

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

„Kovalente Protein- und RNA- Modifikationen bei hepatischer Enzephalopathie“

Dissertation

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

Vorgelegt von
Natalia Qvartskhava
2015

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

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. Häussinger
Zweitgutachter: Prof. Dr. Schnitzler

Widmung

Dein Werk

(meiner Mutter gewidmet)

*Die Zukunft, egal wo ich auch steh,
Dein Werk, so wie ich es seh.*

*Die Kraft, die in mir lebt ,
Dein Werk, die mich zum Besten bewegt.*

*Der Ehrgeiz, der mich antreibt,
Dein Werk, das ewig bleibt.*

*Die Hoffnung, die ich nie verlier,
Dein Werk, von dem ich profitier.*

*Mein Wesen, wofür mich viele schätzen,
Dein Werk, nicht in Werte zu setzen*

*Schließlich Mutter, dank ich dir,
Dein Werk, ohne dich wäre ich nicht hier.*

(Brian Loebb)

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht:

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

Görg B*, Qvartskhava N*, Keitel V, Bidmon HJ, Selbach O, Schliess F, Häussinger D. (2008). Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain *in vivo*, Hepatology. (48): 567-579

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

Brück J, Görg B, Bidmon HJ, Zemtsova I, Qvartskhava N, Keitel V, Kircheis G, Häussinger D (2011). Locomotor impairment and cerebrocortical oxidative stress in portal vein ligated rats *in vivo*. J Hepatology (54): 251-257

Qvartskhava N,* Lang PA,* Görg B, Pozdeev V, Pascual Ortiz M, Lang KS, Bidmon HJ, Lang E, Leibrock C, Lang F, and Häussinger D. (2015). Hyperammonemia in gene targeted mice lacking functional hepatic glutamine synthetase. PNAS (17): 5521-5526

I. ZUSAMMENFASSUNG

Die hepatische Enzephalopathie (HE) repräsentiert ein neuropsychiatrisches Syndrom von hoher sozialmedizinischer Bedeutung, welches in Folge einer akuten oder chronischen Leberschädigung auftritt. Ihre Symptomatik reicht je nach Schweregrad von klinisch unauffälligen neurologischen Veränderungen wie z.B. herabgesetzter Aufmerksamkeit, über unterschiedlich stark ausgeprägte, klinisch offenkundige neurologische und motorische Störungen bis hin zum *coma hepaticum*. Die HE wird durch eine heterogene Gruppe von Faktoren wie Ammoniak dem Haupttoxin der HE, Benzodiazepinen, Hyponatriämie und *pro*-inflammatorischen Zytokinen ausgelöst (Häussinger and Schliess, 2008).

Das von Professor Häussinger aufgestellte und international anerkannte Paradigma zur Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie (HE) konnte erstmalig den gemeinsamen Wirkmechanismus HE-auslösender Faktoren erklären. Hiernach setzt eine Hyperammonämie im Zusammenspiel mit weiteren klinisch relevanten Faktoren, wie inflammatorisch wirksamen Zytokinen, Benzodiazepinen oder Hyponatriämie, eine Signalkaskade in Gang, bei der sich eine Zunahme des Astrozytenvolumens und die Produktion reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies (RNOS) gegenseitig bedingen und verstärken und dadurch eine gemeinsame Endstrecke in der Pathogenese der HE ansteuern. Hierbei werden Genexpressionsprofile moduliert und intrazelluläre Signaltransduktionsvorgänge beeinflusst. Darüber hinaus werden Proteine durch RNOS posttranslational modifiziert, z.B. durch Proteintyrosinnitrierung (PTN). Unter den von einer PTN in kultivierten Astrozyten *in vitro* und im Rattenhirn *in vivo* betroffenen Proteinen wurde die Glutaminsynthetase (GS) identifiziert und vermutet, dass hierdurch deren enzymatische Aktivität beeinträchtigt wird. Dies ist für die Pathogenese der HE von besonderer Bedeutung, da der nahezu exklusiv in Astrozyten im Gehirn exprimierten GS bei der zerebralen Ammoniakentgiftung eine Schlüsselrolle zukommt.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, 1.) funktionale Konsequenzen von posttranslationalen Proteinmodifikationen wie der Tyrosinnitrierung, der S-Nitrosylierung und der Karbonylierung für die Glutaminsynthetaseaktivität und Stabilität zu untersuchen und 2.) die Wirkung von oxidativem Stress bei HE auf die Oxidation von Nukleinsäuren wie RNA zu charakterisieren, sowie die zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären.

Zur Beantwortung der ersten Frage wurde in einem *in vitro* System gereinigte Glutaminsynthetase mit aufsteigenden Konzentrationen der reaktiven Chemikalie Peroxynitrit behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass die dadurch verursachte Inaktivierung des Enzyms mit dem Ausmaß der Tyrosinnitrierung, nicht jedoch mit

anderen Modifikationen, wie S-Nitrosylierung, und Karbonylierung korreliert. Epicatechin, ein Flavonoid welches in verschiedenen Nahrungsmitteln vorkommt, hemmte sowohl die Tyrosinnitrierung als auch die Inaktivierung der GS. Es zeigte sich außerdem, dass die Tyrosinnitrierung der GS *per se* kein Signal für einen Abbau des Enzyms durch das 20S Proteasom darstellt, sondern dass hierfür andere postranslationale Proteinmodifikationen wie die Karbonylierung und S-Nitrosylierung verantwortlich sind, die durch Aussetzung der GS gegenüber höheren Peroxynitritkonzentrationen hervorgerufen werden. Eine Denitrierung der GS und eine damit einhergehende Wiederherstellung ihrer enzymatischen Aktivität konnte unter Verwendung eines Denitrassays belegt werden. Eine verstärkte Tyrosinnitrierung wurde auch in *post mortem* Hirngewebe von Leberzirrhosepatienten mit HE, nicht aber bei Leberzirrhosepatienten ohne HE gefunden. Unter den tyrosinnitrierten Proteinen konnte hier die GS, einhergehend mit einer deutlichen Aktivitätsverminderung bei gleichzeitig unverändertem Proteinexpressionlevel, identifiziert werden.

Im zweiten Abschnitt der Dissertation wurde unter Verwendung verschiedener HE auslösender Faktoren an kultivierten Rattenastrozyten *in vitro* gezeigt, dass HE-präzipitierende Faktoren über eine NMDA-Rezeptor-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration NADPH-Oxidase-vermittelt eine Oxidation von RNA (8-OHG) induzieren. Unter den oxidierten RNA-Spezies konnte der Glutamat-Aspartat-Kotransporter (GLAST) und die ribosomale Untereinheit 18S identifiziert werden. Während die GLAST-mRNA-Oxidation im Zusammenhang mit der bei HE verminderten GLAST-Proteinexpression und Störung der glutamatergen Neurotransmission stehen könnte, ist eine Oxidation ribosomaler RNA im Zusammenhang mit einer verminderten Translationseffizienz mit weitreichenden Folgen für synaptische Plastizität diskutiert worden. Die klinische Relevanz der RNA-Oxidation wird durch Befunde der vorliegenden Dissertation gestützt, die eine verstärkte RNA-Oxidation in *post mortem* Hirngewebe von Leberzirrhosepatienten mit HE nicht aber bei Leberzirrhosepatienten ohne HE zeigten. Die in der vorliegenden Dissertation erhobenen Befunde weisen auf eine bedeutsame Rolle von oxidativem Stress für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie hin.

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläre Kalziumkonzentration
8-OH(d)G	8-Hydroxydesoxyguanosin
8-OHG	8-Hydroxyguanosin
ADP	Adenosindiphosphat
BAPTA-AM	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraazetat
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	complementary DNA
CFF	Critical flicker frequency
Cy3	Indocarbozyanin
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC	Epicatechin
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraazetat
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoreszeinisothiocyant
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GLAST	Glutamate-Aspartat Transporter
GS	Glutaminsynthetase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Hydrogenchlorid
HE	Hepatische Enzephalopathie
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRPOD	Horseradish peroxydase
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
LPS	Lipopolysaccharid
MAP-2	Mikrotubuli assoziiertes Protein 2
mHE	Minimale Hepatische Enzephalopathie
MK-801	Dizocilpin
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
MSO	Methionin-Sulfoximin
NADPH	Reduzierte Form von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NH ₄ Az	Ammoniumazetat
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid

NKCC1	Na-K-Cl-Transporter
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	NMDA-Rezeptor
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid Synthetase
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ Tyr	Nitrotyrosin
NOVA-2	Neuro-Oncological Ventral Antigen 2
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PAA	Polyacrylamid
PBR	Peripherer Benzodiazepinrezeptor
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCA	Portocavale Anastomose
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PN	Peroxynitrit
PSD-95	postsynaptic density protein 95
PVL	Portalvenöse Ligatur
PTN	Proteintyrosinnitrierung
RNA	Ribonucleic acid
RNOS	Reaktive Stickstoff/Sauerstoffsezie
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
S-NO	S-Nitrosylierung
SSC	Saline Sodium Citrate
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20 (Tris-Buffered Saline with Tween 20)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α

III. INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Klinische Definition der hepatischen Enzephalopathie	1
1.2	Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie	2
1.3	Kovalente Proteinmodifikationen bei hepatischer Enzephalopathie	6
1.4	Oxidation von Nucleinsäuren	8
2	ZIELSETZUNG	9
3	MATERIAL UND METHODEN	10
3.1	Materialien	10
3.1.1	Geräte	11
3.1.2	Feinchemikalien	11
3.1.3	Primärantikörper	12
3.1.4	Sekundärantikörper	13
3.2	Methoden	14
3.2.1	Präparation und Kultivierung von Astrozyten aus dem zerebralen Rattenkortex	14
3.2.2	Anlage einer partiellen portalvenösen Ligatur	14
3.2.3	Einstellung einer akuten Hyperammonämie in der Ratte	15
3.2.4	Humane <i>post mortem</i> Hirnbiopsien	16
3.2.5	Western- und Dot-Blot-Analyse	19
3.2.6	RNA-Präparation und Messung der RNA-Konzentration	20
3.2.7	Kapillarelektrophoretische Messung der RNA-Integrität	20
3.2.8	Northwestern- und Slot-Blot-Analyse	20
3.2.9	Densitometrische Quantifizierung von Western- und Dot-Blots	22
3.2.10	Bestimmung des Blutammoniakgehalts	22
3.2.11	Präparation vitaler Maushirnschnitte	22
3.2.12	Immunfluoreszenzanalyse	22
3.2.13	Konfokale Laserscanning Mikroskopie	23
3.2.14	Immunpräzipitation/Immundepletion spezifischer Proteine und oxidierter RNA	23
3.2.15	Semiquantitative Polymerasekettenreaktion	24
3.2.16	Denitrase-Assay	25
3.2.17	Messung des proteasomalen Abbaus durch das 20S Proteasom	25
3.3	Glutaminsynthetase-Assay	26
3.3.1	Statistische Auswertung	26
4	ERGEBNISSE	27

4.1	Untersuchung zur Wirkung Peroxynitrit-vermittelter kovalenter Proteinmodifikationen auf die Aktivität der Glutaminsynthetase	27
4.1.1	Validierung eines in vitro Testsystems zur Untersuchung der Peroxynitrit-vermittelten Wirkung auf die Glutaminsynthetase	27
4.1.2	Identifizierung der Peroxynitrit-vermittelten Proteinmodifikationen an isolierter Glutaminsynthetase und deren Einfluss auf die enzymatische Aktivität	28
4.1.3	Einfluss von Epicatechin auf die PN-induzierte Tyrosinnitrierung und den GS-Aktivitätsverlust	32
4.1.4	Denitrierung der GS durch LPS-behandelte Milzproteinlysate	33
4.1.5	Einfluss der GS-Proteintyrosinnitrierung auf den proteasomalen Abbau des Enzyms durch das 20S Proteasom	36
4.1.6	Nachweis tyrosinnitrierter Proteine und Identifizierung der tyrosinnitrierten Glutaminsynthetase in humanen post mortem Hirnproben	37
4.2	RNA-Oxidation	39
4.2.1	Einfluss von Ammoniak auf die Oxidation von RNA in kultivierten Rattenastrozyten	39
4.2.2	Pharmakologische Charakterisierung der Ammoniak-induzierten RNA-Oxidation in kultivierten Rattenastrozyten	43
4.2.3	Identifizierung oxidiertes RNA-Spezies in Ammoniak behandelten kultivierten Rattenastrozyten.....	45
4.2.4	Einfluss HE-relevanter Faktoren auf die RNA-Oxidation in kultivierten Astrozyten.	46
4.2.5	Nachweis und Charakterisierung zerebraler RNA-Oxidation in Ammonium-azetat-behandelten Ratten	46
4.2.6	Nachweis oxidiertes RNA und Identifizierung oxidiertes RNA-Spezies in NH ₄ Cl-behandelten vitalen Maushirnschnitten	51
4.2.7	Wirkung von TNF- α auf die RNA-Oxidation im vitalen Maushirnschnitt.....	52
4.2.8	Nachweis oxidiertes RNA im Rattenhirn nach Portalvenenligatur.....	55
4.2.9	Nachweis oxidiertes RNA in humanen post mortem Hirnproben	55
4.2.10	Nachweis von zerebralem oxidativem Stress in der leberspezifischen GS-Knockout-Mauslinie	57
5	DISKUSSION	60
5.1	Proteintyrosinnitrierung der Glutaminsynthetase	60
5.2	Zerebraler oxidativer/nitrosativer Stress und Nitrierung der Glutaminsynthetase bei Zirrhosepatienten mit hepatischer Enzephalopathie	63
5.3	Bedeutung der Glutaminsynthetasenitrierung für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie	64
5.4	Oxidation von RNA bei hepatischer Enzephalopathie.....	65
6	SCHLUSSFOLGERUNG	68
7	LITERATURVERZEICHNIS	69

1 Einleitung

Die hepatische Enzephalopathie (HE) ist ein neuropsychiatrisches Syndrom, welches in Folge einer akuten oder chronischen Leberfunktionsstörung oder eines operativ angelegten portosystemischen Shunt auftritt. Sie ist durch motorische und kognitive Störungen gekennzeichnet und prinzipiell in jedem Stadium der Erkrankung reversibel (Wettstein and Häussinger 1996). Sie stellt eine der wichtigsten Komplikationen von Lebererkrankungen dar (Häussinger *et al.*, 1994; 2000). Die Leberzirrhose als Folge chronischer Lebererkrankungen tritt mit einer Inzidenz von etwa 250 /100.000 Einwohner im Jahr auf und besitzt eine hohe sozialmedizinische Relevanz (Häussinger and Blei). Mit dem Fortschreiten der Leberzirrhose nimmt die Fähigkeit der Leber, Neurotoxine, wie Ammoniak, Merkaptane, kurzkettige Fettsäuren und aromatische Aminosäuren zu entgiften, zunehmend ab. In der Folge treten kognitive Beeinträchtigungen und motorische Störungen auf, welche in ihrer Gesamtheit das Krankheitsbild der hepatischen Enzephalopathie (HE) ausmachen und die Lebensqualität der Patienten erheblich einschränken (Kircheis *et al.*, 2002).

1.1 Klinische Definition der hepatischen Enzephalopathie

Die Symptome der HE variieren in ihrer Schwere und reichen von leichten Persönlichkeitsstörungen bis hin zu Koma und Tod. Hierzu zählen motorische Störungen, wie hochfrequenter feinschlägiger Haltetremor (mini asterixis) und ein grobschlägiger Flapping Tremor (asterixis), veränderter Schriftstil, Störungen der Kognition und des Bewusstseins, wie Erinnerungslücken, Unfähigkeit zu rechnen, Umkehrung des Tag-Nacht-Rhythmus, Somnolenz, verlangsamtes Reaktionsvermögen und zeitliche oder räumliche Desorientierung. Die HE kann in eine minimale und manifestierte Form eingeteilt werden. Patienten mit minimaler HE (mHE) zeigen keine klinisch offenkundigen neurologischen Symptome, dennoch liegt bereits in diesem Erkrankungsstadium eine Einschränkung der Lebensqualität vor und ist nur durch psychometrische Tests und physikalische Parameter wie die kritische Flimmerfrequenz (Kircheis *et al.*, 2002) objektivierbar. Im klinischen Alltag wird klassischerweise die symptomorientierende Einteilung der HE in vier Schweregrade nach West-Haven-Kriterien (Tabelle1) verwendet (Ferenci *et al.*, 2002).

Tabelle 1: Einteilung der hepatischen Enzephalopathie nach West-Haven-Kriterien (Ferenci *et al.*, 2002).

Stadium	Befund
Grad 1	Leichte mentale Verlangsamung Euphorie oder Angst verminderte Aufmerksamkeit verminderte Additions-Rechenleistung Reizbarkeit gestörte Feinmotorik
Grad 2	Lethargie oder Apathie minimale zeitliche und/oder räumliche Desorientierung leichte Persönlichkeitsstörungen verminderte Subtraktion-Rechenleistung
Grad 3	Somnolenz Reaktion auf verbale Reize Desorientierung
Grad 4	Koma keine Reaktion auf verbale Reize

1.2 Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie

Die genauen Pathomechanismen der hepatischen Enzephalopathie (HE) sind bislang nur unzureichend aufgeklärt. Es herrscht allgemein Einvernehmen darüber, dass die HE eine primäre Gliopathie darstellt, die eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der neurologischen Symptomatik einnimmt. Eine wesentliche Konsequenz der Astrozyten-funktionsstörung wird in einer beeinträchtigten Interaktion von Astrozyten und Neuronen gesehen (Häussinger *et al.*, 1994; 2000).

Astrozyten spielen eine essentielle Rolle beim Aufbau der Bluthirnschranke und der Entgiftung von Ammoniak durch die im Gehirn nahezu exklusiv von ihnen exprimierte Glutaminsynthetase (Martinez-Hernandez *et al.*, 1977). Die beim akuten Leberversagen auftretende Hyperammonämie ist im Gehirn mit einer gesteigerten Synthese und Akkumulation von Glutamin in Astrozyten assoziiert (Norenberg *et al.*, 1991). Die hierdurch herbeigeführte Zellschwellung ist mit der Ausbildung einer klinisch offenkundigen Hirndruckproblematik verbunden (Blei *et al.*, 1999; Kato *et al.*, 1992). Demgegenüber konnte beim Leberzirrhotiker mit HE eine Glutaminakkumulation und Osmolytdepletion in Astrozyten bereits in frühen Stadien der Erkrankung nachgewiesen werden, die mit der Ausbildung eines geringgradigen Gliödem im Sinne einer Wasserumverteilung verbunden ist (Häussinger *et al.*, 1994). Die erstmalig von Professor Häussinger beschriebene Entwicklung eines geringgradigen Gliödem bei HE wurde durch zahlreiche weitere Studien unter Verwendung unterschiedlicher Techniken bestätigt (Miese *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2003).

Die hepatische Enzephalopathie wird durch auffallend heterogene Faktoren präzipitiert. Diese Heterogenität spiegelt sich auch in den unterschiedlichen Theorien zur Entstehung der HE wieder. Eine veränderte Neurotransmission wurde demnach auf veränderte

Neurotransmitterprofile (Fischer *et al.*, 1971), eine Modulation der glutamatergen Neurotransmission (Schafer *et al.*, 1982) oder auf eine gesteigerte Neurosteroidsynthese (Bender *et al.*, 1998) bei gleichzeitig verstärkter Expression der im Gehirn exprimierten peripheren Benzodiazepinrezeptoren (PBR) (Basile *et al.*, 1989; Mullen *et al.*, 1990; Norenberg *et al.*, 1997; Bender and Norenberg 1998) zurückgeführt. Neben Ammoniak wurden durch die Leberfunktionsstörung ansteigenden Konzentrationen kurzkettiger Fettsäuren, Mercaptane und eine Imbalance des verzweigtkettigen Aminosäurepools im peripheren Blut für die bei HE veränderte Neurotransmission verantwortlich gemacht (Zieve *et al.*, 1974). Alle genannten Hypothesen bieten keinen Erklärungsansatz für die HE-auslösende Wirkung der unterschiedlichen Faktoren.

In einer wegweisenden Arbeit von Häussinger *et al.* (1994) wurde erstmalig gezeigt, dass die hepatische Enzephalopathie mit der Ausbildung eines geringgradigen astroglialen Ödems assoziiert ist und es wurde postuliert, dass die Wirkung der verschiedenen HE-präzipitierenden Faktoren auf der Ebene der Induktion einer Zellschwellung konvergiert (Häussinger *et al.*, 2000). Demnach kann der osmolytderangierte Astrozyt weitere schwellungsinduzierende HE-auslösende Faktoren wie Sedativa vom Benzodiazepin-Typ (Bender and Norenberg, 1998), inflammatorische Zytokine wie TNF- α (Bender *et al.*, 1992) oder Hyponatriämie (Cordoba *et al.*, 1999; Häussinger *et al.*, 1994; 2000) nicht mehr durch weitere Freisetzung von Osmolyten kompensieren. In der Folge kommt es zur Exazerbation der HE-Symptomatik. Das von Professor Häussinger aufgestellte und heute international anerkannte Paradigma zur Pathogenese der HE erklärt den Wirkmechanismus einer heterogenen Gruppe HE-auslösender Faktoren auf der Basis der Induktion einer Zellschwellung und der Bildung von oxidativem Stress, die sich wechselseitig verstärken und nachfolgend eine gemeinsame Endstrecke in der Pathogenese ansteuern. So zeigen jüngere Arbeiten, dass eine Astrozytenschwellung *per se* hinreichend für die Bildung von oxidativem und nitrosativem Stress ist (Schliess *et al.*, 2004). Auch Ammoniak, das Benzodiazepin Diazepam sowie das *pro*-inflammatorische Zytokin TNF- α induzieren in kultivierten Rattenastrozyten sowohl eine Zellschwellung (Bender and Norenberg *et al.*, 1994), als auch die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies (RNOS) (Görg *et al.*, 2003; 2006; Schliess *et al.*, 2002). Es kommt über noch nicht vollständig verstandene Mechanismen zur Aktivierung von astroglial exprimierten NMDA-Rezeptoren (NMDAR) und hierdurch zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$. Diese triggert wiederum die Aktivierung einer in Astrozyten exprimierten NADPH-Oxidase (Reinehr *et al.*, 2007) und bewirkt eine gesteigerte NO-Synthese durch Aktivierung der Typ-I NO-Synthase (nNOS) (Schliess *et al.*, 2002; Görg *et al.*, 2006; Kruczek *et al.*, 2009).

Da außerdem bekannt ist, dass RNOS eine Astrozytenschwellung auslösen können (Häussinger *et al.*, 2002; Abramov *et al.*, 2004), wurde postuliert, dass HE-auslösende

Faktoren einen sich selbst verstärkenden Kreislauf zwischen Volumenzunahme und der Bildung von RNOS in Gang setzen (Häussinger *et al.*, 2006). Funktionale Konsequenzen sind die Modulation von Genexpressionsprofilen und Signalprozessen und posttranslationale RNA- und Proteinmodifikationen wie der Oxidation von RNA und Proteintyrosinnitrierung (PTN) durch die primär astrogliale und nachfolgend neuronale Funktionen beeinträchtigt werden.

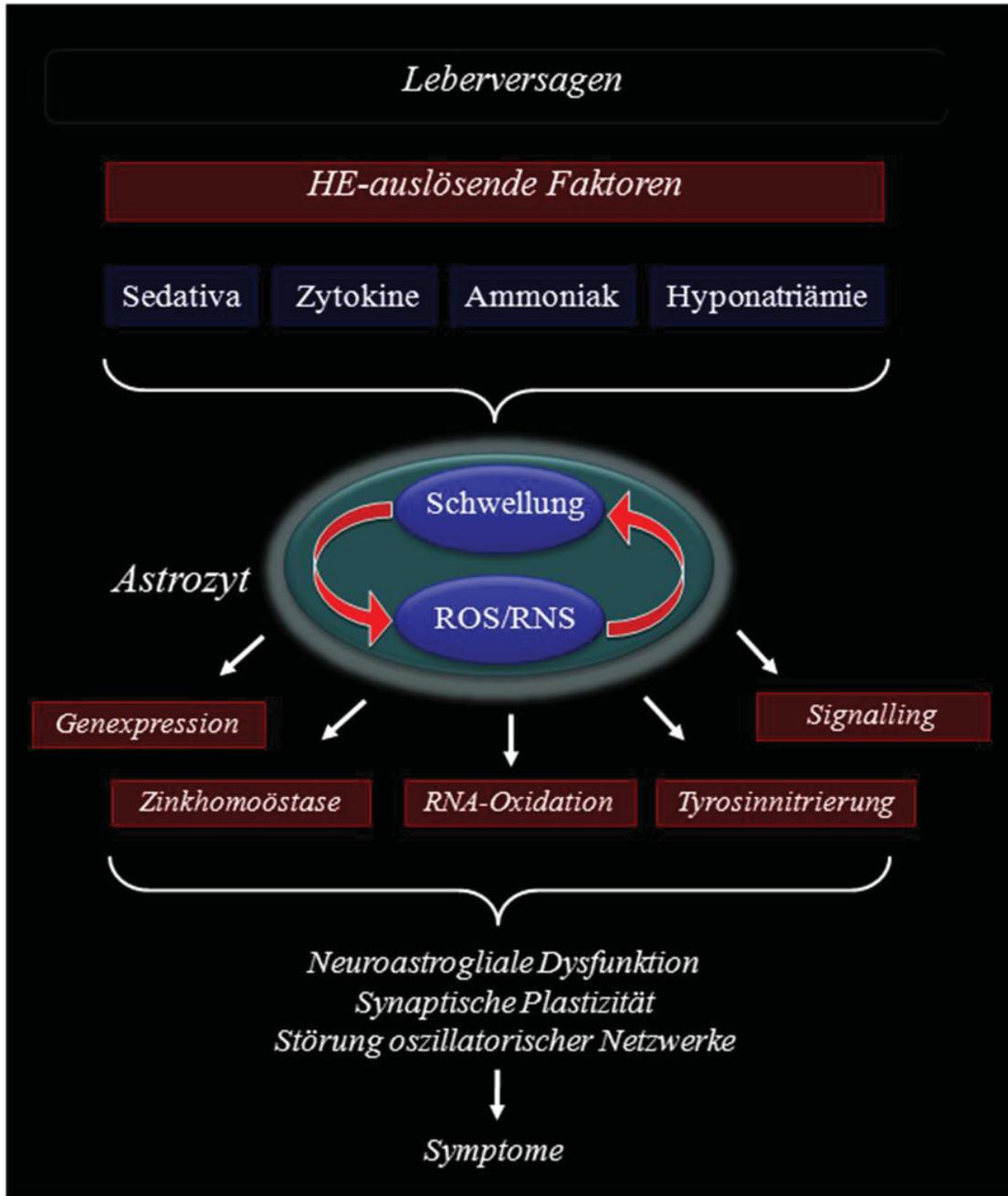


Abbildung 1.1: Paradigma zur Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie

Die hepatische Enzephalopathie ist Folge einer Hydratationsstörung der Astrozyten, die durch Ammoniak im Zusammenspiel mit weiteren HE-relevanten Faktoren ausgelöst wird. Im Zuge der Ammoniakentgiftung in den Astrozyten und der hiermit verbundenen Glutaminakkumulation kommt es zu einer Zellschwellung, die durch die Abgabe von Osmolyten vorübergehend kompensiert werden kann. Der hierdurch osmolytdepletierte Astrozyt kann nachfolgende schwellungsvermittelnde Wirkungen HE-auslösender Faktoren nicht mehr kompensieren. Der hieraus resultierende osmotische Stress vermittelt die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffradikale (ROS/RNS). Da ROS/RNS wiederum eine Zellschwellung induzieren, kommt es zur wechselseitigen Verstärkung von osmotischem/oxidativem Stress, der in einer Reihe funktional relevanter Konsequenzen mündet. Hierzu zählt die Tyrosinnitrierung von Proteinen (PTN), die Oxidation von RNA, eine Störung der intrazellulären Zinkhomoöstase, der Änderung von Signalprozessen und von Genexpressionsmustern. Modifiziert nach Görg, Schliess, Häussinger (2013).

1.3 Kovalente Proteinmodifikationen bei hepatischer Enzephalopathie

Die Bildung von RNOS kann Proteine durch Nitrierung von Tyrosinresten posttranslational modifizieren. Dabei wird an Position 3 des Benzolrings durch nukleophile Addition eine Nitrogruppe eingefügt. Von einigen Autoren wurde vermutet, dass die Tyrosinnitrierung eine unspezifische oxidative Schädigung eines Proteins darstellt, die ein Protein für den proteasomalen Abbau prädisponiert (Grune *et al.*, 1998; 2001). Neuere Arbeiten belegen aber, dass die Nitrierung an spezifischen Tyrosinresten in einem Protein erfolgt und unter bestimmten Umständen reversibel ist und somit einen Signalcharakter ähnlich einer Tyrosinphosphorylierung haben könnte (Gow *et al.*, 1996; Kamisaki *et al.*, 1998; Ischiropoulos *et al.*, 1998; Greenacre and Ischiropoulos 2001). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass hieraus verschiedene funktionale Konsequenzen resultieren können. So wurde berichtet, dass die enzymatische Aktivität von Proteinen oder die Ligandbindungsaffinität von Rezeptoren in Abhängigkeit des betroffenen Tyrosinrestes gesteigert oder vermindert werden kann (Savvides *et al.*, 2002; Ji *et al.*, 2006; Gow *et al.*, 2004; Ischiropoulos *et al.*, 2009). Daneben wurden aber auch Tyrosinnitrierungen beschrieben, die offensichtlich konsequenzlos für die Funktion des betroffenen Proteins sind (Gole *et al.*, 2000).

In kultivierten Rattenastrozyten wurde gezeigt, dass die PTN in Folge einer Stimulation mit Ammoniak (Schliess *et al.*, 2002), Benzodiazepinen (Görg *et al.*, 2003) und inflammatorischen Zytokinen (Görg *et al.*, 2006) sowie unter hypoosmotischen Bedingungen auftritt (Schliess *et al.*, 2004). *In vivo* findet man nach akuter Belastung von Ratten mit Ammoniumazetat eine ausgeprägte PTN in perivaskulär lokalisierten Astrozyten im zerebralen Kortex, was möglicherweise mit einer Permeabilitätsänderung der Blut-Hirnschranke bei der HE in Zusammenhang stehen könnte (Schliess *et al.*, 2002). In zerebrokortikalen Proteinpräparationen Ammoniumazetat-belasteter Ratten, sowie in portokaval anastomosierten Ratten (PCA) wurde die Glutaminsynthetase (GS) nitriert gefunden. In kultivierten Rattenastrozyten wurde zusätzlich nach Stimulation mit NH_4Cl der PBR und die extrazellulär regulierte Kinase 1 (Erk-1) unter den tyrosinnitrierten Proteinen identifiziert (Schliess *et al.*, 2002).

Eine weitere in Folge von nitrosativem Stress auftretende posttranslationale Proteinmodifikation ist die S-Nitrosylierung. Die S-Nitrosylierung von Proteinen findet, wie die Tyrosinnitrierung auch bereits unter physiologischen Bedingungen statt. Hierbei kommt es durch kovalente und reversible Addition (Brüne *et al.*, 2003; Mannick *et al.*, 2007) einer Nitrosogruppe an die Thiolgruppe eines Cysteinrestes in Proteinen zur Bildung von Nitrosocystein. Unter physiologischen Bedingungen stellt diese kovalente Anlagerung an Proteine eine Speicher- und im Blut eine Transportform für das kurzlebige

Stickstoffmonoxid (NO) dar. Für viele Proteine konnte belegt werden, dass eine S-Nitrosylierung, ähnlich der Tyrosinnitrierung, die Proteinfunktion modulieren kann. Ein Beispiel hierfür ist der NMDA-Rezeptor, dessen Aktivität und Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen nach S-Nitrosylierung von spezifischen Cysteinresten vermindert wird (Lipton *et al.*, 1998; 2002; Choi *et al.*, 2000). Die S-Nitrosylierung von spezifischen Proteinen wird unter anderem bei Immunmodulation (De Caterina *et al.*, 1995), Muskelrelaxation (Shin *et al.*, 1996), Neurotransmission (Ignarro *et al.*, 1991) und neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet (Duda *et al.*, 2000; Horiguchi *et al.*, 2003). Es existieren bislang keine Daten, die eine S-Nitrosylierung unter HE-relevanten Bedingungen belegen.

