectives for laminopathies. Eur J Histochem 56: e45.

Lax, I.; Bellot, F.; Howk, R.; Ullrich, A.; Givol, D.; Schlessinger J. (1989): Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. EMBO Journal 8:421–427.

Leal, G.; Compridoa, D.; Duarte, C, B.(2014): BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. Neuropharmacology Vol 76, pp 639–656.

Lee, M.H.; Reynisdottir, I.; Massague, J. (1995): Cloning of p57KIP2, a cyclindependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. Genes Dev 9:639–649.

Liebermann, D.A.; Tront, J.S.; Sha, X.; Mukherjee, K.; Mohamed-Hadley, A.; Hoffman, B. (2011): Gadd45 Stress Sensors in Malignancy and Leukemia. Crit Rev Oncog 16:129-140.

Linskens, M.H.; Harley, C.B.; West, M.D.; Campisi, J.; Hayflick, L. (1995): Replicative senescence and cell death. Science 267:17.

Liu, Y.; Schubert, D.R. (2009): The specifity of neuroprotection by antioxidants. J Biomed Sci 16:98.

Liu, Y.C.; Yen, H.Y.; Chen, C.Y.; Chen, C.H.; Cheng, P.F.; YJuan, .H.; Chen, C.H.; Khoo, K.H.; Yu, C.J.; Yang, P.C.; Hsu, T.L.; Wong, C.H. (2011): Sialylation and fucosylation of epidermal growth factor receptor suppress its dimerization and activation in lung cancer cells. PNAS, 108: 11332–11337.

Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta Delta C(T)) Method. Methods 25:402–408.

Lu, B.; Pang, P.T.; Woo, N.H. (2005): The yin and yang of neurotrophin action. Nat Rev Neurosci 6:603–614.

Lü, L.; Mak, Y.T.; Fang, M.; Yew, D.T. (2009): The difference in gliosis induced by β-amyloid and Tau treatments in astrocyte cultures derived from senescence accelerated and normal mouse strains. Biogerontology 10:695–710.

Luo, Y.; Hurwitz, J.; Massague, J. (1995): Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. Nature 375:159–161.

Magen, I.; Avraham, Y.; Ackerman, Z.; Vorobiev, L.; Mechoulam, R.; Berry, E.M. (2009): Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in mice with bile duct ligation. J Hepatol 51:528–534.

Malumbres, M.; Barbacid, M. (2005): Mammalian cyclin-dependent kinases. Trends Biochem Sci 30:630–641.

Martens, U.M.; Chavez, E.A.; Poon, S.S.; Schmoor, C.; Lansdorp, P.M. (2000): Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. In: Exp Cell Res 256, S. 291–299.

Matsumura, T.; Zerrudo, Z.; Hayflick, L. (1979): Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. J Gerontol 34:328–334.

Matsumoto, T.; Rauskolb, S.; Polack, M.; Klose, J.; Kolbeck, R.; Korte, M.; Barde, Y.A. (2008): Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. Nat Neurosci 11:131–133.

Matthew, J.; Rushton, A. and N. (1994): Use of the CytoTox 96(TM) Assay in Routine Biocompatibility Testing In Vitro. Promega Notes Magazine 45:7.

Matthiessen, H.P.; Schmalenbach, C.; Müller, H.W. (1989): Astroglia-released neurite growth-inducing activity for embryonic hippocampal neurons is associated with laminin bound in a sulfated complex and free fibronectin. Glia 2:177–188.

McNaught, K.S.; Jenner, P. (2000): Dysfunction of rat forebrain astrocytes in culture alters cytokine and neurotrophic factor release. Neurosci Lett 285:61–65.

Mendrola, J.M.; Berger, M.B.; King, M.C.; Lemmon, M.A. (2002): The single transmembrane domains of ErbB receptors self-associate in cell membranes. J Biol Chem 277:4704–4712.

Middlemas, D.S.; Lindberg, R.A.; Hunter, T. (1991): *trk*B, A neural receptor protein-tyrosine kinase: Evidence for a full-length and two truncated receptors. Mol Cell Biol 11:143–153.

Milligan, R.A., Whittaker, M.; Safer, D. (1990): Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites. Nature 348:217–221.

Miyashita, T.; Reed, J. C. (1995): Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human Bax gene. Cell 80:293–299.

