



miRNA Expression bei hepatischer Enzephalopathie

Inaugural Dissertation

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

vorgelegt von

Jessica Oenarto

aus Kupang

Düsseldorf, September 2015

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

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

Referent: Prof. Dr. Dieter Häussinger

Korreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 10. November 2015

Auszüge aus dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

als Posterbeitrag

Oenarto J, Görg B, Castoldi M, Häussinger D. miRNA Expressionsanalyse bei hepatischer Enzephalopathie. September 2014, ISHEN London/Grossbritannien und Januar 2015, GASL München/Deutschland

Auszüge aus dieser Arbeit sind zur Publikation eingereicht:

als Originalarbeiten

Oenarto J, Görg B, Moos M, Bidmon HJ, Häussinger D. 2014. Expression of organic osmolyte transporters in cultured rat astrocytes and rat and human cerebral cortex. Archives of Biochemistry and Biophysics. 560: 59-72.

Oenarto J, Karababa A, Görg B, Castoldi M, Bidmon HJ, Häussinger D. 2015. Ammonia-induced miRNA expression changes in cultured rat astrocytes. Akzeptiert bei Scientific Reports.

Ode an die Leber:

Dort tief im Innern

Filtrierst und verteilst Du

Teilst und trennst Du

Vermehrst und schmierst Du

Du schöpfst und erntest den Stoff des Lebens.

Von dir erhoffe ich Gerechtigkeit:

Ich liebe das Leben: Verrate mich nicht!

Schaffe weiter,

Lass mein Lied nicht sterben.

Pablo Neruda

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.	Hepatische Enzephalopathie	1
1.1.	Auslösende Faktoren	2
1.1.1.	Bedeutung von Ammoniak für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie	3
1.2.	Diagnostik und Therapie der hepatischen Enzephalopathie	4
1.2.1.	Diagnostik	4
1.2.2.	Therapie	6
2.	Molekulare Grundlagen	7
2.1.	Rolle der Astrozytenschwellung bei hepatischer Enzephalopathie	7
2.2.	Oxidativer Stress bei der hepatischen Enzephalopathie	10
2.2.1.	Rolle der Hämoxxygenase-1 bei neurologischen Erkrankungen	13
2.2.2.	Astrozytenseszenz bei hepatischer Enzephalopathie	16
3.	miRNAs	18
3.1.	Biogenese von miRNAs	18
3.2.	Mechanismen der Genregulation durch miRNAs	20
3.3.	Charakterisierung und Funktion von miRNAs im Zentralnervensystem	22
3.4.	Pathogenetische Bedeutung von miRNAs bei neurologischen Erkrankungen	23
4.	Zielsetzung der Arbeit	24
II.	Material und Methoden	25
1.	Materialien	25
1.1.	Geräte	25
1.2.	Verbrauchsmaterialien	26
1.3.	Vorgefertigte Reagenzsysteme (Kits)	26
1.4.	Chemikalien/Substanzen	27
1.5.	Puffer und Lösungen	28

2. Methoden	28
2.1. Zellpräparation und Kultivierung	28
2.1.1. Kultivierte Rattenastrozyten	28
2.1.2. Humane Zelllinien	29
2.1.3. Kultivierung der Rattenastrozyten und humanen Zelllinien SH-SY5Y und MOG-G-CCM	30
2.2. <i>Post mortem</i> Hirngewebe	30
2.3. Experimentelle Behandlung kultivierter Rattenastrozyten	34
2.4. Transfektion von Astrozyten, SH-SY5Y- und MOG-G-CCM-Zellen mit miRNA Inhibitoren und miRNA-Mimetika	35
2.5. Proliferationsmessung	35
2.6. Detektion von Proteinen im Western-Blot	36
2.6.1. Proteinisolation	36
2.6.2. Western-Blot	37
2.6.2.1. Antikörper für den Nachweis individueller Proteine	37
2.6.2.2. Proteinbestimmung nach Bradford	37
2.6.2.3. Proteinisolation	38
2.6.2.4. Herstellung von Elektrophoresegele	38
2.6.2.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.6.2.6. Proteintransfer aus dem Gel auf eine Membran	39
2.6.2.7. Immundetektion	40
2.6.2.8. Densitometrische Quantifizierung	40
2.7. Quantifizierung von mRNA-Expressionspegel mittels Realtime-PCR	40
2.7.1. Präparation von RNA	40
2.7.2. Oligonukleotide	41
2.7.3. RNA-Qualitätsanalyse	42
2.7.3.1. Bestimmung der Konzentration und Reinheit von RNA Präparationen	43
2.7.3.2. Bestimmung der RNA-Integrität	43
2.7.4. cDNA Synthese	43
2.7.5. Quantitative Realtime-PCR	44
2.8. miRNA Analyse	45
2.8.1. miRNA-Isolation	46
2.8.2. cDNA Synthese	46
2.8.3. Design miRNA-spezifischer Primer	47
2.8.4. miQPCR	48

2.9.	miRNA-Datenbanken	49
2.10.	Microarray-Analyse	50
2.10.1.	Transkriptomanalyse	50
2.10.1.1.	Agilent™ Whole Human Genome Oligo Microarray	50
2.10.1.2.	Affymetrix Gene Chip Rat Genome Array	50
2.10.2.	Array-basierte miRNA-Expressionsanalyse	51
2.11.	Statistik	52
3.	Ergebnisse	53
1.	Analyse durch Ammoniak induzierter miRNA Expressionsänderungen in kultivierten Rattenastrozyten	53
1.1.	Identifizierung von miRNA und Genexpressionsänderungen in kultivierten Rattenastrozyten	53
1.2.	Validierung im Array identifizierter Genexpressionsänderungen in mit Ammoniak behandelten kultivierten Rattenastrozyten	53
1.3.	Identifizierung potentieller Zielgene von durch Ammoniak herunterregulierter miRNA-Spezies in kultivierten Rattenastrozyten	55
1.4.	Validierung der im Array gefundenen miRNA Expressionsänderungen in mit Ammoniak behandelten kultivierten Rattenastrozyten mittels quantitativer Realtime-PCR	59
1.5.	Bedeutung der Glutaminsynthese und der Bildung von oxidativ/nitrosativem Stress für durch Ammoniak induzierte miRNA Expressionsänderungen in kultivierten Ratten-Astrozyten	60
1.6.	Validierung der Hämoxygenase-1 als potentielles Zielgen von durch Ammoniak herunterregulierter miRNA-Spezies	63
1.7.	Wirkung der Inhibition HO-1 regulierender miRNA-Spezies auf die Proliferation kultivierter Rattenastrozyten	68
1.8.	Rolle der HO-1 für die durch Ammoniak induzierte Seneszenz und Wachstumshemmung in kultivierten Rattenastrozyten	69
1.9.	Einfluss einer durch hypoosmotisches Medium induzierten Astrozytenschwellung auf die Expression von durch Ammoniak regulierter miRNA-Spezies	71
1.10.	Einfluss einer durch hypoosmotisches Medium induzierten Astrozytenschwellung auf die HO-1 mRNA-Spiegel und Astrozytenproliferation	72

2.	Analyse der miRNA Expression in humanen <i>post mortem</i> Hirngewebe	73
2.1.	Identifizierung von miRNA- und Genexpressionsänderungen in <i>post mortem</i> Hirngewebe von Patienten mit Leberzirrhose mit hepatischer Enzephalopathie	73
2.2.	Überprüfung im Array identifizierter miRNA-Expressionsänderungen in <i>post mortem</i> Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE mittels quantitativer Realtime-PCR	75
2.3.	Identifizierung potentieller Zielgene der in <i>post mortem</i> Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE hochregulierter miRNA-Spezies	77
2.4.	Validierung potentieller Zielgene der in <i>post mortem</i> Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE hochregulierter miRNA-Spezies	78
4.	Diskussion	91
1.	Ammoniak-induzierte miRNA und Genexpressionsänderungen in Astrozyten <i>in vitro</i>	91
2.	Zerebrale miRNA Expressionsänderungen bei hepatischer Enzephalopathie	97
3.	Ausblick	103
5.	Zusammenfassung	105
6.	Abstract	106
7.	Literaturverzeichnis	107
8.	Abkürzungsverzeichnis	132
9.	Abbildungsverzeichnis	136
10.	Tabellenverzeichnis	138
11.	Danksagung	140

I. Einleitung

1. Hepatische Enzephalopathie

Die Hepatische Enzephalopathie (HE) ist ein komplexes, neuropsychiatrisches Syndrom, das in Folge einer akuten oder chronischen Leberinsuffizienz auftritt und durch kognitive und motorische Beeinträchtigungen unterschiedlicher Schweregrade gekennzeichnet ist (Häussinger & Blei, 2007). In Deutschland leiden mindestens drei Millionen Menschen an Lebererkrankungen, davon circa 0,7 bis 1% unter einer gesicherten Leberzirrhose (Siegmond-Schultze, 2012). Circa 40% der Zirrhotiker sind von einer hepatischen Enzephalopathie betroffen. Somit ist hepatische Enzephalopathie die häufigste Komplikation bei fortgeschrittener Leberzirrhose und von hoher sozialmedizinischer Bedeutung. Die Pathogenese der HE ist komplex und bis heute noch nicht vollständig geklärt. Es besteht aber Einvernehmen darüber, dass Ammoniak ein Schlüsseltoxin für die hepatische Enzephalopathie darstellt (Butterworth *et al.*, 1987). Primär ist die HE durch eine Störung der Astrozytenfunktion im Gehirn bedingt, welche erst sekundär neuronale Funktionen beeinflusst (Norenberg, 1987; Häussinger *et al.*, 2000). Die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie ist mit einer im Zuge der zerebralen Ammoniakentgiftung im Gehirn einhergehenden Glutaminakkumulation in Astrozyten verbunden, welche die Ausbildung eines chronischen, geringgradigen astroglialen Ödems bedingt (Häussinger *et al.*, 1994; Häussinger *et al.*, 2000). Die Hydratationsstörung der Astrozyten bedingt nachfolgend Veränderungen der astrozytären/neuronalen Kommunikation und der Neurotransmission (Norenberg, 1998; Häussinger *et al.*, 2000; Ahboucha *et al.*, 2004). Die Symptomatik der HE ist zwar prinzipiell in jedem Stadium reversibel (Häussinger & Blei, 2007), aber neuere Arbeiten zeigen, dass bei HE auftretende kognitive Störungen auch nach Auflösung akuter HE-Episoden fortbestehen können (Bajaj *et al.*, 2010; Riggio *et al.*, 2011). Eine Erklärung hierfür könnte die Astrozytenseszenz sein, welche zu lang anhaltenden Störungen von Neurotransmission und synaptischer Plastizität führen kann (Kawano *et al.*, 2012). Untersuchungen von Görg *et al.* (2015) zeigen, dass die Pathogenese der HE mit Seneszenz assoziiert ist.

Es ist seit Jahrzehnten bekannt, dass die Leber und das Gehirn sehr eng miteinander verbunden sind und sich wechselseitig beeinflussen. Einerseits versorgt die Leber das Gehirn mit bestimmten Nährstoffen z.B. Glucose, welche essentiell für den täglichen Energiebedarf des Gehirns ist. Andererseits werden die im Darm gebildeten neurotoxischen Substanzen, wie z.B. Ammoniak, welches die Gehirnfunktion beeinträchtigt, in der gesunden Leber über die Bildung von Harnstoff und Glutamin entgiftet. Obgleich das Gehirn durch die Blut-Hirn-Schranke geschützt ist, können einige Neurotoxine wie z.B. Ammoniak, dessen Konzentration im Falle einer akuten oder chronischen

Lebererkrankung im Blut ansteigen, die Blut-Hirn-Schranke passieren und ins Gehirn gelangen. Ammoniak ist neurotoxisch und beeinträchtigt die Gehirnfunktionen in vielfältiger Weise.

1.1. Auslösende Faktoren

Die hepatische Enzephalopathie kann beim akuten Leberversagen, wo die Leberfunktion innerhalb weniger Stunden bis wenigen Tagen zum Erliegen kommt, oder dauerhaft bzw. episodisch bei der chronischer Verlaufsform, wo die Leberfunktion über mehrere Monate bis hin zu vielen Jahren kontinuierlich abnimmt, auftreten. Während die Aufnahme von Lebertoxinen wie z.B. hohen Mengen von Paracetamol ursächlich für das Auftreten des akuten Leberversagens sein kann, kann eine chronische Leberschädigung mit Entwicklung einer Leberzirrhose durch Viren (Hepatitis) oder chronischen Alkoholabusus ausgelöst werden. Der Verlust an funktionstüchtigen Leberzellen vermindert die Entgiftung von Ammoniak, dem eine Schlüsselfunktion bei der Entstehung der HE zugeschrieben wird. Die HE kann außerdem durch eine Reihe HE-relevanter Faktoren hervorgerufen werden, wie *pro*-inflammatorische Zytokine, Hyponatriämie oder Benzodiazepinen. Der Anstieg dieser Faktoren wird durch eine Reihe von die Leberzirrhose begleitende Erkrankungen vermittelt (Häussinger & Blei, 2007):

- Gastrointestinale Blutung
- Eiweißexzess
- Trauma
- Infektionen/Sepsis
- Azotämie
- Metabolische Azidose
- Diuretika
- Sedativa und Tranquillanzien
- Sonstige Ursachen: operative Eingriffe, Obstipation, Elektrolytentgleisungen

Ammoniak ist ein endogenes, für die Pathogenese der HE bedeutsames Neurotoxin, das von der erkrankten Leber nur eingeschränkt eliminiert oder entgiftet wird. Obwohl zwischen Ammoniakgehalt im Blut und Schweregrad der HE keine enge Korrelation besteht, ist die Bedeutsamkeit von Ammoniak für die Pathogenese der HE unbestritten. Neuere Untersuchungen belegen außerdem, dass etwa 10% der HE-Patienten Ammoniakkonzentrationen im Normbereich im Serum aufweisen (Häussinger & Blei, 2007). Neben Ammoniak wird weiteren Neurotoxinen wie z.B. Merkaptanen, Phenolen sowie kurz- und mittelkettigen Fettsäuren eine Rolle für die Pathogenese der

HE zugeschrieben (Butterworth, 2003). Im Vergleich zu diesen Neurotoxinen ist Ammoniak das wichtigste und bestuntersuchte endogene Neurotoxin.

1.1.1 Bedeutung von Ammoniak für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie

Im Serum findet man unter physiologischen Bedingungen zu einem großen Anteil Ammoniumionen (NH_4^+) und in geringerem Maße gasförmiges Ammoniak (NH_3). Während Ammoniak über Diffusion die Plasmamembran passieren kann, gelangen Ammoniumionen über Ionenkanäle und andere Transportmechanismen in die Plasmamembran in die Zelle, wodurch Veränderungen des intra- und extrazellulären pH-Wertes hervorgerufen werden können. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit in der Größe und Ladung mit Kalium-Ionen (K^+) können Ammoniumionen über kaliumgängige Ionenkanäle transportiert werden und das Membranpotential der Zellen verändern (Bosoi & Rose, 2009). Wie in Abbildung 1 dargestellt ist, stören erhöhte Ammonium-/Ammoniakkonzentrationen viele metabolische Prozesse in der Zelle und den zerebralen Stoffwechsel. Daher muss eine kontinuierliche Entgiftung erfolgen (Felipo & Butterworth, 2002; Häussinger & Blei, 2007). Ammoniak wird überwiegend von der intestinalen Flora durch anaerobe Bakterien im Dickdarm produziert (Center & Magne, 1990) und in der Leber entgiftet. Die Entgiftung von Ammoniak erfolgt primär über den Harnstoffzyklus durch die Leberzellen im Bereich der Pfortader (periportal), dann sekundär über die Glutaminsynthese durch die perivenös angeordneten azinusnahen Scavenger-Zellen. Die Bildung von Glutamin ist zu etwa 5-10% an der Ammoniakentgiftung beteiligt und ist der Harnstoffsynthese nachgeschaltet (Häussinger & Stehle, 1988). Die Scavengerzellen sind von besonderer Wichtigkeit für die Erhaltung der Ammoniakhomöostase. Sie sorgen dafür, dass der Ammoniakspiegel im peripheren Blut konstant niedrig bei $30 \mu\text{M}$ gehalten wird (Häussinger, 1990). In der konditionalen leberspezifischen Glutaminsynthetase-defizienten Maus wurde ein erhöhter Ammoniakgehalt im Blut gefunden. Dies unterstreicht die wichtige Rolle der in den Scavenger-Zellen exprimierten Glutaminsynthetase für die systemische Ammoniakhomöostase (Qvartskhava *et al.*, 2015). Die systematische Erhöhung der Ammoniakkonzentration bei HE beruht einerseits auf eingeschränkter Entgiftungsleistung der Leberzellen und andererseits auf einem Shunting von Blut unter Umgehung der Leber als Folge einer Leberzirrhose. Es wurde außerdem diskutiert, ob eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke infolge einer Schädigung der Gefäßendothelzellen einen verstärkten Übertritt von Ammoniak in das Gehirn vermittelt und dadurch die Entgiftungskapazität des Gehirns überlastet wird. Die Entgiftung von Ammoniak im Gehirn erfolgt in Astrozyten unter Glutaminsynthetase-katalysierter Bildung von Glutamin aus Ammoniak und Glutamat und ist im Liquor bei Patienten mit hepatischer Enzephalopathie erhöht (Watanabe *et al.*, 1984; Häussinger *et al.*, 1994).

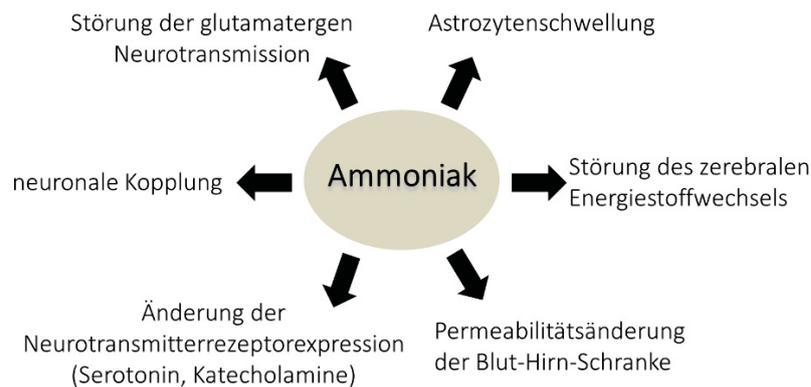


Abbildung 1: Wirkungen von Ammoniak auf das Gehirn. (Modifiziert nach Häussinger & Blei, 2007).

1.2. Diagnostik und Therapie der hepatischen Enzephalopathie

1.2.1. Diagnostik

Die hepatische Enzephalopathie wird anhand ihrer klinischen Symptome (Tab. 1) oder ihrer Ätiologie (Abb. 2) eingeteilt. Gemäß der West-Haven-Kriterien wird die HE in fünf Schweregrade eingeteilt. Dabei entspricht Grad 0 minimale bzw. latente HE und Grad 1-4 manifeste HE (Conn, 1994). Bei der minimalen bzw. latenten hepatischen Enzephalopathie (MHE) sind keine neurologischen Auffälligkeiten erkennbar, jedoch kognitive Defizite, die allerdings nur mit Hilfe psychometrischer oder neurophysiologischer Tests erfasst werden können (Ferenci *et al.*, 2002). Bei der MHE sind Aufmerksamkeit, visuell räumliche Wahrnehmung und Geschwindigkeit der Informationsverarbeitung im psychomotorischen Bereich, Feinmotorik und Kurzzeitgedächtnis beeinträchtigt (Weissenborn *et al.*, 2001). Für die voranschreitende Erkrankung ist eine frühzeitige Behandlung der Patienten von großer Bedeutung, da zahlreiche Studien gezeigt haben, dass trotz keiner offensichtlichen neurologischen Symptome die Lebensqualität (Les *et al.*, 2010), die Arbeitsfähigkeit (Schomerus & Hamster, 2001) und die Fahrtüchtigkeit (Kircheis *et al.*, 2009) von betroffenen Patienten deutlich beeinträchtigt sind. Mit zunehmendem HE-Grad (Tab. 1) kommt es vermehrt zu Beeinträchtigungen von Vigilanz und motorischen Fähigkeiten und letztlich zu schweren Störungen höherer Hirnfunktionen wie z.B. Gedächtnis und Kognition bis hin zum Koma (Stadium IV) (Häussinger & Blei, 2007). Da die Beurteilung des HE-Grades weltweit nicht komplett einheitlich und oft von der subjektiven Einschätzung des Arztes abhängig ist, wurde 2005 bei der 12. ISHEN-Konferenz vorgeschlagen, die Klassifizierung der HE in gering- und hochgradig zu vereinfachen (Häussinger *et al.*, 2006). Während eine geringgradige HE die Schweregrade MHE, HE I und HE II umfasst, beschreibt der Terminus „hochgradige HE“ Patienten, die nachweisbare Anzeichen von kognitiven

Beeinträchtigungen, deutlicher Verwirrtheit, Kooperationsverlust, Somnolenz oder Koma (HE III – HE IV) zeigen.

Tabelle 1 : Einteilung der hepatischen Enzephalopathie (HE) in verschiedene Schweregrade nach West-Haven Kriterien. (modifiziert nach Conn (1994) und Zhan & Stremmel (2012)).

	Bewusstseinslage	Neuropsychiatrische Symptome	Neurologische Symptome
Stadium 0 = MHE	normal	Störungen nur durch psychometrische Tests zu erfassen	keine
Stadium I	leichtgradige mentale Verlangsamung	Persönlichkeitsänderung, Euphorie, Reizbarkeit und Angst, Konzentrationsstörungen, Ruhelosigkeit, gestörter Schlaf-/Wachrhythmus	Gestörte Feinmotorik (beeinträchtigt Schreibvermögen, Fingertremor)
Stadium II	Verstärkte Müdigkeit, Apathie oder Lethargie	Vergesslichkeit, minimale Desorientiertheit bzgl. Ort und Zeit	Flapping-Tremor, Ataxie, verwaschene Sprache
Stadium III	Somnolenz	Aggressivität, ausgeprägte Desorientiertheit bzgl. Ort und Zeit	Rigor, Krämpfe, Asterixis
Stadium IV	Koma	-	Hirndruckzeichen

Psychometrische Testverfahren wie Zahlenverbindungstest und Liniennachfahrttest, sowie computerbasierte Tests werden zur Überprüfung kognitiver und psychomotorischer Hirnfunktionen im Hinblick auf optische Orientierung, Aufmerksamkeit, Konzentrations- und Reaktionsfähigkeit angewendet. Aufgrund der Untersucherabhängigkeit sind diese Testverfahren unzuverlässig im Hinblick auf die Beurteilung des Schweregrades der HE. Verschiedene neurophysiologische Tests z.B. Flimmerfrequenztest und Elektroenzephalogramm (EEG) wurden daher verwendet, um eine Objektivierbarkeit und Reproduzierbarkeit zu erreichen. Bei dem Flimmerfrequenztest werden die Patienten ein brillenähnliches Gerät aufgesetzt haben, das eine vorgegebene Frequenz eines roten Lichtreizes darstellt und diese schrittweise um 0,1 Hz verringert, bis der täuschende Eindruck eines dauerhaften Lichtes verloren geht und dann das Licht flimmernd wahrgenommen wird (Kircheis *et al.*, 2002). Mit höherem HE-Grad kann der Patient nur geringe Frequenzen im Vergleich zum Gesunden

wahrnehmen. Die Flimmerfrequenztechnik hat sich mittlerweile als zuverlässige, untersuchungabhängige, leicht anwendbare Messtechnik zur Beurteilung des Schweregrads der HE herausgestellt (Häussinger & Schliess, 2008). Weitere diagnostische Verfahren stellen die Computer- und Magnetresonanztomographie und die Magnetresonanztomographie und die Magnetresonanztomographie dar (Häussinger *et al.*, 1994; Trzepacz *et al.*, 1994; Naegele *et al.*, 2000; Kale *et al.*, 2006). Diese Untersuchungsmethoden sind jedoch äußerst kosten- und zeitintensiv und benötigen komplexe Apparaturen.

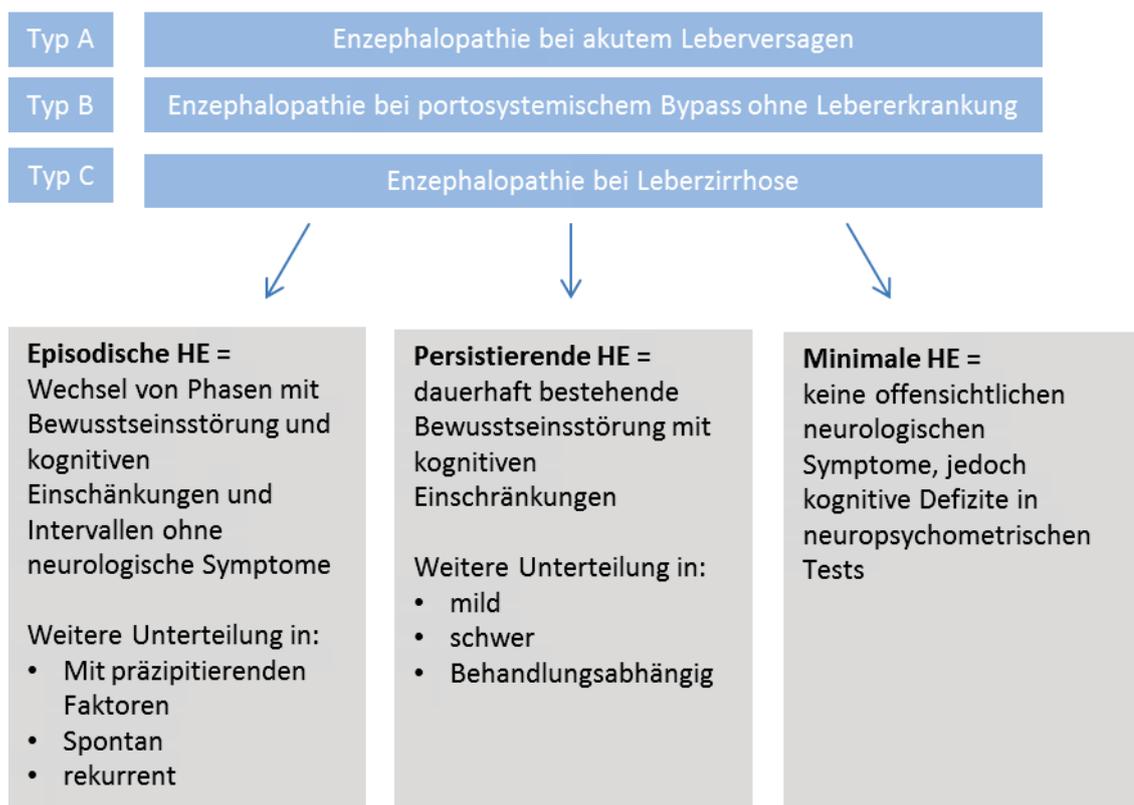


Abbildung 2: Einteilung der hepatischen Enzephalopathie (HE) nach dem CHILD-Score. Einteilung der HE nach ihrer Ätiologie (Child & Turcotte, 1964; Ferenci *et al.*, 2002, Zhan & Stremmel, 2012).

1.2.2. Therapie

Gegenwärtig besteht die Therapie der hepatischen Enzephalopathie im Vermeiden HE-auslösender Faktoren z.B. durch die Senkung des Ammoniakspiegels aber auch von inflammatorischen Zytokinen oder Benzodiazepinen. Therapeutisch bedeutsam sind hierbei pflanzliche Eiweiße, Laktuloseeinläufe, L-Ornithin-L-Aspartat, verzweigtkettige Aminosäuren sowie das Antibiotikum Rifaximin (Kircheis & Häussinger, 2002; Kircheis & Häussinger, 2012; Hadjihambi *et al.*, 2014). Inzwischen wurde durch randomisierte Studien nachgewiesen, dass Laktulose und Rifaximin rekurrende HE-Episoden verhindern können (Sharma *et al.*, 2009; Bass *et al.*, 2010). Laktulose, ein nichtresorbierbares Disaccharid reduziert die Synthese und Aufnahme von Ammoniak, indem sie das

Darmmilieu und die Zusammensetzung der Bakterienspezies im Kolon verändert. Bislang gilt die orale Gabe von Laktulose als Goldstandardtherapie für die HE (Blei und Córdoba 2001; Sharma & Sharma, 2013). Auch das oral-verabreichte und nicht-resorbierbare Antibiotikum Rifaximin kann die Ammoniakbildung im Darm reduzieren (Bajaj *et al.*, 2011; Sidhu *et al.*, 2011). Allerdings ist die Rifaximintherapie kostspielig und die optimale Therapiedauer ist bislang unbekannt (Sauerbruch *et al.*, 2013).

Eine Eiweißrestriktion als Therapieform bei HE ist heute umstritten, da sie den Proteinabbau und die Abnahme der Muskelmasse fördert und zur Katabolie führen kann. Zusätzlich erscheint die bislang als Nahrungsergänzungsmittel empfohlene Gabe von Probiotika in der Therapie der HE nicht empfehlenswert. Obwohl Studien nachgewiesen haben, dass Probiotika den Ammoniakspiegel senken können (McGee *et al.*, 2011; Pereg *et al.*, 2011), ist ihr Nutzen im Hinblick auf die Verbesserungen der HE-Symptome nicht belegt (McGee *et al.*, 2011). Weitere Therapiemöglichkeiten für HE, darunter die Gabe von Zink, Natriumbenzoat, Benzodiazepin- und Dopaminantagonisten sind nur unzureichend untersucht worden und teilweise sind die Befunde hierzu widersprüchlich (Sauerbruch *et al.*, 2013).

Trotz erfolgreicher Therapie können zerebrale Beeinträchtigungen und Störungen wie Demenz, Kleinhirndegeneration, Myelopathie mit spastischer Paraplegie oder peripherer Polyneuropathie zurückbleiben. Daher ist die Lebertransplantation bis heute das einzige therapeutische Konzept zur dauerhaften Verbesserung der Symptomatik. Neuere Arbeiten zeigen aber, dass bei HE auftretende kognitive Störungen trotz Lebertransplantation weiterhin fortbestehen können (Bajaj *et al.*, 2010; Riggio *et al.*, 2011).

2. Molekulare Grundlagen

2.1. Rolle der Astrozytenschwellung bei hepatischer Enzephalopathie

Im Zentralnervensystem (ZNS) wird keine Harnstoffsynthese betrieben (Norenberg & Martinez-Hernandez, 1979). Hier erfolgt die Ammoniakentgiftung hauptsächlich in Astrozyten, den einzigen Zellen im Gehirn, die zur Glutaminsynthese befähigt sind (Martinez-Hernandez *et al.*, 1977). Astrozyten interagieren auf vielfältige Art und Weise mit Neuronen und spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Wasser- und Ionenhomöostase sowie der Aufnahme und Prozessierung verschiedener Neurotransmitter (Hansson & Rönnbäck, 1995). Eine Astrozytenschwellung im Gehirn, wie sie bei vielen neurologischen Erkrankungen auftritt, ist eng vergesellschaftet mit Astrozytenfunktionsstörung und eine Beeinträchtigung astroglialer-neuronaler-Kommunikation, wodurch die synaptische Transmission gestört wird (Araque *et al.*, 1999; Ben Achour & Pascual, 2012; Covelo & Araque, 2015). Der Beeinträchtigung der astroglial-neuronalen Kommunikation wird eine

wichtige Rolle in der Pathogenese der HE zugeschrieben. Hier kommt es in der Folge zur Störung oszillatorischer Netzwerke im Gehirn und dadurch zu einer Beeinträchtigung kognitiver und feinmotorischer Funktionen (Timmermann *et al.*, 2002; Timmermann *et al.*, 2003).

Die 1994 von Häussinger *et al.* mit Hilfe von ^1H -MR-Protonenspektroskopie durchgeführten Untersuchungen belegten erstmalig, dass eine Astrozytenschwellung beim chronischen Leberversagen bereits in einem frühen HE-Stadium auftritt. In dieser Untersuchung wurde bei Probanden mit geringgradiger HE (Abb. 3C) eine Depletion des zerebralen *myo*-Inositolpools bei gleichzeitigem Anstieg der Glutaminkonzentration gefunden. Da Ammoniak über Glutaminbildung in Astrozyten entgiftet wird und *myo*-Inositol ein astrogliales Osmolyt ist, weisen diese Befunde auf eine Hydratationsstörung der Astrozyten im Gehirn hin. Diese Befunde waren maßgeblich für die von Häussinger aufgestellte Schwellungshypothese zur Pathogenese der HE (Abb. 4). In dieser Hypothese postulierte Häussinger, dass die HE die klinische Manifestation eines geringgradigen Gliedödems ist, welches durch Ammoniak und weitere HE-relevanter Faktoren wie Benzodiazepine, inflammatorische Zytokine und Hyponatriämie nach Erschöpfung der volumenregulatorischen Kapazität der Astrozyten entsteht (Häussinger *et al.*, 1994; Häussinger *et al.*, 2000). Bei der Aufrechterhaltung der Astrozytenvolumenhomöostase spielen organische Osmolyte eine wichtige Rolle. Bei einem geringgradigen Gliedödem werden organische Osmolyte wie Taurin und *myo*-Inositol vermehrt aus den Astrozyten freigesetzt, um der Schwellung entgegen zu wirken (Lang *et al.*, 1993). Dabei kann es zu einer Erschöpfung der volumenregulatorischen Kapazität der Astrozyten kommen. Ein osmolytdepletierter Astrozyt ist in der Folge nicht mehr in der Lage auf weitere HE-präzipitierende, Astrozytenschwellung-induzierende Faktoren mit einer kompensatorischen Osmolytfreisetzung zu reagieren. In der Folge kommt es bei der HE zu einer Exazerbation des geringgradigen Gliedödems (Häussinger *et al.*, 1994; Häussinger *et al.*, 2000; Häussinger & Sies, 2013) (Abb. 4).

Inzwischen wurden die Befunde von Häussinger *et al.* (1994) mehrfach, u.a. durch Bestimmung des Wassergehalts im Gehirn bei Zirrhosepatienten mit HE bestätigt (Shah *et al.*, 2003; Miese *et al.*, 2006; Mínguez *et al.*, 2006).

Die Schwellungshypothese gilt heute als anerkanntes Paradigma zur Pathogenese der HE (Schliess *et al.*, 2006). Sie ist bis heute das einzige Pathogenesemodell, welches die HE-auslösende Wirkung der heterogenen HE-relevanten Faktoren erklären kann.

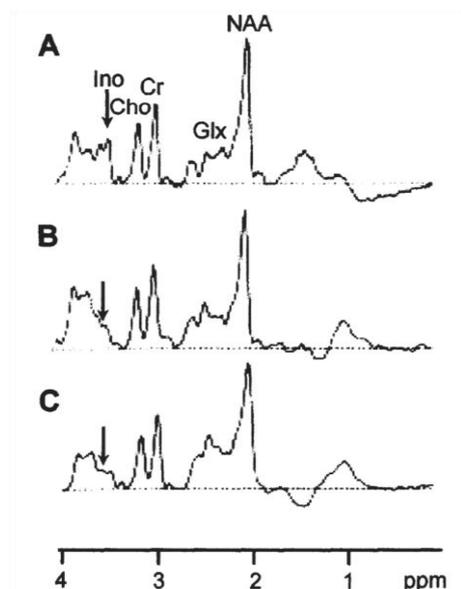


Abbildung 3: MR-spektroskopische Untersuchungen im Gehirn bei (A) gesunden Probanden, (B) Patienten mit Zirrhose und latenter (subklinischer) HE und (C) Patienten mit manifester HE in Stadium I und II. Glx = Glutamin/Glutamat; Ino = *myo*-Inositol (Ino). Cho = Cholin; Cr = Kreatin; NAA = N-Acetylaspartat; ppm = Teile von einer Million (10^{-6} , engl.: parts per million) (Häussinger *et al.*, 1994; Häussinger *et al.*, 2000).

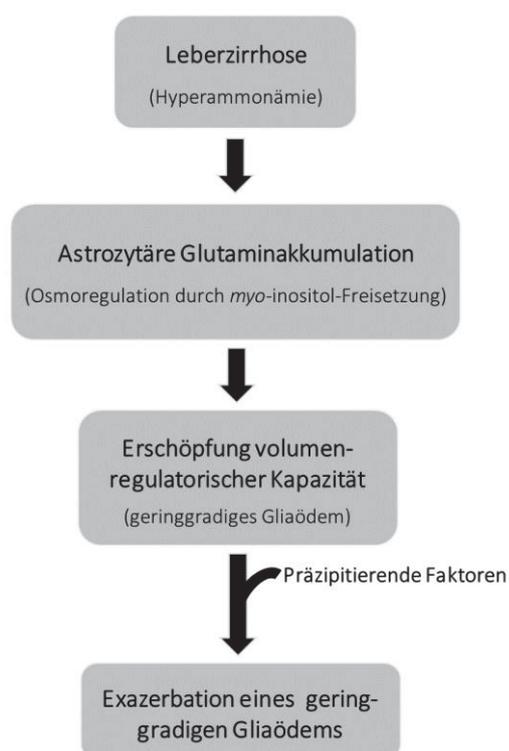


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Schwellungshypothese zur Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie. Leberzirrhose induziert eine Glutaminakkumulation in Astrozyten im Gehirn, die von einer volumeregulatorischen Freisetzung organischer Osmolyte begleitet wird. Die kompensatorische Freisetzung von *myo*-Inositol kann der Astrozytenschwellung entgegen wirken, erschöpft aber

gleichzeitig das volumenregulatorische Potential der Astrozyten, wodurch diese vulnerabel werden für weitere schwellungsauslösende HE-relevante Faktoren. (modifiziert nach Häussinger & Sies, 2013).

2.2. Oxidativer Stress bei der hepatischen Enzephalopathie

Eine Astrozytenschwellung ist mit einer Aktivierung von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren und einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration assoziiert, in dessen Folge reaktive Stick- und Sauerstoffspezies (ROS/RNS) gebildet werden. Dies wurde in kultivierten Rattenastrozyten *in vitro* als auch im Rattenhirn *in vivo* gezeigt (Kosenko *et al.*, 1999; Häussinger & Schliess, 2008; Häussinger, 2010; Reinehr *et al.*, 2007; Murthy *et al.*, 2001; Schliess *et al.*, 2002; Görg *et al.*, 2003). Andererseits induzieren ROS/RNS selbst eine Astrozytenschwellung (Jayakumar *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 1989; Staub *et al.*, 1994; Lachmann *et al.*, 2013). Es wurde daher von Häussinger postuliert, dass Astrozytenschwellung und oxidativer Stress sich wechselseitig verstärken (Häussinger & Schliess, 2005; Häussinger & Schliess, 2008). Die durch Ammoniak vermittelte Bildung von oxidativem und osmotischem Stress hat vielfältige funktionelle Konsequenzen für die Pathogenese der HE. Hierzu zählen die Oxidation von RNA (Bildung von 8-OH-deoxyguanosine (8OH(d)G)), posttranslationale Proteinmodifikationen, Seneszenz und Störungen der Zn^{2+} -Homöostase (Schliess *et al.*, 2002; Görg *et al.*, 2003; Görg *et al.*, 2006; Görg *et al.*, 2008; Kruczek *et al.*, 2009; Kruczek *et al.*, 2011; Görg *et al.*, 2015). Hierdurch werden die Genexpression und die Funktion verschiedener Proteine beeinflusst, was nachfolgend eine Störung der astroglial-neuronalen Kommunikation bewirkt. In der Gesamtheit bewirken diese Mechanismen eine Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität und Störung der oszillatorischen Netzwerke (Abb. 5), wie sie bei der hepatischen Enzephalopathie beobachtet werden.

Der Mechanismus, über den eine RNA-Oxidation (Abb. 6) zur Pathogenese der HE beitragen könnte, ist, indem es die Effizienz und Genauigkeit des Translationsprozesses vermindert und dadurch die Proteinsynthese beeinträchtigt. Im Gehirn von akut mit Ammoniak-behandelten Ratten findet sich oxidierte RNA in RNA-Transport-Granula, die entlang der neuronalen Dendriten zur Synapse transportiert werden (Görg *et al.*, 2008) und dort für synaptische Plastizität und Gedächtnisbildung bedeutsam sind (Schuman *et al.*, 2006). Die Oxidation von RNA im zerebralen Kortex von pfortaderligierten Ratten (PVL) ist assoziiert mit einer reduzierten motorischen Aktivität. Eine Hemmung der RNA-Oxidation durch Indomethacin normalisiert die Laufintensität der Tiere (Brück *et al.*, 2011). Auch im zerebralen Kortex von Patienten mit Leberzirrhose mit HE wurde eine ausgeprägte RNA-Oxidation gefunden (Görg *et al.*, 2010).

Eine weitere Folge von Ammoniak-induzierten oxidativ/nitrosativem Stress sind posttranslationale Proteinmodifikationen, wie z.B. die Nitrierung von Tyrosinresten (Schliess *et al.*,

2002) und die O-GlcNAcylierung an Serin- und Threoninresten (Karababa *et al.*, 2014) in Proteinen, durch die die Funktionen zahlreicher Proteine beeinflusst werden kann. In mit Ammoniak behandelten kultivierten Astrozyten wurden eine Tyrosinnitrierung des peripheren Benzodiazepinrezeptors (PBR), der Glutaminsynthetase (GS), der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), der extrazellulär regulierten Kinase 1 (Erk-1) (Schliess *et al.*, 2002; Görg *et al.*, 2007) und des Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Kotransporters 1 (NKCC1) (Jayakumar *et al.*, 2008) gefunden. Interessanterweise wirken weitere HE-auslösende Faktoren bei der Induktion einer Proteintyrosinnitrierung (PTN) in Astrozyten synergistisch zusammen (Görg *et al.*, 2003; Häussinger & Schliess, 2008). Sowohl PTN (Schliess *et al.*, 2002) als auch die Ammoniumtoxizität (Hermenegildo *et al.*, 1996; Vogels *et al.*, 1997) können durch Antagonisierung des NMDA-Rezeptors verhindert werden. Im Rattenhirn *in vivo* wurden tyrosinnitrierte Proteine überwiegend in perivaskulär lokalisierten Astrozyten gefunden (Schliess *et al.*, 2002) und als Erklärung für die Veränderung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke bei HE diskutiert (Lockwood *et al.*, 1984). Auch in *post mortem* Hirngewebe von Patienten mit Leberzirrhose und HE wurden erhöhte Spiegel tyrosinnitrierter Proteine gefunden. Hierrunter befindet sich auch die Glutaminsynthetase, die bei Patienten mit Leberzirrhose und HE im Vergleich zu den Kontrollpatienten deutlich stärker nitriert vorgefunden wurde (Görg *et al.*, 2010).

Ammoniak und HE-auslösende Faktoren mobilisieren proteingebundenes Zink (Zn²⁺) (Häussinger & Schliess, 2008). Zink ist Kofaktor und/oder integraler Bestandteil von prosthetischen Gruppen in zahlreichen Proteinen, wie z.B. in Metallothioneinen und Transkriptionsfaktoren wie dem metallresponsivem Transkriptionsfaktor 1 (MTF-1) und dem Spezifitätsprotein 1 (Sp1), die beide durch Ammoniak und hypoosmotisch-induzierter Astrozytenschwellung aktiviert werden (Kruczek *et al.*, 2009; Kruczek *et al.*, 2011). Zink spielt eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion, der Langzeit-Potenzierung, synaptischer Plastizität, der Regulation des Energiemetabolismus, der Proliferation und Apoptose (Beyersmann & Haase, 2001; Kröncke, 2007; Tuerk & Fazel, 2009). Bei der durch eine Astrozytenschwellung ausgelösten Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen spielen insbesondere eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und eine durch die neuronale NO-Synthase (nNOS) vermittelte NO-Synthese eine wichtige Rolle (Abb. 6). Störungen der Zinkhomöostase stehen im Zusammenhang mit verminderter Lern- und Gedächtnisprozessierung, Schlaganfall, Epilepsie, Hirntrauma, neurodegenerativen Erkrankungen und hepatische Enzephalopathie (Tuerk & Fazel, 2009; Görg *et al.*, 2013a). Die Erhöhung der intrazellulären Zn²⁺-Konzentration in Astrozyten bewirkt eine nukleäre Akkumulation der Transkriptionsfaktoren MTF-1 und Sp1, durch die die Transkription des peripheren Benzodiazepinrezeptors (PBR) und der Metallothioneine 1, 2 aktiviert wird. Der PBR spielt in der Pathogenese der HE eine wichtige Rolle, da er über den Transport von Cholesterol in die Mitochondrien die Neurosteroidsynthese beeinflusst (Papadopoulos, 2003). Eine Steigerung der Neurosteroidkonzentration mit einer gleichzeitigen Erhöhung der GABAergen Tonus wurde in

Funktionen und tragen dadurch zum klinischen Bild der HE bei. NMDA-R = N-Methyl-D-Aspartate-Rezeptor; PBR = peripherer Benzodiazepinrezeptor; ROS/RNI = reaktiver Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies. (Häussinger & Schliess, 2008; Kircheis & Häussinger, 2012).

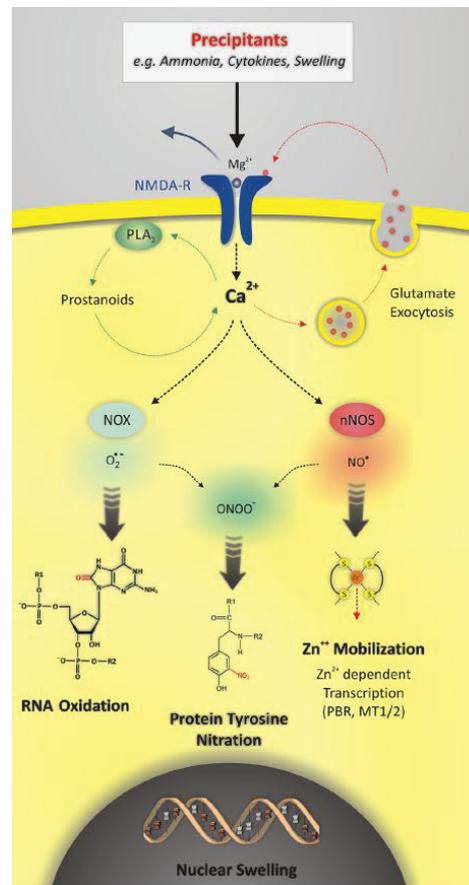


Abbildung 6: Mechanismen und funktionelle Konsequenzen der ammoniakvermittelten Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies in Astrozyten. Ein selbstamplifizierender Zyklus zwischen Astrozytenschwellung und oxidativ-nitrosativem Stress wird durch Aktivierung von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-R) und eine dadurch erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ induziert. Die Steigerung von $[Ca^{2+}]_i$ induziert wiederum die Bildung von Superoxidationradikalen $O_2^{\bullet -}$ und Stickstoffmonoxid (NO^{\bullet}) durch Aktivierung der NADPH-Oxidase (NOX) und der neuronalen NO-Synthase (nNOS). Die Bildung von oxidativ/nitrosativem Stress bewirkt eine RNA-Oxidation, eine Tyrosinnitrierung von Proteinen und eine Mobilisierung von proteingebundenem Zink. Oxidativ/nitrosativer Stress in ammoniakbehandelten Astrozyten induziert eine Schwellung des Nukleus mit bislang unbekanntem funktionellen Konsequenzen. (Görg *et al.*, 2013a).

2.2.1. Rolle der Hämoxigenase-1 bei neurologischen Erkrankungen

Die Hämoxigenase-1 (HO-1) ist ein etablierter Biomarker für oxidativ-/nitrosativen Stress (Calabrese *et al.*, 2006). Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass verschiedene reaktive Stick- und Sauerstoffspezies (RNOS) die HO-1 in verschiedensten Zelltypen induzieren (Keyse & Tyrrell, 1989; Clerget & Polla 1990; Stocker, 1990; Katoh *et al.*, 1991; Saunders *et al.*, 1991; Dwyer *et al.*, 1992; Sato

et al., 1993; Yamaguchi *et al.*, 1993; Hoshida *et al.*, 1996). Auch Stimuli, die indirekt die Produktion von Sauerstoffradikalen vermitteln und damit oxidativen Stress hervorzurufen wie z.B. Häm, Zytokine, Hitzeschock, UV-Strahlung, Schwermetalle, Ischämie, Hyperoxie und Hypoxie induzieren die HO-1 (Sunderman, 1987; Keyse & Tyrrell, 1989; Dwyer *et al.*, 1992; Opanashuk & Finkelstein, 1995; Eysen-Hernandez *et al.*, 1996; Nimura *et al.*, 1996; Visner *et al.*, 1996).

Die Hämoxigenase ist überwiegend im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und katalysiert den Abbau von Häm zu Biliverdin, Kohlenmonoxid (CO) und zweiwertigem Eisen (Fe^{2+}) (Abb. 7). Nachfolgend wird Biliverdin durch eine NAD(P)H-abhängige Biliverdinreduktase zu Bilirubin konvertiert (Schipper *et al.*, 2009).

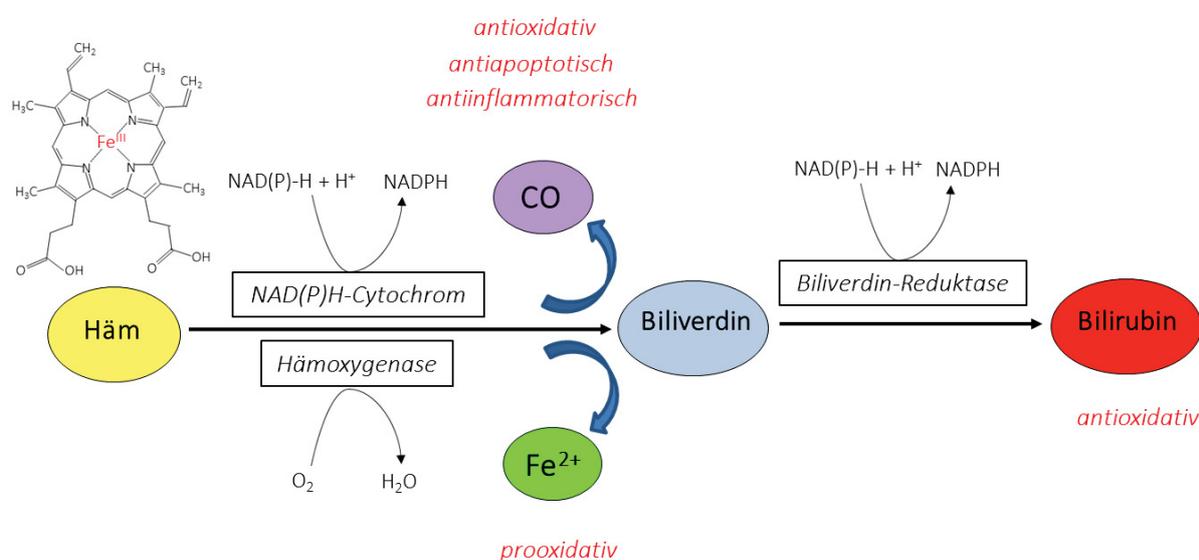


Abbildung 7: Schematische Darstellung des enzymatischen Abbaus von Häm. Hämoxigenase und NADPH-Cytochrom-p450-Reduktase katalysieren die Spaltung von Häm zu Biliverdin, Kohlenmonoxid (CO) und zweiwertigem Eisen (Fe^{2+}). Anschließend wird Biliverdin durch die Biliverdin-Reduktase nach Bilirubin reduziert (modifiziert nach Schipper *et al.*, 2009).

Die im Hämoxigenase-Stoffwechsel gebildeten Produkte Biliverdin und Bilirubin wirken antioxidativ (Stocker, 2004) und Biliverdin besitzt antivirale Eigenschaften (Nakagami *et al.*, 1992). Bilirubin ist ein stark-wirksames Antioxidans und inhibiert die Oxidation ungesättigter Fettsäuren in Liposomen deutlich stärker als α -Tocopherol, welches früher als alleinig-wirksames Antioxidans gegenüber Lipidoxidation vermutet wurde (Stocker *et al.*, 1987). Außerdem hat Bilirubin eine zytoprotektive Rolle im Hinblick auf durch Wasserstoffperoxid verursachte Zellschädigung (Baranano *et al.*, 2002). Bilirubin wirkt anti-inflammatorisch und inhibiert die Synthese von Interleukin 1 und 2 (Haga *et al.*, 1989; Haga *et al.*, 1996). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen belegen die antioxidativen Eigenschaften von Biliverdin und Bilirubin (Stocker *et al.*, 1987; Stocker & Peterhans, 1989; Llesuy & Tomaro, 1994; Stocker, 2004).

Kohlenmonoxid (CO) stellt in hoher Konzentration ein toxisches, mit hoher Affinität an Häm bindendes Gas dar, welches Sauerstoff aus Hämoglobin in Erythrozyten verdrängt und dadurch eine Hypoxie induziert (Ernst & Zibrak, 1998). Auf zellulärer Ebene kann CO in hoher Konzentration die Funktion der Mitochondrien beeinträchtigt (Brown & Piantadosi, 1990). Bei geringen, nicht-toxischen CO-Konzentrationen aktiviert CO die löslichen Guanylatcyclase (sCG) und steigert die Synthese von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Hierüber bewirkt CO eine Vasodilatation der glatten Muskelzellen (Sammur *et al.*, 1998) und der Sinusoide in der Leber (Suematsu *et al.*, 1995). Außerdem besitzt CO anti-inflammatorische Eigenschaften, indem es mitogen-aktivierte Proteinkinasen aktiviert und hierüber die Plättchenaggregation und die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β inhibiert (Otterbein *et al.*, 2000). Weiterhin wirkt CO anti-apoptotisch (Petrache *et al.*, 2000), indem es die Expression pro-apoptischer Proteine supprimiert und die Expression anti-apoptischer Proteine steigert (Brouard *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002). CO ist auch anti-oxidativ wirksam (Otterbein *et al.*, 1999) und schützt Zellen und Organe vor durch reaktive Sauerstoffradikale vermittelten Schädigungen. CO besitzt zudem anti-thrombotische, anti-proliferative und anti-atherosklerotische Eigenschaften (Brüne & Ullrich, 1987; Morita *et al.*, 1997; Fujita *et al.*, 2001; Otterbein *et al.*, 2003).