Die Karbonylierung stellt eine weitere oxidative Modifikation von Proteinen dar. Die Entstehungsmechanismen von Proteinkarbonylen sind nicht vollständig geklärt. Sie erfolgt an spezifischen Aminosäuren, wie Lysin-, Arginin-, Prolin- and Threoninresten in Gegenwart reduktiver Metallionen und reaktiver Verbindungen wie z.B. Superoxidanionradikale (Levine *et al.*, 1983; 2002). Die Bildung einer Karbonylgruppe an Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzyms verändert dessen Struktur und seine hydrophoben Eigenschaften irreversibel. Die Karbonylierung kann zur Ausbildung von zytotoxischen Proteinaggregaten führen, sowie auf diese Weise modifizierte Proteine dem proteasomalen Abbau durch die 20S Untereinheit des Proteasoms zuführen (Desnues *et al.*, 2003; Grune *et al.*, 2005). Eine Steigerung des Anteils karbonylierter Proteine wurde unter physiologischen Bedingungen insbesondere im Zusammenhang mit Alterungsprozessen beschrieben (Yan *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurde in zahlreichen Experimentalsystemen und *in vivo* unter pathologischen Bedingungen eine Zunahme karbonylierter Proteine gezeigt, wie z.B. bei Morbus Alzheimer, Parkinson, Hyperglykämie, verschiedenen Tumoren und weiteren degenerativen Erkrankungen (Castegna *et al.*, 2002; Levine *et al.*, 2002; Dalle-Donne *et al.*, 2003).

1.4 Oxidation von Nukleinsäuren

Eine weitere Konsequenz erhöhter RNOS-Synthese ist die Oxidation von DNA und RNA. Hierbei kann aus Desoxyguanosin 8-Hydroxydesoxyguanosin auch 8-Oxo-2'-desoxyguanosin (8-OH(d)G) in DNA bzw. aus Guanosin 8-Hydroxyguanosin (8-OHG) in RNA gebildet werden. Zytoplasmatische RNA ist besonders empfindlich gegenüber Oxidantien, da sie, anders als nukleäre DNA, im Wesentlichen einzelsträngig vorliegt und nicht durch Anlagerung von Histonen geschützt ist. Insbesondere dem stark reaktiven Peroxynitrit, welches durch Rekombination aus NO und Superoxidanionradikal entsteht (Beckmann *et al.*, 1990), wird eine bedeutsame Rolle bei der Oxidation des Guanins zugesprochen. Die Oxidation von Nukleinsäuren wird mit der Pathophysiologie zahlreicher neurodegenerativer Erkrankungen in Verbindung gebracht. Sie wurde bereits in frühen Stadien des Morbus Alzheimer oder dem Morbus Parkinson beschrieben (Shan *et al.*, 2003). Interessanterweise wurden hier oxidierte mRNA-Spezies identifiziert, deren Translationsprodukte bekanntermaßen für die Pathogenese der Erkrankung eine wichtige Rolle spielen. Die Oxidation von DNA kann eine fehlerhafte Replikation mit einer Transversion von G:C nach T:A bewirken und dadurch die Ausbildung von Mutationen begünstigen. Die Reparatur oxidiert DNA kann enzymatisch durch eine DNA Glykosylase erfolgen (Shattler *et al.*, 2000; Shinmura *et al.*, 2001). Bezüglich der funktionalen Konsequenzen der Oxidation von RNA liegen nur wenige Daten aus der Literatur vor. Dennoch konnte gezeigt werden, dass eine Oxidation ribosomaler RNA mit einer verminderten Translationseffizienz einhergeht, und oxidierte mRNA zur Bildung fehlerhaft gefalteter Proteine führen kann, welche nur unzureichend durch das Proteasom abgebaut werden können und daher in der Zelle akkumulieren. Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass oxidierte RNA durch spezifische Reparaturmechanismen unter bestimmten Bedingungen abgebaut werden kann (Wu *et al.*, 2008; 2009). Die Effizienz dieses Abbauweges, insbesondere unter pathophysiologischen Bedingungen, ist aber bislang völlig unklar.

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es aufzuklären, ob die in vorangegangenen Arbeiten von Professor Häussinger aufgezeigte Tyrosinnitrierung der Glutaminsynthetase in mit Ammoniak-behandelten Astrozyten für einen Aktivitätsabfall des Enzyms ursächlich ist, und ob die Proteintyrosinnitrierung oder andere kovalente Modifikationen der Glutaminsynthetase den proteasomalen Abbau des Enzyms ansteuern.

Es sollte außerdem untersucht werden, ob die Bildung von oxidativem Stress unter HE-relevanten Bedingungen mit einer Oxidation von RNA einhergeht.

Die Relevanz der Glutaminsynthetasenitrierung und der RNA-Oxidation für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie sollte an *post mortem* Hirnbiopsiematerial von Leberzirrhosepatienten mit und ohne hepatischer Enzephalopathie überprüft werden

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

100mm-Zellkulturschalen	Falcon, Heidelberg, Deutschland
15ml-Röhrchen	Falcon, Heidelberg, Deutschland
50ml-Röhrchen	Falcon, Heidelberg, Deutschland
60mm-Zellkulturschalen	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Bradford Protein Assay	BioRad, Hercules, USA
Bottle top-Filter	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Chemilumineszenzfilm Amersham Hyperfilm	GE Healthcare, UK
Chemiluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA, USA
Deckgläser Ø 12mm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMEM (1000 mg/l D-Glucose)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMEM (1000 mg/l D-Glucose) Phenolrot frei	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMEM (1000 mg/l D-Glucose) NaCl-frei	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DNA Ladder (low range)	Fragmentas GmbH, St. Leon-rot, Deutschland
Dual Color Protein Standard	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Einkanal-Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Einwegküvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
Glasbodenpetrischale (35mm)	MatTek Corporation, USA
MAC Microbeads	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Nitrozellulose-Membran	Schleicher-Schuell, Dassel, Deutschland
Objekträger (76 x 26mm) mit Mattrand	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
OxyBlot Kit	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ponceau-S	Serva, Heidelberg, Deutschland
Proteasom 20S, rekombinant	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
Protein A/G Agarose	Santa Cruz Biotechnology, CA
Rainbow Molekular Weight Marker	Amersham, Freiburg, Deutschland
Ribogreen RNA Assay Kits	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNA-Ladder	Qiagen, Hilden, Deutschland

RNase	Invitek Berlin, Deutschland
RNase freie DNase	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Saponin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
SeeBlue Plus 2 Marker	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Spritzen Omnifix	B. Braun, Melsungen, Deutschland
TNF- α , human, rekombinant	Roche, Mannheim, Deutschland
Ziegenserum	Dianova, Hamburg, Deutschland

3.1.1 Geräte

Ammonia Checker II	Nobis Labordiagnostica GmbH, Endingen, Germany
Analysenwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen- Frommern, Deutschland
Elektroblotting-Kammer	Amersham, Freiburg, Deutschland
Entwicklermaschine AGFA CURIX 60	Agfa-Gevaert, Leverkusen, Deutschland
Fluorimeter FL Ascent	Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finnland
Gelelektrophorese Apparatur	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Kodak Digital Image Station 440CF	Eastman Kodak Co., Rochester, USA
LSM 510 meta	ZEISS, Jena, Deutschland
Magnetrührer MR 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Schüttlerapparat GFL-3017	Hilab, Düsseldorf, Deutschland
Slot- Blot Apparatur Minifold II	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Spectrophotometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Sterile Werkbank Hera Cell	Heraus, Karlsruhe, Deutschland
Thermalcycler (PTC-200, Peltier)	MJ-Research, Waltham, USA
Tischzentrifuge: Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultra-Turrax	BANDELIN electronic, Berlin, Deutschland
Vibrotoms	Microm International, Walldorf, Deutschland
Zentrifuge AHT 35R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

3.1.2 Feinchemikalien

(-)Epicatechin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Acrylamid 4K-Lösung (30%)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Adenosindiphosphat	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Apocynin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
BAPTA-AM	Molecular Probes, Oregon, USA
Bovine Serum Albumine (BSA)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Diazepam	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Diethyl Pirocarbonate	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Fluoromount G	Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA
Formaldehydlösung (37%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formamid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glutaminsynthetase	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
H ₂ O ₂	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Hydroxylamine-HCl	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Imidazol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
L-Glutamine	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
LPS	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
MK-801	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
MnCl ₂	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Na-Arsenit	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
N-Azetylcystein	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
PBS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Peroxinitrit	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
Polyphenon60	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

3.1.3 Primärantikörper

Epitop	Quelle	Firma
8-OH(d)G	Maus	QED Bioscience San Diego, USA
DNP	Kaninchen	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
GAPDH	Maus	Biotrend, Köln, Deutschland
GFAP	Kaninchen	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
GFAP	Maus	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
GS	Kaninchen	Santa-Cruz Biotechnology, Santa-Cruz, USA
GS	Maus	Transduction Laboratories/Becton Dickinson, San Diego, CA, USA
MAP-2	Huhn	Chemicon International, Temecula, USA
NO ₂ Tyr	Kaninchen	Upstate Biotechnology, New York, USA
NO ₂ Tyr	Maus	Calbiochem Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland
NOVA-1	Kaninchen	Affinity Bioreagents, Grunberg, Deutschland
PSD-95	Kaninchen	Chemicon International, Temecula, USA

SNO-Cystein Kaninchen Sigma, Taufkirchen, Deutschland

3.1.4 Sekundärantikörper

Epitop	Quelle	Firma
Fluorochrom-gekoppelte Zweitantikörper	Anti-Maus Anti-Rabbit Anti-Huhn	Jackson Corp., West Grove, USA
HRPOD	Anti-Kaninchen	DAKO, Hercules, USA
HRPOD	Anti-Maus	BioRad, Hercules, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Präparation und Kultivierung von Astrozyten aus dem zerebralen Rattenkortex

Primäre Astrozyten wurden von Frau Brigida Ziegler aus Neurologischer Klinik aus Großhirnhemisphären neugeborener Wistar-Ratten präpariert und zur Verfügung gestellt (Matthiessen *et al.*, 1989). Nach Tötung der Tiere durch Äthernarkose und Inkubation für wenige Sekunden in 70%iger Ethanollösung wurde die Haut vom Kopf abgetrennt und der Schädel eröffnet. Das entnommene Hirn wurde entlang der Sagittallinie mit Hilfe einer Stereolupe durchtrennt. Die Meningen wurden entfernt und das aus beiden Hemisphären erhaltene Material zerkleinert und für 1min bei 1500U/min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen und Gewebestücke wurden in 2ml frischem Medium aufgenommen und durch wiederholte Triturierung vereinzelt. Anschließend wurde die Zelllösung mechanisch durch eine sterile Nylongaze (60µm Porengröße) gepresst und die erhaltene Zellsuspension auf zwei Gewebekulturflaschen verteilt. Die Zellen wurden für sieben Tage in einem Brutschrank unter Wasserdampfsättigung bei 95% Luft und 5% CO₂-Anteil kultiviert. Um die Reinheit der Astrozytenkulturen zu erhöhen, wurden die Flaschen für 12h bei 200U/min auf einen Schüttler gegeben, wodurch kontaminierende Mikroglia, Oligodendrozyten und Neurone von den adhären Astrozyten abgelöst und entfernt wurden (Booher und Sensenbrenner 1972). Alle präparativen Arbeiten wurden unter einer Frontluft-Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden bis zur Subkonfluenz kultiviert und anschließend mit Hilfe von EDTA/Trypsin von der Gewebekulturflasche abgelöst und auf neue Gewebekulturflaschen im Verhältnis 1:2 ausgesät. Nachdem die Zellen erneut einen subkonfluenten Monolayer gebildet hatten, wurden sie auf unbeschichtete Gewebekulturschalen (Ø60mm oder Ø100mm) oder Deckgläser (Ø12mm) subkultiviert. Das Kulturmedium der Astrozyten (DMEM + 10% FCS) wurde dreimal pro Woche erneuert. Das Wachstum der Zellen wurde am Phasenkontrast-Mikroskop überprüft und die Reinheit mittels Immunfluoreszenzanalyse der astroglialen Markerproteine *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und der Glutaminsynthetase kontrolliert. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurde das Wachstumsmedium (DMEM, 1000mg/l D-Glucose + 10% FCS) durch Medium ohne FCS-Anteil ersetzt, um eine Beeinflussung der Experimente durch FCS zu verhindern bzw. zu minimieren.

3.2.2 Anlage einer partiellen portalvenösen Ligatur

Zur Einstellung einer partiellen portalvenösen Ligatur wurden männliche Wistar-Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von ca. 160g verwendet (Aktenzeichen: AZ9.93.2.20.34.07.306). Die Tiere wurden in individuellen Käfigen unter kontinuierlicher

Futter- und Wasserzufuhr und 12h Lichtintervall gehalten. Die Operation der Tiere erfolgte unter aseptischen Bedingungen unter Verwendung eines Narkosegerätes („Sulla 808V“, Dräger Lübeck, Deutschland). Hiermit und unter zusätzlicher Nutzung einer Masken-Absaugvorrichtung (Völker, Kaltenkirchen, Deutschland) wurden die Tiere während des gesamten Eingriffes mit einem Isofluran/O₂ Gemisch (2%/98%) beatmet. Nach Eröffnung des Abdomens wurden 125 IE Heparin (Liquemin N) in das Abdomen injiziert und der Magen-Darm-Trakt so verlegt, dass die Portalvene sichtbar wurde. Zum Ausschluss von Effekten, die von der Operation der Tiere selbst ausgehen, aber nicht im Zusammenhang mit der Portalvenenligatur selbst stehen, wurde die Pfortader der Tiere der Kontrollgruppe für 60 Sekunden abgebunden und danach wieder gelöst (scheinoperierte Gruppe, „Sham“). Die Anlage der Portalvenenligatur erfolgte nach Chojkier *et al.*, (1981). Zur Anlage einer dauerhaften partiellen Ligatur der Portalvene wurde in der vorliegenden Arbeit ein 2.0 Seidenfaden verwendet, der um die Portalvene gelegt wurde. Nach Anlegen eines 20G-Mandrins (B. Braun, Melsungen, Germany) an die Portalvene wurde der darum platzierte Seidenfaden zugezogen, verknotet und nach Entfernen des 20G-Mandrins dann eine definierte Stenose der Portalvene erzielt. Zur postoperativen Analgesie wurde Carprofen (Rimadyl, 1mg/kg KG) in das Abdomen injiziert und die Tiere unter kontinuierlicher Kontrolle der Vitalfunktionen bis zur Tötung gehalten, und nachfolgend der zerebrale Kortex für die RNA-Gewinnung und Analyse im Northwestern-Blot genutzt.

3.2.3 Einstellung einer akuten Hyperammonämie in der Ratte

Zur Induktion einer akuten Hyperammonämie wurden männlichen Wistar-Ratten (250-300g) Ammoniumazetat in einer Konzentration von 4,5mmol/kg KG intraperitoneal injiziert (Aktenzeichen: AZ50.05-230-3-65/01). Nach etwa 10min trat für ca. 20min ein transientes Koma (Bewusstseinsverlust und Bewegungslosigkeit, keine Reflexe auf akustische oder optische Reize) ein. Kontrolltieren wurde eine physiologische Kochsalzlösung injiziert. Am Ende eines Experiments (1h, 6h oder 24h nach Injektion von Ammoniumazetat) wurden die Tiere durch Injektion einer letalen Dosis Pentobarbital (70mg/kg) getötet und die Körper transkardial mit 20ml einer physiologischen Kochsalzlösung (versetzt mit 10000U/l Heparin (Liquemin, Hoffmann La Roche, Basel, Switzerland) blutfrei perfundiert. Die für Immunfluoreszenzanalysen vorgesehenen Tiere wurden nachfolgend durch transkardiale Perfusion mit 250ml Formaldehyd fixiert. Die entnommenen Hirne wurden unmittelbar danach in 100ml einer physiologischen Kochsalzlösung, der 20% Sucrose als Gefrierschutz zugesetzt wurde, eingelegt. Ein anderer Teil des Probenmaterials wurde unmittelbar nach Präparation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nachfolgend wie oben beschrieben für die Herstellung von Protein- oder RNA-Proben prozessiert.

3.2.4 Humane *post mortem* Hirnbiopsien

In der vorliegenden Arbeit wurde humanes *post mortem* Hirngewebe aus dem zerebralen Kortex (Grenzbereich: parietal/occipital) von 16 Patienten aus europäischer Patientengruppe untersucht (8 Kontrollen und 8 Patienten mit Leberzirrhose und HE). In die Kontrollgruppe wurden ausschließlich Patienten eingeschlossen, die keine Anzeichen für das Vorliegen einer neurologischen oder hepatischen Erkrankung zum Todeszeitpunkt aufwiesen. Für jeden Patienten lag entweder ein schriftliches Einverständnis zur Körperspende für wissenschaftliche Zwecke vom Patienten selbst oder von einem Angehörigen vor. Das hier untersuchte Autopsiematerial der Kontrollgruppe und der Leberzirrhosepatienten mit HE wurde vom Organspenderprogramm des Instituts für Anatomie der Heinrich-Heine-Universität zur Verfügung gestellt (Studiennummer:4863). Hirnbiopsiematerial einer separaten Kontrollgruppe und einer dazu gehörigen Gruppe von Zirrhosepatienten ohne hepatische Enzephalopathie wurde vom australischen Hirnspenderprogramm (4 Kontrollen und 4 mit Leberzirrhose ohne HE) „NSW Tissue Resource Centre“ (unterstützt durch die Universität von Sydney, National Health and Medical Research Council of Australia, Schizophrenia Research Institute, National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism, NSW Department of Health) zur Verfügung gestellt. Demographische und klinisch relevante Patienteninformationen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Demographie und klinische Patienteninformationen.

Die klinische Diagnose einer HE wurde entweder in der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf oder in der Abteilung für Innere Medizin im Universitätsklinikum Patras (Griechenland) gestellt. *TIPS: transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt (Görg *et al.*, 2010)

Europäische Patientengruppe

Nr.	Geschlecht	Alter	Diagnose	Post mortem Zeit (h)
<i>Kontrollgruppe ohne Leberzirrhose</i>				
1	m	64	Respiratorische Insuffizienz, Lungenembolie	5
2	w	76	Myokardinfarkt	24
3	w	63	Herzinsuffizienz	8
4	w	63	Suizid durch Ersticken	23
5	m	79	Pankreaskarzinom	9
6	m	44	Herzstillstand, Bronchialkarzinom	25
7	w	66	Myokardinfarkt	18
8	m	61	Pankreaskarzinom	12-14
<i>Patienten mit Leberzirrhose und hepatischer Enzephalopathie</i>				
1	m	68	Zirrhose durch Hepatitis B	<12
2	w	45	Äthyltoxische Zirrhose Z.n. TIPS*-Anlage	17
3	m	36	Äthyltoxische Zirrhose Z.n. TIPS*-Anlage	6
4	m	69	Äthyltoxische Zirrhose	<12
5	m	63	Äthyltoxische Zirrhose	13,5
6	m	57	Äthyltoxische Zirrhose	9
7	w	57	Äthyltoxische Zirrhose Z.n. TIPS-Anlage	12
8	m	61	Leberzirrhose bei Hepatitis C-Infektion; Hepatozelluläres Karzinom	<24

Australische Patientengruppe

Nr.	Geschlecht	Alter	Diagnose	Post mortem Zeit (h)
-----	------------	-------	----------	----------------------

Kontrollgruppe ohne Leberzirrhose

1	m	60	GIST-Tumor	25
2	w	71	Adenokarzinom des Pankreas	16
3	m	46	Akuter Myokardinfarkt	29
4	w	49	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie, ARVD	15

Patienten mit Leberzirrhose ohne hepatische Enzephalopathie

1	m	52	Alkoholintoxikation bei äthyltoxischer Leberzirrhose	35
2	m	37	Alkoholintoxikation bei äthyltoxischer Leberzirrhose	17
3	m	50	Ösophagusvarizenblutung	26,5
4	m	58	Akute Myokardischämie	20

Tabelle3: Übersicht der Laborparameter der Patientengruppe mit Leberzirrhose und HE aus der europäischen Kohorte.

Die Blutwerte wurden entweder am Tag des Versterbens (Patient 8) oder am Tag davor (Patient 1,2,3,5,6 und 7) bestimmt. Die Referenzbereiche sind in den entsprechenden Spalten aufgeführt (Görg *et al.*, 2010).

Nr.	Na 135-145mmol/L	Harnstoff 18-15mg/dL	Kreatinin <1.2mg/dL	Albumin 3.3-4.7g/dL	Bilirubin <1.0mg/dL	Leukozyten 4.0- 11.0x1000/ μ l	CRP <0.5mg/dL	Quick 70-100%	Ammoniak <60 μ mol/L
1	131	146	2.6	3.1	19.0				
2	122	258	2.9	2.4	0.8	30	14.9	37	97
3	138	148	1.5	1.8	20.0	22.9	4.6	10	154
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	120	226	7.9	1.8	29.0	2.5	1.0	13	148
6	158	310	5	2.0	36.8	27.3	1.6	29	86
7	126	94	2.4	2.1	11.6	15.8	5.8	26	48
8	141	159	4.1	-	1.98	2.9	1.1	59	343

3.2.5 Western- und Dot-Blot-Analyse

Proteinproben wurden wie nachfolgend beschrieben für die Western-Blot-Analyse hergestellt. Auf 60mm und 100mm Petri-Schalen bis zur Konfluenz kultivierte Astrozyten wurden experimentell behandelt oder blieben unbehandelt, bevor die Zellen mit 200-600µl RL-Lysepuffer (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) versetzt und mit einem Zellschaber mechanisch abgelöst wurden. Anschließend wurden die Zelllysate für 10min bei 20000xg bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand weiterverwendet.

Für die Herstellung von Proteinlysaten wurden die blutfrei perfundierten und schockgefrorenen Rattenhirne (Aktenzeichen: AZ50.05-230-3-65/01 und AZ84-02.04.2011.A166) mit eiskaltem RL-Puffer versetzt und mit einem Ultra-Turrax aufgeschlossen. Das erhaltene Lysat wurde dreimal wie oben beschrieben zentrifugiert. Wo erforderlich, wurde die Proteinkonzentration durch Zugabe von RL-Puffer erniedrigt und die Proteinkonzentration nachfolgend mittels Bradford-Assay bestimmt. Die Proteinlysate wurden so verdünnt, dass die photometrische Messung der Absorption des Bradford-Reagenz bei 595nm im linearen Bereich erfolgen konnte. Die in den Western-Blots eingesetzte Proteinmenge lag zwischen 20-120µg/Lane. Vor Verwendung wurden die Proteinproben mit 2xSDS-Auftragspuffer (Tris/HCl pH 8,8; 220mmol/L; EDTA 22,5mmol/L; SDS 9%; Glycerin 40%; Bromphenolblau 0,125%; DTT 200mmol/L) versetzt und bei 95°C denaturiert.

Die Gelelektrophorese erfolgte in Polyacrylamidgelen mit Trenngelen unterschiedlicher PAA-Konzentrationen (10-12%). Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel erfolgte bei 140V, das Auftrennen der Proteine bei 160-200V für 4-6h. Als Proteinstandard wurden der Rainbow Molecular Weight Marker (Amersham) oder der SeeBlue Plus2 Marker (Invitrogen) verwendet. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die in den Gelen aufgetrennten Proteingemische in Transferpuffer (39mmol/L Glyzin; 48mmol/L Tris/HCl; 0,03% SDS; 20% Methanol) nach dem Semidry-Verfahren in einer ElektrobloTTing-Kammer auf Nitrozellulosemembran geblottet. Dabei wurde das Gel zwischen jeweils mindestens 6-8 Lagen Whatman-Papier auf der Nitrozellulose positioniert. Der Blottingprozess dauerte 2h. Die erforderliche Stromstärke wurde mit $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$ Gelfläche kalkuliert. Transferfehler wurden durch Anfärben der Membran mit Ponceau-S kontrolliert und anschließend bei erfolgreichem Transfer eine Immundetektion eingeleitet. Hierfür wurde zunächst die Nitrozellulose mit 3-5% BSA in TBS-T (Tris 20mmol/L; pH 7,5; NaCl 150mmol/L; Tween-20 0,1%) für mindestens 1h abgesättigt und nachfolgend in einer primären Antikörperlösung mit einer Verdünnung von 1:1000-1:5000 in 3-5% BSA für

mindestens 2h bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T erfolgte die Inkubation der Membran unter den gleichen Bedingungen mit einem HRPOD-gekoppeltem Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:10000 in TBS-T. Nach Entfernen des ungebundenen Zweitantikörpers durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T wurden die Immunkomplexe mit der Hilfe des Enhanced Chemilumineszenz Detektion Kit detektiert. Dabei wurde die Lichtemission der Chemilumineszenz von Luminol mit Hilfe von Kodak X-OMAT AR-5 Filmen oder direkt mittels der KODAK Image Station 440CF digital detektiert. Für die Immundetektion spezifischer kovalenter Proteinmodifikationen wurde alternativ zum Western-Blot- ein Dot-Blot-Verfahren durchgeführt. Hierfür wurden die Proteinlysate auf eine Nitrozellulosemembran punktuell aufgebracht. Dabei wurde eine definierte Proteinmenge (1,5-3µg) auf die Membran pipettiert und für mindestens 10min bei Raumtemperatur getrocknet. Alternativ wurde eine Slot-Blot-Apparatur verwendet. Die Verwendung der Apparatur erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Zur Absättigung freier Membranbereiche wurden die Membranen wie bereits für den Western-Blot beschrieben mit 3-5% BSA-Lösung abgesättigt und mit den Antikörperlösungen prozessiert.

3.2.6 RNA-Präparation und Messung der RNA-Konzentration

RNA wurde aus kultivierten Astrozyten oder Rattenhirngewebe mit dem RNeasy Mini Kit entsprechend dem Herstellerprotokoll isoliert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte durch photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm (Ultrospec 2100 Spectrophotometer, Biorad, Hercules, USA) sowie fluorimetrisch unter Verwendung des Quant-iT Ribogreen RNA Assay Kits nach Vorgaben des Herstellers.

3.2.7 Kapillarelektrophoretische Messung der RNA-Integrität

Um eine RNA-Degradation durch ubiquitär vorkommende RNasen auszuschließen, wurden RNA-Integritätsmessungen mit dem Bioanalyzer 2100 (Agilent) durchgeführt. Das Messprinzip basiert auf einer miniaturisierten Kapillarelektrophorese. In einem Minichip werden die RNA-Fragmente über eine spannungsabhängige Gelelektrophorese nach deren Molekulargewicht aufgetrennt. Die Erfassung der RNA erfolgt dabei durch Anfärben und laserinduzierter Fluoreszenzdetektion. Die Menge der gemessenen Fluoreszenz korreliert mit der Menge an RNA einer bestimmten Größe in einer Probe.

3.2.8 Northwestern- und Slot-Blot-Analyse

Für die Northwestern-Blot-Analysen wurden 2% Formaldehyd-Gele mit einem Agaroseanteil von 0,8% verwendet. Pro Probe wurde eine RNA-Menge von 5µg/Lane auf

das Formaldehyd-Gel aufgetragen. Vor elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proben mit 20µl Auftragspuffer (100% Formamid; 37% Formaldehyde; 10xMOPS; 100%Glycerin; DEPC-Wasser; 1% Brophenolblau) versetzt und bei 65°C für 10 min denaturiert. Anschließend wurde das Gel für 15min in einer NaOH-Lösung (50mmol/L), und nachfolgend in 20xSSC-Puffer (3M NaCl; 0,3M Natriumcitrate; pH 7,0) für 45min inkubiert. Das Auftrennen von RNA erfolgte für 3h bei 100V. Anschließend wurden die im Agarose-Gel enthaltenen RNA-Spezies über Nacht auf die Nitrozellulosemembran mittels kapillaren Transfers geblottet (siehe Abb.: 3.1).

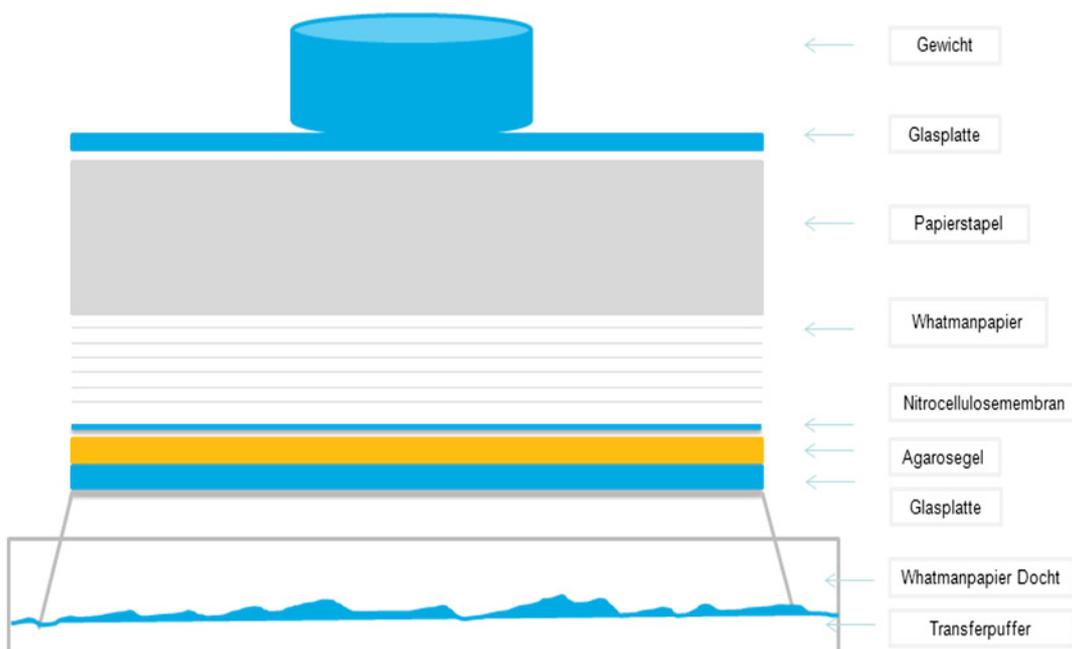


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Kapillartransfers von RNA auf die Nitrozellulosemembran (Modifiziert nach Alberts *et al.* 2004, Essential Cell Biology)

Für die Analyse der RNA-Oxidation wurden RNA-Präparationen auf Nitrozellulosemembran mittels einer Slot-Blot-Apparatur übertragen (Slot-Blotkammer Minifold II (Schleicher and Schuell, Dassel, Deutschland)). Pro Probe wurde 1-2µg RNA verwendet und das Volumen auf 76µl mit Aquadest und Auftragspuffer (100% Formamid (Endkonzentration von 50%), 37% Formaldehyd (Endkonzentration von 7% und 20x SSC (1xfinal)) angeglichen und bei 68°C für 18min hitzebehandelt und anschließend mittels einer Slot-Blot-Kammer auf die Nitrozellulosemembran gespottet. Die Fixierung der Nucleinsäuren auf der Membran erfolgte durch Trocknen bei 70°C im Hybridisierungsöfen für 60min. Die Beladung des Gels und der Transfer wurden durch das Anfärben der Membran mit Methylenblau (0,2% Methylenblau; 0,3M Na-Azetat) kontrolliert.

Anschließend wurde die Membran wie oben beschrieben (siehe 3.2.5) prozessiert. Der Nachweis oxidierter RNA wurde mit einem anti-8-OH(d)G-Antikörper (QED Biosciences) durchgeführt. Hierfür wurde die Nitrozellulosemembran in der Antikörperlösung für 1h bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.9 Densitometrische Quantifizierung von Western- und Dot-Blots

Die densitometrische Auswertung der Schwärzung der Filme und der digitalen Aufnahmen (Kodak Digital Image Station 440CF) erfolgte unter Verwendung der Auswertungssoftware 1D (Eastman Kodak Co., Rochester, USA).