Mizuno, S.; Bogaard, H.J.; Voelkel, N.F.; Umeda, Y.; Kadowaki, M.; Ameshima, S.; Miyamori, I.; Ishizaki, T. (2009): Hypoxia regulates human lung fibroblast proliferation via p53-dependent and -independent pathways. Respir Res 10:17.

Montagnoli, A.; Fiore, F.; Eytan, E.; Carrano, A.C.; Draetta, G.F.; Hershko, A.; Pagano, M. (1999): Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. Genes Dev 13:1181–1189.

Morales, A.; Lachuer, J.; Duchamp, C.; Vera, N.; Georges, B.; Cohen-Adad, F. (1998): Tissue-specific modulation of rat glucagon receptor mRNA by thyroid status. In: Mol Cell Endocrinol 144, S. 71–81.

Mulligan, B.; Hwang, J.Y.; Kim, H.M.; Oh, J.M.; Choi, K.H.; Lee, C.K. (2012): Pro-apoptotic effect of pifithrin-α on preimplantation porcine *in vitro* fertilized embryo development. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS) 25:1681–1690.

Munoz, L.E.; Frey, B.; Pausch, F.; Baum, W.; Mueller, R.B.; Brachvogel, B.; Poschl, E.; Rodel, F.; von der Mark, K.; Herrmann, M.; Gaipl, U.S. (2007): The role of annexin A5 in the modulation of the immune response against dying and dead cells. Curr Med Chem 14:271–277.

Murthy, C.R.; Rama Rao, K.V.; Bai, G.; Norenberg, M.D. (2001): Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. In: J Neurosci Res 66, S. 282–288.

Musavi, S.; Kakkar, P. (1998): Diazepam induced early oxidative changes at the subcellular level in rat brain. In: Mol Cell Biochem 178, S. 41–46.

Nagaraja, T.N.; Brookes, N. (1998): Intracellular acidification induced by passive and active transport of ammonium ions in astrocytes. Am J Physiol 274:C883–891.

Narita, M.; Nunez, S.; Heard, E.; Lin, A.W.; Hearn, S.A.; Spector, D.L.; Hannon, G.J.; Lowe, S.W. (2003): Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. Cell 113:703–716.

Nedergaard, M.; Takano, T.; Hansen, A.J. (2002): Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. Nat Rev Neurosci 3:748–755.

Nicolao, F.; Efrati, C.; Masini, A.; Merli, M.; Attili, A.F.; Riggio, O. (2003): Role of determination of partial pressure of ammonia in cirrhotic patients with and without hepatic encephalopathy. J Hepatol 38:441-6.

Norenberg, M.D. (1981): The astrocyte in liver disease. In: Fedoroff S, Hertz L, editors. Advances in cellular neurobiology. Vol 2, p 303–352.

Norenberg, M.D. (1987): The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. Neurochem Pathol 6:13–33.

Norenberg, M.D. (1996): Astrocytic-ammonia interactions in hepatic encephalopathy. In: Semin Liver Dis 16, S. 245–253.

Norenberg, M.D.; Martinez-Hernandez, A. (1979): Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. In: Brain Res 161, S. 303–310.

Norenberg, M.D. (2003): Oxidative and nitrosative stress in ammonia neurotoxicity. In: Hepatology 37, S. 245–248.

Nott, A.; Watson, P.M.; Robinson, J.D.; Crepaldi, L.; Riccio, A. (2008): S-Nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodelling in neurons. Nature 455:411–415.

Ohira, K.; Funatsu, N.; Homma, K.J.; Sahara, Y.; Hayashi, M.; Kaneko, T.; Nakamura, S. (2007): Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices. Eur J Neurosci 25:406–416.

Ohira, K.; Hayashi, M. (2009): A new aspect of the TrkB signaling pathway in neural plasticity. Curr Neuropharmacol 7:276–285.

Okamoto, Y.; Monjushiro, H.; Fukumoto, T.; Watarai, H. (2006): Measurement of hydrolysis kinetics of galactose-substituted fluorescein by *β*-galactosidase at the toluene-water interface by spinning microtube fluorometry. Anal Bioanal Chem 385:1430–1438.

Ong, J.P.; Aggarwal, A.; Krieger, D.; Easley, K.A.; Karafa, M.T.; Van Lente F.; Arroliga, A.C.; Mullen, K.D. (2003): Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. Am J Med 114:188–193.

Oren, M. (1999): Regulation of the p53 tumor suppressor protein. J Biol Chem 274:36031–36034.