Im Hämoxigenase-Stoffwechsel wird zweiwertiges Eisen (Fe^{2+}) freigesetzt, welches bereits in geringer Konzentration eine zytotoxische Wirkung entfaltet, indem es in geeignetem chemischen Milieu die Bildung von Hydroxyradikalen steigert (Haber-Weiss/Fenton-Reaktion) (Wunder & Potter, 2003). Häufig ist die HO-1-vermittelte Eisenfreisetzung mit einer gesteigerten Expression des Eisenspeicherproteins Ferritin verbunden (Eisenstein *et al.*, 1991). Ferritin wirkt zytoprotektiv, anti-oxidativ (Balla *et al.*, 1992), anti-inflammatorisch (Soares *et al.*, 2004) sowie anti-apoptotisch (Brouard *et al.*, 2002). Die erhöhte Ferritinexpression aktiviert die Fe-ATPase in mikrosomalen Membranen, über die Eisen aktiv aus der Zelle transportiert werden kann, um den intrazellulären Eisengehalt konstant niedrig zu halten (Ferris *et al.*, 1999; Barañano *et al.*, 2000).

Säugerzellen exprimieren überwiegend zwei Isoformen der Hämoxigenase, die HO-1 (synonym: Hitzeshockprotein (HSP) 32) und die HO-2. Eine dritte Isoform, die HO-3, ist ein Produkt der Retrotransposition des HO-2-Gens (Pseudogen), welche ausschließlich in Ratten exprimiert wird (Scapagnini *et al.*, 2002). Während die HO-2 konstitutiv exprimiert wird, kann die HO-1 Expression im Gehirn durch verschiedene Pro-oxidantien und Stressoren induziert werden (Schipper *et al.*, 2009). Im Gehirn wird die HO-1 insbesondere von Astrozyten und Mikroglia exprimiert. Die HO-1 Expressionslevel sind bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen stark erhöht. Hierzu zählen Alzheimer (Smith *et al.*, 1994; Schipper *et al.*, 1995; Takeda *et al.*, 2000), Parkinson (Castellani *et al.*, 1996; Schipper *et al.*, 1998; Mateo *et al.*, 2010), Pick (Castellani *et al.*, 1995), Huntington (Browne *et al.*, 1999) und Multiple Sklerose (Mehindate *et al.*, 2001; Fagone *et al.*, 2013). Der durch

die HO-1 katalysierte Abbau von Häm kann damit sowohl anti- (Biliverdin/Bilirubin und CO) wie auch pro-oxidative (Fe²⁺) Wirkungen vermitteln.

Eine neuroprotektive Wirkung der Hochregulation der HO-1 wurde sowohl *in vitro* (Le *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000; Takeda *et al.*, 2000; Chen-Roetling *et al.*, 2005; Hung *et al.*, 2008) als auch *in vivo* (Fukuda *et al.*, 1996; Panahian *et al.*, 1999; Beschorner *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007a) Untersuchungen gezeigt. Demgegenüber wurden pro-oxidative Wirkungen der HO-1 und damit verbundene Schädigungen im Gehirn z.B. bei Alzheimer- und Parkinson-Erkrankungen beschrieben (Schipper *et al.*, 2009).

In Astrozyten kann eine Hochregulation der HO-1 eine vermehrte Aufnahme von Eisen durch Mitochondrien induzieren. Dort kann Eisen die Bildung von RNOS induzieren und darüber mitochondriale Funktionsstörungen steigern, die schließlich eine Astrozytenseneszenz vermitteln (Schipper 2004a; Calabrese *et al.* 2006; Schipper *et al.*, 2009). Die Überexpression der HO-1 in Astrozyten induziert mitochondriale Eisenablagerungen und Störungen der ATP-Synthese in Mitochondrien, welche bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson beobachtet werden (Beal, 1996; Castellani *et al.*, 1996; Schipper *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2000; Mehindate *et al.*, 2001; LeVine & Chakrabarty, 2004; Schipper, 2004b; Schipper *et al.*, 2001; Schipper *et al.*, 2006). Die Überexpression der HO-1 in Astrozyten induziert Seneszenz (Schipper *et al.*, 2009), die mit Verhaltensstörungen in Mäusen (Song *et al.*, 2012) einhergeht. Im Einklang mit einer Rolle der HO-1 für Seneszenz finden sich gesteigerte HO-1 Proteinlevel und damit einhergehend eine Störung der Eisenhomöostase im alternden Gehirn (Hirose *et al.*, 2003). Auch in mit Ammoniak behandelten Astrozyten (Warskulat *et al.*, 2002), in verschiedenen Tiermodellen zur HE (Warskulat *et al.*, 2002; Rama Rao *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013) und in *post mortem* Hirnproben von Patienten mit Leberzirrhose mit HE (Görg *et al.*, 2013b) wurden erhöhte HO-1 Expressionslevel gefunden. Die Bedeutung der HO-1 für durch Astrozytenseneszenz bei HE ist bislang hingegen unbekannt.

2.2.2. Astrozytenseneszenz bei hepatischer Enzephalopathie

Zelluläre Seneszenz stellt einen irreversiblen Zellzyklusarrest dar, bei dem die Zellen nicht mehr in der Lage sind, sich zu teilen aber gleichzeitig ihre metabolische Aktivität erhalten bleibt. Seneszenz ist prinzipiell durch den Verlust der Fähigkeit DNA zu synthetisieren charakterisiert. Diese Definition geht auf die vor mehr als 60 Jahren beobachtete limitierte Teilungsfähigkeit menschlicher Fibroblasten zurück, welche als „Hayflick-Limit“ bezeichnet wird (Hayflick & Moorhead, 1961). Nach dem Hayflick-Limit befinden sich derlei Zellen in einem Stadium sog. replikativer Seneszenz, der durch einen irreversiblen Zellzyklusarrest in der G1-Phase charakterisiert ist, sie verlieren dadurch ihre

Reaktionsfähigkeit auf Wachstumsfaktoren (Sherwood *et al.*, 1988). Heute unterscheidet man zwei Formen der zellulären Seneszenz. Bei der replikativen Seneszenz kommt es zu einem irreversiblen Teilungsarrest, der auf einer Telomerverkürzung beruht (Martens *et al.*, 2000). Demgegenüber versteht man unter prämaturer Seneszenz einen Wachstumsarrest, der unabhängig von einer Telomerverkürzung durch endogene und exogene Faktoren wie z.B. DNA-Schäden, onkogene Aktivatoren, ionisierende Strahlung, virale Infektionen, Zelltoxine oder oxidativ-/nitrosativen Stress vermittelt wird (Collado & Serrano, 2006; Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Sedelnikova *et al.*, 2010). Auch extrazelluläre Stimuli wie z.B. Zellkulturstress können prämatüre Seneszenz induzieren. Im Gegensatz zur replikativen Seneszenz ist der Wachstumsarrest bei der prämaturen Seneszenz prinzipiell reversibel (Dirac & Bernards, 2003; Xu *et al.*, 2006; Goligorsky *et al.*, 2009; Boquoi *et al.*, 2015).

Charakteristisch für seneszente Zellen sind Veränderung der Zellkernmorphologie, eine Schwellung der Zellen und des Nukleus, die Bildung vakuolärer Strukturen im Zytoplasma, der Verlust der Reaktionsfähigkeit auf Wachstumsfaktoren, sowie die vermehrte Bildung für Seneszenz charakteristische Biomarker. Hierzu zählen eine verstärkte Aktivität der lysosomal-exprimierten seneszenzassoziierten β -Galaktosidase (SA- β -Gal), die ein pH-Optimum von 6,0 besitzt (Dimri *et al.*, 1995; Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007), eine verstärkte Expression von zellzyklusinhibierenden Faktoren wie p53, p16, p21 und GADD45 α (Herbig *et al.*, 2004; Duan *et al.*, 2005), eine vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die Bildung heterochromatischer Foci (γ H2AX), eine verminderte ATP-Synthese und eine Akkumulation von Lipofuscin (Kuilman *et al.*, 2010).

In seneszenten Astrozyten wird neben einer Wachstumsstörung auch ein Verlust von durch Astrozyten bewerkstelligten Funktionen beobachtet, die erforderlich sind für die Aufrechterhaltung neuronaler Aktivität (Lin *et al.*, 2007b; Pertusa *et al.*, 2007; García-Matas *et al.*, 2008). Als Folge der Astrozytenseneszenz beobachtet man eine verringerte Synapsendichte und hierdurch eine Beeinträchtigung von synaptischer Plastizität und Neurotransmission (Kawano *et al.*, 2012). Untersuchungen von Görg *et al.* (2015) zeigten erstmalig, dass Ammoniak, ein Schlüsseltoxin bei HE, durch oxidativen Stress Astrozytenseneszenz induziert. Während die Astrozytenseneszenz nach Wegnahme von Ammoniak reversibel ist, kann davon ausgegangen werden, dass durch Astrozytenseneszenz strukturelle Veränderungen des neuronalen Netzwerkes induziert werden, die langanhaltend sind und persistieren. In *post mortem* Hirnproben von Leberzirrhosepatienten mit HE und in ammoniakbehandelten kultivierten Rattenastrozyten wurden erhöhte mRNA Expressionslevel der seneszenzassoziierten Gene GADD45 α , p21 und p53 gefunden. Diese Befunde zeigen, dass die HE mit Seneszenz assoziiert ist (Görg *et al.*, 2015), die eine Erklärung für die bei HE persistierende kognitiven Störungen nach Auflösung akuter HE-Episoden oder nach Lebertransplantation darstellen

könnte (Bajaj *et al.*, 2010; Riggio *et al.*, 2011). Allerdings sind die molekularen Mechanismen der durch Ammoniak vermittelten Astrozytenseneszenz bislang noch nicht vollständig verstanden.

3. miRNAs

miRNAs sind kleine, einzelsträngige RNA-Moleküle mit einer Größe von ca. 22 Nukleotiden, die die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene durch Bindung am 3'-Ende ihrer Ziel-mRNA regulieren können (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993; Reinhart *et al.*, 2000; Slack *et al.*, 2000). miRNAs spielen eine wichtige und organismusübergreifende Rolle bei der Regulation der Genexpression. Seit der Entdeckung der miRNA-Familienmitglieder, *lin-4* und *let-7* (Lee *et al.*, 1993; Reinhart *et al.*, 2000), wurden hunderte miRNAs durch molekulare Klonierung und bioinformatische Analysen in Menschen, Tieren, Pflanzen und einigen Viren identifiziert (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Berezikov *et al.*, 2006a; Ruby *et al.*, 2006; Ibáñez-Ventoso *et al.*, 2008). Bislang sind über 17 000 miRNAs in 142 verschiedener Spezies in der miRNA-Datenbank miRBase registriert. Davon wurden insgesamt 2588 miRNAs im Menschen identifiziert (miRBase, Juni 2014), die in ihrer Gesamtheit potentiell ein Drittel der proteinkodierenden Gene eines Menschen regulieren können (Lewis *et al.*, 2005).

Bei vielen biologischen Prozessen spielen miRNAs eine wichtige regulatorische Rolle wie z.B. bei der Embryonalentwicklung, Differenzierung und Proliferation von Zellen, Apoptose, Metabolismus, Angiogenese, Onkogenese und Immunsystem (Ambros, 2003; Xu *et al.*, 2003; Bartel, 2004; Chen, 2005). Darüber hinaus sind Änderungen des miRNoms mit neurologischen Erkrankungen, Neuroinflammation und -degeneration, viralen Infektionen, Herzerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Krebs assoziiert (Thounaojam *et al.*, 2013; Kanwar *et al.*, 2010; Sonntag, 2010; Maes *et al.*, 2009; Qu *et al.*, 2014).

3.1. Biogenese von miRNAs

miRNAs werden entweder monocistronisch aus einem individuellen Gen, oder polycistronisch durch Transkription mehrerer, aus demselben Promotorbereich stammender, in einem Cluster vorliegender miRNA-Gene prozessiert. Einige der im Cluster vorkommenden miRNA-Gene werden aus dem Intron (40%) bzw. Exon (10%) des nichtkodierenden Bereiches der Transkriptionseinheit generiert. Der Rest wird aus dem proteinkodierenden Bereich synthetisiert (Filipowicz *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009).

Zu Beginn der miRNA-Biogenese (Abb. 8) wird der Großteil der miRNA-Gene im Nukleus von der RNA-Polymerase II und einige wenige durch die RNA-Polymerase III transkribiert. Das entstandene, bis zu mehrere Kilobasen lange Primärtranskript (primäre miRNA, pri-miRNA) besitzt eine charakteristische Haarnadelstruktur, ist polyadenyliert und enthält eine Cap-Struktur am 5'-Ende, die es vor dem Abbau durch Nukleasen schützt (Cai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). Anschließend wird die pri-miRNA von einem sogenannte Mikroprozessorkomplex, bestehend aus RNase III-Enzym Drosha und den dsRNA-Bindeproteins DGCR8, in etwa 70 Nukleotid lange Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) gespalten (Lee *et al.*, 2003; Denli *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004). Charakteristisch für pre-miRNAs ist der 2 Nukleotid lange Überhang ihrer 3'-Ende. An dieser Stelle wird die pre-miRNA von dem nukleären Transportrezeptor Exportin-5 zusammen mit seinem Kofaktor Ran-GTP gebunden, aus dem Zellkern transportiert und im Zytoplasma GTP-Hydrolyse vermittelt freigesetzt (Bohnsack *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004). Im Zytoplasma wird die pre-miRNA von einem Endonuklease Dicer zu einer etwa 22 Nukleotid-langen miRNA:miRNA*-Duplex prozessiert, indem Dicer im Bereich von pre-miRNA Erkennungssequenzen die Nukleinsäurestränge spaltet (Hutvágner *et al.*, 2001). Dicer interagiert außerdem mit Kofaktoren, wie dem transaktivierenden Bindungsprotein TRBP (Haase *et al.*, 2005) und dem Proteinkinase-Aktivator PACT (Lee *et al.*, 2006). TRBP und PACT entwinden gemeinsam die miRNA-Duplex. Der Komplex aus TRBP und/oder PACT mit Dicer rekrutiert Ago2, ein Protein der Argonaute (Ago)-Familie und bildet dadurch einen Multimer (miRNA-induzierter Silencing-Komplex, miRISC) an dem die nun einzelsträngige, reife miRNA an Ago2 binden kann (Chendrimada *et al.*, 2005). In der Regel entscheidet die unterschiedliche thermodynamische Stabilität der beiden miRNA Stränge, ob der Strang im RISC-Komplex aufgenommen, oder aber abgebaut wird. Ein miRNA-Strang, dessen 5'-Ende weniger stabil ist, wird bevorzugt in diesem Komplex inkorporiert und interagiert mit der Ziel-mRNA (Schwarz *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003). Der andere, stabilere Strang wird meistens degradiert. Da die Auswahl der zu prozessierenden miRNA-Stränge kein zwingender Prozess ist, werden miRNAs aus beiden Strängen einiger pre-miRNAs in regelmäßigen Abständen produziert (Khvorova *et al.* 2003; Han *et al.* 2006).

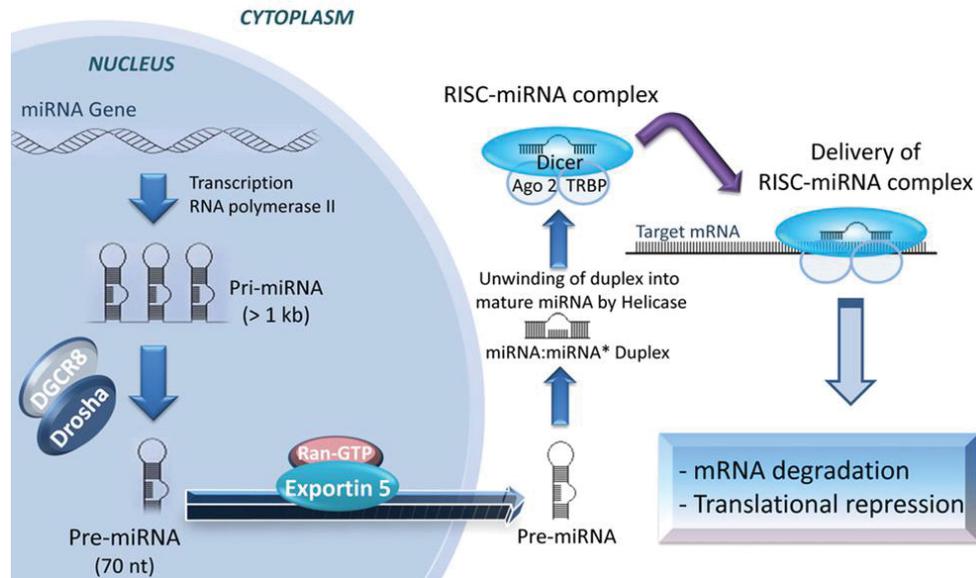


Abbildung 8: Biogenese von miRNA. Im Nucleus wird primäre miRNA (pri-miRNA) mit Hilfe eines RNA Polymerase II gebildet und durch einen Mikroprozessorkomplex Drosha/DGCR8 gespalten. Die entstandene Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) wird aus dem Nucleus ATP-abhängig über Exportin 5/Ran-GTP ins Cytoplasma transportiert. Dort wird sie zur reifen miRNA prozessiert. Der funktionelle reife miRNA-Strang wird schließlich im RISC-Komplex bestehend aus Dicer, TRBP und Ago2 bevorzugt aufgenommen. Durch Bindung am RISC-miRNA-Komplex wird die Ziel-mRNA degradiert oder die Translation inhibiert. Ran = Ras-ähnliches nukleäres Protein; GTP = Guanosintriphosphat; TRBP = transaktivierendes doppelsträngige-RNA-Bindeprotein; Ago 2 = Argonaute 2; RISC = RNA-induzierter Silencing Komplex. (Zhang *et al.*, 2013).

3.2. Mechanismen der Genregulation durch miRNAs

miRNAs regulieren ihre Zielgene posttranskriptionell, indem sie den RISC-Komplex zu der entsprechenden Ziel-mRNA leiten und über Watson-Crick-Basenpaarung an die Ziel-mRNA binden. Die Interaktion zwischen miRNA und mRNA erfolgt durch die Bindung eines 6-7 Nukleotide umfassenden Abschnitts am 5'-Ende der im RISC inkorporierten miRNA. Dabei kann die Bindung der miRNA an die entsprechende Zielsequenz in der 3'-UTR vollständig aber auch partiell erfolgen (Doench und Sharp 2004; Lewis *et al.*, 2005). Damit ist keine 100%ige miRNA-mRNA Sequenzhomologie für die Bindung erforderlich. Im Fall einer perfekten Komplementarität zwischen miRNA/mRNA wird die Ziel-mRNA gespalten und nachfolgend degradiert. Damit diese Spaltung stattfinden kann, muss der miRISC ein Argonaute (Ago)-Protein rekrutieren, welches in der Lage ist eine endonukleäre Spaltung durchzuführen. Alle Ago-Proteine besitzen Endonukleaseaktivität, jedoch nur Ago2 kann die komplementären mRNA-Stränge in menschlichen Zellen spalten (Abb. 9) (Liu *et al.*, 2004; Okamura *et al.*, 2004). Während miRNAs in Pflanzen zum Großteil eine vollständige Komplementarität zur Zielsequenz aufweisen und daher überwiegend die Spaltung der Ziel-mRNA induzieren, wurden nur

wenige tierische miRNAs bislang identifiziert, die vollständig komplementär im Bereich der 3'-UTR-Region der mRNAs binden (Yekta *et al.*, 2004; Park & Shin, 2014).

In den meisten Fällen kommt in tierischen Zellen und beim Menschen keine vollständig komplementäre Bindung zwischen miRNA-mRNA-Sequenzen zustande, wodurch in der Folge die Translation der entsprechenden mRNA unterbunden wird. In diesem Fall wird die Ziel-mRNA nicht degradiert, aber durch mRNA-Deadenylierung und Abspaltung der methylierten Guanosin-Kappe (m⁷G-Kappe) am 5'-Ende der mRNA destabilisiert (Behm-Ansmant *et al.*, 2006a; Behm-Ansmant *et al.*, 2006b; Wu *et al.*, 2006). Dieser Mechanismus verkürzt die Lebensdauer der mRNA und inhibiert letztlich die Genexpression. Ein weiterer der Translationsinhibition zugrunde liegender Mechanismus ist die Hemmung der Translation auf Ebene der Initiation und/oder der Elongation. Eine Hemmung der Translationsinitiation durch miRNA führt zur Störung bei der Bindung der Initiationsfaktoren eIF4E und eIF4G mit dem poly(A)-bindenden Protein PABP am polyadenylierten Bereich der mit m⁷G-Kappe versehenen Ziel-mRNA (Humphreys *et al.*, 2005; Pillai *et al.*, 2005). Bei einer Inhibierung der Elongation an den Polyribosomen durch den miRNA/mRNA-Komplex (Maroney *et al.*, 2006) kann sich das Polyribosom vom miRNA/mRNA ablösen (Petersen *et al.*, 2006) oder die wachsende Aminosäurekette proteolytisch gespalten werden (Nottrott *et al.*, 2006).

Darüber hinaus wurden Ago-Proteine, miRNAs und ihre Ziel-mRNA zusammen in zytosolischen Kompartimenten, den sogenannten „Processing (P)-bodies“ gefunden (Liu *et al.*, 2005b; Sen & Blau, 2005). In P-bodies werden viele wichtige Schritte der RNA-Prozessierung durchgeführt wie z.B. der Abbau von mRNA (Sheth & Parker, 2003). Einige Proteine, die in P-bodies enthalten sind, (GW182, das Dcp1/Dcp2-Komplex und die RCK/p54-Helikase) können Ago-Proteine binden und hierdurch die Translation inhibieren (Liu *et al.*, 2005a; Liu *et al.*, 2005b; Rehwinkel *et al.*, 2005). Außerdem dienen P-bodies dazu mRNA der Prozessierung durch die Translationsmaschinerie zu entziehen (Bhattacharyya *et al.*, 2006).

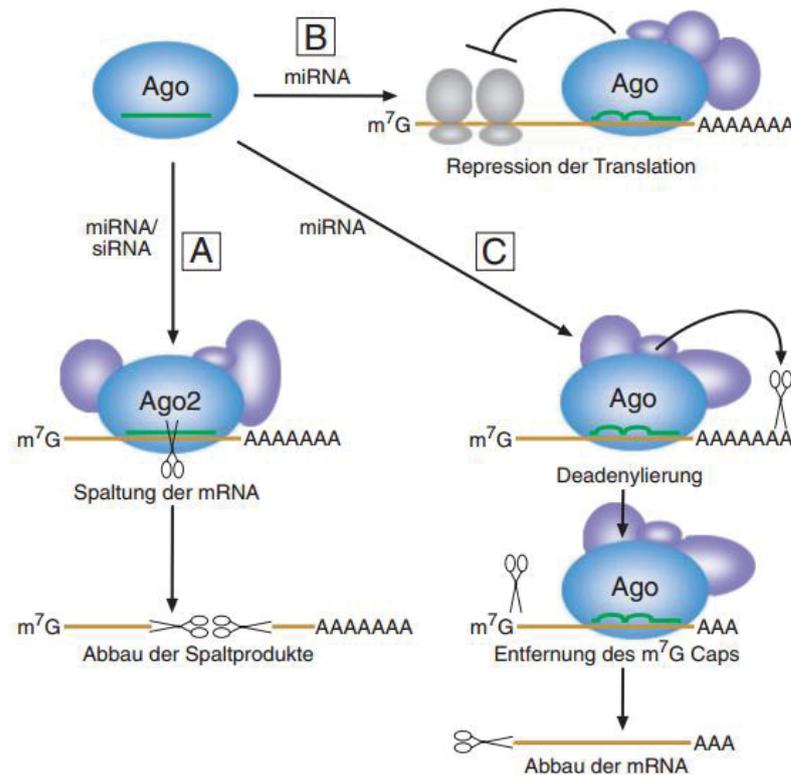


Abbildung 9: Mechanismen der posttranskriptionellen Genregulation durch miRNAs. miRNAs können eine Spaltung und Degradation ihrer Ziel-mRNAs (A) bewirken, indem sie die Stabilität der Ziel-mRNAs (C) und deren Translation (B) beeinflussen. m⁷G-Kappe = 7-Methyl-Guanin-Kappe; AAA = Poly-A-Schwanz; Ago = Argonaute. (Meister & Peters, 2006).

3.3. Charakterisierung und Funktion von miRNAs im Zentralnervensystem

Bislang wurde circa 2500 miRNAs im Humangenom beschrieben (miRBase, Juni 2014) und die Anzahl neu entdeckter miRNA-Spezies steigt permanent an. Jede einzelne miRNA kann potenziell hunderte von Genen regulieren (Krek *et al.*, 2005). Man schätzt, dass ca. ein Drittel der proteinkodierten Gene eines Menschen durch miRNAs reguliert werden (Lewis *et al.*, 2005). Die inhibitorische Wirkung einer miRNA bekommt große physiologisch Relevanz durch kumulative Effekte auf die Expression mehrerer mRNAs bzw. Proteine. Diese „Unspezifität“ erklärt, warum die veränderte Expression einer einzelnen miRNA häufig mit völlig verschiedenartigen Erkrankungen assoziiert sein kann. Reife miRNAs können basierend auf ihrer Sequenzhomologie an ihrem 5'-Ende zu miRNA-Familien gruppiert werden. Darüber hinaus ist ein Drittel der miRNA-Familie über verschiedene Spezies hinweg hochkonserviert, beispielsweise bis zu 60% zwischen Maus und Menschen und bis zu 55% zwischen *Caenorhabditis elegans* und Menschen. Dieser hohe Grad der Homologie deutet auf eine wichtige Bedeutung von miRNAs für die Steuerung grundlegender biologischer Prozesse, die sich in der Evolution ausgebildet haben (Grimson *et al.*, 2008; Roush & Slack, 2008).

Im Gehirn spielen miRNAs eine wichtige Rolle in der Entwicklung und für unterschiedliche Funktionen des Zentralnervensystem (ZNS). miRNA-Expressionsveränderungen sind mit einer Vielzahl schwerer neurologischer Erkrankungen assoziiert wie z.B. Alzheimer, Parkinson und Schizophrenie (Maes *et al.*, 2009; Thounaojam *et al.*, 2013). Viele miRNAs werden spezifisch im Gehirn, einige zelltypspezifisch und andere hirnregionenspezifisch exprimiert. Zum Beispiel werden einige miRNAs, darunter miR-138 und miR-124 hauptsächlich im ZNS, miR-23, miR-26 und miR-29 in Astrozyten, miR-124 und miR-128 in Neuronen und die let-7-Familie in hippocampalen Neuronen exprimiert (Smirnova *et al.*, 2005; Wulczyn *et al.*, 2007). Außerdem sind einige miRNAs wie z.B. let-7 von Nematoden bis hin zum Primaten hochkonserviert, was auf eine wichtige Bedeutung dieser miRNAs für die Entwicklung des ZNS hinweist (Lagos-Quintana *et al.*, 2001). Andere miRNAs werden dagegen nur im Primatenhirn exprimiert (Berezikov *et al.*, 2006b). Dies könnte darauf hindeuten, dass miRNAs für zelluläre Diversität im Gehirn höher-organisierter Organismen und höhere kognitiven Funktionen eine Bedeutung zukommt.

Dicer ist eine Endonuklease, die wichtig für die Prozessierung von reifen miRNAs ist. In einer Dicer-defizienten Maus wurden Neurodegeneration und neuronaler Zelltod im Gehirn gefunden (Kim *et al.*, 2007; Schaefer *et al.*, 2007; De Pietri Tonelli *et al.*, 2008). Dicer-Depletion im Kortex und Hippocampus induziert morphologische Veränderungen und induziert Apoptose (Davis *et al.*, 2008). Demgegenüber stört die Inaktivierung von Dicer in neokortikalen Progenitorzellen die neuronale Differenzierung (Choi *et al.*, 2008).

Mutationen im Dicer1-Gen wirken sich vielfältig im ZNS aus und induzieren z.B. Veränderungen der Morphologie dendritischer Fortsätze und modulieren die Expression synaptischer Proteine. Daher vermutet man, dass miRNAs eine Schlüsselrolle bei synaptischer Plastizität, Lernen und Gedächtnisbildung zukommt (Konopka *et al.*, 2010).

3.4. Pathogenetische Bedeutung von miRNAs bei neurologischen Erkrankungen

miRNAs wurden als wichtige Regulatoren aller Stufen synaptischer Entwicklung beschrieben. Veränderungen in der Expression individueller miRNAs sind mit unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen und Verhaltenstörungen assoziiert (Maes *et al.*, 2009; Thounaojam *et al.*, 2013). Im Menschen führt eine Mikrodeletion von 22q11 (der lange Arm von Chromosoms 22, Position 11) zu Störungen von Kognitiven und Verhalten und bedingt ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Schizophrenie. Eines der Gene, welches durch Mikrodeletion von 22q11 beeinträchtigt wird, ist DGCR8. DGCR8 ist ein Bestandteil des Mikroprozessorkomplexes, der essentiell für die Biogenese der miRNA ist. Eine Haploinsuffizienz des DGCR8 Gens in heterozygoter Maus resultiert in Störung der

miRNA-Biogenese, der Morphogenese von Dendriten und synaptischen Fortsätzen, des räumlichen Arbeitsgedächtnis, der Kurzzeitplastizität sowie der Sensomotorik (Stark *et al.*, 2008; Merico *et al.*, 2014). Diese Befunde deuten auf die Rolle von miRNAs bei der Regulation neuronaler Netzwerke hin (Ramocki & Zoghbi, 2008).

Die Untersuchungen von Schratt *et al.* (2006) zeigten erstmalig, dass miRNAs an der synaptischen Entwicklung und Plastizität z.B. während Lern- und Gedächtnisvorgängen beteiligen sind. Die gehirnspezifische miRNA miR-134 ist exklusiv an dendritischen Dornfortsätzen lokalisiert. Dort inhibiert sie die lokale Synthese wichtiger Strukturproteine von Synapsen darunter Limk-1 (Lim-Domäne der Proteinkinase 1) und beeinflusst dadurch das Wachstum von dendritischen Dornfortsätzen. Diese Inhibition kann wiederum durch den Wachstumsfaktor BDNF („vom Gehirn stammender neurotropher Faktor“) aufgehoben werden. Neuere Untersuchungen deuten auf die Existenz eines Netzwerks aus dendritischen miRNAs hin, welches die Synthese einer Reihe synaptischer Proteine reguliert und hierüber synaptische Plastizität vermittelt (Siegel *et al.*, 2009; Pathania *et al.*, 2012).

4. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es miRNA Expressionsänderungen und damit assoziierte Genexpressionsänderungen bei der hepatischen Enzephalopathie (HE) zu identifizieren. Die Untersuchungen sollten an humanen *post mortem* Hirnproben und an mit Ammoniak behandelten kultivierten Rattenastrozyten durchgeführt werden. An Rattenastrozytenkulturen sollten zugrundeliegende molekulare Mechanismen und funktionelle Konsequenzen ammoniakinduzierter miRNA-Expressionsänderungen charakterisiert werden.

II. Material und Methoden

1. Materialien

1.1. Geräte

Tabelle 2 : Verwendete Geräte.

Gerät	Firma, Ort
7500 Realtime PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Excella E24	New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA
Filterphotometer ECOM 6122	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gefrierpunktsmometer	Gonotec, Berlin, Deutschland
KODAK Digital Image Station (4000 MM)	Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA
Magnetrührer Modell MR2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Nanodrop®ND-1000	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Osmomat 030 cryoscopic osmometer	Gonotec, Berlin, Deutschland
pH-Meter 330	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetboy acu und Pipetboy comfort	IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipetten 0,1-10µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Roller SRT1	Stuart Scientific, Staffordshire, England
Schüttelapparat GFL-3017	Hilab, Düsseldorf, Deutschland
Spectrophotometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Standard Power Pack p25	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermoblock (Thermomixer) 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultraschallprozessor UP50H	Hielscher, Teltow, Deutschland
Ultrazentrifuge J2-HS	Beckman Coulter Inc., Krefeld, Deutschland
Vakuum-Sicherheits-Absaugsystem HLC	Ditabis, Pforzheim, Deutschland
ViiA™ 7 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
VivaTome™ Fluoreszenz Mikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Vortex VM2	CAT, Staufen, Deutschland
Waage (Analyse) 770 max.120g	Kern&Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland
Waage 440-47N max.2000g	Kern&Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland
Wasserbad	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Zellerntegerät 505S	Watson Marlow, Rommerskirchen, Deutschland
Zellkultur-Inkubator Hera Cell 150	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge AHT 35R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 30RF	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Firma, Ort
Cellstar® 24 Well Zellkulturplatte	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® T25, T75, T182-Zellkulturflasche	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cell Strainer 70 µM Nylon	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Costar® Cell Lifter Polyethylene Zellschaber	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Costar® Stripette 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Deckgläser 12 mm φ	Assistent, Sondheim, Deutschland
Deckgläser 24x60 mm	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Einmalkanüle 20G-Mandrin	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einwegküvetten für Photometer	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Eppendorfgefäß 1,5 mL und 2 mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filterpapier	Whatman, Dassel, Deutschland
Filtropur S 0,2-Spritzenfilter	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Framestar® 96-Well Reaction Plate	4titude, Berlin, Deutschland
Glaspipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Mikro Schraubröhre 2 mL	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Nitrocellulose Transfer Membran Protran®	Whatman, Dassel, Deutschland
Original Perfusor® -Spritze OPS 1 ml, 50 ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Parafilm M Labfilm	Pechiney, Chicago, IL, USA
Plastikzellkulturschalen 60 mm, 100 mm	BD Biosciences, Durham, NC, USA
QIAshredder	Qiagen, Hilden, Deutschland
QPCR Seal (Abdeck-Klebefolie)	4titude, Berlin, Deutschland
Röhrchen (Greiner) 15 ml und 50 ml	Falcon, Heidelberg, Deutschland

1.3. Vorgefertigte Reagenzsysteme (Kits)

Tabelle 4: Kommerzielle Reagenzsysteme (Kits).

Kit	Firma, Ort
Bradford Protein Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
dNTP Mix	Promega, Madison, WI, USA
Dual Color Proteinstandard	Bio-Rad, München, Deutschland
<i>miRvana</i> TM miRNA Isolation Kit [Ambion]	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Mycoplasma Detection Kit Venor® GeM	Minerva Biolabs GmbH, Berlin, Deutschland
PrimeScript RT-PCR Kit	Takara Clontech, Mountain View, CA, USA
Quantitect® Reverse Transcription	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

T4 RNA Ligase 2, truncated	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Western Lightning® Plus-ECL	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA

1.4. Chemikalien/Substanzen

Tabelle 5 : Chemikalien oder Substanzen.

Chemikalien/Substanzen	Firma, Ort
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BSA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMEM AS 21885 [-] Phenol red [-] Sodium Chloride (GIBCO)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
DMEM/F-12	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
DMEM Glutamax ohne FCS [+] 1,0 g/l D-Glucose [Pyruvat] (GIBCO)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
DMEM low glucose, [+] Pyruvat	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
DMSO Hybri-Max®	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DTT	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
FCS	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Lipofectamine LTX	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NaCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NaF	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NaN ₃	Merck, Darmstadt, Deutschland
NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Nonidet-P40	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Opti-MEM Medium + GlutaMAX (GIBCO)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
PBS Dulbescco mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (GIBCO)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
PBS Dulbescco ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom, Berlin, Deutschland
Phenol:Chloroform	Ambion, Darmstadt, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S solution for electrophoresis (0,2 %)	Serva, Heidelberg, Deutschland
RNase Inhibitor	Ambion, Darmstadt, Deutschland
SDS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Succrose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris	VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Tris/HCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin/EDTA Solution (0,05%/ 0,02% in PBS)	CytoGen, Wetzlar, Deutschland
Tween-20	Merck, Darmstadt, Deutschland

1.5. Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Puffer und Lösungen.

Lösung	Zusammensetzung
1x Blottingpuffer	10x Blottingpuffer, 20% Methanol, bidest. H ₂ O
5x Elektrophoresepuffer	1,73 mmol/l SDS, 125 mmol/l Tris, 1,25 mmol/l Glycin
10x Blottingpuffer	10 mmol/l SDS, 3,86 mmol/l Glycin, 4,78 mmol/l Tris
10x TBS-Puffer	1,98 mmol/l Tris, 1,488 mmol/l NaCl, pH 7,6
Auftragspuffer	220 mmol/l Tris/HCL (pH 8,8), 22,5 mmol/l EDTA, 9% SDS, 40% Glycerin, 0,125% Bromphenolblau, 200 mmol/l DTT
RL-Puffer	10 mmol/l Tris/HCL (pH 7,4), 1% Triton X-100, 150 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l EGTA, 20 mmol/l NaF, 0,2 mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid, 0,5% Nonidet-P-40
TBST-Puffer	1x TBS-Puffer, 0,1% Tween-20

2. Methoden

2.1. Zellpräparation und -Kultivierung

2.1.1. Kultivierte Rattenastrozyten

In dieser Arbeit wurden kultivierte Rattenastrozyten verwendet. Die Dissoziationskulturen wurden aus dem zerebralen Kortex von 0 - 1 Tage alten Wistar-Ratten gewonnen. Nach Dekapitation wurde die Kopfhaut entfernt und der Schädel mit einer Schere geöffnet. Das Hirn wurde entnommen und die Hemisphären mit einer Pinzette vorsichtig voneinander getrennt. Mit dem Skalpell wurde der zerebrale Kortex der beiden Hemisphären präpariert und anschließend wurden die Meningen mit einer Pinzette unter Verwendung einer Stereolupe entfernt. Nachfolgend wurde der Kortex grob mit

einem Skalpell zerkleinert, in 5 ml PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) aufgenommen und mittels Pasteurpipette unterschiedlicher Öffnungsgröße trituiert. Anschließend wurde die Gewebe-Suspension durch einen Filter mit einem Nylonnetz (Porengröße: $60\mu\text{m}$) passagiert und mit circa 20 ml DMEM-Zellkulturmedium (10% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS) aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde nachfolgend für 5 Min. bei 4°C bei $300 \times g$ zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 25 ml DMEM-Zellkulturmedium (10% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde anschließend auf T75-Zellkulturflaschen gesplittet und für 7 Tage im Brutschrank ($10\% \text{CO}_2$, 37°C) kultiviert. Damit die Astrozytenkulturen von den anderen Zelltypen wie Mikroglia, Oligodendrozyten und Neurone getrennt werden, wurde die Zellkulturflasche über Nacht bei 200 rpm auf einem Rüttler geschüttelt (Booher & Sensenbrenner, 1972). Nachfolgend wurden die Kulturen auf T75 Zellkulturflaschen im Verhältnis 1:3 gesplittet und bis zum Erreichen der Konfluenz weiterkultiviert. Für die Durchführung von Versuchen wurden die Zellen auf 60 mm oder 100 mm Plastikzellkulturschalen gesplittet.

Das „Splitten“ erfolgte nach Absaugen des Zellkulturmediums durch Zugabe von 5 ml PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , welches unmittelbar nach Zugabe auf die Zellkulturflasche abgesaugt wurde und nachfolgender Inkubation in 5 ml Trypsin/EDTA Lösung für 5 Min. im Brutschrank. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen von der Plastikoberfläche mechanisch durch Klopfen abgelöst und in 10% FCS-supplementiertem DMEM-Zellkulturmedium aufgenommen und entsprechend dem Verwendungszweck weiterkultiviert.

2.1.2. Humane Zelllinien

Für die Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden die humane Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y [DSMZ, Braunschweig, Deutschland; Nr. ACC-209] und die Astrozytoma-Zelllinie MOG-G-CCM [ECACC, Salisbury, UK; Nr. 86022702] verwendet. Die Zellen wurden, wie in Tab. 7 aufgelistet, unter Verwendung der genannten Zellkulturmedien bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 auf eine neue Zellkulturflasche passagiert. Für die Versuche wurden ausschließlich Zellen verwendet, die häufiger als 30-mal passagiert worden waren. In regelmäßigen Abständen wurde ein Mycoplasma-Test [Mycoplasma-Detection-Kits, Minerva Biolabs GmbH, Berlin, Deutschland] nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt, um Zellkontamination der Zelllinien auszuschließen zu können.

2.1.3. Kultivierung der Rattenastrozyten und humanen Zelllinien SH-SY5Y und MOG-G-CCM

Astrozyten, SH-SY5Y und MOG-G-CCM-Zellen wurden im Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 37°C und 10% CO₂-Gehalt unter Wasserdampfsättigung inkubiert. Dreimal in der Woche fand ein Mediumwechsel statt. Vor jedem Versuch wurden die Zellen in DMEM-Glutamax-Medium (+ 1,0 g/l D-Glucose) ohne FCS inkubiert, um Einflüsse von FCS auf den Versuch zu minimieren. Unmittelbar danach erfolgte die experimentelle Behandlung der Zellen.

Tabelle 7: Zellkulturmedium.

Kultivierte Rattenastrozyten und SH-SY5Y-Zellen		
500 ml	DMEM, Glutamax, 1,0 g/l D-Glucose (GIBCO)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
50 ml	Fötale Kälberserum (30 Min. bei 56 °C inaktiviert)	Merck, Darmstadt, Deutschland
MOG-G-CCM-Zelllinie		
500 ml	F12-Medium	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
50 ml	Fötale Kälberserum (30 Min. bei 56 °C inaktiviert)	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.2. Post mortem Hirngewebe

Humanes *post mortem* Hirngewebe aus dem zerebralen Kortex (*Gyrus fusiforme*) von 4 Kontrollpatienten und 4 Patienten mit Leberzirrhose mit oder ohne hepatische Enzephalopathie (HE) wurde vom australischen New South Wales (NSW) Tissue Resource Centre, unterstützt, von der Universität Sydney, National Health and Medical Research Council of Australia, Schizophrenia Research Institute, National Institute of Alcohol Abuse und Alcoholism and NSW Department of Health, zur Verfügung gestellt. Detaillierte Informationen zur Ätiologie der Zirrhose, Begleiterkrankungen, der Todesursache sowie demographische Informationen zu den Patienten sind in den Tabellen 8 und 9 aufgelistet.

Zusätzlich wurden humane *post mortem* Hirnproben aus dem zerebralen Kortex (*Gyrus fusiforme*) von 6 Kontrollpatienten und 7 Patienten mit Leberzirrhose mit HE aus dem Körperspender-Programm des anatomischen Instituts der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Deutschland) erhalten. Detaillierte Informationen zur Ätiologie der Zirrhose, Begleiterkrankungen, der Todesursache

sowie demographische Informationen zu den Patienten sind in den Tabellen 10 – 12 aufgelistet. Die Proben wurden wie unter Abschnitt 2.8.1 beschrieben verarbeitet.

Tabelle 8: Patientendemographie, Todesursache und Ätiologie der Zirrhose bei Patienten mit Leberzirrhose mit oder ohne hepatische Enzephalopathie. Hirnproben von 4 Kontrollpatienten, 4 Patienten mit Leberzirrhose ohne und 4 mit HE wurden vom NSW Tissue Resource Centre (Sydney-Universität, Australien) zur Verfügung gestellt. (Quelle: Tissue Resource Centre (Sydney-Universität, Australien)). Nach Sobczyk *et al.* (2015) und Görg *et al.* (2015).

Fall	Patienten-Gruppe	Alter (Jahre)	Geschlecht	Todesursache	Ätiologie
1	Kontrolle	63	♂	Koronare Herzerkrankung	-
2	Kontrolle	63	♂	Koronare Herzerkrankung	-
3	Kontrolle	49	♀	Verdacht auf arrhythmogene, rechtsventrikuläre Dysplasie	-
4	Kontrolle	52	♂	Unbekannt	-
1	Zirrhose ohne HE	46	♂	Alkoholvergiftung	Alkohol
2	Zirrhose ohne HE	52	♂	Alkoholvergiftung	Alkohol
3	Zirrhose ohne HE	37	♂	Alkoholvergiftung	Alkohol
4	Zirrhose ohne HE	57	♂	Koronare Herzerkrankung, Bronchopneumonie	Alkohol
1	Zirrhose mit HE	73	♂	Blutendes Ulkus, Koronare Herzerkrankung	Alkohol
2	Zirrhose mit HE	62	♀	Medikamentenvergiftung	Alkohol
3	Zirrhose mit HE	60	♂	Medikamentenvergiftung	Alkohol
4	Zirrhose mit HE	47	♀	Pneumonie	Alkohol

Tabelle 9: Leber- und Gehirnpathologie und Begleiterkrankungen bei Kontrollpatienten und Patienten mit Leberzirrhose mit oder ohne hepatische Enzephalopathie. (Quelle: Tissue Resource Centre (Sydney-Universität, Australien)). Nach Sobczyk *et al.* (2015) und Görg *et al.* (2015).

Fall	Patienten-Gruppe	Leber und Gehirn Pathologie/ Begleiterkrankungen
1	Kontrolle	Milde Steatose, unauffällige Hirnpathologie, akute koronare Herzerkrankung

2	Kontrolle	Mittelgradige makrovesikuläre Steatose, unauffällige Hirnpathologie, akute koronare Herzerkrankung
3	Kontrolle	Unauffällige Leber- und Hirnpathologie, Arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie (ARVD)
4	Kontrolle	Milde Steatose, unauffällige Hirnpathologie, Colitis ulcerosa
1	Zirrhose ohne HE	Leberzirrhose
2	Zirrhose ohne HE	Leberzirrhose, Steatose, unauffällige Hirnpathologie
3	Zirrhose ohne HE	Gemischte mikro- und makronoduläre Leberzirrhose, Fettleber, akute makrovesikuläre Steatose, mittelgradige zerebelläre Degeneration
4	Zirrhose ohne HE	Leberzirrhose, unauffällige Hirnpathologie, Cholestase, Gelbsucht, Bronchopneumonie
1	Zirrhose mit HE	Leberzirrhose, makrovesikuläre Steatose, unauffällige Hirnpathologie, Ösophagusvarizen, Magengeschwüre
2	Zirrhose mit HE	Makrovesikuläre Steatose und auffällige perivaskuläre Fibrose
3	Zirrhose mit HE	Leberzirrhose, Steatose
4	Zirrhose mit HE	Leberzirrhose, Fettleber, Steatohepatitis, Hepatomegalie, Kleinhirnatrophie

Tabelle 10: Patientendemographie, Todesursache und Ätiologie der Zirrhose bei Patienten mit Leberzirrhose mit oder ohne hepatische Enzephalopathie. Die Diagnose wurde entweder in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Deutschland oder im Department of Internal Medicine des Universitätsklinikums Patras, Griechenland gestellt. (Quelle: Anatomische Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Deutschland)). Nach Görg *et al.* (2013a).

Fall	Patienten-Gruppe	Alter (Jahre)	Geschlecht	Todesursache	Post mortem Verzögerung (Std.)
1	Kontrolle	64	♂	Respiratorische Insuffizienz, Lungenembolie	5
2	Kontrolle	63	♀	Suizid durch Erstickten	23
3	Kontrolle	79	♂	Pankreaskarzinom	9
4	Kontrolle	44	♂	Bronchialkarzinom, Kreislaufversagen	25
5	Kontrolle	66	♀	Herzinfarkt	18

6	Kontrolle	61	♂	Pankreaskarzinom	12 - 14
1	Zirrhose mit HE	36	♂	Leberzirrhose (Alkohol), TIPS	6
2	Zirrhose mit HE	57	♂	Leberzirrhose (Alkohol)	9
3	Zirrhose mit HE	57	♀	Leberzirrhose (Alkohol), TIPS	12
4	Zirrhose mit HE	61	♂	Leberzirrhose (Hepatitis C), hepatozelluläres Karzinom	< 24
5	Zirrhose mit HE	45	♀	Leberzirrhose (Alkohol), TIPS	17
6	Zirrhose mit HE	69	♂	Leberzirrhose (Alkohol)	< 12
7	Zirrhose mit HE	68	♂	Leberzirrhose (Hepatitis B)	< 12

Tabelle 11: Begleiterkrankungen bei Patienten mit Leberzirrhose mit hepatischer Enzephalopathie. (Quelle: Anatomische Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Deutschland)). Nach Görg *et al.* (2013a)

Fall	1	2	3	4	5	6	7
Spontane bakterielle Peritonitis				x			
Gastrointestinale Blutung				x			
Hepatorenales Syndrom	x	x			x	x	x
Hyponatriämie			x		x		
Hyperbilirubinämie	x	x		x	x		x
Koagulopathie	x	x	x	x	x	x	x
Hypoalbuminämie	x	x	x		x	x	x

Tabelle 12: Blutuntersuchungen bei Patienten mit Leberzirrhose mit hepatischer Enzephalopathie

Folgende laboratorische Parameter wurden am gleichen Tag (Fall 4) oder am Tag vor dem Tod (Fälle 1 – 3, 5, 7) gemessen. Referenzwerte für jeden Parameter sind in Klammern angegeben. Nach Görg *et al.* (2013a).

Fall	Natrium [135-145 mmol/l]	Urea [18-55 mg/dl]	Kreatinin [< 1,2 mg/dl]	Albumin [3,3 – 4,7 g/dl]	Bilirubin [< 1,0 mg/dl]	Leukozyten [4,0 – 11,0 * 1000/ μ l]	CRP [< 0,5 mg/dl]	Quick [70 – 130%]	Ammoniak [< 60 μ mol/l]
1	138	148	1,5	1,8	20	22,9	4,6	10	154
2	158	310	5,0	2,0	36,8	27,3	1,6	29	86
3	126	94	2,4	2,1	11,6	15,8	5,8	26	48
4	141	159	4,1	-	1,98	2,9	1,1	59	343
5	122	258	2,9	2,4	0,8	30	14,9	37	97
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	120	226	7,9	1,8	29	2,5	1	13	148

2.3. Experimentelle Behandlung kultivierter Rattenastrozyten

Für die in der Arbeit genannten Untersuchungen wurden kultivierte Rattenastrozyten für 48 bzw. 72 Std. wie nachfolgend behandelt:

- 5 mmol/l NH_4Cl
- 5 mmol/l NH_4Cl [30 Minuten Vorbehandlung mit 300 μ mol/l Apocynin]
- 5 mmol/l NH_4Cl [30 Minuten Vorbehandlung mit 3 mmol/l MSO]
- 5 mmol/l NH_4Cl [16 Stunden Vorbehandlung mit 5 mmol/l Taurin]
- 5 mmol/l NH_4Cl [30 Minuten Vorbehandlung mit 10 μ mol/l Zinn-Protoporphyrin IX (SnPP)]

Eine experimentell herbeigeführte Zellschwellung wurde durch hypoosmotisches Medium induziert. Hierfür wurde die NaCl-Ionen-Konzentration in normoosmolaren DMEM Zellkulturmedium ohne FCS durch Mischen mit NaCl-freiem DMEM auf 205 mosmol/l eingestellt.

Vor jedem Versuch wurden die Astrozyten mit DMEM Zellkulturmedium ohne FCS dreimalig gewaschen und wie oben beschrieben behandelt.

2.4. Transfektion von Astrozyten, SH-SY5Y- und MOG-G-CCM-Zellen mit miRNA-Inhibitoren und miRNA-Mimetika

Für die Transfektion wurden primäre Rattenastrozyten und humane SH-SY5Y- und MOG-G-CCM-Zellen verwendet, die in 60 mm Plastikzellkulturschalen, wie unter Abschnitt 2.1.3 beschrieben, kultiviert wurden. miRNA-Inhibitoren und miRNA-Mimetika wurden in Zellen transfiziert, die eine Konfluenz von 80-90% erreicht hatten.

miRNA-Inhibitoren für die miRNA-Spezies rno-miR-31a-5p, -221-3p, -221-5p, -222-3p, -326-3p, -365-3p (miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitors, Kat.Nr.: IH-HMR-„miRNA-Name“-0020) und miRNA-Mimetika für die miRNA-Spezies hsa-miR-138-2-3p, -152-3p, -339-5p, -455-5p, -486-5p (miRIDIAN microRNA Mimics, Kat.Nr.: C-HMR-„miRNA-Name“-0020) wurden von der Firma GE Dharmacon [Lafayette, CO, USA] bezogen. Es handelt sich hierbei um chemisch modifizierte, einzelsträngige RNA-Moleküle, die an den komplementären reifen miRNA-Strang binden und entweder die Funktion von miRNAs inhibieren oder imitieren können. Die chemische Modifikation erhöht die Stabilität der Verbindungen.

Für jede einzelne Transfektion wurden 20 µmol/l miRNA-Inhibitor bzw. miRNA-Mimetikum mit Opti-MEM zu einer Endkonzentration von 40 nmol/l verdünnt und in einem separaten Ansatz wurden 6 – 12 µl Lipofectamine mit Opti-MEM gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden beide Lösungen zusammengegeben und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor Transfektion wurden die Zellen einmal mit DMEM-Medium mit 10%igem FCS gewaschen. Anschließend wurden je Schale 100 µl Transfektionsansatz zugegeben und im Brutschrank inkubiert. Nach sechs Stunden Inkubation wurde das Transfektionsmedium abgenommen. Die Zellen wurden mit frischem DMEM-Medium mit FCS versetzt und je nach Versuchsvorhaben wurden die transfizierten Zellen entweder direkt für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert oder wie beschrieben experimentell behandelt.