3.2.10 Bestimmung des Blutammoniakgehalts

Der Blutammoniakspiegel wurde mit Hilfe des Ammonia Checker II (Nobis Labordiagnostica GmbH, Endingen, Germany) im Blut von Wistar-Ratten nach Tötung der Tiere bestimmt. Hierfür wurde venöse Blut aus dem rechten Ventrikel entnommen und auf einen Teststreifen gegeben (Menarini Diagnostics GmbH Berlin, Germany). Die kolorimetrische Veränderung des Teststreifens nach Zugabe des Blutes ist ein Maß für die Ammoniakkonzentration und wurde entsprechend den Herstellerangaben photometrisch mit dem Ammonia Checker II quantifiziert.

3.2.11 Präparation vitaler Maushirnschnitte

Vitale Maushirnschnitte wurden von Dr. Oliver Selbach aus dem Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie präpariert und zur Verfügung gestellt. Männliche C57/BL6-Mäusen (2,5-4,5 Monate alt) wurden durch intraperitoneale Injektion von Pentobarbital narkotisiert und nachfolgend dekapitiert. Nach Freipräparation des Gehirns wurden 500µm-dicke Kortexschnitte mit Hilfe eines Vibrotoms (Microm International, Walldorf, Deutschland) angefertigt. Unmittelbar danach wurden die Kortexschnitte in DMEM-Medium (1000g/L D-Glucose, ohne Phenolrot) mit Carbogen (5%CO₂; 95%O₂) für 3-4h kultiviert. Anschließend wurden die Schnitte mit NH₄Cl (5mmol/L) oder TNF-α (50ng/ml) für 6h in mit Carbogen-begastem DMEM-Medium inkubiert. Am Ende des Experiments wurden die vitalen Mausschnitte für die Slot- und Northwestern-Blot-Analyse verwendet.

3.2.12 Immunfluoreszenzanalyse

Für Immunfluoreszenzanalysen wurden Wistar-Ratten durch intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (70mg/kg KG) getötet, transkardial mit Kochsalzlösung blutfrei perfundiert (Aktenzeichen: AZ50.05-230-3-65/01 und AZ84-02.04.2011.A166), gefolgt durch Fixierung mit formaldehydhaltiger Lösung. Anschließend wurden die Gehirne freipräpariert

und in 20% Sucrose für 24h bei 4°C eingelegt und mittels eines Kryotoms Hirnschnitte in einer Dicke von 50µm angefertigt (AktENZEICHEN: AZ50.05-230-3-65/01).

Unmittelbar vor Anfärben der Präparate wurden die Kryoschnitte mit PBS bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln dreimal für jeweils 15min gewaschen. Zur Verminderung einer unspezifischen Antikörperbindung, wurden die Hirnschnitte in einer Blockierlösung (0,3% Saponin und 10% Ziegenserum in PBS) inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:100-1:500 in PBS mit 0,1% Saponin und 2% Ziegenserum) erfolgte über einen Zeitraum von 48h bei 4°C. Anschließend wurden die Schnitte dreimal jeweils für 15min mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Schnitte mit unterschiedlichen fluoreszenzgekoppelten (FITC; Cy3 oder Cy5) Sekundärantikörpern (1:100-1:200 in PBS mit 0,1% Saponin und 2% Ziegenserum) für 48h bei 4°C inkubiert und abschließend mit PBS dreimal jeweils für 15min bei RT gewaschen und in Einbett-Medium (Fluoromount G, Southern Biotech, Alabama, USA) zur Protektion der Fluoreszenz konserviert.

3.2.13 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Ein Konfokalmikroskop (oder CLSM für "*confocal laser scanning microscope*") ist ein Lichtmikroskop, welches ein außerhalb zu fokussierender Ebene stammendes Streulicht mit Hilfe einer Lochblende daran hindert auf den Detektor zuzugehen. Dadurch wird es möglich hochauflösend Schichtaufnahmen anzufertigen die für dreidimensionale Rekonstruktion genutzt werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde ein LSM510meta der Firma ZEISS unter Verwendung von 4 verschiedenen Lasern unterschiedlicher Wellenlängen genutzt (Ar/ML: $\lambda=450-530\text{nm}$; HeNe: $\lambda=633\text{nm}$, $\lambda=543\text{nm}$; Diode: 405nm).

3.2.14 Immunpräzipitation/Immundepletion spezifischer Proteine und oxidierter RNA

Für die Immunpräzipitation von Proteinen wurden jeweils identische Proteinkonzentrationen in den zu vergleichenden Proben gewählt. Einer definierten Menge an Protein wurden zwischen 1,5–3µg Antikörper hinzugefügt und für 4-6h bei 4°C in einem Probenrotor inkubiert. Nachfolgend wurden Immunglobuline durch Zugabe von Protein-A/G-Agarose (Santa-Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA bzw. µMACS Microbeads, Miltenyi, Biotech) präzipitiert. Hierfür wurden die Proben im Überkopffrotor bei 4°C über Nacht inkubiert. Immunpräzipitierte Proteine wurden durch Waschen der Beads mit einer Pufferlösung (PBS; bzw. RL-Puffer (20mmol/L Tris pH 7,4; 140mmol/L NaCl; 10mmol/L NaF; 10mmol/L Natriumpyrophosphat x10H₂O; 0,1% Triton X-100; 1mmol/L EDTA;

1mmol/L EGTA; 1mmol/L Natriumorthovanadat; 20mmol/L β -Glycerophosphat)) von den nicht gebundenen Bestandteilen der Proben getrennt. Im Falle der Agarose wurden die Präzipitate bei 3000g in einer Eppendorf-Tischfuge für 3min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die verbliebene Agarose erneut mit Puffer versehen. Nachfolgend wurde dieser Waschschrift noch zweimal wiederholt, bevor die Immunkomplexe in Auftragspuffer aufgenommen und bei 95°C inkubiert wurden.

Die Aufreinigung von Immunpräzipitaten mittels MACS erfolgte, indem die Microbead/Probensuspension über μ MACS-Columns in einem Mini-MACS-System gegeben wurden. Nachfolgend wurden die Columns dreimal mit PBS bzw. RL-Puffer gespült, bevor immunpräzipitierte Proteine mittels 2xSDS Puffer aus der Säule eluiert wurden. Für die Immunpräzipitation oxidierter RNA wurde isolierte RNA in einer definierten Menge von 5 μ g pro Ansatz verwendet. Die Proben mit entsprechenden Kontrollen wurden zunächst mit 1,5 μ g anti-8-OH(d)G-Antikörper für 2h bei 4°C versetzt und anschließend mit 30 μ l μ MACS ProteinA/G-Microbeads für 2h bei 4°C inkubiert. Die Separation immunpräzipitierter RNA von nicht präzipitierter RNA erfolgte unter Verwendung von μ MACS- bzw. MultiMACS-Säulen. Die präzipitierte, in den MACS-Säulen gebundene RNA wurde von den Säulen durch Hinzugabe von erhitztem (95°C) RNase-freiem Wasser eluiert. Anschließend wurde eine fluorimetrische Quantifizierung der RNA-Menge im Depletat und Präzipitat mittels Ribogreen-Reagenz durchgeführt. Abschließend wurde die RNA für die PCR-Analyse weiter prozessiert und mit Hilfe des First Strand cDNA Synthesis Kits (Roche, Mannheim, Deutschland) in cDNA umgeschrieben.

3.2.15 Semiquantitative Polymerasekettenreaktion

Nach cDNA-Synthese wurden zur Identifizierung oxidierter RNA-Spezies nachfolgende Gene analysiert: GLAST (Glutamat/Aspartat-Kotransporter) GABA_b-R1 (*gamma butyric acid receptor b subtype R1*) und 18S (*ribosomal RNA subunit 18S*). Die PCR wurde mittels eines Thermocyclers (PTC-200, Peltier Thermocycler, MJ-Research, Waltham, USA) durchgeführt. Es wurden 40 PCR-Zyklen gefahren; die Denaturierung erfolgte für 30sek bei 96°C, das Annealing 30sek bei 56°C und die Extension 1min bei 74°C.

Die Sequenz der hierbei verwendeten Primer ist nachfolgend aufgeführt :

GLAST	Sense	5'-CAG-CGC-TGT-CAT-TGT-GGG-TA-3'
	Antisense	5'-TTA-TAC-GGT-CGG-AGG-GCA-AA-3'
GABA _b -R1	Sense	5'-CGT-CTT-CTT-CTG-CTG-GTG-AT-3'
	Antisense	5'-AAG-TCC-CAC-GAT-GAT-TCG-AG-3'

18S-RNA	Sense	5'-GCC-TAG-ATA-CCG-CAG-CTA-GGA-3'
	Antisense	5'-TCA-TGG-CCT-CAG-TTC-CGA-A-3'

Die amplifizierten Fragmente wurden anschließend auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen und durch das Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid unter einer UV-Lampe visualisiert. Die Größe der amplifizierten Fragmente wurde unter Verwendung von DNA Ladder MassRuler (Low Range, Fragmentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) bestimmt.

3.2.16 Denitrase-Assay

Untersuchungen zur Identifizierung einer denitrierenden Aktivität in Hirn-, Leber- und Milzextrakten wurden nach einem modifizierten Protokoll von Kamisaki Y. *et al.* (1998) durchgeführt. Leber und Milzgewebe wurde von Lipopolysaccharid-behandelten (LPS) Ratten entnommen (intraperitoneale Bolusinjektion von 4mg/kg KG in NaCl 0,9%, Organentnahme nach 24h). Hirngewebe wurde aus dem zerebralen Kortex unbehandelter Ratten präpariert (Aktenzeichen: AZ50.05-230-35/03). Der Probenaufschluss, sowie die Proteinbestimmung erfolgten entsprechend wie vorhergehend in Abschnitt Western-Blot- und Dot-Blot-Analysen beschrieben. Als Substrat wurde 50ng mit ONOO⁻-behandelter Glutaminsynthetase verwendet, die mit 40µg des entsprechenden Gewebes in Gegenwart von 2mmol/L CaCl₂ und 2mmol/L MgCl₂ versetzt wurde. Das Gemisch wurde nachfolgend für 1h bei 37°C inkubiert. In Kontrollexperimenten wurden die zu testenden Gewebeproben vor Verwendung im Assay hitzeinaktiviert (95°C, 1min). Nach Beendigung des Experiments wurden die Proben, wie vorhergehend bereits beschrieben, mittels Western- und Dot-Blot-Verfahren analysiert oder die Glutaminsynthetaseaktivität gemessen.

3.2.17 Messung des proteasomalen Abbaus durch das 20S Proteasom

Die Messung des proteasomalen Abbaus der Glutaminsynthetase durch das 20S Proteasom erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Grune T. *et al.* (1997). Im Assay wurden 50ng Glutaminsynthetase mit 1µg 20S Proteasom versetzt und anschließend in Proteolysispuffer (50mmol/L HEPES; 20mmol/L KCl; 5mmol/L Mg(Ac)₂ und 0,03% SDS; pH 7,8) bei 37°C für 6h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2xSDS Puffer und Erhitzen (95°C, 5min) gestoppt und die Proben nachfolgend für Western-Blot-Analysen verwendet. Zur Validierung der proteasomalen Aktivität des 20S Proteasoms wurden Messungen mit dem durch das Proteasom spaltbaren Peptids Suc-LLVY-MCA durchgeführt. Die Spaltung des Peptids bewirkte die Bildung eines

fluorogenen Produkts, das mit Hilfe eines Photometers (Ascent-FL, Thermo Electron) quantifiziert wurde (Anregung bei 380nm, Emission bei 460nm).

3.3 Glutaminsynthetase-Assay

Die Messung der Glutaminsynthetaseaktivität erfolgte nach einem Protokoll von Webb and Brown (1976). Die hier angewendete Aktivitätsmessung beruht auf der durch die Glutaminsynthetase katalysierten Glutamyltransferasereaktion. Hydroxylamin dient dabei als Substrat für die Bildung von γ -glutamyl-Hydroxamat, welches nach Reaktion mit FeCl_3 einen bräunlichen Farbkomplex bildet, dessen charakteristische Absorption bei 500nm photometrisch quantifiziert werden kann. Im Assay wurden 100 μl Probenlysat mit 600 μl einer Reaktionslösung (60mmol/L Imidazol-HCl (pH 6,8); 20mmol/L Natriumarsenat; 60mmol/L L-Glutamin; 15mmol/L Hydroxylamin-HCl; 3mmol/L MnCl_2 und 0,4mmol/L ADP) für 1h bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 600 μl Stopplösung (200mmol/L Trichloressigsäure, 670mmol/L HCl und 370mmol/L FeCl_3) beendet. Die Proben wurden nachfolgend bei 20.000xg für 10min bei 4°C zentrifugiert. Die Messung der Absorption erfolgte in einem Photometer (Ultrospec 2100, Biorad, Hercules, USA) bei einer Wellenlänge von 500nm.

3.3.1 Statistische Auswertung

Alle in dieser Arbeit statistisch ausgewerteten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte unter Einbeziehung von mindestens 3 individuellen und unabhängigen Experimenten bzw. Proben. Statistisch signifikante Veränderungen wurden mittels eines zweiseitigen T-Tests nach Student identifiziert. Dabei wurde ein α -Fehler von $<0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung zur Wirkung Peroxynitrit-vermittelter kovalenter Proteinmodifikationen auf die Aktivität der Glutaminsynthetase

4.1.1 Validierung eines in vitro Testsystems zur Untersuchung der Peroxynitrit-vermittelten Wirkung auf die Glutaminsynthetase

Zur Überprüfung der Wirkung von Peroxynitrit auf posttranslationale Proteinmodifikationen und deren Einfluss auf die enzymatische Aktivität der Glutaminsynthetase (GS) wurden kommerziell erhältliche Glutaminsynthetasepräparationen aus dem Schafshirn verwendet und diese auf Reinheit durch Western-Blot-Analyse untersucht. Wie aus der Abbildung 4.1 ersichtlich, ist nach Elektrophorese der Glutaminsynthetasepräparationen im PAA-Gel und Anfärbung der Membran durch Coomassie-Blue eine Doppelbande im Bereich der zu erwarteten Laufhöhe der Glutaminsynthetase (ca. 45 kDa) erkennbar. Zur Identifizierung wurden diese Peptide aus dem Gel ausgeschnitten und nach enzymatischem Verdau mittels eines kombinierten Verfahrens Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation und Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator (MALDI-TOF) im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf analysiert. Durch Sequenzanalyse konnte sowohl das obere, als auch das untere Peptid als Glutaminsynthetase identifiziert werden. Da nicht alle Fragmente nach tryptischem Verdau in der MS-Analyse wiedergefunden wurden, gelang keine vollständige Sequenzanalyse. Daher bleibt die Ursache der unterschiedlichen Molekulargewichte unklar.

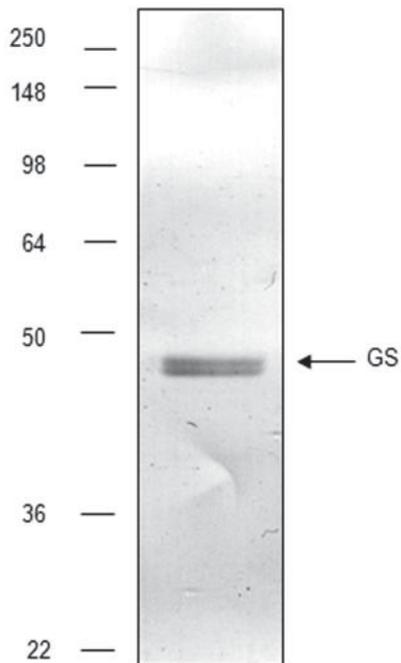


Abbildung 4.1: Überprüfung der Reinheit aus dem Schafhirn isolierter Glutaminsynthetase mittels Western-Blot-Analyse und Coomassie-Blau-Färbung.

20µg Glutaminsynthetase wurde auf ein PAA-Gel aufgetragen, auf Nitrozellulosemembran geblottet und anschließend die Membran mit Coomassie-Blau angefärbt. Quelle: Görg *et al.*, 2007

4.1.2 Identifizierung der Peroxynitrit-vermittelten Proteinmodifikationen an isolierter Glutaminsynthetase und deren Einfluss auf die enzymatische Aktivität

Unter Verwendung verschiedener Peroxynitrit (PN, ONOO^-)-Konzentrationen im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 50µmol/L wurde der Einfluss von PN auf die Proteintyrosinnitrierung (PTN), S-Nitrosylierung (SNO) und Karbonylierung der Glutaminsynthetase (GS) mit Hilfe von jeweils der Modifikation entsprechenden spezifischen Antikörpern in der Dot-Blot-Analyse untersucht. Wie in Abbildung 4.2 erkennbar ist, induzierte PN bereits ab einer Konzentration von 5µmol/L eine signifikante, gegenüber der Kontrolle ca. 4-fach erhöhte PTN der GS. Unter dieser Bedingung konnte hingegen keine verstärkte S-Nitrosylierung oder Karbonylierung des Enzyms gefunden werden. Höhere PN-Konzentrationen induzierten einen weiteren Anstieg der Tyrosinnitrierung sowie beginnend bei einer PN-Konzentration von 10µmol/L wurde ein signifikanter Anstieg der S-Nitrosylierung beobachtet. Eine deutliche Zunahme der Karbonylierung um das 2-fache der Kontrolle konnte hingegen erst bei Verwendung der höchsten hier eingesetzten PN-Konzentration beobachtet werden (50µmol/L).

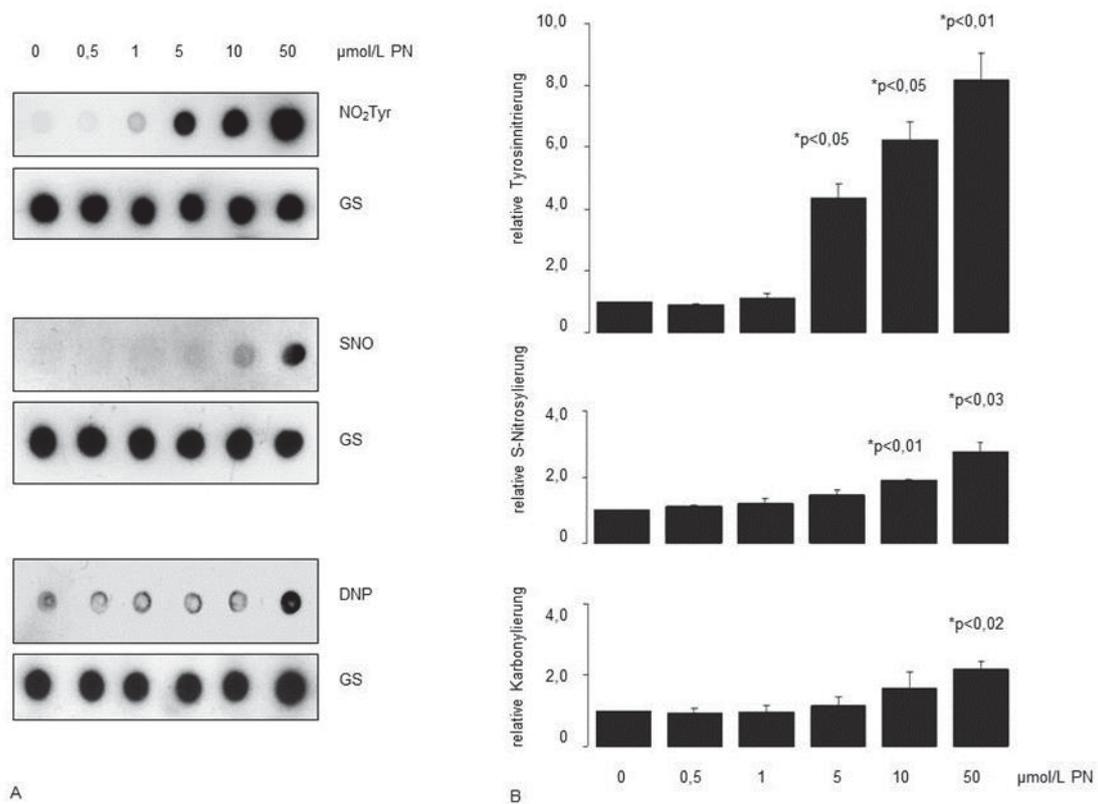


Abbildung 4.2: Nachweis von kovalenten Proteinmodifikationen an der isolierten, mit PN-behandelten Glutaminsynthetase.

Die Glutaminsynthetase wurde mit aufsteigender PN-Konzentration von 0,5 bis 50 µmol/L behandelt und auf Nitrozellulosemembran gedotet. Nachfolgend wurde die Membran auf Tyrosinnitrierung, S-Nitrosylierung und Karbonylierung unter Verwendung von spezifischen Antikörpern untersucht. Die Beladung wurde durch die Detektion von Gesamt-GS kontrolliert (A). Die densitometrischer Analyse von Dots wurde auf die GS-Expression normiert und statistisch ausgewertet (B). Quelle: Görg *et al.*, 2007

Zur Bestimmung des Einflusses von PN auf die GS-Aktivität wurde aufgereinigte GS mit PN in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 50 µmol/L behandelt. Beginnend ab einer PN-Konzentration von 1 µmol/L konnte eine signifikante Verminderung der GS-Aktivität um ca. 10% beobachtet werden, die dosisabhängig weiter bis zu einer residualen Aktivität von ca. 30% bei Verwendung einer PN-Konzentration von 50 µmol/L abfiel (Abb. 4.3 A).

Zur Korrelation von GS-Tyrosinnitrierung und GS-Aktivitätsverlust wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. Wie in Abbildung 4.3B ersichtlich, existiert ein deutlich negativer linearer Zusammenhang zwischen den beiden Merkmalen „GS-Aktivität“ und „Tyrosinnitrierung der GS“ mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=0,97$. Diese Daten belegen einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der GS-Tyrosinnitrierung und dem Aktivitätsverlust der GS nach Behandlung mit PN.

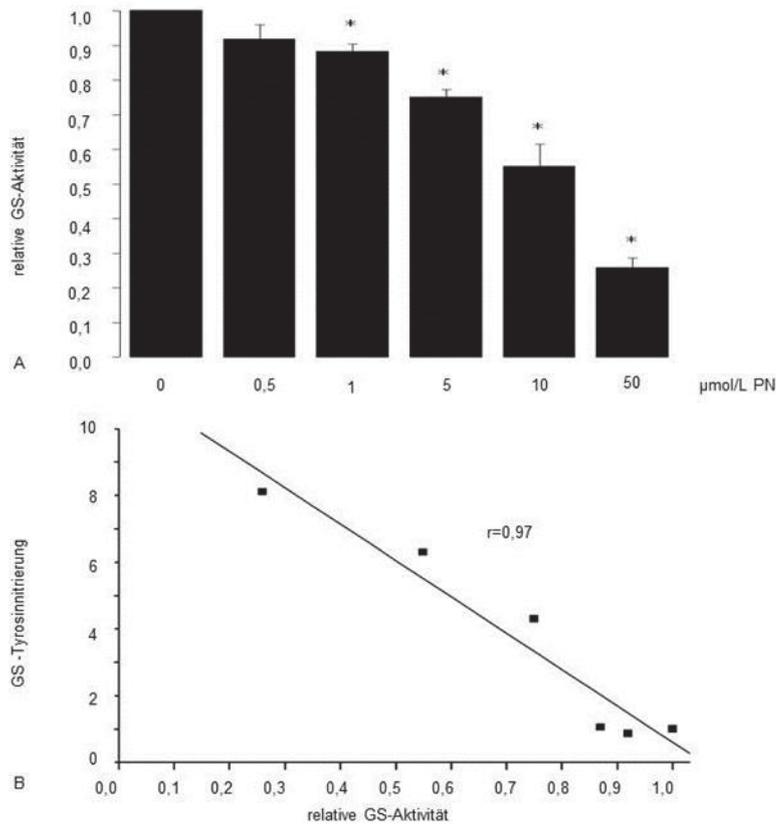


Abbildung 4.3: Korrelation zwischen Tyrosinnitrierung der GS und enzymatischer Aktivität.

Die GS wurde mit aufsteigenden PN-Konzentrationen zwischen 0,5-50 $\mu\text{mol/L}$ wie oben beschrieben behandelt und die Aktivität der GS mittels GS-Assay untersucht. Die statistische Analyse zeigte einen von der PN-Konzentration abhängigen Abfall der GS-Aktivität. Eine signifikante Verminderung der enzymatischen Aktivität war bereits bei einer PN-Konzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ zu beobachten. Bei Verwendung von 50 $\mu\text{mol/L}$ PN war eine residuale Aktivität von 30% messbar(A). Eine Korrelation zwischen PN-induzierter Tyrosinnitrierung und GS-Aktivitätsverlust wurde mittels Regressionsanalyse ermittelt(B). Korrelationskoeffizient $r=0,97$ ($n=3$). Quelle: Görg *et al.*, 2007

Zur Abschätzung des Anteils tyrosinnitrierter GS nach Behandlung mit 5 $\mu\text{mol/L}$ PN wurden NO_2Tyr -Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Hierbei wurde die tyrosinnitrierte GS mit einem monoklonalen gegen NO_2Tyr -gerichteten Antikörper aus der mit ONOO^- -behandelten GS-Lösung präzipitiert und der nicht präzipitierte Anteil für die Western-Blot Analyse weiterverwendet. Im Western-Blot fand sich in diesen NO_2Tyr -Immundepletaten eine deutlich abgeschwächte NO_2Tyr -Immunreaktivität (um ca. 65% geringer gegenüber der nicht immundepletierten PN-behandelten Probe). Dieses Ergebnis zeigt, dass die tyrosinnitrierte GS nicht vollständig entfernt wurde. In parallel dazu durchgeführten Western-Blot-Analysen wurde die GS mit Hilfe eines anti-GS-Antikörpers detektiert. Auch hier zeigte sich ein Abfall der GS-Immunreaktivität um ca. 20%. Diese Experimente legen den Schluss nahe, dass unter den hier verwendeten

experimentellen Bedingungen unter Verwendung einer PN-Konzentration von $5\mu\text{mol/L}$ schätzungsweise 30% der Glutaminsynthetase tyrosinnitriert vorliegt.

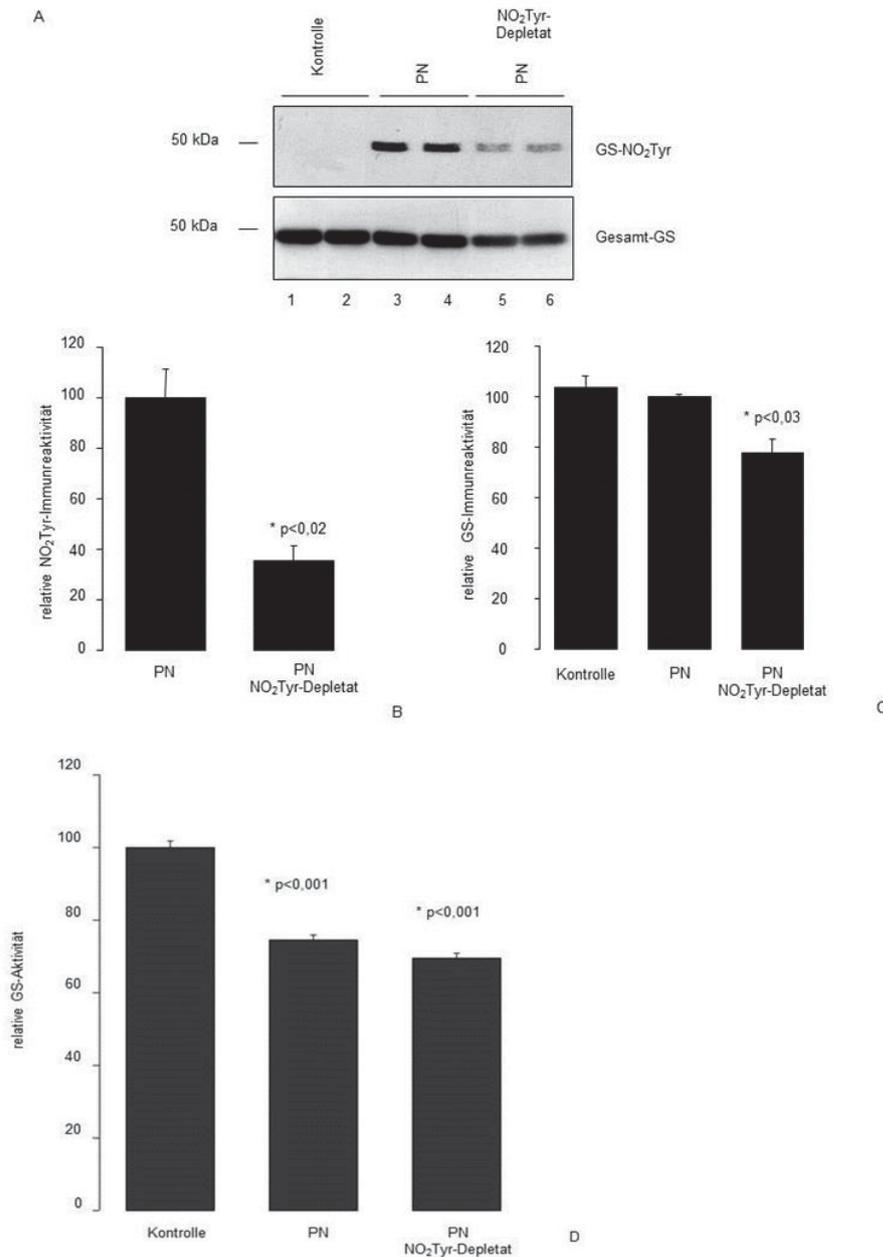


Abbildung 4.4: Einfluss einer NO_2Tyr -Immundepletion auf die GS-Expression und die enzymatische Aktivität.

Die unbehandelte oder mit $5\mu\text{mol/L}$ Peroxynitrit behandelte Glutaminsynthetase wurde durch Verwendung von Anti- NO_2Tyr -Antikörpern immunopräzipitiert. Immunodepletierte GS wurde zusammen mit unbehandelte oder mit PN-behandelte GS-Proben auf das PAA-Gel aufgetragen und auf die gesamt GS- und NO_2Tyr -Immureaktivität überprüft(A) und densitometrisch analysiert(B und C). Anschliessend wurde die enzymatische Aktivität der GS in den nicht NO_2Tyr -depletierten und NO_2Tyr -immundepletierten Proben untersucht(D) ($n=8$). Quelle: Görg *et al.*, 2007

Mit den NO₂Tyr-Immundepletaten wurde nachfolgend ein GS-Aktivitätsassay durchgeführt. Wie die Abbildung 4.4D zeigt, war die Depletion nitrierter Glutaminsynthetase gegenüber den nicht-depletierten PN-behandelten GS-Proben mit keinem verstärkten Abfall der GS-Aktivität assoziiert. Dieses Ergebnis belegt, dass die nitrierte und in diesem experimentellen Setting aus dem Gesamtpool durch NO₂Tyr-Immundepletion entfernte GS, nicht zur gemessenen GS-Aktivität beiträgt. Diese Experimente belegen, dass die Tyrosinnitrierung der GS mit einem Aktivitätsverlust assoziiert ist.

4.1.3 Einfluss von Epicatechin auf die PN-induzierte Tyrosinnitrierung und den GS-Aktivitätsverlust

Es ist bekannt, dass das Flavonoid Epicatechin (EC) die Proteintyrosinnitrierung durch Stabilisierung des Tyrosylradikals verhindert (Schroeder *et al.*, 2001). In den nachfolgenden Untersuchungen wurde daher der Effekt von EC (30µmol/L) auf die durch PN-induzierte (5µmol/L) Tyrosinnitrierung der GS und auf die GS-Aktivität gemessen. Wie in Abbildung 4.5A dargestellt, wird sowohl die Peroxynitrit-vermittelte Tyrosinnitrierung als auch die PN-vermittelte Hemmung der GS-Aktivität durch EC verhindert (Abb. 4.5B). Diese Ergebnisse sprechen für einen Zusammenhang zwischen der PN-induzierten Proteintyrosinnitrierung und dem GS-Aktivitätsverlust unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen.