Ott, H. (1984): Are electroencephalographic and psychomotor measures sensitive in detecting residual sequelae of benzodiazepine hypnotics? Psychopharmacology Suppl 1:133–151.

Ozawa, S.; Gamou, T.; Habano, W.; Inoue, K.; Yoshida, M.; Nishikawa, A.; Nemoto, K.; Degawa, M. (2011): Altered expression of GADD45 genes during the development of chemical-mediated liver hypertrophy and liver tumor promotion in rats. J Toxicol Sci 36:613–623.

Panickar, K.S.; Norenberg, M.D. (2005): Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. Glia 50:287–98.

Panickar, K.S.; Jayakumar, A.R.; Rao, K.V.; Norenberg, M.D. (2009): Ammonia-induced activation of p53 in cultured astrocytes: role in cell swelling and glutamate uptake Neurochem Int 55:98–105.

Pascual, M.; Climent, E.; Guerri, C.; (2001): BDNF induces glutamate release in cerebrocortical nerve terminals and in cortical astrocytes. Neuroreport. 12:2673-2677.

Pearson, G., Robinson, F., Beers, G.T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M.H. (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr Rev 22:153–183.

Penuel, E.; Akita, R.W.; Sliwkowski, M.X. (2002): Identification of a region within the ErbB2/HER2 intracellular domain that is necessary for ligand-independent association. J Biol Chem 277:28468–28473.

Phalke, S.; Mzoughi S.; Bezzi, M.; Jennifer, N.; Mok, W.C.; Low, D.H.; Thike, A.A.; Kuznetsov, V.A.; Tan, P.H.; Voorhoeve, P.M.; Guccione, E. (2012): p53-Independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by PRMT6. Nucleic Acids Res 40(19):9534-42.

Pietrowsky, R.; Braun, D.; Fehm, H.L.; Pauschinger, P.; Born, J. (1991): Vasopressin and oxytocin do not influence early sensory processing but affect mood and activation in man. Peptides 12:1385–1391.

Pilbeam, C.M.; Anderson, R.M.; Bhathal, P.S. (1983): The brain in experimental portal-systemic encephalopathy. I. Morphological changes in three animal models. J Pathol 140:331–345.

Presley, A.D.; Fuller, K.M.; Arriaga, E.A (2003): MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 793:141-150.

Radi, R. (2013): Protein Tyrosine Nitration: Biochemical Mechanisms and Structural Basis of its Functional Effects. Acc Chem Res 46: 550-559.

Rago, R.; Mitchen, J.; Wilding, G. (1990): DNA fluorometric assay in 96-well tissue culture plates using Hoechst 33258 after cell lysis by freezing in distilled water. Anal Biochem 191:31–34.

Raingeaud, J.; Gupta, S.; Rogers, J.S.; Dickens, M.; Han, J.; Ulevitch, R.J.; Davis, R.J. (1995): Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. J Biol Chem 270:7420-7426.

Reinehr, R.; Görg, B.; Becker, S.; Qvartskhava, N.; Bidmon, H.J.; Selbach, O.; Haas H.L.; Schliess F.; Häussinger D. (2007): Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. Glia 55:758–771.

Reynisdottir, I.; Massague, J. (1997): The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev* 11:492-503.

Rhee, S.G.; Kang, S.W.; Jeong, W.; Chang, T.S.; Yang, K.S.; Woo, H.A. (2005): Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. Curr Opin Cell Biol 17:183–189.

Richards, W.L.; Song, M.K.; Krutzsch, H.; Evarts, R.P.; Marsden, E.; Thorgeirsson, S.S. (1985): Measurement of cell proliferation in microculture using Hoechst 33342 for the rapid semiautomated microfluorimetric determination of chromatin DNA. Exp Cell Res 159:235–246.

Riggio, O.; Ridola, L.; Pasquale, C.; Nardelli, S.; Pentassuglio, I.; Moscucci, F.; Merli, M. (2011): Evidence of persistent cognitive impairment after resolution of overt hepatic encephalopathy. Clin Gastroenterol Hepatol 9:181–183.

Robinson, R.C.; Radziejewski, C.; Spraggon, G.; Greenwald, J.; Kostura, M.R.; Burtnick, L.D.; Stuart, D.I.; Choe, S.; Jones, E.Y. (1999): The structures of the neurotrophin 4 homodimer and the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 4 heterodimer reveal a common Trk-binding site. Protein Sci 8:2589–2597.