2.5. Proliferationsmessung

Die Messung der Zellproliferation erfolgte durch fluorimetrische Bestimmung des DNA-Gehalts mittels eines Fluoreszenzreaders [Fluoroskan AscentTM FL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA]. Dabei wurde die DNA mit Hoechst34580 markiert.

Zur Messung der Proliferation wurden kultivierte Rattenastrozyten wie im Abschnitt 2.4 beschrieben transfiziert. Nach 6 Stunden Inkubation im Transfektionsmedium wurden die Zellen mit Zellkulturmedium gewaschen, trypsinisiert und auf eine 24-Well Platte ausgesät. Nachfolgend wurden

die Zellen für sechs Stunden im Brutschrank inkubiert und für weitere 48 Stunden entweder mit 10 $\mu\text{mol/l}$ HO-1-Inhibitor SnPP behandelt oder unbehandelt belassen.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden kultivierte Rattenastrozyten wie unter Abschnitt 2.3 beschrieben mit normo- oder hypoosmotischem Kulturmedium (205 mosmol/l) oder NH_4Cl , (5 mmol/l) mit oder ohne Vorbehandlung mit Taurin (5 mmol/l, 16 Std. Vorbehandlung) bzw. SnPP (10 $\mu\text{mol/l}$, 30 Min. Vorbehandlung) für weitere 72 Stunden behandelt, bevor der DNA-Gehalt fluorimetrisch bestimmt wurde.

Nach 48 bzw. 72 Stunden wurden die Zellen mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung für 5 Min. bei Raumtemperatur fixiert und nachfolgend dreimalig mit PBS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen. Zur Markierung der DNA wurden die Zellen für 15 Minuten mit Hoechst34580 (1:5000) bei 37 °C inkubiert. Nach erneuten Waschen mit PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} wurden die Zellen in einem Fluoreszenzreader [Fluoroskan Ascent™ FL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA] fluoreszenzspektroskopisch analysiert (Exzitation: 370 nm; Emission: 450 nm) und die relative DNA-Menge bestimmt. Jede experimentelle Bedingung wurde auf einem 24-Well dreifach bestimmt und daraus der Mittelwert gebildet. Von den erhaltenen Fluoreszenzintensitätswerten wurde die Hintergrundfluoreszenz (nicht mit Hoechst34580 gefärbte Zellen) subtrahiert.

2.6. Detektion von Proteinen im Western-Blot

Die Detektion von Proteinen im Western-Blot erfolgte unter Verwendung spezifischer Antikörper. Diese Antikörper wurde durch einen Sekundärantikörper, an den eine Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist, detektiert. Nach Zugabe eines Peroxidasesubstrats reagiert das gebildete Produkt mit Luminol, welches Licht an der Position auf dem Blot emittiert, an dem der Primärantikörper gebunden hat. Detektiert und dokumentiert wurde die Lichtemission digital unter Verwendung der Kodak Digital Image Station 4000 MM [Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA].

2.6.1. Proteinisolation

Zur Vermeidung unerwünschter Proteindegradation wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Zuerst wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und diese nachfolgend dreimal mit eiskaltem PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen. Die adhärenen Zelle wurden mit 300 μl RL-Puffer, mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Eppendorfgesäß überführt. Das erhaltene Lysat wurde

anschließend dreimalig für jeweils 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt, um den Zellaufschluss zu verbessern. Es folgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 4°C und 20 000 xg. Gelöste Proteine befanden sich im Überstand, welcher dann in ein neues Eppendorfggefäß überführt und bei -20°C gelagert wurde. Das Pellet wurde verworfen.

2.6.2. Western Blot

2.6.2.1. Antikörper für den Nachweis individueller Proteine

Alle Antikörper wurden mit dem in Tabelle 13 beschriebenen Verdünnungsfaktor in einer Lösung von 10%igem BSA und TBST eingesetzt.

Tabelle 13: Primär- und Sekundärantikörper für den Nachweis individueller Proteine im Western-Blot. mAb: monoklonaler Antikörper; pAb: polyklonaler Antikörper.

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Firma, Ort
EphB3, mAb	Maus	1:500	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HO-1, pAb	Kaninchen	1:1000	Assay Designs „Stressgen“, Ann Arbor, MI, USA
GAPDH, mAb	Maus	1:5000	Meridian Life Science, Cincinnati, OH, USA
Sekundärantikörper	Spezies	Verdünnung	Firma, Ort
Anti-Kaninchen HRPOD	Ziege	1:10 000	Dako, Hamburg, Deutschland
Anti-Maus HRPOD	Ziege	1:10 000	Bio-Rad, München, Deutschland

2.6.2.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe des Bradford-Assays durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine kolorimetrische Methode, die auf der Verschiebung des Coomassie®-Absorptionsmaximums von 470 nm nach 595 nm nach Proteinbindung in saurem Medium beruht. Durch die Anfärbbarkeit der basischen Seitenketten von Aminosäuren durch den Farbstoff Coomassie kann die Proteinkonzentration quantifiziert werden. Da die Farbreaktion abhängig vom Gehalt an aromatischen und basischen Aminosäuren ist, haben unterschiedliche Proteine unterschiedlich starke Absorptionen (Bradford, 1976). Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass die unterschiedliche Proteinzusammensetzung unterschiedlicher Proben aber keinen nennenswerten Effekt auf die Proteinquantifizierung hat.

Vor der Durchführung des Bradford-Assays wurde Bradford-Reagenz im Verhältnis mit 1:5 Aqua-Bidest verdünnt. Hiervon wurden 995 µl in jede Probenküvette für eine dreifache Bestimmung vorgelegt. In jede Probenküvette wurde anschließend 5 µl Proben zugegeben. Damit sich die Färbung homogen in der Lösung entwickelte, wurde das Probengemisch sanft gevortext. Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm. Jede Probe wurde im Triplikat gemessen.

2.6.2.3. Proteinisolation

Für die Beladung der Geltaschen wurden 70 - 100 µg Gesamtprotein verwendet. Zu den Proteinproben wurde SDS- und DTT-haltiger Auftragspuffer gegeben, um eine uniforme negative Ladung der unterschiedlichen Proteine herbeizuführen und Disulfidbrücken zu reduzieren. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben 3 - 5 Minuten bei 95°C im Thermoblock hitzebehandelt, um die Proteine aufzuspalten und zu linealisieren.

2.6.2.4. Herstellung von Elektrophoresegele

Abhängig von der Molekülgröße der Proteine wurden Trenngele mit unterschiedlichen Anteilen an Polyacrylamid (PAA) (8, 10 und 12% PAA-Anteil) hergestellt. Die Gelzusammensetzung ist in der Tab. 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Substanz	Trenngel [ml]			Sammelgel [ml]
	8%	10%	12%	
Bidest. H ₂ O	6,9	5,9	4,9	3,4
30% (w/v) PAA	4,0	5,0	6,0	0,83
1,5 mol/l Tris-Puffer (pH 8,8)	3,8	3,8	3,8	-
1,0 mol/l Tris-Puffer (pH 6,8)	-	-	-	0,63
10% (w/v) SDS	0,15	0,15	0,15	0,05

10% (w/v) APS	0,15	0,15	0,15	0,05
TEMED	0,009	0,006	0,006	0,005

2.6.2.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Alle Western-Blots wurden unter Verwendung diskontinuierlicher Gele durchgeführt, welche aus einem Trenn- und Sammelgel bestehen (Tab. 14). Beide Gele unterscheiden sich im Hinblick auf den pH-Wert, die Ionenstärke und den PAA-Anteil. Unter einer konstanten Spannung von 90 V wurden die Proben im Sammelgel konzentriert, bevor sie im Trenngel bei einer höheren Spannung von 140 V aufgetrennt wurden. Die durch das PAA-gebildeten Poren im Trenngel wirken ähnlich einem Sieb und ermöglichen eine Auftrennung der entfalteten und uniform-negativ geladenen Proteine nach dem Molekulargewicht. Mit Hilfe eines Proteinstandards [Dual Color, Bio-Rad, München, Deutschland] konnte die Proteingröße abgeschätzt werden.

2.6.2.6. Proteintransfer aus dem Gel auf eine Membran

Nach Auftrennen der Proteine im SDS-PAGE wurden die negativ geladenen Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die angelegte Stromstärke wurde dabei folgendermaßen berechnet:

$$\text{Stromstärke} = \text{Breite des Gels [cm]} * \text{Länge des Gels [cm]} * 0,8 \text{ mA}$$

Der Aufbau des Blots ist in Abb. 15 schematisch dargestellt. Die Dauer des Transfers wurde entsprechend der Größe des jeweilig untersuchten Proteins angepasst. Für die Detektion von EphB3, HO-1 und GAPDH erfolgte der Transfer für 2 Stunden. Der Transfererfolg wurde mit Hilfe von einer reversiblen Ponceau-Rot-Färbung geprüft.

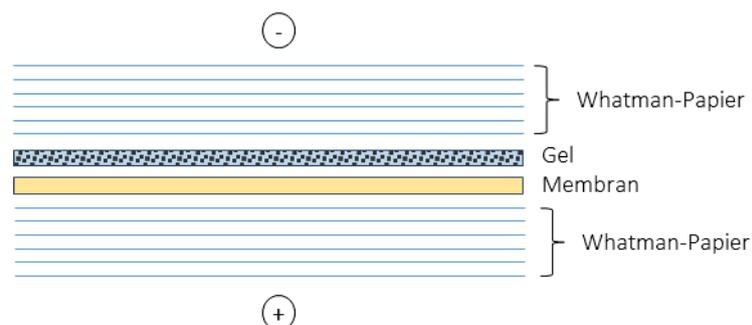


Abbildung 10: Schematischer Aufbau eines semi-dry Proteinblots. Das Proteingel (gemusterter Bereich) wurde auf eine Membran (gelb) gelegt und zwischen mehreren Lagen aus saugfähigem mit 1x

Blottingpuffer befeuchtetem Papier deponiert. Die Nitrozellulose-Membran wurde vorher in Wasser aktiviert und nachfolgend in 1x Blottingpuffer eingetaucht.

2.6.2.7. Immundetektion

Zunächst wurde die Membran mit einer Lösung aus 10%igem BSA und 1x TBST-Puffer für 15 - 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schwenken blockiert, um auf der Membran nicht abgesättigte Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran über Nacht bei 4°C mit dem in BSA/TBST-Lösung entsprechend verdünnten Primärantikörper, der an das gesuchte Protein spezifisch bindet. Danach wurde die Membran dreimalig für jeweils 10 Minuten mit TBST-Puffer gründlich gewaschen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einem in BSA/TBST-Lösung entsprechend verdünnten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 1x TBST zum Entfernen von überschüssigem, ungebundenem Antikörper. Der Nachweis der untersuchten Proteine erfolgte mit dem Western Lightning Plus ECL™ Kit. Hierbei wurde die ECL-Lösungen im Verhältnis von 1:1 gemischt und die Membran mit der Lösung inkubiert, bevor sie nachfolgend auf eine Kodak Digital Image Station 4000MM [Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA] aufgelegt und die Lichtemission digital visualisiert und dokumentiert wurde. Im Anschluss erfolgte eine Beladungskontrolle des Blotes durch Nachweis der GAPDH.

2.6.2.8. Densitometrische Quantifizierung

Die Intensität der detektierten Proteinbande wurde mit Hilfe der Auswertungssoftware Kodak Molecular Imaging (MI) Software (v.4.0.3) [Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA] densitometrisch bestimmt.

2.7. Quantifizierung von mRNA-Expressionspegel mittels Realtime-PCR

Das mRNA Expressionsniveau individueller Gene wurde mit Hilfe der Realtime-PCR quantifiziert.

2.7.1. Präparation von RNA

Für die Isolation von RNA aus Zellen oder Geweben wurde ein kommerzielles RNA-Isolationskit [Qiagen, Hilden, Deutschland] verwendet. Im Falle der Isolation von RNA aus Gewebe wurden Gewebestücke ≤ 30 mg mit 600 μ l Lysispuffers mit Zusatz von 1% β -Mercaptoethanol lysiert und mit

Hilfe eines Pistills homogenisiert. Das Gesamtlysat wurde anschließend für 2 Minuten bei 13 000 x g zentrifugiert und der Überstand auf eine Qia-Shredder Säule überführt. Mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits [Qiagen, Hilden, Deutschland] wurde die RNA nachfolgend entsprechend den Anweisungen des Herstellers isoliert.

Zur Isolation von RNA aus Zellen wurde das Astrozytenkulturmedium mittels eines Absauggeräts abgenommen. Die adhärennten Zellen wurden danach dreimalig mit PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen, um eventuell zurückgebliebene Mediumbestandteile oder Zellfragmente auszuspülen. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch Zugabe von 300 µl Lysispuffer eines kommerziellen RNA-Isolationskits [Qiagen, Hilden, Deutschland], welcher mit 1% β-Mercaptoethanol versetzt wurde. Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden abgelöst. Das Lysat wurde anschließend in ein RNase-freies Eppendorfgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C im Gefrierschrank gelagert. Die RNA wurde nachfolgend mit Hilfe eines kommerziellen Kits isoliert. Die Durchführung der RNA-Extraktion erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers des RNeasy® Mini Kits [Qiagen, Hilden, Deutschland]. Aufgereinigte RNA wurde mit 30 µl RNase-freiem Wasser aus der Säule eluiert.

2.7.2. Oligonukleotide

Die in der Realtime-PCR verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon [Ebersberg, Deutschland] synthetisiert und bezogen (Tab. 15).

Tabelle 15: In der Realtime-PCR verwendete Oligonukleotide.

Gene	Spezies	Primer 5' → 3'	
		Strang	Antistrang
ABCA5	Ratte	TGTCCAGTCTCTCTCACAGTCC	ATTCTTCAATGGCAAAAGTGTG
Adm2	Ratte	GTCTGGCAGCCTGGGTAAG	CGCTGGAAGGAATCTTGG
Arg2	Ratte	GTAGAGCTGTGTCAGGTGGCTA	GGCATGGCCACTAATGGTA
Arhgef2	Ratte	CGGATCGAATCCCTCACTC	TCTCCTTTTCCCGGTCTT
Artn	Ratte	AGAAGAGGGTGGGGAAACAG	CAGTGGGACAATGCAGTAGG
Creb3l1	Ratte	AGTGTCTACGCAGCCAGTCA	GCCTGCCCATCATCATA
Cth	Ratte	CGAAGACCTGGGTCAAGC	AGAAGGTCTGGCCCCTTG
Gadd45α ¹	Ratte	TCTGTTGCGAGAACGACATC	TGTGATGAATGTGGGTTCTGT
Galnt3	Ratte	GGATGGACGAGTACAAGGAAA	TCTTTTGAAGATCACCAAATGAT
Gfra3	Ratte	CCCGTTCTGTCTTTCTTCATC	CCAGCATTCTCTCCCATC
Gmcs	Ratte	GAAATACTACCGACCGACTGAAG	GTTTCCAGTTCAGTTTCTGCTG
Herpud1	Ratte	GAACCTTCTCCCTCTGGAT	CCTTGAAAGTCTGCTGGAC
HO-1	Ratte	CGGCCCTGGAAGAGGAGATAG	CGATGCTCGGGAAGGTGAAAA
Ifit2	Ratte	CACCGACACCACAAACAGTC	GTGGCATTGAGCTGCTGTA
Il6	Ratte	GCCAGAGTCATTGAGAGCAA	CATTGGAAGTTGGGGTAGGA

KCNJ3	Ratte	CAGTTCGAGGTGGTCGTCA	GAGCTTGACAAGTCATCCCTGT
Myc	Ratte	GCTCCTCGCGTTATTTGAAG	GCATCGTCGTGACTGTCCG
Nr4a1	Ratte	CATCTTCTTCCTCGTCCTCG	AACTGCTCAGTCCATACCCG
Serpine1 ²	Ratte	TCTGGGAAAGGGTTCACTTTACC	GACACGCCATAGGGGAGAGAAG
Sfrp4	Ratte	GCAACGTACCTGAGCAAAAAC	TCGACCACAGTTGTGACCTC
Shmt2	Ratte	GGTGAAGCGCAAGACTGC	GCCAAACGCTGACTTGTTTC
Slc1a4 ³	Ratte	ACGCGGGACAGATTTTCAC	ACACCCGCTGCTCCAAC
Slc1a5	Ratte	TCCTCTTTACCCGCAAAAAC	CCACACCATTCTTCTCCTCTAC
Slc6a9	Ratte	CTCTCACACTGCTTCCCATC	TCATCCCCACCTCATCCAC
Tlcd1	Ratte	ATCTGGGATCTGGGCTCTG	GCAAATAGCCACAAACTGACC
Wars	Ratte	GCAAAATTGACAAGGAGCTGA	TTCATAGGCATCCAGAATTTGA
Yars	Ratte	CCCAGTTTGGCGGTATTG	GCCAAGTGTGGGGAGATACT
HPRT	Ratte	TGCTCGAGATGTCATGAAGGA	CAGAGGGCCACAATGTGATG
CCKBR ⁴	Human	AGCAGTGTGGGCAACCTCAG	GATTCTAATGGCCAGCTCCAAT
CORT	Human	CCACAAGATGCCATTGTCC	CAGGAGGCTGCTTTTCCTTA
CXCL12	Human	TGCCAGAGCCAACGTCAAG	CAGCCGGGTACAATCTGAA
EphA3	Human	CCATGGACTGCCAGCTGCC	CCTTGGGCTGCACTGGTGA
EphB3	Human	CGCTCAGTCTGGCATGTCA	CATCCAGCCAATCACCAACTG
ERBB4 ⁵	Human	GGCTGCTGAGTTTTCAAGGATG	GCTTCATACGATCATCACCTGA
FABP3 ⁶	Human	CACTCACCCACGGCACTGCA	TCCCGGTCACTGGCACCTGA
Homer1 ⁷	Human	GCCAAGGGCTGAACCAACTC	TGTTTCACATTGGCAGTGGACTC
KCNQ2 ⁸	Human	GGCTTCAGCATCTCCAGT	GACTCTCCCTCCGCAATGTA
Lin28b ⁹	Human	TGCACTTCAACTCTCCCTCG	GAAGTGAAGGCCCTTTTTG
MCHR1 ¹⁰	Human	GGCTGGATGGACCTGGAA	GCGAAGATGACCGTGGAG
MMP3 ¹¹	Human	GAGGCATCCACACCCTAGGTT	TCAGAAATGGCTGCATCGATT
PARG	Human	GAAAGGGACGACTGGCAGCGG	CCAAAGGCACCACAGCCCCA
PPM1E ¹²	Human	AACATGCGCAGGAAAATGGA	TGGCCATCAAACACTGCAAA
PTPRR ¹³	Human	CATGCTGGATGTAGAAGAAGACA	AACACCCTGTTCTACCTATTCTG
Ras-GRF1 ¹⁴	Human	GCCACCAATCGTGTCTTGAA	CAAAGTCTGAGAGTGCTTGGA
HPRT	Human	TGCTGAGGATTTGGAAAGGGT	CTCGAGCAAGACGTTTCAGTCC

(¹Ozawa *et al.*, 2011; ²Wang *et al.*, 2014; ³Jeong *et al.*, 2011; ⁴Jamali *et al.*, 2006; ⁵Duhem-Tonnelle *et al.*, 2010; ⁶Dubé *et al.*, 2012; ⁷Fujihara *et al.*, 2010; ⁸Su *et al.*, 2011; ⁹Jeong *et al.*, 2009; ¹⁰Pissios *et al.*, 2007; ¹¹van Beuningen *et al.*, 2014; ¹²Tang *et al.*, 2011; ¹³Su *et al.*, 2013; ¹⁴Tarnowski *et al.*, 2012)

2.7.3. RNA-Qualitätsanalyse

Die Konzentration und die Reinheit der RNA Proben wurden zunächst mit Hilfe eines Nanodrop-Geräts ermittelt. Anschließend erfolgte eine Überprüfung der RNA-Integrität mittels Agilent 2100 Bioanalyzer.

2.7.3.1 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von RNA Präparationen

Im Falle der Nanodrop-Messung wurde die Konzentration und die Reinheit der RNA durch Erfassung der Absorption bei den Wellenlängen A_{260} , A_{280} und A_{230} gemessen. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm und das von Proteinen bei 280 nm. Bei einer reinen, nicht mit Proteinen verunreinigten Nukleinsäure ist ein Verhältnis von $A_{260}/A_{280} = 1,9 - 2,1$ zu erwarten. Das Verhältnis von A_{260} zu A_{230} liegt im Idealfall bei 2,0 - 2,2 und kann als Indikator für eine Verunreinigung mit EDTA, Kohlenhydraten, Phenol oder TRIzol-Reagenz interpretiert werden (Qiagen, 2015).

2.7.3.2. Bestimmung der RNA-Integrität

Die Überprüfung der Integrität der RNA wurde mit Hilfe eines Bioanalyzers 2100 [Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland] ermittelt. Der Bioanalyzer ermöglicht eine sensitive und zuverlässige Kontrolle der RNA-Qualität und ordnet den einzelnen Proben einen RNA-Integritätswert zu (RIN). Der Skalenbereich des RIN-Werts liegt von 1 bis 10 und wird durch Bestimmung des Verhältnisses zwischen den ribosomalen Untereinheiten 28S- und 18S-rRNA ermittelt. Je höher der RIN-Wert ist, umso höher ist die RNA-Qualität (Fleige & Pfaffl, 2007).

2.7.4. *cDNA Synthese*

Die cDNA wurde mit dem kommerziellen Kit Quantitect[®] Reverse Transcription [Qiagen, Hilden, Deutschland] synthetisiert. Zuerst wurde mit Hilfe der durch Nanodrop ermittelten RNA-Konzentrationen das Probenvolumen zum Erreichen der gewünschten RNA-Menge von 1 µg berechnet. Die Probe wurde dann mit RNase-freiem Wasser bis auf 12 µl aufgefüllt. Zusätzlich wurde zu jeder Probe 2 µl 7x gDNA Wipeout-Puffer zum Verdau genomischer DNA gegeben. Nachfolgend wurden die Proben für 2 Minuten bei 42°C in einem Thermoblock inkubiert. Die Probe wurde anschließend mit 6 µl Reverse-Transkription-Mastermix (1 µl Reverse-Transkriptase (RT), 4 µl RT-Puffer und 1 µl RT-Primer-Mix) gemischt und für 15 Minuten bei 42 °C inkubiert. Die für die reverse-Transkription benötigte Enzymmischung beinhaltet die Quantiscript-RT-Mischung (Omniscript- und Sensiscript Reverse-Transkriptase) und einen RNase-Inhibitor. Der RT-Puffer war fünffach konzentriert und mit dem Realtime-PCR-Puffer kompatibel. Die RT-Primer-Mischung setzt sich aus vier Desoxynucleotidtriphosphaten (dNTPs) dATP, dTTP, dCTP und dGTP und einem universalen Oligonukleotid zusammen, welches eine cDNA-Synthese von allen Regionen der RNA-Transkripte (auch von der 5'-Region) ermöglicht (Qiagen, 2009). Um das Enzym Reverse-Transkriptase zu

inaktivieren erfolgte eine weitere Inkubation der Proben für 3 Minuten bei 95 °C. Die erhaltene cDNA wurde auf eine Konzentration von 10 ng/μl eingestellt. Als negative Kontrolle wurde eine Probe mit Reverse-Transkriptionsansatz ohne Reverse-Transkriptase verwendet, die Aufschluss darüber geben kann, ob eine Kontamination mit genomischer DNA vorliegt.

2.7.5. Quantitative Realtime-PCR

Die in Tab. 16 aufgeführten Primerpaare (Stock: 100 pmol/μl) wurden mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 10 pmol/μl eingestellt. Als Referenzgen sind all die Gene geeignet, die in konstanter Menge in Zellen und Geweben exprimiert werden (Kessler & Engels, 2012). Das Gen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) repräsentiert eine der stabilsten endogenen Kontrollen und diente aus diesem Grund in diesen Untersuchungen als endogene Referenz (Gubern *et al.*, 2009). Dagegen dienten unbehandelte Zellen als Kalibrator für die einzelnen experimentellen Behandlungen. Die Quantifizierung der mRNAs erfolgte mittels GoTaq®qPCR Master Mix [Promega, Mannheim, Deutschland], der BRYT-Green-Farbstoff, GoTaq® Hot Start-Polymerase und optimierte Puffer beinhaltet, in einem 7500 Realtime-PCR System.

Der BRYT-Green-Farbstoff lagert sich während des amplifizierenden Prozess der PCR in die kleine Furche des DNA-Doppelstrangs und emittiert grünes Licht bei Exposition mit einer Wellenlänge von 494 nm.

Jede PCR-Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25 μl, welche 12,5 μl 2x BRYT-Green-Mastermix, 1 μl von je 10 pM Strang- und Antistrang-Primer, 1,2 μl cDNA und 9,3 μl RNase-freiem Wasser beinhaltete. Die Reaktionen wurden vorbereitet und zum Schluss in ein FrameStar® 96-well Platte aufgetragen und durch eine Abdeck-Klebefolie abgedeckt. Der Ablauf der Realtime-PCR ist in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 16) dargestellt.

Tabelle 16: Schema zum Ablauf einer Realtime-PCR.

Schritt	Temperatur	Inkubationszeit (min.)	Wiederholung
Reverse Transkription	50°C	2	-
Aktivierung der AmpliTaq Gold	95°C	10	-
Denaturierung	95°C	0:15	40
Hybridisierung und Verlängerung	60°C	1	
Dissoziation	95°C	0:15	-

	60°C	1	-
	95°C	0:15	-
	60°C	0:15	-

Jedes Produkt zeigte eine exponentielle Amplifikation, die in eine Sättigung übergeht. Das Plateau entsteht dadurch, dass im Laufe der Reaktion immer mehr Produktfragmente miteinander hybridisieren und so die PCR hemmen. Das Fluoreszenzsignal jeder Reaktion wurde gegen die Anzahl der Zyklen in einer Schmelzkurve aufgetragen. Die Fluoreszenz nahm dabei proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Der C_t -Wert ist der Zyklus, in dem die Reporterfluoreszenz zum ersten Mal die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Die relative Quantifizierung der Transkriptionsrate erfolgte mit Hilfe der vergleichenden C_t -Methode ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Formel nach Pfaffl (2004):

$$\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ Behandlung} - \Delta C_t \text{ Kontrolle (ohne Behandlung)}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

2.8. miRNA Expressionsanalyse

Die spezifische Analyse der Expression individueller miRNA-Spezies erfordert die Beachtung der nachfolgend genannten Eigenschaften von miRNAs:

1. Die Vorlage (Template) zur Synthese eines neuen miRNA-Strangs wird in der Länge limitiert, da reife miRNAs kurz sind und nur aus ca. 22 Nukleotiden bestehen.
2. Reife miRNAs besitzen keine uniformen Sequenzmerkmale (z.B. Poly(A)).
3. Die Sequenzen von reifen miRNA-Spezies sind sowohl in pre- (precursor) als auch in pri- (primäre) miRNAs vorhanden.
4. miRNAs innerhalb einer miRNA-Familie (z.B. let-7) unterscheiden sich oft nur durch ein einziges Nukleotid.
5. Der GC-Gehalt von miRNAs ist heterogen und bewirkt dadurch eine große Variabilität bei den Schmelztemperaturen (T_m).

In den Untersuchungen der vorliegenden Dissertation wurden miRNA-Expressionsänderungen in kultivierten Rattenastrozyten und in humanen *post mortem* Hirnproben mit einem Agilent Microarray-Verfahren (siehe 2.10.2.) und einer miRNA-spezifischen quantitativen Realtime-PCR-Methode (miQPCR) (siehe 2.8.4.) untersucht.

2.8.1. miRNA-Isolation

miRNA wurde aus Zellen oder Geweben mit dem *mirVana* miRNA Isolationskit der Firma Ambion Life Technologies extrahiert. Die *mirVana* miRNA Isolation erfolgte anhand eines kombinierten Verfahrens von organischer Extraktion und Festphasenextraktion. Dieses Extraktions-verfahren ermöglichte die gleichzeitige Isolation von rRNA, mRNA aber auch RNA-Spezies, die aus nur wenigen Basen bestehen. Die Konzentrationsbestimmung und Qualitätsanalyse erfolgten mittels Nanodrop (siehe 2.7.3.1.) und Agilent 2100 Bioanalyzer (siehe 2.7.3.2.).

Für die Isolation von miRNAs aus Geweben wurden pro 1 mg Gewebe 100 µl *mirVana* Lysis/Binding-Puffer dazugegeben. Dann wurde das Gewebe mit einem Pistill homogenisiert. Die Isolation von miRNAs aus kultivierten Zellen erfolgte nach Entfernung des Zellkulturmediums und dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}). Die adhärenen Zellen wurden anschließend nach Zugabe von *mirVana* Lysis/Binding-Puffer (300 µl/60 mm Zellkulturschale) mit einem Zellschaber aufgeschlossen und das erhaltene Lysat in einem Eppendorfgesäß gesammelt. Nachfolgend wurde zur Stabilisierung der RNA und zur Inaktivierung von RNAsen miRNA-Homogenate-Additive in das Lysat gegeben. Nach 10 minütiger Inkubation der Proben auf Eis wurde die RNA von DNA und Proteinen und anderen zellulären Bestandteilen durch Extraktion mittels Phenol/Chloroform (1:1) getrennt. Hierfür wurde das Gemisch aus Phenol/Chloroform und Probe bei 10 000 x g für 5 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. In der nachfolgend erhaltenen zweiphasigen Emulsion befand sich die RNA in der oberen wässrigen Phase, die DNA an der Phasengrenze und die Proteine in der unteren organischen Phase. Die in der wässrigen Phase gelöste RNA wurde nachfolgend vorsichtig in ein neues Eppendorfgesäß überführt.

Für die nachfolgende Isolation von Gesamt-RNA wurde die so erhaltene Probe mit dem 1,25-fachen des Probenvolumens an Ethanol versetzt und dieses über eine Säule mit einem Glasfaserfilter gegeben. Die auf dem Glasfilter immobilisierte RNA wurde entsprechend den Vorschriften des Herstellers mehrmals mit Waschpuffer gewaschen und die aufgereinigte RNA wurde anschließend mit einer im Kit enthaltenen Pufferlösung eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.8.2. cDNA Synthese

Für die Synthese von cDNA aus miRNAs wurde ein RNA/DNA-Adapter (sog. miLINKER) an den miRNA-Strang angehängt. Hierdurch wird es möglich die verschiedenen miRNA-Spezies unter Verwendung eines universellen Primers in cDNA umzuschreiben (Castoldi *et al.*, 2011). Hierfür wurden 10 ng Gesamt-RNA mit 15 µM miLINKER (pp (r) A. GGCCGAACCTACGACCTGCATAAACGG.ddC) (Benes *et*

al., 2015) mit Hilfe des Enzyms T4 RNA-Ligase (NEB, 200 U/μl) ligiert. Der RNA/DNA-Linker-Adapter ist mit einer universellen Primer-Bindesequenz ausgestattet, so dass nachfolgend die elongierten miRNAs mit Hilfe eines universellen Primers (CCCAGTTATGGCCGTTTATGCAGGT) (Benes *et al.*, 2015) unter Verwendung von Primescript (Takara, 200 U/μl) nach Angaben des Herstellers [Takara Clontech, Mountain View, CA, USA] umgeschrieben werden können. Die hier verwendete T4 RNA Ligase ermöglicht spezifische, sensitive und effektive reverse Transkription von miRNAs. Gegenüber der Polyadenylierungsmethode hat die Primer-Ligationsmethode den Vorteil, dass die T4 RNA Ligase kurze einzelsträngige RNA als Substrat bevorzugt. Zudem beinhaltet der Linker-Adapter eine universelle Primer-Bindesequenz, die es ermöglicht miRNA-spezifische Primer flexibel zu konstruieren. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler nach folgendem Temperaturprogramm: 25°C *hold*, 25°C für 30 Min., 10°C *hold*, 85°C für 2 Min., 46°C *hold*, 46°C für 30 Min., 85°C für 3 Min. und 10°C *hold*.

2.8.3. Design miRNA-spezifischer Primer

Eine spezifische und sensitive Detektion individueller miRNA-Spezies mittels der quantitativen miQPCR ist in hohem Maße vom Primerdesign abhängig. Ein hierbei limitierender Faktor ist die Heterogenität des GC-Gehalts individueller miRNA-Spezies, der Einfluss auf die Ablösung der gebildeten Doppelstränge bzw. auf die dabei erforderlichen Schmelztemperaturen (*T_m*-Wert) nimmt. Zur Erhöhung der Spezifität und zur Verbesserung der PCR-Effizienz wurde für das Primerdesign die miRBase-Datenbank zur Analyse des GC-Gehalts und nah-verwandter miRNA-Familien verwendet. Der *T_m*-Wert des jeweiligen Kandidaten-Primers wurde mit *T_m*-Calculator [Applied Biosystem, Darmstadt, Deutschland] ermittelt. Ein zu hoher *T_m*-Wert (> 65°C) vermindert die Spezifität, während ein zu niedrigerer *T_m*-Wert (< 55°C) die Sensitivität des Primers erniedrigt (Benes & Castoldi, 2010). In dem Fall, dass aufgrund der miRNA-Sequenz kein Primer konstruiert werden konnte, der beide Kriterien voll erfüllt, wurde die Priorität beim Primerdesign auf die Spezifität gelegt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer (Tab. 17) wiesen eine Schmelztemperatur zwischen 52°C - 57°C auf und wurden über die Firma Eurofins MWG Operon bezogen.

Tabelle 17: Oligonukleotid-Primer für die Quantifizierung individueller miRNA-Spezies mittels Realtime-PCR (miQPCR).

miRNA Spezies	Sequenz 5'→3'	<i>T_m</i> (°C)
rno-miR-221-5P	GGCATAACAATGTAGATTTTCG	51,80
rno-miR-222-3P	CTACATCTGGCTACTGGGTG	54,24
rno-miR-135a-5p	TGGCTTTTTATTCTATGTGAG	54,81
rno-miR-26a-5p	AAGTAATCCAGGATAGGCTG	52,11
rno-miR-425-5p	CGATCACTCCCGTTGAG	54,12

rno-miR-30e-5p	AACATCCTTGACTGGAAGG	53,40
rno-miR-652-3p	CGCCACTAGGGTTGTGG	56,90
rno-miR-135b-5p	GGCTTTTCATTCTATGTGAG	55,00
rno-miR-31a-5p	GATGCTGGCATAGCTGG	54,47
rno-miR-125a-5p	TGAGACCCTTTAACCTGTGAG	55,41
rno-miR-193-3p	GCCTACAAAGTCCCAGTG	52,31
rno-miR-221-3p	TTGTCTGCTGGGTTTCG	54,91
rno-miR-30b-5p	TAAACATCCTACACTCAGCTG	51,63
rno-miR-326-3P	GGCCCTTCCTCCAGTG	55,70
rno-miR-145-5P	TTCCCAGGAATCCCTG	53,19
rno-miR-365-3p	GCCCCTAAAAATCCTTATG	52,52
hsa-miR-16-2-3p	TTACTGTGCTGCTTTAGGGG	56,58
hsa-miR-23c	ATTGCCAGTGATTACCCG	55,29
hsa-miR-138-2-3p	TCACGACACCAGGGTTG	55,45
hsa-miR-152-3p	ACAGAACTTGGGGGGG	54,84
hsa-miR-339-5P	CAGGAGCTCACGGGG	55,10
hsa-miR-346	GCATGCCTGCCTCTG	53,44
hsa-miR-455-3P	GTCCATGGGCATATACACG	55,61
hsa-miR-455-5p ¹	TGCCTTTGGACTACATCGG	58,08
hsa-miR-486-5p	GAGCTGCCCCGAGG	55,18
hsa-miR-1225-3p	GTGCCGCCCCGAGG	61,74
hsa-miR-1306-5p	CCCTGCAAACGTCCAG	55,22
hsa-miR-4324	GAGACCCTAACCTTAAGGGG	55,34
hsa-miR-4454	CGAGTCACGGCACCAG	56,40
Universalprimer ¹	CCCAGTTATGGCCGTTTA	55,47

(¹Benes et al., 2015)

2.8.4. miQPCR

Das Prinzip der miRNA-spezifischen quantitativen Realtime-PCR (miQPCR) basiert auf der Detektion eines fluoreszierenden Reportermoleküls, dessen Signalintensität mit der Menge der in jedem PCR-Amplifikationszyklus vorhandenen DNA korreliert (Nolan *et al.*, 2006). Die Quantifizierung erfolgte in diesen Untersuchungen mit dem mit doppelsträngiger DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff BRYT-Green von Promega [Mannheim, Deutschland], der nach Bindung an doppelsträngige DNA Fluoreszenz nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 494 nm emittiert.

Jede miQPCR-Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl, welche sich aus 10 µl BRYT-Green-Mastermix, 0,5 µmol/l des jeweiligen miRNA-spezifischen Primers, 0,5 µmol/l des Universalprimers, 7,94 µl RNase-freies Wasser und 2 µl cDNA (100 pg) zusammensetzt. Die Amplifikation erfolgte in eine FrameStar® 96-well Platte unter Verwendung des ViiA™ 7 Thermocyclers [Applied Biosystems, Foster City, CA, USA]. Der Ablauf der Amplifikation der miQPCR ist in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 18) aufgeführt.

Tabelle 18: Übersicht zum Amplifikationszyklus der miQPCR.

Schritt	Temperatur	Inkubationszeit (Min.)	Wiederholung
Aktivierung der „Hot-Start“ Taq DNA-Polymerase	95°C	10	-
Denaturierung	95°C	0:15	50
Hybridisierung und Verlängerung	60°C	0:35	
Dissoziation	95°C	0:15	-
	60°C	1	-
	95°C	0:15	-
	60°C	0:15	-

Zur Quantifizierung wurden die durch miQPCR-ermittelten C_t -Werte für die individuellen miRNA-Spezies mittels der qBase Software (Version 1.3.5.) (Hellemans *et al.*, 2007) Median-normalisiert und die relativen Expressionsänderungen quantifiziert.

2.9. miRNA-Datenbanken

Die für das Primerdesign erforderlichen Informationen und bioinformatischen Tools wurden aus Datenbanken bezogen, die über das World-Wide-Web zugänglich und international-anerkannt sind. Die jeweiligen miRNA-Sequenzen stammen aus www.mirbase.org (v21) (Griffiths-Jones *et al.*, 2006). Die Schmelztemperaturen miRNA-spezifischer Primer wurde mittels des bioinformatischen Tools *Tm*-Calculator [Applied Biosystems, <http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/index.cfm>] ermittelt. Primer für die mRNA-Amplifikation wurden mit Hilfe eines online-Analyzers <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer> auf potentielle Bildung von Sekundärstrukturen und Oligonukleotiddimeren und -duplexen kontrolliert. Das Tool miRWalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>) wurde für die Vorhersage potentieller miRNA-Zielgene verwendet. Überschneidungen zwischen verschiedener Genlisten wurden mit dem bioinformatischem Tool Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) kalkuliert. Im Genarray identifizierte Expressionsänderungen wurden mit Hilfe der Software AltAnalyze im Hinblick auf hierdurch beeinflusste biologische Funktionen und Signalwege untersucht und zur Vorhersage potentieller, den Genexpressionsänderungen zugrundeliegenden, miRNA-Expressionsänderungen verwendet.

2.10. Microarray-Analyse

2.10.1. Transkriptomanalyse

2.10.1.1. Agilent™ Whole Human Genome Oligo Microarray

Die Bestimmung von Genexpressionsänderungen in humanen *post mortem* Hirnproben erfolgte durch Array-basierte Transkriptomanalyse mit dem Agilent™ Whole Human Genome Oligo Microarray. Hierfür wurde RNA aus *post mortem* Hirnproben isoliert und die Qualität der Proben mit dem Bioanalyzer verifiziert, bevor die Proben an die Firma Miltenyi-Biotech [Bergisch-Gladbach, Deutschland] zur erneuten Qualitätsüberprüfung und Durchführung der Array-Analyse übergeben wurden. Zur Amplifizierung und Markierung der RNA mit Cy3 wurden 100 ng Gesamt-RNA mit Hilfe des kommerziellen Kits Low Input Quick Amp Labeling [Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland] nach dem Protokoll des Herstellers prozessiert. Vor der Hybridisierung wurde eine Konzentrationsbestimmung Cy3-markierter cRNA mittels ND-1000 Spectrophotometer [Nanodrop Technologies, Wilmington, USA] durchgeführt und eine gleichmäßige Markierungseffizienz in den unterschiedlichen Proben sichergestellt. Die Hybridisierung erfolgte mittels des Agilent Gene Expression Hybridization Kits entsprechend dem Herstellerprotokoll [Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland]. Die Cy3-markierte cRNA wurde auf Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays 8x60K für 17 Stunden hybridisiert und die Cy3-Fluoreszenzintensität mit einem Agilent Microarray Scanner System [Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland] erfasst und nachfolgend mit der Agilent Feature Extraction Software [Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland] analysiert. Die quantifizierte Fluoreszenzintensität der Proben wurde durch Rosetta Resolver Software (Rosetta, Inpharmatics, LLC) aus dem Feature Extraktion Output Files der Array (Agilent Technologies, Inc) extrahiert. Nach Hintergrundkorrektur erfolgte eine Quantil-Normalisierung (Bolstad *et al.*, 2003) (sog. RMA, Robust Microarray-Analyse) der Gesamt-Fluoreszenzintensität zwischen den mit den einzelnen Proben durchgeführten Arrays, um ausschließen zu können, dass die ermittelten Expressionsunterschiede auf unterschiedliche Hybridisierungseffizienzen beruhen. Alle Gene mit einer $\geq 1,5$ -fachen Expressionsveränderung gegenüber Kontrollen und einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$ wurden als signifikant unterschiedlich exprimiert erfasst.

2.10.1.2. Affymetrix GeneChip Rat Genome Array

Rattenastrozyten aus drei unterschiedliche Präparationen blieben jeweils unbehandelt (48 Std.) oder wurden mit NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) behandelt und die erhaltenen Proben auf

Genexpressions-änderungen mittels dem Affymetrix GeneChip 1.0 Rat Gene ST Array [Affymetrix, Santa Clara, CA, USA] überprüft. Hierfür wurde RNA aus kultivierten Rattenastrozyten isoliert und die Qualität der Proben mit dem Bioanalyzer verifiziert, bevor die Proben an die Firma EMBL [Heidelberg, Deutschland] zur erneuten Qualitätsüberprüfung und Durchführung der Array-Analyse übergeben wurden. Die cDNA-Synthese und Markierung der Proben erfolgte nach Herstellerprotokoll [Affymetrix, Santa Clara, CA, USA]. Die Hybridisierung der Proben auf dem Array erfolgte mittels SciGene 777 Microarray-Ofen (50 rpm, 45°C, 16 Std.). Gewaschen wurden die Proben mit dem Affymetrix GeneChip 450 Waschgerät. Die Fluoreszenzsignalintensitäten wurden mit Hilfe des Affymetrix GeneChip Scanner GCS3000 Systems erfasst. Mittels AltAnalyze-Software (v.2.0.8.1., Emig *et al.*, 2010) wurden die aus den Affymetrix Array erhaltenen Daten analysiert. Dabei wurden alle Gene erfasst, die mehr als zweifach gegenüber der Kontrolle bei einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$ verändert exprimiert waren.

2.10.2. Array-basierte miRNA-Expressionsanalyse

Drei unterschiedliche Präparationen von unbehandelten (48 Std.) oder mit NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.)-behandelten kultivierten Rattenastrozyten und jeweils vier *post mortem* Hirnproben von Kontrollpatienten und Leberzirrhosepatienten mit oder ohne HE wurde auf einem Agilent Rat bzw. Human miRNA Microarray hybridisiert. Vor der Hybridisierung wurde eine Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA und eine Qualitätskontrolle der RNA mittels Agilent Bioanalyzer und Qubit RNA [Invitrogen, Darmstadt, Deutschland] durchgeführt. Die Fluoreszenzmarkierung (Cy3) der cDNA wurde mit dem Agilent miRNA Labeling Kit entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt [Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland]. Anders als im Protokoll wurde DMSO in diesen Untersuchungen nicht über eine Säule gereinigt und die Proben wurden nach der Markierung unter Verwendung einer Speedvac aufkonzentriert. Die Hybridisierungsprozedur erfolgte unter Verwendung des Agilent miRNA Hyb Kits. Dabei wurden 200 ng RNA-Proben auf einen Rat bzw. Human Agilent miRNA v19 8 x 60k Microarray gegeben. Nach einer 20-stündigen Hybridisierung wurden die Proben mit Hilfe des Agilent DNA High-Resolution Scanners gescannt. Die daraus gewonnenen Microarray-Daten wurden mit Hilfe der Feature Extraction 10.7.3.1. nach Median-normalisierung extrahiert. Mit Hilfe des bioinformatischen Tools TMeV (Saeed *et al.*, 2003) wurden initiale Cluster ungepaarter Proben gebildet. Da die miRNA Expressionsänderungen zwischen unbehandelten und mit NH_4Cl -behandelten Astrozyten der jeweiligen Präparation größer als die Unterschiede zwischen den entsprechenden biologischen Replikaten waren, wurden miRNA-Expressionsänderungen basierend auf den gepaarten Proben (unbehandelt vs. NH_4Cl -behandelt) der einzelnen Präparationen ermittelt.

2.11. Statistik

Jeder Versuch wurde mit mindestens drei unabhängigen Astrozytenzellpräparationen oder Aussaaten der SH-SY5Y bzw. MOG-G-CCM-Zelllinien wiederholt. Die erhaltenen Daten sind als Mittelwert aus n-Präparationen \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Signifikanzen wurden mit Hilfe eines zweiseitigen t-Tests nach Student oder einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von Tukey's-*post-hoc*-Test ermittelt [Microsoft Excel für Windows, Microsoft, Redmond, WA, USA; GraphPad Prism, GraphPad, La Jolla, CA, USA]. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit α von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikantes Ergebnis angenommen. Dargestellt sind die erhaltenen Ergebnisse unter Verwendung von Microsoft-Office Excel [Microsoft, Redmond, WA, USA].

III. Ergebnisse

1. Analyse durch Ammoniak induzierter miRNA Expressionsänderungen in kultivierten Rattenastrozyten

1.1. Identifizierung von miRNA- und Genexpressionsänderungen in kultivierten Rattenastrozyten

Mit Hilfe der Microarray-Technologie wurden in der vorliegenden Arbeit durch Ammoniak-induzierte miRNA- (Agilent) und Genexpressionsänderungen (Affymetrix) in Rattenastrozyten *in vitro* untersucht.

Wie in Abbildung 11A und 12A gezeigt, waren 43 von 336 der auf dem Array-vertretenen miRNA-Spezies 48 Stunden nach Behandlung der Astrozyten mit NH_4Cl (5 mmol/l) gegenüber den unbehandelten Kontrollen verringert exprimiert. Keine der im Array detektierbaren miRNA-Spezies war in den mit NH_4Cl (5 mmol/l)-behandelten Astrozyten gegenüber den unbehandelten Kontrollen erhöht exprimiert.

Die Genexpressionsanalyse identifizierte unter 22311 auf dem Chip-repräsentierten Transkripten 216 Gene, die in mit NH_4Cl (5 mmol/l)-behandelten Astrozyten bei einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$ mehr als zweifach verändert exprimiert waren (Abb. 11B, 12B). Von diesen nach Behandlung mit NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) verändert exprimierten Genen, waren 142 erhöht und 74 verringert exprimiert (Abb. 11B, 12B).

1.2. Validierung im Array identifizierter Genexpressionsänderungen in mit Ammoniak-behandelten kultivierten Rattenastrozyten

Die im Array gefundenen Genexpressionsänderungen in NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.)-behandelten Astrozyten wurden mittels quantitativer Realtime-PCR validiert. Hierfür wurden 26 Gene selektiert. Wie in Abbildung 13 gezeigt ist, war die im Array gefundene Expressionssteigerung der selektierten Gene auch durch Realtime-PCR Analyse nachweisbar. Die relativen Expressionsunterschiede zwischen den Kontrollen und NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.)-behandelten Astrozyten differierten jedoch teilweise zwischen den beiden Techniken (Abb. 13). Mit Hilfe des bioinformatischen Tools „AltAnalyse“ wurden potentielle biologische Funktionen und Signalwege der verändert exprimierten Gene ermittelt und potentielle ,den Genexpressionsänderungen zugrundeliegenden, miRNA-Expressionsänderungen vorhergesagt. Abbildung 14A zeigt, dass die

Behandlung kultivierter Astrozyten mit NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) die Expression einer Vielzahl von Genen moduliert, die im Zusammenhang mit der Proteinprozessierung und Funktion des endoplasmatischen Retikulums (z.B. *Herpud1*, *DNAJc3*, *DNAJb1*) stehen. Abbildung 14B zeigt, dass die Behandlung mit NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) die Expression von Genen steigert, die bei der Steuerung des Zellzyklus (z.B. *GADD45 α*) und dem p53-Signalweg eine wichtige Rolle spielen. Wie in Abb. 14C gezeigt ist, weisen die Genexpressionsänderungen in mit NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.)-behandelten Astrozyten auf eine veränderte Expression unterschiedlicher miRNA-Spezies hin (z.B. miR-328).

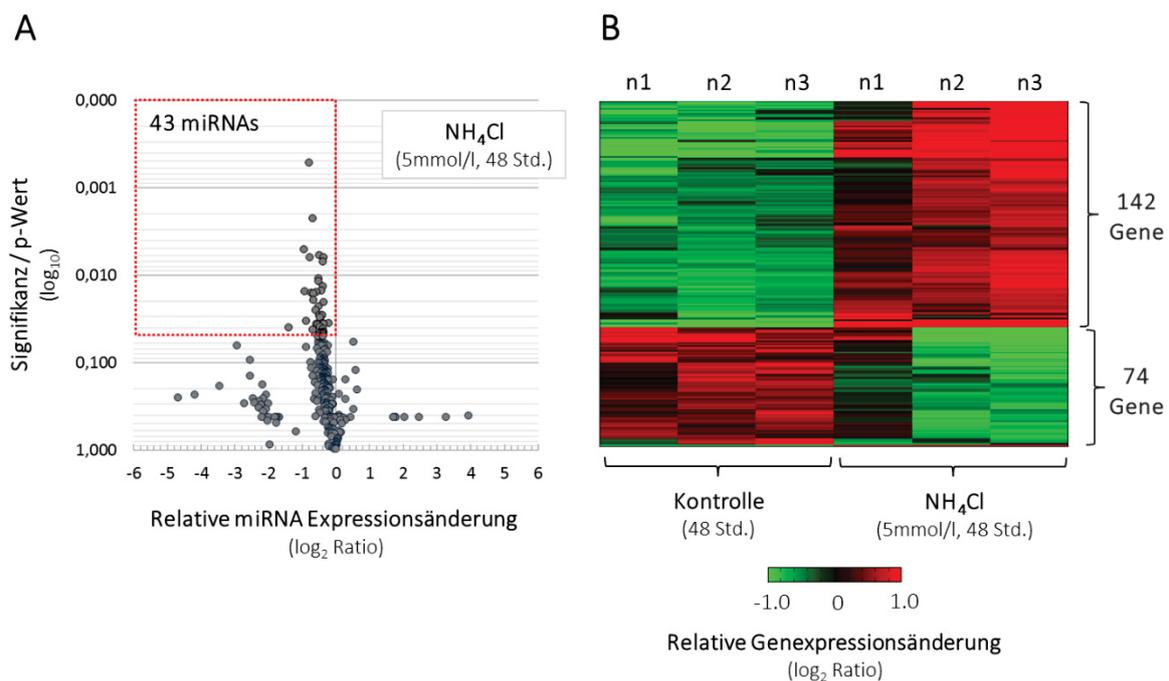


Abbildung 11: Übersichtdarstellung von miRNA- und Genexpressionsänderungen in mit Ammoniak-behandelten kultivierten Rattenastrozyten. Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) behandelt oder blieben unbehandelt. RNA wurde präpariert und (A) miRNA- oder (B) Genexpressionsänderungen mittels Agilent miRNA-Array oder Affymetrix Genarray analysiert. (A) Volcano-Plot-Analyse von miRNA Expressionsänderungen in mit NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) - behandelten Rattenastrozyten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Relative miRNA Expressionsänderungen mit einem P-Wert $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant verändert betrachtet (rot gefärbter Kasten). (B) Darstellung von Genexpressionsänderungen in einer Heatmap. Eine gegenüber dem Median aller Kontrollen erhöhte Expression eines jeweiligen Gens ist rot, eine verringerte Expression ist grün dargestellt. Genexpressionsänderungen in NH_4Cl -behandelten Astrozyten, die mindestens zweifach gegenüber den Kontrollen erhöht sind und ein Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$ aufweisen, wurden als statistisch signifikant verändert betrachtet. **Quelle:** Oenarto *et al.*, Akzeptiert bei Scientific Reports.