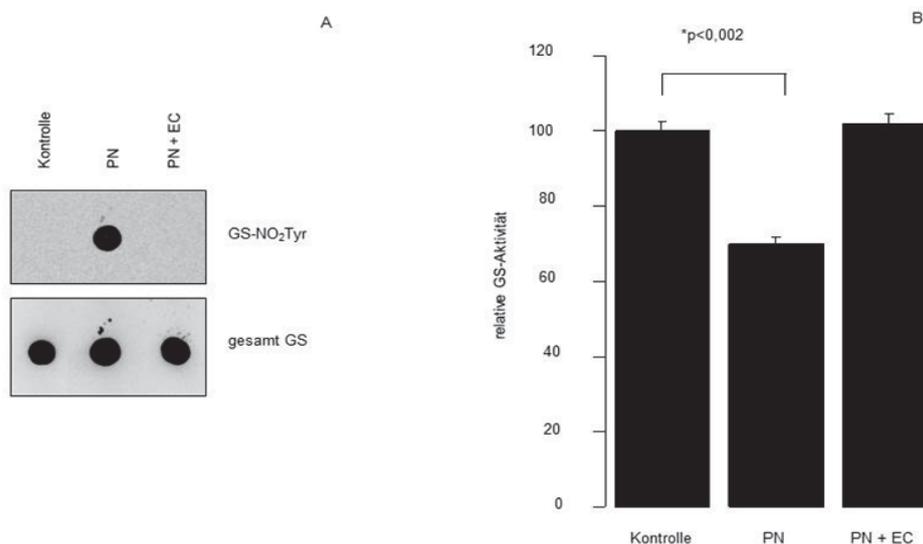


Abbildung 4.5: Einfluss von Epicatechin auf Proteintyrosinnitrierung und PN-vermittelte Verminderung der enzymatischen Aktivität der Glutaminsynthetase.

20ng GS wurde mit 5µmol/L PN in Gegenwart oder Abwesenheit von 30µmol/L Epicatechin behandelt. Die jeweiligen Kontrollproben blieben unbehandelt. In der Dot-Blot-Analyse wurde die NO₂Tyr-Immureaktivität unter Verwendung von monoklonalen anti-NO₂Tyr-Antikörper detektiert. Die Beladung wurde durch Detektion der Glutaminsynthetase kontrolliert (A). Anschliessend wurde

die enzymatische Aktivität der GS in den Kontrollen und mit Epicatechin vorbehandelten Proben überprüft(B) (n=3). Quelle: Görg *et al.*, 2007

4.1.4 Denitrierung der GS durch LPS-behandelte Milzproteinlysate

Einige Publikationen legen die Existenz einer enzymatischen denitrierenden Aktivität in der Milz LPS-behandelter Ratten nahe (Kimasaki *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde daher experimentell ermittelt, ob die tyrosinnitrierte GS ein Substrat für die Denitraseaktivität in der Milz LPS-behandelter Ratten darstellt. Wie in der Abbildung 4.6A erkennbar ist, konnte unter den hier verwendeten Mengen an isolierter GS und Milzproteinlysaten und den gewählten Detektionsbedingungen keine Glutaminsynthetase in der Milz LPS-behandelter Ratten im Western-Blot dargestellt werden. Die Inkubation der isolierten GS mit Proteinlysaten aus der Milz führte zu einem zeitabhängigen, deutlichen Abfall der anti-NO₂Tyr-Immunreaktivität, nicht jedoch der anti-GS-Immunreaktivität (Abb. 4.6A oberes Feld 4-7). Die densitometrische Analyse zeigte eine signifikante Reduktion der NO₂Tyr-Immunreaktivität 30min nach Behandlung mit Milzproteinlysat um ca. 80 % (Abb. 4.6 C). Die im Milzlysate vorhandene Denitraseaktivität war sensitiv gegenüber Hitzebehandlung (95°C, 5min) (Abb. 4.6 B). Die hier vorgestellten Untersuchungen weisen auf eine hitzelabile Denitraseaktivität in der Milz LPS-behandelter Ratten hin, welche die NO₂Tyr-Gruppe der GS entfernt, ohne das betroffene Enzym zu degradieren. Die Zeitabhängigkeit und Hitzesensitivität weisen zudem auf einen enzymatischen Prozess hin.

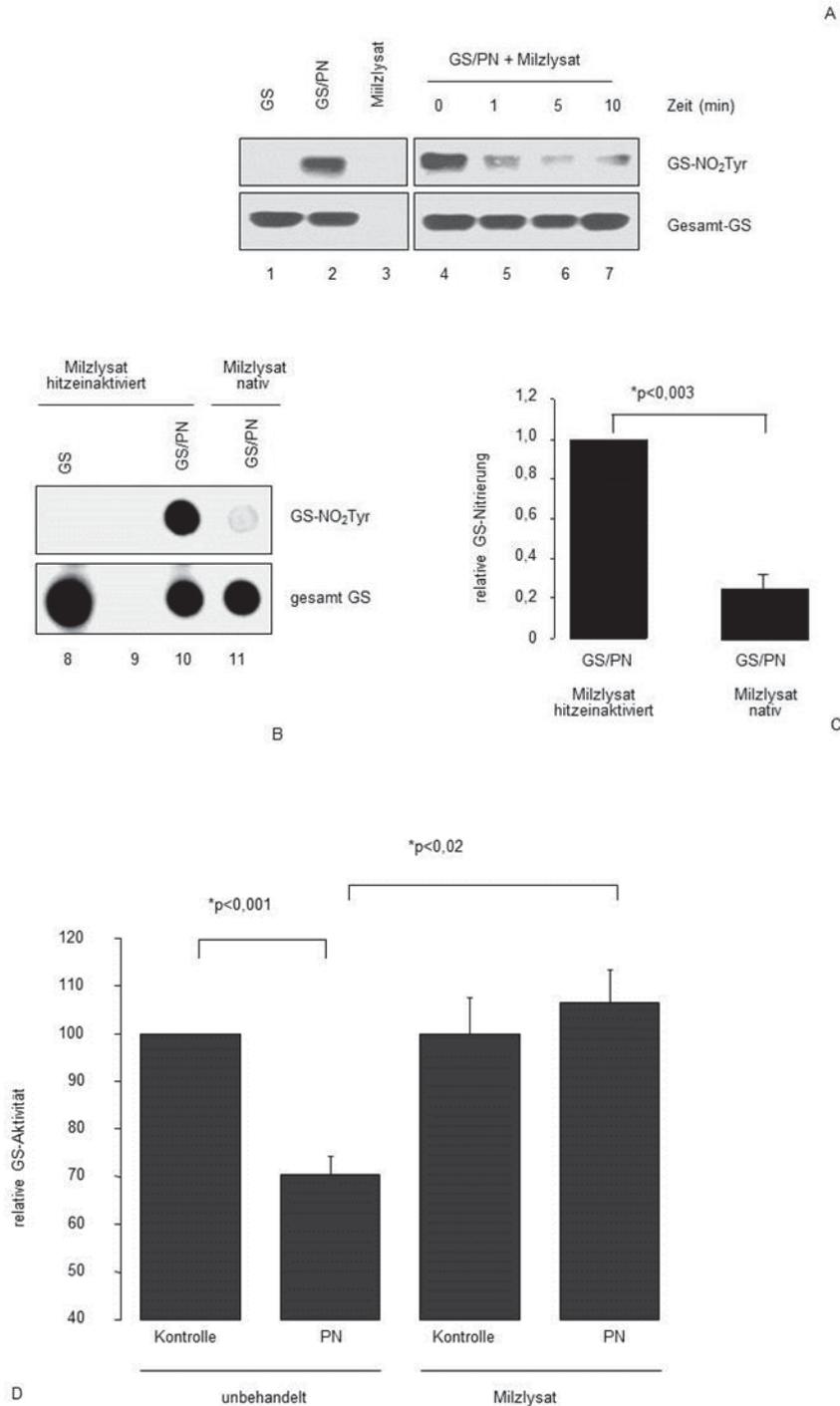


Abbildung 4.6: Einfluss einer Behandlung mit Milzlysate aus LPS-behandelter Ratte auf die Tyrosinnitrierung der Glutaminsynthetase und dem damit assoziierten Aktivitätsverlust.

GS wurde mit 5 $\mu\text{mol/L}$ PN behandelt und anschließend im aufsteigenden Zeitintervall 1-30min mit nativem (4-7) oder hitzeinaktiviertem (8-10) Milzproteinlysate inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben mittels Western- oder Dot-Blot-Analyse auf NO₂Tyr- oder GS-Immunreaktivität überprüft. Als Kontrollen dienten Milzextrakte ohne GS (3,9) oder GS ohne PN-Behandlung (1,8) (A und B). Die NO₂Tyr-Immunreaktivität wurde densitometrisch analysiert (C) (n=5). Anschliessend wurde in den Kontrollen und mit Milzlysate vorbehandelten Proben die enzymatische Aktivität der GS untersucht(D) (n=3). Quelle: Görg *et al.*, 2007.

Nachfolgend wurde die Wirkung der Denitrierung auf den PN-induzierten Aktivitätsverlust der GS überprüft. Während die Zugabe von hitzeinaktivierten Milzproteinlysaten zu PN-behandelter, isolierter GS keine weitere Steigerung der GS-Aktivität bewirkte, brachte die Inkubation mit Milzextrakt die GS-Aktivität der PN-behandelten GS-Probe auf das Ausgangsniveau (Abb.:4.6D). Diese Daten zeigen, dass eine Denitrase in den LPS-behandelten Ratten, die PN-vermittelte Verminderung der enzymatischen Aktivität wiederherstellen kann.

Weitergehend wurde überprüft, ob eine Denitraseaktivität auch in den anderen Organen vorhanden ist, wie zerebraler Kortex und Leber (Abb. 4.7. Lane 2-5). Nach dem die basale NO₂Tyr- und GS-Immureaktivität in den entsprechenden Proteinlysaten mit Hilfe von Western-Blot-Analysen erfasst wurden (Abb. 4.7 Lane 7-9), wurden die Proteinextrakte dieser Organe im Denitraseassay getestet. Wie aus der Abbildung 4.7 ersichtlich, bewirkte die Inkubation der PN-behandelten GS mit Proteinextrakten aus dem zerebralen Kortex und der LPS-behandelten Milz eine Abschwächung der GS-NO₂Tyr-Immureaktivität (Abb. 4.7 Lane 5). In der Leber konnte hingegen keine Denitraseaktivität festgestellt werden (Abb.: 4.7 Lane 8).

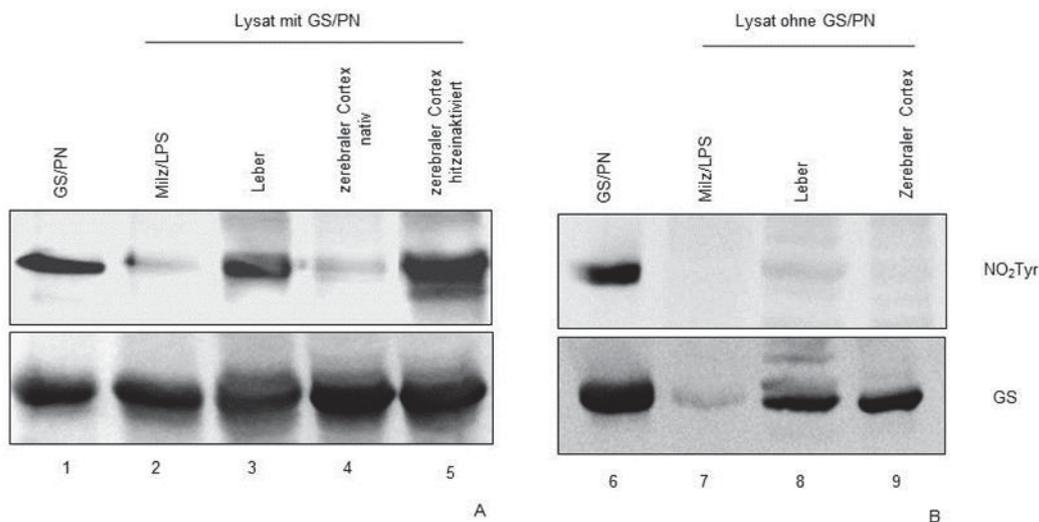


Abbildung 4.7: Nachweis einer Denitraseaktivität in den Proteinlysaten aus der Milz, dem zerebralen Kortex und der Leber LPS-behandelter Ratten.

Die PN-behandelte GS wurde mit nativen oder hitzeinaktivierten Proteinlysaten aus der Milz (Lane 2), Leber (Lane 3) und zerebralem Kortex (Lane 4-5) für 30min inkubiert. Anschließend wurden die Proteinproben auf das PAA-Gel aufgetragen und auf die Nitrozellulosemembran geblottet und die NO₂Tyr- und GS-Immureaktivität mit monoklonalen Antikörpern detektiert(A). Die intrinsische NO₂Tyr- und GS-Immureaktivität in Proteinextrakten aus LPS-behandelter Milz (Lane 7), Leber (Lane 8) und zerebralem Kortex (Lane 9) wurde mittels Western-Blot-Analyse überprüft(B). Quelle: Görg *et al.*, 2007.

4.1.5 Einfluss der GS-Proteintyrosinnitrierung auf den proteasomalen Abbau des Enzyms durch das 20S Proteasom

In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf einen proteasomalen Abbau tyrosinnitrierter Proteine (Grune *et al.*, 1998). Für den Abbau von oxidativ geschädigten Proteinen ist insbesondere die 20S Untereinheit des Proteasoms zuständig. Mit Hilfe von aufgereinigtem 20S Proteasom wurde nachfolgend der Abbau der nitrierten Glutaminsynthetase durch das 20S Proteasom *in vitro* untersucht. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Bedingungen gewählt. Einerseits wurde die PN-behandelte GS verwendet bei der ausschließlich eine PTN, nicht aber eine S-Nitrosylierung oder Karbonylierung des Enzyms vorlag (5µmol/L). Andererseits wurden GS-Proben verwendet, die mit 50µmol/L PN behandelt wurden, da hier die GS sowohl nitriert, als auch S-nitrosyliert und karbonyliert vorliegt. Wie in der Abbildung 4.8A ersichtlich, wurde die mit 5µmol/L PN-behandelte GS nicht durch das 20S Proteasom abgebaut. Wohingegen ca. 40% der mit 50µmol/L PN-behandelten GS proteasomal verdaut wurde.

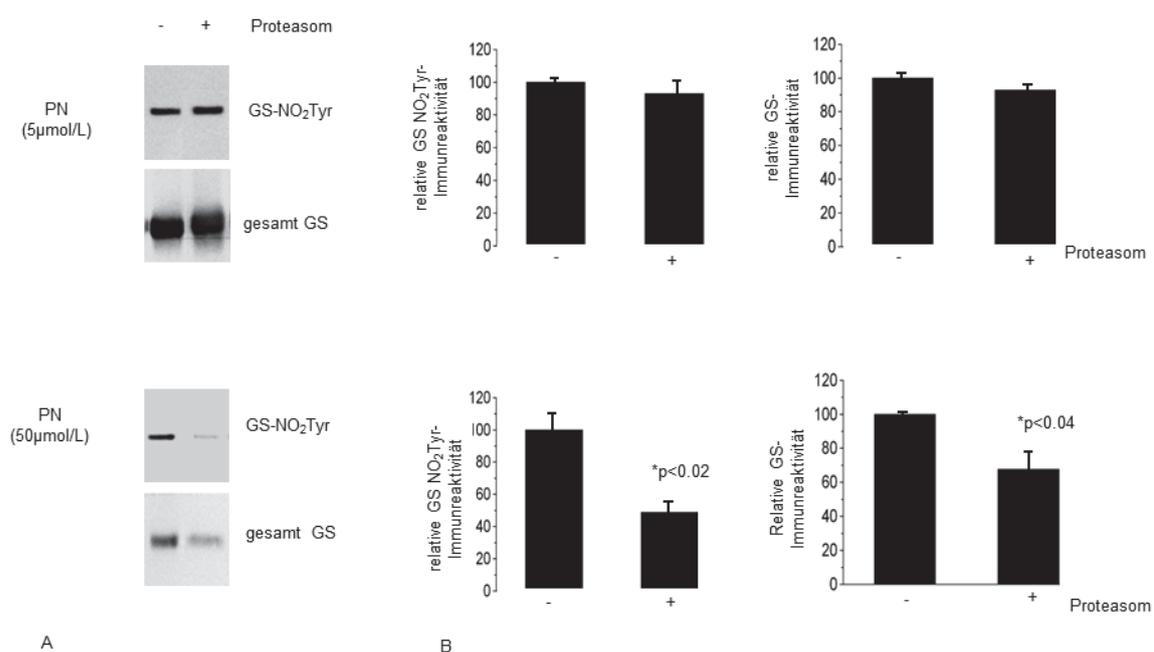


Abbildung 4.8: Einfluss der Tyrosinnitrierung auf den Abbau der PN-behandelten GS durch das 20S Proteasom.

Isolierte Glutaminsynthetase wurde wie beschrieben mit 5- oder 50µmol/L PN behandelt und anschließend mit 1µg 20S Proteasom versetzt und für 6h bei 37°C inkubiert. Die NO₂Tyr- und GS-Immunreaktivität wurde durch Western-Blot-Analyse untersucht (A). Der relative Anteil nitrierter Glutaminsynthetase, sowie der Gesamt-GS wurden durch densitometrische Analyse quantifiziert (B). Quelle: Görg *et al.*, 2007.

4.1.6 Nachweis tyrosinnitrierter Proteine und Identifizierung der tyrosinnitrierten Glutaminsynthetase in humanen post mortem Hirnproben

Aus humanen *post mortem* Hirnproben wurden aus dem zerebralen Kortex Proteinlysate präpariert und die Tyrosinnitrierung individueller Proteine mittels Western-Blot-Analysen untersucht. Wie in Abbildung 4.9A erkennbar ist, findet sich im Molekulargewichtsbereich von 75-20kDa verglichen mit den Kontrollen eine deutlich erhöhte Tyrosinnitrierung individueller Proteine in der Gruppe der Zirrhosepatienten mit HE, aber nicht bei Zirrhosepatienten ohne HE (4.9B).

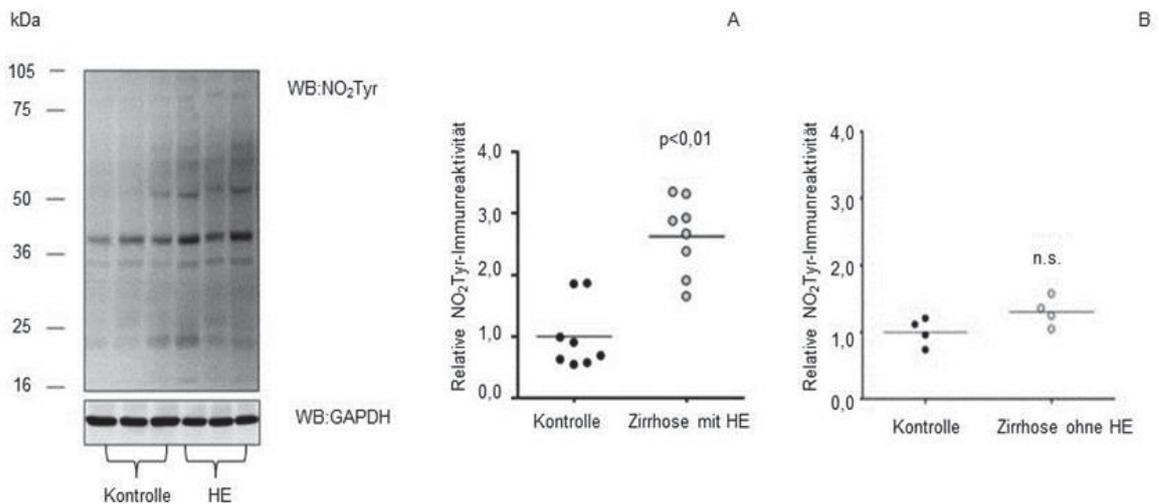


Abbildung 4.9: Nachweis tyrosinnitrierter Proteine in humanen Hirnproben.

Humane Hirnproben wurden mit Hilfe eines gegen Nitrotyrosin gerichteten Antikörpers im Western-Blot auf Proteintyrosinnitrierung untersucht. Der Nachweis der GAPDH diente als Beladungskontrolle. Die prominente Anti-NO₂Tyr-immunreaktive Bande zwischen 36kDa und 50kDa wurde für die densitometrische Analyse verwendet und auf die GAPDH-Expression normiert. Repräsentativer Western-Blot von 3 Kontrollpatienten und 3 Patienten mit Leberzirrhose und HE aus europäischer Patientengruppe und die densitometrische Analyse von allen Kontrollpatienten und Patienten mit Leberzirrhose und HE aus europäischer Patientengruppe (A) (n=8). Die Kontrollpatienten und Patienten mit Leberzirrhose ohne HE aus australischer Patientengruppe wurden auf Proteintyrosinnitrierung mittels Western-Blot-Analyse untersucht und die Blots anschliessend densitometrisch quantifiziert (B) (n=4). Quelle: Görg *et al.*, 2010.

Gleichzeitig wurde in der Patientengruppe der Leberzirrhotiker mit HE gegenüber der Kontrollpatientengruppe ein vergleichbares GS-Proteinexpressionsniveau (Abb. 4.10A) bei signifikant verringerter enzymatischer Aktivität der GS (Abb. 4.10B) gemessen. Keine signifikant verminderte GS-Aktivität war hingegen in der Gruppe der Leberzirrhotiker ohne HE nachweisbar.

Zur Überprüfung, ob die Glutaminsynthetase in der Gruppe der Zirrhosepatienten mit HE gegenüber den Kontrollen verstärkt tyrosinnitriert ist, wurden Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Wie in Abbildung 4.10C erkennbar ist, war

ein signifikant höherer Anteil an nitrierter GS in der Patientengruppe mit HE verglichen mit den Kontrollpatienten ohne Lebererkrankung oder den Patienten mit Leberzirrhose ohne HE zu finden.

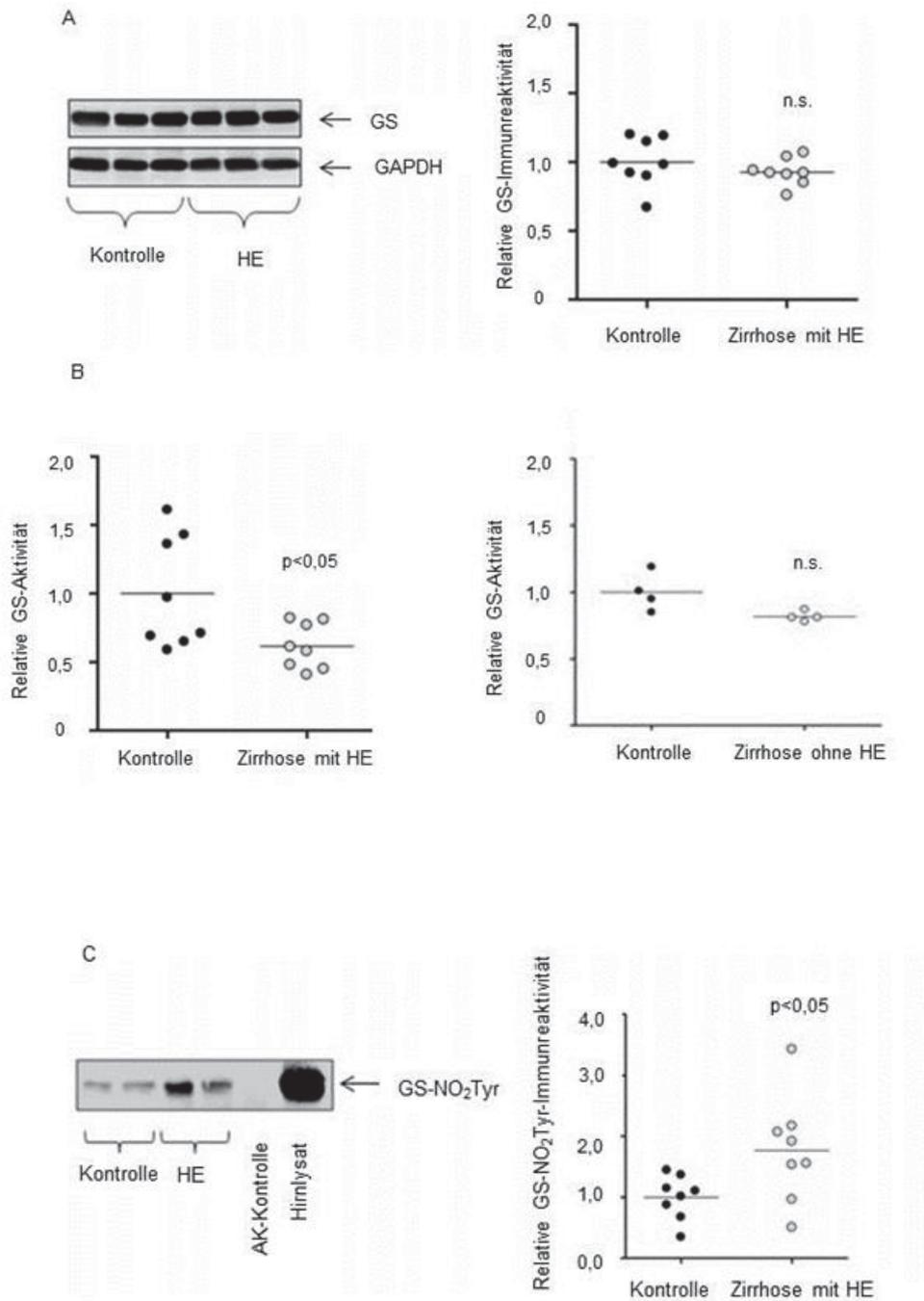


Abbildung 4.10: Expressionsniveau, Aktivität und Tyrosinnitrierung der Glutaminsynthetase in humanen *post mortem* Hirnproben.

Das Expressionsniveau der Glutaminsynthetase wurde mittels Western-Blot überprüft und densitometrisch quantifiziert und die Beladung des Gels mittels GAPDH kontrolliert. Repräsentativer Western-Blot von 3 Kontrollpatienten und 3 Patienten mit Leberzirrhose und HE aus der europäischen Kohorte und die densitometrische Analyse von der gesamten europäischen

Patientengruppe(A) (n=8). Erfassung der enzymatischen Aktivität der Glutaminsynthetase in Proteinlysaten von *post mortem* Hirnproben aus den europäischen(n=8) und australischen(n=4) Patientengruppen. Die mittlere Aktivität aller Kontrollen ist auf 1 normiert und die Aktivität in der Gruppe der Leberzirrhosepatienten mit oder ohne HE relativ dazu angegeben(B). Nachweis der GS-Immunreaktivität mittels Western-Blot in den Immunpräzipitaten tyrosinnitrierter Proteine aus Hirnproteinlysaten von Kontroll- und HE-Patienten. Densitometrische Analyse der anti-GS Immunreaktivität und statistische Auswertung(C) (n=8). Quelle: Görg *et al.*, 2010.

4.2 RNA-Oxidation

4.2.1 Einfluss von Ammoniak auf die Oxidation von RNA in kultivierten Rattenastrozyten

Die oxidierte RNA wurde in kultivierten Astrozyten mittels Northwestern- und Slot-Blot-Analyse, wie in „Material und Methoden“ beschrieben, untersucht. Wie in Abbildung 4.11 gezeigt, steigert die Behandlung kultivierter Astrozyten mit NH_4Cl nach 6h den Anteil oxidiertes RNA bereits ab einer Konzentration von 0,5mmol/L NH_4Cl . Die Northwestern-Blot-Analyse zeigte eine verstärkte RNA-Oxidation im Molekulargewichtsbereich der 28S und 18S RNA.

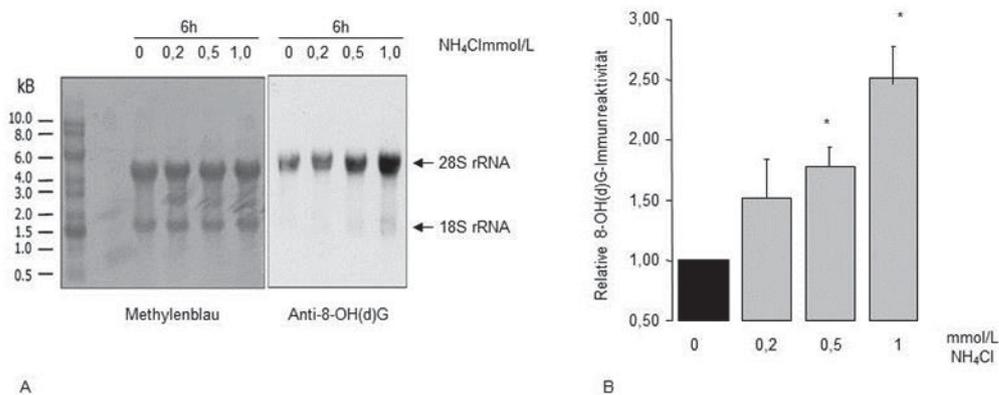


Abbildung 4.11: Konzentrationsabhängigkeit der Ammoniak-vermittelten RNA-Oxidation in kultivierten Rattenastrozyten.

Astrozyten wurden mit unterschiedlichen NH_4Cl -Konzentrationen für 6h behandelt, die Gesamt-RNA präpariert, und oxidierte RNA mittels Northwestern-Blot-Analyse unter Verwendung des anti-8-OH(d)G-Antikörpers nachgewiesen (A). Die Beladung wurde durch das Anfärben der Membran mit Methylenblau kontrolliert. (B) Densitometrische Analyse und statistische Auswertung der im Northwestern-Blot nachgewiesenen 28S 8-OH(d)G-Immunreaktivität. Die Kontrolle wurde gleich eins gesetzt und der relative Anstieg der 8-OH(d)G-Immunreaktivität in den Ammoniak-belasteten Proben als Vielfaches hiervon ausgedrückt. Ab einer Ammoniakkonzentration von 0,5mmol/L wurde ein statistisch signifikanter Anstieg der 8-OH(d)G-Immunreaktivität beobachtet. *: statistisch signifikant ($p \leq 0,05$) n=3. Quelle: Görg *et al.*, 2008

Die Zeitabhängigkeit und Persistenz der NH_4Cl -vermittelten RNA-Oxidation wurde nachfolgend untersucht. Eine gegenüber der Kontrolle erhöhte 8-OH(d)G-

Immunreaktivität wurde in NH_4Cl -behandelten (5mmol/L) Astrozyten bereits eine Stunde nach Stimulationsbeginn bis zu 72h nach Behandlung mit Ammoniak nachgewiesen (Abb.: 4.12). Die Reversibilität der RNA-Oxidation wurde an NH_4Cl -behandelten (5mmol/L) Astrozyten überprüft, bei denen der Ammoniak durch einen Kulturmediumwechsel 1h nach Stimulation entfernt wurde, und nachfolgend die Zellen für weitere 71h kultiviert wurden. Auch in den Kontrollen wurde das Nährmedium gewechselt. Die Oxidation von RNA wurde nachfolgend mittels Slot-Blot analysiert und densitometrisch quantifiziert. Wie in Abbildung 4.12 dargestellt, ist ein Rückgang der RNA-Oxidation nach Wechsel des Mediums gegenüber den für 72h mit NH_4Cl -behandelten Astrozyten erkennbar (Abb.4.12).