Romero-Gómez, M.; Jover, M.; Del Campo, J.A.; Royo, J.L.; Hoyas, E.; Galán, J.J.; Montoliu, C.; Baccaro, E.; Guevara, M.; Córdoba, J.; Soriano, G.; Navarro, J.M.; Martínez-Sierra, C.; Grande, L.; Galindo, A.; Mira, E.; Mañes, S.; Ruiz, A. (2010): Variations in the promoter region of the glutaminase gene and the development of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a cohort study. Ann Intern Med 153:281–288.

Rose, C.R.; Blum, R.; Pichler, B.; Lepier, A.; Kafitz, K.W.; Konnerth, A. (2003): Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. Nature 426:74–78.

Rose, C.; Kresse, W.; Kettenmann, H. (2005): Acute insult of ammonia leads to calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes, an effect of pH. J Biol Chem 280:20937–20944.

Rössig, L.; Amir, S.; Urbich, J.C.; Badorff, C.; Zeiher, A.M.; Dimmeler, S. (2001): Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. Mol Cell Biol 21:5644–5657.

Rouse, J.; Cohen, P.; Trigon, S.; Morange, M.; Alonso-Llamazares, A.; Zamanillo, D.; Hunt, T.; Nebreda, A.R. (1994): A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. Cell 78:1027-1037.

Rudge, J.S.; Li, Y.; Pasnikowski, E.M.; Mattsson, K.; Pan, L.; Yancopoulos, G.D.; Wiegand, S.J.; Lindsay, R.M.; Ip, N.Y. (1994): Neurotrophic factor receptors and their signal transduction capabilities in rat astrocytes. Eub J Neurosci 6:693–705.

Salvador, J.M.; Brown-Clay, J.D.; Fornace, A.J. (2013): Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. Adv Exp Med Biol 793:1-19.

Sánchez-Pérez, A.M.; Felipo, V. (2006): Chronic exposure to ammonia alters basal and NMDA-induced phosphorylation of NMDA receptor-subunit NR1. Neuroscience 140:1239–1244.

Savage, C.R.; Inagami, T.; Cohen S. (1972): The primary structure of epidermal growth factor. J Biol Chem 247:7612–7621.

Schliess, F.; Sinning, R.; Fischer, R.; Schmalenbach, C. and Häussinger, D. (1996): Calcium-dependent activation of Erk-1 and Erk-2 following hypo-osmotic astrocyte-swelling. Biochem J 320:167–171.

Schliess, F.; Görg, B.; Fischer, R.; Desjardins, P.; Bidmon, H.J.; Herrmann, A. (2002): Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. FASEB J 16:739–741.

Schliess, F.; Foster, N.; Görg, B.; Reinehr, R.; Häussinger, D. (2004): Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes. In: Glia 47, S. 21–29.

Schliess, F.; Görg, B.; Häussinger, D. (2006): Pathogenetic interplay between osmotic and oxidative stress: the hepatic encephalopathy paradigm. In: Biol Chem 387, S. 1363–1370.

Schmidt, R.F. (2007a): *Physiologie des Menschen*. Springer, S. 957 ff.

Schneider-Stock, R.; Diab-Assef, M.; Rohrbeck, A.; Foltzer-Jourdainne, C.; Boltze, C.; Hartig, R.; Schonfeld, P.; Roessner, A.; Gali-Muhtasib, H. (2005): 5-aza-Cytidine is a potent inhibitor of DNA methyltransferase 3a and induces apoptosis in HCT-116 colon cancer cells via Gadd45- and p53-dependent mechanisms. J Pharmacol Exp Ther 312:525–536.

Schreiber, K.H.; Kennedy, B.K. (2013): When lamins go bad: nuclear structure and disease. Cell 152:1365–1375.

Sedelnikova, O.A.; Redon, C.E.; Dickey, J.S.; Nakamura, A.J. (2010): Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. Mutat Res 704:152–159.

Sendtner, M. (1998): Neurotrophic factors: effects in modulating properties of the neuromuscular endplate. Cytokine Growth Factor Rev 9:1–7.

Shawcross, D.; Jalan, R. (2005): The pathophysiologic basis of hepatic encephalopathy: central role for ammonia and inflammation. Cell Mol Life Sci 62:2295–2304.