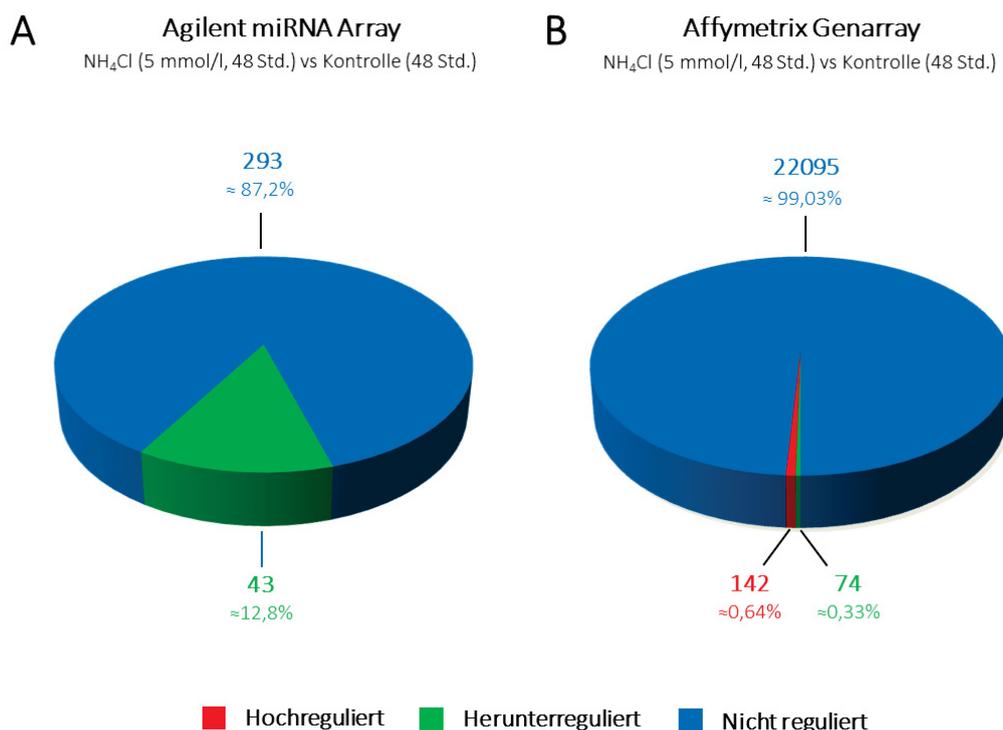


Abbildung 12: miRNA- und Genexpressionsänderungen in mit Ammoniak-behandelten kultivierten Rattenastrozyten. Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit NH₄Cl (5 mmol/l, 48 Std.) behandelt oder blieben unbehandelt. RNA wurde präpariert und (A) miRNA- oder (B) Genexpressionsänderungen mittels Agilent miRNA Array oder Affymetrix Genarray analysiert. Das Kuchendiagramm zeigt miRNA- und Genexpressionsänderungen in mit NH₄Cl (5 mmol/l, 48 Std.)-behandelten Rattenastrozyten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. **Quelle:** Oenarto *et al.*, Akzeptiert bei Scientific Reports.

1.3. Identifizierung potentieller Zielgene von durch Ammoniak herunterregulierter miRNA-Spezies in kultivierten Rattenastrozyten

Im Array gefundene mRNA-Expressionsänderungen wurden mit potentiellen Zielgenen von verändert exprimierten miRNAs korreliert. Potentielle Zielgene durch NH₄Cl (5 mmol/l, 48 Std.) herunterregulierter miRNAs wurden dabei durch bioinformatische Analyse mittels miRWalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>) identifiziert. miRWalk postuliert potentielle miRNA-Zielgene unter Einbeziehung verschiedener Suchalgorithmen und Online-Datenbanken (miRWalk und RNA22).

Wie in Abbildung 15 gezeigt ist, konnten durch bioinformatische Analyse 8060 potentielle Zielgene der 43 nach NH₄Cl (5 mmol/l, 48 Std.)-Behandlung herunterregulierten miRNAs identifiziert werden. 43 der 8060 potentiellen Zielgene überlappten mit Genen, die nach NH₄Cl (5 mmol/l, 48 Std.)-Behandlung verstärkt in kultivierten Rattenastrozyten exprimiert waren. Die Expression vieler der prognostizierten Zielgene könnten potentiell von mehreren der 43 nach NH₄Cl (5 mmol/l, 48 Std.)-

Behandlung herunterregulierten miRNA-Spezies reguliert werden. Für weitere Analysen wurde die Hämoxygenase-1 (HO-1) selektiert, die ein potentielles Zielgen von 6 der durch Ammoniak herunterregulierten miRNA-Spezies in kultivierten Rattenastrozyten identifiziert wurde (Abb. 15).

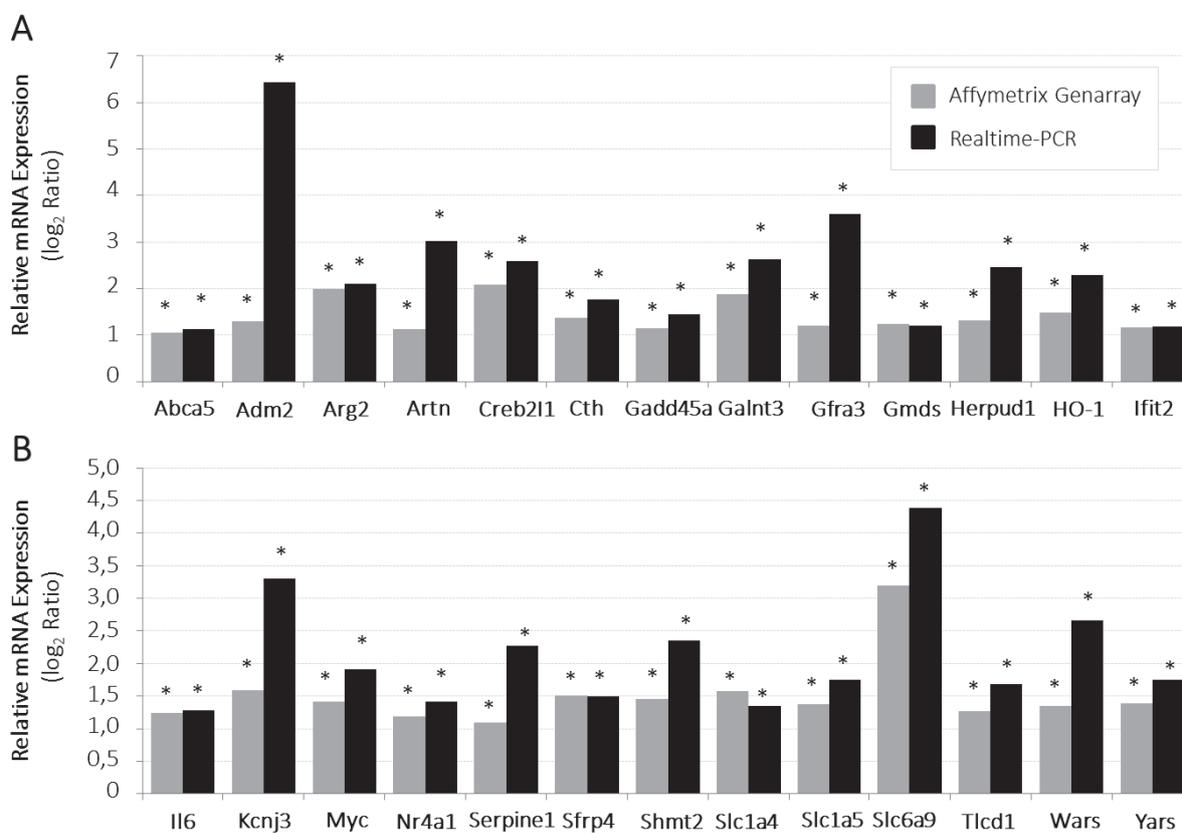
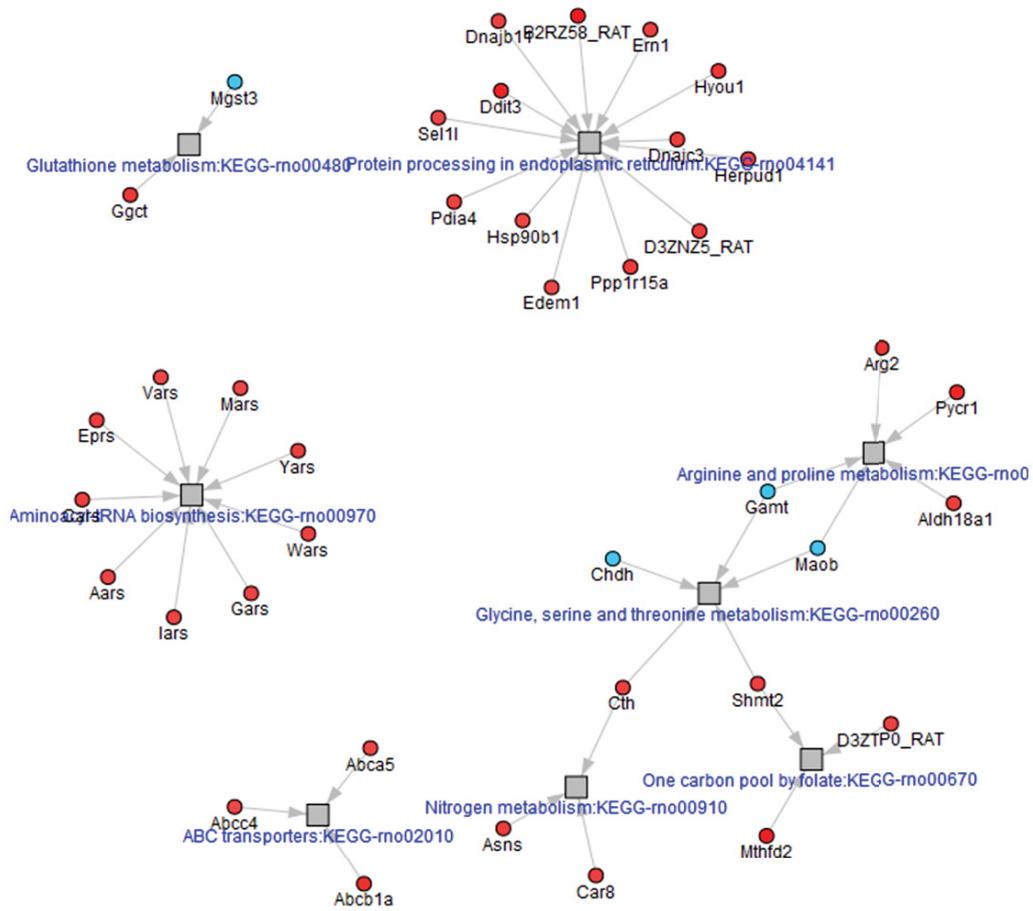


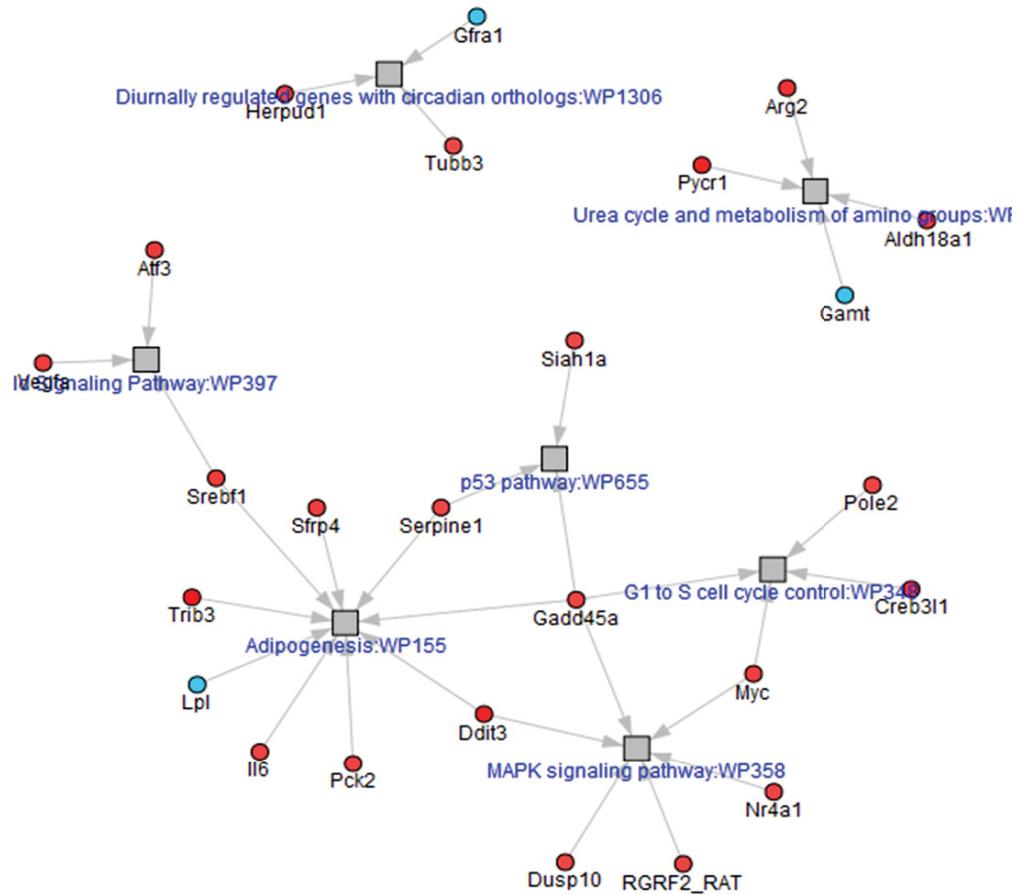
Abbildung 13: Validierung im Array identifizierter, durch Ammoniak induzierter Genexpressionsänderungen mittels Realtime-PCR. Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit NH₄Cl (5 mmol/l, 48 Std.) behandelt oder blieben unbehandelt. RNA wurde isoliert und Genexpressionsänderungen wurden mittels Affymetrix Genarray oder quantitativer Realtime-PCR analysiert. * = statistisch signifikant gegenüber unbehandelten Astrozyten (P < 0,05). (n = 3 - 31).

Quelle: Oenarto *et al.*, Akzeptiert bei Scientific Reports.

A



B



C

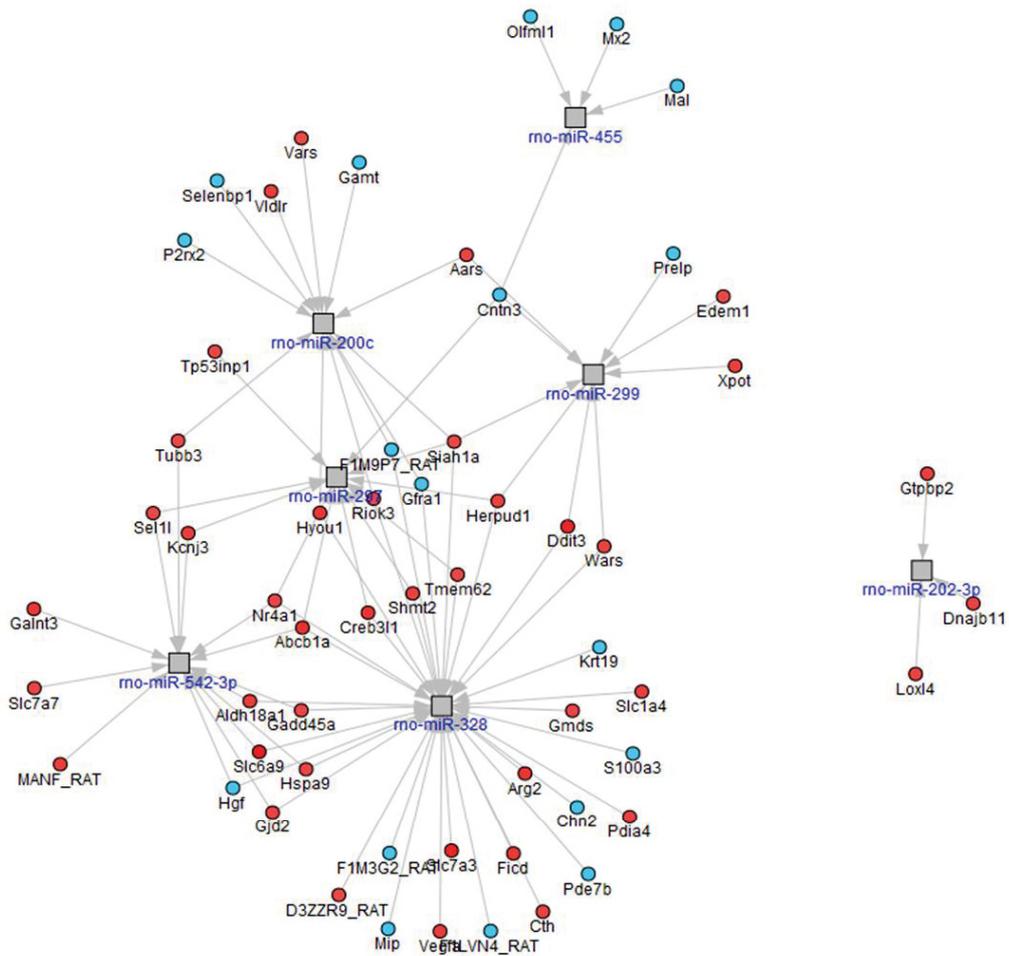


Abbildung 14: Bioinformatische Analyse von durch Ammoniak-induzierten Genexpressionsänderungen potentiell beeinflussten biologischen Funktionen und Signalwege, sowie Vorhersage potentiell regulierter miRNA-Spezies. Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) behandelt oder blieben unbehandelt. RNA wurde präpariert und Genexpressionsänderungen mittels Agilent miRNA Array und Realtime-PCR analysiert. Potentiell durch die experimentelle Behandlung beeinflusste biologische Funktionen und Signalwege (A/B) und in ihrer Expression modulierten miRNA-Spezies (C) in mit NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.)-behandelten Astrozyten wurden mittels AltAnalyze identifiziert. Rote Punkte: hochreguliert gegenüber unbehandelten Kontrollen; Blaue Punkte: herunterreguliert gegenüber unbehandelten Kontrollen.

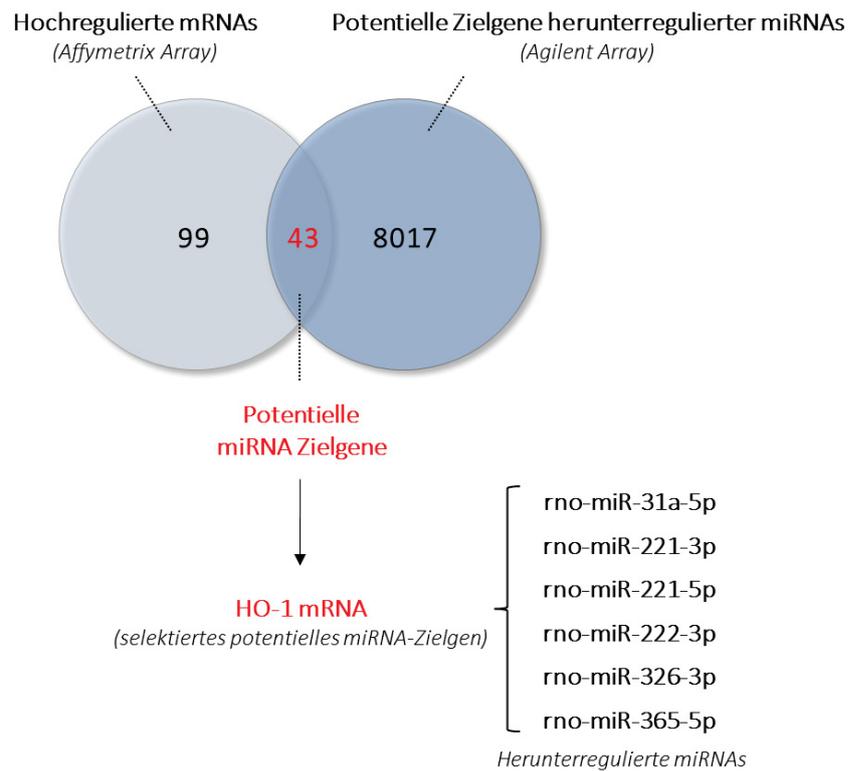


Abbildung 15: Bioinformatische Korrelation der durch Array-Analyse ermittelten mRNA-Expressionsänderungen mit potentiellen Zielgenen verändert exprimierter miRNAs in Ammoniak-behandelten kultivierten Rattenastrozyten. Die Korrelation zwischen den im Array hochregulierten mRNA-Spezies und den mittels miRWalk und RNA22 identifizierten potentiellen Ziel-mRNAs von im Array herunterregulierten miRNAs in NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.)-behandelten Astrozyten sind in einem Venn-Diagramm dargestellt. Die Hämoxygenase-1 (HO-1) wurde als potentielles Zielgen von sechs in Ammoniak-behandelten Astrozyten herunterregulierter miRNA-Spezies identifiziert. (n = 3). Quelle: Oenarto *et al.*, Akzeptiert bei Scientific Reports.

1.4. Validierung der im Array gefundenen miRNA Expressionsänderungen in mit Ammoniak-behandelten kultivierten Rattenastrozyten mittels quantitativer Realtime-PCR

Die im Array nachgewiesenen miRNA Expressionsänderungen in NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) - behandelten Astrozyten wurden mittels miRNA-spezifischer quantitativer Realtime-PCR (miQPCR) validiert (Castoldi *et al.*, 2011). Wie in Abb. 16A dargestellt ist, konnte mittels miQPCR die im Array gefundene Herunterregulation von vier der sechs potentiellen Hämoxygenase-1 (HO-1) regulierenden miRNA-Spezies bestätigt werden. Auch die Herunterregulation von rno-miR-221-5p und -365-3p in den NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) - behandelten Astrozyten konnte tendenziell nachgewiesen werden, allerdings waren das Expressionsniveau in den NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) - behandelten Astrozyten gegenüber den Kontrollen hier nicht statistisch signifikant unterschiedlich (Abb. 16A). Darüber hinaus

konnte mit dieser Methode die im Array gefundene Herunterregulation von neun weiteren miRNA-Spezies in mit NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) -behandelten Astrozyten validiert werden (Abb. 16B).

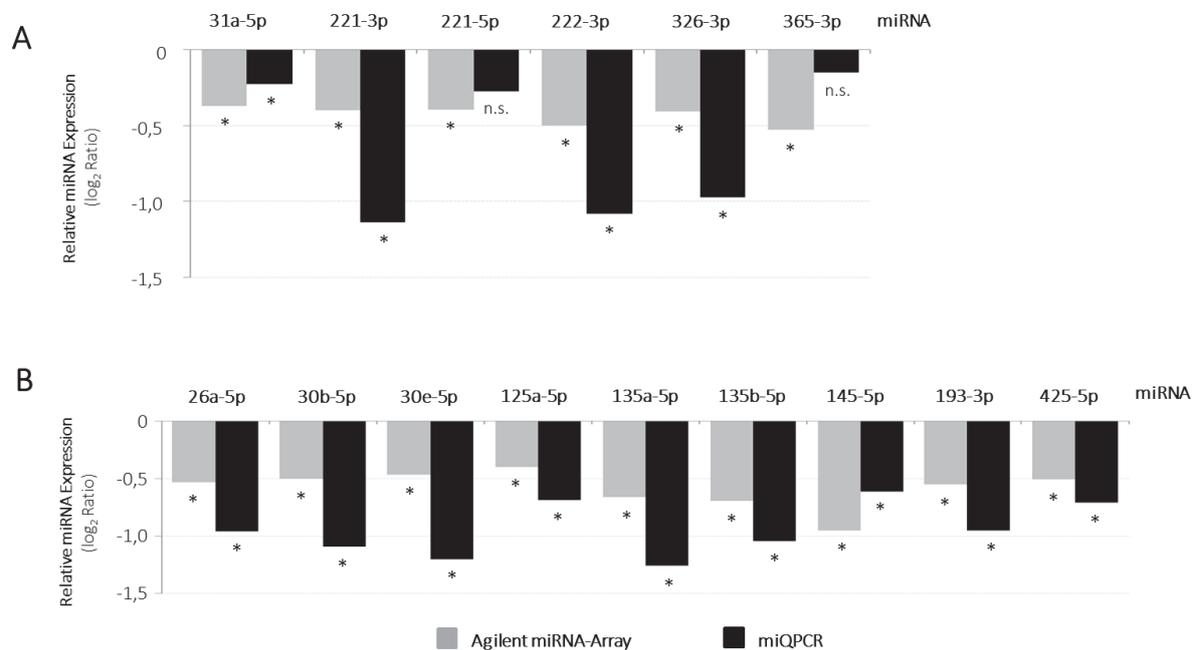


Abbildung 16: Validierung Ammoniak-induzierter miRNA-Expressionsänderungen in kultivierten Rattenastrozyten. Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) behandelt oder blieben unbehandelt. RNA wurde isoliert und miRNA-Expressionsänderungen wurden mittels Agilent miRNA Array oder miRNA-spezifischer quantitativer Realtime-PCR (miQPCR) analysiert. (A) Validierung ammoniakinduzierter Expressionsänderungen von sechs die Hämoxygenase-1 (HO-1) potentiell regulierenden miRNAs. (B) Validierung ammoniakinduzierter Expressionsänderungen von neun miRNAs, die nicht vorhergesagt sind, die HO-1 zu regulieren. * = statistisch signifikant gegenüber unbehandelten Astrozyten. n.s. = nicht signifikant gegenüber unbehandelten Astrozyten. (n = 3 - 4).
Quelle: Oenarto *et al.*, Akzeptiert bei Scientific Reports.

1.5. Bedeutung der Glutaminsynthese und der Bildung von oxidativ/nitrosativem Stress für durch Ammoniak induzierte miRNA Expressionsänderungen in kultivierten Rattenastrozyten

Um die Rolle der Glutaminsynthese für die durch Ammoniak induzierten miRNA-Expressionsänderungen zu untersuchen, wurden Astrozyten mit dem Glutaminsynthetaseinhibitor L-Methionin-Sulfoximin (MSO, 3 mmol/l) behandelt. Wie in Abbildung 18 gezeigt ist, hemmte MSO die NH_4Cl (5 mmol/l, 72 Std.)-induzierte signifikante Herunterregulation der potentiell die Hämoxygenase-

1 (HO-1) regulierenden miRNAs rno-miR-31a-5p, -221-3p, -222-3p und -326-3p (Abb. 18A) und von 9 weiteren miRNA-Spezies, die keine Sequenzhomologie zur HO-1 mRNA aufweisen (Abb. 18B).

Die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) für die durch NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) vermittelte Herunterregulation spezifischer miRNAs wurde durch die Verwendung des NADPH-Oxidase (NOX)-Inhibitors Apocynin (300 $\mu\text{mol/l}$) analysiert. Wie in Abbildung 18A gezeigt, inhibierte Apocynin (300 $\mu\text{mol/l}$) die durch NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) vermittelte Herunterregulation potentiell die HO-1 regulierenden miRNAs rno-miR-31a-5p, -221-3p, -222-3p und -326-3p und von 9 weiteren miRNA-Spezies, die keine Sequenzhomologie zur HO-1 mRNA aufweisen (Abb. 18B).

In Übereinstimmung mit einer durch oxidativen Stress- und miRNAs vermittelten Regulation der HO-1 wurde die Ammoniak-induzierte Hochregulation der HO-1 mRNA Expression in Astrozyten durch den NADPH-Oxidase-Hemmstoff Apocynin und den Glutaminsynthetasehemmstoff MSO inhibiert (Abb. 17).

Gegenüber nur mit MSO- oder Apocynin-behandelten Kontrollen (30 Min. Vorinkubation) induzierte die Behandlung mit NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) eine Expressionssteigerung einiger der untersuchten miRNA-Spezies. Diese waren jedoch mit Ausnahme von miR-221-3p gegenüber den jeweiligen Kontrollen (Inhibitor in Abwesenheit von NH_4Cl) nicht statistisch signifikant.

Die Befunde zeigen, dass die durch NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) vermittelte Herunterregulation von 13 selektierten miRNA-Spezies NADPH-Oxidase-vermittelt und Glutaminsynthese-abhängig erfolgt.

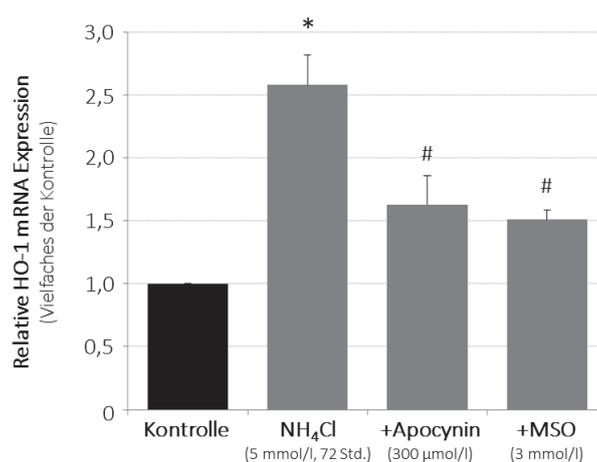


Abbildung 17: Einfluss von Hemmstoffen der NADPH-Oxidase und der Glutaminsynthetase auf die durch Ammoniak induzierte Expressionssteigerung der HO-1 mRNA in kultivierten Rattenastrozyten. Kultivierte Rattenastrozyten blieben entweder unbehandelt oder wurden mit dem Glutaminsynthetasehemmstoff L-Methionin-Sulfoximin (MSO, 3 mmol/l) oder dem NADPH-Oxidase-

Inhibitor Apocynin (300 $\mu\text{mol/l}$) für 30 Min. behandelt. Nachfolgend wurden die Zellen entweder mit NH_4Cl (5 mmol/l, 72 Std.) inkubiert oder blieben unbehandelt. RNA wurde isoliert und für die Quantifizierung der HO-1 mRNA-Expression mittels Realtime-PCR verwendet. Die Expression der HO-1 mRNA in mit Ammoniak-behandelten Astrozyten ist in Relation zur Expression der jeweiligen Kontrolle (unbehandelt oder mit dem jeweiligen Inhibitor behandelt) angegeben. * = statistisch signifikant gegenüber der jeweiligen Kontrolle. # = statistisch signifikant gegenüber NH_4Cl (5 mmol/l, 72 Std.)-behandelten Astrozyten. (n = 3 - 10). **Quelle:** Oenarto *et al.*, Akzeptiert bei Scientific Reports.

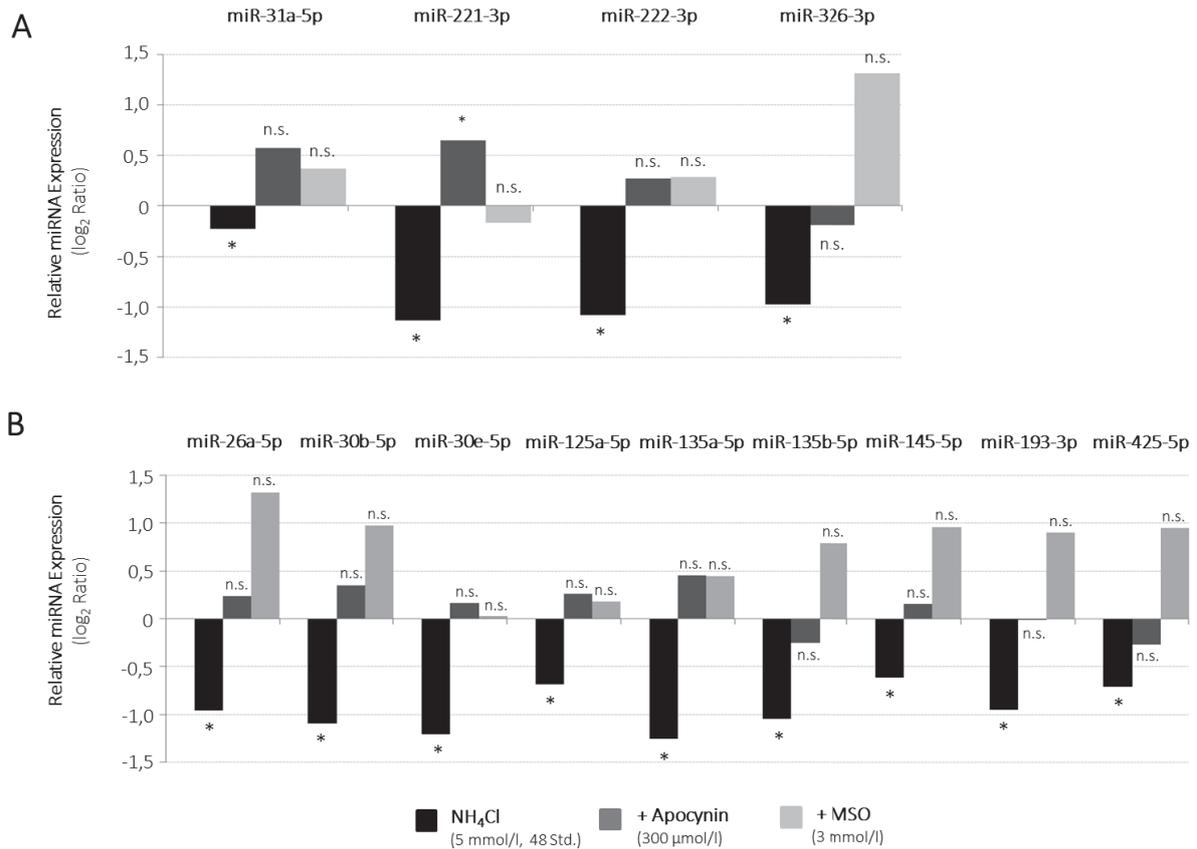


Abbildung 18: Einfluss von Hemmstoffen der NADPH-Oxidase und der Glutaminsynthetase auf durch Ammoniak herunterregulierter miRNA-Spezies. Kultivierte Rattenastrozyten blieben unbehandelt oder wurden mit dem Glutaminsynthetasehemmstoff L-Methionin-Sulfoximin (MSO, 3 mmol/l) oder dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin (300 $\mu\text{mol/l}$) für 30 Min. vorbehandelt. Nachfolgend wurden die Zellen entweder mit NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) inkubiert oder blieben unbehandelt. RNA wurde isoliert und für die miRNA Expression mittels miRNA-spezifischer Realtime-PCR quantifiziert. * = statistisch signifikant gegenüber der jeweiligen Kontrollen (unbehandelt oder mit den jeweiligen Inhibitoren behandelt). n.s. = nicht signifikant gegenüber der jeweiligen Kontrollen (unbehandelt oder mit den jeweiligen Inhibitoren behandelt). (n = 3 - 4). **Quelle:** Oenarto *et al.*, Akzeptiert bei Scientific Reports.

1.6. Validierung der Hämoxxygenase-1 als potentielles Zielgen von durch Ammoniak herunterregulierter miRNA-Spezies

Zur Überprüfung, dass die durch NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) herunterregulierten miRNA-Spezies rno-miR-31a-5p, -221-3p, -221-5p, -222-3p, -326-3p und -365-3p, die Hämoxxygenase-1 (HO-1) mRNA-Expression regulieren, so wie es durch die bioinformatische Analyse vorausgesagt wurde, wurden Astrozyten mit miRIDIAN small hairpin miRNA-Inhibitoren transfiziert, die entweder rno-miR-31a-5p, -221-3p, -221-5p, -222-3p, -326-3p oder -365-3p hemmen. Wie in Abbildung 19 gezeigt, verringerte die Transfektion der Astrozyten mit den miRNA-Inhibitoren die Nachweisbarkeit der jeweiligen miRNA signifikant und steigerte gleichzeitig die HO-1 Expressionslevel auf mRNA (Abb. 19A) wie auch auf Proteinebene (Abb. 19B). Die verringerte Nachweisbarkeit der miRNA-Spezies nach Behandlung mit dem jeweiligen miRNA-Inhibitor kann dabei Folge einer Herunterregulation sein, aber auch einer durch Duplex-Bildung verringerten Amplifizierbarkeit der jeweiligen miRNA.

Neben der HO-1 wurden weitere der mit Hilfe web-basierter Datenbanken ermittelten potentiellen Zielgene NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.)-herunterregulierter miRNAs rno-miR-31a-5p, -221-3p, -221-5p, -222-3p, -326-3p und -365-3p durch Transfektion der Astrozyten mit dem jeweiligen miRIDIAN miRNA-Inhibitor überprüft. Wie in Abbildung 20 zu erkennen ist, konnten mittels quantitativer Realtime-PCR Slc1a5, Shmt2 und Nr4a1 als potentielle Zielgene von rno-miR-221-3p, -221-5p und -222-3p experimentell bestätigt werden. Des Weiteren wurden mit Slc1a5, Shmt2, Yars, Slc6a9 und Adm2 potentielle Zielgene von rno-miR-326-3p experimentell validiert. Es konnte außerdem belegt werden, dass KCN3 ein Zielgen von rno-miR-365-3p und Serpine1 ein Zielgen von rno-miR-31a-5p ist. Demgegenüber konnte mittels quantitativer Realtime-PCR-Analyse nicht bestätigt werden, dass Sfrp4 und Yars in ihrer Expression durch rno-miR-31a-5p moduliert werden.

Die Untersuchungen zeigen, dass die individuelle Inhibition der miRNA-Spezies rno-miR-31a-5p, -221-3p, -221-5p, -222-3p, -326-3p und -365-3p die Expression der HO-1 auf mRNA und Proteinebene in kultivierten Rattenastrozyten reguliert (Abb. 19A/B). Gleichzeitig wurde ein synergetischer Effekt in Bezug auf die Regulation der HO-1 mRNA-Expression beobachtet, wenn Astrozyten mit den miRNA-Spezies rno-miR-31a-5p, -221-3p, -221-5p, -222-3p, -326-3p und -365-3p gleichzeitig transfiziert wurden (Abb. 21A/B).

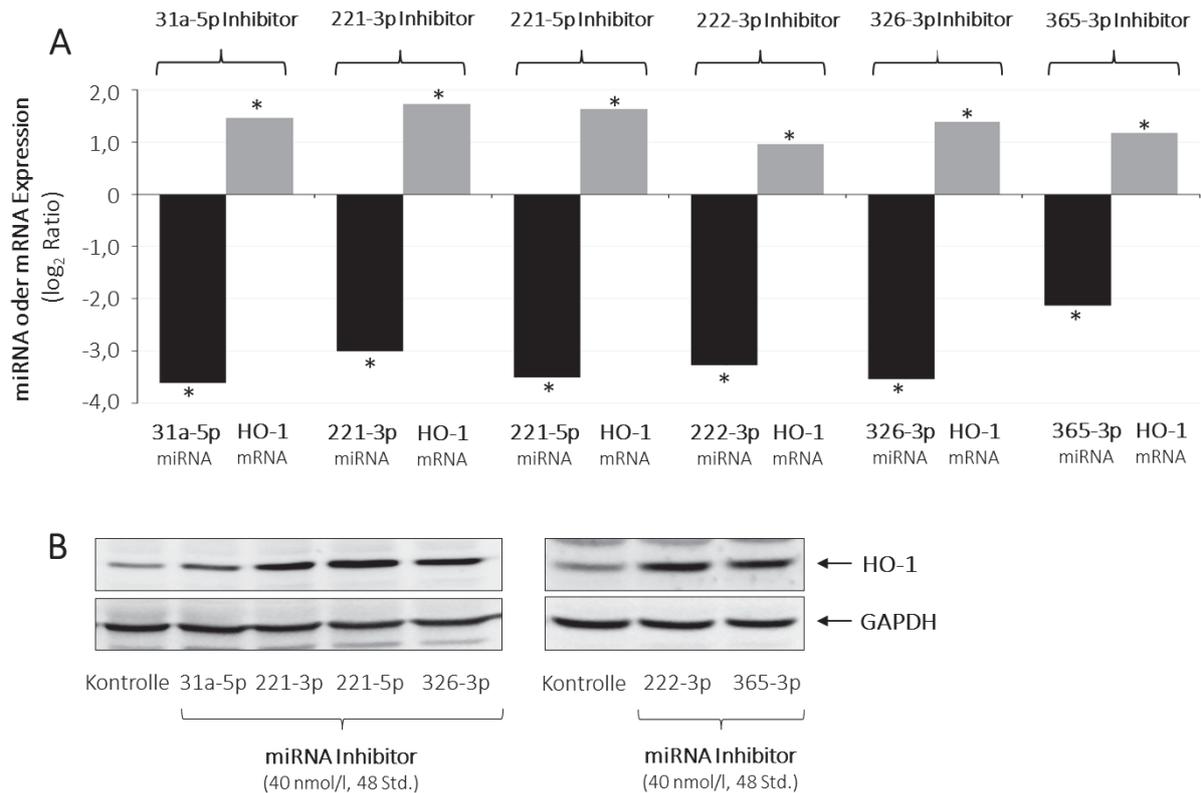


Abbildung 19: Einfluss von miRNA-Inhibitoren auf die Nachweisbarkeit von potentiell die HO-1 regulierenden miRNA-Spezies und Expression von HO-1 mRNA und Protein. Kultivierte Rattenastrozyten wurden für 48 Std. mit Inhibitoren der jeweilig benannten miRNA-Spezies oder in Abwesenheit von Inhibitoren (Kontrolle) transfiziert. RNA (A) oder Protein (B) wurde isoliert und für Realtime-PCR bzw. Western-Blot Analysen verwendet. Nachweis der Transfektionseffizienz mittels miQPCR (A). Die Wirkung der miRNA-Hemmung auf die HO-1 mRNA- (A) und Proteinexpression (B) wurde mittels quantitativer Realtime-PCR bzw. Western-Blot untersucht. * = statistisch signifikant gegenüber kontrolltransfizierten Astrozyten. (n = 3 - 5). **Quelle:** Oenarto *et al.*, Akzeptiert bei Scientific Reports.

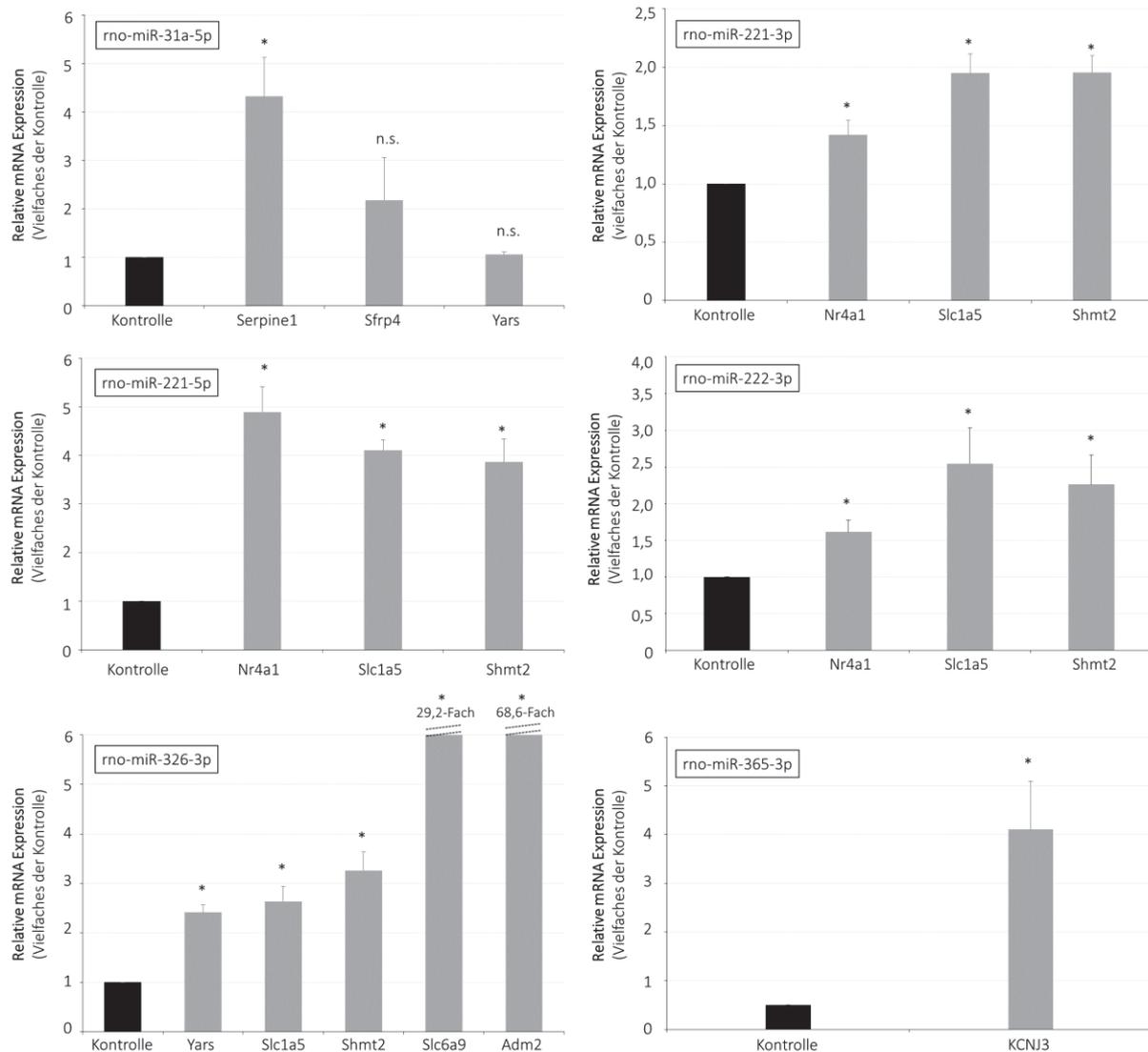


Abbildung 20: Einfluss der Hemmung der miRNA-Spezies rno-miR-31a-5p, -221-3p, -221-5p, -222-3p, -326-3p oder -365-3p auf das mRNA-Expressionsniveau potentieller miRNA-Zielgene. Kultivierte Rattenastrozyten wurden für 48 Std. mit Inhibitoren der genannten miRNA-Spezies oder in Abwesenheit von Inhibitoren (Kontrolle) transfiziert. RNA wurde isoliert und für die Quantifizierung des mRNA Expressionsniveaus potentieller Ziel-mRNAs von rno-miR-31a-5p, -221-3p, -221-5p, -222-3p, -326-3p oder -365-3p mittels quantitativer Realtime-PCR verwendet. * = statistisch signifikant gegenüber kontrolltransfizierten Astrozyten. n.s. = nicht signifikant gegenüber kontrolltransfizierten Astrozyten. (n = 3 - 7). Quelle: Oenarto *et al.*, Akzeptiert bei Scientific Reports.

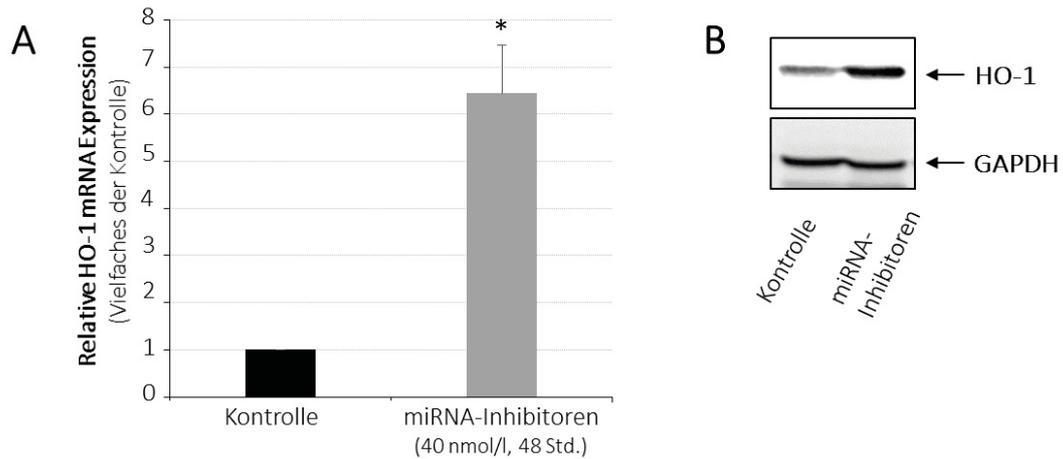


Abbildung 21: Einfluss einer kombinierten Behandlung mit den miRNA-Inhibitoren rno-miR-31a-5p, -221-3p, -221-5p, -222-3p, -326-3p und -365-3p auf das HO-1 mRNA- und Proteinexpressionsniveau. Kultivierte Rattenastrozyten wurden für 48 Std. mit einer Kombination der genannten miRNA-Inhibitoren oder in Abwesenheit von Inhibitoren (Kontrolle) transfiziert. RNA (A) oder Protein (B) wurde isoliert und die HO-1 mRNA mittels Realtime-PCR bzw. das HO-1 Protein mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. * = statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber kontrolltransfizierten Astrozyten (n = 3 – 5). **Quelle:** Oenarto *et al.*, Akzeptiert bei Scientific Reports.

Tabelle 19: Bioinformatisch ermittelte putative Bindungsstellen der miRNAs rno-miR-31a-5p, -221-3p, -222-3p, -326-3p und -365-3p an potentielle Ziel-mRNAs. (miRWalk, <http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/miRNAPredictedtarget.html>).

miRNA	Transkript	RefSeqID	miRNA-Bindestelle	„Seed“-Länge	„Seed“-Anfang	„Seed“-Ende	Region	P-Wert
rno-miR-31a-5p	Hmox1	NM_012580	AGGCAAGAU	9	1059	1051	3UTR	0,0023
rno-miR-31a-5p	Serpine1	NM_012620	GGCAAGAU	8	2310	2303	3UTR	0,0260
rno-miR-31a-5p	Sfrp4	NM_053544	AGGCAAG	7	1224	1218	3UTR	0,0459
rno-miR-31a-5p	Yars	NM_001025696	AGGCAAGAU	9	1929	1921	3UTR	0,0028
rno-miR-31a-5p	Yars	NM_001025696	GGCAAGAU	8	1928	1921	3UTR	0,0111
rno-miR-221-3p	Hmox1	NM_012580	GCUACAU	7	1031	1025	3UTR	0,0368
rno-miR-221-3p	Nr4a1	NM-024388	AGCUACAU	8	2480	2473	3UTR	0,0089
rno-miR-221-3p	Nr4a1	NM-024388	GCUACAU	7	2479	2473	3UTR	0,0350
rno-miR-221-3p	Shmt2	NM_175758	AGCUACA	7	2442	2436	3UTR	0,0335
rno-miR-221-3p	Slc1a5	NM_175758	AGCUACA	7	1731	1725	3UTR	0,0302
rno-miR-222-3p	Hmox1	NM_012580	GCUACAU	7	1031	1025	3UTR	0,0368
rno-miR-222-3p	Nr4a1	NM-024388	AGCUACAU	8	2480	2473	3UTR	0,0089
rno-miR-222-3p	Nr4a1	NM-024388	GCUACAU	7	2479	2473	3UTR	0,0350
rno-miR-222-3p	Shmt2	NM_175758	AGCUACA	7	2442	2436	3UTR	0,0335
rno-miR-222-3p	Slc1a5	NM_175758	AGCUACA	7	1731	1725	3UTR	0,0302
rno-miR-326-3p	Hmox1	NM_012580	CCUCUGGG	8	1008	1001	3UTR	0,0093
rno-miR-326-3p	Hmox1	NM_012580	CUCUGGG	7	1007	1001	3UTR	0,0368
rno-miR-326-3p	Adm2	NM_201426	CUCUGGGC	8	661	654	3UTR	0,0065
rno-miR-326-3p	Shmt2	NM_001008322	CCUCUGG	7	1989	1983	3UTR	0,0302
rno-miR-326-3p	Slc1a5	NM_175758	CUCUGGG	7	2267	2261	3UTR	0,0335
rno-miR-326-3p	Slc6a9	NM_053818	CCUCUGGG	8	2382	2375	3UTR	0,0169
rno-miR-326-3p	Slc6a9	NM_053818	CUCUGGGC	8	2863	2856	3UTR	0,0169
rno-miR-326-3p	Yars	NM_001025696	CCUCUGG	7	2240	2234	3UTR	0,0436
rno-miR-365-3p	Hmox1	NM_012580	UAAUGCC	7	1539	1533	3UTR	0,0368
rno-miR-365-3p	KCNJ3	NM_031610	UAAUGCC	7	1586	1580	3UTR	0,0159

Tabelle 20: Bioinformatisch ermittelte putative Bindungsstellen der miRNAs rno-miR-221-5p an potentielle Ziel-mRNAs. (RNA22 v2, <https://cm.jefferson.edu/data-tools-downloads/>).

miRNA (hsa-)	Transkript	"Seed"-Anfang	Faltungsentnergie (-Kcal/mol)	Heteroduplex	P-Wert
miR-221-5p	Hmox1	129	-10.80	CAGCTCGACAGCATGTCCCAGGA : CTTTAGATGTAACATACGGTCCA	3.13E-1
miR-221-5p	Hmox1	533	-10.90	TGACCTCTCAGGG--GGTCAGGT : CTTTAGATGTAACATACGGTCCA	3.13E-1
miR-221-5p	Hmox1	1124	-7.10	TTTGTCT-CTCTGGAATGGAAGGA : CTTTAGATGTAAC-ATACGGTCCA	1.6E-1
miR-221-5p	Hmox1	1460	-8.50	GCTGTCT--TTTGAGGGGTGGGT : :: CTTTAGATGTAACATACGGTCCA	2.15E-1
miR-221-5p	Nr4a1	252	-7.00	CGCACCTGC-CACCCTGCCCAGT : CTTTAGATGTAACATACGGTCCA	1.76E-1
miR-221-5p	Shmt2	1520	-16.90	AGGTGGAACA--GTTTGCCAGGG CTTTAGATGTAACATACGGTCCA	3.5E-1
miR-221-5p	Slc1a5	1996	-15.00	GGAATCTGTCATGTGAATGTTTGGGA : : : CTTTAGAT-GTA-ACATACGGTCCA	2.49E-1

1.7. Wirkung der Inhibition HO-1-regulierender miRNA-Spezies auf die Proliferation kultivierter Rattenastrozyten

Literaturbefunde weisen auf eine Beteiligung der HO-1 bei der Proliferationshemmung und der Induktion von Seneszenz bei neurodegenerativen Erkrankungen (Schipper *et al.*, 2009). Daher wurde untersucht, ob die Hochregulation von HO-1 durch individuelle Inhibition der miRNA-Spezies rno-miR-221-3p, -221-5p, -222-3p oder -326-3p die Astrozytenproliferation beeinträchtigt. Die Astrozytenproliferation wurde dabei durch fluorimetrische Quantifizierung des DNA-Gehalts in mit Hoechst34580 gefärbten Astrozyten bestimmt. Wie in Abbildung 22A dargestellt, bewirkte die individuelle Hemmung von die HO-1 Expression-regulierender miRNA-Spezies rno-miR-221-3p, -221-5p, -222-3p und -326-3p in unterschiedlichem Ausmaß eine Proliferationshemmung in kultivierten Rattenastrozyten. Die durch die jeweiligen miRNA-Inhibitoren induzierte Proliferationshemmung wurde vollständig durch den HO-1 Hemmstoff Zinn-Protoporphyrin IX (SnPP) aufgehoben (Abb. 22B).