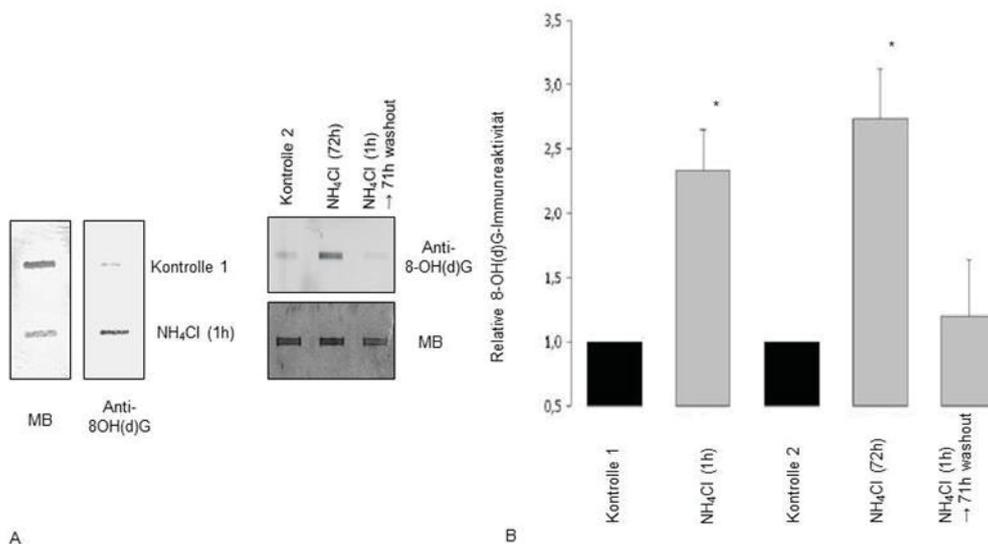


Abbildung 4.12: Zeitabhängigkeit und Reversibilität der NH_4Cl -vermittelten RNA-Oxidation in kultivierten Rattenastrozyten.

Astrozyten wurden für die angegebene Zeitdauer mit Ammoniak behandelt oder blieben unbehandelt. Wo angegeben wurden Astrozyten für 1h mit NH_4Cl (5mM) stimuliert und nachfolgend unter ammoniakfreien Bedingungen für weitere 71h kultiviert. Die aufgereinigte RNA wurde auf eine Nitrozellulosemembran geslotted und mit Hilfe des anti-8-OH(d)G-Antikörpers detektiert. (B) Densitometrische Auswertung und statistische Analyse der 8-OH(d)G-Immunreaktivität nach Slot-Blot-Analyse.* : statistisch signifikant $p \leq 0,05$. (n=4). Quelle: Görg *et al.*, 2008.

Zur Validierung der Antikörperspezifität wurden nachfolgende Kontrollexperimente durchgeführt, bei denen der anti-8-OH(d)G-Antikörper mit freiem 8-OHG für 5h bei 22°C präinkubiert und hierdurch blockiert wurde. Anschließend wurde wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben oxidierte RNA durch Slot-Blot-Analyse detektiert.

In weiteren Kontrollexperimenten wurde die RNA vor dem Auftragen mittels RNase A verdaut, oder die Membran ausschließlich nur mit dem Sekundärantikörper prozessiert. Wie in Abbildung 4.13 dargestellt, führte die Behandlung der RNA-Proben mit RNase A zu

einer vollständigen Degradation der RNA, erkennbar durch die fehlende Methylenblaufärbung. Da Methylenblau generell Nukleinsäuren, und damit sowohl RNA als auch DNA anfärbt, deutet eine fehlende Methylenblaufärbung auf einen hohen Reinheitsgrad der verwendeten RNA-Präparationen hin. In weiteren Kontrollexperimenten konnte durch die alleinige Verwendung des Sekundärantikörpers keine Immunreaktivität detektiert werden. Diese Ergebnisse sprechen für eine spezifische Detektion oxidierter RNA.

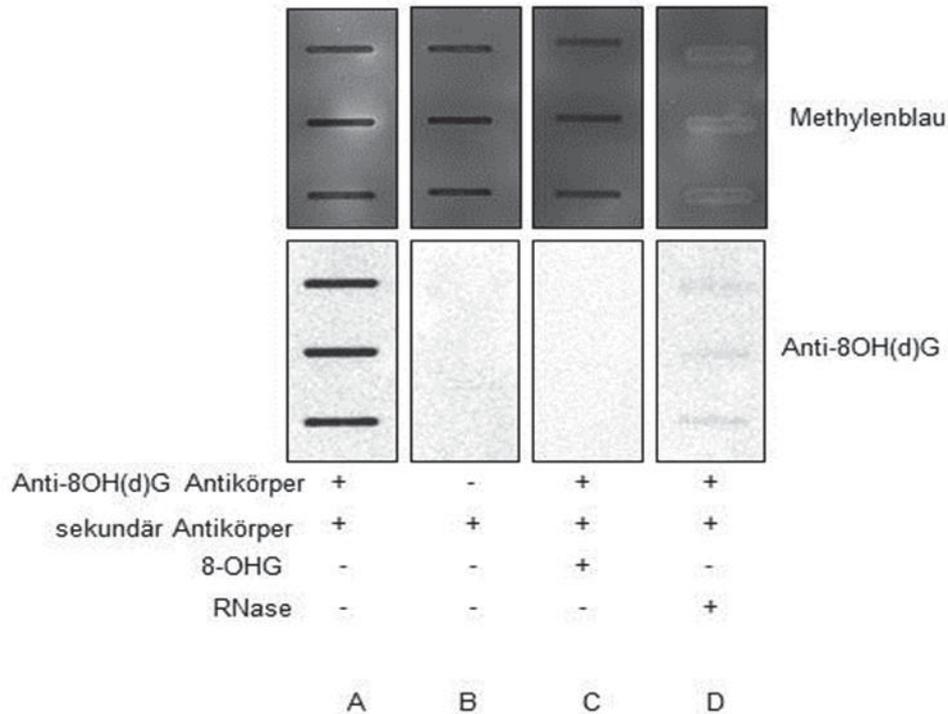


Abbildung 4.13: Validierung der anti-8-OH(d)G-Antikörperspezifität.

Astrozyten wurden mit NH_4Cl (1mmol/L) behandelt, RNA präpariert und für nachfolgende Experimente verwendet. (A) Nachweis der 8-OH(d)G-Immunreaktivität. (B) Inkubation der Nitrozellulosemembran ausschließlich mit HRPOD-gekoppeltem Sekundärantikörper. (C) Präabsorption des anti-8-OH(d)G-Antikörpers mit 8-OHG (23ng/ml für 1h bei 37°C) bevor der so behandelte Antikörper für die nachfolgende Detektion verwendet wurde. (D) Verdau der RNA mit RNase A (10mg/ml für 2h bei 37°C), bevor die Proben mittels Slot-Blot auf die Membran aufgetragen wurden. Quelle: Görg *et al.*, 2008.

Um den prozentualen Anteil oxidierter RNA in Ammoniak-behandelten Astrozyten zu quantifizieren, wurden RNA-Proben unbehandelter, sowie NH_4Cl -behandelter (1mmol/L, 1h) Astrozyten unter Verwendung des anti-8-OH(d)G-Antikörpers und der MACS-Protein-A/G-Beads inkubiert (siehe Kapitel „Material und Methoden“). Die durch den Antikörper und die paramagnetischen Beads markierte, oxidierte RNA wurde in einem magnetischen Feld zurückgehalten und der im Durchfluss verbleibende Anteil mit dem RNA-sensitiven Farbstoff Ribogreen quantifiziert. Wie in Abbildung 4.14 zu sehen ist, wird durch diesen

Vorgang („8-OHG-Depletat“) im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollen ca. 7% der gesamten RNA der NH_4Cl -behandelten Astrozyten entfernt.

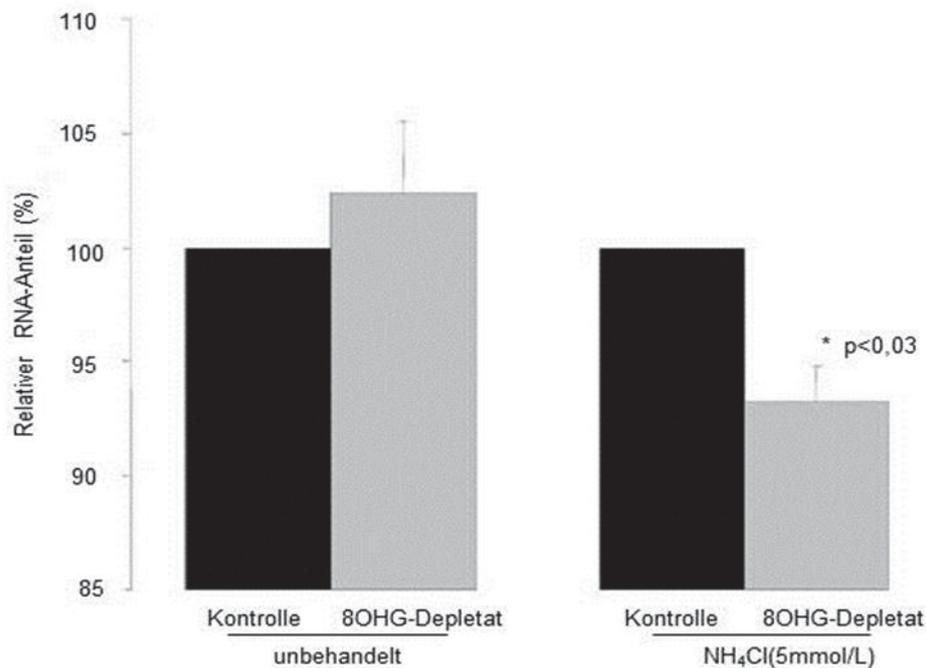


Abbildung 4.14: Quantifizierung oxidiertes RNA in Ammoniak-belasteten Astrozytenkulturen. Gesamt-RNA wurde aus unbehandelten, oder NH_4Cl -behandelten (1mmol/L, 1h) Rattenastrozyten präpariert und der oxidierte Anteil unter Verwendung von Protein-A/G-Beads und des anti-8-OH(d)G-Antikörpers immunpräzipitiert. Der nicht präzipitierte Anteil wurde mit Ribogreen fluorimetrisch quantifiziert und als prozentualer Anteil der Gesamt-RNA-Menge berechnet. *: statistisch signifikant (n=10). Quelle: Görg *et al.*, 2008.

Die Integrität der Gesamt-RNA wurde mittels Kapillarektrophorese unter Verwendung eines Bioanalyzers (Agilent 2100) verifiziert. Bei dieser Methode wird RNA nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, so dass für degradierte RNA charakteristische RNA-Fragmente sichtbar werden. In den hier durchgeführten Untersuchungen wurden unbehandelte und mit Ammoniak behandelte Astrozyten verwendet (Abb. 4.15). Zur Induktion einer RNA-Degradation wurde *in vitro* mit FeCl_3 (1 $\mu\text{mol/L}$), Ascorbinsäure (10 $\mu\text{mol/L}$) und H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/L}$), oder mit ONOO^- (0,5 $\mu\text{mol/L}$) für 1h behandelte RNA verwendet. Wie in Abb. 4.15 erkennbar ist, wurde durch diese Behandlung eine Degradation der RNA herbeigeführt, durch die Behandlung kultivierter Rattenastrozyten mit NH_4Cl (1 und 5 mmol/L, 1h) hingegen nicht.

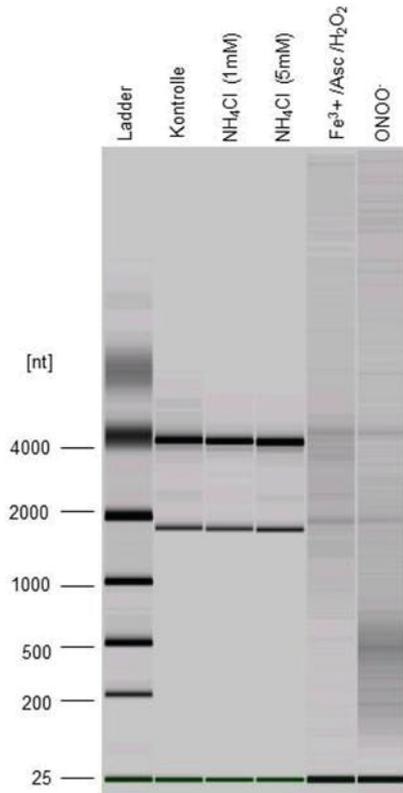


Abbildung 4.15: RNA-Integrität in Ammoniak-behandelten kultivierten Rattenastrozyten.

Isolierte RNA wurde mittels Kapillarelektrophorese (Agilent 2100 Bioanalyzer) untersucht. Astrozyten wurden für eine Stunde mit 1 oder 5 mmol/L NH₄Cl behandelt oder blieben unbehandelt. Als Positivkontrolle wurde RNA *in vitro* durch Behandlung mit FeCl₃ (1μmol/L)/Ascorbat (10μmol/L)/H₂O₂ (100μmol/L) oder ONOO⁻ (0,5mmol/L) für 1 Stunde bei 22°C behandelt. Quelle: Görg *et al.*, 2008.

4.2.2 Pharmakologische Charakterisierung der Ammoniak-induzierten RNA-Oxidation in kultivierten Rattenastrozyten

Die Ammoniak-induzierte Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies ist mit einer Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, einer Zunahme der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, sowie einer Aktivierung der NADPH-Oxidase verbunden. Zur Charakterisierung des Einflusses dieser Faktoren auf die Ammoniak-vermittelte RNA-Oxidation wurden der NMDA-Rezeptor-Hemmstoff (MK-801), der Calcium-Chelator (BAPTA-AM), ein Polyphenolextrakt aus grünem Tee (Polyphenon60) und der NADPH-Oxidase-Inhibitor (Apocynin) eingesetzt. Abbildung 4.16 zeigt deutliche Hemmeffekte aller genannten Verbindungen, auf die Ammoniak-vermittelte RNA-Oxidation.

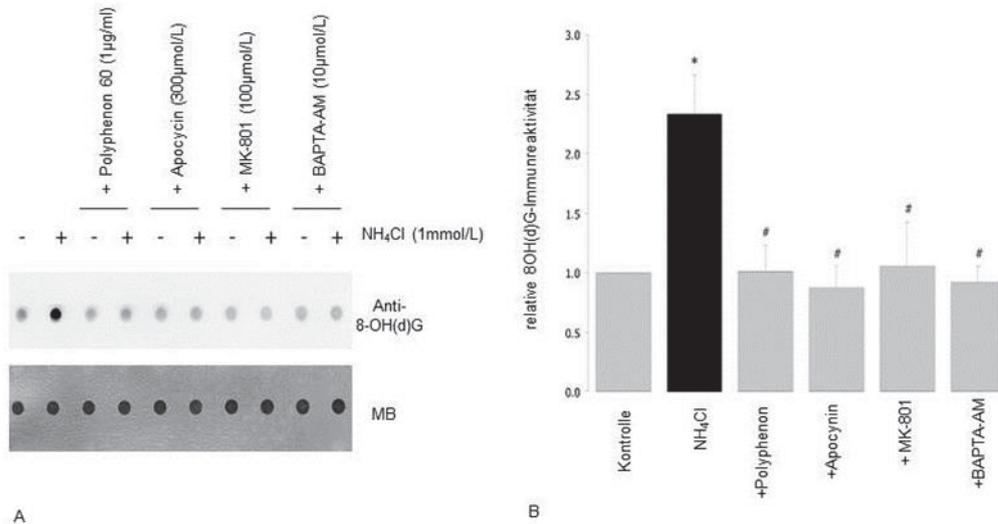


Abbildung 4.16: Pharmakologische Charakterisierung der NH₄Cl-vermittelten RNA-Oxidation in kultivierten Rattenastrozyten.

Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit Polyphenon60 (1µg/ml), Apocynin (300µmol/L), MK-801 (100µmol/L) und BAPTA-AM (10µmol/L) für 30min vorbehandelt oder blieben unbehandelt, bevor die Zellen mit NH₄Cl (1mmol/L) für eine Stunde behandelt wurden oder unbehandelt blieben. Nachfolgend wurde die aufgereinigte Gesamt-RNA auf Nitrozellulose geslotted, die 8-OH(d)G-Immunreaktivität gemessen und die Beladung mittels Methyleneblau kontrolliert(A). Densitometrische Auswertung der 8-OH(d)G-Immunreaktivität(B). *: statistisch signifikant gegenüber den respektiven Kontrollen, #: statistisch signifikant p≤0,05 gegenüber NH₄Cl-behandelten Astrozyten (p≤0,05) (n=3). Quelle: Görg *et al.*, 2008.

4.2.3 Identifizierung oxidierter RNA-Spezies in Ammoniak behandelten kultivierten Rattenastrozyten

Zur Identifizierung oxidierter RNA-Spezies wurden Immunpräzipitations-experimente unter Verwendung eines anti-8-OH(d)G-Antikörpers durchgeführt. Aus Gesamt-RNA-Präparationen unbehandelter und NH_4Cl -behandelter Rattenastrozyten wurde oxidierte RNA präzipitiert und die Präzipitate in cDNA umgeschrieben. In der nachfolgenden PCR-Analyse wurden Primer für die Detektion von 18S-rRNA, GLAST, $\text{GABA}_b\text{-1R}$ und β -Aktin verwendet. Wie in Abbildung 4.17 gezeigt, konnte in den anti-8-OHG-Immunpräzipitaten aus der RNA NH_4Cl -behandelter Rattenastrozyten gegenüber Kontrollen eine deutlich höhere Menge an 18S-rRNA- und GLAST-Amplifikat nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte weder die mRNA für $\text{GABA}_b\text{-R1b}$ oder β -Aktin in den anti-8-OHG-Immunpräzipitaten identifiziert werden. Die densitometrische Analyse zeigte gegenüber den Kontrollen eine signifikante, ca. 2,5-3-fach höhere Oxidation der 18S-rRNA und GLAST-mRNA in NH_4Cl -behandelten Astrozyten.

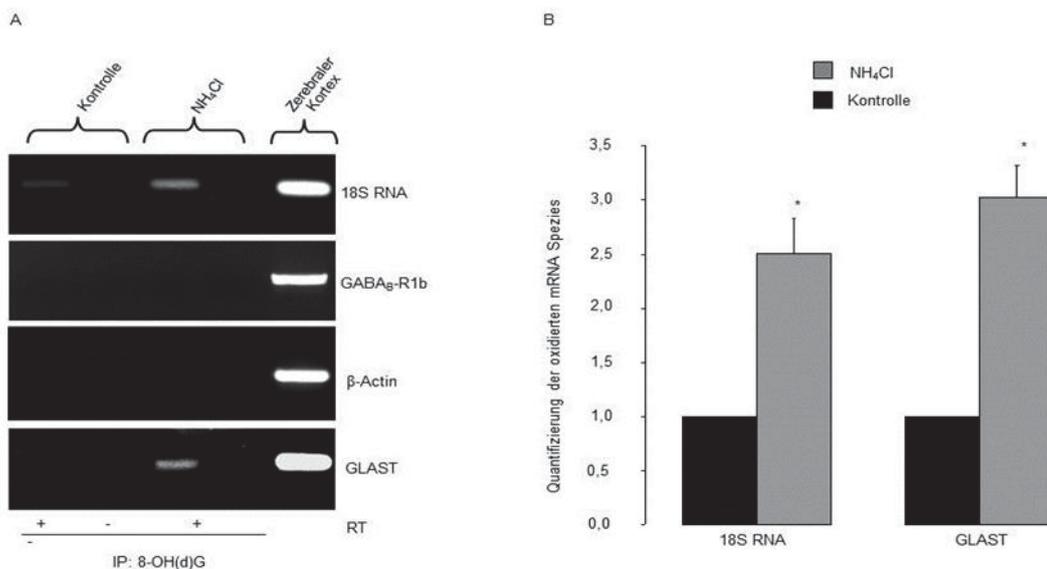


Abbildung 4.17: Identifizierung oxidierter mRNA-Spezies in NH_4Cl -behandelten Rattenastrozyten.

Astrozyten blieben unbehandelt oder wurden mit NH_4Cl (1mmol/L, 1h) behandelt, bevor Gesamt-RNA isoliert und oxidierte RNA mit dem anti-8-OHG-Antikörper immunpräzipitiert und nachfolgend in cDNA umgeschrieben wurde. In diesen cDNA-Proben wurde dann unter Verwendung von 18S-, $\text{GABA}_b\text{-R1b}$ -, β -Aktin- und GLAST-mRNA spezifischen Primern eine RT-PCR durchgeführt. Die Amplifikate wurden auf Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel aufgetragen und anschließend unter UV-Belichtung im Gel visualisiert (A), sowie die Signalintensität densitometrisch quantifiziert. Die Signalstärke in den NH_4Cl -behandelten Proben ist relativ zu den entsprechenden Kontrollen angegeben. *: statistisch signifikant (B). Quelle: Görg *et al.*, 2008.

4.2.4 Einfluss HE-relevanter Faktoren auf die RNA-Oxidation in kultivierten Astrozyten.

Eine hypoosmotisch-induzierte Astrozytenschwellung wie auch die Behandlung kultivierter Astrozyten mit HE-relevanten Faktoren induziert die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies (Schliess *et al.*, 2004; Görg *et al.*, 2003; 2006) Abbildung 4.18 zeigt, dass sowohl eine durch Hypoosmolarität herbeigeführte Astrozytenschwellung (205mosmol/L, 2h), wie auch das Benzodiazepin Diazepam (10 μ mol/L, 6h) sowie das inflammatorische Zytokin TNF- α (10ng/ml, 6h) einen signifikanten Anstieg oxidierter RNA um das 1,5-2-fache gegenüber normoosmotischen bzw. unbehandelten Kontrollen induziert.

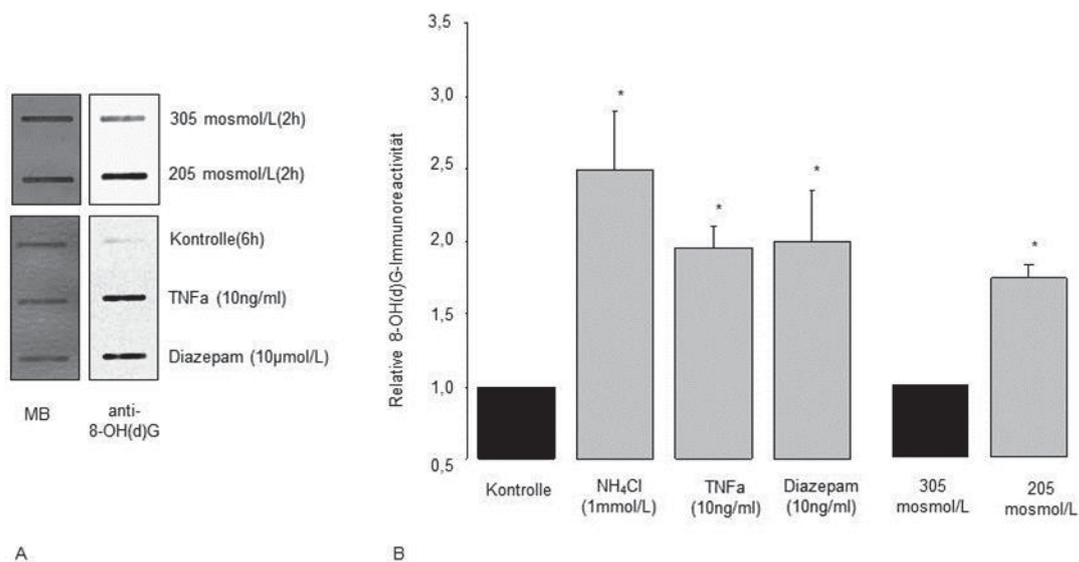


Abbildung 4.18: Einfluss HE-relevanter Faktoren auf die RNA-Oxidation in kultivierten Rattenastrozyten.

Astrozyten wurden mit TNF- α (10ng/ml) oder Diazepam (10 μ mol/L) für 6h behandelt, oder für 2h in hypo- (205mosmol/L) bzw. normo-osmolarem (305mosmol/L) Medium inkubiert. Nachfolgend wurde Gesamt-RNA isoliert und auf Nitrozellulosemembran mit einer Slot-Blot-Apparatur aufgebracht (A). (B) Densitometrische Analyse der anti-8-OH(d)G-Immunreaktivität. *: statistisch signifikant gegenüber den entsprechenden Kontrollen (p \leq 0,05). Quelle: Görg *et al.*, 2008.

4.2.5 Nachweis und Charakterisierung zerebraler RNA-Oxidation in Ammoniumazetat-behandelten Ratten

Mit Hilfe von Northwestern- und Slot-Blot-Analysen wurde oxidierte RNA in RNA-Präparationen aus dem zerebralen Kortex von Ammoniumazetat (4,5mmol/kg KG i.p.)-belasteten Ratten untersucht. Wie in Abbildung 4.19 zu sehen, zeigen mit NH $_4$ Azetat-behandelte Ratten gegenüber den NaCl (0,9%, Kontrolle)-behandelten Kontrollen eine ca. 2-fach höhere RNA-Oxidation 6h nach intraperitonealer Verabreichung. Erhöhte RNA-Oxidationslevel waren 24h, aber nicht 72h nach

Verabreichung von NH_4 Azetat nachweisbar. Diese Ergebnisse sprechen für eine transiente Erhöhung der RNA-Oxidation im zerebralen Kortex von NH_4 Azetat-belasteten Ratten.

Die Verabreichung von NH_4 Azetat induzierte in Tieren, die für 30min mit NH_4 Az behandelt wurden, eine ausgeprägte Hyperammonämie. Während der Ammoniakspiegel nach 6h immer noch signifikant, aber nur leicht gegenüber der Kontrolle erhöht war, fiel er bei 24h und 72h zurück auf das Kontrollniveau (Abb. 4.19).

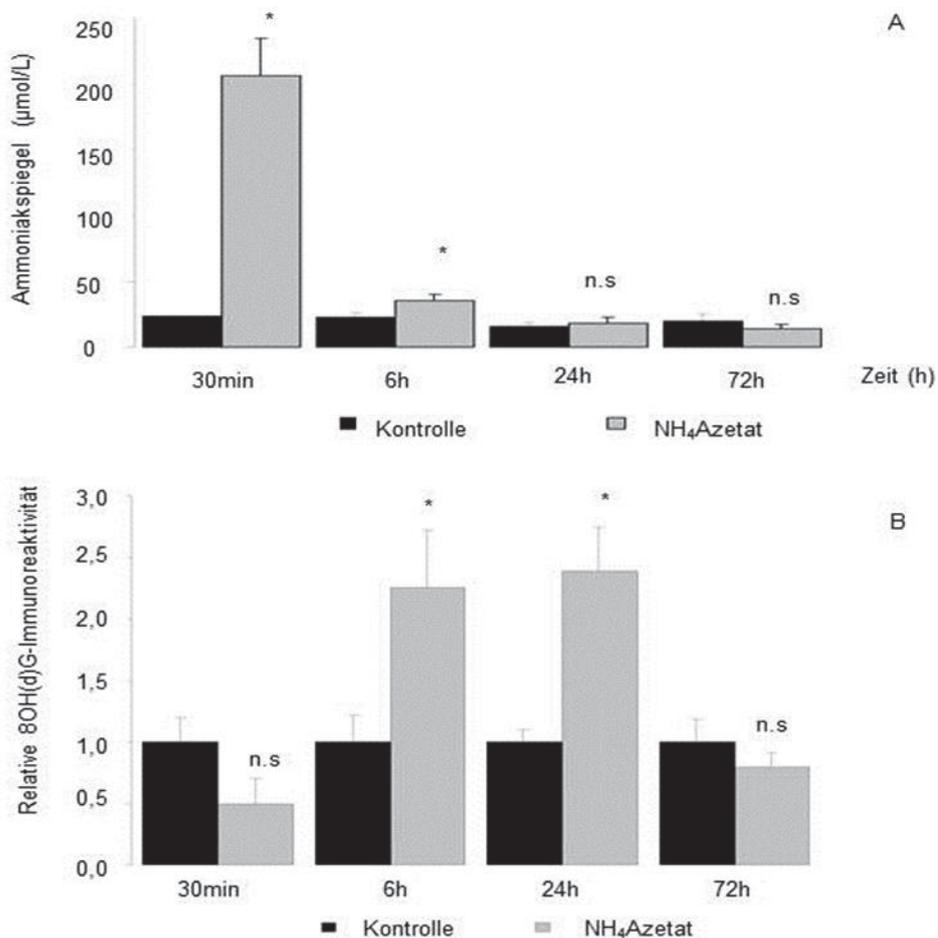


Abbildung 4.19: Blutammoniakspiegel und zerebrale RNA-Oxidation in Ammoniumazetat-belasteten Ratten.

Wistar-Ratten wurden entweder NaCl (0,9%) oder Ammoniumazetat (4,5 mmol/kg KG) intraperitoneal injiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere getötet, der Ammoniakgehalt im Blut bestimmt (A) und die zerebrale RNA-Oxidation mittels Slot-Blot-Analyse untersucht und densitometrisch quantifiziert (B). Quelle: Görg *et al.*, 2008.

Analog zu den im Kapitel 4.2.1 (Seite 57) beschriebenen Experimenten wurde der Anteil oxidierter RNA im zerebralen Rattenkortex mittels Immundepletion oxidierter RNA

quantifiziert. Wie in Abbildung 4.20 zu sehen, wurde durch „Entfernen“ oxidierter RNA aus der Gesamt-RNA eine Reduktion des Gesamt-RNA Gehalts um 6% der Ausgangsmenge herbeigeführt.

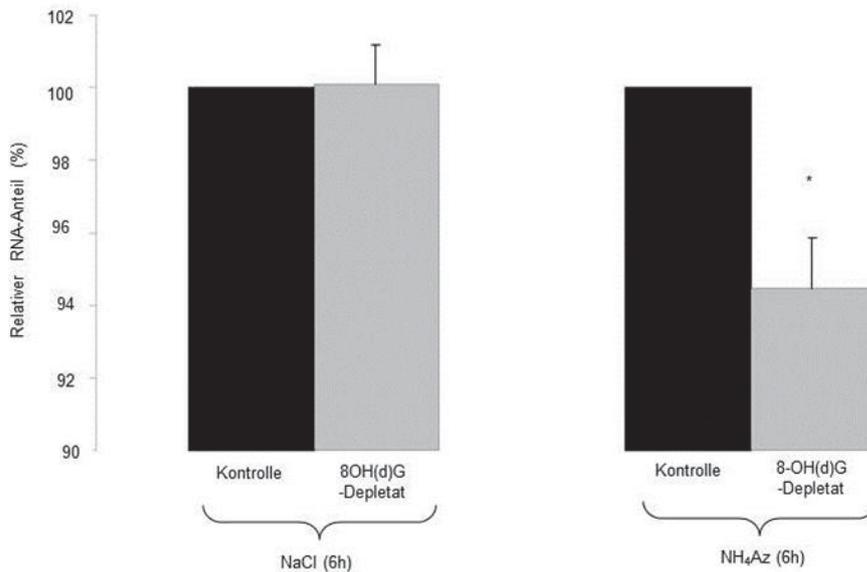


Abbildung 4.20: Anteil oxidierter RNA an aus dem Rattenhirn isolierten Gesamt-RNA.