Sherwood, S.W.; Rush, D.; Ellsworth, J.L.; Schimke, R.T. (1988): Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. Proc Natl Acad Sci USA 85:9086–9090.

Sinning, R.; Schliess, F.; Kubitz, R.; Häussinger, D. (1997): Osmosignalling in C6 glioma cells. In: FEBS Lett 400, S. 163–167.

Sofroniew, M.V.; Vinters, H.V. (2009): Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol 119:7–35.

Sohn, D.; Graupner, V.; Neise, D.; Essmann, F.; Schulze-Osthoff, K.; Jänicke, R.U. (2009): Pifithrin-alpha protects against DNA damage-induced apoptosis downstream of mitochondria independent of p53. Cell Death Differ 16:869–878.

Steller, H. (1995): Mechanisms and genes of cellular suicide. Science 267:1445–1449.

Sternberg, M.J.; Gullick, W.J. (1989): Neu receptor dimerization. Nature 339:587.

Takekawa, M.; Saito, H. (1998): A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. Cell 95:521–530.

Tamura, R.E.; de Vasconcellos, J.F.; Sarkar, D.; Libermann, T.A.; Fisher, P.B.; Zerbini, L.F. (2012): GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. Curr Mol Med 12: 634–651.

Taylor, J.M.; Mitchell, W.M.; Cohen S. (1972): Epidermal growth factor: physical andchemical properties. Journal of Biological Chemistry 247: 5928–5934.

Thiel, G.; Bauer, I.; Rössler, O. (2005): Wie Nervenzellen sich vor dem programmierten Zelltod schützen. Magazin Forschung, Universität des Saarlandes. S. 28–32.

Thoenen, H.; Hughes, R.A.; Sendtner, M. (1993): Trophic support of motoneurons: Physiological, pathophysiological, and therapeutic implications. Exp Neurol 124:47–55.

Thompson, D.M.; Gill, G.N. (1985): The EGF receptor: structure, regulation and potential role in malignancy. Cancer Surveys 4:767–788.

Tilman, W. (2001): Organische psychische Störung. Steinkopff- Verlag, S. 39.

Toussaint, O.; Dumont, P.; Remacle, J.; Dierick, J.F.; Pascal, T.; Frippiat, C.; Magalhaes, J.P.; Zdanov, S.; Chainiaux, F. (2002): Stress-induced premature senescence or stress-induced senescence-like phenotype: one in vivo reality, two possible definitions? Scientific World Journal 2:230–247.

Toyomoto, M.; Ohta, M.; Okumura, K.; Yano, H.; Matsumoto, K.; Inoue, S.; Hayashi, K.; Ikeda, K. (2004): Prostaglandins are powerful inducers of NGF and BDNF production in mouse astrocyte cultures. FEBS Lett 562:211–215.

Trentin, A.G. (2006): Thyroid hormone and astrocyte morphogenesis. In: J Endocrinol 189, S. 189–197.

Trigueros-Motos, L.; Gonzalez, J.M.; Rivera, J.; Andres, V. (2011): Hutchinson-Gilford progeria syndrome, cardiovascular disease and oxidative stress. Front Biosci 3:1285-97.

Ullrich, A.; Coussens, L.; Hayflick, J.S.; Dull, T.J.; Gray, A.; Tam, A.W.; Lee, J.; Yarden, Y.; Libermann, T.A. (1984): Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. Nature 309:418–425.

Vairapandi, M.; Azam, N.; Balliet, A. G.; Hoffman, B.; Liebermann, D. A. (2000): Characterization of MyD118, Gadd45, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interactingdomains. PCNA impedes MyD118 AND Gadd45-mediated negative growth control. J Biol Chem 275:16810-16819.

Vairapandi, M.; Balliet, A. G.; Hoffman, B.; Liebermann, D. A. (2002): GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. J Cell Physiol 192:327-38.

Waga, S.; Hannon, G.J.; Beach, D.; Stillman, B. (1994): The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. Nature 369:574–578.

Walton, M.I.; Wilson, S.C.; Hardcastle, I.R.; Mirza, A.R.; Workman, P. (2005): An evaluation of the ability of pifithrin-alpha and -beta to inhibit p53 function in two wild-type p53 human tumor cell lines. Mol Cancer Ther 4:1369–1377.