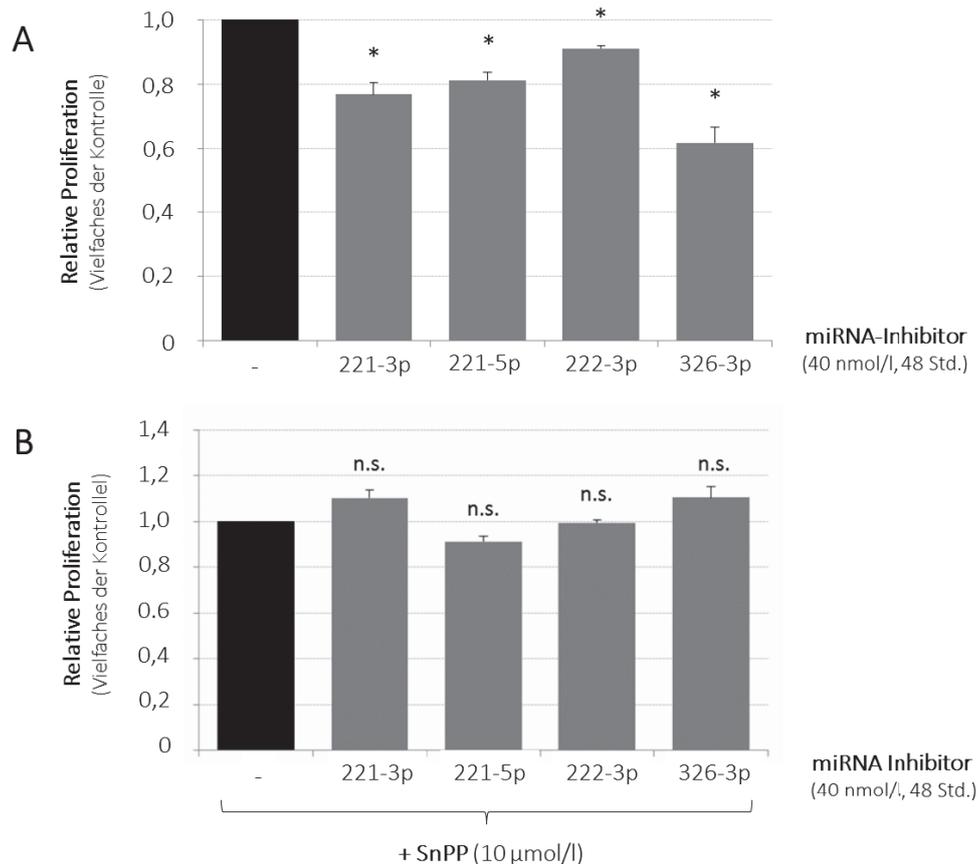


Abbildung 22: Einfluss einer Inhibition die HO-1-Expression regulierender miRNA-Spezies auf die Proliferation kultivierter Rattenastrozyten. Kultivierte Rattenastrozyten wurden für 48 Std. mit Inhibitoren der miRNA-Spezies rno-miR-221-3p, -221-5p, -222-3p oder -326-3p oder in Abwesenheit von Inhibitoren (Kontrolle) transfiziert. Der DNA-Gehalt der Proben wurde fluorimetrisch durch Messung der Fluoreszenzintensität von Hoechst34580 bestimmt. Die Fluoreszenzintensität der mit miRNA-Inhibitoren behandelten Astrozyten ist in Relation zur Fluoreszenzintensität der kontrolltransfizierten Astrozyten angegeben. (A) Einfluss der miRNA-Inhibition auf die Astrozytenproliferation. (B) Einfluss des HO-1 Hemmstoffs Zinn-Protoporphyrin IX (SnPP, 10 µmol/l, 30 Min. Vorinkubation vor Zugabe von 5 mmol/l NH₄Cl) auf die Proliferation mit miRNA-Inhibitoren behandelter Astrozyten. * = statistisch signifikant gegenüber kontrolltransfizierten Astrozyten. n.s. = nicht signifikant gegenüber kontrolltransfizierten mit SnPP-behandelten Astrozyten. (n = 3 – 5). **Quelle:** Oenarto *et al.*, Akzeptiert bei Scientific Reports.

1.8. Rolle der HO-1 für die durch Ammoniak induzierte Seneszenz und Wachstumshemmung in kultivierten Rattenastrozyten

Ammoniak induziert eine Wachstumshemmung und Seneszenz kultivierter Rattenastrozyten (Görg *et al.*, 2015). Zur Überprüfung einer Beteiligung der HO-1 an der durch Ammoniak induzierten Astrozytenseneszenz wurden Astrozyten mit Taurin behandelt. Taurin hemmt die durch Ammoniak induzierte Transkriptionssteigerung der HO-1 (Warskulat *et al.*, 2002). Hierfür wurden die Astrozyten 16 Std. vor Zugabe von NH₄Cl (5 mmol/l) mit Taurin (5 mmol/l) vorinkubiert. Taurin blieb während des

gesamten Experiments im Zellkulturmedium anwesend. Wie in Abbildung 23 gezeigt ist, hemmte Taurin die durch NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) induzierte mRNA-Expressionssteigerung der HO-1 (Abb. 23A) und des Seneszenzbiomarkers GADD45 α (Abb. 23B) vollständig. Eine erhöhte HO-1 (Abb. 23C) und GADD45 α (Abb. 23D) mRNA Expression wurde auch im zerebralen Kortex Taurintransporter (TauT)-defizienter Mäuse gefunden, in dem der Tauringehalt stark verringert ist (Sergeeva *et al.*, 2007).

Um die Rolle von HO-1 für die durch NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.) induzierte Wachstumshemmung kultivierter Astrozyten zu untersuchen, wurde Taurin (5 mmol/l) und der HO-1 Hemmstoff Zinn-Protoporphyrin IX (SnPP, 10 $\mu\text{mol/l}$) verwendet. Wie in Abbildung 24 gezeigt ist, wurde die NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.)-vermittelte Wachstumshemmung kultivierter Rattenastrozyten sowohl durch Taurin, als auch durch SnPP vollständig blockiert.

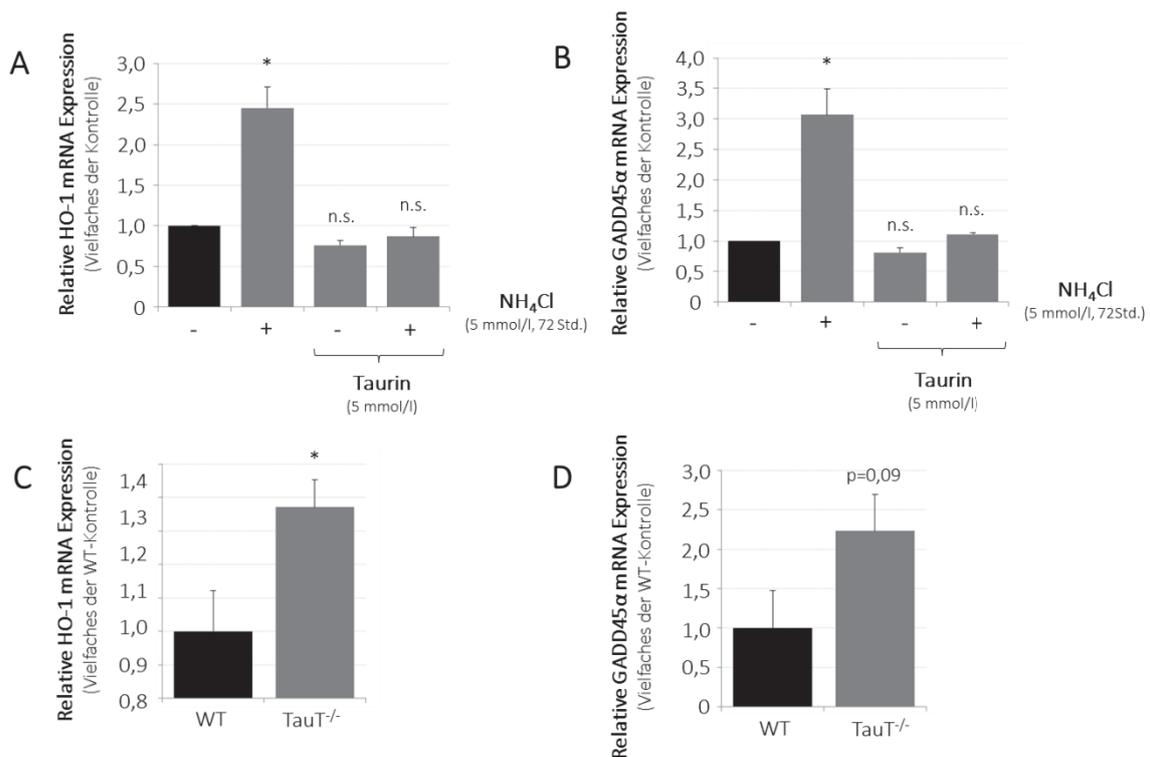


Abbildung 23: HO-1 und GADD45 α mRNA Expression in mit Ammoniak-behandelten kultivierten Rattenastrozyten *in vitro* und im zerebralen Kortex von Taurintransporter-defizienten Mäusen *in vivo*. Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit oder ohne Taurin (5 mmol/l, 16 Std. Vorbehandlung) mit NH_4Cl (5 mmol/l, 72 Std.) inkubiert oder blieben unbehandelt. RNA wurde isoliert und für die Quantifizierung der HO-1 (A) oder GADD45 α (B) mRNA Expressionslevel mittels Realtime-PCR verwendet. Quantifizierung der HO-1 (C) oder GADD45 α (D) mRNA Expression in Wildtyp (WT) und Taurintransporter-defizienten Mäusen (TauT^{-/-}) mittels Realtime-PCR. * = statistisch signifikant gegenüber unbehandelten Astrozyten oder Wildtypkontrollen. (n = 3 – 7). **Quelle:** Oenarto *et al.*, Akzeptiert bei Scientific Reports.

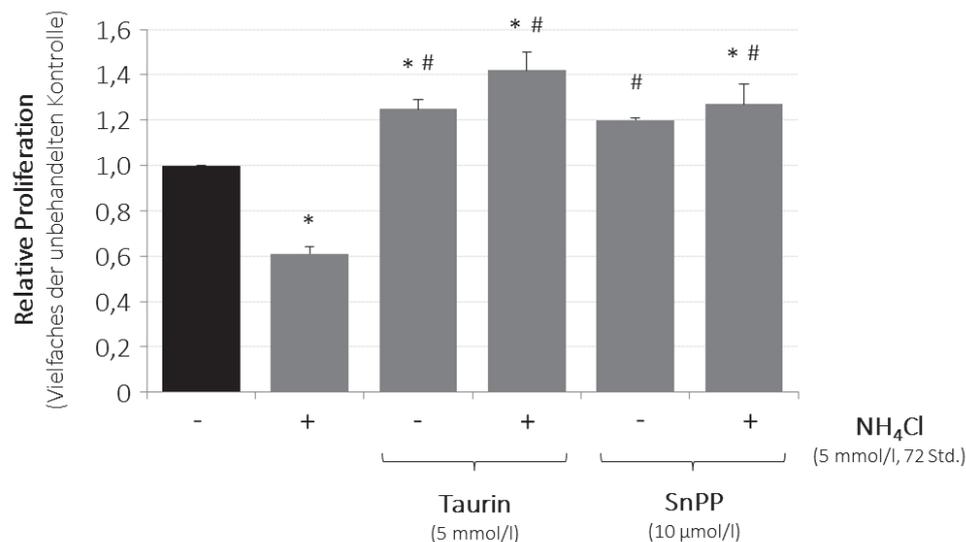


Abbildung 24: Einfluss von Taurin und des HO-1-Hemmstoffs SnPP auf die durch Ammoniak induzierte Proliferationshemmung kultivierter Rattenastrozyten. Kultivierte Rattenastrozyten wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von Taurin (5 mmol/l, 16 Std. Vorbehandlung) oder Zinn-Protoporphyrin IX (SnPP, 10 µmol/l, 30 Min. Vorbehandlung) mit NH₄Cl (5 mmol/l, 72 Std.) inkubiert oder blieben unbehandelt. Der DNA-Gehalt der Proben wurde fluorimetrisch durch Messung der Fluoreszenzintensität von Hoechst34580 bestimmt. Die Fluoreszenzintensität der jeweilig behandelten Astrozyten ist in Relation zur Fluoreszenzintensität der unbehandelten Astrozyten angegeben. * = statistisch signifikant gegenüber unbehandelten Astrozyten. # = statistisch signifikant gegenüber mit Ammoniak behandelten Astrozyten. (n = 3 – 4). Quelle: Oenarto *et al.*, Akzeptiert bei Scientific Reports.

1.9. Einfluss einer durch hypoosmotisches Medium induzierten Astrozytenschwellung auf die Expression von durch Ammoniak regulierter miRNA-Spezies

Der Einfluss einer Astrozytenschwellung auf die Expression durch NH₄Cl regulierter miRNA-Spezies wurde experimentell durch Behandlung der Zellen mit hypoosmotischem Zellkulturmedium (205 mosmol/l, 48 Std.) überprüft. Die Kontrollen wurden mit normoosmotischem Zellkulturmedium (320 mosmol/l) behandelt.

Wie in Abbildung 25 gezeigt, verringerte die Behandlung kultivierter Astrozyten mit hypoosmotischem Medium die Expression der die HO-1 regulierenden miRNA-Spezies rno-miR-221-5p und -326-3p (Abb. 25A) und der auch in NH₄Cl (5 mmol/l, 48 Std.)-behandelten Astrozyten verringert exprimierten miRNA-Spezies rno-miR-26a-5p, -145-5p und -652-3p (Abb. 25B) gegenüber normoosmotisch-behandelten Kontrollen. Andere untersuchte, durch NH₄Cl (5 mmol/l, 48 Std.) herunterregulierte miRNA-Spezies waren nach Behandlung der Astrozyten mit hypoosmotischem Medium gegenüber normoosmotischen Kontrollen nicht signifikant in ihrer Expression verändert.

1.10. Einfluss einer durch hypoosmotisches Medium induzierten Astrozytenschwellung auf die HO-1 mRNA-Expression und Astrozytenproliferation

Die Behandlung kultivierter Rattenastrozyten mit hypoosmotischem Zellkulturmedium steigert die mRNA Expression der HO-1 (Warskulat *et al.*, 2002). Dieser mittels Northern-Blot erhaltene Befund wurde in der vorliegenden Arbeit durch Realtime-PCR Analyse überprüft. Wie in Abbildung 26 dargestellt ist, steigerte die Behandlung kultivierter Astrozyten mit hypoosmotischem gegenüber normoosmotischem Zellkulturmedium die HO-1 mRNA Expression signifikant um ca. das 1,7-fache (Abb. 26A).

Gleichzeitig verringerte die Behandlung kultivierter Astrozyten mit hypoosmotischem Zellkulturmedium die Proliferation um ca. 25% verglichen mit normoosmotisch behandelten Astrozyten (Abb. 26B).

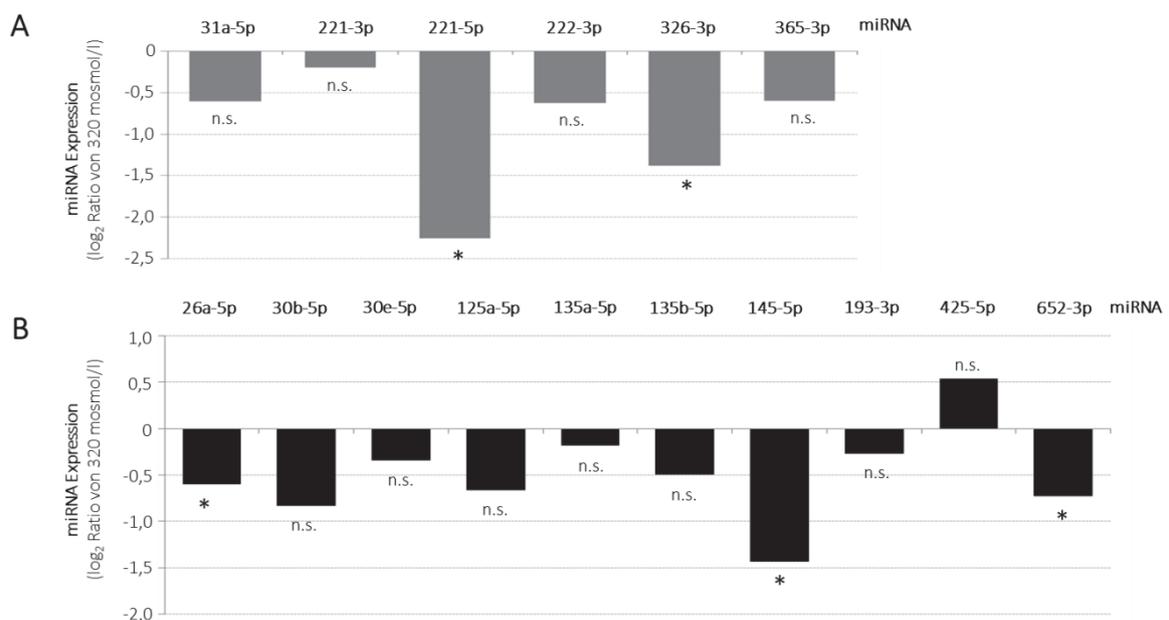


Abbildung 25: Einfluss einer durch hypoosmotisches Zellkulturmedium induzierten Astrozytenschwellung auf die Expression durch Ammoniak regulierter miRNA-Spezies. Kultivierte Rattenastrozyten wurden für 72 Std. in hypoosmotischem (205 mosmol/l) oder normoosmotischem (320 mosmol/l) Medium kultiviert. Quantifizierung HO-1 regulierender (A) und weiterer miRNA-Spezies (B) mittels miRNA-spezifischer quantitativer Realtime-PCR (miQPCR). Das miRNA Expressionsniveau in mit hypoosmotischem Zellkulturmedium behandelten Astrozyten ist in Relation zu mit normoosmotischem Medium behandelten Astrozyten ausgedrückt. * = statistisch signifikant gegenüber mit normoosmotischem Medium behandelten Astrozyten. n.s. = nicht signifikant

gegenüber mit normoosmotischem Medium behandelten Astrozyten. (n = 3–5). Quelle: Oenarto *et al.*, Akzeptiert bei Scientific Reports.

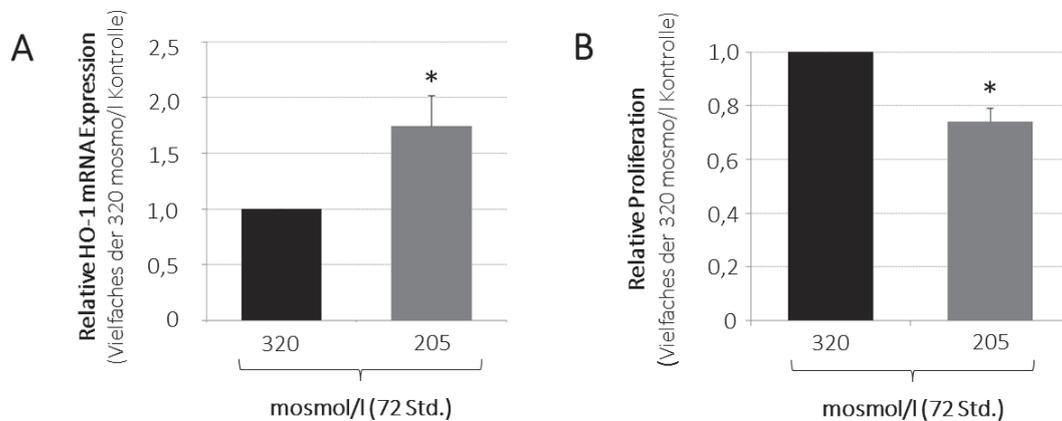


Abbildung 26: Einfluss einer durch hypoosmotisches Zellkulturmedium induzierten Astrozytenschwellung auf die HO-1 mRNA Expression und die Astrozytenproliferation. Kultivierte Rattenastrozyten wurden für 72 Std. in hypoosmotischem (205 mosmol/l) oder normoosmotischem (320 mosmol/l) Zellkulturmedium kultiviert. (A) Quantifizierung der HO-1 mRNA Expressionslevel mittels Realtime-PCR. (B) Bestimmung der Astrozytenproliferation. Der DNA-Gehalt der Proben wurde fluorimetrisch durch Messung der Fluoreszenzintensität von Hoechst34580 bestimmt. Die Fluoreszenzintensität der mit hypoosmotischem Medium behandelten Astrozyten ist in Relation zur Fluoreszenzintensität normoosmotisch-behandelter Kontrollen ausgedrückt. * = statistisch signifikant gegenüber hypoosmotisch-behandelten Astrozyten. n.s. = nicht signifikant gegenüber normoosmotisch-behandelten Astrozyten. (n= 3–5). Quelle: Oenarto *et al.*, Akzeptiert bei Scientific Reports.

2. Analyse der miRNA Expression in humanen *post mortem* Hirngewebe

2.1. Identifizierung von miRNA- und Genexpressionsänderungen in *post mortem* Hirngewebe von Patienten mit Leberzirrhose mit hepatischer Enzephalopathie

Mit Hilfe der Microarray-Technologie wurden in der vorliegenden Arbeit das miRnom (Agilent miRNA-Array) und das Transkriptom (Agilent Genarray) in *post mortem* Hirngewebe von Kontrollpatienten und Zirrhosepatienten mit oder ohne hepatische Enzephalopathie analysiert. miRNA und Genexpressionsänderungen wurden in Proben analysiert, die aus einer australischen Kohorte stammen (Kohorte 1). Zusätzlich wurde das miRnom in Proben analysiert, die aus einer europäischen Kohorte stammen (Kohorte 2).

A. Transkriptomanalyse-Kohorte 1

Wie in Abbildung 27 dargestellt, wurden mit Hilfe der Transkriptomanalyse unter den 42404 auf dem Chip-repräsentierten Transkripten 1574 Gene identifiziert, die bei Zirrhosepatienten mit HE gegenüber den Kontrollpatienten verändert exprimiert waren. Von diesen Genen waren 945 erhöht und 602 verringert exprimiert. Im Vergleich zu den Kontrollpatienten wurde eine veränderte Expression von 685 der 42404 auf dem Chip repräsentierten Transkripten bei Zirrhosepatienten ohne HE gefunden. 547 Gene waren erhöht und 138 Gene waren erniedrigt exprimiert in Zirrhosepatienten ohne HE.

B. miRnom-Analyse-Kohorte 1

Wie in Abbildung 28A gezeigt, waren 25 von 2006 auf dem Array vertretenen miRNA-Spezies in *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE gegenüber den Kontrollpatienten signifikant verstärkt exprimiert. In *post mortem* Hirnproben der Zirrhosepatienten ohne HE waren gegenüber den Kontrollpatienten 54 verstärkt und 108 verringert exprimiert. Von den im Array hochregulierten miRNA-Spezies waren 23 spezifisch in Zirrhosepatienten mit HE und 52 in Patienten mit Leberzirrhose ohne HE verändert (Abb. 28B).

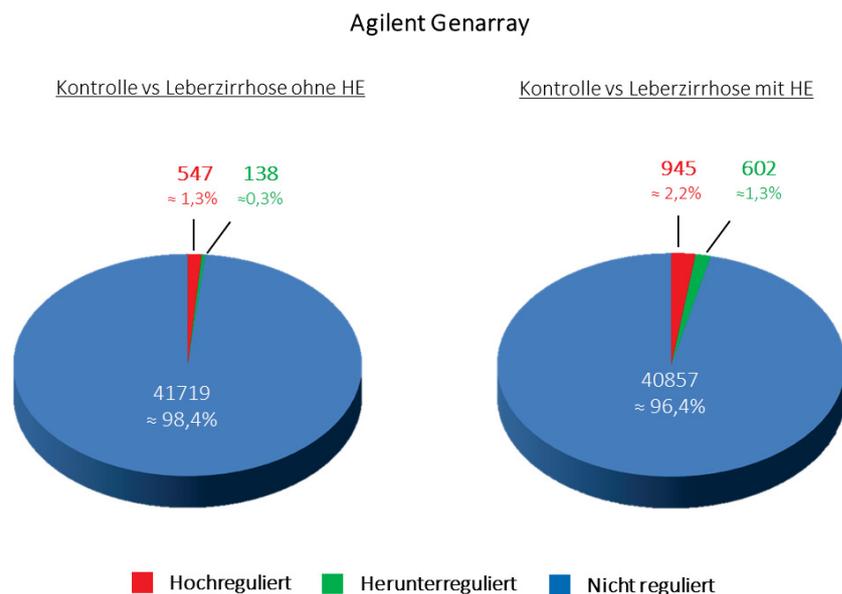


Abbildung 27: Genexpressionsänderungen in humanen *post mortem* Hirngewebe von Leberzirrhosepatienten mit und ohne HE. RNA wurde aus *post mortem* humanen Hirngewebe von 4 Kontrollen und jeweils 4 Leberzirrhosepatienten mit und ohne hepatische Enzephalopathie (HE) isoliert und das Transkriptom mittels Agilent™ Whole Human Genome Array analysiert. Gene, die gegenüber den Kontrollen als verändert exprimiert bewertet wurden, zeigen eine mindestens 2-fach erhöhte Expression und einen P-Wert von < 0,05.

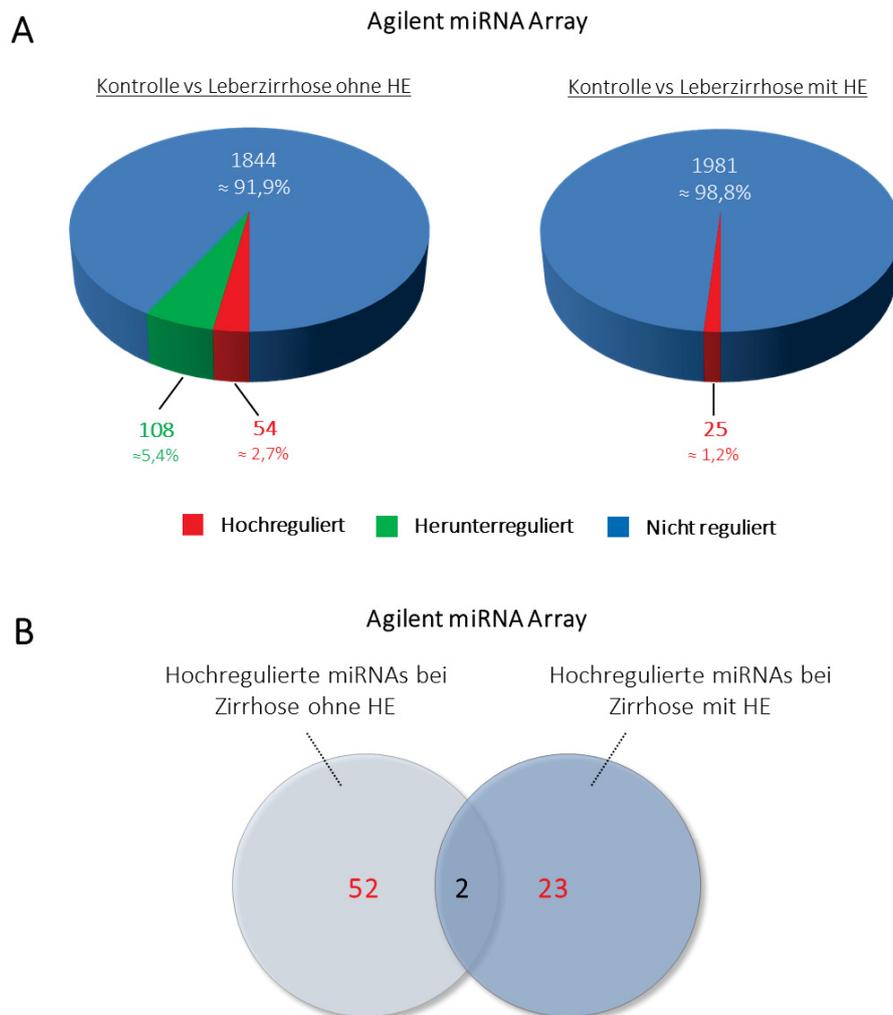


Abbildung 28: miRNA Expressionsänderungen in humanen *post mortem* Hirngewebe von Leberzirrhosepatienten mit und ohne HE. RNA wurde aus humanem *post mortem* Hirngewebe aus 4 Kontrollen, sowie jeweils 4 Leberzirrhosepatienten mit oder ohne hepatische Enzephalopathie (HE) isoliert und mittels Agilent™ miRNA Microarray analysiert. (A) miRNA-Expressionsänderungen in Zirrhosepatienten mit und ohne HE. (B) Quantifizierung spezifischer, im Gehirn von Zirrhosepatienten mit und ohne HE (rot) sowie in beiden (Überlappung, schwarz) gegenüber den Kontrollen verändert exprimierter miRNA-Spezies.

2.2. Überprüfung im Array identifizierter miRNA-Expressionsänderungen in *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE mittels quantitativer Realtime-PCR

Die im Array nachgewiesenen miRNA Expressionsänderungen in *post mortem* Hirngeweben von Zirrhosepatienten der australischen Kohorte mit hepatischer Enzephalopathie (HE) wurden mittels miRNA-spezifischer quantitativer Realtime-PCR (miQPCR) (Castoldi *et al.*, 2011) überprüft. Wie in Abb. 29 dargestellt, konnte mittels miQPCR bei 13 von 25 im Array signifikant hochregulierter miRNA-

Spezies eine Tendenz zu einer Hochregulation nachgewiesen werden, jedoch ohne einen statistisch signifikanten Unterschied zu zeigen.

Die Expression dieser 13 tendenziell in Leberzirrhosepatienten mit HE der Kohorte 1 verstärkt exprimierten miRNA-Spezies wurde in *post mortem* Hirnprobenmaterial der Kohorte 2 überprüft. Für diese Analyse wurden die aus Kohorte 1 und Kohorte 2 (*Gyrus fusiforme*) gewonnenen Daten zusammengeführt. Hierfür wurden die durch miQPCR ermittelten C_t -Werte mit qBase Median-normalisiert und auf den Mittelwert aller Kontrollpatienten der jeweiligen Kohorte normalisiert. Nachfolgend wurden die normierten Werte beider Kohorten für die Mittelwertbildung der Kontrollen und der Zirrhosepatienten mit HE verwendet und relative Expressionsänderungen bei Zirrhosepatienten mit HE in Relation zur Kontrolle angegeben. Wie in Abb. 30 dargestellt ist, konnte für 9 der 13 im Array hochregulierten miRNA-Spezies im *Gyrus fusiforme* der Zirrhosepatienten mit HE aus beiden Kohorten eine tendenzielle und für 1 (*hsa-miR-1225-3p*) eine signifikante Hochregulation gezeigt werden.

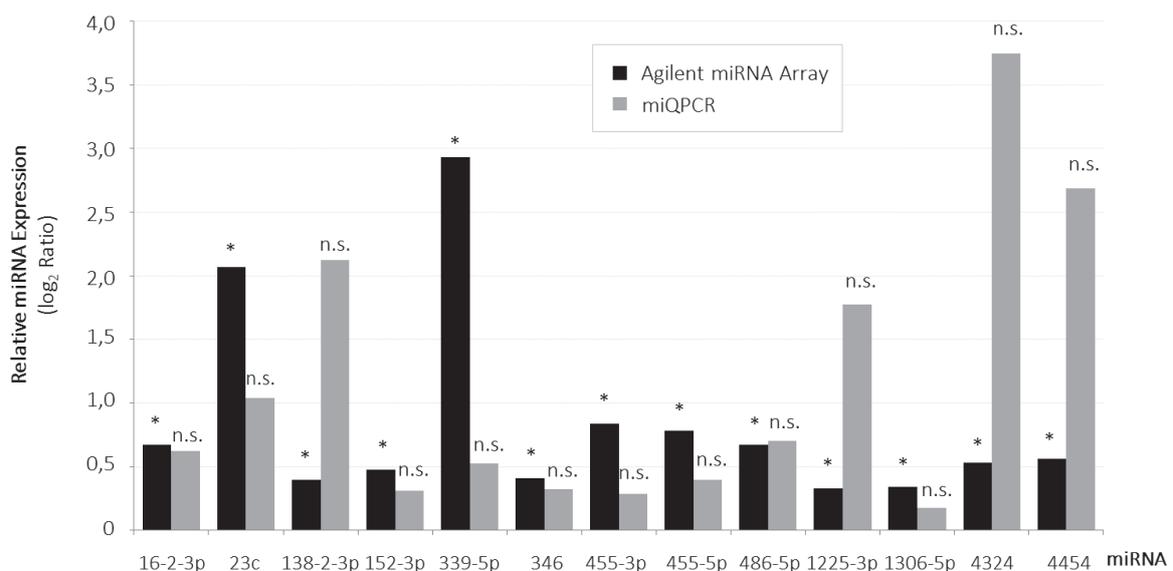


Abbildung 29: Überprüfung von miRNA Expressionsänderungen in *post mortem* Hirngewebe von Leberzirrhosepatienten mit HE der Kohorte 1. Die im Array gefundenen miRNA-Expressionsänderungen im Gehirn von Zirrhosepatienten mit HE der Kohorte 1 wurden mit Hilfe miRNA-spezifischer quantitativer Realtime-PCR (miQPCR) überprüft. * = statistisch signifikant gegenüber den Kontrollpatienten bei $P < 0,05$. n. s. = nicht signifikant gegenüber den Kontrollpatienten. (n = 4).

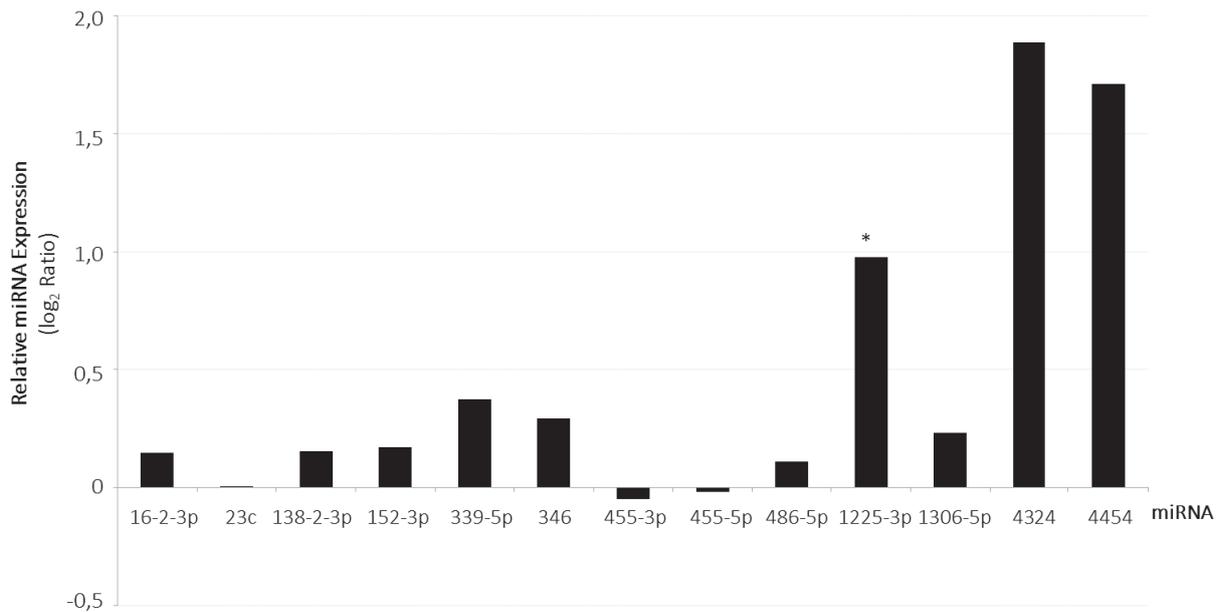


Abbildung 30: Überprüfung von im Array identifizierten miRNA-Expressionsänderungen in *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE, entnommen aus dem *Gyrus fusiforme* (Kohorten 1 und 2) mittels miQPCR. Die im Array gefundenen miRNA Expressionsänderungen im Gehirn von Zirrhosepatienten mit HE der Kohorte 1 und 2 aus der Region *Gyrus fusiforme* wurden mit Hilfe miRNA-spezifischer quantitativer Realtime-PCR (miQPCR) überprüft. * = statistisch signifikant gegenüber den Kontrollpatienten bei $P < 0,05$. (n = 9 - 11).

2.3. Identifizierung potentieller Zielgene der in *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE hochregulierter miRNA-Spezies

Mit bioinformatischen Anaysetools und unter Verwendung verschiedener Suchalgorithmen und web-basierten Datenbanken (Diana-mT, MicroCosm, miRDB, miRWalk, TargetScan und RNA22 (Tab. 22)) wurden die im Genarray identifizierten mRNA-Expressionsänderungen mit potentiellen Zielgenen der im Array identifizierten verändert exprimierten miRNAs in *post mortem* Hirnproben von Zirrhosepatienten mit HE der Kohorte 1 verglichen.

Wie in Abbildung 31 gezeigt ist, wies die bioinformatische Analyse auf 13130 potentielle Zielgene der 13 in *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE hochregulierten miRNA-Spezies. 224 von 13130 potentiellen Zielgene überlappten mit Genen, die in *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE verringert exprimiert waren. Mehrere der 13 selektierten, in *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE hochregulierten miRNA-Spezies könnten potentiell die Expression mehrerer bei HE runterregulierter Zielgene beeinflussen.

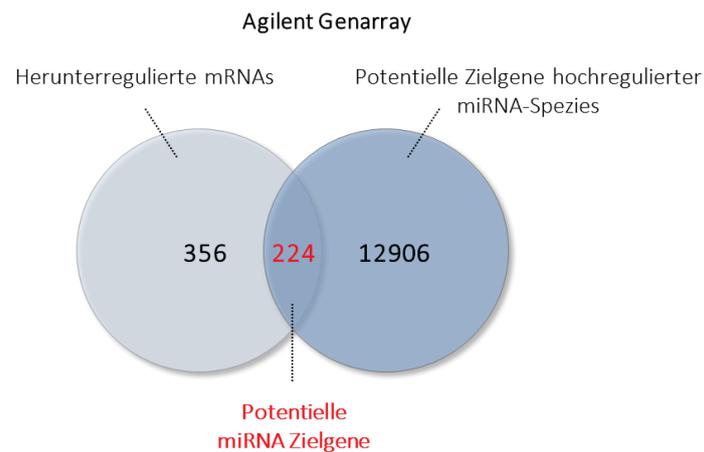


Abbildung 31: Bioinformatische Vorhersage potentieller Zielgene von im Gehirn von Leberzirrhosepatienten mit HE hochregulierter miRNA-Spezies. Korrelation der mittels web-basierter bioinformatischer Analyse identifizierter Zielgene hochregulierter miRNAs und herunterregulierter mRNAs in *post mortem* Hirnproben von Leberzirrhosepatienten mit HE. 224 potentielle Zielgene der bei HE hochregulierten miRNA Spezies (13) überlappen mit 580 bei HE runterregulierten Genen.

2.4. Validierung potentieller Zielgene der in *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE hochregulierter miRNA-Spezies

Zur Überprüfung, ob die in *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE hochregulierten miRNA-Spezies hsa-miR-138-2-3p, -152-3p, -339-5p, -455-3p und -486-5p, die durch bioinformatische Analyse vorhergesagten, bei Zirrhosepatienten mit HE verringert exprimierten Gene regulieren können, wurden humane MOG-G-CCM (Astrozytoma)- und SH-SY5Y (Neuroblastoma)-Zelllinien mit dem entsprechenden miRIDIAN miRNA Mimetikum transfiziert. Wie in Abbildung 32 gezeigt ist, steigerte die Transfektion der MOG-G-CCM-Zelllinie mit den miRNA-Mimetika die Expression der jeweiligen miRNA signifikant und verringerte gleichzeitig die Expressionslevel der jeweiligen potentiellen Zielgene EphB3, Homer1, PPM1E und PTPRR auf mRNA (Abb. 33A, Tab. 21) und im Fall von EphB3 zusätzlich auch auf Proteinebene (Abb. 33B) gezeigt. Dabei wurde die mRNA Expression von PTPRR durch miR-152-3p und -455-3p und die Proteinexpression von EphB3 durch miR-339-5p und -486-5p reguliert. Demgegenüber wurde die Expression von EphB3, Homer1, PPM1E und PTPRR durch die jeweiligen miRNA-Mimetika (hsa-miR-138-2-3p, -152-3p, -339-5p, -455-3p und -486-5p) in SH-SY5Y-Zellen nicht verändert (Tab. 21). Die Transfektion von SH-SY5Y-Zellen mit dem jeweiligen miRNA-Mimetikum steigerte die Nachweisbarkeit der jeweiligen miRNAs (Abb. 32) und verringerte die mRNA Expressionslevel von FABP3, MMP3 und KCNQ2 (Abb. 34, Tab. 21) signifikant.

Demgegenüber wurde die Expression von FABP3, MMP3 und KCNQ2 durch die jeweiligen miRNA-Mimetika (hsa-miR-152-3p, -455-3p oder -486-5p) in MOG-G-CCM-Zellen nicht verändert (Tab. 21).

Die Untersuchungen zeigen, dass die Überexpression der miRNA-Spezies hsa-miR-138-2-3p, -339-5p, -152-3p, -455-3p und -486-3p die Expression der durch bioinformatische Analyse vorhergesagten potentiellen Zielgene auf mRNA- und/oder Proteinebene zelltypspezifisch regulieren.

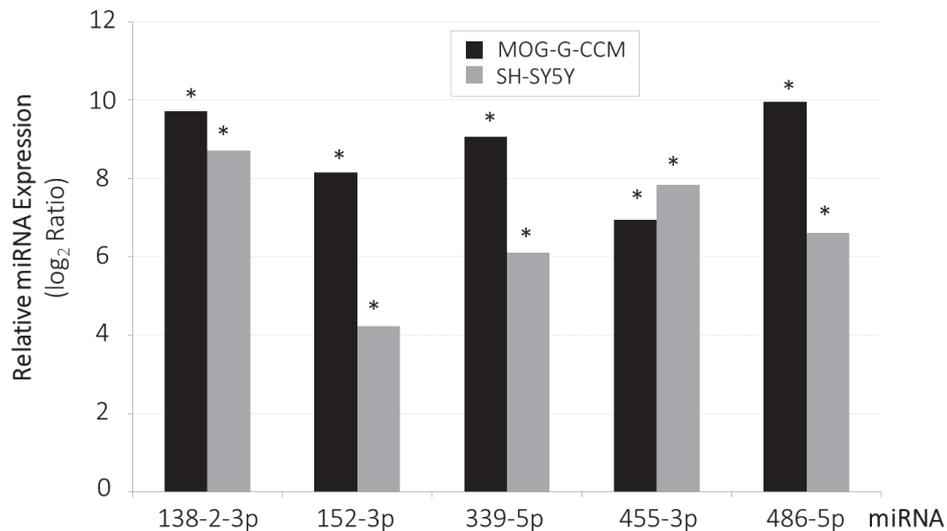


Abbildung 32: Validierung der Überexpression von miRNA Mimetika in MOG-G-CCM- und SH-SY5Y-Zellen. Humane MOG-G-CCM (Astrozytoma)- und SH-SY5Y (Neuroblastoma)-Zellen wurden für 48 Std. mit für die jeweils benannte miRNA-Spezies spezifischen miRIDIAN miRNA Mimetika oder mit der miRIDIAN miRNA Mimetika-Negativkontrolle transfiziert. RNA wurde isoliert und die Expression der jeweiligen miRNA-Spezies mittels Realtime-PCR quantifiziert. * = statistisch signifikant gegenüber den jeweiligen kontrolltransfizierten Zellen. (n = 3 - 8).

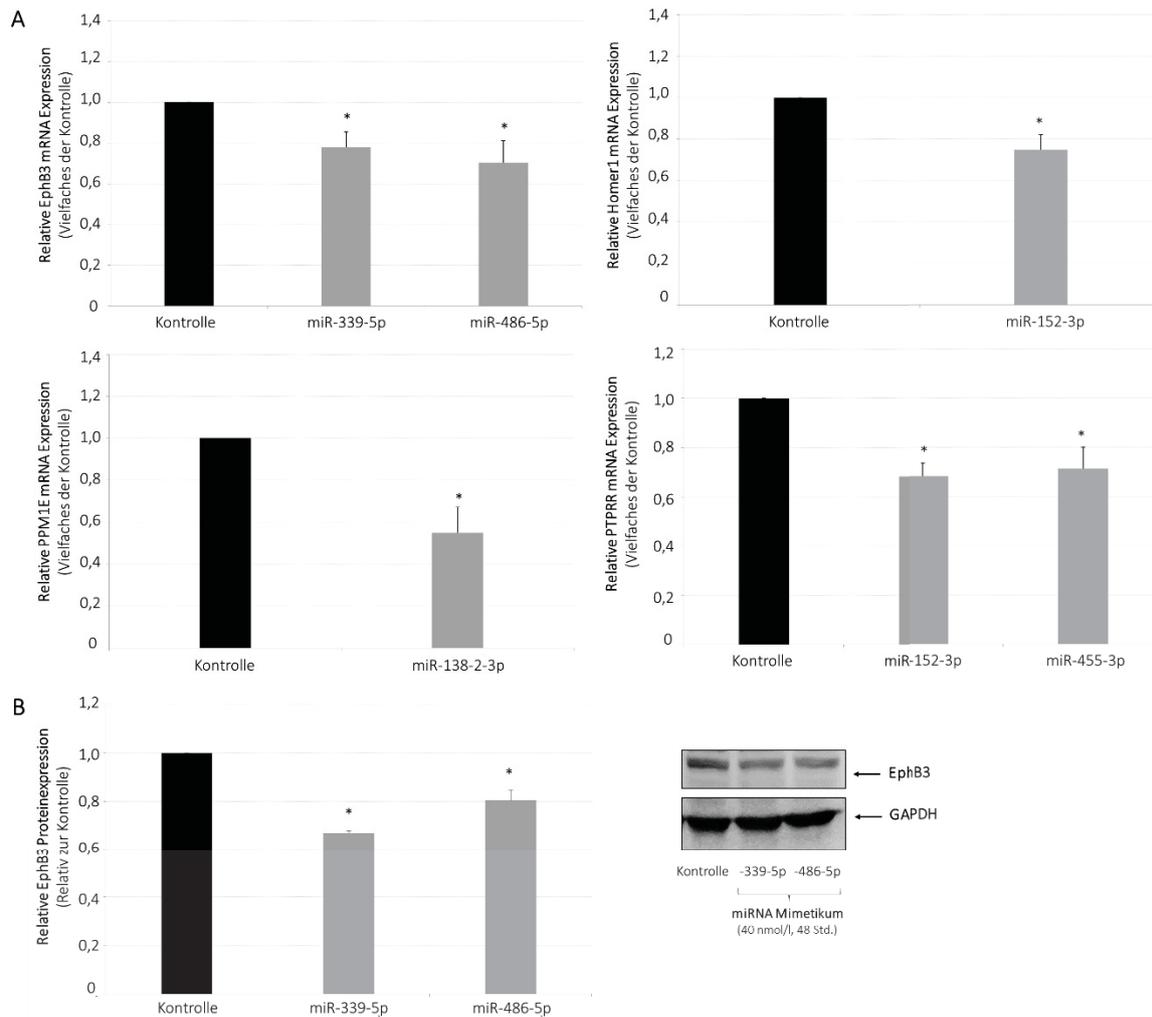


Abbildung 33: Einfluss der Überexpression in *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE hochregulierter miRNA-Spezies in MOG-G-CCM-Zellen auf die Expression potentieller Zielgene. Humane MOG-G-CCM (Astrozytoma)-Zellen wurden für 48 Std. mit einem für die jeweils benannte miRNA-Spezies spezifischen miRIDIAN miRNA Mimetikum oder mit der miRIDIAN miRNA Mimetika-Negativkontrolle transfiziert. RNA (A) oder Protein (B) wurde isoliert und die Expression des jeweiligen Ziels mittels Realtime-PCR und/oder Western-Blot überprüft. (B) Densitometrische Quantifizierung der Ephrinrezeptor B3 Proteinexpression in mit miRNA 339-5p- und 486-5p Mimetika transfizierten MOG-G-CCM-Zellen. * = statistisch signifikant gegenüber kontrolltransfizierten MOG-G-CCM-Zellen. (n = 3 - 5).

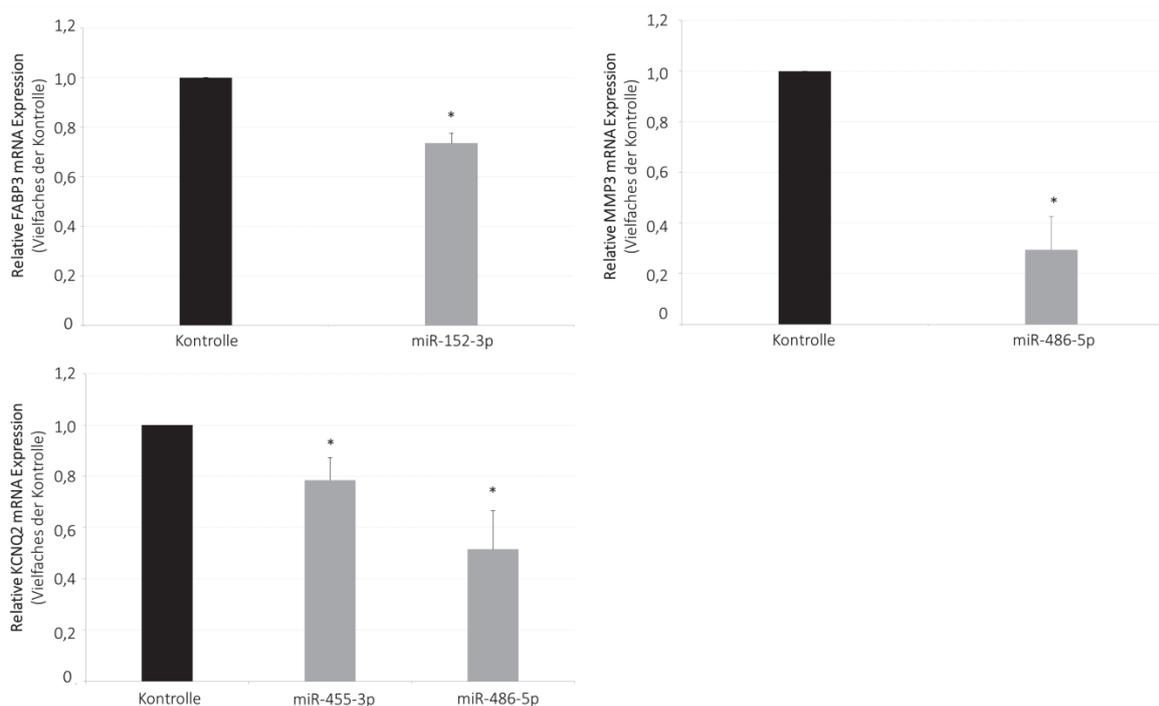


Abbildung 34: Einfluss der Überexpression in *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE hochregulierter miRNA-Spezies in SH-SY5Y-Zellen auf die mRNA Expression potentieller Zielgene. Humane SH-SY5Y (Neuroblastoma)-Zellen wurden für 48 Std. mit dem für die jeweils benannte miRNA-Spezies spezifischen miRIDIAN miRNA Mimetikum oder mit der miRIDIAN miRNA Mimetika-Negativkontrolle transfiziert. RNA wurde isoliert und die mRNA Expression des jeweiligen Zielgens mittels Realtime-PCR quantifiziert. * = statistisch signifikant gegenüber kontrolltransfizierten SH-SY5Y-Zellen (n = 3 - 4).

Tabelle 21 : Einfluss der Überexpression der miRNA-Spezies hsa-miR-138-2-3p, -152-3p, -339-5p, -455-3p und -486-5p auf das mRNA-Expressionsniveau jeweiliger potentieller miRNA-Zielgene in humanen MOG-G-CCM- und SH-SY5Y-Zellen. * = statistisch signifikant gegenüber jeweiligen kontrolltransfizierten Zelllinien (p ≤ 0,05). n.s. = statistisch nicht signifikant gegenüber jeweiligen kontrolltransfizierten Zelllinien (n = 3 – 9).