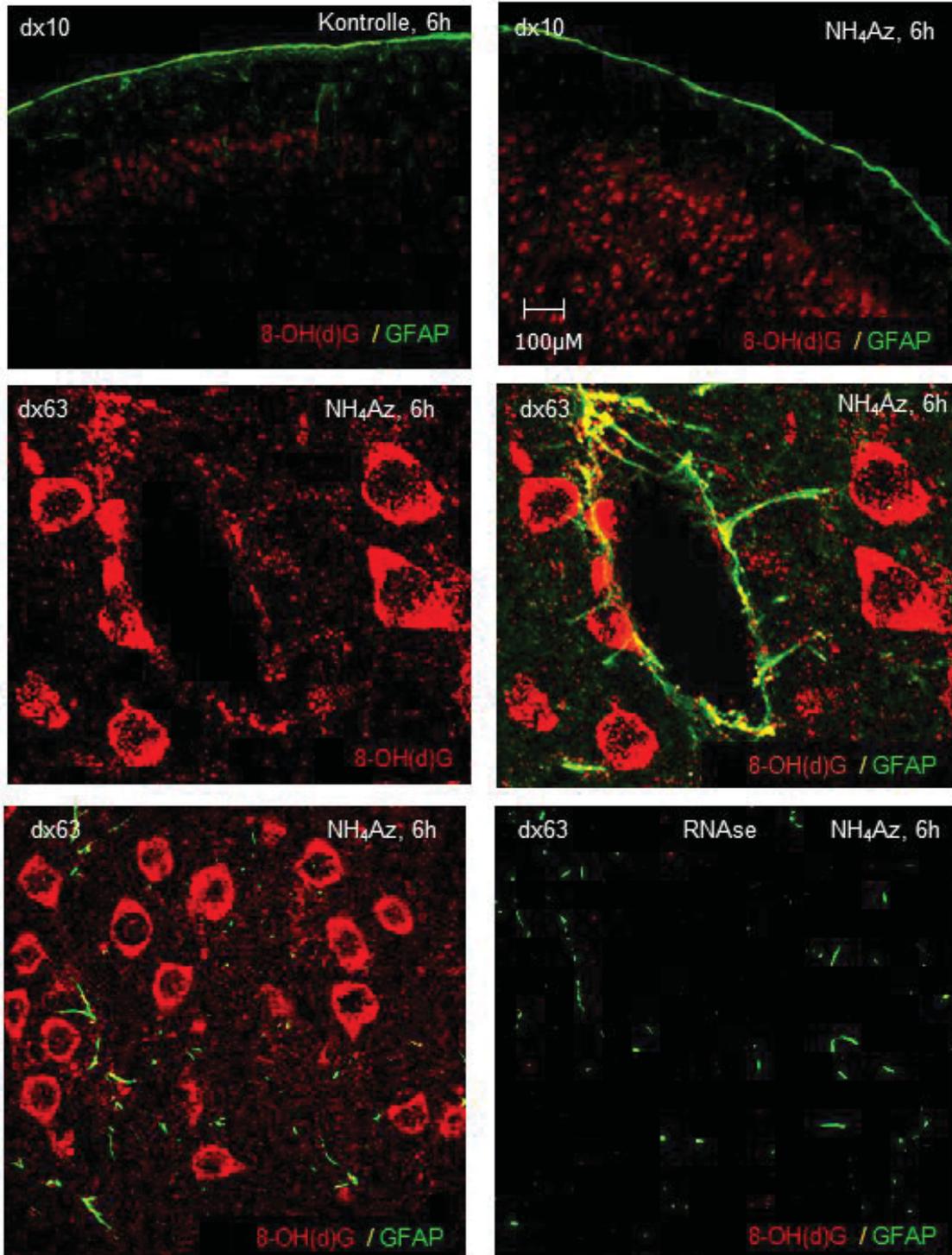
Wistar-Ratten wurde entweder NaCl(0,9%) oder Ammoniumazetat(4,5mmol/kg KG) intraperitoneal appliziert. RNA wurde aus dem zerebralen Kortex präpariert und oxidierte RNA durch die Verwendung eines anti-8-OH(d)G-Antikörpers, wie oben beschrieben, präzipitiert und die verbleibende RNA-Menge mittels Ribogreen fluorimetrisch quantifiziert und in Relation zur Ausgangsmenge angegeben *: statistisch signifikant ($p < 0,05$). Quelle: Görg *et al.*, 2008.

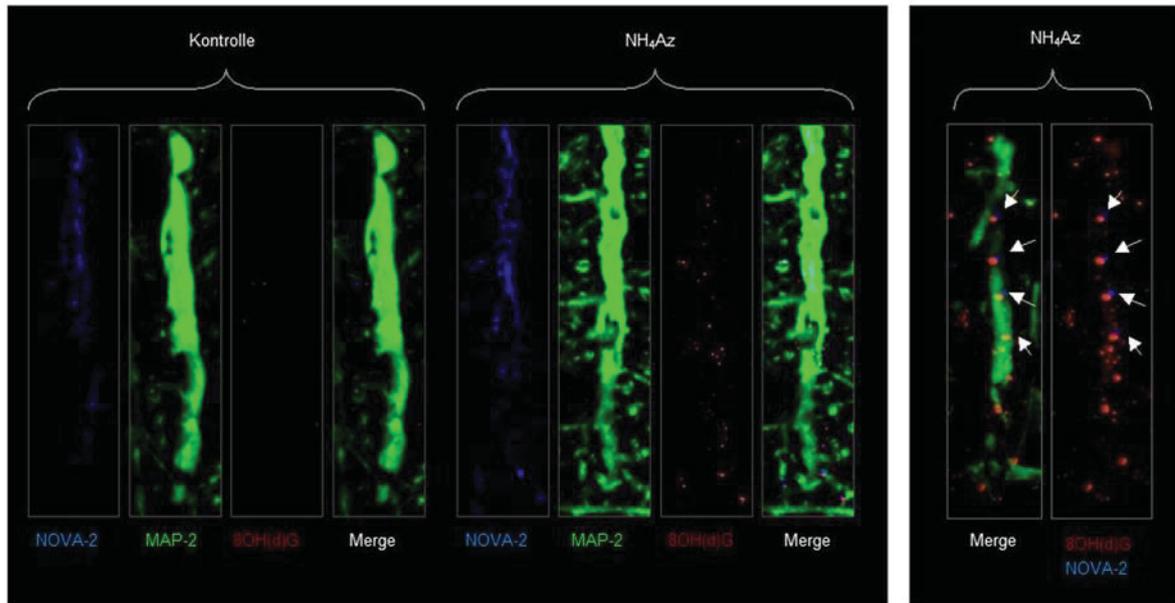
Zur Identifizierung der durch die RNA-Oxidation betroffenen Zelltypen wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Es zeigte sich eine intensive anti-8-OH(d)G-Färbung im Soma von Neuronen (Abb. 4.21A mittleres Feld). In einer Doppelfärbung, bei der zusätzlich zum anti-8-OH(d)G-Antikörper auch ein anti-GFAP-Antikörper verwendet wurde, zeigte sich sowohl in perivaskulären, als auch in parenchymalen GFAP-positiven Astrozyten eine deutlich erhöhte 8-OH(d)G-Immunreaktivität (Abb. 4.21A mittleres Feld).

Zur Überprüfung der Spezifität des Nachweises oxidierter RNA wurden die Hirnschnitte mit RNase A 10mg/ml für 12h bei 37°C vorbehandelt. Solchermaßen vorbehandelte Schnitte wiesen gegenüber den unbehandelten Schnitten keine anti-8-OH(d)G-Immunreaktivität mehr auf (Abb. 4.21 A unteres Feld).

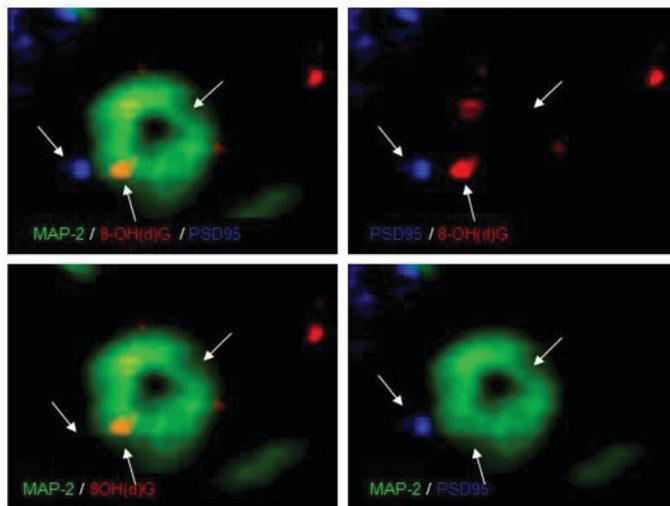
Zur genaueren Lokalisierung wurden oxidierte RNA, MAP-2 und das RNA-Transportprotein NOVA-2 gleichzeitig angefärbt. Im Vergleich zu kontrollbehandelten Ratten (NaCl, 0.9%) zeigte sich 6h nach Verabreichung von Ammoniumazetat ein deutlicher Anstieg oxidierter RNA in MAP-2-positiven Dendriten, oxidierte RNA kolokalisierte zudem mit NOVA-2. In nachfolgenden Immunfluoreszenzanalysen wurde

der Synapsenmarker PSD-95 gemeinsam mit oxidiertem RNA und MAP-2 angefärbt (Abb.4.21B). Die Abbildung 4.21C zeigt eine enge räumliche Assoziation oxidiertem RNA mit PSD-95-positiven Synapsen in zerebrokortikalen Dendriten NH_4Az -belasteter Ratten.





B



C

Abbildung 4.21: Nachweis der RNA-Oxidation bei akuter Hyperammonämie im Rattengehirn *in vivo*.

Doppelfärbung von anti-8-OH(d)G (rot) und dem Astrozytenmarker GFAP (grün). Oberes Feld: Übersichtsaufnahme des zerebralen Kortexes. Mittleres Feld: Lokalisation der RNA-Oxidation in perivaskulären Astrozyten und in neuronalen Somata. Unteres Feld: Überprüfung der Nachweisspezifität des anti-8-OH(d)G-Antikörpers (rot) im Hirnschnitt nach RNase A-Verdau (1mg/ml 37°C für 12h) (A). Tripelfärbung oxidierter RNA (rot) mit dem neuronalem Marker MAP-2 (grün) und dem RNA-Transportprotein NOVA-2 (blau) (B). Neuronaler Dendrit: Kofärbung oxidierter RNA (rot) mit dem neuronalen Marker MAP-2 (grün) und dem Synapsenmarker PSD-95 (blau) (C). Quelle: Görg *et al.*, 2008.

4.2.6 Nachweis oxidiertes RNA und Identifizierung oxidiertes RNA-Spezies in NH₄Cl-behandelten vitalen Maushirnschnitten

Vitale Maushirnschnitte wurden mit NH₄Cl (5mmol/L, 6h) behandelt und oxidierte RNA wurde mittels Slot- und Northwesternblot-Analyse nachgewiesen und quantifiziert. Wie in Abbildung 4.22 erkennbar ist, induziert die Behandlung vitaler Maushirnschnitte mit NH₄Cl (5mmol/L) nach 6h eine deutliche Zunahme oxidiertes RNA gegenüber unbehandelten Kontrollen (Abb.: 4.22A). Zur Quantifizierung und Validierung dieses Effektes wurde oxidierte RNA aus Gesamt-RNA-Präparation solchermaßen behandelter Schnitte mit dem anti-8-OH(d)G-Antikörper präzipitiert und mittels Ribogreenfluoreszenz quantifiziert (B). Zur Validierung der Spezifität der anti-8-OH(d)G-Immunpräzipitation wurde der Antikörper entweder blockiert, oder die RNA vor Präzipitation verdaut. Wie in Abbildung 4.22B erkennbar ist, verhindert sowohl eine Blockierung des Antikörpers mit freiem 8-OHG, als auch eine Degradation der RNA mit RNase A die Präzipitation vollständig.

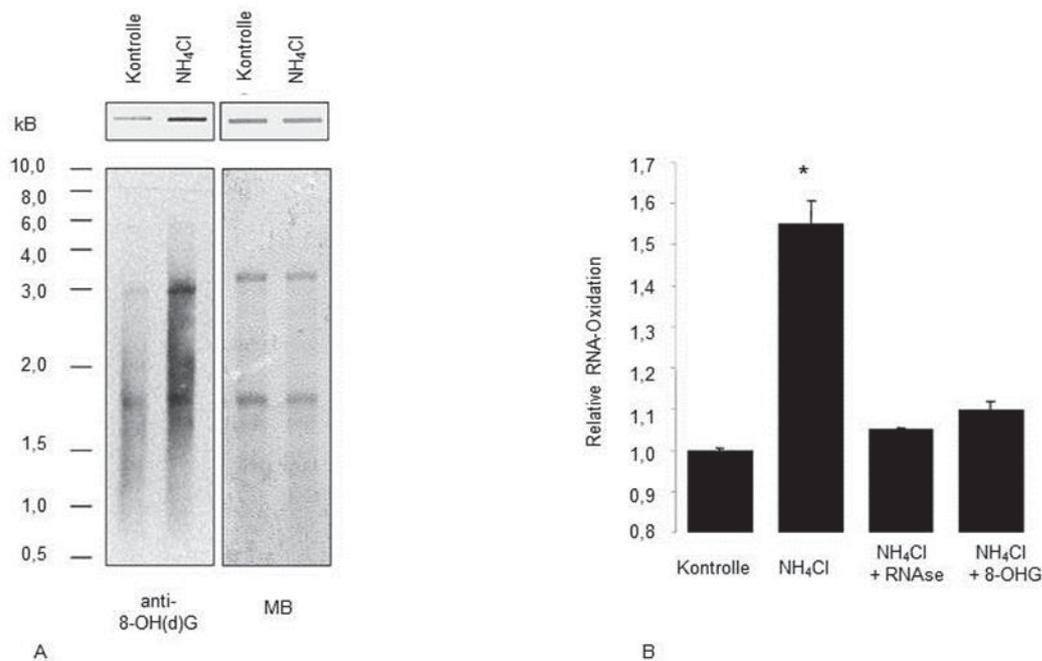


Abbildung 4.22: Nachweis oxidiertes RNA in Ammoniak-behandelten vitalen Hirnschnitten.

Vitale Mausschnitte wurden mit NH₄Cl (5mmol/L, 6h) behandelt und nachfolgend oxidiertes RNA in der Gesamt-RNA-Präparation mittels Slot- und Northwestern-Blot untersucht. Die Beladung der Membran wurde mittels Methylblau (MB) überprüft (A). Immunpräzipitation oxidiertes RNA und fluorimetrische Quantifizierung der RNA-Konzentration in den Präzipitaten mittels Ribogreen (B). *: statistisch signifikant ($p \leq 0,05$) Quelle: Görg *et al.*, 2008.

In Analogie zu den aus der Zellkultur erhaltenen Befunden wurden in anti-8-OH(d)G-Immunpräzipitaten GLAST- und β -Aktin-mRNA mittels RT-PCR nachgewiesen. Abbildung 4.23 zeigt in den anti-8-OH(d)G-Immunpräzipitaten NH₄Cl-behandelter Hirnschnitte, dass GLAST-, nicht jedoch das β -Aktin-Transkript verstärkt immunpräzipitiert wurde. Keine

Amplifikation der GLAST-mRNA konnte hingegen in Präzipitaten nachgewiesen werden, in denen der anti-8-OH(d)G-Antikörper mit freiem 8-OHG blockiert wurde.

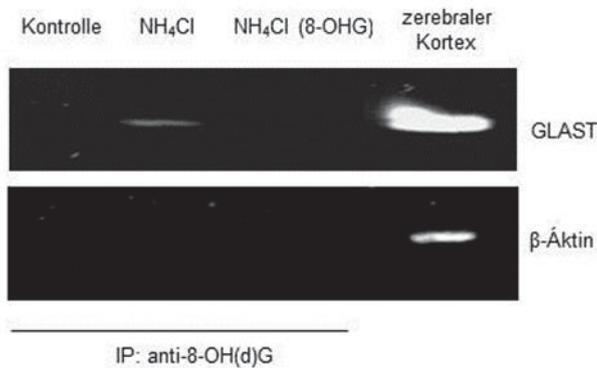


Abbildung 4.23: Nachweis oxidierter mRNA-Spezies in anti-8-OH(d)G-Immünpräzipitaten von Ammoniak-behandelten oder unbehandelten vitalen Maushirnschnitten.

Aus unbehandelter oder mit NH₄Cl behandelten (5mmol/L, 6h) Maushirnschnitten wurde Gesamt-RNA isoliert und oxidierte RNA mittels anti-8-OH(d)G-Antikörper präzipitiert und nachfolgend für die Synthese von cDNA verwendet. Mittels RT-PCR wurden GLAST- und β-Aktin-Transkripte amplifiziert und deren PCR-Produkte mittels Ethidiumbromid im Agarose-Gel nachgewiesen. Zum Nachweis der Antikörperspezifität wurde der anti-8-OH(d)G-Antikörper mit freiem 8-OHG blockiert (n=3). Quelle: Görg *et al.*, 2008.

4.2.7 Wirkung von TNF-α auf die RNA-Oxidation im vitalen Maushirnschnitt

Der Nachweis des Einflusses von TNF-α auf die RNA-Oxidation in vitalen Maushirnschnitten wurde mittels Slot-Blot-Analyse untersucht. Wie Abbildung 4.24 gezeigt, steigert TNF-α innerhalb von 6h die Oxidation von RNA um das 2,5-fache, gegenüber unbehandelten Kontrollen. Eine verstärkte RNA-Oxidation konnte auch mittels Immunfluoreszenzanalyse in TNF-α (10ng/ml, 6h)-behandelten Hirnschnitten nachgewiesen werden (Abb 4.25). Eine intensivere 8-OH(d)G-Immünreaktivität im Vergleich zur Kontrolle fand sich hierbei insbesondere im Soma von MAP-2-positiven neuronalen Dendriten. Die Ergebnisse dieser Experimente belegen, dass TNF-α die RNA-Oxidation im vitalen Maushirnschnitt steigert.

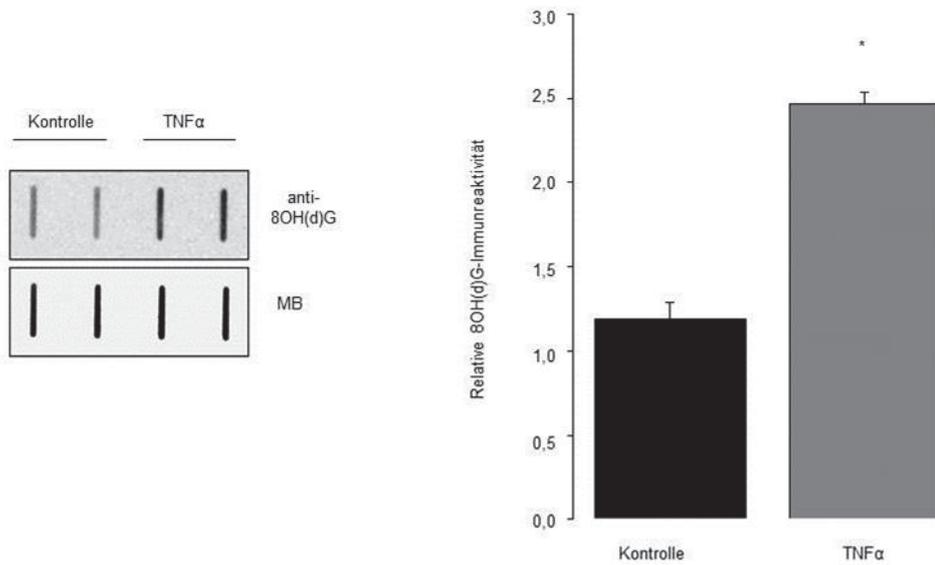


Abbildung 4.24: Nachweis oxidierter RNA in TNF- α -behandelten vitalen Mausschnitten.

Vitale Maushirnschnitte wurden mit TNF- α (50ng/ml, 6h) behandelt oder blieben unbehandelt. Links: Gesamt-RNA wurde isoliert und oxidierte RNA mittels Slot-Blot-Analyse untersucht. Die Beladung der Membran wurde durch Methylenblaufärbung überprüft. Rechts: Densitometrie und statistische Auswertung der anti-8-OH(d)G-Immunreaktivität. *: statistisch signifikant ($p \leq 0.05$).
Quelle: Görg *et al.*, 2008.

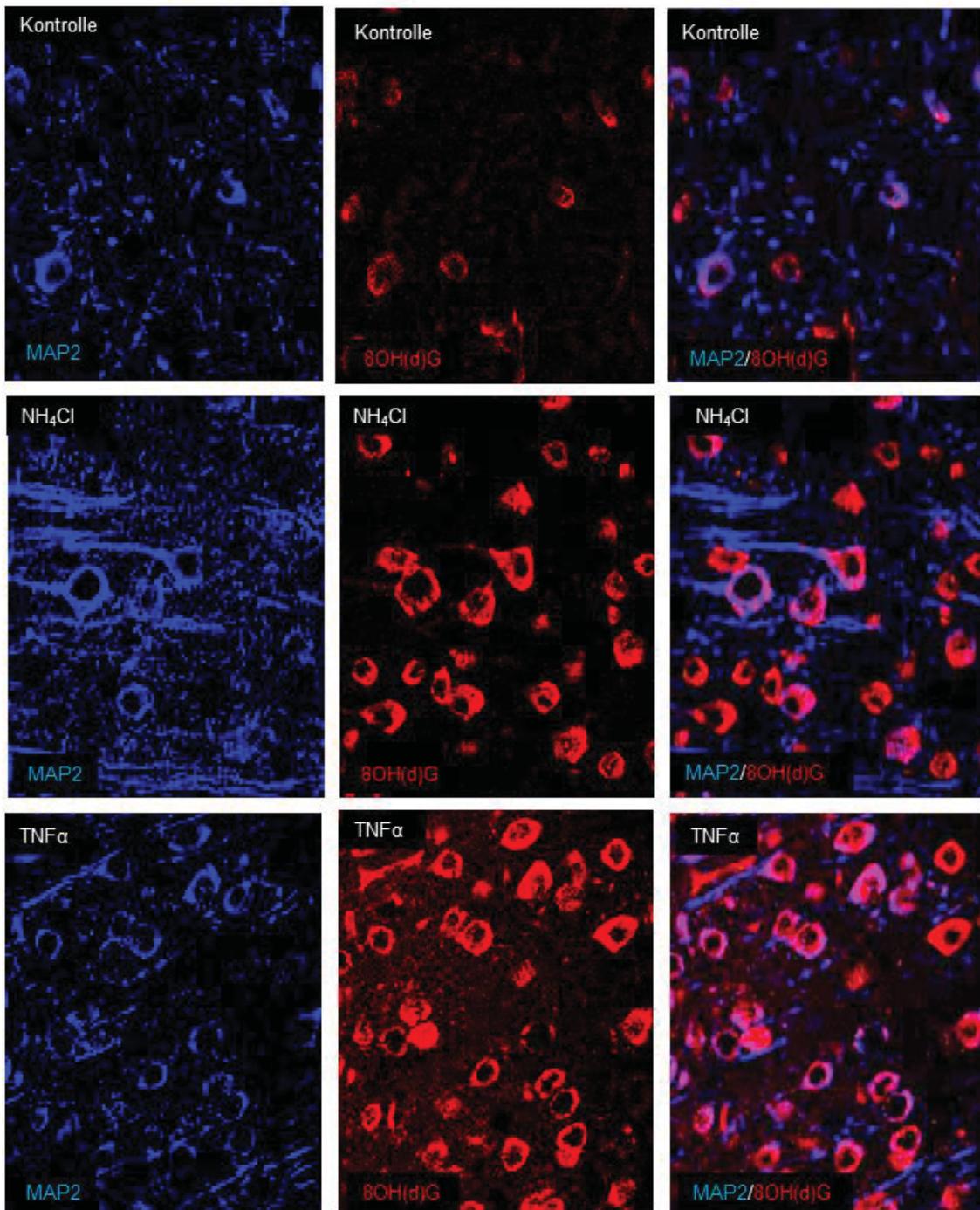


Abbildung 4.25: Nachweis oxidierter RNA in Ammoniak- oder TNF- α -behandelten vitalen Maushirnschnitten mittels Immunfluoreszenz.

Vitale Maushirnschnitte wurden mit NH_4Cl (5 mmol/L) und TNF- α (50 ng/ml) behandelt, aber blieben unbehandelt. Die RNA-Oxidation wurde mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Die unbehandelten (oberes Feld) und mit NH_4Cl - (mittleres Feld) oder TNF- α -behandelten Maushirnschnitte wurden einer Doppelfärbung mit anti-8-OH(d)G (rot) und mit dem Neuronenmarker MAP-2-Antikörper (blau) unterzogen. Oberes Feld Quelle: Görg *et al.*, 2008.

4.2.8 Nachweis oxidierter RNA im Rattenhirn nach Portalvenenligatur

Oxidierter RNA wurde in einem etablierten Tiermodell für chronische HE analysiert, bei der eine chronische Hyperammonämie durch partielle Portalvenenligatur herbeigeführt wird. Kontrolltiere wurden scheinoperiert. 2 Wochen nach Ligatur der Portalvene wurden die Tiere durch Pentobarbitalnarkose getötet und die Gefäße der Tiere durch transkardiale Perfusion mit physiologischer Kochsalzlösung von Blut befreit und RNA aus dem zerebralen Kortex für die Northwestern-Blot-Analyse isoliert. Wie in Abbildung 4.26 gezeigt, induzierte die Portalvenenligatur gegenüber scheinoperierten Kontrollen einen Anstieg oxidierter RNA um das 1,5-fache.

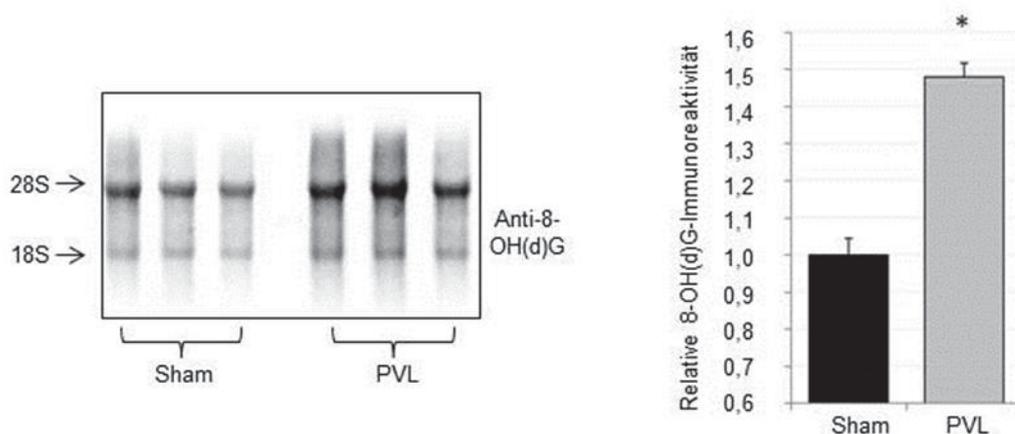


Abbildung 4.26: Nachweis oxidierter RNA im Rattenkortex nach Portalvenenligatur.

Gesamt-RNA wurde aus dem zerebralen Rattenkortex scheinoperierter Ratten (Sham) oder nach partieller Portalvenenligatur (PVL) isoliert und oxidierte RNA mittels Northwestern-Blot-Analyse nachgewiesen und densitometrisch quantifiziert (n=4). Quelle: Brück *et al.*, 2011.

4.2.9 Nachweis oxidierter RNA in humanen post mortem Hirnproben

Oxidierter RNA wurde in humanen *post mortem* Hirnproben gemessen. In diese Untersuchung wurden Proben von Patienten europäischer Herkunft (8 Patienten ohne Erkrankung der Leber oder des Gehirns, 8 Patienten mit Leberzirrhose und HE) und australischer Herkunft (4 Patienten ohne Erkrankung der Leber oder Gehirns, 4 Patienten mit Leberzirrhose ohne HE) eingeschlossen. Detaillierte Patienteninformationen sind den Tabellen 2 und 3 im Kapitel „Material und Methoden“ (Seite 31) zu entnehmen. Aus dem Patientenmaterial wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy-Kits, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben isoliert und mittels Northwestern-Blot analysiert. Wie in Abbildung 4.27 gezeigt, ist eine signifikant erhöhte Oxidation von RNA in der

Gruppe der Leberzirrhosepatienten mit HE gegenüber den Kontrollen nachweisbar. Keine verstärkte RNA-Oxidation gegenüber Kontrollen wurde hingegen in den RNA-Proben von Zirrhosepatienten ohne HE nachgewiesen.

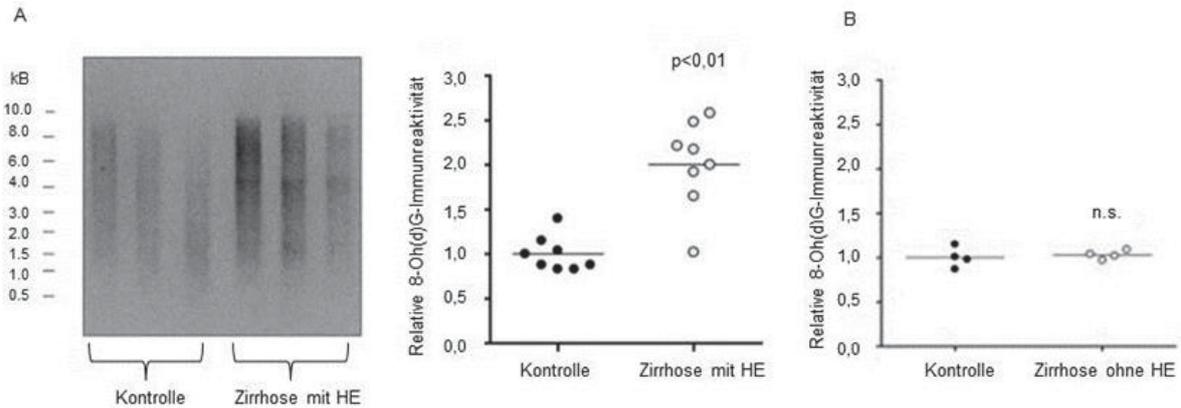


Abbildung 4.27: Nachweis oxidierter RNA in humanen *post mortem* Hirnproben.

Gesamt-RNA wurde aus *post mortem* Hirnproben isoliert und oxidierte RNA mittels Northwestern-Blot nachgewiesen. Repräsentativer Northwestern-Blot von 3 Kontrollpatienten und 3 Patienten mit Leberzirrhose und HE aus europäischer Patientengruppe und die densitometrische Analyse von allen Kontrollpatienten und Patienten mit Leberzirrhose und HE aus europäischer Patientengruppe (A) (n=8). Die Kontrollpatienten und Patienten mit Leberzirrhose ohne HE aus australischer Patientengruppe wurden auf zerebrale RNA-Oxidation mittels Northwestern-Analyse untersucht und anschliessend densitometrisch quantifiziert (B) (n=4). Quelle: Görg *et al.*, 2010.

Die Korrelation von Serumnatriumspiegeln und zerebraler RNA-Oxidation wurde in der Regressionsanalyse ermittelt. Hierfür wurden die verfügbaren Laborwerte (7 HE-Patienten aus der europäischen Kohorte) verwendet, die innerhalb von 24h vor dem Eintritt des Todes bestimmt wurden. In der Regressionsanalyse wurde der Serumnatriumspiegel zusammen mit der korrespondierenden RNA-Oxidation analysiert. Die Abbildung 4.28 zeigt eine signifikante negative Korrelation zwischen dem Serumnatriumspiegel und der RNA-Oxidation ($r=0,87$; $p<0,03$; $n=6$).

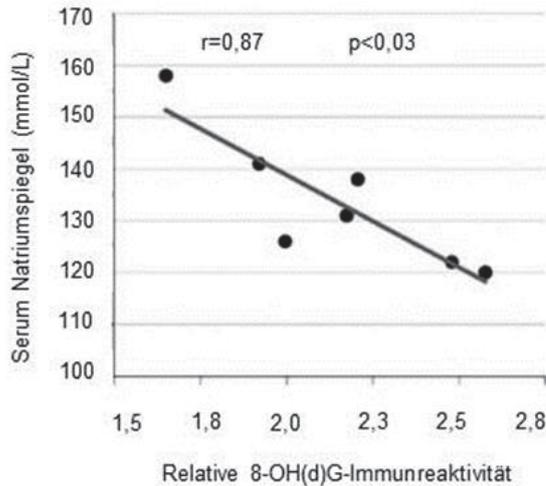


Abbildung 4.28: Korrelation von Serumnatriumkonzentrationen und zerebralen RNA-Oxidationsleveln.