Wang, J.; Wang, G.; Ma, H.; Khan, M.F. (2011): Enhanced expression of cyclins and cyclin-dependent kinases in aniline-induced cell proliferation in rat spleen. Toxicol Appl Pharmacol 250:213–220.

Ward, C.W.; Hoyne P.A.; Flegg R.H. (1995): Insulin and epidermal growth factor receptors contain the cysteine repeat motif found in the tumor necrosis factor receptor. Proteins 22:141–153.

Wardle, R.A.; Poo, M.M. (2003): Brain-derived neurotrophic factor modulation of GABAergic synapses by postsynaptic regulation of chloride transport. J Neurosci. 23:8722-32.

Webley, K.; Bond, J.A.; Jones, C.J; Blaydes, J.P.; Craig, A.; Hupp, T.; Wynford-Thomas, D. (2000): Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. Mol Cell Biol 20:2803–2808.

Wegner, L.; Anthonsen, S.; Bork-Jensen, J.; Dalgaard, L.; Hansen, T.; Pedersen, O.; Poulsen, P.; Vaag, A. (2010): LMNA rs4641 and the muscle lamin A and C isoforms in twins - metabolic implications and transcriptional regulation. J Clin Endocrinol Metab 95:3884–3892.

Wei, R.; Lin, C.M.; Tu, Y.Y. (2010): Strain-specific BDNF expression of rat primary astrocytes. J Neuroimmunol 220:90–98.

Weissenborn, K.; Giewekemeyer, K.; Hnreich, S.; Bokemeyer, M.; Berding, G.; Ahl, B. (2005): Attention, memory, and cognitive function in hepatic encephalopathy. In: Metab Brain Dis 20, S. 359–367.

Wettstein, M.; Häussinger, D. (1996): Hepatische Enzephalopathie, Diagnostik und Therapie. In: Med Klin (Munich) 91, S. 447–448.

Wettstein, M.; Häussinger, D. (2003a): Hepatische Enzephalopathie - Therapie. In: Dtsch Med Wochenschr 128, S. 2658–2660.

Wettstein, M.; Kircheis, G.; Häussinger, D. (2003b): Hepatische Enzephalopathie - Diagnostik. In: Dtsch Med Wochenschr 128, S. 2654–2657.

Wiese, S.; Beck, M.; Karch, C.; Sendtner, M. (2004): Signalling mechanisms for survival of lesioned motoneurons. Acta Neurochir Suppl. 89:21–35.

Wu, X.; Bayle, J.H.; Olson, D.; Levine, A.J. (1993): The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. Genes Dev 7:1126–1132.

Wu,S.; Cetinkaya,C.; Munoz-Alonso, M.J.; von der Lehr, N.; Bahram, F.; Beuger, V.; Eilers, M.; Leon, J.; Larsson, L.G. (2003) Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter.Oncogene, 22, 351–360.

Xu, H.; Goldfarb, M. (2001): Multiple effector domains within SNT1 coordinate ERK activation and neuronal differentiation of PC12 cells. In: J Biol Chem 276, S. 13049–13056.

Yang, Q.; Manicone, A.; Coursen, J. D.; Linke, S. P.; Nagashima, M.; Forgues, M.; Wang, X.W. (2000): Identification of a functional domain in a GADD45-mediated G2/M checkpoint. Biol Chem 275:36892-8.

Yarden, Y.; Sliwkowski, M.X. (2001): Untangling the ErbB signalling network. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2:127–137.

Zarubin, T.; Han, J. (2005): Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. Cell Research 15:11-18.

Zemtsova, I.; Görg, B.; Keitel, V.; Bidmon, H.J.; Schrör, K.; Häussinger, D. (2011): Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. Hepatology 54:204–215.

Zeng, Y.; Hirano, K.; Hirano, M.; Nishimura, J.; Kanaide, H. (2000): Minimal requirements for the nuclear localization of p27(Kip1), a cyclin-dependent kinase inhibitor. Biochem Biophys Res Commun 274:37–42.

Zhan, Q.; Antinore, M.J.; Wang, X.W.; Carrier, F.; Smith, M.L.; Harris, C.C.; Fornace, A.J.Jr. (1999): Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. Oncogene 18:2892–2900.

Zhan, Q.; Lord, K.A.; Alamo, I.Jr.; Hollander, M.C.; Carrier, F.; Ron, D.; Kohn, K.W.; Hoffman, B.; Liebermann, D.A.; Fornace, A.J.Jr. (1994): The gadd and MyD genes define a novel set of mammalian genes encoding acidic proteins that synergistically suppress cell growth. Mol Cell Biol 14:2361–2371.