MOG-G-CCM-Zelllinie			
miRNA (hsa-miR)	Potentiellles Zielgen	Relatives mRNA-Expressionsniveau (Vielfaches der Kontrolle)	Signifikanzniveau (P-Wert)
138-2-3p	PPM1E	0,55 ± 0,12 *	0,03
152-3p	CCKBR	1,46 ± 0,61 ^{n.s.}	0,50
	CXCL12	1,75 ± 0,14 ^{n.s.}	0,09
	FABP3	1,12 ± 0,18 ^{n.s.}	0,57
	Homer1	0,75 ± 0,07 *	0,04

	PTPRR	0,68 ± 0,05 *	0,01
339-5p	EphB3	0,78 ± 0,08 *	0,02
455-3p	CORT	2,00 ± 0,62 ^{n.s.}	0,25
	MCHR1	2,32 ± 0,71 ^{n.s.}	0,20
	MMP3	1,19 ± 0,20 ^{n.s.}	0,89
	PARG	1,04 ± 0,12 ^{n.s.}	0,79
	PTPRR	0,71 ± 0,09 *	0,05
486-5p	EphA3	1,09 ± 0,11 ^{n.s.}	0,46
	EphB3	0,70 ± 0,11 *	0,03
	MMP3	1,23 ± 0,09 ^{n.s.}	0,17
SH-SY5Y-Zelllinie			
miRNA (hsa-miR)	Potentielles Zielgen	Relatives mRNA- Expressionsniveau (Vielfaches der Kontrolle)	Signifikanzniveau (P-Wert)
138-2-3p	ERBB4	0,82 ± 0,10 ^{n.s.}	0,17
	PPM1E	1,06 ± 0,06 ^{n.s.}	0,40
152-3p	CCKBR	1,87 ± 0,80 ^{n.s.}	0,35
	CXCL12	2,32 ± 0,88 ^{n.s.}	0,43
	FABP3	0,74 ± 0,04 *	0,02
	Homer1	1,04 ± 0,05 ^{n.s.}	0,57
	Lin28b	0,99 ± 0,12 ^{n.s.}	0,96
	PTPRR	0,89 ± 0,07 ^{n.s.}	0,22
	Ras-GRF1	1,57 ± 0,47 ^{n.s.}	0,41
339-5p	EphB3	1,01 ± 0,09 ^{n.s.}	0,93
	ERBB4	0,83 ± 0,10 ^{n.s.}	0,19
455-3p	CORT	1,13 ± 0,42 ^{n.s.}	0,78
	KCNQ2	0,79 ± 0,09 *	0,04
	MMP3	0,70 ± 0,22 ^{n.s.}	0,51
	PARG	1,05 ± 0,13 ^{n.s.}	0,71
	PTPRR	1,07 ± 0,08 ^{n.s.}	0,48
486-5p	EphA3	0,83 ± 0,28 ^{n.s.}	0,59
	EphB3	0,91 ± 0,12 ^{n.s.}	0,53
	KCNQ2	0,51 ± 0,15 *	0,04
	MMP3	0,29 ± 0,13 *	0,03

Tabelle 22: Bioinformatisch ermittelte putative Bindungsstellen der miRNAs hsa-miR-138-2-3p, -152-3p, -339-5p, -455-3p und -486-5p an potentielle Ziel-mRNAs. (RNA22 v2, <https://cm.jefferson.edu/data-tools-downloads/>).

miRNA (hsa-)	Transkript	"Seed"-Anfang	Faltungsenergie (-Kcal/mol)	Heteroduplex	P-Wert
miR-138-2-3p	ERBB4	1584	-8.00	TG TACTGCTG--AAGGAATGGT :: : : TTGGGACCACAGCACTTTATCG	2.14E-1
miR-138-2-3p	ERBB4	1836	-8.13	TGCTCT-CATTTTAAAGATGGC : : :: : TTGGGACCACAGCACTTTATCG	5.35E-2
miR-138-2-3p	ERBB4	2271	-15.20	GGCTCAGGTGCTTTTGAACGGT :: : :: : : TTGGGACCAC-AGCACTTTATCG	6.99E-2
miR-138-2-3p	ERBB4	2302	-7.50	GTATTTGG-GTACCTGAAGGAGA : : TTGGGACCACA-GCACTTTATCG	6.99E-2
miR-138-2-3p	ERBB4	3222	-5.40	GACTC--GAATAG-GAACCAGT : : : TTGGGACCACAGCACTTTATCG	1.32E-1
miR-138-2-3p	ERBB4	3644	-7.70	CGAGGATGAGTATGTGAATGAGC : TTGGGACCACA-GCACTTTATCG	4.09E-2
miR-138-2-3p	ERBB4	4526	-7.80	TGTCCTAG-CAAGTAAGAATGGC : : : : TTGGGACCACAGCA-CTTTATCG	1.49E-1
miR-138-2-3p	ERBB4	5783	-6.10	GACC-AAATTAGAATCAATAGT : : TTGGGACCACAGCACTTTATCG	2.61E-1
miR-138-2-3p	ERBB4	5884	-5.00	CTTCCT--ATTC-TGAACAAGT : : TTGGGACCACAGCACTTTATCG	4.63E-4
miR-138-2-3p	ERBB4	6467	-7.57	GATTCAGGGGCCACAATCTAATAGC : : TTGGG-ACC--ACAGCACTTTATCG	2.25E-1
miR-138-2-3p	ERBB4	6851	-11.00	GACCCAAATGCTTTATAATAGC : TTGGGACCACAGCACTTTATCG	1.16E-1
miR-138-2-3p	ERBB4	7274	-11.20	AAC--AGGTGAGGAAAGATGGC : : : TTGGGACCACAGCACTTTATCG	2.01E-1
miR-138-2-3p	ERBB4	9422	-8.40	GACCTT--TAGAGGAAAATAGA : : : TTGGGACCACAGCACTTTATCG	8.34E-3
miR-138-2-3p	ERBB4	10161	-6.80	TCCCTATATCATGAGAAGTGGT : : : : TTGGGACCACAGCACTTTATCG	4.98E-3
miR-138-2-	PPM1E	47	-10.50	AGCCCTAGG-CTC-AAAAGCAGC : :	2.57E-1

3p				TTGGGA-CCACAGCACTTTATCG	
miR-138-2-3p	PPM1E	565	-9.20	GACCT--GTG-CCTGCAGCAGC : : : TTGGGACCACAGCACTTTATCG	9.61E-2
miR-138-2-3p	PPM1E	1906	-9.60	GGTCCTGGTGCACCAAAGAAAGC : TTGGGACCAC-AGCACTTTATCG	1.69E-1
miR-138-2-3p	PPM1E	2065	-8.10	TCTCCTGTCTGTTTCAGGGTTGGA : : : : TTGGGAC-CACAGCACTTTATCG	2.01E-1
miR-138-2-3p	PPM1E	2143	-10.55	CACCACTACTCAAAGAAGTGGC : : TTGGGACCACAGCACTTTATCG	6.67E-2
miR-138-2-3p	PPM1E	2283	-10.50	TTCTCTGCCATGGAGGCAAAATAGT : : TTGGGAC--CACAGC-ACTTTATCG	2.73E-1
miR-138-2-3p	PPM1E	2297	-7.80	GGCAAAATAGTTG-GAAAGGGT : : : : : TTGGGACCACAGCACTTTATCG	2.73E-1
miR-138-2-3p	PPM1E	2372	-10.04	TTCCTTGAGCTATAAAATAGA : TTGGGACCACAGCACTTTATCG	7.19E-2
miR-138-2-3p	PPM1E	3467	-9.10	AGCCAGAGG-CCACTGAGAATGC : TTGGG--ACCACAGCACTTTATCG	7.99E-2
miR-138-2-3p	PPM1E	3699	-9.30	GATTCATTCATTCAGTGAAGCAGC : : : TTGGG-ACCACAG-CACTTTATCG	8.63E-2
miR-138-2-3p	PPM1E	4417	-6.00	AAAGAGGGTAAAGGGAAAAAGT TTGGGACCACAGCACTTTATCG	8.49E-2
miR-138-2-3p	PPM1E	4457	-8.40	TTCTCAGTGG-GGAAAAAAATGGC : TTGGG--ACCACAGCACTTTATCG	2.14E-1
miR-138-2-3p	PPM1E	4822	-22.00	CGCCACTGGTGATAGGAAGTAGT : TTGG-GACCACAGCACTTTATCG	1.52E-1
miR-138-2-3p	PPM1E	5171	-7.50	AACAAGTTAGAATAGGAAATAGT TTG-GGACCACAGCACTTTATCG	4.7E-2
miR-138-2-3p	PPM1E	6423	-6.70	CACTTTTGAGTTCAGTTGTAGT : : : : : TTGGGACCACAGCACTTTATCG	2.53E-1
miR-152-3p	CCKBR	426	-8.10	AATCACTCT-TTACGCAGTGA : GGTTCAAGACAGTACGTGACT	3.18E-1
miR-152-3p	CCKBR	900	-12.10	CCAGACCTGGTC-CGTACTGC : GGTTCAAGACAGTACGTGACT	1.15E-1
miR-152-3p	CCKBR	1147	-13.20	CCACGTTCCCGGCCTGCCCTGG GGTTCAAG-ACAGTACGTGACT	1.71E-1

miR-152-3p	CCKBR	1626	-19.30	GCAGGGCAAATGACATGCACTGA : GGTTC--AAGACAGTACGTGACT	1.77E-2
miR-152-3p	CCKBR	1885	-11.80	GGGAACTCTGACAAGGGCTGA : GGTTCAAGACAGTACGTGACT	4.23E-2
miR-152-3p	CCKBR	2061	-21.80	CCAACAGGCTGTTCTGCACTGA : GGTT-CAAGACAGTACGTGACT	1.6E-1
miR-152-3p	CXCL12	816	-6.10	GAAGGCTTCTCTCTGTGGGATGG : : : : GGTTC-AAGACAG-TACGTGACT	2.34E-1
miR-152-3p	CXCL12	1238	-14.30	TGTCTTGATG-CATGCACTGT GGTTCAAGACAGTACGTGACT	9.89E-2
miR-152-3p	CXCL12	1256	-11.40	GTTCCCCCTGTGCAGCCGCTGA : GGTTCAAGACA-GTACGTGACT	9.89E-2
miR-152-3p	CXCL12	1374	-9.90	CATGGT-GGGTCCATGGGCAGA : : GGTTCAAGACAG-TACGTGACT	3.45E-2
miR-152-3p	CXCL12	1651	-11.70	CTGGGCCCTCTC-TGCTCTGC : GGTTCAAGACAGTACGTGACT	6.95E-2
miR-152-3p	CXCL12	1762	-8.52	GAGTGTTCCCTTCCACTGA GGTTCAAGACAGTACGTGACT	3.47E-1
miR-152-3p	CXCL12	2472	-5.52	AAGAGT-AGAACTGCAGGGA : GGTTCAAGACAGTACGTGACT	1.53E-1
miR-152-3p	CXCL12	2572	-5.70	TACAGT-CTTCCATTTGCAAGGG : GGTTCAAGACAGT--ACGTGACT	1.74E-1
miR-152-3p	CXCL12	2855	-19.60	CC-CCCTCTGTCCAGGCACTGA GGTTCAAGACAG-TACGTGACT	6.08E-2
miR-152-3p	CXCL12	2997	-10.00	AGATGTTCTAAGTCTTTCCATTGG : : GGTTCAAGA--CAG-TACGTGACT	1.1E-1
miR-152-3p	CXCL12	3130	-11.10	ATGAGAATTTG-AGTGCTCTGA : : : GGTTC-AAGACAGTACGTGACT	1.8E-1
miR-152-3p	CXCL12	3220	-9.00	CCAAATCCCCTAAGCAGACCACTGA GGTT--CAAGA-CAGT-ACGTGACT	9.15E-2
miR-152-3p	FABP3	448	-8.12	ATGAGAAAGAGGCATGACCTGA : GGTTC-AAGACAGTACGTGACT	2.42E-1
miR-152-3p	FABP3	459	-11.60	GCATGACCTGAC-TGCACTGT GGTTCAAGACAGTACGTGACT	2.42E-1
miR-	FABP3	982	-8.90	TCAGG-CCCATCCTACACTGA	5.08E-2

152-3p				: : GGTTCAAGACAGTACGTGACT	
miR-152-3p	Homer1	401	-6.70	CCA-CCTCTTCTC-TGCTCCGA GGTTCAAGA-CAGTACGTGACT	5.73E-2
miR-152-3p	Homer1	455	-8.80	CCAA--TGTGGAGTGCCGTGC : GGTTCAAGACAGTACGTGACT	5.73E-2
miR-152-3p	Homer1	1145	-8.10	GCAAG-CATG-CAGTTACTGT : GGTTCAAGACAGTACGTGACT	5.73E-2
miR-152-3p	Homer1	1277	-11.90	AGAAGTTTGGCCAGTGGGCTGA : : : GGTTCAAG-ACAGTACGTGACT	1.77E-1
miR-152-3p	Homer1	1307	-7.00	CAAACACCGTTTATGGATTGG : : : GGTTCAAGACAGTACGTGACT	3.11E-1
miR-152-3p	Homer1	1558	-11.40	CCAA-CTC-AGAATGCATTGC : GGTTCAAGACAGTACGTGACT	7.74E-2
miR-152-3p	Homer1	2708	-8.10	TTCTCCCTTTTTGTGCTGG : : GGTTCAAGACAGTACGTGACT	2.57E-1
miR-152-3p	Homer1	3556	-16.10	TGGAGT-CTATAAATGCACTGA : GGTTCAAGA-CAGTACGTGACT	2.14E-1
miR-152-3p	Lin28b	3530	-6.80	TGTGCATATGTGAATATCACTGA GGTTCAAGACAGT--ACGTGACT	1.38E-1
miR-152-3p	Lin28b	4386	-8.40	GGAAGTTTAG-AGTGCAATGT : : GGTTCAAGACAGTACGTGACT	1.16E-1
miR-152-3p	Lin28b	4945	-11.20	GCAAGTTATGGTAAAGTACTGT : GGTTCAA-GACAGTACGTGACT	2.38E-1
miR-152-3p	Lin28b	4951	-8.80	TATGGTAAAGTACTGTACTGT : : GGTTCAAGACAGTACGTGACT	2.38E-1
miR-152-3p	Lin28b	5059	-9.70	ATCACATCTATCAACCACTGG : GGTTCAAGACAGTACGTGACT	2.5E-1
miR-152-3p	PTPRR	117	-7.40	CCACCCTGCCGTCTCCGCCTTGG : : GGT-TCAAGACAG-TACGTGACT	1.95E-1
miR-152-3p	PTPRR	271	-7.60	CCACAGACTGAC-TGCTCTGC GGTTCAAGACAGTACGTGACT	1.04E-1
miR-152-3p	PTPRR	937	-10.70	GGAATTTCTG--ATGCTCTGC GGTTCAAGACAGTACGTGACT	7.97E-2
miR-152-3p	PTPRR	2277	-9.70	CCAGCTTC--GTATGGATAGA : : :	2.64E-2

				GGTCAAGACAGTACGTGACT	
miR-152-3p	PTPRR	2457	-7.80	AGAAGGAGCT-TCCTGCAATGG : GGTTC-AAGACAGTACGTGACT	3.27E-2
miR-152-3p	PTPRR	2500	-12.00	CCATGT-ATGGCATGGATTGT : GGTCAAGACAGTACGTGACT	3.27E-2
miR-152-3p	Ras-GRF1	316	-10.80	CGGGGGGCTG-C-TGCGCGGA : GGTCAAGACAGTACGTGACT	1.52E-2
miR-152-3p	Ras-GRF1	1871	-10.70	TGATTATCTGTACCAGAGGCTCTGG : GGTCAAGACA--GT--ACGTGACT	2.5E-1
miR-152-3p	Ras-GRF1	2891	-9.30	GAGAG--GAGTCAGATATTGA : : GGTCAAGACAGTACGTGACT	4.2E-2
miR-152-3p	Ras-GRF1	3197	-11.10	ACAAGGAGTTTGTGATCCGCAGA : : GGTTC--AAGACAGTACGTGACT	8.32E-3
miR-152-3p	Ras-GRF1	4765	-7.60	GGGAGTCCTCTC-TGCTCAGA : GGTCAAGACAGTACGTGACT	1.5E-2
miR-152-3p	Ras-GRF1	5205	-7.60	TTTTACACTGTACA-GTATAGA : GGTCAAGACA-GTACGTGACT	4.5E-2
miR-152-3p	Ras-GRF1	5813	-10.70	CTGGATGTTGATGTCTGCTGGGCTGC : : GGTT--CAA-GACAG--TACGTGACT	2.14E-1
miR-152-3p	Ras-GRF1	5820	-14.10	TTGATGTCTGCTGGGCTGCACTGG : : GGTT-CA--AGACAGTACGTGACT	2.14E-1
miR-152-3p	Ras-GRF1	5963	-5.70	CCAGATGCCATCCTGCCCAGA : GGTCAAGACAGTACGTGACT	8.11E-2
miR-152-3p	Ras-GRF1	6024	-10.40	CCACCCTCAGTCACAGGCATGGG : : GGTCAAGACAGT--ACGTGACT	5.66E-2
miR-339-5p	EphB3	1569	-16.60	AAGAAGTGCCATGGGGCTGGAGGGG : : : GCACTCGAGG-ACCTC-CTGTCCCT	5.25E-2
miR-339-5p	EphB3	2174	-13.70	CGTCTGCCTCAGGA-AGCAGCGA : GCACTCGAGGACCTCCTGTCCCT	2.85E-1
miR-339-5p	EphB3	3857	-19.40	GAGGGGACTCCAGGA--ATGGGGA : : GCACTC-GAGGACCTCCTGTCCCT	8.1E-2
miR-339-5p	EphB3	3907	-15.30	TTGCACCTCCAGTTTGCACAGGGA GCACTCGAGG-ACCTCCTGTCCCT	8.1E-2
miR-339-5p	ERBB4	4083	-7.20	CACTCCCAGTGGAAGATACAGA : GCACTCGAGGACCTCCTGTCCCT	3.03E-1

miR-339-5p	ERBB4	5218	-12.60	ACCTTGCAAC-GGTATCCAGGGA GCACTCGAGGACCTCCTGTCCCT	1.06E-1
miR-339-5p	ERBB4	5635	-9.90	GATGAGAAC--AAATGACAGAGA GCACTCGAGGACCTCCTGTCCCT	3.07E-1
miR-455-3p	CORT	1152	-6.60	TTATTTCAAGTTTATGAATTGA :: : CACATATACGGGTACCTGACG	8.87E-2
miR-455-3p	CORT	1163	-5.50	TATGAATTG-ATATGAATTGT : : CACATATACGGGTACCTGACG	8.87E-2
miR-455-3p	KCNQ2	1623	-11.20	GAGCTGGAGCTTCGGGGACCGC : CACATATACGGG-TACCTGACG	1.82E-3
miR-455-3p	KCNQ2	2480	-20.50	AGGAGGACACCC-CGGGCTGC : CACATATACGGGTACCTGACG	1.31E-1
miR-455-3p	KCNQ2	2987	-12.40	CAACAGGGGCTGGAGGGCTGG : : CACATATACGGGTACCTGACG	3.15E-1
miR-455-3p	MCHR1	390	-15.10	GTG-GCAGGCGCTGGAGGCTGC : CACATATACG-GGTACCTGACG	1.01E-2
miR-455-3p	MCHR1	1401	-13.20	TTGTGTA-CATCGTCTGT : : : CACATATACGGGTACCTGACG	2.1E-2
miR-455-3p	MCHR1	1455	-16.50	AGCCTGCAGCCCAGGGGCAGC : CACATATACGGGTACCTGACG	1.79E-1
miR-455-3p	MMP3	217	-5.50	TTGT-TAGGAGAAAGGACAGT : CACATATACGGGTACCTGACG	3.78E-1
miR-455-3p	MMP3	265	-11.00	TGCAGAAGTTCCTTGGATTGG : : CACATATACGGGTACCTGACG	5.5E-3
miR-455-3p	MMP3	1024	-6.80	GGAAGCTTGAACCTGAATTGC : CACATATACGGGTACCTGACG	7.46E-2
miR-455-3p	PARG	3512	-17.50	TTGTGAAATCCCATGGAAGGT : : CACATATACGGGTACCTGACG	1.72E-1
miR-455-3p	PARG	3690	-9.80	CTTAATATGCT--TGCATTGT : : CACATATACGGGTACCTGACG	1.35E-1
miR-455-3p	PARG	3844	-8.90	TTTTATCTGT-AATGTTTGT : CACATATACGGGTACCTGACG	2.46E-1
miR-455-3p	PTPRR	2162	-11.10	CTGTGGTTGTCCACTGCAGTGC : CACATATACGGGT-ACCTGACG	1.49E-1
miR-	PTPRR	2326	-17.40	GAATTTGTGCACCATGCTCTGT	4.25E-2

				GAGCCCCGT-CGAGTCATGTCCT	
miR-486-5p	EphB3	3786	-15.30	CAGGGCCCAGCCC-TGGCAGGG : : GAGCCCCGTCGAGTCATGTCCT	1.1E-1
miR-486-5p	KCNQ2	854	-8.90	ATGCCACAGCAAGGAGCTGGT : : GAGCCCCGTCGAGTCATGTCCT	1.16E-1
miR-486-5p	KCNQ2	2461	-14.40	AGCATGG-AGTTCCTGCGGCAGGA : : GAGCCCCGTCGAG--TCATGTCCT	1.31E-1
miR-486-5p	KCNQ2	2898	-15.00	AGTGTGGCGG-GAAGGGTGGGC : : : GAGCCCCGTCGAGTCATGTCCT	2.04E-1
miR-486-5p	KCNQ2	3150	-12.80	GTTGTCTCAGCCGAGCCCAGGG : GAGCCCCGTCGAGTCATGTCCT	1.27E-1
miR-486-5p	KCNQ2	3166	-19.10	CCAGGGGAGGCACAAAGGGCAGGC : GAGCCCCGTCG--AGTCATGTCCT	1.27E-1
miR-486-5p	MMP3	670	-7.30	AATGGACAAAGG-ATACAACAGGG : : : GAGCC--CCGTCGAGTCATGTCCT	1.97E-1
miR-486-5p	MMP3	1261	-9.40	AAACATATTTCTTTGTAGAGGA : GAGCCCCGTCGAGTCATGTCCT	4.16E-2

IV. Diskussion

miRNAs sind kleine RNAs (ca. 22 Nukleotide), die durch Interaktion mit Ziel-mRNAs deren Degradation induzieren bzw. die Translation der jeweiligen mRNA inhibieren. Diesen durch miRNAs vermittelten Wirkungen wird eine wichtige Rolle bei vielen biologischen Prozessen und verschiedenen Erkrankungen zugeschrieben. Bislang sind miRNA-Expressionsänderungen und deren funktionellen Konsequenzen für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie (HE) jedoch nur unzureichend untersucht worden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Wirkungen von Ammoniak, einem Schlüsseltoxin in der Pathogenese der HE (Butterworth *et al.*, 1987), auf das miRnom und Transkriptom kultivierter Rattenastrozyten untersucht.

In einem weiteren Ansatz wurden Änderungen der miRNA- und Genexpression in *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit und ohne hepatische Enzephalopathie untersucht und potentielle Zielgene der bei Zirrhosepatienten mit HE regulierten miRNA-Spezies bioinformatisch identifiziert und experimentell durch Transfektion humaner Astrozytoma- und Neuroblastomazelllinien mit miRNA-Mimetika überprüft.

1. Ammoniak-induzierte miRNA- und Genexpressionsänderungen in Astrozyten *in vitro*

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig miRNA Expressionsänderungen in mit Ammoniak behandelten kultivierten Astrozyten untersucht und potentielle miRNA Zielgene mit Hilfe von Genarrays sowie bioinformatischer Analyse identifiziert (Abb. 11A/B, 12A/B, 15). Die im Array identifizierten, durch Ammoniak vermittelten miRNA und Genexpressionsänderungen wurden nachfolgend durch quantitative Realtime-PCR-Analyse validiert. Dieser Untersuchungsansatz wurde gewählt, da sowohl die Array-basierte Identifizierung verändert exprimierter miRNAs und mRNAs, als auch die bioinformatische miRNA-Zielgenvorhersage eine hohe Fehlerquote aufweisen können (Muniategui *et al.*, 2013). Mit Hilfe des bioinformatischen Tools AltAnalyze wurden aus den durch Ammoniak vermittelten Genexpressionsänderungen resultierende Beeinflussungen biologischer Funktionen und Signalwege vorhergesagt. Dabei weisen die durch NH₄Cl (5 mmol/l, 48 Std.) herbeigeführten Genexpressionsänderungen auf eine veränderte Proteinprozessierung im endoplasmatischen Retikulum (ER), einer Aktivierung des p53- und MAPK-Signalwegs sowie auf eine Beeinflussung des Zellzyklus (Abb. 14A/B). Diese Ergebnisse stehen sowohl in Einklang mit Befunden von Görg *et al.* (2015), die Ammoniak-induzierte Astrozytenseneszenz zeigen und den Ergebnissen von

Jördens *et al.* (2015), die auf durch Ammoniak-induzierten ER-Stress weisen. Es kann darüber hinaus spekuliert werden, dass die durch Ammoniak vermittelte Störung der Proteinprozessierung im ER in Zusammenhang steht mit der Hemmung des Zellzyklus und der Induktion von Seneszenz.

In der vorliegenden Arbeit gelang es den überwiegenden Teil exemplarisch ausgewählter im Array identifizierter miRNA- (13 von 16) und mRNA- (26 von 27) Expressionsänderungen durch Realtime-PCR zu validieren (Abb. 13, 16), was die Verlässlichkeit der verwendeten Array-Systeme unter diesen experimentellen Bedingungen belegt.

Interessanterweise wurden im miRNA-Array ausschließlich herunterregulierte miRNA-Spezies in mit Ammoniak behandelten Rattenastrozyten gefunden (Abb. 11A, 12A). Da der Array nur einen Bruchteil der mittlerweile bekannten miRNA-Spezies abdeckt und darüber hinaus kontinuierlich neue miRNA-Spezies identifiziert werden, kann aus den vorliegenden Untersuchungen nicht gefolgert werden, dass Ammoniak generell die Synthese von miRNAs in kultivierten Astrozyten blockiert. Zur Beantwortung dieser Frage, könnte in die Expression und Aktivität von Proteinen der miRNA-Prozessierungsmaschinerie untersucht werden.

Im Gegensatz zum miRNA-Array, zeigte die Genarrayanalyse sowohl verringert, als auch verstärkt exprimierte Gene in mit Ammoniak behandelten kultivierten Rattenastrozyten. Mittels bioinformatischer Analyse konnte unter den 142 in der Genarrayanalyse identifizierten Gene, die durch Ammoniakbehandlung verstärkt in kultivierten Rattenastrozyten exprimiert wurden, 43 identifiziert werden, die potentielle Zielgene herunterregulierter miRNAs darstellen (Abb. 15). Die meisten der hier ermittelten Gene repräsentieren potentielle Zielgene mehrerer nach Ammoniakbehandlung herunterregulierter miRNA-Spezies. Dies lässt vermuten, dass Ammoniak nicht die Expression individueller miRNA-Spezies moduliert, sondern regulatorische miRNA-Netzwerke in Astrozyten beeinflusst. Zusätzlich wurden mit Hilfe von AltAnalyse auf Basis der durch Ammoniak-induzierten Genexpressionsänderungen miRNA-Expressionsänderungen vorhergesagt. Hierbei wies die veränderte Expression einer Vielzahl von Genen auf eine damit in Verbindung stehende Expressionsänderung von miR-348 hin. Tatsächlich gelang es mittels miRNA-Array und miQPCR zu validieren, dass die Expression der miR-348 durch Ammoniakbehandlung erniedrigt wird. Dieses Ergebnis belegt die komplexe Wirkung einer einzelnen miRNA auf die Expression verschiedener Gene und Gen-Netzwerke (Abb. 14C).

Die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies (RNOS) spielt eine zentrale Rolle für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie (Görg *et al.*, 2013b). Jüngere Arbeiten zeigen außerdem, dass RNOS die Expression spezifischer miRNA-Spezies regulieren (Cheng *et al.*, 2013). Die funktionelle Bedeutung dieser sogenannten „RedoximiRs“ ist nur wenig verstanden, aber es wird vermutet, dass RedoximiRs durch Regulation des Nrf2-Signalweges die Redoxhomöostase beeinflussen

(Cheng *et al.*, 2013). In Übereinstimmung damit induziert Ammoniak die nukleäre Akkumulation von Nrf2 und eine verstärkte Expression Nrf2-regulierter Gene wie z.B. der Hämoxigenase-1 (Warskulat *et al.*, 2002; Kruczek *et al.*, 2011).

Die durch Ammoniak in kultivierten Rattenastrozyten induzierte Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies kultivierter Rattenastrozyten ist sensitiv gegenüber dem Glutaminsynthetasehemmstoff MSO (Murthy *et al.*, 2001; Schliess *et al.*, 2002; Görg *et al.*, 2015) und beruht u.a. auf einer Aktivierung der NADPH-Oxidase (Reinehr *et al.*, 2007). Zur Identifizierung potentieller RedoximiRs unter den durch Ammoniak herunterregulierten miRNA-Spezies wurde daher der Einfluss einer Hemmung der NADPH-Oxidase durch Apocynin und der Glutaminsynthetase durch MSO auf die Expression durch Ammoniak-regulierter miRNAs untersucht (Abb. 18A/B). Tatsächlich blockierten sowohl Apocynin, als auch MSO die durch Ammoniak vermittelte Herunterregulation der miRNAs rno-miR-31a-5p, -221-3p, -222-3p und -326-3p, so dass in der vorliegenden Arbeit diese miRNA-Spezies erstmalig als neue Vertreter der RedoximiR-Familie identifiziert werden konnten. In Übereinstimmung mit der Bedeutung von RedoximiRs für die Redoxhomöostase regulieren alle genannten miRNAs die Expression der Hämoxigenase-1 (HO-1), die eine bedeutsame Rolle für die Redoxhomöostase bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen spielt (Schipper *et al.*, 2009).

In Übereinstimmung mit früheren Befunden (Warskulat *et al.*, 2002) wurde auch in der vorliegenden Arbeit eine Steigerung der HO-1 mRNA durch Ammoniak in Astrozyten gefunden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen darüber hinaus erstmalig, dass die Ammoniak-induzierte Hochregulation der HO-1 mRNA signifikant durch Hemmung der NADPH-Oxidase oder der Glutaminsynthetase verhindert werden kann (Abb. 17). Letzterer Befund steht in Widerspruch zu Befunden von Warskulat *et al.* (2002), die keine MSO-Sensitivität der Ammoniak-induzierten HO-1 Hochregulation zeigen konnten. Diese Diskrepanz ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die bei Warskulat *et al.* (2002) verwendete Northern-Blot-Technik nur eine semiquantitative Analyse durch Messung der optischen Dichte eines geschwärzten Films erlaubt und dadurch deutlich insensitiver und weniger akkurat ist. Im Gegensatz zum Northern-Blot ist die Realtime-PCR-Methode eine äußerst sensitive und zuverlässige Technik, durch die selbst geringfügige Genexpressionsänderungen reproduzierbar belegt werden können. Darüber hinaus untersuchte Warskulat *et al.* (2002) die Wirkung von MSO auf die HO-1 Expression 48 Std. und nicht wie in der vorliegende Arbeit 72 Std. nach NH₄Cl-Exposition.

Da sowohl die durch Ammoniak induzierte Expressionserniedrigung der in der vorliegende Arbeit identifizierten RedoximiRs, als auch die Expressionssteigerung des potentiellen Zielgens HO-1 durch MSO und Apocynin gehemmt werden konnte, kann vermutet werden, dass oxidativer Stress die HO-1 mRNA Expression über eine Expressionserniedrigung von RedoximiRs steigert. In Einklang damit

erhöhten spezifisch gegen die miRNA-Spezies rno-miR-31a-5p, -221-3p, -221-5p, -222-3p, -326-3p oder -365-3p gerichtete miRNA-Inhibitoren sowohl die HO-1 mRNA-, wie auch die Proteinexpression (Abb. 19A/B). Eine gleichzeitige Herunterregulation aller HO-1 regulierenden miRNA-Spezies durch Transfektion mit miRNA-Inhibitoren (Kombination von rno-miR-31a-5p, -221-3p, -221-5p, -222-3p, -326-3p, und -365-3p) in kultivierten Rattenastrozyten erhöhte synergistisch die HO-1 mRNA Expression (Abb.21A/B). In Übereinstimmung damit, binden die für die Transfektion verwendeten miRNA-Spezies mit Ausnahme von 2 miRNAs (rno-miR-221-3p und -222-3p) an unterschiedliche Bereiche in der HO-1 mRNA Nukleotidsequenz (Tab. 19, 20).

Interessanterweise spielen die HO-1 wie auch weitere durch bioinformatische Analyse identifizierte potentielle Zielgene durch Ammoniak in Astrozyten herunterregulierter miRNAs wie z.B. GADD45 α , Serpine1, Creb3I1, Myc eine wichtige Rolle für zelluläre Seneszenz. Diese Genexpressionsänderungen stehen in Einklang mit einer kürzlich erschienenen Arbeit, die erstmalig zeigt, dass Ammoniak Seneszenz in kultivierten Rattenastrozyten induziert und dass Seneszenzbiomarker im Gehirn von Zirrhosepatienten mit HE verstärkt exprimiert werden (Görg *et al.*, 2015). Während diese Untersuchung erstmalig einen Erklärungsansatz für die Persistenz kognitiver Beeinträchtigungen nach Auflösung akuter HE-Episoden beim Leberzirrhosepatienten mit HE bietet, konnten die Seneszenz-induzierenden molekularen Mechanismen nicht vollständig aufgeklärt werden (Görg *et al.*, 2015). Interessanterweise wird die durch Ammoniak induzierte Astrozytenseneszenz (Görg *et al.*, 2015) wie auch die Herunterregulation von RedoximiRs (Abb. 16A) und die Herunterregulation der HO-1 (Abb. 17) gleichsam durch den NADPH-Oxidasehemmstoff Apocynin, wie auch den Glutaminsynthetasehemmstoff MSO verhindert. Zudem existieren in der Literatur bereits Hinweise darauf, dass eine experimentelle Überexpression der HO-1 in Astrozyten Seneszenz induziert (Schipper *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde daher überprüft, ob eine Hemmung der HO-1 regulierenden und durch Ammoniak-herunterregulierten RedoximiRs in Astrozyten die Astrozytenproliferation beeinflusst. Tatsächlich zeigen die Ergebnisse, dass eine Hochregulation der HO-1 durch individuelle Inhibition der RedoximiR-Spezies rno-miR-221-3p, -221-5p, -222-3p und -326-3p (Abb. 19A/B) die Astrozytenproliferation hemmt (Abb. 22A). Dabei wurde die miRNA-Inhibitor-vermittelte Hemmung der Astrozytenproliferation vollständig durch den HO-1-Hemmstoff Zinn-Protoporphyrin IX (SnPP) aufgehoben (Abb. 22B). Auch die durch Ammoniak induzierte Proliferationshemmung kultivierter Astrozyten konnte vollständig durch den HO-1-Hemmstoff SnPP blockiert werden (Abb. 24).

Interessanterweise induziert eine Astrozytenschwellung *per se* die Bildung von oxidativen/nitrosativen Stress (Schliess *et al.*, 2004) und steigert die Expression der HO-1 (Warskulat *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang zeigt die vorliegende Arbeit in Übereinstimmung mit Warskulat *et al.* (2002), dass eine experimentell durch hypoosmotisches Zellkulturmedium herbeigeführte Astrozytenschwellung nicht nur die Expression der HO-1 mRNA steigert (Abb. 26A), sondern darüber

hinaus auch erstmalig, dass gleichzeitig die Expression HO-1 reprimierender miRNAs (rno-miR-221-5p und -326-3p, Abb. 25A) vermindert und die Astrozytenproliferation in HO-1-abhängiger Weise gehemmt wird (Abb. 26B). Auch die Hemmung der durch Ammoniak induzierten Expressionssteigerung der HO-1 (Warskulat *et al.*, 2002 und Abb. 17, diese Arbeit) durch Taurin verhindert Astrozytenseneszenz gemessen an der Proliferation (Abb. 24), sowie die Hochregulation des Seneszenzbiomarkers GADD45 α (Abb. 23B). Derzeitig ist nicht bekannt, über welchen Mechanismus Taurin die Hochregulation der HO-1 in Astrozyten hemmt. Taurin ist zum einen ein wichtiges organisches Osmolyt und zum anderen ein starkes Antioxidanz (Huxtable, 1992). Eine durch Ammoniak oder hypoosmotischem Zellkulturmedium herbeigeführte Taurindepletion könnte die Hochregulation der HO-1 in kultivierten Astrozyten begünstigen. Zukünftige Untersuchungen müssen klären, ob Taurin die Ammoniak-induzierte Herunterregulation HO-1-reprimierender RedoximiRs in Astrozyten aufhebt.

Interessanterweise ist die Lebenserwartung Taurintransporter (TauT)-defizienter Mäuse (TauT^{-/-}), die deutlich erniedrigte Taurinspiegel im Gehirn gegenüber Wildtyp-Mäusen (Heller-Stilb *et al.*, 2002) aufweisen, verringert (Ito *et al.*, 2014). Die vorliegende Arbeit zeigt nun, dass dies mit einer erhöhten HO-1 und GADD45 α mRNA Expression im zerebralen Kortex der TauT^{-/-} Maus einhergeht, so dass vermutet werden kann, dass Taurin eine protektive Funktion im Zusammenhang mit Alterung und Seneszenz zukommt. Interessanterweise zeigen TauT^{-/-} Mäuse mitochondriale Funktionsstörungen (Warskulat *et al.*, 2006) und diesen wird eine zentrale Bedeutung für die Entstehung von Seneszenz zugeschrieben (Schipper *et al.*, 2009).

In Übereinstimmung damit existieren Hinweise in der Literatur, die für eine Beeinträchtigung mitochondrialer Funktionen bei hepatischer Enzephalopathie sprechen. So zeigen Untersuchungen an kultivierten Astrozyten, dass Ammoniak die „Mitochondria Permeability Transition“ induziert (Bai *et al.*, 2001), den mitochondrialen Energiestoffwechsel beeinträchtigt (Chadipiralla *et al.*, 2012; Rama Rao & Norenberg, 2012) und die Bildung von ROS in Mitochondrien induziert (Görg *et al.*, 2015). Die den Ammoniak-vermittelten Mitochondrienfunktionsstörungen zugrunde liegenden Mechanismen sind bislang nicht verstanden, aber es wurde vermutet, dass hierbei der Import von Glutamin und eine Glutaminase-vermittelte Ammoniakfreisetzung in Mitochondrien eine bedeutsame Rolle spielen (Rama Rao & Norenberg, 2014).

Neuere Studien zeigen, dass eine Überexpression der HO-1 in kultivierten Astrozyten miRNA Expressionsänderungen induziert (Lin *et al.*, 2015). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die HO-1 nicht nur ein Zielgen spezifischer miRNA-Spezies ist, sondern Teil eines komplexen regulatorischen Netzwerkes, in dem miRNA-vermittelte HO-1 Genexpressionsänderungen nachfolgend weitere miRNA-Expressionsänderungen nach sich ziehen. Interessanterweise waren die durch

Überexpression der HO-1 vermittelten miRNA-Expressionsänderungen (Lin *et al.*, 2015) mit Ausnahmen der miRNA-Spezies rno-miR-187 und -181a verschieden zu denen, die in mit Ammoniak-behandelten Astrozyten identifiziert wurden. Es ist denkbar, dass unterschiedliche Kinetiken und weitere bislang unbekannte Mechanismen zu diesen Unterschieden beitragen.

Bislang existieren nur sehr wenige Informationen zu miRNA Expressionsänderungen bei hepatischer Enzephalopathie. Die einzige in diesem Zusammenhang gegenwärtig in PubMed gelistete Publikation zeigt mit Hilfe von Microarray-Analyse identifizierte miRNA Expressionsänderungen im zerebralen Kortex in einem Mausmodell, in dem durch Verabreichung von Azoxymethan ein akutes Leberversagen induziert wurde. Allerdings wurden die Array-Ergebnisse nicht durch weitere Untersuchungen validiert und auch die über bioinformatische Analyse identifizierten potentiellen Zielgene wurden nicht weitergehend überprüft (Vemuganti *et al.*, 2014).

Zusammenfassend zeigen die Befunde der vorliegenden Arbeit, dass Ammoniak über die Bildung von oxidativen Stress HO-1-reprimierende miRNAs herunterreguliert und auf diese Weise die Expression der HO-1 steigert und HO-1 abhängig Astrozytenseszenz vermittelt (Abb.35). In der vorliegenden Arbeit konnte hingegen nicht geklärt werden, ob die identifizierten, potentiell die HO-1 regulierenden miRNAs eine Herunterregulation der HO-1 durch direkte Interaktion mit der HO-1 vermitteln. Zur Klärung dieser Frage sind weitere Untersuchungen notwendig.

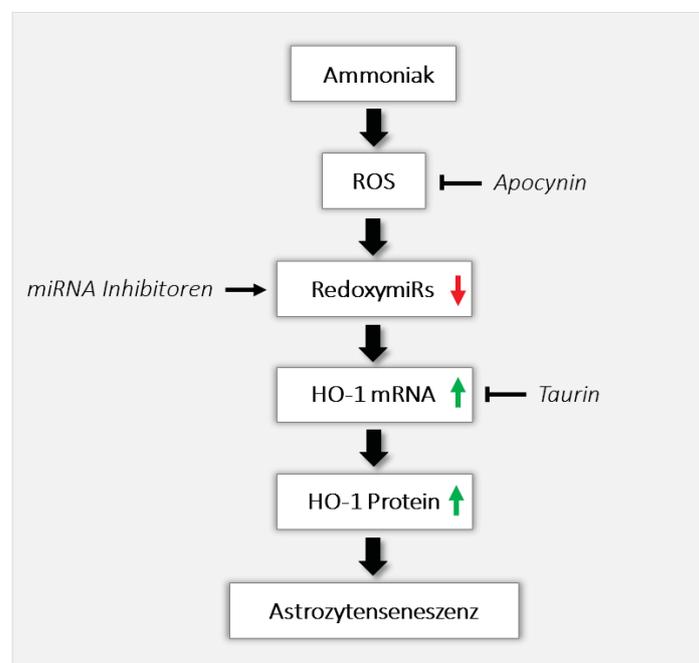


Abbildung 35: Hypothese zur Beteiligung von miRNAs an der durch Ammoniak induzierten Astrozytenseszenz. Ammoniak erhöht NADPH-Oxidase-vermittelt die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Astrozyten, welche die Expression HO-1-reprimierender RedoxymiRs hemmt und hierüber eine Expressionssteigerung der HO-1 mRNA und des Proteins induziert. Die

Hochregulation der HO-1 ist mit der Induktion von Seneszenz in Astrozyten über einen bislang unbekanntem Mechanismus assoziiert.

2. Zerebrale miRNA Expressionsänderungen bei hepatischer Enzephalopathie

In einem zweiten Untersuchungsansatz wurden miRNA- und Genexpressionsänderungen in *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit oder ohne HE im Vergleich zu Kontrollpatienten ohne Erkrankungen des Gehirns untersucht. Im Gehirn von Zirrhosepatienten mit HE verändert exprimierte Gene wurde verglichen mit durch bioinformatische Analyse ermittelten potentiellen Zielgenen von verändert exprimierten miRNA-Spezies.

Mit Hilfe einer Transkriptomanalyse konnten in der vorliegenden Arbeit Genexpressionsänderungen in *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE identifiziert werden (Abb. 27). Diese Untersuchungen wurden mit Probenmaterial einer australischen Kohorte durchgeführt, welches aus dem *Gyrus fusiforme* entnommen wurde (Kohorte 1). Insgesamt waren 945 Gene im Gehirn der HE-Patienten gegenüber Kontrollpatienten hoch- und 602 Gene herunterreguliert (Abb. 27).

Mit Hilfe der Microarray-basierten miRnom-Analyse konnten gegenüber den Kontrollpatienten 25 signifikant hochregulierte miRNA-Spezies im Gehirn von Zirrhosepatienten mit HE identifiziert werden. Demgegenüber war keine der 2005 auf dem Array repräsentierten miRNA-Spezies gegenüber den Kontrollen verringert exprimiert. 23 der 25 hochregulierten miRNA-Spezies konnten als HE-spezifische miRNA-Expressionsänderungen identifiziert werden und lediglich 2 von 25 waren ebenfalls bei Leberzirrhosepatienten ohne HE hochreguliert (Abb. 28B). Verglichen mit Zirrhosepatienten mit HE waren bei Leberzirrhosepatienten ohne HE mehr als doppelt so viele miRNA-Spezies im Gehirn gegenüber Kontrollpatienten hochreguliert (54) und darüber hinaus 108 gegenüber Kontrollpatienten vermindert exprimiert.

Die Quantifizierung von miRNA Expressionsänderungen mittels Microarray ist aufgrund der geringen Basenzahl der zu untersuchenden Nukleotide fehleranfällig, da für die Hybridisierung mit komplementären aber spezifischen Sonden nur kurze Bereiche zur Verfügung stehen. Daher wurden die im Array gefundenen miRNA Expressionsunterschiede mit der miQPCR überprüft, die auf dem Prinzip der quantitativen Realtime-PCR beruht (Benes & Castoldi, 2010).

Mit Hilfe der miQPCR-Technik gelang es unter Verwendung miRNA-spezifischer Primer eine tendenzielle Hochregulation von 13 der 25 im Array identifizierten, hochregulierten miRNA-Spezies im Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE der australischen Kohorte (Kohorte 1) zu zeigen (Abb. 29).

Aufgrund der großen Variabilität zwischen den einzelnen Proben konnten jedoch keine statistisch signifikanten Veränderungen gezeigt werden. Die hohe Streuung der miRNA-Expressionswerte in der miQPCR ist höchstwahrscheinlich Folge der deutlich höheren Sensitivität der Realtime-PCR gegenüber der Array-basierten Analyse. Zur weiteren Überprüfung und Erhöhung der Anzahl untersuchter Proben wurde die Expression dieser 13 miRNA-Spezies in *post mortem* Hirngewebe der europäischen Kohorte (Kohorte 2), welches aus dem *Gyrus fusiforme* entnommen wurde, untersucht. Unter Einbeziehung der Proben der Kohorte 2 konnte für 1 miRNA (hsa-miR-1225-3p) eine signifikante Hochregulation gezeigt werden und der Trend zu einer Hochregulation für weitere 9 miRNA-Spezies bestätigt werden (Abb. 30).

Für eine Vielzahl der im Array gefundenen miRNA-Expressionsänderungen im Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE konnte keine signifikante Expressionsänderung sondern nur eine tendenzielle Erhöhung mit der miQPCR-Technik gezeigt werden. Es ist denkbar, dass die hohe Variabilität in der Expression Folge unterschiedlich starker Degradation im Hirngewebe nach Eintritt des Todes ist oder auf eine beeinträchtigte miRNA-Isolation durch bislang unbekannte Faktoren in den individuellen Proben ist. Problematisch ist hierbei insbesondere, dass keine miRNA-Spezies bekannt ist, die im Gehirn als verlässliche Housekeeping-miRNA fungieren könnte. Daher ist es nicht möglich das miRNA Expressionsniveau auf einen internen Standard für die Quantifizierung zu normalisieren. Andererseits muss auch berücksichtigt werden, dass unterschiedliche Zelltypen im Gehirn miRNAs individuell regulieren und basal unterschiedlich stark exprimieren könnten. In diesem Zusammenhang würde eine starke Expressionssteigerung einer spezifischen miRNA, die in einigen Zelltypen basal nur niedrig exprimiert wird, durch biologische Schwankungen in anderen sehr stark diese miRNA exprimierenden Zellen maskiert werden. Zur Lösung dieser Frage wäre es erforderlich eine *in situ*-Hybridisierung mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten miRNAs durchzuführen.

Durch bioinformatische Analyse wurden unter den 580 bei HE-Patienten herunterregulierten Genen 195 potentielle Zielgene der bei HE-Patienten hochregulierten miRNA-Spezies vorhergesagt (Abb. 31). Interessanterweise, waren diese Gene potentielle Ziele gleich mehrerer bei Zirrhosepatienten mit HE hochregulierten miRNA-Spezies, so dass spekuliert werden kann, dass die HE mit einer Veränderung regulatorischer miRNA-Netzwerke im zerebralen Kortex assoziiert ist. Dieser Befund steht in Einklang mit den *in vitro* an mit Ammoniak behandelten Astrozyten erhaltenen Ergebnissen, die ebenfalls eine Modulation von miRNA-Netzwerken vermuten lassen.

Interessanterweise haben die potentiell durch die bei HE hochregulierten miRNAs reprimierten Gene bei Zirrhosepatienten mit HE eine wichtige Bedeutung für biologische Prozessen, die bei HE beeinträchtigt sind (Tab. 23). Viele der potentiellen Zielgene von bei Zirrhosepatienten mit HE hochregulierten miRNA-Spezies sind außerdem mit neurologischen Erkrankungen assoziiert, wie

z.B. bipolaren Störungen (ERBB4 - Roy *et al.*, 2007), Schizophrenie (ERBB4 - Cooper & Koleske, 2014; Homer1 - Szumlinski *et al.*, 2005), Epilepsie (KCNQ2 - Watanabe *et al.*, 2000; Ras-GRF1 - Zhu *et al.*, 2013; GABRA1 - Arain *et al.*, 2012) und Alzheimer (FABP3 - Cheon *et al.*, 2003; CORT - Gahete *et al.*, 2010).

Tabelle 23: Biologische Funktionen bei HE runterregulierter Gene, die potentiell von bei HE hochregulierten miRNA-Spezies in ihrer Expression gehemmt werden.

Biologische Prozesse	Gene	Literatur
Synaptische Transmission	CCKBR ³ , EphB3 ⁸ , ERBB4 ^{4,9} , FABP3 ⁷ , GABRA1 ⁹ , KCNQ2 ^{2,5,6} , Ras-GRF1 ¹	¹ Brambilla <i>et al.</i> , 1997; ² Watanabe <i>et al.</i> , 2000; ³ Köks <i>et al.</i> , 2001; ⁴ Li <i>et al.</i> , 2007; ⁵ Martire <i>et al.</i> , 2004; ⁶ Martire <i>et al.</i> , 2007; ⁷ Shioda <i>et al.</i> , 2010; ⁸ Zhuang <i>et al.</i> , 2011; ⁹ Cooper & Koleske, 2014; ¹⁰ Swanson <i>et al.</i> , 2015
Motorische Koordination und Gleichgewichtssinn	Homer1 ¹² , PTPRR ^{11,13}	¹¹ Chirivi <i>et al.</i> , 2007; ¹² Jaubert <i>et al.</i> , 2007; ¹³ Schmitt <i>et al.</i> , 2009
Lern & Gedächtnis	CCKBR ¹⁴ , Ras-GRF1 ¹⁵	¹⁴ Sebret <i>et al.</i> , 1999; ¹⁵ Giese <i>et al.</i> , 2001
Schlaf/Wach-Rhythmus	Cort ¹⁶ , Homer1 ¹⁷ , MCHR1 ¹⁸	¹⁶ Bourgin <i>et al.</i> , 2007; ¹⁷ Maret <i>et al.</i> , 2007; ¹⁸ Monti <i>et al.</i> , 2013

In weiteren *in vitro* Untersuchungen wurde überprüft, ob die Überexpression exemplarisch ausgewählter und bei HE-Patienten hochregulierter miRNA-Spezies mit den bei HE-Patienten beobachteten Expressionserniedrigungen potentieller Zielgene einhergeht. Hierfür wurden die miRNA-Spezies hsa-miR-138-2-3p, -152-3p, -339-5p, -455-3p und -486-5p ausgewählt. Die Expression dieser miRNA-Spezies war signifikant im miRNA-Array und tendenziell in der Realtime-PCR in *post mortem* Hirnproben von Zirrhosepatienten mit HE der Kohorte 1 erniedrigt.

Interessanterweise induzierte die Überexpression der miRNAs hsa-miR-138-2-3p, -152-3p, -339-5p, -455-3p oder -486-5p in Neuroblastoma (SH-SY5Y)- und Astrozytoma (MOG-G-CCM)-Zellen zelltypspezifisch eine Herunterregulation potentieller Zielgene. So verringerte die miRNA hsa-miR-152-3p die Expression des Fettsäure-bindenden Proteins 3 (FABP3) ausschließlich in Neuroblastoma-Zellen, aber nicht in Astrozytoma-Zellen (Tab. 21). Die Überexpression von hsa-miR-138-2-3p, -152-3p, -339-5p, -455-3p oder -486-5p verminderte hingegen viele der durch bioinformatische Analyse vorhergesagten potentiellen Zielgene in den Astrozytomazellen (Tab. 21). Im Gegensatz dazu, blieben

die meisten potentiellen Zielgene nach Überexpression der miRNA-Spezies hsa-miR-138-2-3p, -152-3p, -339-5p, 455-3p oder -486-5p in den Neuroblastomazellen unverändert (Tab. 21).

Bei der Validierung der funktionellen Bedeutung von miRNAs in Bezug auf die Regulation der Expression potentieller Zielgene müssen die Expressionsniveaus der jeweiligen endogen vorhandenen miRNA-Spezies wie auch die der jeweiligen potentiellen Zielgene berücksichtigt werden (Kuhn *et al.*, 2008). So könnte theoretisch ein für die effektive Herunterregulation potentieller Zielgene erforderlicher miRNA-Expressionslevel durch eine basal bereits hohe Expression der jeweiligen miRNA in unterschiedlichen Zelltypen begünstigt werden. Wie in Abb. 32 gezeigt ist, wurde das Expressionsniveau der jeweiligen miRNA-Spezies sowohl in Astrozytoma-, als auch in Neuroblastomazellen durch Transfektion sehr stark angehoben, wenngleich tendenziell etwas stärker in Astrozytomazellen. Daher erscheint es unplausibel, dass die beobachteten zelltypspezifischen Wirkungen der jeweiligen miRNA-Spezies auf unzureichend hohen Expressionsspiegeln der jeweiligen miRNA-Spezies resultieren. Hierfür spricht auch, dass die deutlich stärker in Astrozytomazellen überexprimierte hsa-miR-152-3p im Gegensatz zu Neuroblastomazellen keine herunterregulation von FABP3 (Tab. 21) induzierte aber beide Zelltypen ein vergleichbares FABP3 mRNA Expressionsniveau zeigten (SH-SY5Y: $C_t = 28, 51 \pm 0,68$; MOG-G-CCM: $C_t = 29,44 \pm 0,24$).