Die Laborparameter stammen von 7 Patienten der 8 HE-Patienten aus der europäischen Kohorte. Quelle: Görg *et al.*, 2010

4.2.10 Nachweis von zerebralem oxidativem Stress in der leberspezifischen GS-Knockout-Mauslinie

Kürzlich gelang es in der Arbeitsgruppe von Professor Dieter Häussinger ein Mausmodell zu etablieren, bei dem spezifisch in der Leber die Glutaminsynthetase ausgeschaltet ist. Hierfür wurde das Glutaminsynthetasegen mit lox-P-Sequenzen in der DNA flankiert und eine unter Albuminpromoterkontrolle exprimierte Cre-Rekombinase in das Genom eingebracht. In der Leber wird die Glutaminsynthetase exklusiv in einer kleinen perivenös gelegenen Hepatozytensubpopulation exprimiert, den sogenannten „Scavenger-Zellen“ (Häussinger 1983; Häussinger and Gerok 1984; Häussinger *et al.*, 1985). Der Knockout der Glutaminsynthetase in der Leber ist in dieser Maus mit der Ausbildung einer Hyperammonämie assoziiert. Diese Mauslinie wurde im Rahmen dieser Arbeit auf die Entstehung von zerebralem oxidativem Stress untersucht. In der vorliegenden Arbeit wird nur ein Teil, der erhobenen Daten präsentiert. Die Abbildung 4.29 stellt exemplarisch die Daten aus Northwestern- und Western-Blot-Analysen dar. Wie aus dieser Abbildung zu entnehmen ist, zeigte der leberspezifische Glutaminsynthetase-Knockout gegenüber dem Wildtyp eine signifikant höhere Proteintyrosinnitrierung (Abb.: 4.29A) und 8OH(d)G-Immunreaktivität (Abb.: 4.29B) im Hippocampus, Zerebellum und im somatosensorischen Kortex.

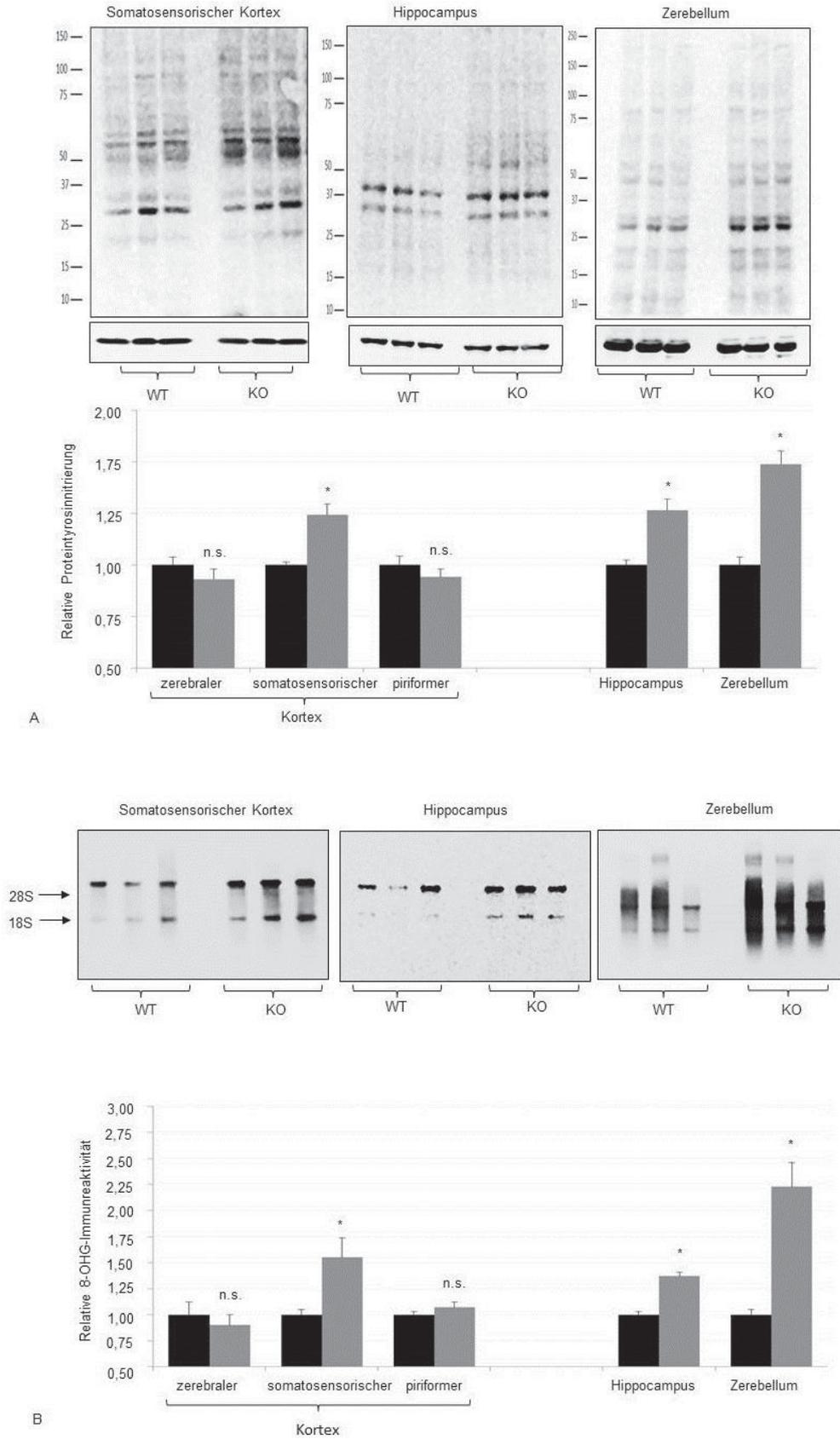


Abbildung 4.29: Nachweis von oxidativen Stressmarkern in den unterschiedlichen Hirnregionen der leberspezifischen Glutaminsynthetase-Knockout-Mauslinie.

Die unterschiedlichen Hirnregionen wurden den 6-Wochen-alten Mäusen entnommen nachdem sie mittels Pentobarbitalnarkose getötet wurden. Das gewonnene Material wurde für die Western-Blot-(A) und Northwestern-Blot-Analyse(B) verwendet. Die anti-NO₂Tyr- und 8OH(d)G-Immunreaktivität der Blots wurde densitometrisch analysiert und statistisch ausgewertet (für die Western-Blot-Analyse WT n=6, KO n=9, für die Northwestern-Blot-Analyse WT n= 6 und KO n=9). Quelle: Qvartskhava *et al.*, 2015.

5 Diskussion

Vorangegangene Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von Professor Häussinger (Schliess *et al.*, 2002; Häussinger *et al.*, 2006) sowie weiterer internationaler Forschergruppen (Jayakumar *et al.*, 2006; Rama Rao *et al.*, 2005; Norenberg *et al.*, 2004) belegen übereinstimmend an Astrozytenzellkulturen und Tiermodellen zur HE, dass die Pathophysiologie der hepatischen Enzephalopathie (HE) eng mit der Bildung von osmotischem und oxidativem Stress vergesellschaftet ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit oxidativem Stress assoziierte posttranslationale Protein- und posttranskriptionale Nukleinsäure-Modifikationen untersucht und deren Bedeutung für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie überprüft.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Konsequenzen der Tyrosinnitrierung der Glutaminsynthetase, die in vorangegangenen Arbeiten (Schliess *et al.*, 2002 und Görg *et al.*, 2003; 2005) an Ammoniak-behandelten kultivierten Rattenastrozyten und in HE-Tiermodellen erstmalig beschrieben wurde, für deren enzymatische Aktivität und proteasomale Degradation in *in vitro* Experimenten untersucht und deren klinische Relevanz unter Verwendung von humanem *post mortem* Hirnmaterial überprüft.

In einem zweiten Abschnitt der Arbeit wurde untersucht, ob die durch Ammoniak- und weitere HE-relevante Faktoren-vermittelte oxidativ/nitrosative Stressantwort mit der Oxidation von RNA als eine neue für die Pathogenese der HE funktionale Konsequenz vergesellschaftet ist. Hierfür wurden die Kinetik, die Reversibilität, die der RNA-Oxidation zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, die zelluläre Lokalisation, die Selektivität der von einer Oxidation betroffener RNA-Spezies untersucht und die *in vivo* Relevanz der aus Zellkulturen-erhaltenen Befunde an Tiermodellen zur HE und an *post mortem* Hirnbiopsieproben überprüft.

5.1 Proteintyrosinnitrierung der Glutaminsynthetase

Die Tyrosinnitrierung (PTN) ist eine durch nitrosativen Stress herbeigeführte posttranslationale Proteinmodifikation, die einen Einfluss auf die Funktionalität betroffener Proteine haben kann (Barbosa de Oliveira *et al.*, 2002). Sie kann ohne Einfluss auf die Funktion bleiben, oder die Aktivität bzw. Funktionalität betroffener Proteine sowohl steigern, als auch verringern (Ischiropolous *et al.*, 2008). So konnte z.B. gezeigt werden, dass eine PTN der Superoxiddismutase vom Typ 1 deren Aktivität inhibiert und dies assoziiert ist mit einem Verlust der Resistenz gegenüber oxidativem Stress bei familiärer amyotropher Lateralsklerose (Beckman *et al.*, 1993). Eine Proteintyrosinnitrierung kann die betroffenen Proteine aber auch für den proteasomalen Abbau durch das 20S Proteasom prädisponieren (Grune *et al.*, 1998).

Bei hepatischer Enzephalopathie wurden an Astrozytenzellkulturen und/oder in Tierexperimentalsystemen zur HE eine Tyrosinnitrierung des peripheren Benzodiazepinrezeptors (PBR), der Glutaminsynthetase (GS), der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), der „*extracellular-signal regulated kinase*“ (Erk)-1 (Schliess *et al.*, 2002) sowie des Na-K-Cl-Kotransporters (NKCC1) (Jayakumar *et al.*, 2008) gezeigt. Während die Tyrosinnitrierung der GAPDH mit einer verstärkten proteasomalen Degradation einhergeht (Buchzyk *et al.*, 2003), bewirkt die PTN des NKCC1 eine Aktivierung wie sie auch durch Phosphorylierung des NKCC1 herbeigeführt wird (Jayakumar *et al.*, 2008).

Obwohl die Tyrosinnitrierung der GS mit einem Aktivitätsverlust in Ammoniak-behandelten Astrozyten assoziiert ist (Schliess *et al.*, 2002) und an mit Peroxynitrit-behandelter isolierter Glutaminsynthetase gezeigt werden konnte, dass die Tyrosinnitrierung der GS in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum erfolgt (Görg *et al.*, 2005), ist ein kausaler Zusammenhang zwischen Tyrosinnitrierung und dem Verlust der enzymatischen Aktivität bei der GS bislang nicht belegt worden und war Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

In Übereinstimmung mit den an mit Ammoniak-belasteten Rattenastrozyten erhobenen Befunden von Schliess *et al.* (2002) und der Tyrosinnitrierung und enzymatischen Inaktivierung der GS in der Leber LPS-behandelter Ratten (Görg *et al.*, 2005) konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die durch Peroxynitrit (ONOO⁻) *in vitro* herbeigeführte Nitrierung isolierter GS mit einem Aktivitätsverlust des Enzyms assoziiert ist (Abb. 4.3A). Sowohl die Nitrierung, als auch der Aktivitätsverlust der GS korrelierten signifikant mit der verwendeten Peroxynitritkonzentration (Abb. 4.3B). Im Vergleich zur Behandlung isolierter GAPDH (Buchzyk *et al.*, 2003), die *in vitro* erst unter Verwendung einer ONOO⁻-Konzentration von 100-200µmol/L tyrosinnitriert vorgefunden wurde, war eine Tyrosinnitrierung und ein damit einhergehender Aktivitätsverlust der GS bereits durch eine ONOO⁻-Konzentration von 5µmol/L induzierbar (Abb. 4.3A). Dieser Befund lässt vermuten, dass die GS-Aktivität äußerst sensitiv gegenüber einer durch nitrosativen Stress induzierten Proteintyrosinnitrierung ist.

Die Behandlung der GS mit höheren ONOO⁻-Konzentrationen (5µmol/L) induzierte neben der PTN zusätzliche posttranslationale Proteinmodifikationen wie S-Nitrosylierung und Karbonylierung (Abb. 4.2). Eine Karbonylierung und Inaktivierung der GS wurde bereits im Gehirn von Alzheimermodellern (Carney *et al.*, 1994; Hensley *et al.*, 1994) und in *post mortem* Hirnproben von Alzheimerpatienten (Butterfield *et al.*, 2005) nachgewiesen und der dort gefundene GS-Aktivitätsverlust als Folge der Karbonylierung diskutiert.

Die Bedeutung der Tyrosinnitrierung für den Aktivitätsabfall der GS konnte in Experimenten belegt werden, bei denen die durch 5µmol/L ONOO⁻-vermittelte PTN und

der damit einhergehende Aktivitätsabfall der GS vollständig durch das Antioxidans und spezifisch die Tyrosinnitrierung von Proteinen hemmende (Schroeder *et al.*, 2001) Flavonoid Epicatechin (EC) verhindert werden konnte (Abb. 4.5A).

Die unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen durchgeführte *in vitro* Behandlung isolierter GAPDH mit ONOO⁻ bei Buchzyk *et al.* (2003) zeigte, dass die GAPDH im Vergleich zur Tyrosinnitrierung sensitiver ist gegenüber einer durch ONOO⁻-vermittelten Karbonylierung und diese einen proteasomalen Abbau der GAPDH durch das 20S Proteasom vermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurde gefunden, dass unter Verwendung einer ONOO⁻-Konzentration, bei der ausschließlich eine Tyrosinnitrierung, aber keine Karbonylierung der GS induziert wird (5µmol/L), und dass die Tyrosinnitrierung der GS keinen verstärkten Abbau durch das 20S Proteasom bewirkt (Abb. 4.8 A). Die zusätzliche Induktion einer S-Nitrosylierung und Karbonylierung der GS durch Verwendung einer höheren ONOO⁻-Konzentration (50µmol/L, Abb. 4.3) induzierte demgegenüber einen signifikanten Abbau der GS durch das 20S Proteasom (Abb. 4.8A). Dieses Ergebnis belegt übereinstimmend mit den Befunden von Buchzyk *et al.* (2003), dass die Karbonylierung eine posttranslationale Proteinmodifikation repräsentiert, die einen Abbau von oxidativ modifizierten Proteinen durch das 20S Proteasom vermitteln kann. Die Karbonylierung von Proteinen wurde in diesem Zusammenhang auch als irreversible oxidative Schädigung diskutiert, die einen Abbau der betroffenen Proteine zwingend erforderlich machen könnte (Levine *et al.*, 2002).

Die Reversibilität der Tyrosinnitrierung von Proteinen ist bislang nur unzureichend untersucht worden. Dennoch gelang es einer Arbeitsgruppe zu zeigen, dass ein Ca²⁺-abhängiger und hitzelabiler Faktor in Milzproteinlysaten LPS-behandelter Ratten die Anti-Nitrotyrosinimmunreaktivität von mit ONOO⁻-nitriertem Albumin im Western-Blot vermindert (Kamisaki *et al.*, 1998). Während ein Protein mit Denitraseaktivität bis heute nicht identifiziert werden konnte, gelang es mittlerweile mehreren unabhängigen Arbeitsgruppen die Existenz einer Denitraseaktivität in unterschiedlichen Zelltypen und Organen zu bestätigen (z.B. Deeb *et al.*, 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde gefunden, dass die *in vitro* durch ONOO⁻-vermittelte Tyrosinnitrierung der GS durch Behandlung mit Milzproteinlysaten, die aus LPS-behandelten Ratten gewonnen wurden, revertiert werden kann (Abb. 4.6 A-C). Dabei war die verringerte anti-Nitrotyrosinimmunreaktivität nicht Folge einer verstärkten Degradation der GS durch im Milzproteinlysat enthaltene Proteasen (Abb. 4.6 A-B). In Übereinstimmung mit Kamisaki *et al.* (1998) zeigt die vorliegende Arbeit, dass der im Milzproteinlysat enthaltende denitrierende Faktor hitzelabil ist, und daher eine enzymatische Aktivität repräsentieren könnte (Abb. 4.6 B). Kongruent zu der durch Tyrosinnitrierung vermittelten Glutaminsynthetaseinaktivierung ging die Revertierung der

Tyrosinnitrierung in mit Milzproteinlysaten-behandelten Proben mit einer Normalisierung der GS-Aktivität einher (Abb. 4.6 D). Dabei war die Normalisierung der GS-Aktivität nicht auf das Einbringen zusätzlicher Glutaminsynthetaseaktivität durch das Milzproteinlysat zurückzuführen (Abb. 4.7 B).

Die Reversibilität der PTN der Glutaminsynthetase und der in dieser Arbeit erbrachte Nachweis einer Denitraseaktivität im Gehirn unbehandelter Ratten (Abb. 4.7) lassen vermuten, dass die Nitrierung der GS einen gerichteten und damit ein regulatorischer Prozess auch im Gehirn darstellen könnte. Diese Spekulation wird gestützt von einer kürzlich erschienen Arbeit, die eine reversible, denitraseabhängige Aktivitätswiederherstellung der durch Tyrosinnitrierung inaktivierten Cyclooxygenase-1 zeigt (Deeb *et al.*, 2013). Die Autoren vermuten in diesem Zusammenhang einen Feedback-Mechanismus, über den einer COX-1-vermittelten Synthese *pro*-inflammatorisch wirkender Prostanoiden durch oxidativen/nitrosativen Stress situationsabhängig und reversibel entgegengewirkt werden kann (Deeb *et al.*, 2013).

Die hier an Astrozyten und in HE-Tiermodellen erstmalig gezeigte Tyrosinnitrierung der Glutaminsynthetase wurde inzwischen von weiteren Arbeitsgruppen anderer Fachrichtungen aufgegriffen und als Erklärungsansatz für die Pathogenese unterschiedlicher Erkrankungen herangezogen wie z.B. der beim Diabetes Mellitus auftretenden diabetischen Retinopathie, bei dem eine PTN der in Müllerzellen exprimierten Glutaminsynthetase in der Netzhaut beobachtet wurde (Zeng *et al.*, 2010).

5.2 Zerebraler oxidativer/nitrosativer Stress und Nitrierung der Glutaminsynthetase bei Zirrhosepatienten mit hepatischer Enzephalopathie

In der vorliegenden Arbeit wurde an *post mortem* Hirnproben von Zirrhosepatienten mit hepatischer Enzephalopathie gegenüber Kontrollpatienten eine gesteigerte Tyrosinnitrierung individueller Proteine im zerebralen Kortex gezeigt. Diese Befunde belegen die pathophysiologische Relevanz der an mit Ammoniak-belasteten Astrozytenzellkulturen und im Hirn von HE-Tiermodellen in vorausgegangenen Arbeiten gezeigten Proteintyrosinnitrierung (Schliess *et al.*, 2002; Jayakumar *et al.*, 2008; Kosenko *et al.*, 2003; Suárez *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu an kultivierten Rattenastrozyten und HE-Tiermodellen erhobenen Befunden, ging die erhöhte Proteintyrosinnitrierung im Gehirn von Zirrhosepatienten mit HE jedoch nicht mit einer gesteigerten Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) einher (Görg *et al.*, 2010). Unter den tyrosinnitrierten Proteinen im Gehirn von Zirrhosepatienten mit HE wurde im Einklang mit vorausgegangenen an Zellkulturen und HE-Tiermodellen erhaltenen Befunden (Schliess *et al.*, 2002) die Glutaminsynthetase identifiziert (Abb. 4.10B). In Einklang mit einer

aktivitätshemmenden Wirkung der GS-Tyrosinnitrierung wurde eine verringerte GS-Aktivität im zerebralen Kortex von Zirrhosepatienten mit HE gefunden (Abb.4.10A). Da in der vorliegenden Arbeit eine S-Nitrosylierung und Karbonylierung der Glutaminsynthetase im Gehirn von Zirrhosepatienten mit HE nicht untersucht wurde, kann gegenwärtig nicht ausgeschlossen werden, dass die verringerte GS-Aktivität im Gehirn von Zirrhosepatienten mit HE auch durch diese posttranslationalen Proteinmodifikationen vermittelt wird.

5.3 Bedeutung der Glutaminsynthetasenitrierung für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie

Zusammenfassend zeigen die Befunde der vorliegenden Dissertation, dass die Tyrosinnitrierung der GS einen regulatorischen Einfluss auf die Aktivität, aber nicht den Abbau der Glutaminsynthetase durch das 20S Proteasom ausübt und prinzipiell reversibel ist. Ungeklärt bleibt jedoch, ob eine Denitrierungsreaktion auch im Hirn *in vivo* erfolgt. Die Relevanz der Glutaminsynthetase-Tyrosinnitrierung für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie wird gestützt durch Befunde der vorliegenden Dissertation, die eine verringerte Glutaminsynthetaseaktivität begleitet von einer gesteigerten Tyrosinnitrierung der GS in *post mortem* Hirnbiopsien von Zirrhosepatienten mit HE gegenüber Kontrollen belegt.

Obwohl die Proteintyrosinnitrierung als möglicher Angriffspunkt für eine therapeutische Intervention bei mit oxidativen/nitrosativen Stress assoziierten Erkrankungen diskutiert wird (Ali *et al.*, 2008; Sennlaub *et al.*, 2002), kann gegenwärtig die aus einer Tyrosinnitrierung der GS erwachsene Konsequenz für die Pathophysiologie der hepatischen Enzephalopathie noch nicht abschließend beurteilt werden (Häussinger and Görg 2010). Es kann vermutet werden, dass die Unterbindung der Glutaminakkumulation in Astrozyten die hiermit assoziierte Astrozytenschwellung abmildert und dadurch die Bildung eines geringgradigen Gliödem abschwächt (Häussinger *et al.*, 1994). Die Tyrosinnitrierung der GS könnte in diesem Zusammenhang als regulatorischer Mechanismus verstanden werden, der ähnlich agiert wie die Phosphorylierung von Proteinen (Monteiro *et al.*, 2002), wodurch einer weiteren schwellungsinduzierenden Akkumulation von Glutamin entgegengewirkt werden könnte. Hierfür sprechen die Befunde der vorliegenden Promotionsarbeit, dass die PTN der GS durch eine putative enzymatische Aktivität (Denitrase), die auch im Gehirn vorhanden ist, entfernt werden kann. Andererseits kann nicht von der inaktivierten GS entgifteter Ammoniak auch eine erhöhte neurotoxische Wirkung entfalten (Hazell *et al.*, 1999; Albrecht *et al.*, 1999). Ob eine Hemmung der Nitrierung der Glutaminsynthetase durch Antioxidanten von therapeutischem Nutzen für die Pathogenese der HE sein könnte, ist daher gegenwärtig

unklar. Hierbei muss außerdem berücksichtigt werden, dass eine anti-oxidative Therapie auch eine unspezifische Hemmung durch Oxidantien gesteuerter Signalwege, wie z.B. der reversiblen Inaktivierung von Phosphatasen bewirken könnte und in der Folge unkalkulierbare Nebeneffekte auf die Hirnfunktionen ausüben könnte.

5.4 Oxidation von RNA bei hepatischer Enzephalopathie

Die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies kann nicht nur posttranslational Proteine modifizieren, sondern posttranskriptionell auch RNA. Während verschiedene chemische Modifikationen an Basen und dem Zuckergerüst der RNA mittlerweile bekannt sind (Cooke *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2004) hat die Oxidation von Guanin zum 8-Oxoguanin (in der Literatur auch häufig als 8-Hydroxyguanin (8-OHG) bezeichnet) in jüngerer Zeit an Aufmerksamkeit gewonnen (Nunomura *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999). Der Schweregrad der zerebralen Dysfunktion und die Beeinträchtigung kognitiver Funktionen bei Morbus Alzheimer korrelieren auffallend stark mit dem Grad an zerebral oxidierte RNA (Nunomura *et al.*, 2006). Gleichzeitig stellt die RNA-Oxidation ein in der Pathogenese der Erkrankung auffallend früh auftretendes Ereignis dar im Vergleich zur Karboxylierung oder Nitrierung von Proteinen (Levine *et al.*, 2002; Duda *et al.*, 2000). Da die Translation oxidierte RNA eine fehlerhafte Bildung von Proteinen mit beeinträchtigter Funktion bedingen, oder die Translationseffizienz verringern kann, wurde vermutet, dass oxidierte RNA der zerebralen Dysfunktion bei Morbus Alzheimer zugrunde liegen könnte (Nunomura *et al.*, 2006). Tatsächlich gelang es die zerebrale Oxidation von mRNA-Spezies in Alzheimertiermodellen zu zeigen, deren Proteinprodukte in Zusammenhang mit der Erkrankung stehen (Shan *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Dissertation wurde untersucht, ob die hepatische Enzephalopathie mit einer verstärkten Oxidation von RNA bzw. der Bildung von 8-Oxoguanin assoziiert ist. Die Ergebnisse zeigen erstmalig, dass Ammoniak (Abb. 4.11) und weitere HE-relevante Faktoren wie Diazepam, TNF- α und eine durch Hypoosmolarität herbeigeführte Zellschwellung (Abb. 4.18) eine Oxidation von RNA in kultivierten Rattenastrozyten induziert. Diese an Kulturen erhobenen Befunde konnten an mit Ammoniak- und TNF- α -belasteten vitalen Maushirnschnitten (Abb. 4.24) und in HE-Tiermodellen (Abb. 4.26) reproduziert werden und belegen die *in vivo* Relevanz der an Astrozytenzellkulturen erhaltenen Befunde.

Die Bildung von oxidativem/nitrosativem Stress in mit Ammoniak behandelten kultivierten Astrozyten beruht auf einer NMDA-Rezeptoraktivierung und einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, einer Stickstoffmonoxid NO-Synthase vermittelten Bildung von NO (Schliess *et al.*, 2002), sowie der Aktivierung einer astrozytär exprimierten NADPH-Oxidase (Reinehr *et al.*, 2007, Norenberg *et al.*, 2009; Jayakumar *et al.*, 2009,

2011). In Übereinstimmung mit diesen Arbeiten zeigten die Untersuchungen der vorliegenden Dissertation, dass die durch Ammoniak-vermittelte RNA-Oxidation auf einer NMDA-Rezeptoraktivierung, einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, sowie einer Aktivierung der NADPH-Oxidase beruht (Abb. 4.16).

In vitro Experimente belegten, dass die RNA-Oxidation ein zeit- und konzentrationsabhängiger (Abb. 4.11) und nach Wegnahme des Stimulus *in vitro* (Abb. 4.12) aber auch *in vivo* (Abb. 4.19) reversibler Prozess ist. Da die neuropsychiatrische Symptomatik der HE ebenfalls prinzipiell reversibel ist (Hazell und Butterworth 1999) könnte die RNA-Oxidation einer Beeinträchtigung neuronaler Funktionen bei HE zugrunde liegen und die Reversibilität klinischer HE-Episoden erklären. Während enzymatische DNA-Reparaturmechanismen seit langem bekannt und gut dokumentiert sind (Boiteux *et al.*, 2000; Shinmura *et al.*, 2001), ist gegenwärtig unklar, ob oxidierte RNA wieder reduziert werden kann. Daher bleibt offen, ob die in vorliegenden Dissertation beschriebene Reversibilität der RNA-Oxidation Folge eines bislang nicht identifizierten RNA-Reparaturmechanismus ist, oder auf einer Degradation betroffener RNA-Spezies beruht (Nunomura *et al.*, 2006).

Auch im Gehirn Ammoniumazetat-behandelter Ratten wurde gegenüber unbehandelten Kontrollen eine Zunahme oxidierte RNA in perivaskulären Astrozyten gefunden (Abb. 4.21A). Demgegenüber zeigten Neurone einen höheren RNA-Oxidationslevel (Abb. 4.21A). Die oxidierte RNA fand sich in den Neuronen überwiegend im Soma (Abb. 4.21A), aber auch in Vesikeln in neuronalen Dendriten in enger räumlicher Nähe zu dem RNA-bindenden Transportprotein NOVA-2 (Abb. 4.21B) und der Postsynapse (Abb. 4.21C). Diese Befunde lassen vermuten, dass an die Synapse transportierte RNA oxidiert wird. Da langanhaltende synaptische Plastizität und Gedächtnisbildung eine lokale Proteinbiosynthese für die molekulare Restrukturierung der Synapse erfordert (Cajigas *et al.*, 2010; Schuman *et al.*, 2006), kann vermutet werden, dass synaptisch lokalisierte oxidierte RNA der Beeinträchtigung kognitiver Funktionen bei HE zugrunde liegen könnte. Diese Hypothese wird durch Befunde gestärkt, die zeigen, dass eine Hemmung der durch Ammoniak-vermittelten Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies in vitalen Hirnschnitten durch das die RNA-Oxidation inhibierende Polyphenon60 einhergeht mit einer Normalisierung der durch Ammoniak gestörten Neurotransmission (Sergeeva *et al.*, 2013).

Unter den oxidierten RNA-Spezies wurden in den Untersuchungen der vorliegenden Dissertation der astrozytär exprimierte Glutamat/Aspartat-Transporter (GLAST), sowie die 18S Untereinheit der Ribosomen in Ammoniak-belasteten Astrozyten (Abb. 4.17) und vitalen Maushirnschnitten (Abb. 4.23), nicht aber Aktin-mRNA identifiziert. Die Oxidation der GLAST-mRNA könnte als Erklärungsansatz dienen, für die an kultivierten Astrozyten

beschriebene Herunterregulation der GLAST-mRNA (Zhou *et al.*, 1999), des Proteins (Chan *et al.*, 2000) und des verringerten Glutamattransports (Chan *et al.*, 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebene Selektivität der Oxidation spezifischer RNA-Spezies steht in Einklang mit Befunden von Shan *et al.* (2003) die ebenfalls zeigen konnten, dass die quantitativ stark exprimierte Aktin-mRNA im Gehirn im Alzheimermodell nicht oxidiert wird. Bislang ist unklar, welche Faktoren der Selektivität der RNA-Oxidation zugrunde liegen, aber es wird vermutet, dass die Halbwertszeit oder strukturelle oder sequenzspezifische Eigenschaften die Sensitivität individueller mRNA-Spezies gegenüber einer Oxidation bedingen (Shan *et al.*, 2003; Castegna *et al.*, 2002).

Eine signifikante Zunahme oxidierter RNA konnte auch in *post mortem* Hirnbiopsien von Zirrhosepatienten mit HE, aber nicht in Zirrhosepatienten ohne HE gefunden werden (Abb. 4.27). Eine signifikante inverse Korrelation zwischen dem Grad der RNA-Oxidation und Serumnatriumspiegeln (Görg *et al.*, 2010) könnte hier auf die enge Assoziation von osmotischem und oxidativen Stress hindeuten. So zeigten Patienten mit einer Hyponatriämie eine stärkere zerebrale RNA-Oxidation, als Patienten mit normalen Serumnatriumspiegeln (Abb.: 4.28). Dieser Befund steht in Einklang mit Befunden, die zeigen, dass eine experimentell durch Hypoosmolarität herbeigeführte Astrozytenschwellung nicht nur oxidativen/nitrosativen Stress (Schliess *et al.*, 2004), sondern auch eine RNA-Oxidation (diese Arbeit) induziert, und dass eine Hyponatriämie die klinische Symptomatik von HE-Patienten exazerbieren lässt (Papadakis *et al.*, 1988, Wilkinson *et al.*, 1974).

6 Schlussfolgerung

Die in der vorliegenden Dissertationsarbeit erbrachten Befunde belegen in Einvernehmen mit Literaturbefunden, dass oxidativer/nitrosativer Stress eine wichtige Rolle in der Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie einnimmt. Da im Gegensatz zu Zirrhosepatienten mit HE in *post mortem* Hirnbiopsien von Zirrhosepatienten ohne HE keine gesteigerte Proteintyrosinnitrierung und RNA-Oxidation gefunden werden konnte, lassen die Ergebnisse außerdem vermuten, dass die zerebrale Bildung von oxidativem/nitrosativem Stress ein charakteristisches Merkmal der hepatischen Enzephalopathie darstellt und im Zusammenhang mit der klinisch offenkundigen zerebralen Dysfunktion bei HE stehen könnte. Während in der vorliegenden Arbeit die funktionale Relevanz der von Schliess *et al.* (2002) und Görg *et al.* (2005) gezeigten Tyrosinnitrierung der Glutaminsynthetase erstmalig belegt werden konnte, wurde die RNA-Oxidation als neue funktional relevante Konsequenz der Bildung von osmotischem und oxidativ/nitrosativem Stress bei HE identifiziert.