Zhang, T.; Brazhnik, P.; Tyson, J.J. (2007): Exploring mechanisms of the DNA-damage response: p53 pulses and their possible relevance to apoptosis. Cell Cycle 6:85-94.

Zhang, X.P., Liu, F., Wang, W. (2009): Cell fate decision mediated by p53 pulses. Proc Natl Acad Sci USA 106:12245-12250.

Zhang, X.P;, Liu, F.; Wang, W. (2011): Two-phase dynamics of p53 in the DNA damage response. Proc Natl Acad Sci USA 108:8990-8995.

Zhao, R.; Gish, K.; Murphy, M.; Yin, Y.; Notterman, D.; Hoffman, W.H., Tom, E., Mack, D.H., Levine, A.J. (2000): Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. Genes Dev 14:981–993.

Zhen, Y.J.; Caprioli, R.M.; Staros, J.V. (2003): Characterization of glycosylation sites of the epidermal growth factor receptor. Biochemistry 42:5478–5492.

Zhou, B.P.; Liao, Y.; Xia, W; Spohn, B.; Lee, M.H.; Hung, M.C. (2001): Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. Nat Cell Biol 3:245-52.

Zielonka, J.; Kalyanaraman, B. (2010): Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. Free Radic Biol Med 48:983–1001.

Zuccato, C.; Cattaneo, E. (2009): Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. Nat Rev Neurol 5:311–322.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Häussinger für seine wertvolle Unterstützung und für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie durchführen zu können.

Auch möchte ich mich auf diesem Weg herzlich bei Herrn Prof. Dr. Martin für die Übernahme des Gutachtens bedanken.

Ein sehr großer Dank geht auch an meinen Betreuer Herrn Dr. Boris Görg für seine hervorragende Betreuung, seine kontinuierliche Unterstützung, seine Bereitschaft zur Diskussion, seine wertvollen Anregungen und für die Korrektur dieser Arbeit.

Herzlich danken möchte ich zudem Herrn Dr. Hans-Jürgen Bidmon aus dem C.u.O. Vogt-Institut für Hirnforschung für die technische Unterstützung bei der Präparation von humanem Hirngewebe, für die fachlichen Diskussionen und vielen wichtigen Anregungen.

Des Weiteren gilt auch mein besonderer Dank Frau Dr. Aygul Shafigullina für ihre jederzeit gewährte Unterstützung, ihre Hilfe bei der Durchführung der Versuche und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte und meinen Tag verschönert hat.

Ein besonderer Dank geht auch an die fabelhafte technische Assistentin Ursula Kristek für die Präparation der Tiere und Gewinnung der Zellen und an den tollsten technischen Assistent Torsten Janssen für seine jederzeit gewährte Unterstützung. Die Unterhaltungen mit ihnen haben sich positiv auf den Verlauf der Arbeit ausgewirkt.

Mein Dank gilt auch an meinen Mitarbeitern und Freunde im Institut für experimentelle Hepatologie für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, die netten Unterhaltungen und die vielen Hilfestellungen. Besonders herausheben möchte ich dabei Christina Wöhler, Judith Knievel und Aygul Shafigullina, die mir jederzeit bei unterschiedlichsten Problemen und Fragestellungen mit Rat und Tat zur Seite standen und mich moralisch unterstützt haben.

Ich möchte mich an dieser Stelle auch bei Herrn Dr. Markus Jördens, Frau Dr. Natalia Qvartskhava und Jessica Oenarto für ihre angenehme Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meinen Eltern Ismail und Nural Karababa für die langjährige Unterstützung bedanken und dafür, dass sie stets ein offenes Ohr für mich haben und immer standhaft an mich geglaubt haben. Ein besonderer Dank gilt auch meinen beiden hübschen Schwestern Yasemin und Gülsemin und natürlich auch meinem Bruder Kayhan für die entgegengebrachte Geduld und dafür, dass sie mich nicht nur tatkräftig unterstützt haben, sondern meine Stärke aufbaut, gefestigt und für die erforderliche Abwechslung gesorgt haben. Ohne euch könnte ich niemals in der Position sein, in der ich nun erfreulicherweise bin. Bin sehr froh, dass es euch gibt.

Eidesstattliche Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Ort, Datum

Unterschrift