Interessanterweise weisen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit auf eine Herunterregulation durch hsa-miR-138-2-3p-reprimierter Gene. Neuere Studien zeigen, dass miR-138 im Gehirn Einfluss auf Gedächtnisbildung nimmt und den Schlaf/Wach-Rhythmus reguliert (Davis *et al.*, 2012; Tatro *et al.*, 2013; Schröder *et al.*, 2014). In der vorliegenden Arbeit verringerte die Überexpression von miR-138-2-3p (Abb. 32) in humanen Astrozytomazellen die mRNA Expression der Mg^{2+}/Mn^{2+} -abhängigen Proteinphosphatase 1E (PPM1E) (Abb. 33A, Tab. 21), deren Translation potentiell auch durch die ebenfalls in Hirnproben von HE-Patienten erhöhte miR-16-2-3p reguliert werden kann. PPM1E reguliert eine Vielzahl von Signaltransduktionsprozessen im Gehirn und ist im präfrontalen Kortex von Patienten mit Schizophrenie und bipolarer Störung (Narayan *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2011) sowie in *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE (diese Arbeit) verringert exprimiert.

Die funktionelle Bedeutung der miRNA-Spezies hsa-miR-152-3p und -455-3p, die in dieser Arbeit experimentell im Hinblick auf die Regulation potentieller Zielgene untersucht wurden, ist bislang unbekannt. Eine einzige Literaturstelle zeigt, dass miR-152 im Hippocampus in einem Epilepsiemodell der Ratte erhöht exprimiert wird (Hu *et al.*, 2012). Die vorliegende Arbeit zeigt eine gesteigerte Expression von hsa-miR-152-3p und -455-3p in Hirnproben von Zirrhosepatienten mit HE. Die Überexpression von hsa-miR-152-3p (Abb. 32) vermindert die mRNA Expression der bioinformatisch vorhergesagten Zielgene Homer1 und PTPRR in Astrozytomazellen und FABP3 in

Neuroblastomazellen (Abb. 33, 34, Tab. 21). Die Überexpression von hsa-miR-455-3p (Abb. 32) verringert die mRNA Expression der potentielle Zielgene PTPRR in Astrozytomazellen und KCNQ2 in Neuroblastomazellen (Abb. 33, 34, Tab. 21).

Überraschenderweise wurde das in Neuronen bekanntermaßen stark exprimierte Homer1 ausschließlich in der Astrozytomazelllinie durch hsa-miR-152-3p herunterreguliert. Homer 1 gehört zu den sogenannten „immediate early genes“ und ist im Bereich der Postsynapse exprimiert, wo es die Lokalisation metabotroper Glutamatrezeptoren vom Subtyp 5 (mGluR5) beeinflusst (Ango *et al.*, 2000) und hierüber synaptische Plastizität vermittelt (Tu *et al.*, 1998; Sala *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2014). Homer1-defiziente Mäuse zeigen ausgeprägte motorische und kognitive Beeinträchtigungen (Jaubert *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2014), wie sich auch bei HE angetroffen werden. Interessanterweise ist Homer1 an die Regulation des Schlaf/Wach-Rhythmus beteiligt (Maret *et al.*, 2007; Porter *et al.*, 2012) und eine Beeinträchtigung des Schlaf/Wach-Rhythmus ist ebenfalls charakteristisch für Zirrhosepatienten mit HE. Die Bedeutung von Homer1 für die Pathogenese der HE wurde bislang nicht untersucht. Bislang ist unklar, in welchem Zelltyp Homer1 im Gehirn von Zirrhosepatienten mit HE verändert exprimiert wird. Die funktionelle Relevanz der in der vorliegenden Arbeit gezeigten miR-152-3p vermittelten Herunterregulation von Homer1 in einer humanen Astrozytomazelllinie bleibt ebenfalls unklar und muss in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden.

Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit auch eine verminderte Expression der Proteinphosphatase des Rezeptor-Typs R (PTPRR) und gleichzeitig eine Hochregulation der potentiell die PTPRR-Expression regulierenden miRNA Spezies hsa-miR-152-3p und -455-3p gezeigt werden. Im Maushirn wird PTPRR unter anderem im Kortex, Hippocampus und Zerebellum exprimiert (Van Den Maagdenberg *et al.*, 1999; Augustine *et al.*, 2000; Chirivi *et al.*, 2004; Chirivi *et al.*, 2007; Lein *et al.*, 2007). Der Hippocampus (Broadbent *et al.*, 2004; Barker & Warburton, 2011) und der Kortex (Albasser *et al.*, 2010) verarbeiten Informationen die für die gedächtnisabhängige Wiedererkennung von neuen Objekten eine wichtige Rolle spielen (Daenen *et al.*, 2001). In Übereinstimmung damit zeigen PTPRR-defiziente Mäuse Verhaltensauffälligkeiten in Bezug auf die Erkennung von Objekten und das Erkundungsverhalten (Erkens *et al.*, 2014). Das Zerebellum spielt eine zentrale Rolle bei der Steuerung motorischer Prozesse und konsistent damit ist die feinmotorische Koordination bei PTPRR-defizienten Mäusen gestört (Chirivi *et al.*, 2007; Schmitt *et al.*, 2009). Die Funktionen des PTPRR-Gens in Astrozyten und die Bedeutung der miRNA vermittelten Herunterregulation von PTPRR für die Pathogenese der HE ist noch nicht untersucht worden.

Ein weiteres im Hirngewebe von HE-Patienten herunterreguliertes Gen ist das Fettsäurebindende Protein 3 (FABP3), welches in seiner Expression durch die in HE-Patienten erhöht exprimierte miRNA-Spezies hsa-miR-152-3p potentiell reguliert werden kann. Die Untersuchungen der

vorliegenden Arbeit bestätigen experimentell an Neuroblastomazellen, dass die FABP3 mRNA Expression durch die Überexpression von hsa-miR-152-3p (Abb. 32) signifikant herunterreguliert wird (Abb. 34, Tab. 21). Fettsäure-bindende Proteine (FABPs) sind an der Aufnahme und dem Transport von Fettsäuren beteiligt (Veerkamp & Zimmerman, 2001). Durch Steuerung der intrazellulären Fettsäurekonzentration, können sie die Eigenschaften von Proteinen, Membranen, Ionenkanälen und Rezeptoren (Veerkamp *et al.*, 1993) und die Genexpression (Schoonjans *et al.*, 1996; Desvergne *et al.*, 1998; Grimaldi *et al.*, 1999), sowie Wachstum und zelluläre Differenzierung (Nunez, 1997) beeinflussen. FABP3 wird hauptsächlich in Neuronen im *Bulbus olfactorius*, Hippocampus, Thalamus, Hypothalamus, Zerebellum und im *caudale putamen* im vollentwickelten Gehirn exprimiert (Sellner *et al.*, 1995; Owada *et al.*, 1996). Dort reguliert es die Arachidonsäureaufnahme (Murphy *et al.*, 2005), die Bildung von Neuriten und ist an der synaptischen Reifung beteiligt (Sellner *et al.*, 1995; Pu *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000; Owada & Kondo, 2003; Owada *et al.*, 2006) beteiligt. FABP3-defiziente Mäuse zeigten eine gestörte dopaminerge Neurotransmission (Shioda *et al.*, 2010). Eine Herunterregulation von FABP3 wird bei einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen beobachtet, wie z.B. bei Down-Syndrom und Alzheimer (Cheon *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine verringerte FABP3 mRNA im zerebralen Kortex von Zirrhosepatienten mit HE gefunden. Die funktionelle Bedeutung der verminderten FABP3-Expression bei hepatischer Enzephalopathie bleibt derzeit unklar.

Ein weiteres, experimentell *in vitro* validiertes Zielgen der in *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE hochregulierten miRNA-Spezies hsa-miR-339-5p und -486-5p ist der Ephrinrezeptor B3 (EphB3). So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von hsa-miR-339-5p und -486-5p in Astrozytomazellen (Abb. 32) die mRNA- und Proteinexpression des Ephrinrezeptors B3 verringert (Abb. 33A/B, Tab. 21). Auch die Expression von hsa-miR-346 wurde in humanen *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE erhöht gefunden und diese miRNA-Spezies reguliert ebenfalls potentiell die Expression von EphB3. Es kann daher vermutet werden, dass hsa-miR-339-5p, -486-5p und -346 synergistisch die EphB3 Expression vermindern könnten. Ephrinrezeptoren und deren Liganden beeinflussen die Neurotransmission (Klein, 2009; Nikolov *et al.*, 2013) unter anderem durch Regulation der astroglialen Glutamat-Clearance aus dem synaptischen Spalt (Zhuang *et al.*, 2010) und der Freisetzung von Gliotransmittern (Filosa *et al.*, 2009). Es ist denkbar, dass die in *post mortem* Hirnproben von Zirrhosepatienten mit HE beobachtete verringerte EphB3 Expression durch Hochregulation der miRNA-Spezies hsa-miR-339-5p und/oder -486-5p vermittelt wird und dadurch die Neurotransmission bei HE beeinträchtigt wird. Weitere Untersuchungen sind notwendig um die funktionelle Relevanz der veränderten EphB3-Expression bei HE zu belegen

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA der Matrix-Metalloproteinase 3 (MMP3) durch Überexpression von hsa-miR-486-5p in Neuroblastomazellen herunterreguliert (Abb. 34, Tab. 21).

MMP3 ist mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer (Peng *et al.*, 2015), Parkinson (Chung *et al.*, 2013) und multipler Sklerose (Kouwenhoven *et al.*, 2001; D'Souza & Moscarello, 2006) assoziiert und spielt eine wichtige Rolle bei synaptischer Plastizität und Lernprozessen (van Hove *et al.*, 2012a). MMP3-defiziente Mäuse weisen eine Störung der Motorkoordination und des Gleichgewichtsinns auf (van Hove *et al.*, 2012b). Es ist denkbar, dass eine durch miRNAs vermittelte Herunterregulation der MMP3 mRNA zu bei HE beobachteten Störungen der Motorik und Kognition beiträgt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Spiegel des spannungsabhängigen Kaliumkanals KCNQ2 wurde durch Überexpression von hsa-miR-455-3p und -486-5p in Neuroblastomazellen verringert exprimiert (Abb. 34, Tab. 21). KCNQ2 wird spezifisch in Neuronen im Hippocampus und im zerebralen Kortex exprimiert (Tinel *et al.*, 1998). KCNQ2 wurde als eines der Gene identifiziert, das maßgeblich an der Entstehung von Epilepsie beteiligt ist (Biervert *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998). Niedrige KCNQ2 Genexpressionslevel sind mit neuronaler Hyperexzitabilität (Watanabe *et al.*, 2000), mit gestörter Neurotransmitter-freisetzung und beeinträchtigter synaptischen Plastizität (Martire *et al.*, 2004) assoziiert. Es ist daher möglich zu spekulieren, dass die durch miRNA-Spezies vermittelte Expressionerniedrigung von KCNQ2 mit kognitiven Funktionsstörungen bei der HE in Zusammenhang stehen könnte.

Zusammenfassend, zeigen die Befunde der vorliegenden Arbeit spezifische Änderungen im Transkriptom und im miRnom in humanen Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE und lassen vermuten, dass miRNA Expressionsänderungen die zerebrale Genexpression bei HE beeinflussen. Dabei ist zu beachten, dass es sich hierbei um Hirnregionen-spezifische Effekte handeln könnte, da unterschiedliche Hirnregionen deutliche Unterschiede in Bezug auf das miRnom, das Transkriptom und die zelluläre Zusammensetzung aufweisen (Hawrylycz *et al.*, 2012). Zur Aufklärung der funktionellen Bedeutung der miRNA-vermittelten Genexpressionsänderungen im Gehirn von Zirrhosepatienten mit HE sind weitere Untersuchungen notwendig. So erlaubt die Genexpressionsanalyse keinen direkten Rückschluss auf die von den Genexpressionsänderungen betroffenen Zelltypen im Gehirn von Zirrhosepatienten mit HE. Auch bleibt zu überprüfen, ob die im Array identifizierten Genexpressionsänderungen in *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE auf Proteinebene sichtbar werden. Hierfür müssten Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt werden.

3. Ausblick

Die vorliegende Arbeit weist miRNAs eine wichtige Funktion für Genexpressionsänderungen bei der hepatischen Enzephalopathie zu. Die Arbeit zeigt erstmalig, dass Ammoniak über Induktion von

oxidativem Stress miRNA-Spezies herunterreguliert, welche die Expression der Hämoxigenase-1 erhöhen und dass eine dadurch vermittelte Hochregulation der HO-1 Astrozytenseneszenz vermittelt. Ungeklärt bleiben derzeit die Mechanismen, die der HO-1 vermittelten Astrozytenseneszenz zugrunde liegen. Es erscheint gegenwärtig vielversprechend zu untersuchen, ob die Überexpression der HO-1 die Eisenhomöostase in Astrozyten beeinträchtigt und ob hierüber die Funktionen von Mitochondrien in Astrozyten beeinträchtigt werden. Da eine vermehrte Eisenakkumulation mit mitochondrialen ROS einhergehen kann, könnte dies mit den von anderen Gruppen beobachteten mitochondrialen Funktionsstörungen im Zusammenhang stehen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit begründen weitere geplante Untersuchungen zur Aufklärung des Mechanismus über den Taurin Astrozytenseneszenz in mit Ammoniak-behandelten kultivierten Rattenastrozyten *in vitro* blockiert. In diesem Zusammenhang soll geklärt werden, ob Taurin die Expression potentiell die HO-1-reprimierender miRNAs beeinflusst.

Weitere Untersuchungen werden sich außerdem damit beschäftigen, die funktionelle Bedeutung der identifizierten und validierten miRNA-Zielgene für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie zu untersuchen. Die Befunde der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass Ammoniak miRNA-Netzwerke beeinflusst und hierdurch vermittelte Genexpressionsänderungen wiederum auf die Expression von miRNAs rückwirken. Daher erscheint es gegenwärtig wenig vielversprechend einzelne miRNAs gezielt in ihrer Expression zu beeinflussen, um z.B. die durch Ammoniak-induzierte Astrozytenseneszenz zu verhindern. Demgegenüber wird es wichtig sein in zukünftigen Untersuchungen durch Ammoniak beeinflusste miRNA-Netzwerke genauer zu charakterisieren, um hierüber Ansatzpunkte für eine gezielte Manipulation des miRNA-Netzwerks für einen therapeutischen Ansatz aufzuzeigen. Von großer Bedeutung wird in diesem Zusammenhang sein, zelltypspezifische Effekte HE-relevanter Faktoren auf die Expression von miRNAs zu identifizieren.

V. Zusammenfassung

Die hepatische Enzephalopathie (HE) ist ein neuropsychiatrisches Syndrom, welches mit der zerebralen Bildung von osmotischem und oxidativ/nitrosativem Stress assoziiert ist. Ammoniak, ein Schlüsseltoxin in der Pathogenese der HE, induziert über Bildung von oxidativen Stress Astrozytenseneszenz. Die hierbei zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind nur wenig verstanden. Da miRNAs die Expression zellzyklussteuernder Gene regulieren können und ihre Expression durch oxidativen Stress moduliert werden kann, wurde untersucht, ob Astrozytenseneszenz durch Ammoniak-induzierte miRNA Expressionsänderungen vermittelt wird. An kultivierten Astrozyten wurden mittels Microarray-basierter miRnom- und Transkriptomanalyse 43 herunterregulierte miRNA-Spezies und 142 hochregulierte Gene in NH_4Cl (5 mmol/l, 48 Std.)-behandelten Astrozyten identifiziert. Die durch Microarray-Analyse identifizierten miRNA- und Genexpressionsänderungen wurden nachfolgend exemplarisch durch quantitative Realtime-PCR validiert. Mit Hilfe bioinformatischer Analysetools wurden 43 potentielle Zielgene durch Ammoniak-vermindert exprimierter miRNA-Spezies unter den durch Ammoniak hochregulierten Genen identifiziert. Weitere Untersuchungen fokussierten auf die Hämoxxygenase-1 (HO-1). Eine Inhibition von HO-1 regulierenden und durch Ammoniak herunterregulierten miRNA-Spezies steigerte die HO-1 mRNA- und Proteinexpression und hemmte die Astrozytenproliferation in HO-1-abhängiger Weise. Sowohl die Hemmung der ammoniakinduzierten Hochregulation der HO-1 durch Taurin (5 mmol/l) als auch Blockierung der HO-1-Aktivität durch Zinn-Protoporphyrin IX verhindert die ammoniakinduzierte Proliferationshemmung und Seneszenz. Diese Befunde deuten darauf hin, dass ammoniakvermittelte miRNA Expressionsänderungen durch Hochregulation der HO-1 Seneszenz in Astrozyten induzieren. miRNA- und Genexpressionsänderungen wurden auch in *post mortem* Hirnproben von Zirrhosepatienten mit und ohne HE mittels Transkriptom und miRnom Microarray-Analyse untersucht. Dabei konnten 25 herunterregulierte miRNA-Spezies und 602 herunterregulierte Gene in Zirrhosepatienten mit HE identifiziert werden. 23 der 25 hochregulierten miRNA-Spezies waren bei Zirrhosepatienten ohne HE nicht gleichsam verändert. Durch bioinformatische Analyse wurden potentielle bei HE vermindert exprimierte miRNA-Zielgene vorhergesagt, die in Zusammenhang mit bei HE beeinträchtigten zerebralen Funktionen stehen. An Astrozytoma und Neuroblastomazellen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von in Hirnproben von HE-Patienten hochregulierter miRNAs zelltypspezifisch die Expression potentieller Zielgene herunterreguliert, die auch im Hirnproben der HE-Patienten vermindert exprimiert gefunden wurden. Diese Ergebnisse zeigen spezifische Genexpressionsänderungen im Gehirn von HE-Patienten als mögliche Folge verändert exprimierter miRNA-Spezies.

VI. Abstract

Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychiatric syndrome evolving from cerebral osmotic disturbances and oxidative/nitrosative stress. Ammonia, the main toxin of HE, triggers astrocyte senescence in an oxidative stress-dependent way. However, molecular mechanisms underlying ammonia-induced astrocyte senescence are incompletely understood. miRNAs are endogenous non-coding single stranded RNA molecules which regulate gene expression through inactivation or degradation of mRNA species. As miRNAs are critically involved in cell cycle regulation and their expression may be regulated by oxidative stress, the impact of ammonia-induced miRNA expression changes was analyzed. In the second part of this project miRNA expression profiling was performed in *post mortem* brain tissue of controls and patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy.

The analysis in cultured astrocytes *in vitro* showed that by using combined miRNA and gene microarray approach, 43 miRNA species were downregulated and 142 genes were upregulated by NH₄Cl (5 mmol/l, 48h). Ammonia-induced miRNA and gene expression changes were validated by qPCR and 43 potential miRNA target genes, including heme oxygenase 1 (HO-1), were identified by matching upregulated mRNA species with predicted targets of miRNA species downregulated by ammonia. Inhibition of HO-1 targeting miRNAs rno-miR-31a-5p, -221-3p, -221-5p, -222-3p, -326-3p and -365-3p which were downregulated by NH₄Cl (5 mmol/l, 48h) strongly upregulated HO-1 mRNA and protein levels and inhibited astrocyte proliferation in a HO-1 dependent way. Preventing ammonia-induced upregulation of HO-1 by taurine (5 mmol/l) as well as blocking HO-1 activity by tin protoporphyrine IX fully prevented ammonia-induced proliferation inhibition and astrocyte senescence. The data suggest that ammonia induces astrocyte senescence through oxidative stress-dependent downregulation of HO-1 targeting miRNAs and concomitant upregulation of HO-1 at both mRNA and protein level.

By using a combined miRNA and gene microarray approach, 25 upregulated miRNA species and 602 genes were found to be downregulated in human *post mortem* brain tissue of cirrhotic patients with HE compared to controls. 23 out of 25 miRNAs were specifically upregulated in HE patients. A tendency towards upregulation could be confirmed for 13 miRNA Species using qPCR. 195 potential miRNA target genes were identified through bioinformatics analysis. These genes were related to learning and memory processing, sleep/wake rhythm, motor functions and synaptic plasticity. The present findings point to a potential role of miRNA expression changes for gene expression changes in brain of cirrhotic patients with HE.

VII Literaturverzeichnis

- Ahboucha S, Pomier-Layrargues G, Butterworth RF. 2004. Increased brain concentrations of endogenous (non-benzodiazepine) GABA-A receptor ligands in human hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*. 19: 241–251.
- Ahboucha S. 2011. Neurosteroids and hepatic encephalopathy: an update on possible pathophysiological mechanisms. *Current Molecular Pharmacology*. 4: 1–13.
- Ahmad AS, Zhuang H, Doré S. 2006. Heme oxygenase-1 protects brain from acute excitotoxicity. *Neuroscience*. 141: 1703–1708.
- Albasser MM, Poirier GL, Aggleton JP. 2010. Qualitatively different modes of perirhinal-hippocampal engagement when rats explore novel vs. familiar objects as revealed by c-Fos imaging. *The European Journal of Neuroscience*. 31: 134–147.
- Ambros V. 2003. MiRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell*. 113: 673–676.
- Ango F, Pin JP, Tu JC, Xiao B, Worley PF, Bockaert J, Fagni L. 2000. Dendritic and axonal targeting of type 5 metabotropic glutamate receptor is regulated by homer1 proteins and neuronal excitation. *The Journal of Neuroscience*. 20: 8710–8716.
- Arain FM, Boyd KL, Gallagher MJ. 2012. Decreased viability and absence-like epilepsy in mice lacking or deficient in the GABAA receptor $\alpha 1$ subunit. *Epilepsia*. 53: e161-165.
- Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG. 1999. Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 77: 699–706.
- Augustine KA, Silbiger SM, Bucay N, Ulias L, Boynton A, Trebasky LD, Medlock ES. 2000. Protein tyrosine phosphatase (PC12, Br7,S1) family: expression characterization in the adult human and mouse. *The Anatomical Record*. 258: 221–234.
- Bai G, Rama Rao KV, Murthy CR, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD. 2001. Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rat astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*. 66: 981–991.
- Bajaj JS, Schubert CM, Heuman DM, Wade JB, Gibson DP, Topaz A, Saeian K, Hafeezullah M, Bell DE, Sterling RK, Stravitz RT, Luketic V, White MB, Sanyal AJ. 2010. Persistence of cognitive impairment after resolution of overt hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*. 138: 2332–2340.
- Bajaj JS, Heuman DM, Wade JB, Gibson DP, Saeian K, Wegelin JA, Hafeezullah M, Bell DE, Sterling RK, Stravitz RT, Fuchs M, Luketic V, Sanyal AJ. 2011. Rifaximin improves driving simulator performance in a randomized trial of patients with minimal hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*. 140: 478-487.
- Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM. 1992. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *The Journal of Biological Chemistry*. 267: 18148–18153.
- Barañano DE, Wolosker H, Bae BI, Barrow RK, Snyder SH, Ferris CD. 2000. A mammalian iron ATPase induced by iron. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 15166–15173.

- Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. 2002. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99: 16093–16098.
- Barker GRI, Warburton EC. 2011. When is the hippocampus involved in recognition memory? *The Journal of Neuroscience*. 31: 10721–10731.
- Bartel DP. 2004. MiRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281–297.
- Bass NM, Mullen KD, Sanyal A, Poordad F, Neff G, Leevy CB, Sigal S, Sheikh MY, Beavers K, Frederick T, Teperman L, Hillebrand D, Huang S, Merchant K, Shaw A, Bortey E, Forbes WP. 2010. Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *The New England Journal of Medicine*. 362: 1071–1081.
- Beal MF. 1996. Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. *Current Opinion in Neurobiology*. 6: 661–666.
- Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Izaurralde E. 2006a. MiRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 71: 523–530.
- Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. 2006b. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & Development*. 20: 1885–1898.
- Ben Achour S, Pascual O. 2012. Astrocyte-neuron communication: functional consequences. *Neurochemical Research*. 37.
- Benes V, Castoldi M. 2010. Expression profiling of miRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods*. 50: 244–249.
- Benes V, Collier P, Kordes C, Stolte J, Rausch T, Muckentaler MU, Häussinger D, Castoldi M. 2015. Identification of cytokine-induced modulation of miRNA expression and secretion as measured by a novel miRNA specific qPCR assay. *Scientific Reports*. 5: 11590.
- Berezikov E, Cuppen E, Plasterk RHA. 2006a. Approaches to miRNA discovery. *Nature Genetics*. 38: 2–7.
- Berezikov E, Thuemmler F, van Laake LW, Kondova I, Bontrop R, Cuppen E, Plasterk RHA. 2006b. Diversity of miRNAs in human and chimpanzee brain. *Nature Genetics*. 38: 1375–1377.
- Beschorner R, Adjodah D, Schwab JM, Mittelbronn M, Pedal I, Mattern R, Schluesener HJ, Meyermann R. 2000. Long-term expression of heme oxygenase-1 (HO-1, HSP-32) following focal cerebral infarctions and traumatic brain injury in humans. *Acta Neuropathologica*. 100: 377–384.
- Beyersmann D, Haase H. 2001. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals*. 14: 331–341.
- Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. 2006. Relief of miRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*. 125: 1111–1124.
- Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK. 1998. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science*. 279: 403–406.
- Blei AT, Córdoba J. 2001. Hepatic Encephalopathy. *The American journal of gastroenterology*. 96: 1968–1976.

- Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 10: 185–191.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 19: 185–193.
- Booher J, Sensenbrenner M. 1972. Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology*. 2: 97–105.
- Boquoi A, Arora S, Chen T, Litwin S, Koh J, Enders GH. 2015. Reversible cell cycle inhibition and premature aging features imposed by conditional expression of p16Ink4a. *Aging Cell*. 14: 139–147.
- Bosoi CR, Rose CF. 2009. Identifying the direct effects of ammonia on the brain. *Metabolic Brain Disease*. 24: 95–102.
- Bourgin P, Fabre V, Huitrón-Reséndiz S, Henriksen SJ, Prospero-Garcia O, Criado JR, Lecea L. 2007. Cortistatin promotes and negatively correlates with slow-wave sleep. *The European Journal of Neuroscience*. 26: 729–738.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248–254.
- Brambilla R, Gnesutta N, Minichiello L, White G, Roylance AJ, Herron CE, Ramsey M, Wolfer DP, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Grant SG, Chapman PF, Lipp HP, Sturani E, Klein R. 1997. A role for the Ras signalling pathway in synaptic transmission and long-term memory. *Nature*. 390: 281–286.
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. 2004. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101: 14515–14520.
- Brouard S, Berberat PO, Tobiasch E, Seldon MP, Bach FH, Soares MP. 2002. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 17950–17961.
- Brown SD, Piantadosi CA. 1990. In vivo binding of carbon monoxide to cytochrome c oxidase in rat brain. *Journal of Applied Physiology*. 68: 604–610.
- Browne SE, Ferrante RJ, Beal MF. 1999. Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathology*. 9: 147–163.
- 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. *Journal of Hepatology*. 54: 251–257.
- Brüne B, Ullrich V. 1987. Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Molecular Pharmacology*. 32: 497–504.
- Butterworth RF, Giguère JF, Michaud J, Lavoie J, Layrargues GP. 1987. Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochemical Pathology*. 6: 1–12.
- Butterworth RF. 2003. Role of circulating neurotoxins in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: potential for improvement following their removal by liver assist devices. *Liver International*. 23: 5–9.
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. 2004. Human miRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 10: 1957–1966.

- Calabrese V, Butterfield DA, Scapagnini G, Stella AMG, Maines MD. 2006. Redox regulation of heat shock protein expression by signaling involving nitric oxide and carbon monoxide: relevance to brain aging, neurodegenerative disorders, and longevity. *Antioxidants & Redox Signaling*. 8: 444–477.
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 8: 729–740.
- Castellani R, Smith MA, Richey PL, Kalaria R, Gambetti P, Perry G. 1995. Evidence for oxidative stress in Pick disease and corticobasal degeneration. *Brain Research*. 696: 268–271.
- Castellani R, Smith MA, Richey PL, Perry G. 1996. Glycooxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease. *Brain Research*. 737: 195–200.
- Castoldi M, Vujic Spasic M, Altamura S, Elmén J, Lindow M, Kiss J, Stolte J, Sparla R, D'Alessandro LA, Klingmüller U, Fleming RE, Longrich T, Gröne HJ, Benes V, Kauppinen S, Hentze MW, Muckenthaler MU. 2011. The liver-specific miRNA miR-122 controls systemic iron homeostasis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 121: 1386–1396.
- Center SA, Magne ML. 1990. Historical, physical examination, and clinicopathologic features of portosystemic vascular anomalies in the dog and cat. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*. 5: 83–93.
- Chadipiralla K, Reddanna P, Chinta RM, Reddy PVB. 2012. Thioacetamide-induced fulminant hepatic failure induces cerebral mitochondrial dysfunction by altering the electron transport chain complexes. *Neurochemical Research*. 37: 59–68.
- Chan PH, Longar S, Chen S, Yu AC, Hillered L, Chu L, Imaizumi S, Pereira B, Moore K, Woolworth V. 1989. The role of arachidonic acid and oxygen radical metabolites in the pathogenesis of vasogenic brain edema and astrocytic swelling. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 559: 237–247.
- Chen K, Gunter K, Maines MD. 2000. Neurons overexpressing heme oxygenase-1 resist oxidative stress-mediated cell death. *Journal of Neurochemistry*. 75: 304–313.
- Chen CZ. 2005. MiRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *The New England Journal of Medicine*. 353: 1768–1771.
- Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for miRNA processing and gene silencing. *Nature*. 436: 740–744.
- Cheng X, Ku CH, Siow RCM. 2013. Regulation of the Nrf2 antioxidant pathway by miRNAs: New players in micromanaging redox homeostasis. *Free Radical Biology & Medicine*. 64: 4–11.
- Chen-Roetling J, Benvenisti-Zarom L, Regan RF. 2005. Cultured astrocytes from heme oxygenase-1 knockout mice are more vulnerable to heme-mediated oxidative injury. *Journal of Neuroscience Research*. 82: 802–810.
- Cheon MS, Kim SH, Fountoulakis M, Lubec G. 2003. Heart type fatty acid binding protein (H-FABP) is decreased in brains of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*. 67: 225–234.
- Child CG, Turcotte JG. 1964. Surgery and portal hypertension. In: Child CG, editors. *The Liver and portal hypertension*. Philadelphia: Saunders. 50-64.

- Chirivi RGS, Dilaver G, van de Vorstenbosch R, Wanschers Ba, Schepens J, Croes H, Fransen J, Hendriks W. (2004): Characterization of multiple transcripts and isoforms derived from the mouse protein tyrosine phosphatase gene Ptprr. *Genes to Cells*. 9: 919–933.
- Chirivi RGS, Noordman YE, Van der Zee Catharina EEM, Hendriks WJAJ. 2007. Altered MAP kinase phosphorylation and impaired motor coordination in PTPRR deficient mice. *Journal of Neurochemistry*. 101: 829–840.
- Choi PS, Zakhary L, Choi WY, Caron S, Alvarez-Saavedra E, Miska EA, McManus M, Harfe B, Giraldez AJ, Horvitz HR, Schier AF, Dulac C. 2008. Members of the miRNA-200 family regulate olfactory neurogenesis. *Neuron*. 57: 41–55.
- Chung YC, Kim YS, Bok E, Yune TY, Maeng S, Jin BK. 2013. MMP-3 contributes to nigrostriatal dopaminergic neuronal loss, BBB damage, and neuroinflammation in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Mediators of Inflammation*. 2013: 370526.
- Clerget M, Polla BS. 1990. Erythrophagocytosis induces heat shock protein synthesis by human monocytes-macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87: 1081–1085.
- Collado M, Serrano M. 2006. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nature Reviews. Cancer*. 6: 472–476.
- Conn HO. 1994. Quantifying the severity of hepatic encephalopathy. In: Conn HO, Bircher J, editors. *Hepatic encephalopathy: syndromes and therapies*. Medi-ed Press. Lansing, MI. 13-26.
- Cooper MA, Koleske AJ. 2014. Ablation of ErbB4 from excitatory neurons leads to reduced dendritic spine density in mouse prefrontal cortex. *The Journal of Comparative Neurology*. 522: 3351–3362.
- Covelo A, Araque A. 2015. Lateral regulation of synaptic transmission by astrocytes. *Neuroscience*.
- Daenen EW, Van der Heyden JA, Kruse CG, Wolterink G, Van Ree JM. 2001. Adaptation and habituation to an open field and responses to various stressful events in animals with neonatal lesions in the amygdala or ventral hippocampus. *Brain Research*. 918: 153–165.
- Davis TH, Cuellar TL, Koch SM, Barker AJ, Harfe BD, McManus MT, Ullian EM. 2008. Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 28: 4322–4330.
- Davis CJ, Clinton JM, Krueger JM. 2012. MiRNA 138, let-7b, and 125a inhibitors differentially alter sleep and EEG delta-wave activity in rats. *Journal of Applied Physiology*. 113: 1756–1762.
- Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. 2004. Processing of primary miRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 432: 231–235.
- De Pietri Tonelli D, Pulvers JN, Haffner C, Murchison EP, Hannon GJ, Huttner WB. 2008. miRNAs are essential for survival and differentiation of newborn neurons but not for expansion of neural progenitors during early neurogenesis in the mouse embryonic neocortex. *Development*. 135: 3911–3921.
- Desvergne B, Ijpenberg A, Devchand PR, Wahli W. 1998. The peroxisome proliferator-activated receptors at the cross-road of diet and hormonal signalling. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 65: 65–74.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubeli I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture

and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92: 9363–9367.

Dirac AMG, Bernards R. 2003. Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 11731–11734.

Doench JG, Sharp PA. 2004. Specificity of miRNA target selection in translational repression. *Genes & Development*. 18: 504–511.

D'Souza CA, Moscarello MA. 2006. Differences in susceptibility of MBP charge isomers to digestion by stromelysin-1 (MMP-3) and release of an immunodominant epitope. *Neurochemical Research*. 31: 1045–1054.

Duan J, Duan J, Zhang Z, Tong T. 2005. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 37: 1407–1420.

Dubé E, Gravel A, Martin C, Desparois G, Moussa I, Ethier-Chiasson M, Forest JC, Giguère Y, Masse A, Lafond J. 2012. Modulation of fatty acid transport and metabolism by maternal obesity in the human full-term placenta. *Biology of Reproduction*. 87: 14, 1-11.

Duhem-Tonnelle V, Bièche I, Vacher S, Loyens A, Maurage CA, Collier F, Baroncini M, Blond S, Prevot V, Sharif A. 2010. Differential distribution of erbB receptors in human glioblastoma multiforme: expression of erbB3 in CD133-positive putative cancer stem cells. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 69: 606–622.

Dwyer BE, Nishimura RN, Vellis J de, Yoshida T. 1992. Heme oxygenase is a heat shock protein and PEST protein in rat astroglial cells. *Glia*. 5: 300–305.

Eisenstein RS, Garcia-Mayol D, Pettingell W, Munro HN. 1991. Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88: 688–692.

Emig D, Salomonis N, Baumbach J, Lengauer T, Conklin BR, Albrecht M. 2010. AltAnalyze and DomainGraph: analyzing and visualizing exon expression data. *Nucleic Acids Research*. 38: W755-762.

Erkens M, Bakker B, van Duijn LM, Hendriks WJAJ, Van der Zee CEEM. 2014. Protein tyrosine phosphatase receptor type R deficient mice exhibit increased exploration in a new environment and impaired novel object recognition memory. *Behavioural Brain Research*. 265: 111–120.

Ernst A, Zibrak JD. 1998. Carbon monoxide poisoning. *The New England Journal of Medicine*. 339: 1603–1608.

Eysen-Hernandez R, Ladoux A, Frelin C. 1996. Differential regulation of cardiac heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor mRNA expressions by hemin, heavy metals, heat shock and anoxia. *FEBS Letters*. 382: 229–233.

Fagone P, Patti F, Mangano K, Mammana S, Coco M, Touil-Boukoffa C, Chikovani T, Di Marco R, Nicoletti F. 2013. Heme oxygenase-1 expression in peripheral blood mononuclear cells correlates with disease activity in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 261: 82–86.

Felipo V, Butterworth RF. 2002. Neurobiology of ammonia. *Progress in Neurobiology*. 67: 259–279.

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

Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, Tysoe SA, Wolosker H, Barañano DE, Doré S, Poss KD, Snyder SH. 1999. Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nature Cell Biology*. 1: 152–157.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by miRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews. Genetics*. 9: 102–114.

Filosa A, Paixão S, Honsek SD, Carmona MA, Becker L, Feddersen B, Gaitanos L, Rudhard Y, Schoepfer R, Klopstock T, Kullander K, Rose CR, Pasquale EB, Klein R. 2009. Neuron-glia communication via EphA4/ephrin-A3 modulates LTP through glial glutamate transport. *Nature Neuroscience*. 12: 1285–1292.

Fleige S, Pfaffl MW. 2007. Einfluss der RNA-Integrität auf die quantitative real-time RT-PCR. *Laborwelt*. 5/2007.

Fujihara C, Yamada S, Ozaki N, Takeshita N, Kawaki H, Takano-Yamamoto T, Murakami S. 2010. Role of mechanical stress-induced glutamate signaling-associated molecules in cytodifferentiation of periodontal ligament cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 285: 28286–28297.

Fujita T, Toda K, Karimova A, Yan SF, Naka Y, Yet SF, Pinsky DJ. 2001. Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis. *Nature Medicine*. 7: 598–604.

Fukuda K, Richmon JD, Sato M, Sharp FR, Panter SS, Noble LJ. 1996. Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) in glia after traumatic brain injury. *Brain Research*. 736: 68–75.

Gahete MD, Rubio A, Durán-Prado M, Avila J, Luque RM, Castaño JP. 2010. Expression of Somatostatin, cortistatin, and their receptors, as well as dopamine receptors, but not of neprilysin, are reduced in the temporal lobe of Alzheimer's disease patients. *Journal of Alzheimer's Disease*. 20: 465–475.

García-Matas S, Gutierrez-Cuesta J, Coto-Montes A, Rubio-Acero R, Díez-Vives C, Camins A, Pallàs M, Sanfeliu C, Cristòfol R. (2008): Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity. *Aging Cell*. 7: 630–640.

Giese KP, Friedman E, Telliez JB, Fedorov NB, Wines M, Feig LA, Silva AJ. 2001. Hippocampus-dependent learning and memory is impaired in mice lacking the Ras-guanine-nucleotide releasing factor 1 (Ras-GRF1). *Neuropharmacology*. 41: 791–800.

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

Görg B, Bidmon HJ, Keitel V, Foster N, Goerlich R, Schliess F, Häussinger D. 2006. Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 449: 104–114.

Görg B, Qvarthava 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, Qvarthava 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, Qvarthava 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: 256–265.

- Görg B, Schliess F, Häussinger D. 2013a. Osmotic and oxidative/nitrosative stress in ammonia toxicity and hepatic encephalopathy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 536: 158–163.
- Görg B, Bidmon HJ, Häussinger D. 2013b. Gene expression profiling in the cerebral cortex of patients with cirrhosis with and without hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 57: 2436–2447.
- Görg B, Karababa A, Shafiqullina A, Bidmon HJ, Häussinger D. 2015. Ammonia-induced senescence in cultured rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. *Glia*. 63: 37–50.
- Goligorsky MS, Chen J, Patschan S. 2009. Stress-induced premature senescence of endothelial cells: a perilous state between recovery and point of no return. *Current Opinion in Hematology*. 16: 215–219.
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. 2006. miRBase: miRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*. 34: 140-144.
- Grimaldi PA, Teboul L, Gaillard D, Armengod AV, Amri EZ. 1999. Long chain fatty acids as modulators of gene transcription in preadipose cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 192: 63–68.
- Grimson A, Srivastava M, Fahey B, Woodcroft BJ, Chiang HR, King N, Degnan BM, Rokhsar DS, Bartel DP. 2008. Early origins and evolution of miRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature*. 455: 1193–1197.
- Gubern C, Hurtado O, Rodríguez R, Morales JR, Romera VG, Moro MA, Lizasoain I, Serena J, Mallolas J. 2009. Validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in in-vivo and in-vitro models of cerebral ischaemia. *BMC Molecular Biology*. 10: 57.
- Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang H, Lainé S, Sack R, Gagnon A, Filipowicz W. 2005. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Reports*. 6: 961–967.
- Hadjihambi A, Khetan V, Jalan R. 2014. Pharmacotherapy for hyperammonemia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 15: 1685–1695.
- Häussinger D, Stehle T. 1988. Hepatocyte heterogeneity in response to icosanoids. The privenous scavenger cell hypothesis. *European Journal of Biochemistry*. 175: 395-403
- Häussinger D. 1990. Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. *The Biochemical Journal*. 267: 281–290.
- Häussinger D, Laubenberger J, Vom Dahl S, Ernst T, Bayer S, Langer M, Gerok W, Hennig J. 1994. Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-Inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*. 107: 1475–1480.
- Häussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, Vom Dahl S. 2000. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *Journal of Hepatology*. 32: 1035–1038.
- Häussinger D, Schliess F. 2005. Astrocyte swelling and protein tyrosine nitration in hepatic encephalopathy. *Neurochemistry International*. 47: 64-70.
- Häussinger D, Córdoba J, Kircheis G, Vilstrup H, Fleig WE, Jones EA, Schliess F, Blei AT. 2006. Definition and assessment of low-grade hepatic encephalopathy. In: Häussinger D, Kircheis G, Schliess F, editors. *Hepatic encephalopathy and nitrogen metabolism*. Dordrecht: Springer. 423-433.
- Häussinger D, Blei AT. 2007. Hepatic encephalopathy. In: Rodes J, Benhamou JP, Blei AT, Reichen J, Rizzetto M, editors. *The Oxford Textbook of Hepatology*. Oxford: Blackwell. 728-760.

- Häussinger D, Schliess F. 2008. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut*. 57: 1156–1165.
- Häussinger D. 2010. Hepatic encephalopathy. *Acta Gastro-enterologica Belgica*. 73: 457–464.
- Häussinger D, Sies H. 2013. Hepatic encephalopathy: clinical aspects and pathogenetic concept. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 536: 97–100.
- Haga Y, Sakamoto K, Egami H, Yokoyama Y, Arai M, Mori K, Akagi M. 1989. Changes in production of interleukin-1 and interleukin-2 associated with obstructive jaundice and biliary drainage in patients with gastrointestinal cancer. *Surgery*. 106: 842–848.
- Haga Y, Tempero MA, Zetterman RK. 1996. Unconjugated bilirubin inhibits in vitro major histocompatibility complex-unrestricted cytotoxicity of human lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1316: 29–34.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary miRNA processing. *Genes & Development*. 18: 3016–3027.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN. 2006. Molecular basis for the recognition of primary miRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*. 125: 887–901.
- Hansson E, Rönnbäck L. 1995. Astrocytes in glutamate neurotransmission. *FASEB Journal*. 9: 343–350.
- Hawrylycz MJ, Lein ES, Guillozet-Bongaarts AL, Shen EH, Ng L, Miller JA, van de Lagemaat LN, Smith KA, Ebbert A, Riley ZL, Abajian C, Beckmann CF, Bernard A, Bertagnoli D, Boe AF, Cartagena PM, Chakravarty MM, Chapin M, Chong J, Dalley RA, Daly BD, Dang C, Datta S, Dee N, Dolbeare TA, Faber V, Feng D, Fowler DR, Goldy J, Gregor BW, Haradon Z, Haynor DR, Hohmann JG, Horvath S, Howard RE, Jeromin A, Jochim JM, Kinnunen M, Lau C, Lazarz ET, Lee C, Lemon TA, Li L, Li Y, Morris JA, Overly CC, Parker PD, Parry SE, Reding M, Royall JJ, Schulkin J, Sequeira PA, Slaughterbeck CR, Smith SC, Sodt AJ, Sunkin SM, Swanson BE, Vawter MP, Williams D, Wohnoutka P, Zielke HR, Geschwind DH, Hof PR, Smith SM, Koch C, Grant SG, Jones AR. 2012. An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature*. 489: 391–399.
- Hayflick L, Moorhead PS. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*. 25: 585–621.
- Hellemans J, Mortier G, Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*. 8: R19.
- Heller-Stilb B, van Roeyen C, Rascher K, Hartwig HG, Huth A, Seeliger MW, Warskulat U, Häussinger D. (2002): Disruption of the taurine transporter gene (taut) leads to retinal degeneration in mice. *FASEB Journal*. 6: 231–233.
- Herbig U, Jobling WA, Chen BPC, Chen DJ, Sedivy JM. 2004. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Molecular Cell*. 14: 501–513.
- Hermenegildo C, Marcaida G, Montoliu C, Grisolia S, Miñana MD, Felipe V. 1996. NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice. *Neurochemical Research*. 21: 1237–1244.
- Hirose W, Ikematsu K, Tsuda R. 2003. Age-associated increases in heme oxygenase-1 and ferritin immunoreactivity in the autopsied brain. *Legal Medicine*. 5: 360–366.

- Hoshida S, Nishida M, Yamashita N, Igarashi J, Aoki K, Hori M, Kuzuya T, Tada M. 1996. Heme oxygenase-1 expression and its relation to oxidative stress during primary culture of cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 28: 1845–1855.
- Hu K, Xie YY, Zhang C, Ouyang DS, Long HY, Sun DN, Long LL, Feng L, Li Y, Xiao B. 2012. MiRNA expression profile of the hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy and miR-34a-targeted neuroprotection against hippocampal neurone cell apoptosis post-status epilepticus. *BMC Neuroscience*. 13: 115.
- Huang En, Ong WY, Go ML, Garey LJ. 2005. Heme oxygenase-1 activity after excitotoxic injury: immunohistochemical localization of bilirubin in neurons and astrocytes and deleterious effects of heme oxygenase inhibition on neuronal survival after kainate treatment. *Journal of Neuroscience Research*. 80: 268–278.
- Humphreys DT, Westman BJ, Martin DIK, Preiss T. 2005. MiRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 16961–16966.
- Hung SY, Liou HC, Kang KH, Wu RM, Wen CCh, Fu WM. 2008. Overexpression of heme oxygenase-1 protects dopaminergic neurons against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurotoxicity. *Molecular Pharmacology*. 74: 1564–1575.
- Hutvágner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 293: 834–838.
- Huxtable RJ. 1992. Physiological actions of taurine. *Physiological Reviews*. 72: 101-163.
- Ibáñez-Ventoso C, Vora M, Driscoll M. 2008. Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human miRNAs highlight the extensive conservation of miRNAs in biology. *PLoS One*. 3.
- Ito T, Yoshikawa N, Inui T, Miyazaki N, Schaffer SW, Azuma J. 2014. Tissue depletion of taurine accelerates skeletal muscle senescence and leads to early death in mice. *PLoS One*. 9.
- Jamali S, Bartolomei F, Robaglia-Schlupp A, Massacrier A, Peragut JC, Régis J, Dufour H, Ravid R, Roll P, Pereira S, Royer B, Roedel-Trevisiol N, Fontaine M, Guye M, Boucraut J, Chauvel P, Cau P, Szepietowski P. 2006. Large-scale expression study of human mesial temporal lobe epilepsy: evidence for dysregulation of the neurotransmission and complement systems in the entorhinal cortex. *Brain*. 129: 625–641.
- Jaubert PJ, Golub MS, Lo YY, Germann SL, Dehoff MH, Worley PF, Kang SH, Schwarz MK, Seeburg PH, Berman RF. (2007): Complex, multimodal behavioral profile of the Homer1 knockout mouse. *Genes, Brain, and Behavior*. 6: 141–154.
- Jayakumar AR, Panickar KS, Murthy Ch RK, Norenberg MD. 2006. Oxidative stress and mitogen-activated protein kinase phosphorylation mediate ammonia-induced cell swelling and glutamate uptake inhibition in cultured astrocytes. *The Journal of Neuroscience*. 26: 4774–4784.
- Jayakumar AR, Liu M, Moriyama M, Ramakrishnan R, Forbush B, Reddy PVB, Norenberg MD. 2008. Na-K-Cl Cotransporter-1 in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *The Journal of Biological Chemistry*. 283: 33874–33882.
- Jeong SH, Wu HG, Park WY. 2009. LIN28B confers radio-resistance through the posttranscriptional control of KRAS. *Experimental & Molecular Medicine*. 41: 912–918.

- Jeong IK, Oh DH, Park SJ, Kang JH, Kim S, Lee MS, Kim MJ, Hwang YC, Ahn KJ, Chung HY, Chae MK, Yoo HJ. 2011. Inhibition of NF- κ B prevents high glucose-induced proliferation and plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Experimental & Molecular Medicine*. 43: 684–692.
- Jördens MS, Keitel V, Karababa A, Zemtsova I, Bronger H, Häussinger D, Görg B. 2015. Multidrug resistance-associated protein 4 expression in ammonia-treated cultured rat astrocytes and cerebral cortex of cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Glia*.
- Kale RA, Gupta RK, Saraswat VA, Hasan KM, Trivedi R, Mishra AM, Ranjan P, Pandey CM, Narayana PA. 2006. Demonstration of interstitial cerebral edema with diffusion tensor MR imaging in type C hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 43: 698–706.
- Kanwar JR, Mahidhara G, Kanwar RK. 2010. MiRNA in human cancer and chronic inflammatory diseases. *Frontiers in Bioscience*. 2: 1113–1126.
- Karababa A, Görg B, Schliess F, Häussinger D. 2014. O-GlcNAcylation as a novel ammonia-induced posttranslational protein modification in cultured rat astrocytes. *Metabolic Brain Disease*. 29: 975–982.
- Katoh T, Ohmori H, Murakami T, Karasaki Y, Higashi K, Muramatsu M. 1991. Induction of glutathione-S-transferase and heat-shock proteins in rat liver after ethylene oxide exposure. *Biochemical Pharmacology*. 42: 1247–1254.
- Kawano H, Katsurabayashi S, Kakazu Y, Yamashita Y, Kubo N, Kubo M, Okuda H, Takasaki K, Kubota K, Mishima K, Fujiwara M, Harata NC, Iwasaki K. 2012. Long-term culture of astrocytes attenuates the readily releasable pool of synaptic vesicles. *PLoS One*. 7.
- Keitel V, Görg B, Bidmon HJ, Zemtsova I, Spomer L, Zilles K, Häussinger D. 2010. The bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) acts as a neurosteroid receptor in brain. *Glia*. 58: 1794–1805.
- Kessler C, Engels JW. 2012. Polymerasekettenreaktion. In: Lottspeich F, Engels JW., editors. *Bioanalytik*. Vol. 3. Kap. 30. Berlin: Springer Spektrum. 838.
- Keyse SM, Tyrrell RM. 1989. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86: 99–103.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 115: 209–216.
- Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, Murchison E, Hannon G, Abeliovich A. 2007. A miRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science*. 317: 1220–1224.
- Kim VN, Han J, Siomi MC. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 10: 126–139.
- Kircheis G, Häussinger D. 2002. Management of hepatic encephalopathy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 17: 260-267.
- Kircheis G, Wettstein M, Timmermann L, Schnitzler A, Häussinger D. 2002. Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 35: 357–366.
- Kircheis G, Knoche A, Hilger N, Manhart F, Schnitzler A, Schulze H, Häussinger D. 2009. Hepatic encephalopathy and fitness to drive. *Gastroenterology*. 137: 1706-1715.

- Kircheis G, Häussinger D. 2012. Hepatische Enzephalopathie. *Deutsche medizinische Wochenschrift*. 137: 1582–1585.
- Klein R. 2009. Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/ephrin signaling. *Nature Neuroscience*. 12: 15–20.
- Köks S, Volke V, Veraksits A, Rünkorg K, Sillat T, Abramov U, Bourin M, Huotari M, Männistö PT, Matsui T, Vasar E. 2001. Cholecystokinin2 receptor-deficient mice display altered function of brain dopaminergic system. *Psychopharmacology*. 158: 198–204.
- Konopka W, Kiryk A, Novak M, Herwerth M, Parkitna JR, Wawrzyniak M, Kowarsch A, Michaluk P, Dzwonek J, Arnsperger T, Wilczynski G, Merckenschlager M, Theis FJ, Köhr G, Kaczmarek L, Schütz G. 2010. MiRNA loss enhances learning and memory in mice. *The Journal of Neuroscience*. 30: 14835–14842.
- Kosenko E, Kaminski Y, Lopata O, Muravyov N, Felipo V. 1999. Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication. *Free Radical Biology & Medicine*. 26: 1369–1374.
- Kouwenhoven M, Ozenci V, Gomes A, Yarilin D, Giedraitis V, Press R, Link H. 2001. Multiple sclerosis: elevated expression of matrix metalloproteinases in blood monocytes. *Journal of Autoimmunity*. 16: 463–470.
- Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. 2005. Combinatorial miRNA target predictions. *Nature Genetics*. 37: 495–500.
- Kröncke KD. 2007. Cellular stress and intracellular zinc dyshomeostasis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 463: 183–187.
- Kruczek C, Görg B, Keitel V, Pirev E, Kröncke KD, Schliess F, Häussinger D. 2009. Hypoosmotic swelling affects zinc homeostasis in cultured rat astrocytes. *Glia*. 57: 79–92.
- Kruczek C, Görg B, Keitel V, Bidmon HJ, Schliess F, Häussinger D. 2011. Ammonia increases nitric oxide, free Zn(2+), and metallothionein mRNA expression in cultured rat astrocytes. *Biological Chemistry*. 392: 1155–1165.
- Kuhn DE, Martin MM, Feldman DS, Terry AV, Nuovo GJ, Elton TS. 2008. Experimental validation of miRNA targets. *Methods*. 44: 47–54.
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. 2010. The essence of senescence. *Genes & Development*. 24: 2463–2479.
- Lachmann V, Görg B, Bidmon HJ, Keitel V, Häussinger D. 2013. Precipitants of hepatic encephalopathy induce rapid astrocyte swelling in an oxidative stress dependent manner. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 536: 143–151.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 294: 853–858.
- Lang F, Ritter M, Völkl H, Häussinger D. 1993. Cell Volume Regulatory Mechanisms-An Overview. In: Lang F, Häussinger D, editors. *Advances in Comparative and Environmental Physiology*. Vol. 14. Berlin: Springer.
- Lavoie J, Layrargues GP, Butterworth RF. 1990. Increased densities of peripheral-type benzodiazepine receptors in brain autopsy samples from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 11: 874–878.