Kürzlich gelang es in der Arbeitsgruppe von Professor Dieter Häussinger eine Maus zu etablieren, bei der spezifisch in der Leber die Glutaminsynthetase ausgeschaltet ist. Der Knockout der Glutaminsynthetase in der Leber ist in dieser Maus mit der Ausbildung einer Hyperammonämie assoziiert (Qvartskhava *et al.*, 2015). In der vorliegenden Dissertation konnte belegt werden, dass eine durch partielle Portalvenenligatur herbeigeführte chronische Hyperammonämie mit der Bildung von zerebralem oxidativ/nitrosativem Stress, Proteintyrosinnitrierung und RNA-Oxidation sowie Verhaltensänderungen verbunden ist. In Übereinstimmung mit diesen Befunden ist auch die chronische Hyperammonämie bei der leberspezifischen Glutaminsynthetase-Knockout-Maus mit der zerebralen Bildung von oxidativ/nitrosativem Stress und einer verstärkten Proteintyrosinnitrierung und RNA-Oxidation sowie einer Beeinträchtigung von Lokomotion und Verhalten assoziiert (Qvartskhava *et al.*, 2015).

Ungeklärt ist gegenwärtig, ob die Tyrosinnitrierung der zerebral exprimierten Glutaminsynthetase bei hepatischer Enzephalopathie eine protektive Funktion im Sinne einer Kompensation einer glutaminbedingten Astrozytenschwellung darstellt, oder eine erhöhte zerebrale Ammoniaktoxizität bewirkt. Die Bedeutung der astroglialen Glutaminsynthese für die Pathogenese der HE könnte mit Hilfe eines konditionalen, astrozytenspezifischen Glutaminsynthetase-Knockouts untersucht werden.

Weitere Untersuchungen sind erforderlich zur Abklärung der Auswirkung der zerebralen RNA-Oxidation auf die Proteinbiosynthese bei hepatischer Enzephalopathie, insbesondere im Hinblick auf die lokale Translation an Synapsen und deren Effekte auf die Neurotransmission.

7 Literaturverzeichnis

- Abramov AY**, Canevari L, Duchen MR. *Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase.* J Neurosci 2004; 24:565-575.
- Acarin L**, Peluffo H, Barbeito L, Castellano B, Gonzalez B. *Astroglial nitration after postnatal excitotoxic damage: correlation with nitric oxide sources, cytoskeletal, apoptotic and antioxidant proteins.* J Neurotrauma 2005; 22:189-200.
- Alberts B.** *Essential cell biology.* Verlag: New York, NY: Garland Science Pub., 2004.
- Albrecht J**, Jones EA. *Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome.* J Neurol Sci. 1999; 170:138-46.
- Albrecht J**, Norenberg MD. *Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity.* Hepatology 2006; 44:788-794.
- Ali TK**, Matragoon S, Pillai BA, Liou GI, El-Remessy AB. *Peroxynitrite mediates retinal neurodegeneration by inhibiting nerve growth factor survival signaling in experimental and human diabetes.* Diabetes. 2008; 57:889-98.
- Ames BN**, Gold LS. *Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer.* Mutat Res. 1991; 250:3–16.
- Barbosa de Oliveira LC**, Rocha Oliveira CJ, Fries DM, Stern A, Monteiro HP. *Effects of lipopolysaccharide on low- and high-density cultured rabbit vascular smooth muscle cells: differential modulation of nitric oxide release, ERK1/ERK2 MAP kinase activity, protein tyrosine phosphatase activity, and DNA synthesis.* Braz J Med Biol Res. 2002; 35:181-90.
- Basile AS**, Gammal SH, Jones EA, Skolnick P. *GABAA receptor complex in an experimental model of hepatic encephalopathy: evidence for elevated levels of an endogenous benzodiazepine receptor ligand.* J Neurochem. 1989; 53:1057-63.
- Beckman J.S.** and Koppenol W.H. *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.* Am. J. Physiol. 1996; 271:C1424–C1437.
- Beckman JS**, Carson M, Smith CD, Koppenol WH. *ALS, SOD and peroxynitrite.* Nature. 1993; 364:584.
- Bender AS, Norenberg MD.** *Calcium dependence of hypoosmotically induced potassium release in cultured astrocytes.* J Neurosci. 1994; 14:4237-43.
- Bender AS**, Norenberg MD. *Effect of benzodiazepines and neurosteroids on ammonia-induced swelling in cultured astrocytes.* J Neurosci Res. 1998; 54:673-80.
- Bender AS**, Rivera IV, Norenberg MD. *Tumor necrosis factor alpha induces astrocyte swelling.* Trans Am Soc Neurochem 1992; 23:113.
- Bidmon HJ**, Starbatty J, Görg B, Zilles K, Behrends S. *Cerebral expression of the alpha2-subunit of soluble guanylyl cyclase is linked to cerebral maturation and sensory pathway refinement during postnatal development.* Neurochem Int 2004; 45:821-832.
- Blei AT**, Larsen FS. *Pathophysiology of cerebral edema in fulminant hepatic failure.* J Hepatol 1999; 31:771-776.
- Boiteux S**, Radicella JP. *The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis.* Arch Biochem Biophys. 2000; 377:1-8.
- Booher J, Sensenbrenner M.** *Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures.* Neurobiology. 1972; 2:97-105.
- Brück J**, Görg B, Bidmon HJ, Zemtsova I, Qvarskhava N, Keitel V, Kircheis G, Häussinger D. *Locomotor impairment and cerebrocortical oxidative stress in portal vein*

ligated rats in vivo. J Hepatol. 2011; 54:251-257

Brüne B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? Cell Death Differ. 2003; 8:864-9.

Buchczyk D.P, Grune T., Sies H and Klotz L.O. Modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by increasing concentrations of peroxynitrite: early recognition by the 20S proteasome. Biol. Chem. 2003; 384:237–241.

Butterfield DA, Poon HF, St Clair D, Keller JN, Pierce WM, Klein JB, Markesbery WR. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. Neurobiol Dis. 2006; 22:223-32.

Cajigas IJ, Will T, Schuman EM. Protein homeostasis and synaptic plasticity. EMBO J. 2010; 29:2746-52.

Carney JM, Smith CD, Carney AM, Butterfield DA. Aging- and oxygen-induced modifications in brain biochemistry and behavior. Ann N Y Acad Sci. 1994; 38:44-53.

Cassina P, Peluffo H, Pehar M, Martinez-Palma L, Ressler A, Beckman JS, Estévez AG, Barbeito L. Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. J Neurosci Res 2002; 67:21-29.

Castegna A, Aksenov M, Aksenova M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, Markesbery WR, Butterfield DA. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. Free Radic Biol Med. 2002; 33:562-71.

Chamuleau R.A. Animal models of hepatic encephalopathy. Semin. Liver Dis. 1996; 16:265–270.

Chan H, Hazell AS, Desjardins P, Butterworth RF. Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. Neurochem Int 2000; 37:243-248.

Chepkova AN, Sergeeva OA, Haas HL. Taurine rescues hippocampal long-term potentiation from ammonia-induced impairment. Neurobiol Dis 2006; 23:512-521.

Choi YB, Tanneti L, Le DA, Ortiz J, Bai G, Chen HS, Lipton SA. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. Nat Neurosci. 2000; 3:15-21.

Chojkier M, Groszmann RJ. Measurement of portal-systemic shunting in the rat by using gamma-labeled microspheres. Am J Physiol 1981; 240:371–375.

Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? Clin Chim Acta 2006; 365:30–49.

Córdoba J, Salat D. The pathogenesis of hepatic encephalopathy. Gastroenterol Hepatol. 1999; 22:247-57.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin Chim Acta. 2003; 329:23-38.

De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. J Clin Invest. 1995; 96:60-8.

Desjardins P, Rao K.V, Michalak A., Rose C. and Butterworth R.F. Effect of portacaval anastomosis on glutamine synthetase protein and gene expression in brain, liver and skeletal muscle. Metab Brain Dis. 1999; 14:273–280.

Desnues B, Cuny C, Grégori G, Dukan S, Aguilaniu H, Nyström T. Differential oxidative damage and expression of stress defence regulons in culturable and non-culturable

Escherichia coli cells. EMBO Rep. 2003; 4:400-4.

Ding Q, Markesbery WR, Chen Q, Li F, Keller JN. *Ribosome dysfunction is an early event in Alzheimer's disease*. J Neurosci 2005; 25:9171-9175.

Duda JE, Giasson BI, Chen Q, Gur TL, Hurtig HI, Stern MB, Gollomp SM, Ischiropoulos H, Lee VM, Trojanowski JQ. *Widespread nitration of pathological inclusions in neurodegenerative synucleinopathies*. Am J Pathol. 2000; 157:1439-45.

Evans MD, Cooke MS. *Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids*. Bioessays. 2004; 26:533-42.

Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei A. *"Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998"*. Hepatology 2002; 35:716-21.

Fernandes SP, Dringen R, Lawen A, Robinson SR. *Inactivation of astrocytic glutamine synthetase by hydrogen peroxide requires iron*. Neurosci Lett. 2011; 490:27-30.

Fischer JE, Baldessarini RJ. *False neurotransmitters and hepatic failure*. Lancet. 1971; 2:75-80.

Gole MD, Souza JM, Choi I, Hertkorn C, Malcolm S, Foust RF 3rd, Finkel B, Lanken PN, Ischiropoulos H. *Plasma proteins modified by tyrosine nitration in acute respiratory distress syndrome*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000; 278:L961-7.

Görg B, Bidmon HJ, Keitel V, Foster N, Goerlich R, Schliess F, Häussinger D. *Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes*. Arch Biochem Biophys. 2006; 449:104-14.

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

Görg B, Qvartrkhava N, Bidmon HJ, Palomero-Gallagher N, Kircheis G, Zilles K, Häussinger D. *Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy*. Hepatology 2010; 52:256-256.

Görg B, Qvartrkhava N, Keitel V, Bidmon HJ, Selbach O, Schliess F, Häussinger D. *Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo*. Hepatology 2008; 48:567-579.

Görg B, Qvartrkhava N, Voss P, Grune T, Häussinger D, Schliess F. *Reversible inhibition of mammalian glutamine synthetase by tyrosine nitration*. FEBS Letters 2007; 581:84-90.

Görg B, Schliess F, Häussinger D. *Osmotic and oxidative/nitrosative stress in ammonia toxicity and hepatic encephalopathy*. Arch Biochem Biophys. 2013; 536:158-63.

Görg B, Wettstein M, Metzger S, Schliess F. and Häussinger D. *LPS-induced tyrosine nitration of hepatic glutamine synthetase*. Hepatology 2005; 42:499.

Gow A, Duran D, Thom SR, Ischiropoulos H. *Carbon dioxide enhancement of peroxynitrite-mediated protein tyrosine nitration*. Arch Biochem Biophys. 1996; 333:42-8.

Gow AJ, Farkouh CR, Munson DA, Posencheg MA, Ischiropoulos H. *Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004; 287:L262-8.

Greenacre SA, Ischiropoulos H. *Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction*. Free Radic Res. 2001; 34: 541-81.

- Grune T**, Blasig, I.E., Sitte, N., Roloff, B., Haseloff, R. and Davies, K.J. *Peroxy-nitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome*. J. Biol. Chem. 1998; 273:10857–10862.
- Grune T**, Klotz LO, Gieche J, Rudeck M, Sies H. *Protein oxidation and proteolysis by the nonradical oxidants singlet oxygen or peroxy-nitrite*. Free Radic Biol Med. 2001; 30: 1243-53.
- Grune T**, Merker K, Jung T, Sitte N, Davies KJ. *Protein oxidation and degradation during postmitotic senescence*. Free Radic Biol Med. 2005; 39:1208-15.
- Grune T**, Reinheckel T, Davies KJ. *Degradation of oxidized proteins in mammalian cells*. FASEB J. 1997; 11:526-34.
- Häberle J**, Görg B., Toutain A, Rutsch F, Benoist J.F, Gelot A, Suc A.L, Koch H.G, Schliess F. and Häussinger D. *Inborn error of amino acid synthesis: Human glutamine synthetase deficiency*. J. Inherit. Metab. Dis. 2006; 29:352–358.
- Häussinger D and Blei A**. Hepatic Encephalopathy. The Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice, 3rd Edition. Capital 7.8: 2007, Wiley-Blackwell. Capitel 7.8; Page 108-140.
- Häussinger D and Gerok W**. *Hepatocyte heterogeneity in ammonia metabolism: impairment of glutamine synthesis in CCl4 induced liver cell necrosis with no effect on urea synthesis*. Chem Biol Interact. 1984; 48:191-4.
- Häussinger D**, *Hepatocyte heterogeneity in glutamine and ammonia metabolism and the role of an intercellular glutamine cycle during ureogenesis in perfused rat liver*. Eur J Biochem. 1983; 133:269-75.
- Häussinger D**, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, vom Dahl S. *Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema?* J Hepatol. 2000; 32:1035-8.
- Häussinger D**, Laubenberger J, vom Dahl S, Ernst T, Bayer S, Langer M, Gerok W, Hennig J. *Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy*. Gastroenterology. 1994; 107:1475-80.
- Häussinger D**, Schliess F, Kircheis G. *Pathogenesis of hepatic encephalopathy*. J Gastroenterol Hepatol. 2002; 3:256-9.
- Häussinger D**, Schliess F. *Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy*. Gut. 2008; 57:1156-65.
- Häussinger D**, Sies H, Gerok W. *Functional hepatocyte heterogeneity in ammonia metabolism. The intercellular glutamine cycle*. J Hepatol. 1985; 1:3-14.
- Häussinger D**. *Low grade cerebral edema and the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis*. Hepatology 2006; 43:1187-1190.
- Hazell AS**, Butterworth RF. *Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanisms*. Proc Soc Exp Biol Med 1999; 222:99-112.
- Hensley K**, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, Floyd RA, Butterfield DA. *A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91:3270-4.
- Hermenegildo C**, Monfort P, Felipo V. *Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: characterization by in vivo brain microdialysis*. Hepatology 2000; 31:709-715.
- Herold G** und Mitarbeiter *Innere Medizin 2010* (2010. Auflage).
- Horiguchi T**, Uryu K, Giasson BI, Ischiropoulos H, LightFoot R, Bellmann C, Richter-

- Landsberg C, Lee VM, Trojanowski JQ. *Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies*. Am J Pathol. 2003; 163:1021-31.
- Ignarro LJ**. *Signal transduction mechanisms involving nitric oxide*. Biochem Pharmacol. 1991; 41:485-90.
- Ischiropoulos H**. *Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species*. Arch Biochem Biophys. 1998; 356:1-11.
- Ischiropoulos H**. *Protein tyrosine nitration-an update*. Arch Biochem Biophys. 2009; 484:117-21.
- Jayakumar AR**, Panickar KS, Murthy ChR, Norenberg MD. *Oxidative stress and mitogen-activated protein kinase phosphorylation mediate ammonia-induced cell swelling and glutamate uptake inhibition in cultured astrocytes*. J Neurosci. 2006; 26: 4774-84.
- Ji Y**, Neverova I, Van Eyk JE, Bennett BM. *Nitration of tyrosine 92 mediates the activation of rat microsomal glutathione s-transferase by peroxynitrite*. J Biol Chem. 2006; 281:1986-91.
- Kamisaki Y**, Wada K, Bian K, Balabanli B, Davis K, Martin E, Behbod F, Lee Y.C. and Murad F. *An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. 1998; 95:11584–11589.
- Kasai H**, Crain PF, Kuchino Y, Nishimura S, Ootsuyama A, Tanooka H. *Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair*. Carcinogenesis 1986; 7:1849–1851.
- Kato M**, Hughes RD, Keays RT, Williams R. *Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure*. Hepatology 1992; 15:1060-6.
- Kircheis G**, Wettstein M, Timmermann L, Schnitzler A, Häussinger D *Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopathy*. Hepatology. 2002; 35: 357-66.
- Kosenko E**, Kaminski Y, Lopata O, Muravyov N, Felipo V. *Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication*. Free Radic Biol Med 1999; 26:1369-1374.
- Kosenko E**, Llansola M, Montoliu C, Monfort P, Rodrigo R, Hernandez-Viadel M, Erceg S., Sanchez-Perez A.M. and Felipo V. *Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide*. Neurochem 2003; 43: 493–499.
- Kosenko E**, Montoliu C, Giordano G, Kaminsky Y, Venediktova N, Buryanov Y, Felipo V. *Acute ammonia intoxication induces an NMDA receptor-mediated increase in poly(ADP-ribose) polymerase level and NAD metabolism in nuclei of rat brain cells*. J Neurochem 2004; 89:1101-1110.
- Kosenko E**, Venediktova N, Kaminsky Y, Montoliu C, Felipo V. *Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication in vivo*. Brain Res 2003; 981:193-200.
- Kruczek C**, Görg B, Keitel V, Pirev E, Kröncke KD, Schliess F, Häussinger D. *Hypoosmotic swelling affects zinc homeostasis in cultured rat astrocytes*. Glia. 2009; 57:79-92.
- Levine RL**. *Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease*. Free Radic Biol Med. 2002; 32:790-6.
- Levine RL**. *Oxidative modification of glutamine synthetase. II. Characterization of the ascorbate model system*. J Biol Chem. 1983; 258:11828-33.

- Lipton SA**, Choi YB, Takahashi H, Zhang D, Li W, Godzik A, Bankston LA. *Cysteine regulation of protein function as exemplified by NMDA-receptor modulation*. Trends Neurosci. 2002; 25:474-80.
- Lipton SA**, Rayudu PV, Choi YB, Sucher NJ, Chen HS. *Redox modulation of the NMDA receptor by NO-related species*. Prog Brain Res. 1998; 118:73-82.
- Mannick JB**. *Regulation of apoptosis by protein S-nitrosylation*. Amino Acids. 2007; 32:523-6.
- Martinez-Hernandez A**, Bell KP, Norenberg MD. *Glutamine synthetase: glial localization in brain*. Science. 1977; 195:1356-8.
- Master S**, Gottstein J, Blei AT. *Cerebral blood flow and the development of ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis*. Hepatology 1999; 30:876-880.
- Matthiessen HP**, Schmalenbach C, Müller HW. *Astroglia-released neurite growth-inducing activity for embryonic hippocampal neurons is associated with laminin bound in a sulfated complex and free fibronectin*. Glia. 1989; 2:177-88.
- McBean GJ**, Doorty, K.B., Tipton, K.F. and Kollegger, H. *Alteration in the glial cell metabolism of glutamate by kainate and N-methyl-D-aspartate*. Toxicol 1995; 33:569–576.
- Miese F**, Kircheis G, Wittsack HJ, Wenserski F, Hemker J, Mödder U, Häussinger D, Cohnen M. *¹H-MR spectroscopy, magnetization transfer, and diffusion-weighted imaging in alcoholic and nonalcoholic patients with cirrhosis with hepatic encephalopathy*. JNR Am J Neuroradiol. 2006; 27:1019-26.
- Minana MD**, Kosenko E, Marcaida G, Hermenegildo C, Montoliu C, Grisolia S. and Felipo, V. *Modulation of glutamine synthesis in cultured astrocytes by nitric oxide*. Cell. Mol. Neurobiol. 1997; 17:433–445.
- Monteiro H.P.** *Signal transduction by protein tyrosine nitration: competition or cooperation with tyrosine phosphorylation- dependent signaling events*. Free Radic. Biol. Med. 2002; 33:765–773.
- Mullen KD**, Szauter KM, Kaminsky-Russ K. *"Endogenous" benzodiazepine activity in body fluids of patients with hepatic encephalopathy*. Lancet. 1990; 336:81-3.
- Murthy CR**, Rama-Rao KV, Bai G, Norenberg MD. *Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes*. J Neurosci Res 2001; 66:282-288.
- Norenberg MD**, Baker L, Norenberg LO, Blicharska J, Bruce-Gregorios JH, Neary JT. *Ammonia-induced astrocyte swelling in primary culture*. Neurochem Res. 1991; 16: 833-6.
- Norenberg MD**, Huo Z, Neary JT, Roig-Cantesano A. *The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission*. Glia. 1997; 21:124-33.
- Norenberg MD**, Itzhak Y, Bender AS. *The peripheral benzodiazepine receptor and neurosteroids in hepatic encephalopathy*. Adv Exp Med Biol. 1997; 420:95-111.
- Norenberg MD**, Jayakumar AR, Rama Rao KV. *Oxidative stress in the pathogenesis of hepatic encephalopathy*. Metab Brain Dis. 2004; 19:313-29.
- Nunomura A**, Honda K, Takeda A, Hirai K, Zhu X, Smith MA, Perry G. *Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases*. J Biomed Biotechnol 2006; 1-6.
- Nunomura A**, Moreira PI, Castellani RJ, Lee HG, Zhu X, Smith MA, Perry G. *Oxidative damage to RNA in aging and neurodegenerative disorders*. Neurotox Res. 2012; 22: 231-48.

- Nunomura A**, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S, Smith MA. *RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease*. J Neurosci. 1999; 19:1959-64.
- Odeh M**. *Pathogenesis of hepatic encephalopathy: the tumour necrosis factor-alpha theory*. Eur J Clin Invest 2007; 37:291-304.
- Oka M**, Wada M, Wu Q, Yamamoto A, Fujita T. *Functional expression of metabotropic GABAB receptors in primary cultures of astrocytes from rat cerebral cortex*. Biochem Biophys Res Commun 2006; 341:874-881.
- Oliver CN**, Starke-Reed, P.E., Stadtman, E.R., Liu, G.J., Carney, J.M. and Floyd, R.A. *Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain*. Proc. Natl. Acad. Sci. 1990; 87:5144-5147.
- Qvartrskhava N**, Lang PA, Görg B, Pozdeev VI, Ortiz MP, Lang KS, Bidmon HJ, Lang E, Leibrock CB, Herebian D, Bode JG, Lang F, Häussinger D. *Hyperammonemia in gene-targeted mice lacking functional hepatic glutamine synthetase*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112:5521-6.
- Rama Rao KV**, Jayakumar AR, Norenberg MD. *Role of oxidative stress in the ammonia-induced mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes*. Neurochem Int. 2005; 47:31-8.
- Rao KV**, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD. *Astrocytes protect neurons from ammonia toxicity*. Neurochem Res 2005; 30:1311-1318.
- Reinehr R**, Görg B, Becker S, Qvartrskhava N, Bidmon HJ, Selbach O, Haas HL, Schliess F, Häussinger D. *Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices*. Glia 2007; 55:758-771.
- Reinehr R**, Görg B, Höngen A, Häussinger D. *CD95-tyrosine nitration inhibits hyperosmotic and CD95 ligand-induced CD95 activation in rat hepatocytes*. J Biol Chem 2004; 279:10364-10373.
- Rose C**. and Felipo, V. *Limited capacity for ammonia removal by brain in chronic liver failure: potential role of nitric oxide*. Metab. Brain. Dis. 2005. 20:275-283.
- Saffari Y**, Sadrzadeh SM. *Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro*. Life Sci 2004; 74:1513-1518.
- Saitoh F**, Araki T. *Proteasomal degradation of glutamine synthetase regulates schwann cell differentiation*. J Neurosci. 2010; 30:1204-12.
- Sattler U**, Calsou P, Boiteux S, Salles B. *Detection of oxidative base DNA damage by a new biochemical assay*. Arch Biochem Biophys. 2000; 376:26-33.
- Savvides SN**, Scheiwein M, Bohme CC, Arteel GE, Karplus PA, Becker K, Schirmer RH. *Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite*. J Biol Chem. 2002; 277:2779-84.
- Schafer DF**, Jones EA. *Hepatic encephalopathy and the gamma-aminobutyric-acid neurotransmitter system*. Lancet. 1982; 1:18-20.
- Schliess F**, Foster N, Görg B, Reinehr R, Häussinger D. *Astrocyte swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes*. Glia 2004; 47:21-29.
- Schliess F**, Foster N, Görg B, Reinehr R, Häussinger D. *Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes*. Glia. 2004; 47:21-9.
- Schliess F**, Görg B, Fischer R, Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K, Häussinger D. *Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes*. FASEB J 2002; 16:739-

741.

Schliess F, Görg B, Fischer R, Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K. and Häussinger D. *Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes*. FASEB J. 2002; 16:739–741.

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

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

Schroeder P, Klotz LO, Buchczyk DP, Sadik CD, Schewe T and Sies H. *Epicatechin prevents nitration but not oxidation reactions of peroxynitrite*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001; 285:782–787.

Schuman EM, Dynes JL, Steward O. *Synaptic regulation of translation of dendritic mRNAs*. J Neurosci 2006; 26:7143–7146.

Sennlaub F, Courtois Y, Goureau O. *Inducible nitric oxide synthase mediates retinal apoptosis in ischemic proliferative retinopathy*. J Neurosci. 2002; 22:3987–93.

Shah NJ, Neeb H, Zaitsev M, Steinhoff S, Kircheis G, Amunts K, Häussinger D, Zilles K. *Quantitative T1 mapping of hepatic encephalopathy using magnetic resonance imaging*. Hepatology. 2003; 38:1219–26.

Shan X, Chang Y, Lin CL. *Messenger RNA oxidation is an early event preceding cell death and causes reduced protein expression*. FASEB J 2007; 21:2753–2764.

Shan X, Tashiro H, Lin CL. *The identification and characterization of oxidized RNAs in Alzheimer's disease*. J Neurosci. 2003; 23:4913–21.

Shin WS, Kawaguchi H, Sasaki T, Wang YP, Yang WD, Inukai M, Toyo-Oka T. Ann N. *The role of nitric oxide in the cardiovascular system*. Y Acad Sci. 1996; 786:233–44.

Shinmura K, Yokota J. *The OGG1 gene encodes a repair enzyme for oxidatively damaged DNA and is involved in human carcinogenesis*. Antioxid Redox Signal. 2001; 3:597–609.

Silva L, Carvalho H. *Possible role of glutamine synthetase in the NO signaling response in root nodules by contributing to the antioxidant defenses*. Front Plant Sci. 2013; 4:372.

Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA and Markesbery WR. *Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88:10540–10543.

Souza JM and Radi R. *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite*. Arch. Biochem. Biophys. 1998; 360:187–194.

Stewart VC, Sharpe MA, Clark JB, Heales SJ. *Astrocyte-derived nitric oxide causes both reversible and irreversible damage to the neuronal mitochondrial respiratory chain*. J Neurochem 2000; 75:694–700.

Suárez I, Bodega G, Arilla E, Felipo V, Fernández B. *The expression of nNOS, iNOS and nitrotyrosine is increased in the rat cerebral cortex in experimental hepatic encephalopathy*. Neuropathol Appl Neurobiol. 2006; 32:594–604.

Tanaka M, Chock PB, Stadtman ER. *Oxidized messenger RNA induces translation errors*. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104:66–71.

Tanigami H, Rebel A, Martin LJ, Chen TY, Brusilow SW, Traystman RJ, Koehler RC.

- Effect of glutamine synthetase inhibition on astrocyte swelling and altered astroglial protein expression during hyperammonemia in rats.* Neuroscience 2005; 131:437-449.
- Vaquero J**, Chung C, Cahill ME, Blei AT. *Pathogenesis of hepatic encephalopathy in acute liver failure.* Semin Liver Dis 2003; 23:259-269.
- Webb JT**, Brown GW. *Some properties and occurrence of glutamine synthetase in fish.* Comp. Biochem Physiol B. 1976; 54:171-5.
- Wettstein M**, Häussinger D. *Hepatic encephalopathy, diagnosis and therapy.* Med Klin Munich 1996; 91:447-8.
- Wu F**, Wang P, Young LC, Lai R, Li L. *Proteome-wide identification of novel binding partners to the oncogenic fusion gene protein, NPM-ALK, using tandem affinity purification and mass spectrometry.* Am J Pathol. 2009; 174:361-70.
- Wu M**, Che W, Zhang Z. *Enhanced sensitivity to DNA damage induced by cooking oil fumes in human OGG1 deficient cells.* Environ Mol Mutagen. 2008; 49:265-75.
- Wu Y**, Li N, Zhang T, Wu H, Huang C, Chen D. *Mitochondrial DNA base excision repair and mitochondrial DNA mutation in human hepatic HuH-7 cells exposed to stavudine.* Mutat Res. 2009; 664:28-38.
- Yan LJ**, Sohal RS. *Prevention of flight activity prolongs the life span of the housefly, Musca domestica, and attenuates the age-associated oxidative damage to specific mitochondrial proteins.* Free Radic Biol Med. 2000; 29:1143-50.
- Zhang J**, Perry G, Smith MA, Robertson D, Olson SJ, Graham DG, Montine TJ. *Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons.* Am J Pathol. 1999; 154:1423-9.
- Zhou BG**, Norenberg MD. *Ammonia downregulates GLAST mRNA glutamate transporter in rat astrocyte cultures.* Neurosci Lett. 1999; 276:145-8.
- Zielinska M**, Law RO, Albrecht J. *Excitotoxic mechanism of cell swelling in rat cerebral cortical slices treated acutely with ammonia.* Neurochem Int 2003; 43:299-303.
- Zieve L**, Doizaki WM, Zieve J. *Synergism between mercaptans and ammonia or fatty acids in the production of coma: a possible role for mercaptans in the pathogenesis of hepatic coma.* J Lab Clin Med. 1974; 83:16-28.

DANKSAGUNG

Professor Dr. Dieter Häussinger danke ich für die Vergabe des hochinteressanten Promotionsthemas und für die einmalige Möglichkeit, die Arbeit im Labor der experimentellen Hepatologie in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie durchführen zu dürfen. Seine stete Unterstützung, Motivation, sowie die intensive Betreuung bei der Planung von Experimenten, als auch rege Diskussionen der Ergebnisse, waren unentbehrlich.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Boris Görg für die hervorragende Zusammenarbeit und intensive Betreuung über die gesamte Promotionszeit. In jeder Phase dieser Arbeit gewährte er mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung, sowie bei der schriftlichen Verfassung der vorliegenden Arbeit, außerordentlich wertvolle Unterstützung.

Herrn Torsten Janssen danke ich für die Freundschaft, stete Hilfsbereitschaft und exzellente technische Unterstützung, sowie dem kompletten Team der experimentellen Hepatologie, für die harmonische und freundliche Stimmung, durch die die Arbeit und die langen Tage an der Uni, etwas leichter und angenehmer wurden.

Herrn Dr. Hans-J. Bidmon aus dem C&O Vogt-Institut für Hirnforschung der Universität Düsseldorf danke ich für die Unterstützung in der Durchführung von Tierexperimenten, sowie für seine freundliche und uneingeschränkte Bereitschaft mir sein großes Hirnanatomiewissen weiterzugeben.

Dem Organspenderprogramm des Instituts für Anatomie der Heinrich-Heine-Universität sowie dem australischen Hirnspenderprogramm „NSW Tissue Resource Centre“ (unterstützt durch die Universität von Sydney, National Health and Medical Research Council of Australia, Schizophrenia Research Institute, National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism, NSW Department of Health) möchte ich für die Zurverfügungstellung der Hirnautopsieproben danken.

Bei der Jürgen-Manchot-Stiftung bedanke ich mich für die Vergabe des Stipendiums zur Unterstützung dieser Arbeit.

Frau Dr. S. Metzger aus dem Biologisch-Medizinischem Forschungszentrum der Universität Düsseldorf danke ich für die Durchführung der Massenspektrometrie.

Meiner besten Freundin Juliane Karthe danke ich aus ganzem Herzen für alles.

Bei Frau Prof. Verena Keitel bedanke mich ganz herzlich für Ihre liebe Unterstützung und ihre unermüdlichen Aufmunterungen.

Herrn Dr. B.O. Jensen danke ich für die unermüdliche Motivation und Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen meinen lieben Freunden danke ich für die Ruhe und Geduld, womit sie mir stets zur Seite standen und mich immer wieder motiviert haben.

Meiner Familie und meinem Lebensgefährten danke ich für die bedingungslose Liebe, Vertrauen und Unterstützung.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

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

Datum

Vor- und Nachname des Verfassers

Unterschrift