- Le, WD, Xie WJ, Appel SH. 1999. Protective role of heme oxygenase-1 in oxidative stress-induced neuronal injury. *Journal of Neuroscience Research*. 56: 652–658.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75: 843–854.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. 2003. The nuclear RNase III Droscha initiates miRNA processing. *Nature*: 415–419.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. 2004. MiRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*. 23: 4051–4060.
- Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. 2006. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *The EMBO Journal*. 25: 522–532.
- Les I, Doval E, Flavià M, Jacas C, Cárdenas G, Esteban R, Guardia J, Córdoba J. 2010. Quality of life in cirrhosis is related to potentially treatable factors. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 22: 221–227.
- Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbeare TA, Donelan MJ, Dong HW, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliss TP, Frensley C, Gates SN, Glattfelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramée AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, Morgan JJ, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR, Schaffnit K, Shapovalova NV, Sivasay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sodt AJ, Stewart NN, Stumpf KR, Sunkin SM, Sutram M, Tam A, Teemer CD, Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wohnoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, Wood M, Yaylaoglu MB, Young RC, Youngstrom BL, Yuan XF, Zhang B, Zwingman TA, Jones AR. 2007. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*. 445: 168–176.
- LeVine SM, Chakrabarty A. 2004. The role of iron in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1012: 252–266.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are miRNA targets. *Cell*. 120: 15–20.
- Li B, Woo RS, Mei L, Malinow R. 2007. The neuregulin-1 receptor erbB4 controls glutamatergic synapse maturation and plasticity. *Neuron*. 54: 583–597.
- Lin Y, Vreman HJ, Wong RJ, Tjoa T, Yamauchi T, Noble-Haeusslein LJ. 2007a. Heme oxygenase-1 stabilizes the blood-spinal cord barrier and limits oxidative stress and white matter damage in the acutely injured murine spinal cord. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 27: 1010–1021.
- Lin DT, Wu J, Holstein D, Upadhyay G, Rourk W, Muller E, Lechleiter JD. 2007b. Ca²⁺ signaling, mitochondria and sensitivity to oxidative stress in aging astrocytes. *Neurobiology of Aging*. 28: 99–111.
- Lin SH, Song W, Cressatti M, Zukor H, Wang E, Schipper HM. 2015. Heme oxygenase-1 modulates miRNA expression in cultured astroglia: implications for chronic brain disorders. *Glia*. 63: 1270–1284.
- Liu Y, Longo LD, León M. 2000. In situ and immunocytochemical localization of E-FABP mRNA and protein during neuronal migration and differentiation in the rat brain. *Brain Research*. 852: 16–27.

- Liu XM, Chapman GB, Peyton KJ, Schafer AI, Durante W. 2002. Carbon monoxide inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Research*. 55: 396–405.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 305: 1437–1441.
- Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR, Parker R, Hannon GJ. 2005a. A role for the P-body component GW182 in miRNA function. *Nature Cell Biology*. 7: 1261–1266.
- Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. 2005b. MiRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature Cell Biology* 7: 719–723.
- Llesuy SF, Tomaro ML. 1994. Heme oxygenase and oxidative stress. Evidence of involvement of bilirubin as physiological protector against oxidative damage. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1223: 9–14.
- Lockwood AH, Bolomey L, Napoleon F. 1984. Blood-brain barrier to ammonia in humans. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 4: 516–522.
- Lu F, Selak M, O'Connor J, Croul S, Lorenzana C, Butunoi C, Kalman B. 2000. Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*. 177: 95–103.
- Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. 2004. Nuclear export of miRNA precursors. *Science*. 303: 95–98.
- Maes OC, Chertkow HM, Wang E, Schipper HM. 2009. MiRNA: Implications for Alzheimer Disease and other Human CNS Disorders. *Current Genomics*. 10: 154–168.
- Maret S, Dorsaz S, Gurcel L, Pradervand S, Petit B, Pfister C, Hagenbuchle O, O'Hara BF, Franken P, Tafti M. 2007. Homer1a is a core brain molecular correlate of sleep loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104: 20090–20095.
- Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW. 2006. Evidence that miRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nature Structural & Molecular Biology*. 13: 1102–1107.
- Martens UM, Chavez EA, Poon SS, Schmoor C, Lansdorp PM. 2000. Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Experimental Cell Research*. 256: 291–299.
- Mateo I, Infante J, Sánchez-Juan P, García-Gorostiaga, I, Rodríguez-Rodríguez E, Vázquez-Higuera JL, Berciano J, Combarros O. 2010. Serum heme oxygenase-1 levels are increased in Parkinson's disease but not in Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*. 121: 136–138.
- Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. 1977. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*. 195: 1356–1358.
- Martire M, Castaldo P, D'Amico M, Preziosi P, Annunziato L, Tagliatela M. 2004. M channels containing KCNQ2 subunits modulate norepinephrine, aspartate, and GABA release from hippocampal nerve terminals. *The Journal of Neuroscience*. 24: 592–597.
- Martire M, D'Amico M, Panza E, Miceli F, Viggiano D, Lavergata F, Iannotti FA, Barrese V, Preziosi P, Annunziato L, Tagliatela M. 2007. Involvement of KCNQ2 subunits in [3H]dopamine release triggered by depolarization and pre-synaptic muscarinic receptor activation from rat striatal synaptosomes. *Journal of Neurochemistry*. 102: 179–193.

- McGee RG, Bakens A, Wiley K, Riordan SM, Webster AC. 2011. Probiotics for patients with hepatic encephalopathy. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 11.
- Mehindate K, Sahlas DJ, Frankel D, Mawal Y, Liberman A, Corcos J, Dion S, Schipper HM. 2001. Proinflammatory cytokines promote glial heme oxygenase-1 expression and mitochondrial iron deposition: implications for multiple sclerosis. *Journal of Neurochemistry*. 77: 1386–1395.
- Meister G, Peters L. 2006. Kleine nicht-kodierende RNAs als Regulatoren der Genexpression. *Biospektrum*. 12: 615–618.
- Merico D, Costain G, Butcher NJ, Warnica W, Ogura L, Alfred SE, Brzustowicz LM, Bassett AS. 2014. MiRNA Dysregulation, Gene Networks, and Risk for Schizophrenia in 22q11.2 Deletion Syndrome. *Frontiers in Neurology*. 5: 238.
- Meyer D, Bonhoeffer T, Scheuss V. 2014. Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity. *Neuron*. 82: 430–443.
- Miese F, Kircheis G, Wittsack HJ, Wenserski F, Hemker J, Mödder U, Häussinger D, Cohnen M. 2006. ¹H-MR spectroscopy, magnetization transfer, and diffusion-weighted imaging in alcoholic and nonalcoholic patients with cirrhosis with hepatic encephalopathy. *American Journal of Neuroradiology*. 27: 1019–1026.
- Mínguez B, García-Pagán JC, Bosch J, Turnes J, Alonso J, Rovira A, Córdoba J. 2006. Noncirrhotic portal vein thrombosis exhibits neuropsychological and MR changes consistent with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 43: 707–714.
- Monti JM, Torterolo P, Lagos P. 2013. Melanin-concentrating hormone control of sleep-wake behavior. *Sleep Medicine Reviews*. 17: 293–298.
- Morita T, Mitsialis SA, Koike H, Liu Y, Kourembanas S. 1997. Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 32804–32809.
- Munitegui A, Pey J, Planes FJ, Rubio A. 2013. Joint analysis of miRNA and mRNA expression data. *Briefings in Bioinformatics*. 14: 263–278.
- Murphy EJ, Owada Y, Kitanaka N, Kondo H, Glatz JFC. 2005. Brain arachidonic acid incorporation is decreased in heart fatty acid binding protein gene-ablated mice. *Biochemistry*. 44: 6350–6360.
- Murthy CR, Rama Rao KV, Bai G, Norenberg MD. 2001. Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*. 66: 282–288.
- Naegele T, Grodd W, Viebahn R, Seeger U, Klose U, Seitz D, Kaiser S, Mader I, Mayer J, Lauchart W, Gregor M, Voigt K. 2000. MR imaging and ¹H spectroscopy of brain metabolites in hepatic encephalopathy: time-course of renormalization after liver transplantation. *Radiology*. 216: 683–691.
- Nakagami T, Taji S, Takahashi M, Yamanishi K. 1992. Antiviral activity of a bile pigment, biliverdin, against human herpesvirus 6 (HHV-6) in vitro. *Microbiology and Immunology*. 36: 381–390.
- Narayan S, Tang B, Head SR, Gilmartin TJ, Sutcliffe JG, Dean B, Thomas EA. 2008. Molecular profiles of schizophrenia in the CNS at different stages of illness. *Brain Research*. 1239: 235–248.
- Nikolov DB, Xu K, Himanen JP. 2013. Eph/ephrin recognition and the role of Eph/ephrin clusters in signaling initiation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1834: 2160–2165.

- Nimura T, Weinstein PR, Massa SM, Panter S, Sharp FR. 1996. Heme oxygenase-1 (HO-1) protein induction in rat brain following focal ischemia. *Brain Research. Molecular Brain Research*. 37: 201–208.
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*. 1: 1559–1582.
- Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. 1979. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Research*. 161: 303–310.
- Norenberg MD. 1987. The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochemical Pathology*. 6: 13–33.
- Norenberg MD, Itzhak Y, Bender AS. 1997. The peripheral benzodiazepine receptor and neurosteroids in hepatic encephalopathy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 420: 95–111.
- Norenberg MD. 1998. Astroglial dysfunction in hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*. 13: 319–335.
- Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. 2006. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature Structural & Molecular Biology*. 13: 1108–1114.
- Nunez EA. 1997. Fatty acids involved in signal cross-talk between cell membrane and nucleus. Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential fatty acids. 57: 429–434.
- Okamura K, Ishizuka A, Siomi H, Siomi MC. 2004. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes & Development*. 18: 1655–1666.
- Opanashuk LA, Finkelstein JN. 1995. Relationship of lead-induced proteins to stress response proteins in astroglial cells. *Journal of Neuroscience Research*. 42: 623–632.
- Otterbein LE, Mantell LL, Choi AM. 1999. Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *The American Journal of Physiology*. 276: 688–694.
- Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM. 2000. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nature Medicine*. 6: 422–428.
- Otterbein LE, Zuckerbraun BS, Haga M, Liu F, Song R, Usheva A, Stachulak C, Bodyak N, Smith RN, Csizmadia E, Tyagi S, Akamatsu Y, Flavell RJ, Billiar TR, Tzeng E, Bach FH, Choi AMK, Soares MP. 2003. Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nature Medicine*. 9: 183–190.
- Owada Y, Yoshimoto T, Kondo H. 1996. Spatio-temporally differential expression of genes for three members of fatty acid binding proteins in developing and mature rat brains. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 12: 113–122.
- Owada Y, Kondo H. 2003. Fatty Acid Binding Proteins of the Brain. In: Duttaroy AK, Spener F, editors. *Cellular Proteins and Their Fatty Acids in Health and Disease*. Weinheim: Wiley-VCH. 253–265.
- Owada Y, Abdelwahab SA, Kitanaka N, Sakagami H, Takano H, Sugitani Y, Sugawara M, Kawashima H, Kiso Y, Mobarakeh JI, Yanai K, Kaneko K, Sasaki H, Kato H, Saino-Saito S, Matsumoto N, Akaike N, Noda T, Kondo H. 2006. Altered emotional behavioral responses in mice lacking brain-type fatty acid-binding protein gene. *The European Journal of Neuroscience*. 24: 175–187.

- Ozawa S, Gamou T, Habano W, Inoue K, Yoshida M, Nishikawa A, Nemoto K, Degawa M. 2011. Altered expression of GADD45 genes during the development of chemical-mediated liver hypertrophy and liver tumor promotion in rats. *The Journal of Toxicological Sciences*. 36: 613–623.
- Panahian N, Yoshiura M, Maines MD. 1999. Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice. *Journal of Neurochemistry*. 72: 1187–1203.
- Papadopoulos V. 2003. Peripheral benzodiazepine receptor: structure and function in health and disease. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 61: 30-50.
- Park JH, Shin C. 2014. MiRNA-directed cleavage of targets: mechanism and experimental approaches. *BMB Reports*. 47: 417–423.
- Pathania M, Torres-Reveron J, Yan L, Kimura T, Lin TV, Gordon V, Teng ZQ, Zhao X, Fulga TA, Van Vactor D, Bordey A. 2012. miR-132 enhances dendritic morphogenesis, spine density, synaptic integration, and survival of newborn olfactory bulb neurons. *PLoS One*. 7.
- Peng M, Jia J, Qin W. 2015. Plasma gelsolin and matrix metalloproteinase 3 as potential biomarkers for Alzheimer disease. *Neuroscience Letters*. 595: 116–121.
- Pereg D, Kotliroff A, Gadoth N, Hadary R, Lishner M, Kitay-Cohen Y. 2011. Probiotics for patients with compensated liver cirrhosis: a double-blind placebo-controlled study. *Nutrition*. 27: 177–181.
- Pertusa M, García-Matas S, Rodríguez-Farré E, Sanfeliu C, Cristòfol R. 2007. Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *Journal of Neurochemistry*. 101: 794–805.
- Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. 2006. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular Cell*. 21: 533–542.
- Petrache I, Otterbein LE, Alam J, Wiegand GW, Choi AM. 2000. Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. 278: 312-319.
- Pfaffl MW. 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum*. 10: 92–95.
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W. 2005. Inhibition of translational initiation by Let-7 MiRNA in human cells. *Science*. 309: 1573–1576.
- Pissios P, Ozcan U, Kokkotou E, Okada T, Liew CW, Liu S, Peters JN, Dahlgren G, Karamchandani J, Kudva YC, Kurpad AJ, Kennedy RT, Maratos-Flier E, Kulkarni RN. 2007. Melanin concentrating hormone is a novel regulator of islet function and growth. *Diabetes*. 56: 311–319.
- Porter NM, Bohannon JH, Curran-Rauhut M, Buechel HM, Dowling ALS, Brewer LD, Popovic J, Thibault V, Kraner SD, Chen KC, Blalock EM. 2012. Hippocampal CA1 transcriptional profile of sleep deprivation: relation to aging and stress. *PLoS one*. 7.
- Pu L, Annan RS, Carr SA, Frolov A, Wood WG, Spener F, Schroeder F. 1999. Isolation and identification of a mouse brain protein recognized by antisera to heart fatty acid-binding protein. *Lipids*. 34: 363–373.
- Qiagen. 2009. QuantiTect® Reverse Transcription Handbook. Zuletzt zugegriffen im August 2015.
- Qiagen. 2012. RNeasy Mini Handbook. 4th Edition. Zuletzt zugegriffen im August 2015.

- Qu Z, Li W, Fu B. 2014. MiRNAs in autoimmune diseases. *BioMed Research International*. 2014: 527895
- Qvartskhava 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. 2015. Hyperammonemia in gene-targeted mice lacking functional hepatic glutamine synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112: 5521–5526.
- Rama Rao KV, Reddy PVB, Tong X, Norenberg MD. 2010. Brain edema in acute liver failure: inhibition by L-histidine. *The American journal of pathology*. 176: 1400–1408.
- Rama Rao KV, Norenberg MD. 2012. Brain energy metabolism and mitochondrial dysfunction in acute and chronic hepatic encephalopathy. *Neurochemistry International*. 60: 697–706.
- Rama Rao KV, Norenberg MD. 2014. Glutamine in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: the trojan horse hypothesis revisited. *Neurochemical Research*. 39: 593–598.
- Ramocki MB, Zoghbi HY. 2008. Failure of neuronal homeostasis results in common neuropsychiatric phenotypes. *Nature*. 455: 912–918.
- Rehwinkel J, Behm-Ansmant I, Gatfield D, Izaurralde E. 2005. A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA*. 11: 1640–1647.
- Reinehr R, Görg B, Becker S, Qvartskhava N, Bidmon HJ, Selbach O, Haas HL, Schliess F, Häussinger D. 2007. Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. *Glia*: 758–771.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403: 901–906.
- Riggio O, Ridola L, Pasquale C, Nardelli S, Pentassuglio I, Moscucci F, Merli M. 2011. Evidence of persistent cognitive impairment after resolution of overt hepatic encephalopathy. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 9: 181–183.
- Roush S, Slack FJ. 2008. The let-7 family of miRNAs. *Trends in Cell Biology*. 18: 505–516.
- Roy K, Murtie JC, El-Khodori BF, Edgar N, Sardi SP, Hooks BM, Benoit-Marand M, Chen C, Moore H, O'Donnell P, Brunner D, Corfas G. 2007. Loss of erbB signaling in oligodendrocytes alters myelin and dopaminergic function, a potential mechanism for neuropsychiatric disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104: 8131–8136.
- Ruby JG, Jan C, Player C, Axtell MJ, Lee W, Nusbaum C, Ge H, Bartel DP. 2006. Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional miRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell*. 127: 1193–1207.
- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J. 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques*. 34: 374–378.
- Sala C, Futai K, Yamamoto K, Worley PF, Hayashi Y, Sheng M. 2003. Inhibition of dendritic spine morphogenesis and synaptic transmission by activity-inducible protein Homer1a. *The Journal of Neuroscience*. 23: 6327–6337.

- Sammut IA, Foresti R, Clark JE, Exon DJ, Vesely MJ, Sarathchandra P, Green CJ, Motterlini R. 1998. Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of haeme oxygenase-1. *British Journal of Pharmacology*. 125: 1437–1444.
- Sato H, Ishii T, Sugita Y, Tateishi N, Bannai S. 1993. Induction of a 23 kDa stress protein by oxidative and sulfhydryl-reactive agents in mouse peritoneal macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta* 1148: 127–132.
- Sauerbruch T, Appenrodt B, Schmitz V, Spengler U. 2013. The conservative and interventional treatment of the complications of liver cirrhosis. *Deutsches Ärzteblatt International*. 110: 126-32.
- Saunders EL, Maines MD, Meredith MJ, Freeman ML. 1991. Enhancement of heme oxygenase-1 synthesis by glutathione depletion in Chinese hamster ovary cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 288: 368–373.
- Scapagnini G, D'Agata V, Calabrese V, Pascale A, Colombrita C, Alkon D, Cavallaro S. 2002. Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain. *Brain Research*. 954: 51–59.
- Schaefer A, O'Carroll D, Tan CL, Hillman D, Sugimori M, Llinas R, Greengard P. 2007. Cerebellar neurodegeneration in the absence of miRNAs. *The Journal of Experimental Medicine*. 204: 1553–1558.
- Schipper HM, Cissé S, Stopa EG. 1995. Expression of heme oxygenase-1 in the senescent and Alzheimer-diseased brain. *Annals of Neurology*. 37: 758–768.
- Schipper HM, Liberman A, Stopa EG. 1998. Neural heme oxygenase-1 expression in idiopathic Parkinson's disease. *Experimental Neurology*. 150: 60–68.
- Schipper HM, Mawal Y, Chertkow H, Bergman H. 2001. Blood HO-1 mRNA in AD and MCI. *Neurology*. 57: 2142–2143.
- Schipper HM. 2004a. Heme oxygenase-1: transducer of pathological brain iron sequestration under oxidative stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1012: 84–93.
- Schipper HM. 2004b. Brain iron deposition and the free radical-mitochondrial theory of ageing. *Ageing Research Reviews*. 3: 265–301.
- Schipper HM, Bennett DA, Liberman A, Bienias JL, Schneider JA, Kelly J, Arvanitakis Z. 2006. Glial heme oxygenase-1 expression in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*. 27: 252–261.
- Schipper HM, Song W, Zukor H, Hascalovici JR, Zeligman D. 2009. Heme oxygenase-1 and neurodegeneration: expanding frontiers of engagement. *Journal of Neurochemistry*. 110: 469–485.
- Schliess F, Görg B, Fischer R, Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K, Häussinger D. 2002. Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *Federation of American Societies for Experimental Biology*. 16: 739–741.
- Schliess F, Foster N, Görg B, Reinehr R, Häussinger D. 2004. Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes. *Glia*. 47: 21–29.
- Schliess F, Görg B, Häussinger D. 2006. Pathogenetic interplay between osmotic and oxidative stress: the hepatic encephalopathy paradigm. *Biological Chemistry*. 387: 1363–1370.
- Schmitt I, Bitoun E, Manto M. 2009. PTPRR, cerebellum, and motor coordination. *Cerebellum*. 8: 71–73.

- Schomerus H, Hamster W. 2001. Quality of life in cirrhotics with minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*. 16: 37–41.
- Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. 1996. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1302: 93–109.
- Schröder J, Ansaloni S, Schilling M, Liu T, Radke J, Jaedicke M, Schjeide BM, Mashychev A, Tegeler C, Radbruch H, Papenberg G, Düzel S, Demuth I, Bucholtz N, Lindenberger U, Li SC, Steinhagen-Thiessen E, Lill CM, Bertram L. 2014. MiRNA-138 is a potential regulator of memory performance in humans. *Frontiers in Human Neuroscience*. 8: 501.
- Schuman EM, Dynes JL, Steward O. 2006. Synaptic regulation of translation of dendritic mRNAs. *The Journal of Neuroscience*. 26: 7143–7146.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 115: 199–208.
- Sebret A, Léna I, Crété D, Matsui T, Roques BP, Daugé V. 1999. Rat hippocampal neurons are critically involved in physiological improvement of memory processes induced by cholecystokinin-B receptor stimulation. *The Journal of Neuroscience*. 19: 7230–7237.
- Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, Bonner WM. 2010. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutation Research*. 704: 152–159.
- Sellner PA, Chu W, Glatz JF, Berman NE. 1995. Developmental role of fatty acid-binding proteins in mouse brain. *Brain Research*. 89: 33–46.
- Sen GL, Blau HM. 2005. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nature Cell Biology*. 7: 633–636.
- Sergeeva OA, Fleischer W, Chepkova AN, Warskulat U, Häussinger D, Siebler M, Haas HL. 2007. GABAA-receptor modification in taurine transporter knockout mice causes striatal disinhibition. *The Journal of Physiology*. 585: 539–548.
- Shah NJ, Neeb H, Zaitsev M, Steinhoff S, Kircheis G, Amunts K, Häussinger D, Zilles K. 2003. Quantitative T1 mapping of hepatic encephalopathy using magnetic resonance imaging. *Hepatology*. 38: 1219–1226.
- Sharma BC, Sharma P, Agrawal A, Sarin SK. 2009. Secondary prophylaxis of hepatic encephalopathy: an open-label randomized controlled trial of lactulose versus placebo. *Gastroenterology*. 137: 885–891.
- Sharma P, Sharma BC. 2013. Disaccharides in the treatment of hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*. 28: 313–320.
- Sherwood SW, Rush D, Ellsworth JL, Schimke RT. 1988. Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85: 9086–9090.
- Sheth U, Parker R. 2003. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*. 300: 805–808.
- Shioda N, Yamamoto Y, Watanabe M, Binas B, Owada Y, Fukunaga K. 2010. Heart-type fatty acid binding protein regulates dopamine D2 receptor function in mouse brain. *The Journal of Neuroscience*. 30: 3146–3155.

- Sidhu SS, Goyal O, Mishra BP, Sood Ajit, Chhina RS, Soni RK. 2011. Rifaximin improves psychometric performance and health-related quality of life in patients with minimal hepatic encephalopathy (the RIME Trial). *The American Journal of Gastroenterology*. 106: 307–316.
- Siegel G, Obernosterer G, Fiore R, Oehmen M, Bicker S, Christensen M, Khudayberdiev S, Leuschner PF, Busch CJ, Kane C, Hübel K, Dekker F, Hedberg C, Rengarajan B, Drepper C, Waldmann H, Kauppinen S, Greenberg ME, Draguhn A, Rehmsmeier M, Martinez J, Schratt GM. 2009. A functional screen implicates miRNA-138-dependent regulation of the dephalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nature Cell Biology*. 11: 705–716.
- Siegmund-Schultze N. 2012. Wie sich Therapien fortentwickeln. *Deutsches Ärzteblatt*. 109: 863–865.
- Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy JV, McHarg ML, Gagnon D, Rosales TO, Peiffer A, Anderson VE, Leppert M. 1998. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nature Genetics*. 18: 25–29.
- Smith MA, Kutty RK, Richey PL, Yan SD, Stern D, Chader GJ, Wiggert B, Petersen RB, Perry G. 1994. Heme oxygenase-1 is associated with the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology* 145: 42–47.
- Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G. 2000. The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Molecular Cell*. 5: 659–669.
- Smirnova L, Gräfe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, Wulczyn FG. 2005. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *The European Journal of Neuroscience*. 21: 1469–1477.
- Soares MP, Seldon MP, Gregoire IP, Vassilevskaia T, Berberat PO, Yu J, Tsui TY, Bach FH. 2004. Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *Journal of Immunology*. 172: 3553–3563.
- Sobczyk K, Jördens MS, Karababa A, Görg B, Häussinger D. 2015. Ephrin/Ephrin receptor expression in ammonia-treated rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. *Neurochemical Research*. 40: 274–283.
- Song W, Zukor H, Lin SH, Hascalovici J, Liberman A, Tavitian A, Mui J, Vali H, Tong XK, Bhardwaj SK, Srivastava LK, Hamel E, Schipper HM. 2012. Schizophrenia-like features in transgenic mice overexpressing human HO-1 in the astrocytic compartment. *The Journal of Neuroscience*. 32: 10841–10853.
- Sonntag KC. 2010. MiRNAs and deregulated gene expression networks in neurodegeneration. *Brain Research*. 1338: 48–57.
- Stark KL, Xu Bin, Bagchi A, Lai WS, Liu H, Hsu R, Wan X, Pavlidis P, Mills AA, Karayiorgou M, Gogos JA. 2008. Altered brain miRNA biogenesis contributes to phenotypic deficits in a 22q11-deletion mouse model. *Nature Genetics*. 40: 751–760.
- Staub F, Winkler A, Peters J, Kempfski O, Kachel V, Baethmann A. 1994. Swelling, acidosis, and irreversible damage of glial cells from exposure to arachidonic acid in vitro. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 14: 1030–1039.
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 235: 1043–1046.

- Stocker R, Peterhans E. 1989. Synergistic interaction between vitamin E and the bile pigments bilirubin and biliverdin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1002: 238–244.
- Stocker R. 1990. Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radical Research Communications*. 9: 101–112.
- Stocker R. 2004. Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxidants & Redox Signaling*. 6: 841–849.
- Su J, Cao X, Wang KW. 2011. A novel degradation signal derived from distal C-terminal frameshift mutations of KCNQ2 protein which cause neonatal epilepsy. *The Journal of Biological Chemistry*. 286: 42949–42958.
- Su PH, Lin YW, Huang RL, Liao YP, Lee HY, Wang HC, Chao TK, Chen CK, Chan MW, Chu TY, Yu MH, Lai HC. 2013. Epigenetic silencing of PTPRR activates MAPK signaling, promotes metastasis and serves as a biomarker of invasive cervical cancer. *Oncogene*. 32: 15–26.
- Suematsu M, Goda N, Sano T, Kashiwagi S, Egawa T, Shinoda Y, Ishimura Y. 1995. Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *The Journal of Clinical Investigation*. 96: 2431–2437.
- Sunderman FW. 1987. Metal induction of heme oxygenase. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 514: 65–80.
- Swanson AM, Allen AG, Shapiro LP, Gourley SL. 2015. GABA α 1-mediated plasticity in the orbitofrontal cortex regulates context-dependent action selection. *Neuropsychopharmacology*. 40: 1027–1036.
- Szumliński KK, Lominac KD, Kleschen MJ, Oleson EB, Dehoff MH, Schwarz MK, Seeburg PH, Worley PF, Kalivas PW. 2005. Behavioral and neurochemical phenotyping of Homer1 mutant mice: possible relevance to schizophrenia. *Genes, Brain, and Behavior*. 4: 273–288.
- Takeda A, Perry G, Abraham NG, Dwyer BE, Kutty RK, Laitinen JT, Petersen RB, Smith MA. 2000. Overexpression of heme oxygenase in neuronal cells, the possible interaction with Tau. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 5395–5399.
- Tang B, Dean B, Thomas EA. 2011. Disease- and age-related changes in histone acetylation at gene promoters in psychiatric disorders. *Translational Psychiatry*. 1: e64.
- Tarnowski M, Schneider G, Amann G, Clark G, Houghton P, Barr FG, Kenner L, Ratajczak MZ, Kucia M. 2012. RasGRF1 regulates proliferation and metastatic behavior of human alveolar rhabdomyosarcomas. *International Journal of Oncology*. 41: 995–1004.
- Tatro ET, Risbrough V, Soontornniyomkij B, Young J, Shumaker-Armstrong S, Jeste DV, Achim CL. 2013. Short-term recognition memory correlates with regional CNS expression of miRNA-138 in mice. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*. 21: 461–473.
- Thounaojam MC, Kaushik DK, Basu A. 2013. MiRNAs in the brain: its regulatory role in neuroinflammation. *Molecular Neurobiology*. 47: 1034–1044.
- Timmermann L, Gross J, Kircheis G, Häussinger D, Schnitzler A. 2002. Cortical origin of mini-asterixis in hepatic encephalopathy. *Neurology*. 58: 295–298.
- Timmermann L, Gross J, Butz M, Kircheis G, Häussinger D, Schnitzler A. 2003. Mini-asterixis in hepatic encephalopathy induced by pathologic thalamo-motor-cortical coupling. *Neurology*. 61: 689–692.

- Tinel N, Lauritzen I, Chouabe C, Lazdunski M, Borsotto M. 1998. The KCNQ2 potassium channel: splice variants, functional and developmental expression. Brain localization and comparison with KCNQ3. *FEBS Letters*. 438: 171–176.
- Trzepacz PT, Tarter RE, Shah A, Tringali R, Faett DG, Van Thiel DH. 1994. SPECT scan and cognitive findings in subclinical hepatic encephalopathy. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. 6: 170–175.
- Tu JC, Xiao B, Yuan JP, Lanahan AA, Leoffert K, Li M, Linden DJ, Worley PF. 1998. Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *Neuron*. 21: 717–726.
- Tuerk MJ, Fazel N. 2009. Zinc deficiency. *Current Opinion in Gastroenterology*. 25: 136–143.
- Van Beuningen HM, de Vries-van Melle ML, Vitters EL, Schreurs W, van den Berg WB, van Osch GJVM, van der Kraan PM. 2014. Inhibition of TAK1 and/or JAK can rescue impaired chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in osteoarthritis-like conditions. *Tissue Engineering*. 20: 2243–2252.
- Van Den Maagdenberg AM, Bächner D, Schepens JT, Peters W, Franssen JA, Wieringa B, Hendriks WJ. 1999. The mouse Ptprr gene encodes two protein tyrosine phosphatases, PTP-SL and PTPBR7, that display distinct patterns of expression during neural development. *The European Journal of Neuroscience*. 11: 3832–3844.
- Van Hove I, Lemmens K, Van de Velde S, Verslegers M, Moons L. 2012a. Matrix metalloproteinase-3 in the central nervous system: a look on the bright side. *Journal of Neurochemistry*. 123: 203–216.
- Van Hove I, Verslegers M, Buyens T, Delorme N, Lemmens K, Stroobants S, Gantois I, D’Hooge R, Moons L. 2012b. An aberrant cerebellar development in mice lacking matrix metalloproteinase-3. *Molecular Neurobiology*. 45: 17–29.
- Veerkamp JH, van Kuppevelt TH, Maatman RG, Prinsen CF. 1993. Structural and functional aspects of cytosolic fatty acid-binding proteins. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*. 49: 887–906.
- Veerkamp JH, Zimmerman AW. 2001. Fatty acid-binding proteins of nervous tissue. *Journal of Molecular Neuroscience*. 16: 133–42.
- Vemuganti R, Silva VR, Mehta SL, Hazell, AS. 2014. Acute liver failure-induced hepatic encephalopathy is associated with changes in miRNA expression profiles in cerebral cortex of the rat. *Metabolic Brain Disease*. 29: 891–899.
- Visner GA, Fogg S, Nick HS. 1996. Hyperoxia-responsive proteins in rat pulmonary microvascular endothelial cells. *The American Journal of Physiology*. 270: 517–525.
- Vogels BA, Maas MA, Daalhuisen J, Quack G, Chamuleau RA. 1997. Memantine, a noncompetitive NMDA receptor antagonist improves hyperammonemia-induced encephalopathy and acute hepatic encephalopathy in rats. *Hepatology*. 25: 820–827.
- Wagner KV, Häusl AS, Pöhlmann ML, Hartmann J, Labermaier C, Müller MB, Schmidt MV. 2014. Hippocampal Homer1 levels influence motivational behavior in an operant conditioning task. *PloS One*. 9.

- Wang QM, Yin XY, Duan ZJ, Guo SB, Sun XY. 2013. Role of the heme oxygenase/carbon monoxide pathway in the pathogenesis and prevention of hepatic encephalopathy. *Molecular Medicine Reports*. 8: 67–74.
- Wang ZH, Ren WY, Zhu L, Hu LJ. 2014. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates LPS induced inflammation in rat macrophages through autophagy activation. *The Scientific World Journal*. 2014: 189168.
- Warskulat U, Görg B, Bidmon HJ, Müller HW, Schliess F, Häussinger D. 2002. Ammonia-induced heme oxygenase-1 expression in cultured rat astrocytes and rat brain in vivo. *Glia*. 40: 324–336.
- Warskulat U, Borsch E, Reinehr R, Heller-Stilb B, Mönnighoff I, Buchczyk D, Donner M, Flögel U, Kappert G, Soboll S, Beer S, Pfeiffer K, Marschall HU, Gabrielsen M, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Dienes HP, Häussinger D. 2006. Chronic liver disease is triggered by taurine transporter knockout in the mouse. *FASEB Journal*. 20: 574–576.
- Watanabe A, Takei N, Higashi T, Shiota T, Nakatsukasa H, Fujiwara M, Sakata T, Nagashima H. et al. 1984. Glutamic acid and glutamine levels in serum and cerebrospinal fluid in hepatic encephalopathy. *Biochemical Medicine*. 32: 225–231.
- Watanabe H, Nagata E, Kosakai A, Nakamura M, Yokoyama M, Tanaka K, Sasai H. 2000. Disruption of the epilepsy KCNQ2 gene results in neural hyperexcitability. *Journal of Neurochemistry*. 75: 28–33.
- Weissenborn K, Ennen JC, Schomerus H, Rückert N, Hecker H. 2001. Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *Journal of Hepatology*. 34: 768–773.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 75: 855–862.
- Wu L, Fan J, Belasco JG. 2006. MiRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103: 4034–4039.
- Wulczyn FG, Smirnova L, Rybak A, Brandt C, Kwidzinski E, Ninnemann O, Strehle M, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R. 2007. Post-transcriptional regulation of the let-7 miRNA during neural cell specification. *FASEB Journal*. 21: 415–426.
- Wunder C, Potter RF. 2003. The heme oxygenase system: its role in liver inflammation. *Current Drug Targets. Cardiovascular & Haematological Disorders*. 3: 199–208.
- Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA. 2003. The *Drosophila* miRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Current Biology*. 13: 790–795.
- Xu Y, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. 2006. Oxidative inhibition of receptor-type protein-tyrosine phosphatase kappa by ultraviolet irradiation activates epidermal growth factor receptor in human keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 281: 27389–27397.
- Yamaguchi M, Sato H, Bannai S. 1993. Induction of stress proteins in mouse peritoneal macrophages by oxidized low-density lipoprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 193: 1198–1201.
- Yekta S, Shih IH, Bartel DP. 2004. MiRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 304: 594–596.
- Zhan T, Stremmel Wolfgang. 2012. The diagnosis and treatment of minimal hepatic encephalopathy. *Deutsches Ärzteblatt International*. 109: 180–187.

Zhang C, Chen B, Xu X, Han B, Wang G, Wang J. 2013. MiRNAs Regulated Brain Tumor Cell Phenotype and Their Therapeutic Potential. In: Lichtor T, editor. *Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications*. Rijeka, Kroatien: INTECH. 497-529.

Zhu Q, Wang L, Xiao Z, Xiao F, Luo J, Zhang X, Peng X, Wang X, Sun H. 2013. Decreased expression of Ras-GRF1 in the brain tissue of the intractable epilepsy patients and experimental rats. *Brain Research*. 1493: 99–109.

Zhuang Z, Yang B, Theus MH, Sick JT, Bethea JR, Sick TJ, Liebl DJ. 2010. EphrinBs regulate D-serine synthesis and release in astrocytes. *The Journal of Neuroscience*. 30: 16015–16024.

Zhuang Z, Huang J, Cepero ML, Liebl DJ. 2011. Eph signaling regulates gliotransmitter release. *Communicative & Integrative Biology*. 4: 223–226.

VIII. Abkürzungsverzeichnis

8OH(d)G	8-OH-deoxyguanosine
Abca5	ATP-binding-cassette Subfamilie 5
ADM	Adenosinmonophosphat
Adm2	Adrenomedullin 2
Ago	Argonaute
Arg2	Arginase 2
Arhgef2	Rho/rac guanine nucleotide exchange factor 2
Artn	Artemin
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSA	Rinderserumalbumin
CCKBR	Cholecystokinin B Rezeptor
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenmonoxid
CORT	Cortistatin
Creb2l1	cAMP response element-binding protein 2l1
C _t	Schwellenwert-Zyklus
Cth	Cystathionase
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
Cy3	Carbozyanin 3
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DGCR8	DiGeorge-Syndrom chromosomale (oder kritische) Region Gen 8
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's modified eagle Medium-Liquor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EEG	Elektroenzephalographie
EphA3	Ephrin Typ-A Rezeptor 3
EphB3	Ephrin Typ-B Rezeptor 3
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERBB4	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 4
Erk-1	Extrazellulär regulierte Kinase 1
FABP3	Fettsäure-bindendes Protein
FCS	Fötale Kälberserum
GABA	γ-Aminobuttersäure
GADD45α	Wachstumsstillstand- und DNA-Schaden-induzierbares Protein 45 alpha
Galnt3	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

gDNA	Genomische DNA
Gfra3	Glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha 3
GS	Glutaminsynthetase
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hepatische Enzephalopathie
Herpud1	Homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1
Hmox1	Hämoxygenase 1
HO	Hämoxygenase
Homer1	Homer protein homolog 1
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1
HRP	Horseradish peroxidase
hsa	<i>Homo sapiens</i>
HSP	Hitzeschockprotein
IE	Internationale Einheiten
Ifit2	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
Il6	Interleukin 6
ISHEN	International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism
KCNJ3	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3
KCNQ2	Potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2
LIMK-1	Lim-Domäne der Proteinkinase 1
Lin28b	Lin-28 homolog B
M ⁷ G-Kappe	Methylierte (7) Guanosin-Kappe
mAb	Monoklonale Antikörper
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MCHR1	Melanin-concentrating hormone receptor 1
MI	Molecular Imaging
miQPCR	miRNA-spezifische quantitative Realtime-PCR
miRNA	microRNA
MMP3	Matrix-Metalloproteinase-3
mRNA	Messenger RNA
MSO	L-Methionin-Sulfoximin
MTF	Metallresponsiver Transkriptionsfaktor
Myc	V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NADPH	Nicotinamidadenindinukelotidphosphat
NH ₃	Ammoniak
NH ₄ ⁺	Ammonium
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NKCC1	Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ - Kotransporter 1
NMDA	N-methyl-D-aspartat
nNOS	Neuronale NO-Synthese
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NOX	NADPH-Oxidase
Nr4a1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1

P-bodies	Processing bodies
pAb	Polyklonale Antikörper
PABP	Poly(A)-bindendes Protein
PACT	Proteinaktivator der Interferon-induzierten Proteinkinase
PARG	Poly(ADP-Ribose)-glykohydrolase
PBR	Peripherer Benzodiazepinrezeptor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Potentia Hydrogenii oder pondus Hydrogenii
PPM1E	Mg ²⁺ /Mn ²⁺ -abhängige Proteinphosphatase 1E
PTN	Proteintyrosinnitrierung
PTPRR	Protein-Tyrosin-Phosphatase
PVL	Portalvenöse Ligatur
Ran	Ras-ähnliches, nukleäres Protein
Ras-GRF1	Ras proteinspezifischer Guaninnukleotid-freisetzender Faktor 1
RIN	RNA Integritätswert
RISC	RNA-induziertes-Silencing-Kompex
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rno	<i>Rattus norvegicus</i>
RNOS	Reaktive Stick- und Sauerstoffspezies
RNS	Stickstoffradikale
ROS	Sauerstoffradikale
rRNA	Ribosomale RNA
RRU	Relative RNA Units
RT	Reverse Transkriptase
SA-β-Gal	Seneszenzassoziierte β-Galactosidase
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Serpine1	Serpin peptidase inhibitor, clade E, member 1
Sfrp4	Secreted frizzled-related protein 4
Shmt2	Serine hydroxymethyltransferase 2
Slc1a4	Solute carrier family 1, member 4
Slc6a6	Solute carrier family 6, member 6
Slc6a9	Solute carrier family 6, member 9
SnPP	Zinn-Protoporphyrin IX
Sp1	Spezifitätsprotein 1
TauT	Taurintransporter
TauT ^{-/-}	Taurintransporter-defizientes Mausmodell
Tlcd1	TLC domain containing 1
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRBP	Trans-aktivations response RNA-binding protein
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TRizol	Phenol-Guanidin-Isothiocyanat-Lösung
Wars	Tryptophanyl-tRNA synthetase

Yars	Tyrosyl-tRNA synthetase
ZNS	Zentralnervensystem

IX. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1	Wirkungen von Ammoniak auf das Gehirn.	4
2	Einteilung der hepatischen Enzephalopathie (HE) nach der CHILD-Score.	6
3	MR-spektroskopische Untersuchungen im Gehirn bei (A) gesunden Probanden, (B) Patienten mit Zirrhose und latenter (subklinischer) HE und (C) Patienten mit manifester HE in Stadium I und II.	9
4	Schematische Darstellung der Schwellungshypothese zur Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie.	9
5	Schema zur Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie (HE).	12
6	Mechanismen und funktionelle Konsequenzen der ammoniakvermittelten Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies in Astrozyten.	13
7	Schematische Darstellung des enzymatischen Abbaus von Häm.	14
8	Biogenese von miRNA.	20
9	Mechanismen der postranskriptionellen Genregulation durch miRNAs.	22
10	Schematischer Aufbau eines semi-dry Proteinblots.	39
11	Übersichtsdarstellung von miRNA- und Genexpressionsänderungen in mit Ammoniak-behandelten kultivierten Rattenastrozyten.	54
12	miRNA- und Genexpressionsänderungen in mit Ammoniak-behandelten kultivierten Rattenastrozyten.	55
13	Validierung im Array identifizierter, durch Ammoniak induzierter Genexpressionsänderungen mittels Realtime-PCR.	56
14	Bioinformatische Analyse von durch Ammoniak-induzierten Genexpressionsänderungen potentiell beeinflussten biologischen Funktionen und Signalwege, sowie Vorhersage potentiell regulierter miRNA-Spezies.	57-58
15	Bioinformatische Korrelation der durch Array-Analyse ermittelten mRNA-Expressionsänderungen mit potentiellen Zielgenen verändert exprimierter miRNAs in mit Ammoniak-behandelten kultivierten Rattenastrozyten.	59
16	Validierung Ammoniak-induzierter miRNA-Expressionsänderungen in kultivierten Rattenastrozyten.	60
17	Einfluss von Hemmstoffen der NADPH-Oxidase und der Glutaminsynthetase auf die durch Ammoniak induzierte Expressionssteigerung der HO-1 mRNA in kultivierten Rattenastrozyten.	61
18	Einfluss von Hemmstoffen der NADPH-Oxidase und der Glutaminsynthetase auf durch Ammoniak herunterregulierter miRNA-Spezies.	62
19	Einfluss von miRNA-Inhibitoren auf die Nachweisbarkeit von potentiell die HO-1 regulierenden miRNA-Spezies und Expression von HO-1 mRNA	64

	und Protein.	
20	Einfluss der Hemmung der miRNA-Spezies rno-miR-31a-5p, -221-3p, -221-5p, -222-3p, -326-3p oder -365-5p auf das mRNA-Expressionsniveau potentieller miRNA-Zielgene.	65
21	Einfluss einer kombinierten Behandlung mit den miRNA-Inhibitoren rno-miR-31a-5p, -221-3p, -221-5p, -222-3p, -326-3p und -365-3p auf das HO-1 mRNA und Proteinexpressionsniveaus.	66
22	Einfluss einer Inhibition die HO-1-Expression regulierender miRNA-Spezies auf die Proliferation kultivierter Rattenastrozyten.	69
23	HO-1 und GADD45 α mRNA Expression in mit Ammoniak-behandelten kultivierten Rattenastrozyten <i>in vitro</i> und im zerebralen Kortex von Taurintransporter-defizienten Mäusen <i>in vivo</i> .	70
24	Einfluss von Taurin und des HO-1-Hemmstoffs SnPP auf die durch Ammoniak induzierte Proliferationshemmung kultivierter Rattenastrozyten.	71
25	Einfluss einer durch hypoosmotisches Zellkulturmedium induzierten Astrozytenschwellung auf die Expression durch Ammoniak regulierter miRNA-Spezies.	72
26	Einfluss einer durch hypoosmotisches Zellkulturmedium induzierten Astrozytenschwellung auf die HO-1 mRNA Expression und die Astrozytenproliferation.	73
27	Genexpressionsänderungen in humanen <i>post mortem</i> Hirngewebe von Leberzirrhosepatienten mit und ohne HE.	74
28	miRNA Expressionsänderungen in humanen <i>post mortem</i> Hirngewebe von Leberzirrhosepatienten mit und ohne HE.	75
29	Überprüfung von miRNA Expressionsänderungen in <i>post mortem</i> Hirngewebe von Leberzirrhosepatienten mit HE der Kohorte 1.	76
30	Überprüfung von im Array identifizierten miRNA-Expressionsänderungen in <i>post mortem</i> Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE, entnommen aus dem <i>Gyrus fusiforme</i> (Kohorten 1 und 2) mittels miQPCR.	77
31	Bioinformatische Vorhersage potentieller Zielgene von im Gehirn von Leberzirrhosepatienten mit HE hochregulierter miRNA-Spezies.	78
32	Validierung der Überexpression von miRNA Mimetika in MOG-G-CCM- und SH-SY5Y-Zellen.	79
33	Einfluss einer über in <i>post mortem</i> Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE hochregulierter miRNA-Spezies in MOG-G-CCM-Zellen auf die Expression potentieller Zielgene.	80
34	Einfluss der Überexpression in <i>post mortem</i> Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE hochregulierter miRNA-Spezies in SH-SY5Y-Zellen auf die mRNA Expression potentieller Zielgene.	81
35	Hypothese zur Beteiligung von miRNAs an der durch Ammoniak induzierten Astrozytenseneszenz.	96

X. Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
1	Einteilung der hepatischen Enzephalopathie (HE) in verschiedene Schweregrade nach West-Haven Kriterien.	5
2	Verwendete Geräte.	25
3	Verbrauchsmaterialien.	26
4	Kommerzielle Reagenzsysteme (Kits).	26
5	Chemikalien oder Substanzen.	27
6	Puffer und Lösungen.	28
7	Zellkulturmedium.	30
8	Patientdemographie, Todesursache und Ätiologie der Zirrhose bei Patienten mit Leberzirrhose mit oder ohne hepatische Enzephalopathie.	31
9	Leber- und Gehirnpathologie und Begleiterkrankungen bei Kontrollpatienten und Patienten mit Leberzirrhose mit oder ohne hepatische Enzephalopathie.	31
10	Patientdemographie, Todesursache und Ätiologie der Zirrhose bei Patienten mit Leberzirrhose mit oder ohne hepatische Enzephalopathie bezogen.	32
11	Begleiterkrankungen bei Patienten mit Leberzirrhose mit hepatischer Enzephalopathie.	33
12	Blutuntersuchungen bei Patienten mit Leberzirrhose mit hepatischer Enzephalopathie.	34
13	Primär- und Sekundärantikörper für den Nachweis individueller Proteine im Western-Blot.	37
14	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.	38
15	In der Realtime-PCR verwendete Oligonukleotide.	41
16	Schema zum Ablauf einer Realtime-PCR.	44
17	Oligonukleotid-Primer für die Quantifizierung individueller miRNA-Spezies mittels Realtime-PCR (miQPCR).	47
18	Übersicht zum Amplifikationszyklus der miQPCR.	49
19	Putative Bindungsstellen der miRNAs rno-miR-31a-5p, -221-3p, -222-3p, -326-3p und -365-3p an der potentiellen Ziel-mRNA.	67
20	Putative Bindungsstellen der miRNAs rno-miR-221-5p an der potentiellen Ziel-mRNA.	68
21	Einfluss der Überexpression der miRNA-Spezies hsa-miR-138-2-3p, -152-3p, -339-5p, -455-3p und -486-5p auf das mRNA-Expressionsniveau jeweiliger potentieller miRNA-Zielgene in humanen MOG-G-CCM- und SH-SY5Y-Zellen.	81
22	Putative Bindungsstellen der miRNAs hsa-miR-138-2-3p, -152-3p, -339-5p, -455-3p und -486-5p an der potentiellen Ziel-mRNA.	83

23	Biologische Funktionen bei HE runterregulierter Gene, die potentiell von bei HE hochregulierten miRNA-Spezies in ihrer Expression gehemmt wurden.	99
----	---	----

XI. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. In erster Linie geht mein Dank an Herr Prof. Häussinger, der es mir ermöglicht hat, an diesen interessanten und herausfordernden Projekten zu arbeiten. Bei Prof. Willbold bedanke ich mich besonders für die Bereitschaft, das Gutachten für diese Arbeit zu erstellen. Obwohl er viel beschäftigt war, hat er stets bei Problemen und Fragen ein offenes Ohr gehabt. An mein Team – Dr. Boris Görg für die ständige Unterstützung und sein Rat. Immer hat er Ideen, wie man ein Problem lösen kann und diese Arbeit vorantreibt. Ich danke ihm herzlich dafür. Dr. Ayşe Karababa, die immer für mich da gewesen ist, in schlechten und in guten Tagen, für die lieben Worte, für die Motivation, die sie mir gibt, immer weiter zu gehen und an Träume festzuhalten. Für deine Freundschaft möchte ich dir danken. Torsten Janssen für seine nützlichen Tipps und die Unterstützung im praktischen Teil. Ich habe von ihm gelernt, das Lachen nicht zu verlieren, auch in stressigen Tagen. Ursula Kristek für die Unterstützung im praktischen Teil. Besonderer Dank geht an Dr. Hans J. Bidmon und Dr. Mirco Castoldi – Ratgeber und Unterstützer bei der Durchführung und Fertigung dieser Arbeit. Ein herzlichen Dank an Vladimir Benes, Jelena Pistolovic und Paul Collier von EMBL Genomics Core Facility, Heidelberg, Deutschland für die Hybridisierung von rat Affymetrix mRNA, human Agilent mRNA sowie human und rat Agilent miRNA Arrays.

Mein Vater Joseph Oenarto hat mir gesagt, dass er für mich nicht die Welt kaufen kann, dafür sind wir nicht reich genug, aber er kann mir etwas viel wertvolles schenken und das ist die Bildung. Ich bin ihm sehr dankbar, dass er es mir ermöglicht hat, die Welt zu bereisen und hier in Deutschland zu studieren. Und jetzt siehst du Vater, ich habe es geschafft und du fehlst mir sehr. Mein Dank an meine Mutter Kristina und meine Geschwister Vici und Jeffrey, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben. Mein größter Dank gilt an meine Freund David, dass er immer die Ruhe bewahrt und mich durch Höhen und Tiefen begleitet hat, denn ohne seine ständige Unterstützung wäre diese Arbeit nicht erstanden. Ganz Besonders möchte ich mich bei meiner wundervollen Freundin Rosemarie bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich hat, hinter mir steht und immer verständnisvoll und geduldig ist. Auch bedanke ich mich herzlich bei Eleni Konstantinidou, Irma Kühnert, Axel & Rina Kühnert, die für mich wie eine zweite Familie hier in Deutschland geworden sind. Als letztes möchte ich bei allen bedanken, die stets an mich geglaubt haben. „Nach den Gesetzen der Physik können Hummeln nicht fliegen. Doch die Hummel weiß das nicht und fliegt trotzdem“.

Eidesstattliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift