

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

**Untersuchungen zur Wirkung HE-relevanter Faktoren auf das Zell- und Kernvolumen  
kultivierter Astrozyten unter besonderer Berücksichtigung der Bedeutung  
von oxidativ/nitrosativem Stress**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Vera Lachmann

2016

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

gez.:

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

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Alfons Schnitzler

*Meiner Familie in Dankbarkeit*

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

als Posterbeitrag

Lachmann V., Görg B., Häussinger D., Hepatische Enzephalopathie auslösende Faktoren vermitteln eine rasch einsetzende Zellschwellung in kultivierten Rattenastrozyten. Juli 2012, Doktorandenkongress der Medical Research School Düsseldorf

in Originalarbeiten

Lachmann, V., Görg, B., Bidmon, H.J., Keitel, V., Häussinger, D., 2013. Precipitants of hepatic encephalopathy induce rapid astrocyte swelling in an oxidative stress dependent manner. Arch.Biochem.Biophysic.536, 143-151.doi: 10.1016/j.abb.2013.05.004

## Zusammenfassung

Die hepatische Enzephalopathie ist ein komplexes neuropsychiatrisches Krankheitsbild, welches aufgrund eines akuten Leberversagens oder einer vorbestehenden chronischen Lebererkrankung entsteht. Die HE ist die klinische Manifestation eines geringgradigen Hirnödems, das begleitet wird von einer verstärkten Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies.

Die Astrozytenschwellung nimmt in der Pathogenese der HE eine zentrale Stellung ein. In kultivierten Astrozyten induzieren HE-relevante Faktoren wie Ammoniak, Benzodiazepine, *pro*-inflammatorische Zytokine und Hypoosmolarität die rasche Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies (RNOS). Da RNOS eine Zellschwellung induzieren können, und eine Zellschwellung andererseits die Bildung von RNOS in Astrozyten auslöst, wurde vermutet, dass HE-relevante Faktoren einen sich selbst verstärkenden Kreislauf zwischen RNOS-Bildung und Zellschwellung in Gang setzen und eine Reihe von für die Pathogenese der HE bedeutsamen Konsequenzen vermitteln.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe einer Volumenmikroskopiertechnik rasch einsetzende Veränderungen des Astrozytenzellvolumens durch HE-relevante Faktoren zeit- und konzentrationsabhängig zu untersuchen und zugrundeliegende molekulare Mechanismen unter besonderer Berücksichtigung von oxidativ/nitrosativem Stress zu charakterisieren.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass Ammoniak, Diazepam und die *pro*-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 20 Minuten eine Zunahme des Astrozytenzellvolumens um 25 % induzieren und dies begleitet wird von einer Kernschwellung vergleichbaren Ausmaßes. Die durch Ammoniak, TNF- $\alpha$  oder Diazepam induzierte Astrozytenschwellung wurde vollständig durch das Antioxidans Epigallocatechingallat verhindert, was auf eine Beteiligung von oxidativ/nitrosativem Stress bei der rasch einsetzenden astrozytären Zellvolumenzunahme hindeutet.

Die durch Ammoniak induzierte Astrozytenschwellung ließ sich weiterhin durch Hemmstoffe der Glutaminsynthetase, NADPH-Oxidase oder der NO-Synthasen verhindern. Übereinstimmend mit der bereits in der Literatur beschriebenen durch Ammoniak induzierten NMDA-Rezeptor-, prostanoid- und kalziumvermittelten RNOS-Bildung, wurde die ammoniakinduzierte Astrozytenschwellung durch Kalziumchelierung, Inhibitoren des NMDA-Rezeptors und von Zyklooxygenasen gehemmt. Eine rasch einsetzende Zellvolumenzunahme kultivierter Astrozyten wurde auch durch das Kalziumionophor Ionomycin, NMDA, Glutamat und Prostanoiden induziert. Ammoniak vermittelte eine Glutaminsynthese-abhängige Schwellung kultivierter Mikroglia, hatte jedoch keine Auswirkungen auf das Zellvolumen kultivierter Neurone.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die gleichen an der Bildung von oxidativ/nitrosativem Stress in Astrozyten beteiligten Signalwege auch in die Induktion einer Astrozytenschwellung involviert sind. Da eine Zellschwellung die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies induziert, und HE-relevante Faktoren RNOS vermittelt eine Zellschwellung vermitteln, lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine Relevanz einer wechselseitigen Verstärkung von oxidativ/nitrosativem Stress und Astrozytenschwellung für die Pathogenese der HE vermuten.

**Abkürzungsverzeichnis**

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <b>Abb</b>                        | Abbildung  |
| <b>ANOVA</b>                      | <i>Analysis of variance</i> ; Varianzanalyse                           |
| <b>ATP</b>                        | Adenosintriphosphat  |
| <b>BAPTA-AM</b>                   | 1,2-bis (o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraazetat-azetoxymethylester |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b>            | Kalzium  |
| <b>cDNA</b>                       | komplementäre Desoxyribonukleinsäure                                   |
| <b>COX</b>                        | Zyklooxygenase   |
| <b>cPTIO</b>                      | 2-4-carboxyphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid          |
| <b>3D</b>                         | 3-dimensional  |
| <b>DAF-FM</b>                     | 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorfluoreszein                         |
| <b>DCF</b>                        | 2',7'-dichlorodihydrofluoreszein                                       |
| <b>DMEM</b>                       | <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>                                |
| <b>DMSO</b>                       | Dimethylsulfoxid   |
| <b>DNA</b>                        | Desoxyribonukleinsäure   |
| <b>EDTA</b>                       | Ethylendiamintetraazetat   |
| <b>EEG</b>                        | Elektroenzephalographie  |
| <b>EGCG</b>                       | Epigallocatechingallat   |
| <b>FCS</b>                        | <i>Fetal calf sera</i> ; Fötales Kälberserum                           |
| <b>GABA</b>                       | γ-Aminobuttersäure   |
| <b>GAPDH</b>                      | Glyzeraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase                                 |
| <b>GFAP</b>                       | <i>Glial fibrillary acidic protein</i> ; Saures Gliafaserprotein       |
| <b>GS</b>                         | Glutaminsynthetase   |
| <b>GSH</b>                        | Reduziertes Glutathion   |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Wasserstoffperoxid   |
| <b>HE</b>                         | Hepatische Enzephalopathie   |
| <b>HPRT1</b>                      | Hypoxanthinphosphoribosyltransferase 1                                 |
| <b>Iba-1</b>                      | Ionisiertes kalziumbindendes Adaptermolekül 1                          |
| <b>IFN-γ</b>                      | Interferon-γ   |
| <b>IL-1β</b>                      | Interleukin-1β   |
| <b>KG</b>                         | Körpergewicht  |
| <b>LDH</b>                        | Laktatdehydrogenase  |
| <b>L-NMMA</b>                     | N-Monomethyl-L-Arginin   |
| <b>MK-801</b>                     | 5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzocyclohepten-5,10-imin                 |
| <b>MR</b>                         | Magnetresonanz   |
| <b>MSO</b>                        | Methioninsulfoximin  |
| <b>NADPH</b>                      | Reduzierte Form von Nikotinamidadenindinukleotidphosphat               |
| <b>NH<sub>3</sub></b>             | Ammoniak   |
| <b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b> | Ammoniumion  |
| <b>NH<sub>4</sub>Cl</b>           | Ammoniumchlorid  |
| <b>NKCC1</b>                      | Natrium-Kalium-2-Chlorid-Kotransporter 1                               |
| <b>NMDA</b>                       | N-Methyl-D-Aspartat  |
| <b>nNOS</b>                       | Neuronale Stickstoffmonoxidsynthase                                    |
| <b>NOS</b>                        | Stickstoffmonoxidsynthase  |
| <b>NA</b>                         | Numerische Apertur   |
| <b>OMG</b>                        | O-Methyl-D-Glukose   |

---

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>ONOO<sup>-</sup></b> | Peroxynitrit  |
| <b>PCR</b>              | Polymerasekettenreaktion  |
| <b>PGE<sub>2</sub></b>  | Prostaglandin E <sub>2</sub>  |
| <b>PGF<sub>2α</sub></b> | Prostaglandin F <sub>2α</sub>                                       |
| <b>PTN</b>              | Proteintyrosinnitrierung  |
| <b>PBR</b>              | Peripherer Benzodiazepinrezeptor                                    |
| <b>RNA</b>              | Ribonukleinsäure  |
| <b>RNOS</b>             | Reaktive Stick- und Sauerstoffspezies                               |
| <b>ROS</b>              | Reaktive Sauerstoffspezies  |
| <b>rpm</b>              | <i>rotation per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute                 |
| <b>SD</b>               | Standardabweichung  |
| <b>SEM</b>              | <i>Standard error of the mean</i> ; Standardfehler des Mittelwertes |
| <b>SNOC</b>             | S-Nitrosocystein  |
| <b>Spe-NO</b>           | Spermin-NONOate   |
| <b>Tab</b>              | Tabelle   |
| <b>TNF-α</b>            | Tumornekrosefaktor-α  |
| <b>ZNS</b>              | Zentralnervensystem   |

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

## Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 Ätiologie und Auslöser der hepatischen Enzephalopathie.....  | 1         |
| 1.2 Klinik der hepatischen Enzephalopathie .....   | 2         |
| 1.3 Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie .....  | 4         |
| 1.3.1 Bedeutung der Astrozyten für das zentrale Nervensystem .....   | 4         |
| 1.3.2 Glutamaterge Neurotransmission bei HE .....  | 6         |
| 1.3.3 Bedeutung von Ammoniak und Glutaminbildung für die Pathogenese der HE ..   | 8         |
| 1.3.4 Schwellungshypothese zur Pathogenese der HE.....   | 10        |
| 1.3.5 Oxidativ/nitrosativer Stress bei hepatischer Enzephalopathie .....   | 11        |
| 1.4 Zielsetzung .....  | 14        |
| <b>2. Material und Methoden.....</b>   | <b>15</b> |
| 2.1 Materialien.....   | 15        |
| 2.1.1 Chemikalien.....   | 15        |
| 2.1.2 Antikörper .....   | 16        |
| 2.1.3 Oligonukleotide (Primer) .....   | 17        |
| 2.1.4 Verbrauchsmaterialien und Geräte .....   | 17        |
| 2.2 Methoden .....   | 18        |
| 2.2.1 Präparation und Kultivierung von Rattenhirnzellen .....  | 18        |
| 2.2.2 Realtime-PCR .....   | 20        |
| 2.2.3 Western-Blot.....  | 21        |
| 2.2.4 Immunfluoreszenzanalyse .....  | 22        |
| 2.2.5 Laktatdehydrogenase-Aktivität.....   | 23        |
| 2.2.6 Fluorimetermessung.....  | 24        |
| 2.2.7 NO-Donoren.....  | 24        |
| 2.2.8 Zellvolumenmessung .....   | 24        |
| 2.2.9 Kernvolumenmessung .....   | 26        |
| 2.2.10 Volumenberechnung und dreidimensionale Rekonstruktion .....   | 26        |
| 2.2.11 Prinzip der Volumenmikroskopie mittels VivaTome™ .....  | 27        |
| 2.2.12 Analyse der Ergebnisse .....  | 37        |
| <b>3. Ergebnisse .....</b>   | <b>38</b> |
| 3.1 Darstellung der Morphologie kultivierter Astrozyten, Mikroglia und Neurone mittels VivaTome™-Fluoreszenzmikroskopie .....                | 38        |
| 3.2 Effekte HE-auslösender Faktoren auf das Zellvolumen kultivierter Astrozyten.....   | 39        |
| 3.3 Wirkung des Antioxidans Epigallocatechingallat auf die durch Ammoniak, TNF- $\alpha$ oder Diazepam induzierte Astrozytenschwellung ..... | 45        |

---

|   |           |
|---|-----------|
| 3.4 Pharmakologische Charakterisierung der durch Ammoniak induzierten Astrozytenschwellung.....   | 47        |
| 3.5 Wirkung HE-auslösender Faktoren auf das Kernvolumen kultivierter Astrozyten .....   | 61        |
| 3.6 Wirkung HE-auslösender Faktoren auf das Zellvolumen kultivierter Mikroglia .....  | 64        |
| 3.7 Wirkung HE-auslösender Faktoren auf das Zellvolumen kultivierter Neurone .....  | 68        |
| <b>4. Diskussion.....</b>   | <b>69</b> |
| 4.1 Wirkung HE-relevanter Faktoren auf das Astrozytenzellvolumen .....  | 69        |
| 4.2 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der durch Ammoniak induzierten Astrozytenschwellung.....   | 72        |
| 4.3 Molekulare Mechanismen der durch Ammoniak induzierten Astrozytenschwellung. 77  |           |
| 4.3.1 Rolle von NMDA-Rezeptoren, $[Ca^{2+}]_i$ und Prostanoiden für die durch Ammoniak induzierte Astrozytenschwellung <i>in vitro</i> .....                      | 77        |
| 4.3.2 Rolle von oxidativ/nitrosativem Stress bei der durch Ammoniak und weiteren HE-relevanten Faktoren induzierten Schwellung kultivierter Rattenastrozyten..... | 78        |
| 4.3.3 Bedeutung der Ammoniak-vermittelten Glutaminbildung für die rasch einsetzende Astrozytenschwellung <i>in vitro</i> .....                                    | 79        |
| 4.4 Kernschwellung durch HE-auslösende Faktoren .....   | 81        |
| 4.5 Wirkung von Ammoniak auf das Zellvolumen kultivierter Mikroglia.....  | 81        |
| 4.6 Wirkung von Ammoniak auf das Zellvolumen kultivierter Neurone.....  | 82        |
| 4.7 Limitationen der Arbeit .....   | 83        |
| 4.8 Ausblick.....   | 84        |
| <b>5. Tabellenverzeichnis.....</b>  | <b>87</b> |
| <b>6. Abbildungsverzeichnis .....</b>   | <b>88</b> |
| <b>7. Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>91</b> |

## 1. Einleitung

Die hepatische Enzephalopathie (HE) ist ein komplexes neuropsychiatrisches Krankheitsbild. Sie ist Folge einer Leberfunktionsstörung, die entweder auf einem akuten Leberversagen oder auf einer Dekompensation einer vorbestehenden chronischen Lebererkrankung mit Zirrhose beruht (Häussinger und Blei, 2007; Häussinger und Schliess, 2008). Die Symptome reichen von leichten Konzentrationsstörungen über kognitive und motorische Beeinträchtigungen bis hin zu schweren Bewusstseinsstörungen. Derzeit geht man davon aus, dass die HE Folge einer Hydratationsstörung der Astrozyten und der Bildung eines geringgradigen zerebralen Ödems ist. Da die Leber ihre Entgiftungsfunktion nicht mehr erfüllen kann, reichern sich in der Folge neurotoxische Substanzen in der Zirkulation an. Hierzu zählt insbesondere der Ammoniak, welcher maßgeblich die Funktion der Astrozyten aber auch der Neurone beeinträchtigt (Görg *et al.*, 2013b). Die im Zuge der Ammoniakentgiftung durch Glutaminakkumulation in den Astrozyten im Gehirn vermittelte osmotische Imbalance wird durch eine Freisetzung organischer Osmolyte kompensiert. Hierdurch wird der Osmolytpool depletiert und das volumenregulatorische Potenzial des Astrozyten beeinträchtigt (Görg *et al.*, 2013b; Häussinger *et al.*, 1994). In diesem Zustand ist der Astrozyt besonders vulnerabel gegenüber der schwellungsauslösenden Wirkung weiterer HE-relevanter Faktoren, die das geringgradige gliale Ödem exazerbieren lassen können (Häussinger, 2000). Derzeitig geht man davon aus, dass die Funktionsstörung des Gehirns bei hepatischer Enzephalopathie prinzipiell reversibel sein kann (Häussinger und Blei, 2007). Neuere Befunde zeigen jedoch, dass in einigen Fällen nach Auflösung akuter HE-Episoden die Beeinträchtigung kognitiver Funktionen persistiert (Bajaj *et al.*, 2010).

### 1.1 Ätiologie und Auslöser der hepatischen Enzephalopathie

Die hepatische Enzephalopathie ist Folge einer Leberfunktionsstörung. Nach der Ätiologie teilt man die hepatische Enzephalopathie in drei Typen ein (Ferenci *et al.*, 2002): Typ A bezeichnet die hepatische Enzephalopathie, die im Gefolge eines akuten Leberversagens auftritt. Das akute Leberversagen ist mit einem massiven Leberzelluntergang verbunden (Canbay *et al.*, 2011), in dessen Folge innerhalb von wenigen Stunden oder Tagen die Leberfunktion zum Erliegen kommen kann. Das akute Leberversagen kann zum Beispiel durch Ent-

zündungen wie akuter Virushepatitis oder auch durch hepatotoxische Substanzen wie Paracetamol oder Pilzgifte hervorgerufen werden (Bernuau *et al.*, 1986; Gotthardt *et al.*, 2007; Santi *et al.*, 2012). Liegt der hepatischen Enzephalopathie ein portosystemischer Shunt zugrunde, handelt es sich um Typ B. Typ C klassifiziert eine HE, die durch eine chronische Lebererkrankung mit Leberzirrhose entsteht und stellt die häufigste Ursache dar. Bei chronischen Lebererkrankungen verschlechtern sich die Leberfunktionen über einen längeren Zeitraum bis hin zum vollständigen Leberversagen. Ursachen hierfür können Hepatitiden, chronischer Alkoholmissbrauch und metabolische Störungen sein (Schölmerich und Holstege, 1990), die einen bindegewebigen Umbau der Leber (Leberfibrose) bis hin zur Leberzirrhose induzieren können. Im Zuge der beeinträchtigten Leberfunktion können dann heterogene Auslöser wie gastrointestinale Blutungen, Infektionen, eine eiweißreiche Kost, Obstipation, Diuretika, Sedativa und Elektrolytentgleisungen eine HE induzieren (Ferenci *et al.*, 2002; Häussinger und Kircheis, 2002; Wettstein und Häussinger, 2003). Alle drei HE-Typen haben unabhängig von ihrem Entstehungsmechanismus eine gemeinsame Endstrecke: Es kommt zu einer Anreicherung von neurotoxischen Substanzen im Blut, die das Gehirn erreichen und eine HE verursachen können. Dem Neurotoxin Ammoniak wird dabei eine zentrale Rolle in der Pathogenese der HE zugeschrieben (siehe Kapitel 1.3.2; S. 6). Obwohl 90 % der HE-Patienten erhöhte Serumammoniakspiegel aufweisen, korrelieren diese nicht mit dem Schweregrad der HE (Butterworth, 2002; Cash *et al.*, 2010).

## 1.2 Klinik der hepatischen Enzephalopathie

Die hepatische Enzephalopathie lässt sich nach den West-Haven-Kriterien entsprechend dem Schweregrad der Symptome in unterschiedliche Stadien einteilen (Abb. 1; S. 4). Dabei ist eine Differenzierung zwischen latenter und manifester Ausprägung der HE essentiell, da Patienten mit latenter HE zwar kein Krankheitsgefühl verspüren, aber dennoch kognitive und motorische Funktionen, die im Alltag benötigt werden, beeinträchtigt sein können (Ferenci *et al.*, 2002; Kircheis *et al.*, 2002; Román *et al.*, 2013; Schomerus *et al.*, 1981).

Da die Schweregrade HE 0-II nach den West-Haven-Kriterien nur subjektiv durch den behandelnden Arzt eingeschätzt werden können, wurde eine neue Klassifizierung der HE-

Schweregrade in „geringgradig“ und „hochgradig“ vorgeschlagen (Häussinger, 2006). Dabei entsprechen einer „geringgradigen“ HE die Stadien 0-II und einer „hochgradigen“ den HE-Stadien III-IV (Häussinger, 2006).

Die Klinik der HE umfasst ein breites Spektrum von motorischen und kognitiven Störungen. Charakteristische Merkmale im Anfangsstadium der HE sind der Flapping Tremor (Mini-Asterixis; Asterixis, grobschlägiges Zittern der Hände), eine konstruktive Apraxie und eine Störung der Tag-Nacht-Rhythmik. In den folgenden Stadien verschlechtern sich kognitive und motorische Funktionen sowie die Vigilanz bis zum Endstadium des Leberkomas (Abb. 1).

Die Symptomatik kann bei Patienten mit akutem Leberversagen abrupt einsetzen und stärker progredient verlaufen. Dabei kann sich ein klinisch offenkundiges Hirnödem mit entsprechender Symptomatik wie Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen entwickeln (Shawcross und Wendon, 2012).

Die Diagnose der HE wird entscheidend durch das klinische Bild bestimmt. Zusätzlich werden ergänzende Untersuchungen wie Blutuntersuchungen, psychometrische und neuropsychologische Tests, zu denen zum Beispiel der *Paper Pencil*-Test, EEG, evozierte Potenziale und die kritische Flimmerfrequenzanalyse zählen, herangezogen (Häussinger, 2006; Häussinger und Kircheis, 2002; Kircheis *et al.*, 2002; Weissenborn *et al.*, 2001; Wettstein und Häussinger, 1996).

| Grad der Enzephalopathie                                     | Bewusstseinslage   | Intellekt   | Verhalten  | Neuromuskuläre Störungen  | Neuropsychometrie  |
|--|--|---|--|---|--|
| <b>Grad 0 (keine HE)</b>                                     | unauffällig  | unauffällig   | unauffällig  | nicht nachweisbar   | unauffällig  |
| <b>Grad 0 (SHE; subklinische HE, (keine manifeste HE)</b>    | unauffällig  | unauffällig   | unauffällig  | nicht nachweisbar   | pathologische Testresultate  |
| <b>Grad I (geringgradig manifeste HE)</b>                    | Schlafstörungen, Schläfrigkeit, Schlaflosigkeit, Umkehrung des Schlaf-Wach-Rhythmus                                    | verminderte Konzentration, verminderte Aufmerksamkeit, verminderte Reaktionsgeschwindigkeit | zunehmende Er-schöpfung, Euphorie oder Depression, Geschwätzigkeit Reizbarkeit | gestörte Fein-motorik, einschlä-giges Fingerzittern, Schriftänderung  | pathologische Testresultate  |
| <b>Grad II (mittel-gradig mani-feste HE)</b>                 | Verlangsamung, starke Schläfrigkeit, träger Gedanken-fluss, Lethargie  | kein Zeitgefühl, Rechnen beeinträchtigt, Er-innerungslücken                                 | Enthemmung, Persönlichkeits-änderung, Angst, Teilnahmslosigkeit                | Zunahme des Händ-e-zitterns, ver-waschene Sprache, verminderte Reflexe, verstärkter Muskel-tonus                              | pathologische Testresultate  |
| <b>Grad III (schwere, manifeste HE, Vorstufe des Komats)</b> | Desorientiertheit, stärkste Schläfrigkeit, Bewusstseins-trübung, Verwirrtheit, Bewegungslosigkeit, z.T. „Erstarrungen“ | fortschreitende Erinnerungslücken, Unfähigkeit zu Rechnen                                   | Desorientiertheit (zeitlich und örtlich), Wahnvorstellungen, Aggressionen      | verstärkte Reflexe, Zunahme krank-hafter Fremdreflexe, Augenzittern, Au-genflattern, Muskel-krämpfe, fortschrei-tende Spastik | keine psycho-metrischen bzw. computerpsycho-metrischen Untersuchungen durchführbar |
| <b>Grad IV (schwerste Form der manifesten HE, Koma)</b>      |  |   |  | Pupillenerweiterung, Streckkrämpfe, Nackensteifigkeit   | keine psycho-metrischen bzw. computerpsycho-metrischen Untersuchungen durchführbar |
|  | <b>Bewusstlosigkeit</b>  | <b>keine Funktion</b>   | <b>erloschen</b>   | <b>Erlöschen der Re-flexe, Tonusverlust</b>   |  |

Abbildung 1: Einteilung der hepatischen Enzephalopathie in Schweregrade nach den West-Haven-Kriterien (Häussinger, 2006)

### 1.3 Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie

Man geht derzeit davon aus, dass die HE Folge einer Hydratationsstörung der Astrozyten ist. Astrozyten besitzen vielfältige Funktionen im Gehirn. Im Nachfolgenden werden die von Astrozyten im Gehirn bewerkstelligten Funktionen erläutert.

#### 1.3.1 Bedeutung der Astrozyten für das zentrale Nervensystem

Astrozytenfunktionen sind essentiell für die Aufrechterhaltung der Neurotransmission und eine Vielzahl neurologischer Erkrankungen ist mit einer Funktionsstörung der Astrozyten vergesellschaftet (Hertz *et al.*, 1990; Montgomery, 1994; Pekny und Nilsson, 2005).

Astrozyten sind die am häufigsten vorkommenden Zellen im Gehirn und machen etwa 1/3 des Volumens der grauen Hirnsubstanz aus (Montgomery, 1994).

Der Astrozyt ist mit seinen Zellausläufern an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Abbott *et al.*, 2006). Über *gap junctions* miteinander verbunden (Dermietzel *et al.*, 1991; Fischer und Kettenmann, 1985), bilden Astrozyten ein funktionelles Synzytium. Hierüber können nach neuronaler Erregung aus dem Extrazellularraum aufgenommene Kaliumionen auf benachbarte Astrozyten verteilt und die extrazelluläre Kaliumionenkonzentration reguliert werden. Durch Regulation der Elektrolythomöostase haben Astrozyten ebenfalls Einfluss auf den pH-Haushalt (Deitmer und Rose, 2010; Nagaraja und Brookes, 1998; Rose und Ransom, 1996).

Astrozyten dienen als Glykogenspeicher: Durch den Abbau von Glykogen zu Glukose können Astrozyten Glukose an Nervenzellen abgeben und dadurch Neurone mit energietischem Substrat versorgen (Brown und Ransom, 2007; Müller, 2014).

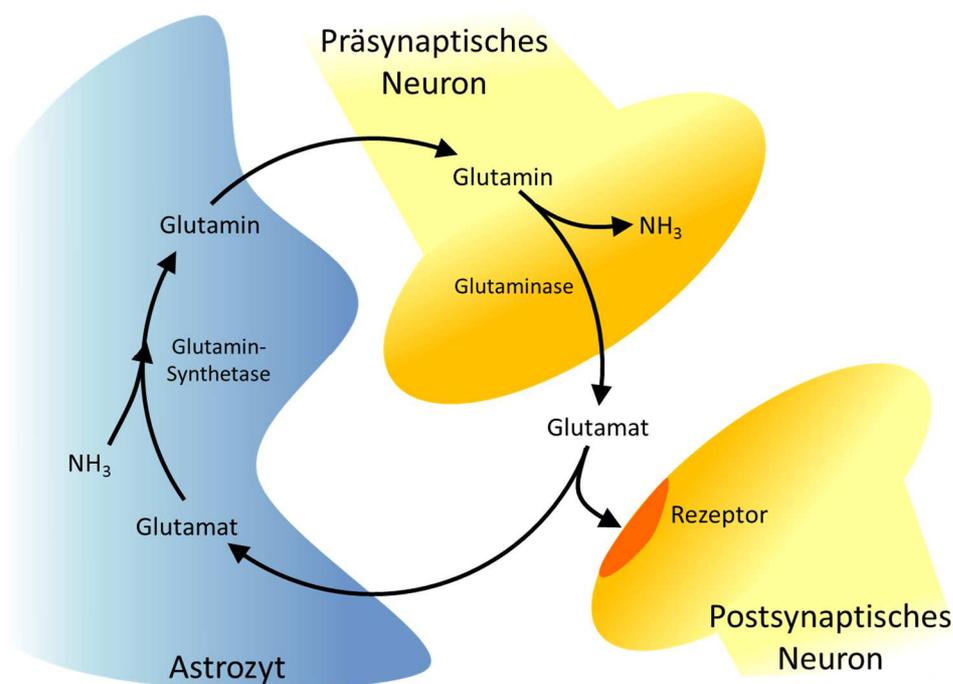
Des Weiteren sind Astrozyten bei der Narbenbildung im Nervensystem beteiligt, wie sie bei ZNS-Traumata, Schlaganfall, neurodegenerativen Erkrankungen und auch physiologischen Alterungsprozessen nachgewiesen wurde (Pekny und Nilsson, 2005).

Astrozyten können darüberhinaus *pro*-inflammatorische Effekte durch Synthese und Freisetzung von Zytokinen vermitteln und Immunfunktionen im Nervensystem beeinflussen (Dietrich *et al.*, 2003; Hertz *et al.*, 1990) wie z.B. bei Multipler Sklerose, Morbus Parkinson, Alzheimer und HIV-assoziiertes Demenz (Barres, 2008; Sofroniew und Vinters, 2010).

Durch die Bildung und Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren beeinflussen Astrozyten synaptische Aktivität, neuronale Migration und Wachstum (Menet *et al.*, 2000; Powell und Geller, 1999) und kommunizieren mit Neuronen (Barres, 2008).

Astrozyten können den Neurotransmitter Glutamat „recyclen“: Das von Nervenzellen an Synapsen freigesetzte Glutamat kann von umliegenden Astrozyten aufgenommen werden und durch die Glutaminsynthetase, welche exklusiv in Astrozyten exprimiert wird (Norenberg und Martinez-Hernandez, 1979), zu Glutamin verstoffwechselt werden (Abb. 2; S. 6). Glutamin wird nun wieder in den Extrazellularraum entlassen und kann von Neuronen erneut für die Synthese von Glutamat genutzt werden. Somit kommt den Astrozyten durch das Enzym Glutaminsynthetase eine wichtige Bedeutung bei der Ammoniakentgiftung zu.

Ein solches „Recycling“ geschieht ebenfalls mit dem Transmitter GABA, welcher in den Astrozyten zu Ketoglutarat umgewandelt wird (Bak *et al.*, 2006; Hertz *et al.*, 1999; van den Berg und Garfinkel, 1971).



**Abbildung 2: Glutamat-Glutamin-Zyklus.** Das von Nervenzellen an Synapsen freigesetzte Glutamat kann von umliegenden Astrozyten aufgenommen werden und durch die Glutaminsynthetase, welche exklusiv in Astrozyten exprimiert wird, zu Glutamin verstoffwechselt werden. Glutamin wird nun wieder in den Extrazellularraum entlassen und kann von Neuronen erneut zu Glutamat abgebaut werden (Benjamin und Quastel, 1972; Ottersen *et al.*, 1992; van den Berg und Garfinkel, 1971).

### 1.3.2 Glutamaterge Neurotransmission bei HE

Die HE ist eng assoziiert mit einer Störung der glutamatergen Neurotransmission (Görg *et al.*, 2013b, 2010a; Mousseau und Butterworth, 1994; Norenberg *et al.*, 1997; Schliess *et al.*, 2002; Szerb und Butterworth, 1992).

Eine Dysregulation der Glutamat-Homöostase ist mit zahlreichen Störungen neuronaler Funktionen assoziiert und beeinträchtigt das Neuritenwachstums und die Synapto- und Neurogenese (Mattson, 2008). Ammoniak stimuliert kalziumabhängig eine Freisetzung von Glutamat aus kultivierten Ratten- und Mausastrozyten (Görg *et al.*, 2010a; Rose *et al.*, 2005). Eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration wird dabei in Mausastrozyten über eine Freisetzung aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischem Retikulum bewirkt

(Rose *et al.*, 2005) und in Ratten über einen NMDA-Rezeptor-vermittelten Kalziumeinstrom aus dem Extrazellularraum (Görg *et al.*, 2010a). Die initiale Aktivierung der NMDA-Rezeptoren erfolgt dabei vermutlich über eine durch Ammoniak herbeigeführte Membrandepolarisation (Häussinger und Görg, 2010; Schliess *et al.*, 2002), welche die Magnesiumblockade des NMDA-Rezeptors aufhebt (Mayer *et al.*, 1984).

Einige tierexperimentelle Untersuchungen belegen einen Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration im Gehirn bei Hyperammoniämie (Bosman *et al.*, 1992; de Knecht *et al.*, 1994). Als mögliche Ursache wurde eine verminderte Glutamataufnahme durch Herabregulation von Glutamattransportern diskutiert (Chan *et al.*, 2000; Knecht *et al.*, 1997; Norenberg *et al.*, 1997). Michalak *et al.* zeigten darüber hinaus, dass die extrazellulären Glutamatkonzentrationen positiv mit den Serumammoniakspiegeln in einem HE-Tiermodell korrelieren (Michalak *et al.*, 1996). Es gilt als gesichert, dass Ammoniak über eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren auch neurotoxische Wirkungen entfaltet und diese weitgehend durch den NMDA-Rezeptor-Antagonist MK-801 verhindert werden können (Kosenko *et al.*, 1999; Marcaida *et al.*, 1992).

Ammoniak wird in den Astrozyten durch das Enzym Glutaminsynthetase entgiftet (Norenberg und Martinez-Hernandez, 1979) (Abb. 2; S. 6). Die bei Leberzirrhose systemisch erhöhten Ammoniakspiegel steigern die Synthese und Akkumulation von Glutamin in Astrozyten und vermitteln hierüber ein geringgradiges gliales Ödem (Häussinger *et al.*, 1994). Auch in HE-Tiermodellen beobachtet man eine Astrozytenschwellung, die durch Inhibition der Glutaminsynthetase weitgehend verhindert wird (Tanigami *et al.*, 2005).

Histologisch finden sich bei Leberzirrhosepatienten mit HE charakteristische morphologische Veränderungen der Astrozyten (sog. Alzheimer Typ II Astrozyten) (Butterworth, 2002), die auch in mit Ammoniak belasteten Astrozyten (Cavanagh und Kyu, 1971) und in HE-Tiermodellen gefunden werden (Zamora *et al.*, 1973). Die durch Hyperammoniämie induzierbare Astrozytenschwellung kann durch den Glutaminsynthetasehemmstoff Methioninsulfoximin (MSO) blockiert werden (Tanigami *et al.*, 2005; Willard-Mack *et al.*, 1996). Der Glutaminbildung wird auch eine entscheidende Rolle bei der Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies in mit Ammoniak behandelten Astrozyten (Görg *et al.*, 2015; Häussinger *et al.*, 2005; Häussinger und Schliess, 2005; Norenberg *et al.*, 2004) und in HE-Tiermodellen zugeschrieben (Master *et al.*, 1999).

Nach der der sogenannten „Trojan Horse Hypothesis“ von Albrecht und Norenberg werden die toxischen Wirkungen von Ammoniak durch eine verstärkte Akkumulation und Hydrolyse des Glutamins in Mitochondrien vermittelt (Albrecht und Norenberg, 2006). Demnach gelangt ein Teil des durch die Glutaminsynthetase gebildeten Glutamins über einen Histidin-sensitiven Glutamintransporter in die Mitochondrien. Das in der inneren Mitochondrienmembran befindliche Enzym Glutaminase hydrolysiert Glutamin wieder zu Glutamat und Ammoniak. Albrecht und Norenberg vermuten, dass die mitochondriale Glutaminhydrolyse Ursache der Astrozytenschwellung, der Radikalbildung und der mitochondrialen Funktionsstörung ist (Jayakumar *et al.*, 2006, 2004; Rama Rao *et al.*, 2012). L-Histidin soll einen protektiven Effekt auf Astrozyten haben, indem es den mitochondrialen Glutamintransport hemmt und die durch Ammoniak induzierte Zellschwellung, ROS-Bildung und mitochondrialen Permeabilitätsstörungen mit einhergehendem ATP-Verlust blockiert (Pichili *et al.*, 2007).

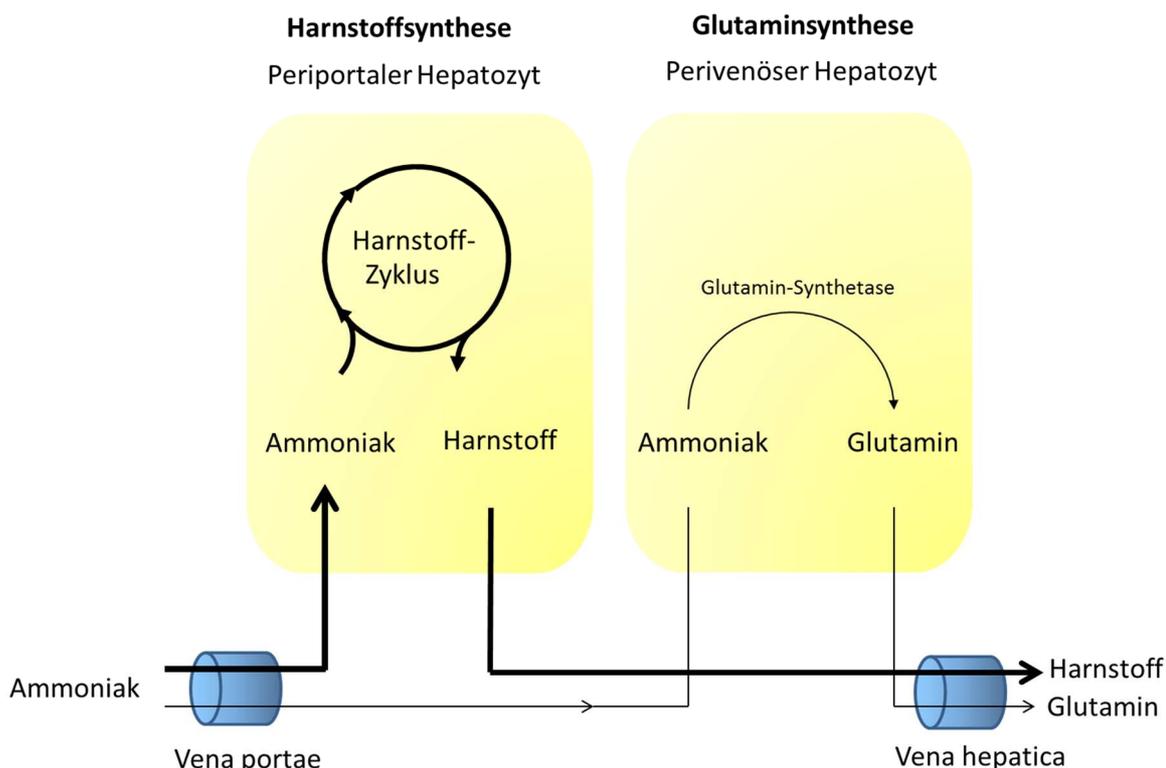
### 1.3.3 Bedeutung von Ammoniak und Glutaminbildung für die Pathogenese der HE

Es herrscht allgemein Einvernehmen darüber, dass Ammoniak ein Schlüsseltoxin in der Pathogenese der HE ist (Butterworth *et al.*, 1987; Häussinger und Schliess, 2008; Norenberg, 1987; Record, 1991).

Eiweiße werden aus der Nahrung im Darm aufgenommen und durch Darmbakterien proteolytisch verstoffwechselt. Dabei entsteht Ammoniak, welches dann über das Pfortaderblut in die Leber gelangt (Vince *et al.*, 1973). Ammoniak kann auch durch Proteinabbau im Muskel entstehen (Lowenstein, 1972). Da Ammoniak in hohen Konzentrationen toxisch wirkt, ist eine ständige Elimination durch die Leber essentiell (Abb. 3).

Ammoniak kann als Ammoniumion  $\text{NH}_4^+$  oder gasförmig als  $\text{NH}_3$  vorliegen. Während  $\text{NH}_3$  passiv durch Membranen diffundieren kann (Castell und Moore, 1971), werden Ammoniumionen über Ionenkanäle und Transporter wie z.B. den Natrium-Kalium-2-Chlorid-Kotransporter (NKCC)-1 transportiert (Aickin *et al.*, 1982; Kelly *et al.*, 2009). Dadurch kann es zu Membranpotentialveränderungen kommen. Auch Verschiebungen des pH-Werts werden durch Ammoniak in Astrozyten induziert (Nagaraja und Brookes, 1998).

Die Entgiftung von Ammoniak erfolgt in der Leber in periportalen und perivenösen Hepatozyten (Scavenger-Zellen) (Häussinger, 1990; Häussinger and Gerok, 1983) (Abb. 3). Im periportalen Hepatozyten wird 90 % des Ammoniaks entgiftet. Hier wird Ammoniak zu Harnstoff, einem gut wasserlöslichen und ungiftigen Endprodukt, welches über die Nieren ausgeschieden wird, abgebaut. Die Ammoniakentgiftung im perivenösen Hepatozyten findet hingegen im Zytosol statt und erfolgt durch die Glutaminsynthetase (GS), die im Gehirn selektiv in Astrozyten exprimiert wird (Norenberg und Martinez-Hernandez, 1979). Die GS katalysiert in einer ATP-abhängigen Reaktion die Umwandlung von Glutamat und Ammoniak zu Glutamin.



**Abbildung 3: Ammoniakentgiftung in der Leber.** Die Entgiftung von Ammoniak in der Leber erfolgt im Harnstoffzyklus der periportalen Hepatozyten und durch die in den perivenös gelegenen Scavengerzellen lokalisierte Glutaminsynthetase (Häussinger, 1990; Häussinger and Gerok, 1983).

Bei Leberschädigungen ist die Ammoniakentgiftung in der Leber stark verringert, so dass die Ammoniakkonzentration im Blut ansteigt (Kaiser *et al.*, 1988; Rudman *et al.*, 1973). Der erhöhte Blutammoniakspiegel und die verstärkte Glutaminbildung in Astrozyten im Gehirn (Häussinger *et al.*, 1994) induzieren Veränderungen im zentralen Nervensystem, die mit der klinischen Symptomatik der HE assoziiert sind: Die Integrität der Blut-Hirn-Schranke ist gestört, die zerebrale Durchblutung (Dam *et al.*, 2013; Lockwood *et al.*, 1991) und die Morphologie von Astrozyten (sog. „Alzheimer Typ II Astrozyten“) (Cavanagh und Kyu, 1971; Gregorios *et al.*, 1985) und Neuronen verändern sich (Chen *et al.*, 2014), die Expression astroglialer Proteine ist verändert (z.B. GFAP und GLAST) (Chan *et al.*, 2000; Desjardins *et al.*, 2001; Görg *et al.*, 2008) und die Neurotransmitter-Homöostase (Cauli *et al.*, 2009; Monfort *et al.*, 2002; Vaquero und Butterworth, 2006) und der Energie-Metabolismus (Felipo und Butterworth, 2002; Rama Rao und Norenberg, 2012) sind gestört.

#### 1.3.4 Schwellungshypothese zur Pathogenese der HE

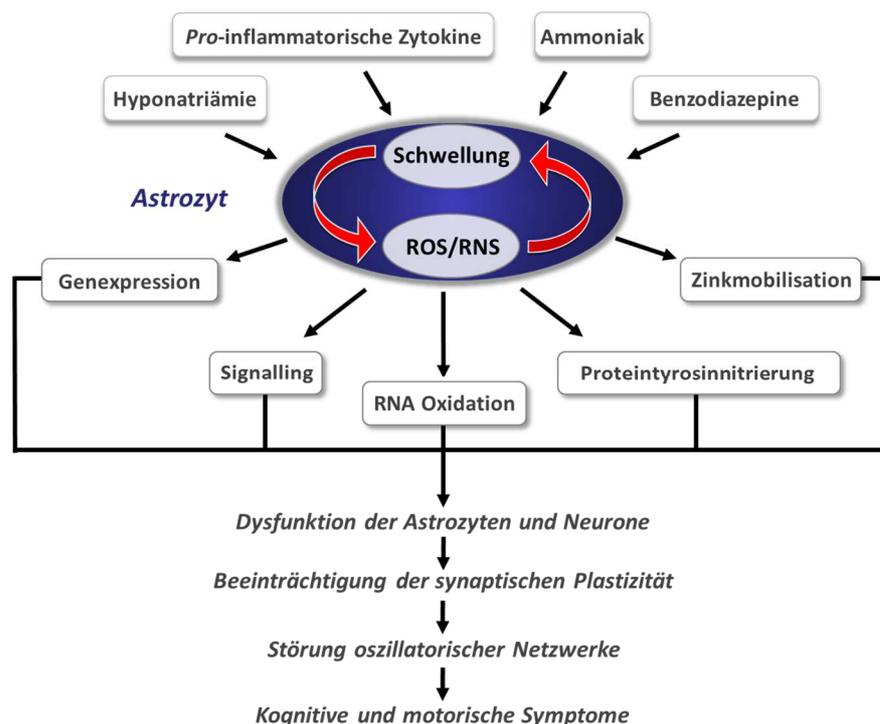
Die von Professor Häussinger formulierte Schwellungshypothese zur Pathogenese der HE ist ein international anerkanntes Paradigma, welches erstmals und alleinig die gemeinsame Wirkung der heterogenen Gruppe HE-auslösender Faktoren erklären konnte (Görg *et al.*, 2013b; Häussinger, 2006; Häussinger und Schliess, 2008). Demnach kommt der durch Ammoniak in den Astrozyten gesteigerten Glutaminsynthese eine wichtige Rolle zu, indem sie eine Astrozytenschwellung induziert, die durch eine Freisetzung organischer Osmolyte wie *myo*-Inositol und Taurin kompensiert wird (Albrecht *et al.*, 1994; Cordoba *et al.*, 1996; Gupta *et al.*, 1993). In der 1H-Magnetresonanzspektroskopie fand Häussinger in Gehirnen von Zirrhose-Patienten eine Glutaminakkumulation, die begleitet wurde von einer Verringerung des *myo*-Inositolgehalts im Gehirn (Häussinger *et al.*, 1994; Laubenberger *et al.*, 1997). Dabei zeigte sich eine enge Korrelation zwischen der erhöhten Glutamin- und der reduzierten *myo*-Inositolkonzentration und dem Schweregrad der HE. Eine Reduktion des astroglialen Osmolytpools macht den Astrozyten vulnerabel gegenüber weiteren schwellungsinduzierenden Faktoren, die nachfolgend eine Dekompensation des volumenregulatorischen Potentials der Astrozyten bewirken können (Häussinger, 2006; Häussinger *et al.*, 1994; Häussinger und Görg, 2010; Häussinger und Schliess, 2008;

Häussinger und Sies, 2013). Hierdurch wird verständlich, weshalb die hepatische Enzephalopathie durch ein heterogenes Set von Faktoren wie Ammoniak, Hyponatriämie, Benzodiazepine und inflammatorische Zytokine ausgelöst werden kann: Alle diese Faktoren können eine Astrozytenschwellung induzieren.

### **1.3.5 Oxidativ/nitrosativer Stress bei hepatischer Enzephalopathie**

Eine weitere gemeinsame Eigenschaft HE-auslösender Faktoren (Ammoniak (Murthy *et al.*, 2001; Schliess *et al.*, 2002), *pro*-inflammatorische Zytokine (Görg *et al.*, 2006), Hyponatriämie (Schliess *et al.*, 2004) und Benzodiazepine (Görg *et al.*, 2003)) besteht darin, dass sie oxidativen Stress in Astrozyten induzieren (Häussinger, 2006; Häussinger und Schliess, 2008) (Abb. 4; S. 12). Gleichzeitig steigert die Langzeitbehandlung kultivierter Astrozyten mit diesen Faktoren auch das Zellvolumen (Bender und Norenberg, 1998; Rama Rao *et al.*, 2010).

Da eine Astrozytenschwellung *per se* oxidativ/nitrosativen Stress induzieren kann, wurde postuliert, dass hierüber ein sich selbst verstärkender Kreislauf zwischen Schwellung und oxidativ/nitrosativem Stress in Gang gesetzt wird (Häussinger und Görg, 2010; Häussinger und Schliess, 2008; Schliess *et al.*, 2006, 2004) (Abb. 4).



**Abbildung 4: Pathogenese-Modell zur hepatischen Enzephalopathie.** Ammoniak, pro-inflammatorische Zytokine, Benzodiazepine und Hyponatriämie steuern durch Induktion einer Astrozytenschwellung und Bildung von oxidativ/nitrosativem Stress eine gemeinsame Endstrecke in der Pathogenese der HE an. Als Konsequenz vielfältiger funktionell relevanter Veränderungen wie Genexpressionsänderungen, Proteinmodifikationen und veränderter intrazellulärer Signalkaskaden werden astrogliale und neuronale Funktionen beeinträchtigt, was sich im klinischen Bild der HE widerspiegelt (Häussinger und Sies, 2013).

Grundlage des von Häussinger aufgestellten Paradigmas zur Pathogenese der HE sind von Professor Häussinger 1994 mittels Kernresonanzspektroskopie gemachte Beobachtungen zur Veränderung der Glutamin- und *myo*-Inositol-Spiegel im Gehirn von Leberzirrhosepatienten mit HE (Häussinger *et al.*, 1994). Die aus diesen Untersuchungen gefolgerte zerebrale Ödembildung bei hepatischer Enzephalopathie wurde in nachfolgenden Studien mittels quantitativem *water mapping* bestätigt (Häussinger *et al.*, 1994; Shah *et al.*, 2008).

Nachfolgende Untersuchungen zeigten außerdem, dass die gestörte astrogliale Hydratation beim Zirrhosepatienten mit HE mit einer erhöhten zerebralen Expression von Biomarkern für oxidativen Stress assoziiert ist (Görg *et al.*, 2010b). Viele an Astrozyten *in vitro* und im Gehirn in verschiedenen HE-Tiermodellen gemachte Beobachtungen belegen eine enge Beziehung zwischen osmotischem und oxidativ/nitrosativem Stress, aber deren Bedeutung für die Pathogenese der HE ist immer noch nicht vollständig verstanden (Görg *et*

*al.*, 2013b; Häussinger und Görg, 2010; Murthy *et al.*, 2001; Norenberg, 2003; Norenberg *et al.*, 2004; Schliess *et al.*, 2006). Funktionell bedeutsame Folgen von oxidativ/nitrosativem Stress bei HE sind die Proteintyrosinnitrierung, die eine Inaktivierung der Glutaminsynthetase nach sich zieht, die RNA-Oxidation in Neuronen und Astrozyten, die einen Einfluss auf die Translation haben kann, und die Modulation der zinkabhängigen Gentranskription (Görg *et al.*, 2008, 2007, 2005, 2003; Häussinger und Görg, 2010; Schliess *et al.*, 2009, 2004, 2002).

In der Gesamtheit beeinträchtigen diese Mechanismen astrogliale und neuronale Funktionen, synaptische Plastizität und oszillatorische Netzwerke (Häussinger und Schliess, 2008; Häussinger und Sies, 2013).

Untersuchungen an kultivierten Astrozyten zeigten, dass HE-relevante Faktoren die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies (RNOS) durch Aktivierung eines gemeinsamen Signalwegs auslösen (Görg *et al.*, 2006, 2003; Kruczek *et al.*, 2011; Reinehr *et al.*, 2007; Schliess *et al.*, 2004). Dieser Signalweg wird durch autokrine Aktivierung astroglialer NMDA-Rezeptoren (NMDAR) und einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  vermittelt (Schliess *et al.*, 2006, 2002), die partiell auf einer gesteigerten Prostanoidbildung beruht (Görg *et al.*, 2010a). Hierüber wird eine rasche vesikuläre Glutamatfreisetzung induziert, welche die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren weiter verstärkt (Bezzi *et al.*, 1998). Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert in der Folge die neuronale NO-Synthase (nNOS) und die NADPH-Oxidase und beide tragen zur Bildung von RNOS bei, welche durch HE-auslösende Faktoren induziert werden (Kruczek *et al.*, 2011, 2009; Reinehr *et al.*, 2007; Schliess *et al.*, 2004, 2002). Da RNOS eine Zellschwellung induzieren, wäre es plausibel, dass in kultivierten Astrozyten die rasch einsetzende RNOS-Bildung von einer Schwellung begleitet wird (Görg *et al.*, 2003; Kruczek *et al.*, 2011, 2009; Reinehr *et al.*, 2007; Schliess *et al.*, 2004, 2002).

Bislang wurden die Effekte HE-relevanter Faktoren auf das Astrozytenvolumen jedoch nur in Astrozytenkulturen untersucht, die über einen längeren Zeitraum von mehreren Stunden bis zu Tagen mit HE-relevanten Faktoren behandelt wurden.

#### 1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob Ammoniak, ein Haupttoxin der HE, in kultivierten Mikroglia, Neuronen und Astrozyten eine rasch einsetzende Zellschwellung induziert und deren zeitliche Verläufe zu bestimmen.

An kultivierten Astrozyten sollte untersucht werden, ob neben Ammoniak auch *pro*-inflammatorische Zytokine und das Benzodiazepin Diazepam eine Zell- und Kernschwellung auslösen und ob die durch HE-relevante Faktoren induzierte Astrozytenschwellung durch oxidativen Stress vermittelt wird.

Bei der durch Ammoniak vermittelten Astrozytenschwellung sollte weiterführend untersucht werden, ob eine NMDA-Rezeptor-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, eine Prostanoidbildung, sowie eine Aktivierung der NADPH-Oxidase und NO-Synthase hieran beteiligt sind.

Für diese Untersuchungen sollte eine Volumenmikroskopiertechnik etabliert werden, die gleichzeitig die Visualisierung und die Berechnung von Volumenveränderungen ermöglicht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Übersicht zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien.

| Chemikalien   | Hersteller                                |
|---|---|
| Amplex-Red  | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland        |
| Apocynin  | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |
| Azetazolamid  | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |
| 1,2-bis (o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraazetat-azetoxymethylester (BAPTA-AM) | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |
| CellMask™ -Orange   | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland        |
| 2-4-carboxyphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid (cPTIO)             | Merck, Darmstadt, Deutschland             |
| 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluoreszein (DAF-FM)                          | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland        |
| Diclofenac  | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)   | Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)   | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |
| Epigallocatechingallat (EGCG)   | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |
| Fötales Kälberserum   | PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich   |
| 2',7'-dichlorodihydrofluoreszein Diazetat (H <sub>2</sub> DCFDA)                  | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland        |
| Harnsäure   | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |
| Hoechst34580  | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland        |
| Hydrogenperoxid   | Merck, Darmstadt, Deutschland             |
| Indomethacin  | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |
| Interferon-γ  | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |
| Interleukin-1β  | Roche, Mannheim, Deutschland              |
| Ionomycin   | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |
| Katalase  | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |

|   |  |
|---|--|
| L-Glutamat  | Sigma, Deisenhofen, Deutschland  |
| N <sup>G</sup> -Monomethyl-L-Argininazetat (L-NMMA)   | Sigma, Deisenhofen, Deutschland  |
| Methioninsulfoximin (MSO)   | Sigma, Deisenhofen, Deutschland  |
| (+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-di-benzo[a,d]cyclohepten-5,10-iminhydrogen maleat ((+)-MK-801 Hydrogenmaleat) | Sigma, Deisenhofen, Deutschland  |
| Prostaglandin E <sub>2</sub>  | Sigma, Deisenhofen, Deutschland  |
| Prostaglandin F <sub>2α</sub>   | Sigma, Deisenhofen, Deutschland  |
| S-Nitrosocystein (SNOC)   | Siehe Kapitel 2.2.7, S. 24   |
| Spermin-NONOate   | Institut für Biochemie und Molekularbiologie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Prof. Dr. Klaus Kröncke |
| Syto <sup>TM</sup> -11  | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland   |
| Tumornekrosefaktor-α  | Roche, Mannheim, Deutschland   |

### 2.1.2 Antikörper

Tabelle 2: Übersicht zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern.

| Antikörper  | Hersteller                         |
|---|------------------------------------|
| GFAP, mAb (Maus), pAb (Kaninchen)                         | Sigma, Deisenhofen, Deutschland    |
| GAPDH, mAb (Maus)   | Biodesign International, Saco, USA |
| Iba1, pAb (Kaninchen)                                     | Wako Chemicals, Wako, Osaka, Japan |
| Anti-Kaninchen HRPOD gekoppelt (Zweitantikörper) ( Ziege) | DakoCytomation, Glostrup, Danemark |
| Anti-Maus HRPOD gekoppelt (Zweitantikörper) (Ziege)       | Biorad, München, Deutschland       |

mAb: monoklonaler Antikörper, pAb: polyklonaler Antikörper.

### 2.1.3 Oligonukleotide (Primer)

Tabelle 3: Übersicht zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Realtime-PCR Primern.

| c-DNA        | Vorwärts Primer<br>(5' → 3') | Rückwärts Primer<br>(5' → 3') |
|--------------|------------------------------|-------------------------------|
| GS, Ratte    | ccttctaattggcttcctgga        | ctccacaccgcagtaatagg          |
| Hprt1, Ratte | tgctcgagatgtcatgaagga        | cagagggccacaatgtgatg          |

### 2.1.4 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 4: Übersicht zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien.

| Verbrauchsmaterialien    | Hersteller                       |
|--------------------------|----------------------------------|
| 100mm-Zellkulturschalen  | Falcon, Heidelberg, Deutschland  |
| 14ml-Röhrchen            | Falcon, Heidelberg, Deutschland  |
| 50ml-Röhrchen            | Falcon, Heidelberg, Deutschland  |
| 60mm-Zellkulturschalen   | Falcon, Heidelberg, Deutschland  |
| Einkanal-Pipetten        | Eppendorf, Hamburg, Deutschland  |
| Pipettenspitzen          | StarLab, Ahrensburg, Deutschland |
| Stripetten (5, 10, 25ml) | Corning Costar GmbH, Bodenheim   |
| ibidi™-Schalen (30mm)    | ibidi, Martinsried, Deutschland  |

**Tabelle 5: Übersicht zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräten.**

| Geräte                          | Hersteller                                |
|---------------------------------|---|
| Analysenwaage (Kern 770)        | Kern&Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland |
| Axio-Observer A1, VivaTome™     | Zeiss, Jena, Deutschland                  |
| Brutschrank (Heracell150)       | Heraeus, Hanau, Deutschland               |
| Cell Observer (Z1)              | Zeiss, Jena, Deutschland                  |
| Elektrophoresekammer (Biometra) | Biometra, Göttingen, Deutschland          |
| Präzisionswaage Kern (440-47N)  | Kern&Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland |
| Realtime-PCR (ABI7500)          | Applied Biosystems, Carlsbad, USA         |
| Roller (SRT1)                   | Stuart Scientific, Staffordshire, USA     |
| Schüttler (GFL-3017)            | Hilab, Düsseldorf, Deutschland            |
| Zentrifuge (5415D)              | Eppendorf, Hamburg, Deutschland           |
| Zentrifuge (Rotina 420R)        | Hettich, Tuttlingen, Deutschland          |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Präparation und Kultivierung von Rattenhirnzellen

#### A) Präparation und Kultivierung von Rattenastrozyten

Primäre Astrozyten wurden aus den Großhirnhemisphären neugeborener Wistar Ratten (P1-3) präpariert. Nach Dekapitation wurde der Schädel für etwa 10 Sekunden in eine 70 %ige Ethanollösung gelegt und die Kopfhaut entfernt. Das Schädeldach wurde eröffnet, das Gehirn entnommen und mit einem Mikrospatel ein Sagittalschnitt entlang der Mittellinie vorgenommen, um die beiden Hemisphären voneinander zu trennen. Die Hirnhäute wurden vorsichtig mit zwei Uhrmacherpinzetten entfernt und der zerebrale Kortex präpariert. Die beiden zerebrokortikalen Hemisphärenanteile wurden nachfolgend mit einem Skalpell und einer gebogenen Pinzette zerkleinert und die Suspension für 1 Minute bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Gewebe in 2 ml frisches Medium überführt. Das Medium mit den Zellen wurde nachfolgend mit sterilen Pasteurpipetten mehrmals

vorsichtig trituiert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde mit 8 ml DMEM (1000 mg/l D-Glucose, 10 % FCS) versetzt und durch eine Nylongaze mit einer Maschenweite von 60 µm gedrückt. Das erhaltene Filtrat wurde dann auf zwei Gewebeflaschen aufgeteilt und mit Zellkulturmedium auf 20 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 10 % CO<sub>2</sub>-Anteil und einer relativen Luftfeuchte von 95 % sieben Tage in einem Brutschrank kultiviert. Kontaminierende Fremdzellen wie Mikroglia, Oligodendrozyten und Neurone wurden durch Schütteln der Kulturflaschen für 24 Stunden bei 200 U/min und 10 % CO<sub>2</sub> entfernt.

Nachdem die Wachstumsfläche der Zellkulturflasche vollständig mit Astrozyten bedeckt war, wurden die Astrozyten durch Inkubation mit einer EDTA/Trypsin-Lösung von der Wachstumsfläche abgelöst und auf 2 neue Zellkulturflaschen ausgesät. Dreimal pro Woche wurde das Zellkulturmedium gewechselt und das Wachstum der Zellen am Phasenkontrast-Mikroskop kontrolliert. Die Reinheit der Zellkulturen wurde lichtmikroskopisch und durch Detektion des astroglialen Markerproteins GFAP mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Für die Erfassung des Zellvolumens wurden Astrozyten auf ibidi<sup>TM</sup>-Plastikschalen (Martinsried, Deutschland, 30 mm Ø Wachstumsfläche) ausgesät und für weitere 3 Tage kultiviert, bevor die Volumenmessungen durchgeführt wurden.

## **B) Präparation und Kultivierung von Rattenmikroglia**

Wie vorhergehend für Astrozyten beschrieben, werden Zellen aus Großhirnhemisphären von neugeborenen, männlichen Wistar Ratten (P1-3) präpariert. Hierfür wurden die präparierten Kortizes trypsinisiert, die Zellen trituiert und die erhaltene Zellsuspension in Gewebekulturflaschen kultiviert und in DMEM (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA), welches 20 % hitzeinaktiviertes FCS enthält, ausplattiert. Die Zellen wurden für 14 Tage in der Kulturflasche kultiviert, bevor Mikroglia durch Schütteln auf einem Rüttler bei 200 rpm für 12 Stunden bei 37 °C abgelöst wurden. Die nach dem Schütteln im Überstand befindlichen Mikroglia wurden nachfolgend auf ibidi<sup>TM</sup>-Schalen (Martinsried, Deutschland) ausgesät und für 30 Minuten im Brutschrank bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Ungebundene, nicht an die Plastikschale adhärenzte Zellen wurden nach 30 Minuten durch mehrfachen Austausch des Kulturmediums von den adhärenzten Zellen entfernt.

### **C) Präparation und Kultivierung von Rattenneuronen**

Kultivierte Neurone wurden aus Rattenembryonen (E15) präpariert. Mit einer gebogenen Mikropinzette wurde im Mittelpunkt des Schädels eingestochen und zuerst der obere, dann der untere Schädelbereich eingeschnitten und der Schädel geöffnet. Die Durchführung der Präparation erfolgte unter einer Stereolupe. Das Präparationsbesteck wurde vor Verwendung zweimalig in PBS und einmal in DMEM getaucht. Mit Hilfe eines Mikrospatels wurde nachfolgend das Gehirn entnommen. Die weitere Zellpräparation erfolgte entsprechend der bereits vorhergehend beschriebenen Arbeitsschritte.

Zur Anlage neuronaler Dissoziationskulturen wurde die Zellsuspension in 50 ml-Falcon-Röhrchen bei 2000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen, das Pellet in 10 ml Trypsin/EDTA aufgenommen und bei 37 °C für 8 Minuten im Brutschrank inkubiert. Am Ende der Inkubation wurde die Trypsinlösung vorsichtig abgossen, die Zellsuspension in 10 ml Kulturmedium (mit 10 % FCS) aufgenommen und erneut bei 2000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml DMEM aufgenommen. Nachfolgend wurde die Zellsuspension mit Hilfe einer Pasteurpipette trituiert, mit 9 ml DMEM verdünnt und durch eine Nylon-Gaze (30 µm Porengröße) gedrückt. Die erhaltene Suspension vereinzelter Zellen wurde mit einer 10 ml-Pipette aufgenommen und in 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und mit DMEM auf 50 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden auf ibid™-Schalen, die mit Laminin und Poly-D-Lysin beschichtet wurden, ausplattiert.

Die Präparation und Kultivierung von Rattenastrozyten, Rattenmikroglia und Rattenneuronen wurde von Frau Brigida Ziegler (Institut für Molekulare Neurobiologie), Torsten Janssen und Frau Ursula Kristek (Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie) durchgeführt.

#### **2.2.2 Realtime-PCR**

Die quantitative Bestimmung der Glutaminsynthetase- und Hypoxanthinphosphoribosyltransferase 1 (hppt1)-mRNA-Expression erfolgte durch quantitative-reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (Realtime-PCR). Die quantitative Realtime-PCR (qPCR) beruht auf dem klassischen Prinzip der PCR und ermöglicht eine Quantifizierung spezifisch amplifizierter

Nukleinsäuren durch Verwendung eines Nukleinsäure-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs. In dieser Arbeit wurde hierfür SYBR-Green verwendet. Dabei handelt es sich um einen Cyanin-Farbstoff, der doppelsträngige DNA bindet und bei einer Wellenlänge von 494 nm angeregt wird. Der Farbstoff emittiert nach Anregung grünes Licht bei einer Wellenlänge von 521 nm. Nach jedem Amplifikationszyklus wird die DNA-Menge durch Erfassung der SYBR-Green-Fluoreszenz bestimmt. Dabei ist die DNA-Menge proportional zur Intensität des Fluoreszenzsignals (Heid *et al.*, 1996). Die Quantifizierung der DNA-Menge erfolgt in der exponentiellen Phase der Realtime-PCR.

RNA wurde mit Hilfe eines kommerziellen Kits isoliert (Qiagen, Hilden, Deutschland) und cDNA wurde mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transkriptionskits (Qiagen, Hilden, Deutschland) synthetisiert. Die Realtime-PCR wurde mit dem HT7500 Realtime-PCR-System (Applied Biosystems, Foster City, CA) durchgeführt. Jede Probe wurde im Duplikat gemessen und der Mittelwert hieraus bestimmt.

Die Realtime-PCR-Analyse wurde von Frau Stefanie Lindner und Frau Professor Verena Keitel durchgeführt (Institut für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie).

### 2.2.3 Western-Blot

Bei der Western-Blot-Analyse kann die Expressionsstärke individueller Proteine durch Verwendung von spezifisch an das nachzuweisende Protein bindende Antikörper analysiert werden. Am Ende des Experiments wurden die Astrozyten mit 4 °C kaltem Lysis-Puffer aufgeschlossen (10 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4), 1 % Triton X-100, 140 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l EGTA, 10 mmol/l NaF, 10 mmol/l Natriumpyrophosphat, 1 mmol/l Natriumvanadat, 20 mmol/l  $\beta$ -Glyzerophosphat und Proteaseinhibitor Mixtur (Roche Applied Science)).

Das erhaltene Lysat wurde nachfolgend durch mehrfaches Pipettieren homogenisiert und für 10 Minuten bei 4 °C und 20 0000 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand weiterverwendet. Mittels Bio-RAD-Proteinbestimmung wurde die Proteinkonzentration in den Proben bestimmt (BIO-RAD, München, Deutschland). Hierfür wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:200 in Bradfordreagenz verdünnt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm spektrofluorimetrisch gemessen (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Die Proben wurden mit gleichem Volumenanteil

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) vermischt und die Proteine in einem elektrischen Feld mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Der Elektrophorese-Puffer bestand aus 17,3 mmol/l SDS, 125 mmol/l Tris und 1,25 mol/l Glyzin.

Die Gele wurden nachfolgend auf eine Nitrozellulose-Membran gegeben und die Proteine im *semidry*-Verfahren im elektrischen Feld auf die Membran unter Verwendung eines Transferpuffers (5,68 mM Tris, 38,4 mM Glyzin, 10 % Methanol) übertragen.

Zur Blockierung freier Bindungsstellen auf der Nitrozellulose-Membran wurde diese in Tris-gepufferter Lösung (Tris 20 mmol/l; pH 7,5; NaCl 150 mmol/l; 0,1 % Tween-20) (TBS+T) mit 10 % BSA inkubiert.

Nachfolgend wurden die jeweiligen Primärantikörper in TBS-T mit 10 % BSA verdünnt (Iba-1 1:1000, GFAP und GAPDH 1:5000) und für 2 Stunden mit der Nitrozellulose-Membran bei 4 °C unter Rütteln inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran für 10 Minuten dreimal in TBS-T gewaschen und mit gegen die Primärantikörper gerichteten Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern (1:10000) in TBS-T mit 10 % BSA inkubiert.

Die Membran wurde für 10 Minuten dreimal in TBS-T gewaschen und abschließend mit Chemilumineszenz-Detekektionsreagenz inkubiert und die Lichtemission mittels *Kodak Digital Image Station 4000MM* digital erfasst.

Die Western-Blot-Analysen wurden von Torsten Janssen und Dr. Boris Görg durchgeführt (Institut für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie).

#### **2.2.4 Immunfluoreszenzanalyse**

Die Immunfluoreszenzanalyse dient der Visualisierung individueller Proteine mit Hilfe von Antikörpern, die entweder selbst mit einem Fluorochrom markiert sind, oder durch einen zweiten Antikörper markiert werden, welcher dann mit einem Fluorochrom markiert wird. Ein primärer Antikörper bindet an spezifische Epitope in Proteinen. Der mit einem Fluorochrom markierte sekundäre Antikörper wiederum bindet an spezifische Epitope des primären Antikörpers. Die jeweiligen Fluorochrome werden bei einer für sie

charakteristischen Wellenlänge angeregt und das emittierte Licht in einer ebenfalls für den Farbstoff charakteristischen Wellenlänge detektiert.

Für Immunfluoreszenzanalyse wurden Astrozyten und Mikroglia je auf MatTek-Schalen ausgesät, mit eiskaltem Methanol bei Raumtemperatur für 5 Minuten fixiert und anschließend dreimal mit PBS (+Mg<sup>2+</sup>/+Ca<sup>2+</sup>) gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen 10-30 Minuten lang bei Raumtemperatur in PBS (+Mg<sup>2+</sup>/+Ca<sup>2+</sup>) mit 10-30 % BSA und nachfolgend 2 Stunden mit dem jeweiligen Primär-Antikörper in PBS (mit 10 % BSA) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine Inkubation mit dem Fluorochrom gekoppelten Sekundär-Antikörper für 2 Stunden. Die Zellen wurden nachfolgend dreimal mit PBS gewaschen.

Zellkerne wurden mit Hoechst34580 (1:5000) sichtbar gemacht. Mikroglia wurden mit einem Antikörper angefärbt, der das ionisierte kalziumbindende Adapterprotein 1 (Iba-1) bindet. Astrozyten wurden mit einem Antikörper angefärbt, der das saure Gliafaserprotein (GFAP) bindet.

Die Immunfluoreszenzanalysen kultivierter Zellen wurden von Torsten Janssen und Dr. Boris Görg (Institut für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie) durchgeführt. Die Immunfluoreszenzanalyse an Rattenhirnschnitten wurden von Frau Lila Igdalowa und Herrn Dr. Hans-Jürgen Bidmon aus dem C.u.O. Vogt-Institut für Hirnforschung durchgeführt.

### **2.2.5 Laktatdehydrogenase-Aktivität**

Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µmol/l, 500 µmol/l oder 10 mmol/l) für 20 Minuten behandelt. Die Laktatdehydrogenase (LDH) -Aktivität wurde photometrisch in einem Reaktionsgemisch, welches Zellkulturmediumüberstand, Pyruvat (0,64 mmol/l) und NADH (0,13 mmol/l) enthält, gemessen. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 366 nm gemessen.

Die Laktatdehydrogenase-Aktivitätsbestimmung wurde von Torsten Janssen und Dr. Boris Görg durchgeführt (Institut für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie).

### 2.2.6 Fluorimetermessung

In der vorliegenden Arbeit wurden Effekte von Methioninsulfoximin auf die durch reaktive Stick- und Sauerstoffspezies (RNOS) *in vitro* induzierte Oxidation von RNOS-Fluoreszenzindikatoren fluorimetrisch bestimmt (Fluoroskan Ascent™ FL, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland). Als Fluoreszenzindikatoren wurden Dichlorodihydrofluoreszein (DCF, 100 µmol/l), Amplex Red (50 µmol/l) und Diaminodifluorofluoreszein (DAF-FM, 1 µmol/l) verwendet. Die Oxidation der Farbstoffe wurde durch Inkubation mit ONOO<sup>-</sup> (1 µmol/l, 5 Minuten), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µmol/l, 5 Minuten) oder S-Nitrosocystein (SNOC, 100 µmol/l, 60 Minuten) in An- oder Abwesenheit von Methioninsulfoximin (MSO), dem Antioxidans Epigallocatechingallat (EGCG, 100 µmol/l), dem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-umsetzenden Enzym Katalase (8000U/ml), dem NO-Fänger Carboxyphenyltetramethylimidazolinoxyloxid (cPTIO, 10 µmol/l) oder reduziertem Glutathion (GSH, 10 mmol/l) durchgeführt.

Die Fluorimetermessung wurde von Torsten Jansen und Dr. Boris Görg durchgeführt (Institut für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie).

### 2.2.7 NO-Donoren

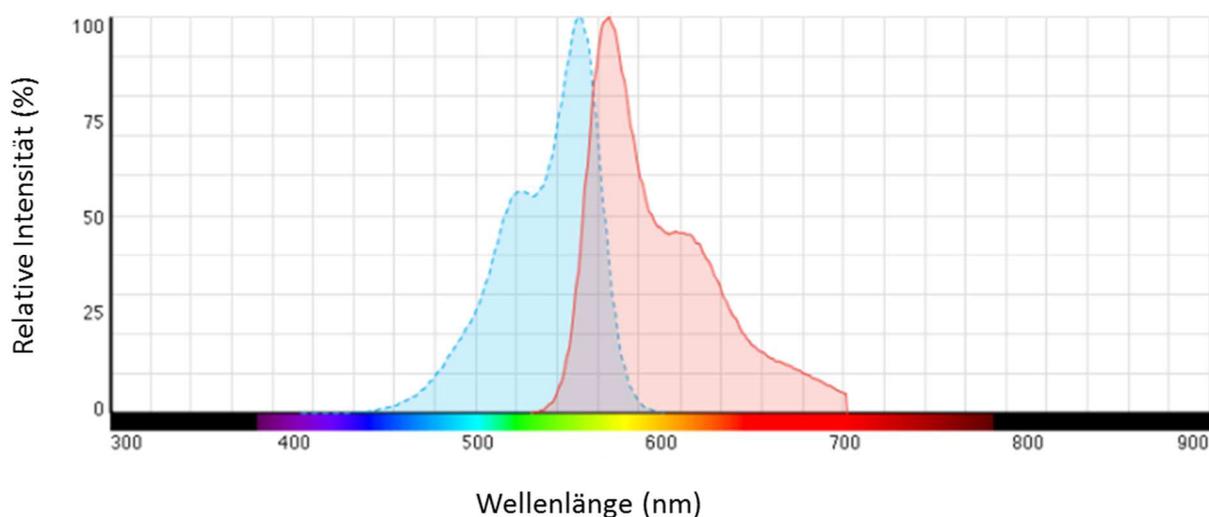
Für die Herstellung von S-Nitrosocystein (SNOC) wurden 1,76 mg Cystein-HCl und 0,69 mg NaNO<sub>2</sub> in 48 µl Aquabidest gelöst und der pH-Wert der Lösung mit 2 µl 1M HCl und nachfolgend mit 1,5 µl NaOH eingestellt.

Spermin-NONOate wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. Klaus Kröncke (Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

### 2.2.8 Zellvolumenmessung

Zellvolumenmessungen wurden mit dem Axio-Observer A1 Weitfeld-Mikroskop und einer VivaTome™-Einheit (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Bilder wurden unter Verwendung eines dx63 (numerische Apertur 1,4) Immersionsöl-Objektiv und einer HXP-120 Weißlichtquelle (Leistungselektronik Jena GmbH) aufgenommen. Vitale

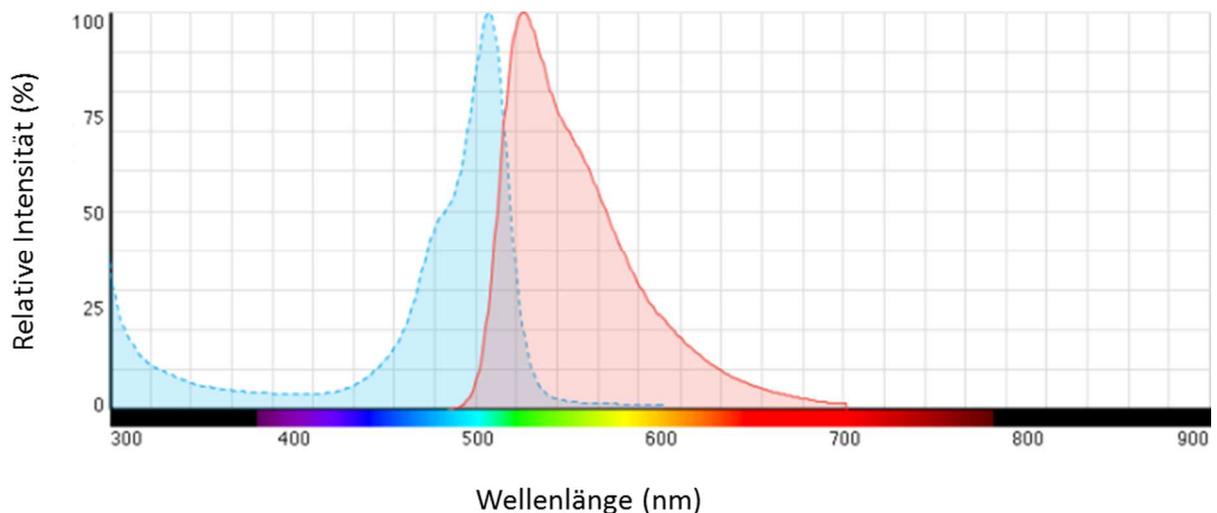
Astrozyten, Neurone und Mikroglia, ausgesät auf ibidi™-Schalen, wurden mit CellMask™-Orange (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland; 0,6125 µg/ml) für 3 Minuten inkubiert. CellMask™-Orange ist ein rot fluoreszierender Farbstoff, der die Zellmembran anfärbt (Anregungsmaximum: 554 nm, Emissionsmaximum: 567 nm) (Abb. 5). Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit jeweils 2 ml DMEM gewaschen und bei einer Wellenlänge von 545 nm angeregt und die Emission bei 606 nm detektiert. Die Anregungsparameter (Anregungsenergie der Beleuchtungsquelle, Öffnung der Lochblende sowie Dauer der Anregung und Anzahl der aufgenommenen Schichten in z-Richtung) wurden zur Verringerung von Ausbleicheeffekten („*Bleaching*“) und Phototoxizität optimiert. Für die Volumenberechnungen wurden z-Stapel mit einer Schrittweite von 0,266 µm angefertigt. Bilder wurden vor der Zugabe des Stimulus (t=0) und zu den Zeitpunkten 1, 3, 5, 10, 15 und 20 Minuten ohne oder nach Vorbehandlung mit der angezeigten Substanz aufgenommen. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. In einigen Untersuchungen wurden die Zellen vor Zugabe von NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l) mit Inhibitoren vorbehandelt (30 Min), die während der gesamten Dauer des Experiments im Zellkulturmedium verblieben. Die Vorbehandlung der Zellen mit den hier genutzten Inhibitoren führte zu keiner statistisch signifikanten Veränderung des Zellvolumens (Tab. 7; S. 60).



**Abbildung 5: Anregungs- und Emissionsspektren des Fluoreszenzfarbstoffs CellMask™-Orange.** Die x-Achse repräsentiert die Wellenlänge in nm aufgeführt, die y-Achse die relative Intensität in %. Die Absorption ist hellblau und die Emission rot dargestellt. Das Anregungsmaximum liegt bei 554 nm, das Emissionsmaximum bei 567 nm (mit freundlicher Genehmigung der Firma Thermo Fisher Scientific).

### 2.2.9 Kernvolumenmessung

Für die Kernvolumenmessungen wurden Astrozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Syto<sup>TM</sup>-11 (1  $\mu\text{mol/l}$ , 10 Min, 10 %  $\text{CO}_2$ , 37 °C, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) inkubiert und mit Hilfe der unter 2.2.11 (S. 27) beschriebenen Volumenmikroskopiertechnik analysiert. Syto<sup>TM</sup>-11 ist ein membranpermeabler, nach Anregung grünfluoreszierender Farbstoff, der an DNA bindet. Das Anregungsmaximum des Farbstoffs liegt bei 508 nm, das Emissionsmaximum bei 527 nm (Thermo Fisher Scientific) (Abb. 6).



**Abbildung 6: Anregungs- und Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffs Syto<sup>TM</sup>-11.** Die x-Achse repräsentiert die Wellenlänge in nm, die y-Achse die relative Intensität in %. Die Absorption ist hellblau und die Emission rot dargestellt. Das Anregungsmaximum von Syto<sup>TM</sup>-11 liegt bei 508 nm, das Emissionsmaximum bei 527 nm (mit freundlicher Genehmigung der Firma Thermo Fisher Scientific).

### 2.2.10 Volumenberechnung und dreidimensionale Rekonstruktion

Für die Volumenberechnung wurden Bilderstapel wie unter 2.2.8 (S. 24) beschrieben angefertigt und nachfolgend mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ (Wayne Rasband, [wsr@nih.gov](mailto:wsr@nih.gov)) weiter prozessiert. Unspezifisches Bildrauschen wurde durch

Verwendung des Hybrid 3D Median Filter-Plugins für ImageJ verringert (Christopher Philip Mauer (Toronto Western Research Institute, Toronto, Canada), Vytas Bindokas (University of Chicago, USA)). Die Pixel der durch mit CellMask™-Orange im Bild eingegrenzten Flächen einer jeden einzelnen Schicht wurden nachfolgend gefüllt („Voxel Counter“: Image J-Plugin, Wayne Rasband (NCBI)). Unter den beschriebenen Aufnahmebedingungen und von dem von der Hardware vorgegebenen Größenmaßstab beträgt das Volumen eines einzelnen Voxels  $0,1 \mu\text{m} \times 0,1 \mu\text{m} \times 0,266 \mu\text{m} = 0,00266 \mu\text{m}^3$ . Das Gesamtvolumen einer Zelle ergibt sich durch Summierung aller Pixel aller Bilder in Stapeln. Das Volumen wird in Pikoliter (pl) angegeben. Die Genauigkeit der Volumenbestimmung wurde mit größendefinierten *Latex-Beads* (Focal Check Fluorescent Microspheres Standards, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) überprüft. Bei den verwendeten *Microspheres* (F7236) der Lot Nr. 873774, gab der Hersteller einen durchschnittlichen Durchmesser eines *Beads* von  $15,4 \mu\text{m}$  an. Hieraus ergibt sich ein theoretisches durchschnittliches Volumen eines *Beads* von  $1,912 \text{ pl}$ . Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopiertechnik, die hier verwendet wurde, wurde ein durchschnittliches Volumen der *Beads* von  $1,903 \pm 0,009 \text{ pl}$  und ein durchschnittlicher Durchmesser von  $15,25 \pm 0,009 \mu\text{m}$  errechnet. Diese Untersuchungen sprechen für eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der in dieser Arbeit verwendeten Mikroskopiertechnik.

Für die dreidimensionale Rekonstruktion der Zellen wurden die erhaltenen z-Stapel-Bilderserien mit Hilfe des ImageJ Plugins „TransformJ“ unter Verwendung der Option „Cubic-B-Spline Interpolation Scheme“ prozessiert und die erhaltenen Bilderstapel mit Hilfe der 3D Rendering Software Volocity™ visualisiert (Perkin Elmer, Massachusetts, USA).

### 2.2.11 Prinzip der Volumenmikroskopie mittels VivaTome™

Mit Hilfe der VivaTome™-Mikroskopie lassen sich dynamische Prozesse an lebenden Proben mit hoher zeitlicher Auflösung darstellen. Durch sie können optische Schnitte mit einer Frequenz von bis zu 30 Bildern pro Sekunde aufgenommen werden (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

Die hohe Lichteffizienz der VivaTome™-Mikroskopie wird durch eine rotierende Scheibe, auf der ein Gittermuster angebracht ist, erreicht, durch das sowohl Anregungs-, als auch Emissionslicht gelangt. Dadurch wird die Probe hocheffizient ausgeleuchtet. Im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie, bei der hochenergetische Laser als Anregungsquelle genutzt werden müssen, kann dieses System eine Kaltlichtquelle nutzen. Insgesamt ermöglicht die VivaTome™-Mikroskopie eine probenschonende und rasche Anregung der Fluorochrome.

Diese Eigenschaften lassen die VivaTome™-Technik ideal für die dynamische Erfassung rasch ablaufender zellulärer Prozesse, wie z.B. Veränderungen des Zellvolumens, erscheinen (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

#### **A) Aufbau des VivaTome Mikroskopiensystems**

Das Imaging-System besteht aus einem Axio Observer A1 (Zeiss Mikroskop). Dieser ist ausgestattet mit einem Plan-APOCHROMAT 63x/1.4 NA Oil DIC-Objektiv, einer Epi-Fluoreszenzlichtquelle HXP120 C (Leistungselektronik Jena GmbH) und einem Tischaufsatz, der durch einen z-PIEZO in kurzer Zeit in z-Richtung bewegt werden kann. Am linken Kameraausgang ist die Spinning-Disk-Einheit VivaTome™ und eine digitale Kamera angebracht (Zeiss, Axio Cam MRm) (Abb. 7). Das System wird durch die Software Axio Vision gesteuert (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

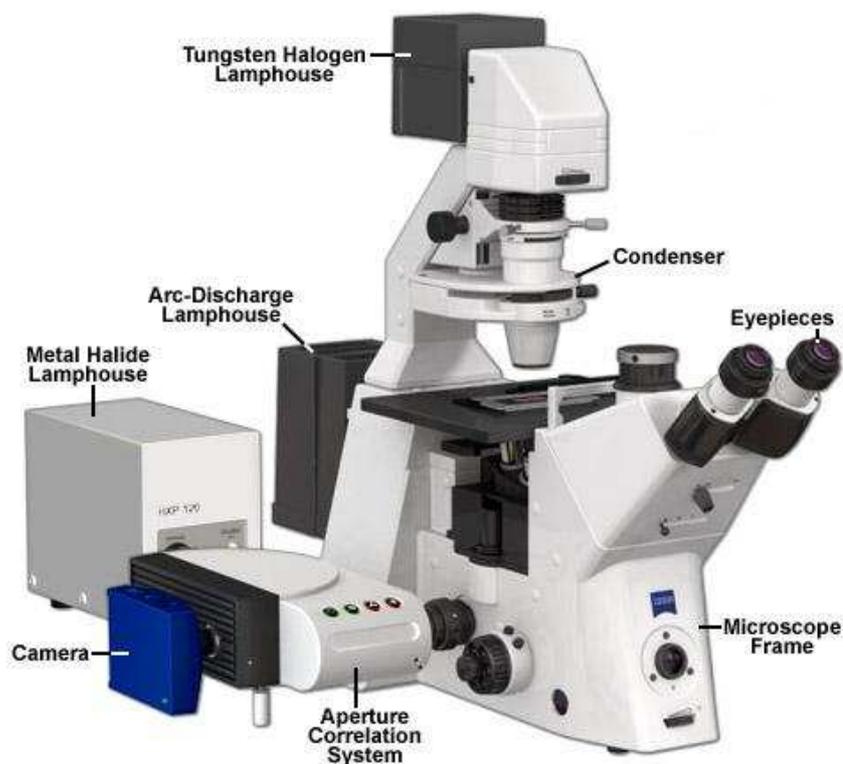


Abbildung 7: Aufbau des VivaTome™ Mikroskops (Quelle: Carl Zeiss Microscopy GmbH)

## B) Funktionsprinzip des VivaTome™ Mikroskop-Setups

Bei der VivaTome™-Mikroskopie wird eine Quecksilber-Kurzbogen-Reflektorlampe (HXP120C der Firma Leistungselektronik Jena GmbH) als Lichtquelle für die Anregung der Fluorochrome verwendet. Das Anregungslicht gelangt durch Lochblenden auf die Probe, die sich auf einer sich rasch drehenden Scheibe befinden (1000 Lochblenden auf einer Fläche von 10x7 mm in einem Abstand von jeweils 250  $\mu\text{m}$ ) (Abb. 8; S. 31). Jede Lochblende weist einen Durchmesser von 50  $\mu\text{m}$  auf.

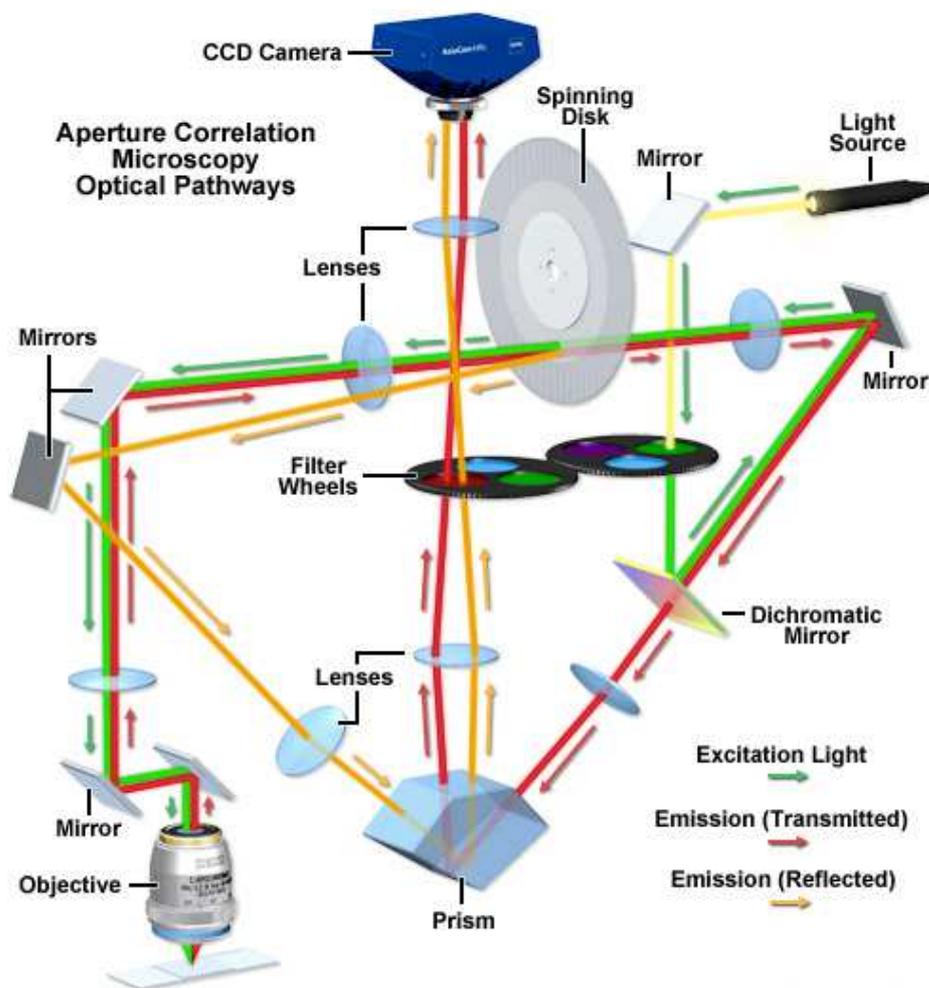
Das Anregungslicht wird durch die Lochblenden auf die Probe projiziert und regt die Fluorochrome in der Probe an, Licht der jeweiligen charakteristischen Wellenlänge zu emittieren. Ein Teil des emittierten Lichts gelangt durch die auf der Scheibe angebrachten Lochblenden zurück und wird von der CCD-Kamera detektiert. Durch die Verwendung von Lochblenden kann ähnlich der konfokalen Mikroskopie ein Teil des Lichts, das nicht aus der

fokussierten Ebene stammt, von der Detektion ausgeschlossen werden. Dabei ist die Auflösung in z-Ebene bei der hier für die Detektion von CellMask™Orange genutzten Anregungswellenlänge und des verwendeten optischen Systems auf 0,266 µm begrenzt.

Durch Verwendung einer rotierenden Scheibe mit mehreren darauf befindlichen benachbarten Lochblenden gelangt zu jedem Aufnahmezeitpunkt gleichzeitig Licht auf viele verschiedene Bereiche der Probe. Im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie unter Verwendung von Linien- und Punktscannern, bei der einzelne Bereiche der Probe lokal angeregt werden, werden bei diesem System viele benachbarte Bereiche der Probe parallel angeregt. Dabei überlagert sich das Emissionslicht benachbarter Lochblenden partiell. In der Folge enthält das durch eine Lochblende gelangte Licht auch Licht aus benachbarten optischen Bereichen (Out-Of-Focus-Licht). Das erhaltene Bild enthält zu einem Anteil von 50 % Licht, das innerhalb der Fokusebene liegt, aber auch zu 50 % Licht mit Weitfeldinformationen.

Im Gegensatz zur bei Laserscanning Systemen zum Einsatz kommenden „Yokogawa Disk“, die nach dem Nipkow-Prinzip arbeitet, sind die Lochblenden bei der im VivaTome™ enthaltenen Disk nicht entlang konzentrischer Kreise angebracht, sondern bilden ein regelmäßiges Gittermuster (Carl Zeiss Microscopy GmbH) (Abb. 9; S. 32).

Hierdurch wird es möglich, dass die Pinhole-Strukturen für Anregung und Detektion sehr nah beieinander angeordnet werden können. Dadurch kann eine Effektivität der Lichttransmission von 50 % erreicht werden.



**Abbildung 8: Darstellung der Strahlenwege des Anregungs-, des transmittierten und des reflektierten Lichts bei der VivaTome™-Mikroskopie.** Anregungslicht aus einer weißen Lichtquelle gelangt durch die Lochblenden der rotierenden Scheibe und erreicht die zu untersuchende Probe. Von der Probe gelangt emittiertes Licht durch die Lochblenden der Scheibe auf den Detektor. Zusätzlich zur Information aus der Fokusebene gelangt Fluoreszenzlicht außerhalb der Fokusebene durch die Lochblenden der Scheibe, sodass das erhaltene Bild alle „In-Focus“-, aber auch 50 % der „Out-Of-Focus“-Informationen enthält. Wegen des 1:1- „line-to-space“-Verhältnisses (50 % der Scheibe sind durchlässig) gelangt 50 % des „Out-Of-Focus“-Lichts durch die Lochblenden der Scheibe, sodass das erhaltene Bild alle „In-Focus“-, aber auch 50 % der „Out-Of-Focus“-Informationen enthält. Die der Probe zugewandte Seite der Scheibe reflektiert Licht, welches nicht aus der Fokusebene stammt, über einen zweiten Strahlenweg auf die Kamera. Dadurch entstehen zwei Bilder simultan: Das erste Bild enthält die „In-Focus“-Information und zusätzlich 50 % der „Out-Of-Focus“-Information, während das zweite Bild ausschließlich die „Out-Of-Focus“-Information enthält (Quelle: Carl Zeiss Microscopy GmbH).



**Abbildung 9: Im VivaTome™ verwendete Lochblendenscheibe.** Auf der Lochblendenscheibe ist die Gitterstruktur anhand der unterschiedlichen Reflektion bzw. Transmission des Lichts erkennbar. Auf der Scheibe befinden sich unterschiedliche Gitter, die den verschiedenen Objektiven angepasst sind (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

### C) “Optischer Schnitt“

Zur Erzeugung eines optischen Schnittes kann nachfolgend die „In-Focus“-Information aus dem die Lochblende passierten Lichts über einen mathematischen Algorithmus unter Nutzung der Information des an der Scheibe reflektierten Lichts („Out-Of-Focus“) errechnet werden (Abb. 10, 11; S. 33, 34).

Der optische Schnitt ( $I_{\text{Sectioned}}$ ) wird dabei durch einfache Subtraktion der beiden Bilder  $I_{\text{Transmitted}}$  und dem Produkt aus  $k \cdot I_{\text{Reflected}}$  berechnet. Der Skalierungsfaktor  $k$  beschreibt dabei eine Konstante, welche Unterschiede in der Transmissionseffizienz der beiden Strahlengänge (transmittiertes und reflektiertes Licht) korrigiert (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

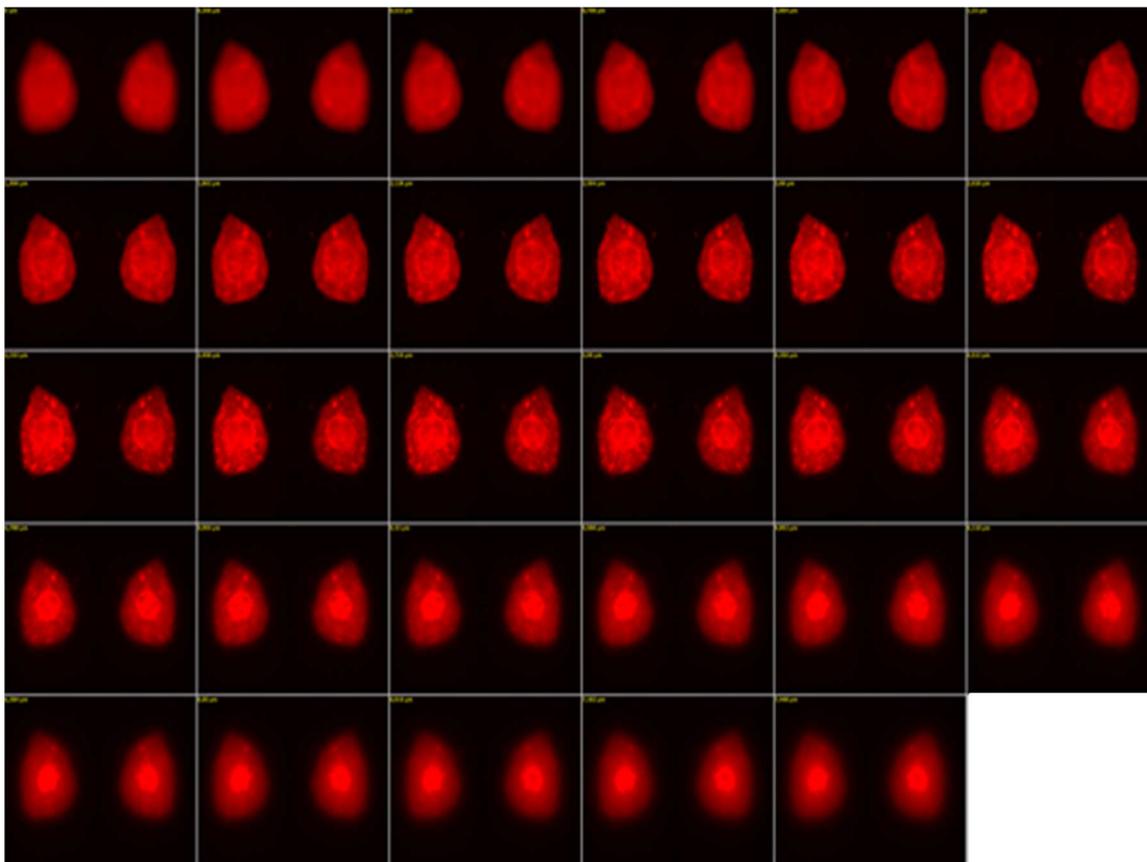
$$I_{\text{Sectioned}} = I_{\text{Transmitted}} - k \cdot I_{\text{Reflected}}$$

Die Addition von  $I_{\text{Transmitted}}$  und dem Produkt  $k \cdot I_{\text{Reflected}}$  ergibt das konventionelle Weitfeldbild ( $I_{\text{Widefield}}$ ):

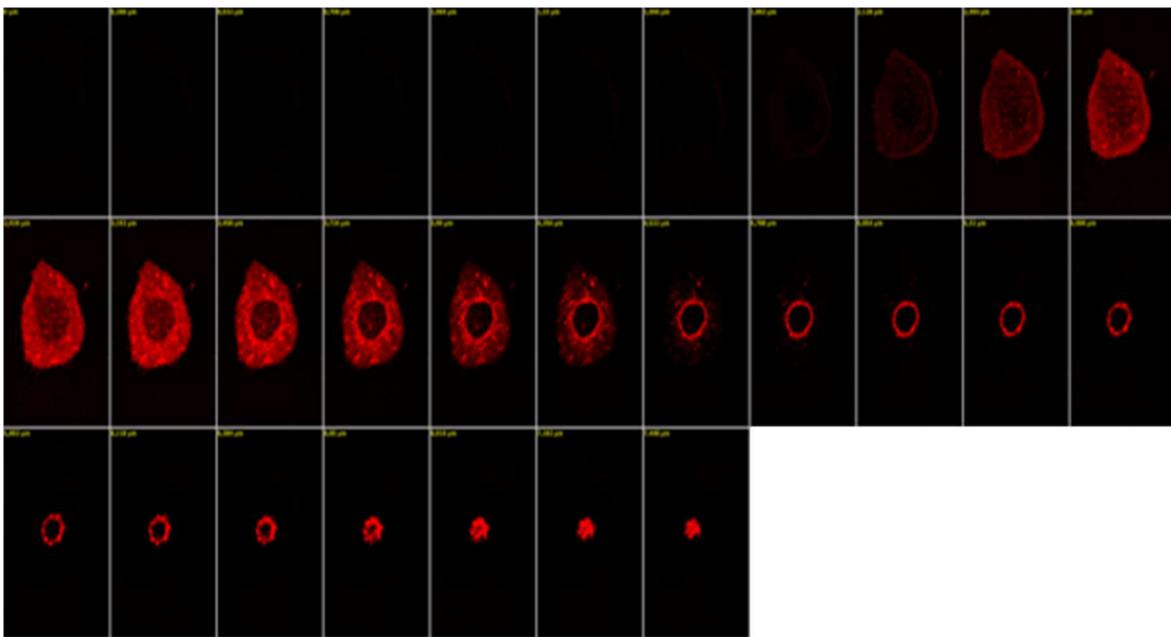
$$I_{\text{Transmitted}} + k \cdot I_{\text{Reflected}} = I_{\text{Reflected}}$$

Die Funktionsweise des Algorithmus ist in Abbildungen 10 und 11 am Beispiel eines mit Cell-Mask™-Orange gefärbten Astrozyten dargestellt. Abb. 10 zeigt die „In-Focus“- und „Out-Of-

Focus“-Information für jeden optischen Schnitt in z-Ebene paarweise angeordnet. Abb. 11 zeigt die jeweiligen Bilderpaare nach Verarbeitung.



**Abbildung 10: Gegenüberstellung von „In-Focus“- und „Out-Of-Focus“-Informationen aufeinanderfolgender Schichten eines mit CellMask™-Orange gefärbten Astrozyten.** In den 29 gezeigten Schnittebenen sind jeweils „Out-Of-Focus“-Bilder (jeweils auf der linken Seite eines jeden Bilderpaares) den „Out-Of-Focus + In-Focus“-Bildern (jeweils rechte Seite eines jeden Bilderpaares) gegenübergestellt. Die Kamera zeichnet gleichzeitig das „Out-Of-Focus“-Bild neben dem „In-Focus“-Bild auf und verrechnet die Bildinformationen: Unter Verwendung der oben beschriebenen mathematischen Gleichungen kann die im Bild enthaltene Weitfeldlichtinformation entfernt werden (aus Lachmann *et al.*, 2013).



**Abbildung 11: Ergebnis der mathematischen Prozessierung der „In-“ und „Out-Of-Focus“-Bildinformationen.** Die Abbildung zeigt die 29 Schnittebenen aus Abb. 10 nach Prozessierung mit dem oben beschriebenen mathematischen Algorithmus, der die „Out-Of-Focus“-Information aus den Bildern, die sowohl „Out-Of-Focus“ als auch „In-Focus“- Informationen beinhalten, entfernt (aus Lachmann *et al.*, 2013).

#### D) Auflösung

Die mit dem vorliegenden Setup erzielte Auflösung wird bestimmt durch a.) den Aufbau der Nipkow-Scheibe, b.) der numerischen Apertur des verwendeten Objektivs, c) der Probenbeschaffenheit und der verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlängen.

Die Struktur bzw. der Lochblendenabstand auf der rotierenden Scheibe mit dem darauf befindlichen Gittermuster bestimmt die axiale Auflösung. Die erzielbare optische Auflösung ist abhängig von der numerischen Apertur, des Objektivs, der Objektivvergrößerung und der Gitterfrequenz. Dieser Zusammenhang kann näherungsweise in folgenden Formeln beschrieben werden (Carl Zeiss Microscopy GmbH):

$$\text{FWHM}(z) = \frac{3.83}{16\pi} \cdot \frac{\lambda \times 10^{-3}}{n \cdot \sin^2\left(\frac{\alpha}{2}\right) \bar{V} \left(1 - \frac{\bar{V}}{2}\right)}$$

$$\bar{v} = \frac{M \cdot \lambda \cdot v}{NA}$$

FWHM: Full Width at Half Maximum (Halbwertsbreite)

$\lambda$ : Wellenlänge [nm]

n: Brechungsindex des Mediums zwischen Deckglas und Frontlinse des Objektivs

$\alpha$ : Öffnungswinkel des Objektivs (Akzeptanzwinkel)

v: effektive Gitterfrequenz

M: Objektivvergrößerung

v: aktuelle Gitterfrequenz

NA: Numerische Apertur

Die numerische Apertur (NA) ist eine dimensionslose Größe und beschreibt das Auflösungsvermögen eines Objektivs. Dabei ist das Auflösungsvermögen von dem Öffnungswinkel des Objektivs und dem Brechungsindex des Materials zwischen der zu fokussierenden Ebene und dem Objektiv abhängig, welche die Lichtmenge begrenzen, die vom Präparat in das Objektiv gelangt. Je größer der Öffnungswinkel ist, umso mehr Licht gelangt in das Objektiv und desto höher ist das Auflösungsvermögen (Carl Zeiss Microscopy GmbH) (Abb. 12).



**Abbildung 12: Beziehung zwischen Objektiv-Öffnungswinkel und Lichteinfall.** Die Abbildung zeigt schematisch Objektive mit einem kleinen und einem großen Öffnungswinkel. Der größere Öffnungswinkel erlaubt einen größeren Lichteinfall und somit ein besseres Auflösungsvermögen (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

Die Numerische Apertur lässt sich in folgender Formel ausdrücken:

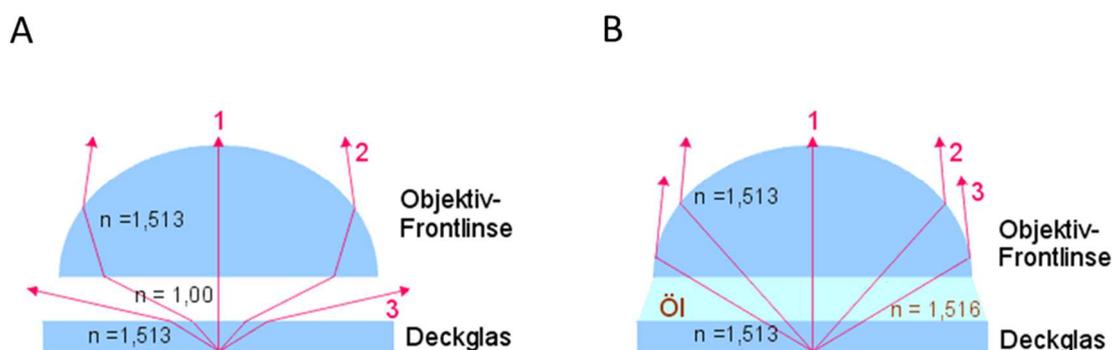
$$NA = n \cdot \sin(\alpha)$$

NA: Numerische Apertur des Objektivs

n: Brechungsindex

$\sin(\alpha)$ : Sinus des halben Öffnungswinkels

Bei Ölimmersionsobjektiven befindet sich zwischen Deckglas und Frontlinse des Objektivs Immersionsöl mit einem Brechungsindex von 1,516 (23 °C), der dem Brechungsindex des Deckglases ähnlich ist ( $n=1,513$ ) und somit Licht ungebeugt auf die Objektivlinse gelangt. Die NA ist bei Immersionsobjektiven größer als 1 und damit haben solche Objektive ein höheres Auflösungsvermögen als Trockenobjektive (Carl Zeiss Microscopy GmbH) (Abb. 13). Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Ojektiv handelt es sich um ein Ölimmersionsobjektiv, welches eine numerische Apertur von 1,4 besitzt.



**Abbildung 13: Vergleich der Strahlenwege beim Trockenobjektiv (A) und Ölimmersionsobjektiv (B).** Bei Trockenobjektiven werden die Lichtstrahlen beim Übergang vom Deckglas zur Luft von der senkrechten Achse ausgehend gebrochen, sodass einige Lichtstrahlen nicht das Objektiv erreichen und nicht die Bildauflösung erhöhen (A, Lichtstrahl 3). Bei Trockenobjektiven ergibt sich ein Brechungsindex von 1. Bei Ölimmersionsobjektiven hingegen ist der Brechungsindex des Deckglases ( $n=1,513$ ) dem des Immersionsöls ( $n=1,516$ ) sehr ähnlich (B). Durch das zwischen Deckglas und Objektiv befindliche Immersionsöl verringert sich die Beugung des Lichtstrahls und es wird somit ein besseres Auflösungsvermögen als bei Trockenobjektiven erreicht (mit freundlicher Genehmigung von Christian Linkenheld, [linkenheld@mikroskopie.de](mailto:linkenheld@mikroskopie.de)).

## E) Software AxioVision

Die Aufnahme und die Prozessierung der Bilder erfolgten unter Verwendung der für das VivaTome™ Setup optimierten AxioVision-Software. Durch das Modul „z-Stapel“ können verschiedene Fokusebenen in axialer Richtung aufgenommen werden (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

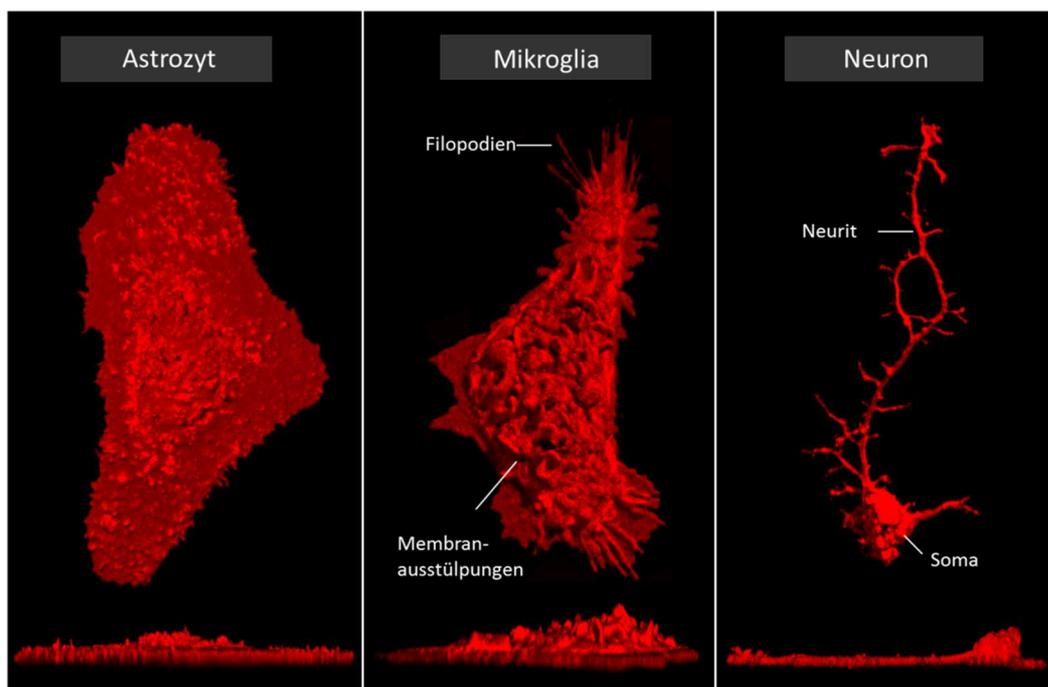
### 2.2.12 Analyse der Ergebnisse

Jedes Experiment wurde mit Astrozyten, die aus mindestens drei unabhängigen Präparationen stammten, durchgeführt. Die Ergebnisse von  $n$ -unabhängigen Experimenten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*; SEM) ausgedrückt. Statistische Unterschiede wurden mit Hilfe des t-Test nach Student oder bei Vergleich von mehr als 2 unabhängigen Gruppen durch einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von Tukey`s oder Dunnett`s *post hoc* Tests analysiert. Ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet. Statistische Berechnungen wurden mit der Software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad, La Jolla, USA) und Microsoft Excel für Windows (Microsoft, Redmond, USA) durchgeführt.

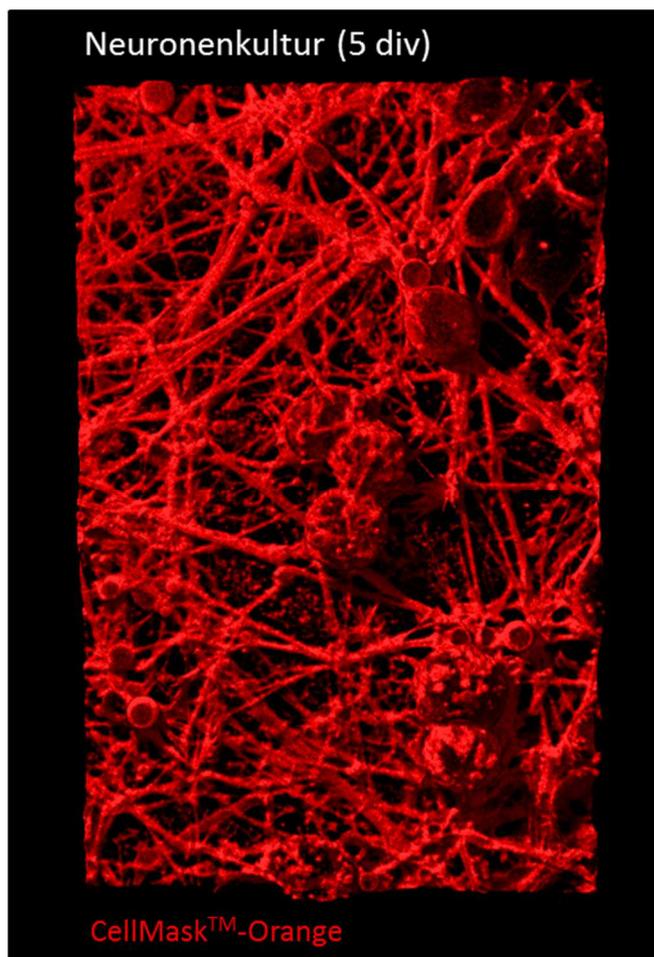
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Darstellung der Morphologie kultivierter Astrozyten, Mikroglia und Neurone mittels VivaTome™-Fluoreszenzmikroskopie

Die in der Arbeit beschriebene Volumenmikroskopiertechnik wurde an mit CellMask™-Orange angefärbten kultivierten vitalen Astrozyten, Mikroglia und Neuronen aus dem zerebralen Kortex der Ratte durchgeführt. Wie in Abb. 14 dargestellt, bleiben charakteristische morphologische Eigenschaften von Astrozyten, Mikroglia und Neuronen *in vitro* gut erhalten und lassen sich durch VivaTome™-Fluoreszenzmikroskopie gut reproduzieren. Während Astrozyten *in vitro* einen flachen Zellkörper zeigen, weisen Mikroglia Filopodien und Membranerhebungen auf. Neurone sind durch ein voluminöses Soma und verzweigte Ausläufer (Neuriten) charakterisiert, welche im Verlauf der Kultivierung ein komplexes Netzwerk bilden (Abb. 15).



**Abbildung 14: Darstellung der Morphologie kultivierter Rattenastrozyten, Mikroglia und Neurone mittels VivaTome™-Fluoreszenzmikroskopie.** Astrozyten, Mikroglia und Neurone aus dem zerebralen Kortex wurden auf ibidi™-Schalen ausgesät und mit CellMask™-Orange angefärbt, durch VivaTome™-Fluoreszenzmikroskopie visualisiert und nach Anfertigung von z-Stapel-Bilderserien dreidimensional mittels Volocity 3D-Software gerendert. Oben: Aufsicht; unten: Seitenansicht (aus Lachmann *et al.*, 2013).



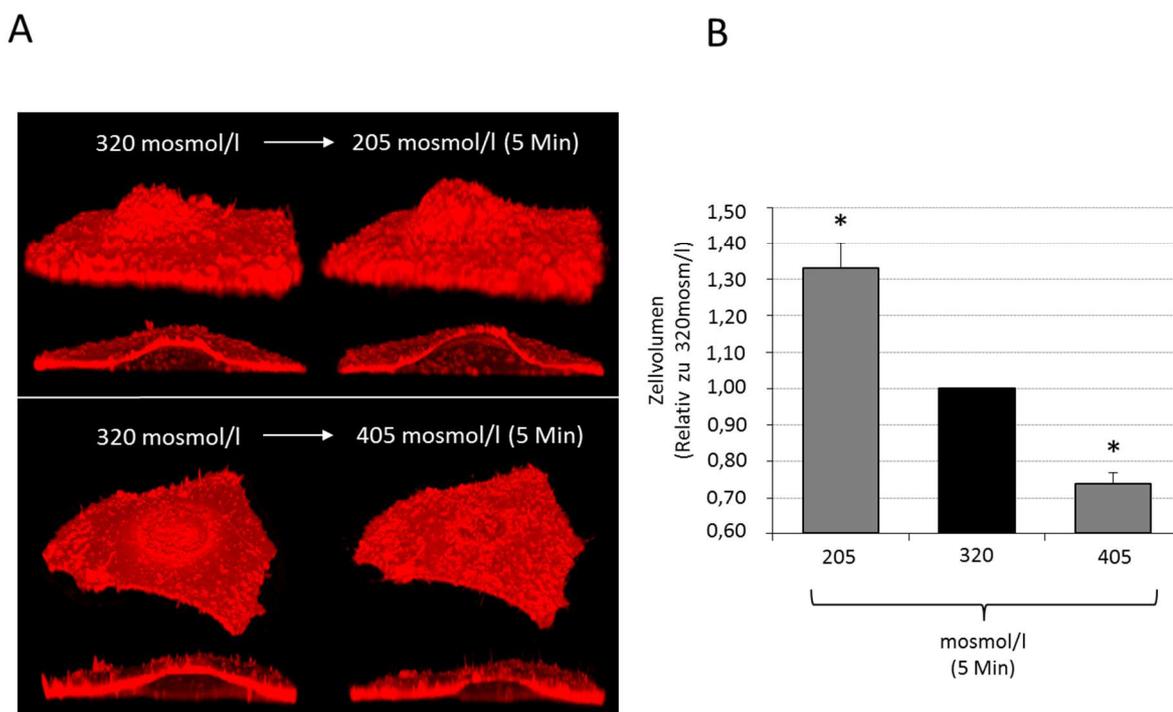
**Abbildung 15: Darstellung kultivierter Rattenneurone mittels VivaTome™-Fluoreszenzmikroskopie.** Neurone aus dem zerebralen Kortex wurden auf ibidi™-Schalen ausgesät und für 5 Tage kultiviert. Mit CellMask™-Orange angefarbte Neurone wurden mittels VivaTome™-Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen und die erhaltenen Bilderstapel dreidimensional mittels Volocity 3D-Software gerendert (aus Lachmann *et al.*, 2013). div: Tage *in vitro*

### 3.2 Effekte HE-auslösender Faktoren auf das Zellvolumen kultivierter Astrozyten

Zur Überprüfung der Eignung der VivaTome™-Mikroskopietechnik für Zellvolumenmessungen wurden Astrozyten entweder mit hypoosmotischem (205 mosmol/l) oder mit hyperosmotischem Medium (405 mosmol/l) für 5 Minuten behandelt und Volumenänderungen mittels VivaTome™-Mikroskopie erfasst. Während Hypoosmolarität das Zellvolumen statistisch signifikant um 30 % erhöhte, verringerte Hyperosmolarität das

Zellvolumen innerhalb von 5 Minuten um etwa 25 % des unter normoosmotischen Bedingungen gefundenen Ausgangsvolumens (Abb. 16).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine experimentell herbeigeführte Zellschwellung oder – Schrumpfung mit der VivaTome™-Mikroskopie erfasst und quantifiziert werden kann.

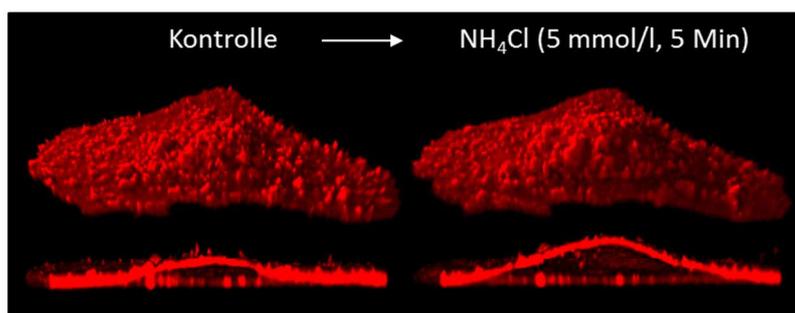


**Abbildung 16: Einfluss von Anisotonicität auf das Zellvolumen kultivierter Rattenastrozyten.** Kultivierte Rattenastrozyten wurden entweder mit hypoosmotischem (205 mosmol/l) oder hyperosmotischem (405 mosmol/l) Medium für 5 Minuten behandelt. (A) Dreidimensionale Volumenrekonstruktion der Zelle und der angeschnittenen Zelle. (B) Das Zellvolumen wurde 5 Minuten nach Behandlung mit hypo- oder hyperosmotischem Medium durch Volumenmikroskopie wie in Material & Methoden beschrieben bestimmt. Das Astrozytenvolumen in Gegenwart von normoosmotischem Medium wurde gleich eins gesetzt und Volumenänderungen nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zu normoosmotischen Kontrollen ( $n \geq 4$ ) (aus Lachmann *et al.*, 2013).

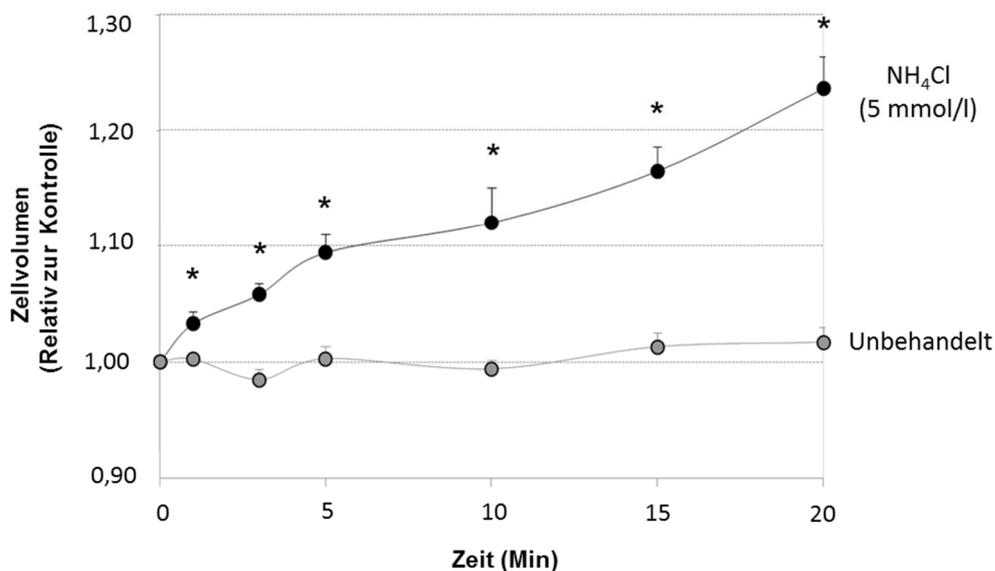
Um Effekte HE-auslösender Faktoren auf das Astrozytenvolumen zu untersuchen, wurden die Zellen entweder mit verschiedenen Konzentrationen  $\text{NH}_4\text{Cl}$  oder Diazepam (10  $\mu\text{mol/l}$ ), Clonazepam (10  $\mu\text{mol/l}$ ) oder mit den *pro*-inflammatorischen Zytokinen  $\text{TNF-}\alpha$  (10 ng/ml),  $\text{IFN-}\gamma$  (100 U/ml) oder  $\text{IL-1}\beta$  (100 U/ml) behandelt. Im Gegensatz zu den unbehandelten Astrozyten, die keine statistisch signifikante Zellvolumenänderungen zeigten, erhöhte  $\text{NH}_4\text{Cl}$  das Astrozytenvolumen zeit- und dosisabhängig auf bis zu 125 % des Ausgangs-

volumens innerhalb von 20 Minuten (Abb. 17 A-D; S. 41-42). Das Astrozytenvolumen stieg nach der Behandlung mit 0,5 mmol/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$  bereits bei 3 Minuten signifikant an. Die Ergebnisse zeigen, dass  $\text{NH}_4\text{Cl}$  eine rasch einsetzende Volumenzunahme kultivierter Astrozyten induziert.

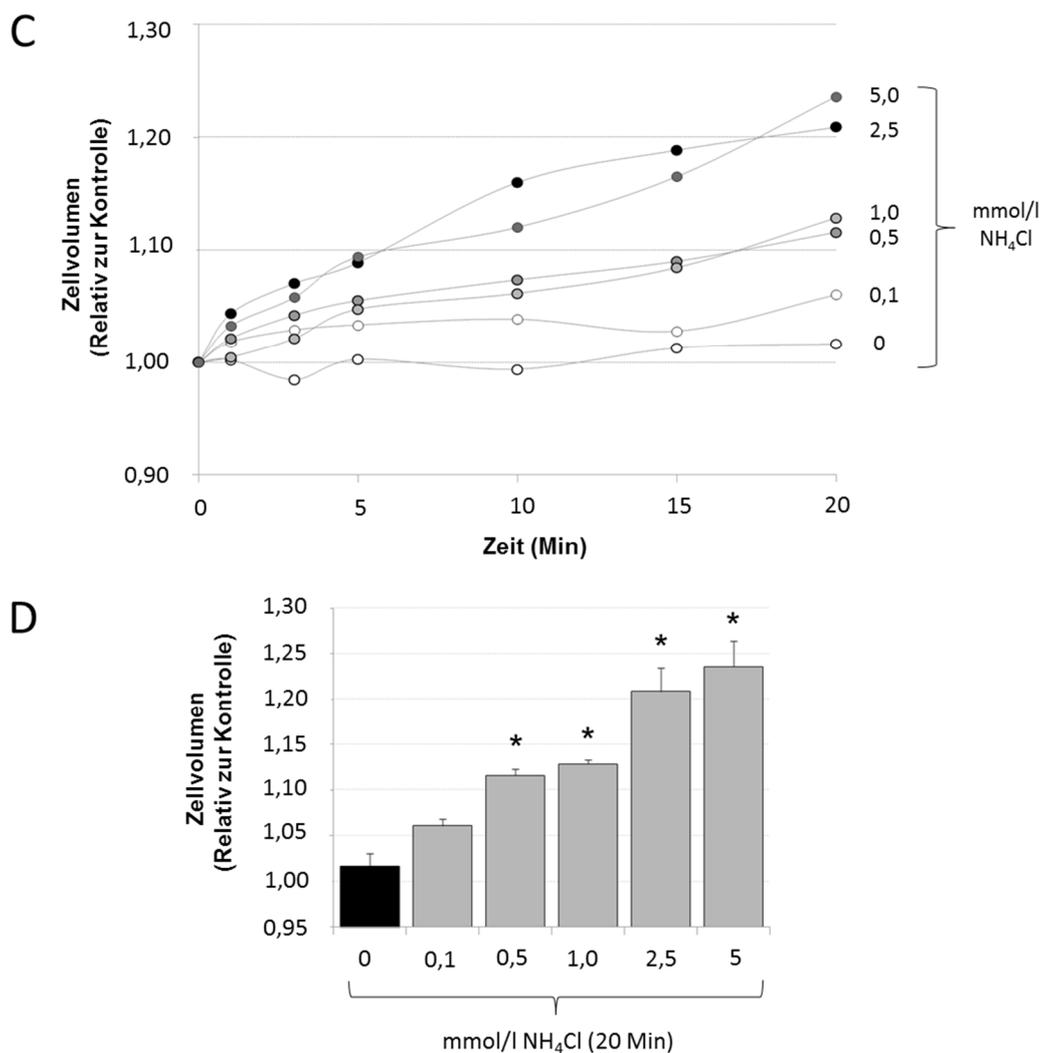
A



B

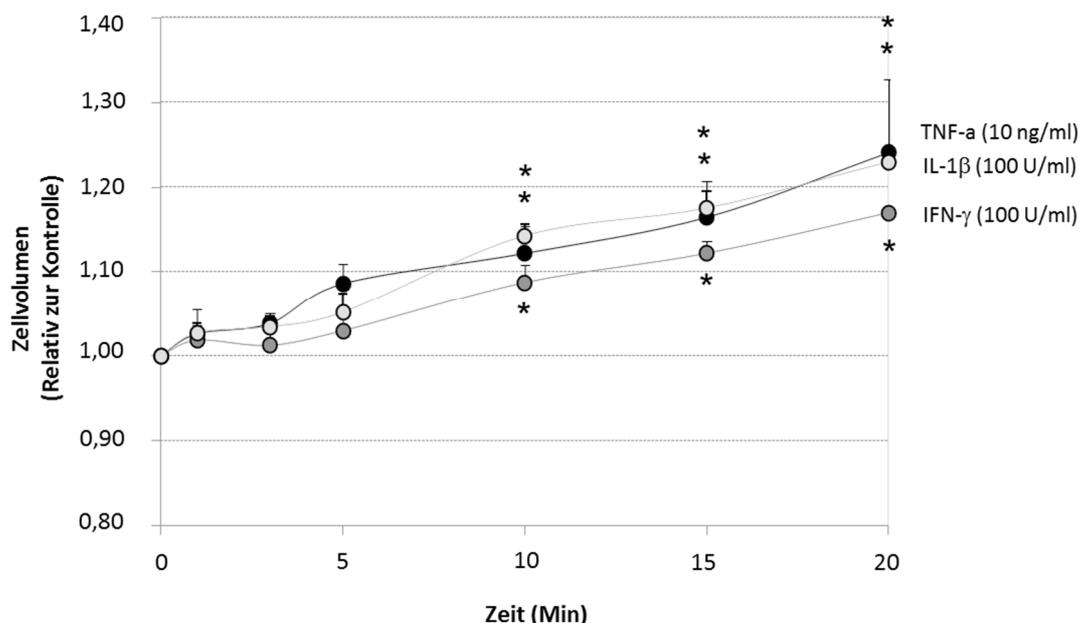


**Abbildung 17 A, B: Effekte von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  auf das Zellvolumen kultivierter Rattenastrozyten.** Kultivierte Rattenastrozyten blieben unbehandelt oder wurden mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Das Zellvolumen unbehandelter Astrozyten (0 Minuten) wurde gleich eins gesetzt und Volumenänderungen nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. (A) Dreidimensionale Volumenrekonstruktion eines Astrozyten 5 Minuten nach Inkubation mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mmol/l, 5 Minuten). (B) Zeitabhängigkeit der Zellvolumenveränderungen unbehandelter oder mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mmol/l) behandelter Astrozyten. \* statistisch signifikant unterschiedlich zu unbehandelten Kontrollen ( $n \geq 4$ ) (aus Lachmann *et al.*, 2013).



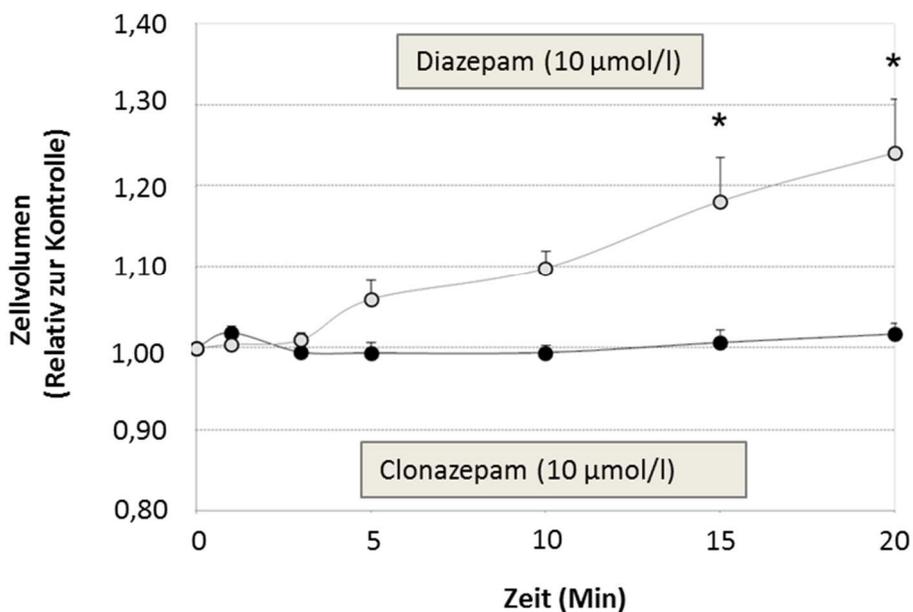
**Abbildung 17 C, D: Effekte von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  auf das Zellvolumen kultivierter Rattenastrozyten.** Kultivierte Rattenastrozyten blieben unbehandelt oder wurden mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Das Zellvolumen unbehandelter Astrozyten (0 Minuten) wurde gleich eins gesetzt und Volumenänderungen nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. (C) Konzentrationsabhängigkeit der durch  $\text{NH}_4\text{Cl}$  induzierten Zellvolumenänderungen. (D) Statistische Auswertung von Zellvolumenänderungen mit unterschiedlichen Konzentrationen  $\text{NH}_4\text{Cl}$  behandelter Astrozyten 20 Minuten nach Inkubation mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . \* statistisch signifikant unterschiedlich zu unbehandelten Kontrollen ( $n \geq 4$ ) (aus Lachmann *et al.*, 2013).

Wurden die Astrozyten mit den *pro*-inflammatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (100 U/ml) oder IFN- $\gamma$  (100 U/ml) behandelt, stieg das Zellvolumen um 15-25 % innerhalb von 20 Minuten an (Abb. 18, 20).



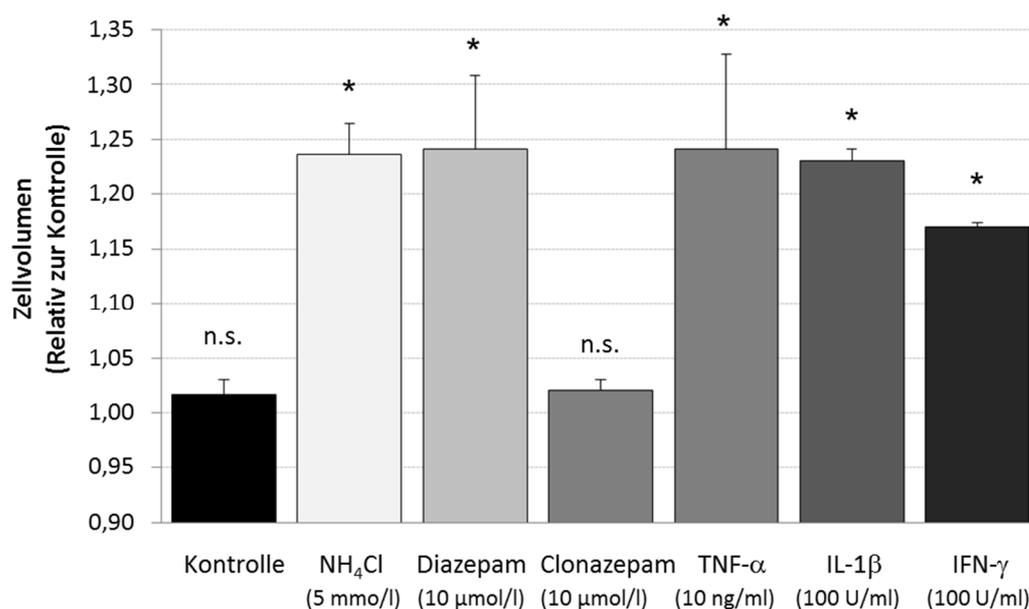
**Abbildung 18: Wirkung *pro*-inflammatorischer Zytokine auf das Zellvolumen kultivierter Rattenastrozyten.** Rattenastrozyten blieben entweder unbehandelt oder wurden mit TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (100 U/ml) oder IFN- $\gamma$  (100 U/ml) inkubiert. Das Zellvolumen unbehandelter Astrozyten (0 Minuten, Kontrolle) wurde gleich eingesetzt und Volumenänderungen nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle (n=3) (aus Lachmann *et al.*, 2013).

Diazepam (10  $\mu$ mol/l), ein Agonist des peripheren und zentralen Benzodiazepinrezeptors, induzierte einen Zellvolumenanstieg auf 125 % des Ausgangsvolumens. Clonazepam (10  $\mu$ mol/l), ein Agonist des zentralen Benzodiazepinrezeptors, beeinflusste das Astrozytenvolumen nicht (Abb. 19, 20; S. 44, 45). Dimethylsulfoxid (DMSO), das als Lösungsmittel für Diazepam und Clonazepam diente, hatte keinen Effekt auf das Zellvolumen (Tab. 7; S. 60). Die Ergebnisse zeigen, dass eine Aktivierung des peripheren, aber nicht des zentralen Benzodiazepinrezeptors eine Schwellung kultivierter Astrozyten vermittelt.



**Abbildung 19: Wirkung der Benzodiazepine Diazepam und Clonazepam auf das Zellvolumen kultivierter Rattenastrozyten.** Kultivierte Rattenastrozyten wurden entweder mit Diazepam oder mit Clonazepam (jeweils 10 µmol/l) inkubiert. Das Zellvolumen unbehandelter Astrozyten (0 Minuten, Kontrolle) wurde gleich eingesetzt und Volumenänderungen nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle (n=3) (aus Lachmann *et al.*, 2013).

Nach 20 minütiger Behandlung steigerte sowohl  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mmol/l) als auch Diazepam (10 µmol/l) sowie die *pro*-inflammatorischen Zytokine  $\text{TNF-}\alpha$  (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (100 U/ml) oder IFN- $\gamma$  (100 U/ml) das Astrozytenzellvolumen in ähnlicher Weise um ca. 15-25 % des Ausgangsvolumens (Abb. 20).

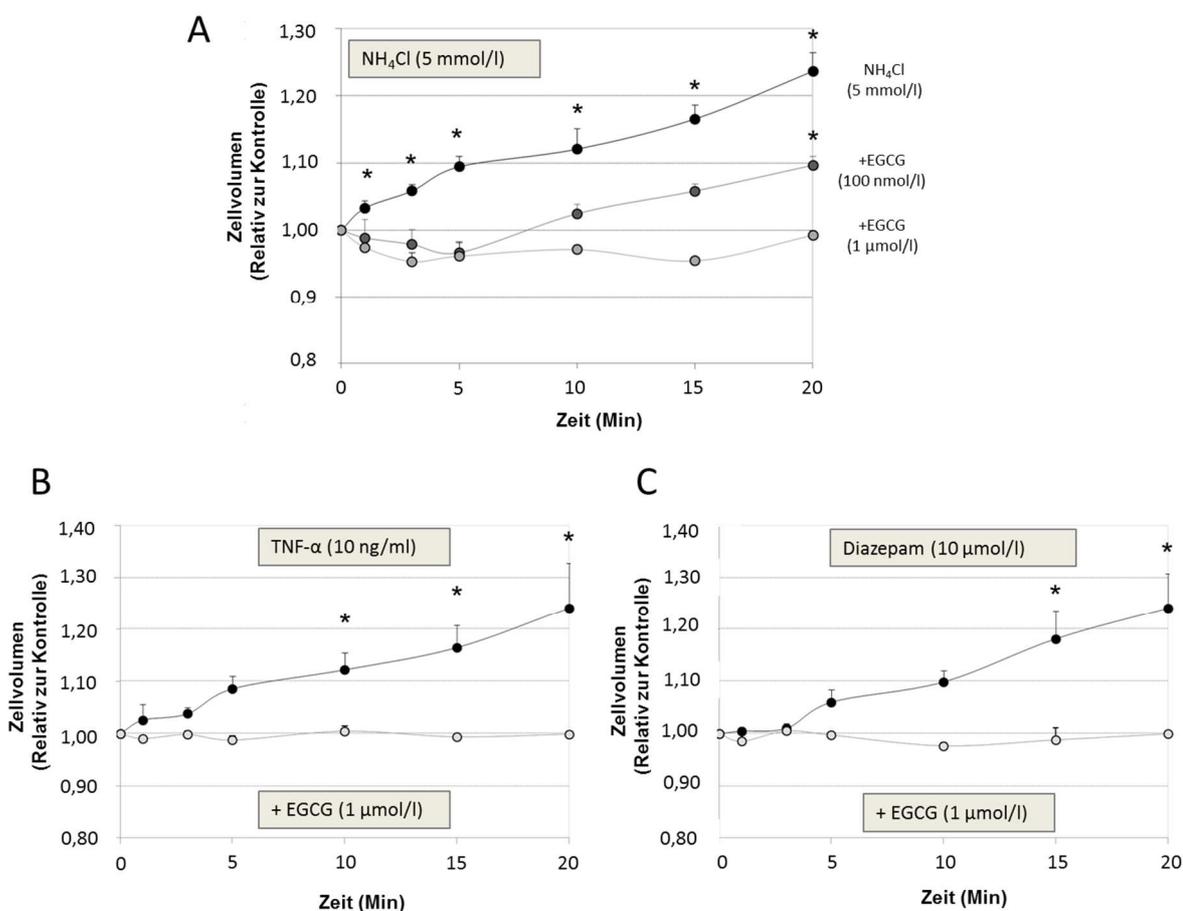


**Abbildung 20: Wirkung HE-relevanter Faktoren auf das Zellvolumen kultivierter Rattenastrozyten.** Kultivierte Rattenastrozyten blieben entweder unbehandelt („Kontrolle“) oder wurden mit NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l), Diazepam (10 µmol/l), Clonazepam (10 µmol/l), TNF-α (10 ng/ml), IL-1β (100 U/ml) oder IFN-γ (100 U/ml) für 20 Minuten behandelt. Das Zellvolumen unbehandelter Astrozyten (0 Minuten, Kontrolle) wurde gleich eins gesetzt und Volumenänderungen 20 Minuten nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant unterschiedlich zu unbehandelten Kontrollen (n=3). n.s. nicht signifikant unterschiedlich zu unbehandelten Kontrollen (aus Lachmann *et al.*, 2013).

### 3.3 Wirkung des Antioxidans Epigallocatechingallat auf die durch Ammoniak, TNF-α oder Diazepam induzierte Astrozytenschwellung

Hypoosmolarität, Ammoniak, Tumornekrosefaktor α (TNF-α) oder Diazepam induzieren die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies (RNOS) in kultivierten Astrozyten (Schliess *et al.*, 2004, 2006; Reinehr *et al.*, 2007; Kruzcek *et al.*, 2011; Görg *et al.*, 2003, 2006). Um die Bedeutung von RNOS für die durch NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l), TNF-α (10 ng/ml) oder Diazepam (10 µmol/l) induzierte Astrozytenschwellung zu untersuchen, wurden Volumenmessungen in Anwesenheit des Antioxidans Epigallocatechingallat (EGCG), das sowohl Stickstoffmonoxid, Superoxidanionradikal als auch Peroxynitrit effektiv inaktiviert (Nakagawa *et al.*, 2002), durchgeführt. Wie in Abb. 21 gezeigt, hemmt EGCG dosisabhängig die durch NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l) induzierte Astrozytenschwellung. Während EGCG in einer Konzentration von 1 µmol/l die durch NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l) herbeigeführte Volumenzunahme

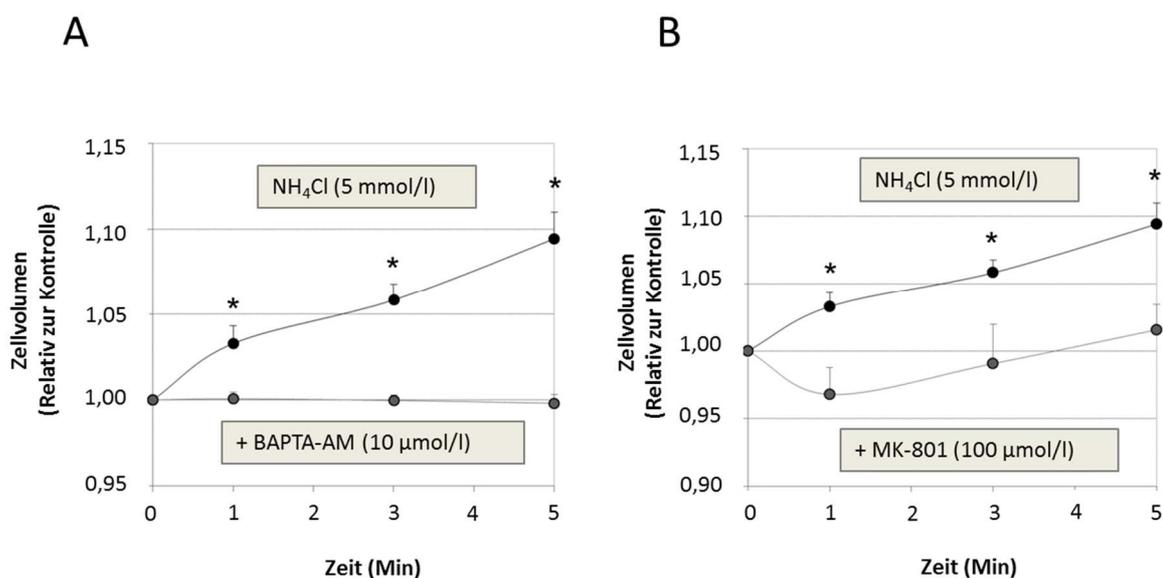
vollständig blockierte, wurde bei einer Konzentration von 100 nmol/l die  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -vermittelte Volumenzunahme um ca. 50 % gehemmt (Abb. 21 A). EGCG hemmte in einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  auch die durch TNF- $\alpha$  oder Diazepam induzierte Volumenzunahme kultivierter Astrozyten vollständig (Abb. 21 B, C). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Diazepam und TNF- $\alpha$  eine rasche Schwellung kultivierter Astrozyten herbeiführen, die durch das Antioxidans EGCG blockierbar ist.



**Abbildung 21: Wirkung von Epigallocatechingallat auf die durch  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , TNF- $\alpha$  oder Diazepam induzierte Zellvolumenerhöhung kultivierter Rattenastrozyten.** Astrozyten wurden für 30 Minuten mit Epigallocatechingallat (entweder 1  $\mu\text{mol/l}$  oder 100 nmol/l) vorbehandelt, bevor die Zellen mit (A)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mmol/l), (B) TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) oder (C) Diazepam (10  $\mu\text{mol/l}$ ) inkubiert wurden. Das Zellvolumen unbehandelter Astrozyten (0 Minuten, Kontrolle) wurde gleich eins gesetzt und Volumenänderungen nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant unterschiedlich zu unbehandelten Kontrollen (aus Lachmann *et al.*, 2013).

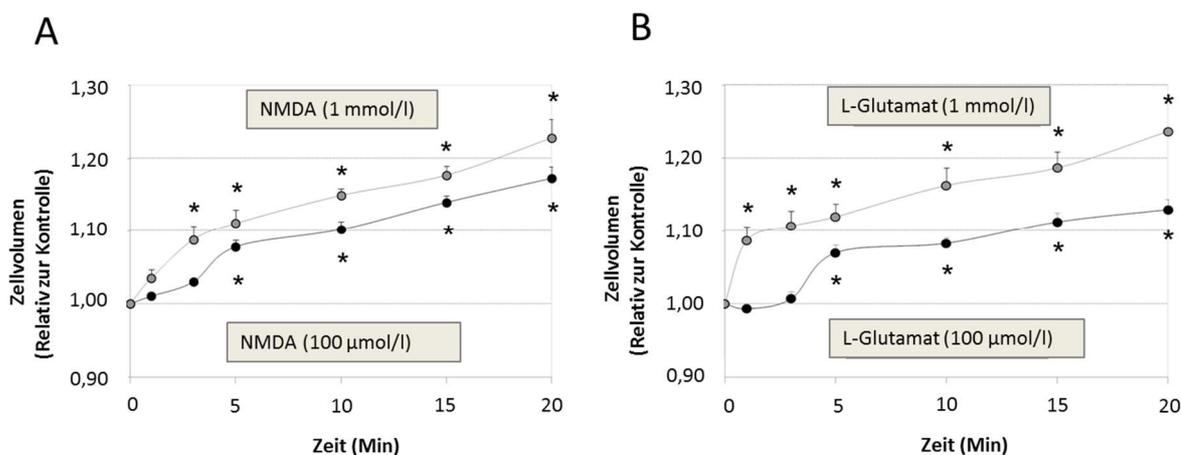
### 3.4 Pharmakologische Charakterisierung der durch Ammoniak induzierten Astrozytenschwellung

Die durch Ammoniak induzierte Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies (RNOS) beruht auf einer NMDA-Rezeptor-Aktivierung und einer Erhöhung der Konzentration intrazellulärer Kalziumionen  $[Ca^{2+}]_i$  (Schliess *et al.*, 2002; Görg *et al.*, 2010a). Um die Bedeutung von NMDA-Rezeptoren und der  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung für die durch  $NH_4Cl$  ausgelöste Zellschwellung zu untersuchen, wurden Volumenmessungen in Anwesenheit eines Kalziumchelators (BAPTA-AM, 10  $\mu mol/l$ ) oder eines NMDA-Rezeptor-Antagonisten (MK801, 100  $\mu mol/l$ ) durchgeführt. Sowohl BAPTA-AM als auch MK801 unterdrückten die durch  $NH_4Cl$  (5  $mmol/l$ ) induzierte Volumenzunahme innerhalb der ersten 5 Minuten nach Inkubation mit  $NH_4Cl$  vollständig (Abb. 22 A, B). 20 Minuten nach Behandlung mit  $NH_4Cl$  (5  $mmol/l$ ) stieg das Astrozytenvolumen gegenüber dem Ausgangsvolumen signifikant um etwa 15 % an (Abb. 24; S. 49).

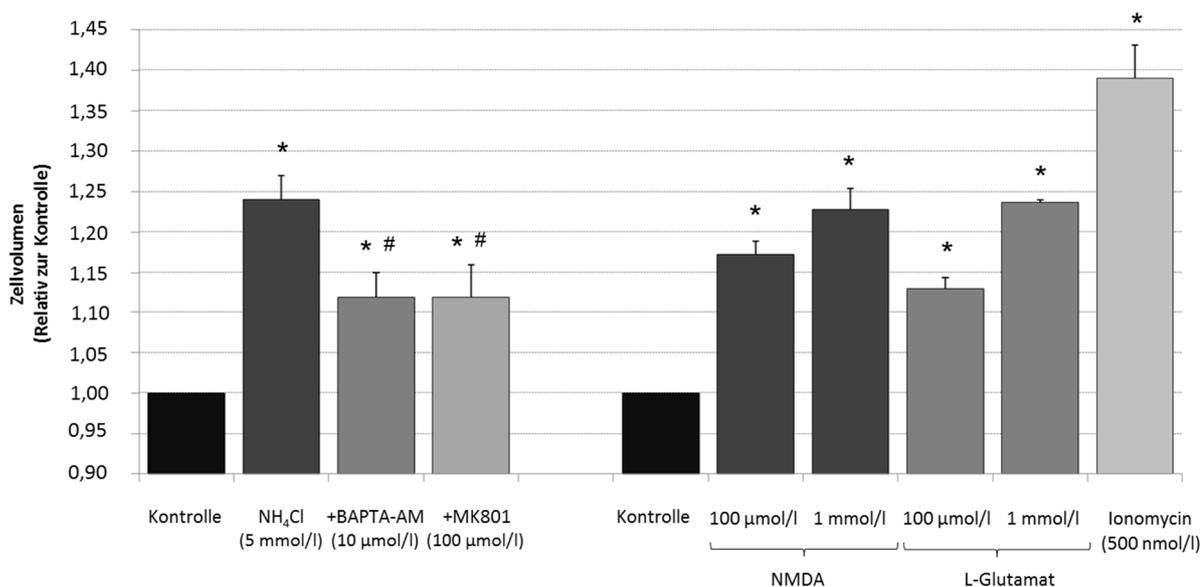


**Abbildung 22: Bedeutung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration und des NMDA-Rezeptors für die durch  $NH_4Cl$  induzierte Astrozytenschwellung.** Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit BAPTA-AM (10  $\mu mol/l$ ) (A) oder MK801 (100  $\mu mol/l$ ) (B) für 30 Minuten vorbehandelt, bevor die Zellen in Gegenwart der jeweiligen Substanz mit  $NH_4Cl$  (5  $mmol/l$ ) stimuliert wurden (A, B). Das Zellvolumen unbehandelter Astrozyten (0 Minuten, Kontrolle) wurde gleich eins gesetzt und Volumenänderungen nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant unterschiedlich zu unbehandelten Kontrollen ( $n \geq 4$ ) (aus Lachmann *et al.*, 2013).

Die Effekte einer intrazellulären Erhöhung der Kalziumionenkonzentration, einer Glutamatfreisetzung und einer NMDA-Rezeptoraktivierung auf das AstrozytENVOLUMEN wurden mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor Ionomycin und den NMDA-Rezeptor-Agonisten N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) und L-Glutamat untersucht (Abb. 23, 24). Eine Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels durch Inkubation der Astrozyten mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor Ionomycin (500 nmol/l) induzierte eine Zellvolumenzunahme gegenüber des Ausgangszellvolumens um ca. 40 % innerhalb von 5 Minuten (Abb. 24). Eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren durch NMDA oder die Inkubation mit L-Glutamat (jeweils 100  $\mu\text{mol/l}$  und 1 mmol/l) steigerte zeit- und konzentrationsabhängig das AstrozytENVOLUMEN um 17 % bzw. 22 % (NMDA 100  $\mu\text{mol/l}$  oder 1 mmol/l) und 13 % bzw. 24 % (L-Glutamat 100  $\mu\text{mol/l}$  oder 1 mmol/l) (Abb. 23, 24). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass  $\text{NH}_4\text{Cl}$  eine rasche Astrozytenschwellung über Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und durch Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  herbeiführt.



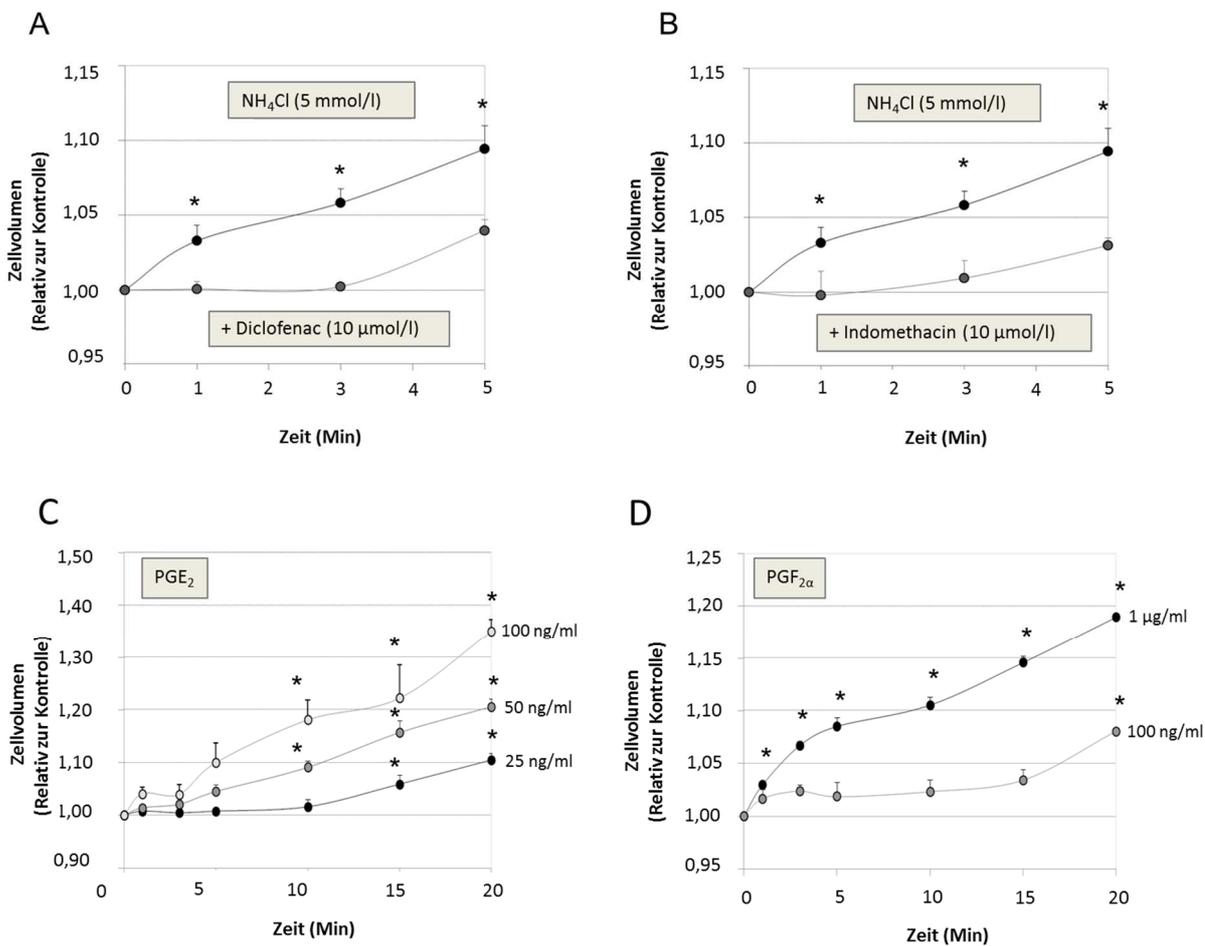
**Abbildung 23: Wirkung von NMDA und Glutamat auf das AstrozytENVOLUMEN.** Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit NMDA (100  $\mu\text{mol/l}$ , 1mmol/l) (A) oder Glutamat (100  $\mu\text{mol/l}$ , 1mmol/l) (B) inkubiert. Das Zellvolumen unbehandelter Astrozyten (0 Min, Kontrolle) wurde gleich eins gesetzt und Volumenänderungen 20 Minuten nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant unterschiedlich zu unbehandelten Kontrollen (n=3) (aus Lachmann *et al.*, 2013).



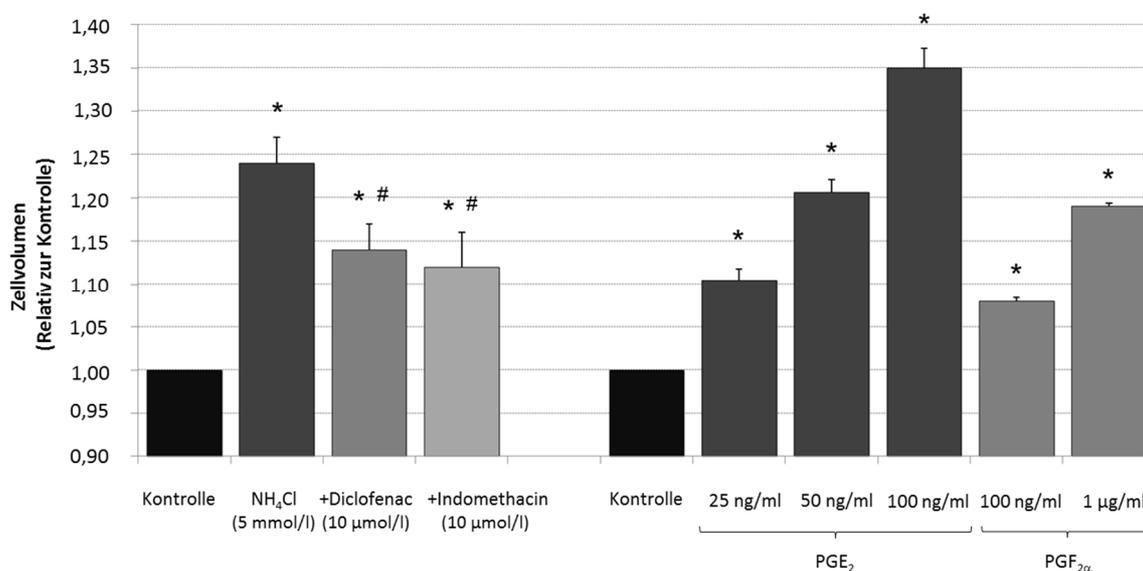
**Abbildung 24: Bedeutung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration und einer NMDA-Rezeptoraktivierung und -Antagonisierung für die durch NH<sub>4</sub>Cl induzierte Astrozytenschwellung.** Relatives Zellvolumen kultivierter Astrozyten 20 Minuten nach Inkubation mit NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l) in An- oder Abwesenheit von BAPTA-AM (10 µmol/l) oder MK-801 (100 µmol/l) oder Behandlung mit NMDA, L-Glutamat (jeweils 100 µmol/l und 1 mmol/l) oder Ionomycin (500 nmol/l). In jedem Experiment wurde das Zellvolumen unbehandelter Astrozyten (0 Minuten, Kontrolle) gleich eins gesetzt und Volumenänderungen 20 Minuten nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant unterschiedlich zu unbehandelten Kontrollen (n≥4). # statistisch signifikant verschieden im Vergleich zur Behandlung mit NH<sub>4</sub>Cl (5mmol/l) (aus Lachmann *et al.*, 2013).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass die durch NH<sub>4</sub>Cl vermittelte Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> über eine prostanoindabhängige Glutamatfreisetzung aus den Astrozyten erfolgt (Görg *et al.*, 2010a). In Experimenten der vorliegenden Dissertation wurden die Zellen mit den Zyklooxygenase-Inhibitoren Indomethacin und Diclofenac behandelt, um einen möglichen Einfluss von Prostanoiden auf die ammoniakinduzierte Astrozytenschwellung zu untersuchen. Wie in Abb. 25 und 26 (S. 50-51) erkennbar, hemmen sowohl Indomethacin als auch Diclofenac (beide 10 µmol/l) die Astrozytenschwellung innerhalb der ersten 3 Minuten nach Inkubation mit NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l) vollständig. 20 Minuten nach Behandlung mit Ammoniak (5 mmol/l) stieg das Astrozytenvolumen signifikant um 10-15 % des Ausgangsvolumens an. Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von Prostanoiden bei der durch Ammoniak induzierten Astrozytenschwellung. In Übereinstimmung hiermit stieg das Zellvolumen nach Behandlung mit den Prostaglandinen E<sub>2</sub> (25 ng/ml, 50 ng/ml, 100

ng/ml) und  $F_{2\alpha}$  (100 ng/ml, 1  $\mu$ g/ml) in kultivierten Astrozyten nach 20 Minuten um bis zu 35 % (Abb. 25 C, D; Abb. 26).

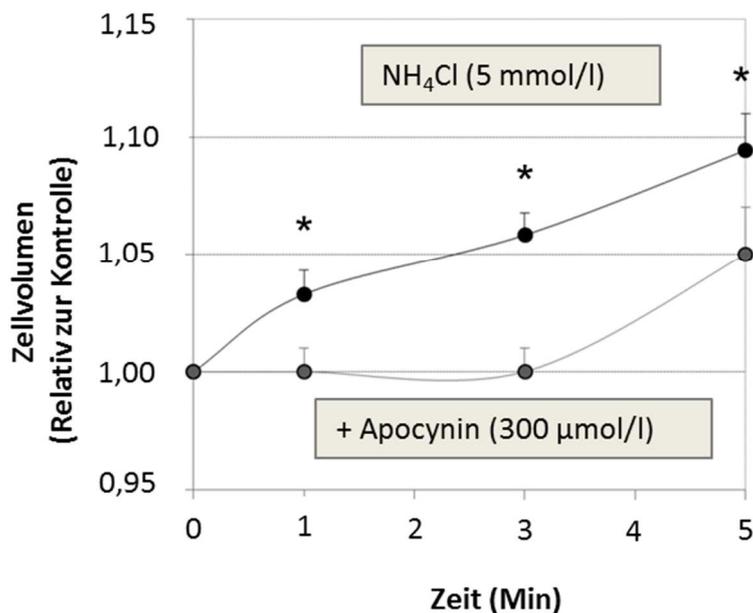


**Abbildung 25: Wirkung von Zycklooxygenaseinhibitoren auf die durch NH<sub>4</sub>Cl induzierte Astrozytenschwellung und Wirkung von Prostanoiden auf das Astrozytenzellvolumen *in vitro*.** Kultivierte Rattenastrozyten blieben entweder unbehandelt oder wurden 30 Minuten lang vorbehandelt mit Diclofenac (A) oder Indomethacin (B) (jeweils 10  $\mu$ mol/l), bevor die Zellen in Gegenwart der entsprechenden Substanzen mit NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l) inkubiert wurden. (C/D) Zellvolumenänderungen in PGE<sub>2</sub> (25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml)- oder PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (100 ng/ml, 1  $\mu$ g/ml)-behandelten Astrozyten. Das Zellvolumen unbehandelter Astrozyten (0 Minuten, Kontrolle) wurde gleich eins gesetzt und Volumenänderungen nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle (n $\geq$ 4) (aus Lachmann *et al.*, 2013).



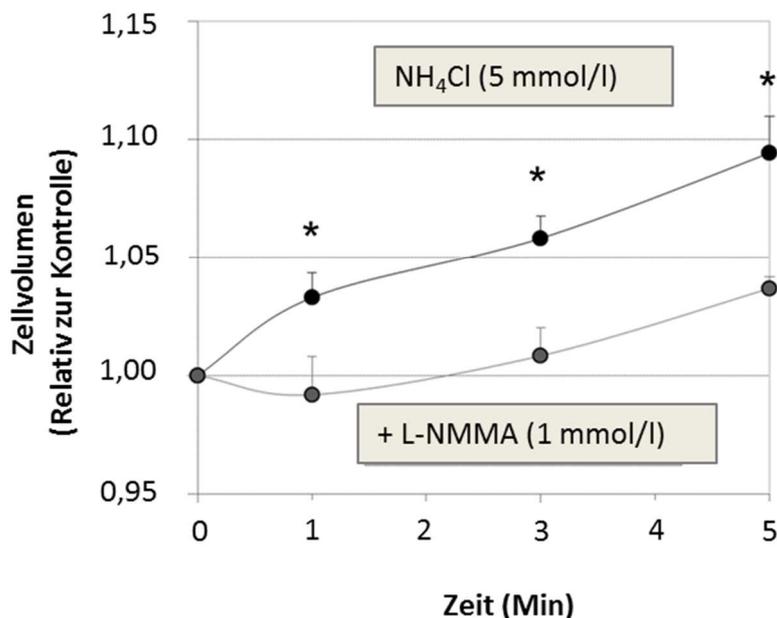
**Abbildung 26: Wirkung von Zykllooxygenaseinhibitoren auf die durch NH<sub>4</sub>Cl induzierte Astrozytenschwellung und Wirkung von Prostanoiden auf das Astrozytenvolumen *in vitro*.** Relatives Zellvolumen kultivierter Astrozyten 20 Minuten nach Inkubation mit NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l) in An- oder Abwesenheit von Diclofenac oder Indomethacin (jeweils 10 µmol/l), oder Behandlung mit Prostaglandin PGE<sub>2</sub> (25, 50, 100 ng/ml) oder PGF<sub>2α</sub> (100ng/ml, 1µg/ml). In jedem Experiment wurde das Zellvolumen unbehandelter Astrozyten (0 Minuten, Kontrolle) gleich eins gesetzt und Volumenänderungen 20 Minuten nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant unterschiedlich zu unbehandelten Kontrollen (n≥4). # statistisch signifikant verschieden im Vergleich zur Behandlung mit NH<sub>4</sub>Cl (5mmol/l) (aus Lachmann *et al.*, 2013).

Eine durch Hypoosmolarität herbeigeführte Zellschwellung wie auch NH<sub>4</sub>Cl induziert in kultivierten Astrozyten die Bildung von RNOS durch Aktivierung von NADPH-Oxidase und der neuronalen NO-Synthaseisoform (Reinehr *et al.*, 2007). Um die Bedeutung der von der NADPH-Oxidase gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies für die durch NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l) induzierte Astrozytenschwellung zu überprüfen, wurden die Zellen mit dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin (300 µmol/l) behandelt. Wie in Abbildung 27 gezeigt, wurde die NH<sub>4</sub>Cl-induzierte Astrozytenschwellung innerhalb der ersten 3 Minuten durch Apocynin vollständig blockiert. 20 Minuten nach Behandlung mit NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l) stieg das Astrozytenvolumen signifikant um 15 % gegenüber dem Ausgangsvolumen an (Abb. 32; S. 57). Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung der NADPH-Oxidase bei der durch NH<sub>4</sub>Cl induzierten Astrozytenschwellung.



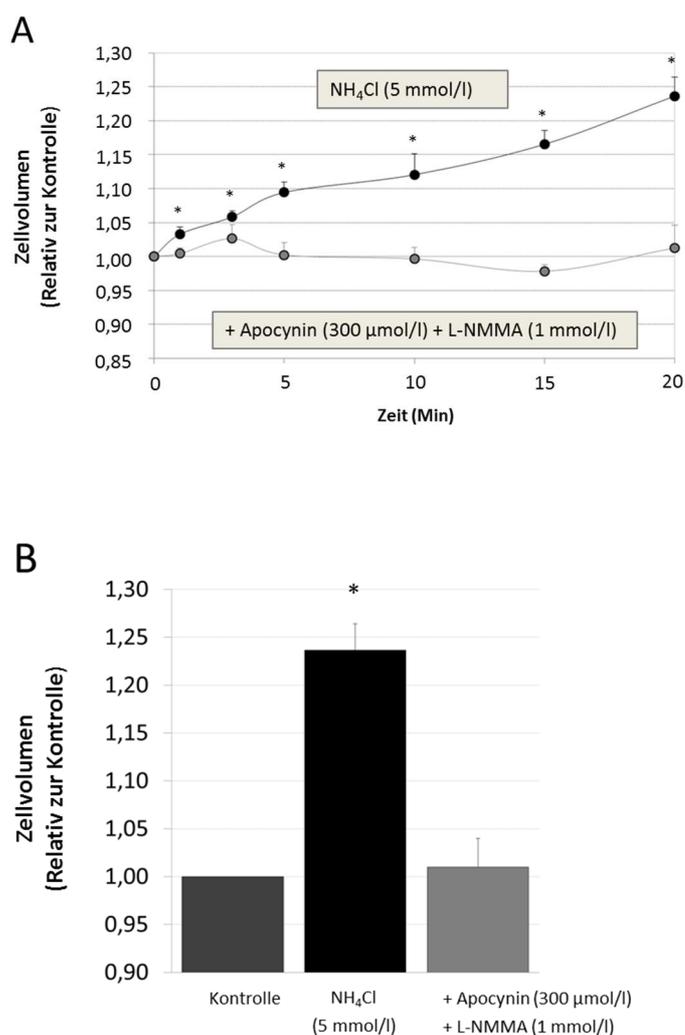
**Abbildung 27: Bedeutung der NADPH-Oxidase für die NH<sub>4</sub>Cl-induzierte Astrozytenschwellung *in vitro*.** Kultivierte Rattenastrozyten blieben entweder unbehandelt oder wurden 30 Minuten lang mit Apocynin (300 µmol/l) vorbehandelt, bevor die Zellen in Gegenwart von Apocynin mit NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l) inkubiert wurden. Das Zellvolumen unbehandelter Astrozyten (0 Minuten, Kontrolle) wurde gleich eins gesetzt und Volumenänderungen nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (n≥4) (aus Lachmann *et al.*, 2013).

Eine Beteiligung des von NO-Synthasen gebildeten Stickstoffmonoxids bei der durch NH<sub>4</sub>Cl vermittelten Astrozytenschwellung wurde unter Verwendung des Breitband NO-Synthaseinhibitors L-NMMA untersucht. Abbildung 28 zeigt, dass die durch NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l) induzierte Astrozytenschwellung innerhalb der ersten 5 Minuten durch L-NMMA (1 mmol/l) gehemmt wurde. 20 Minuten nach Behandlung mit NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l) war das Astrozytenvolumen signifikant auf 112 % des Ausgangsvolumens angestiegen (Abb. 32; S. 57).



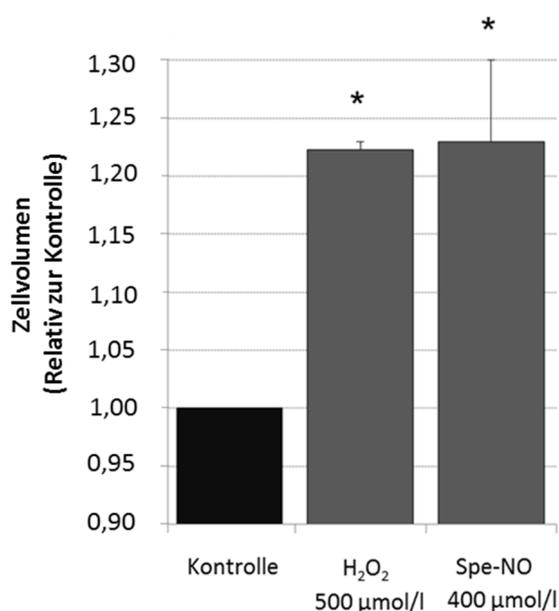
**Abbildung 28: Bedeutung von Stickstoffmonoxid für die NH<sub>4</sub>Cl-induzierte Astrozytenschwellung *in vitro*.** Kultivierte Rattenastrozyten blieben entweder unbehandelt oder wurden 30 Minuten lang mit L-NMMA (1 mmol/l) vorbehandelt, bevor die Zellen in Gegenwart von L-NMMA mit NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l) inkubiert wurden. Das Zellvolumen unbehandelter Astrozyten (0 Minuten, Kontrolle) wurde gleich eins gesetzt und Volumenänderungen nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (n≥4) (aus Lachmann *et al.*, 2013).

Diese Ergebnisse deuten sowohl auf eine Beteiligung von NADPH-Oxidase als auch von NO-Synthasen bei der durch Ammoniak induzierten Astrozytenschwellung. Um die Effekte der NADPH-Oxidase und NO-Synthasen für die NH<sub>4</sub>Cl-induzierte Astrozytenschwellung zu untersuchen, wurden Astrozyten gleichzeitig mit Apocynin (300 µmol/l) und L-NMMA (1 mmol/l) inkubiert. Wie in Abbildung 29 gezeigt, wurde die NH<sub>4</sub>Cl-induzierte Astrozytenschwellung in dem Beobachtungszeitraum von 20 Minuten vollständig in Anwesenheit von Apocynin und L-NMMA gehemmt.



**Abbildung 29: Bedeutung der NADPH-Oxidase und NO-Synthasen für die durch NH<sub>4</sub>Cl induzierte Astrozytenschwellung *in vitro*.** Kultivierte Rattenastrozyten blieben entweder unbehandelt oder wurden 30 Minuten lang mit Apocynin (300 µmol/l) und L-NMMA (1 mmol/l) vorbehandelt, bevor die Zellen in Gegenwart von Apocynin und L-NMMA mit NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l) inkubiert wurden (A/B). Das Zellvolumen der unbehandelten Astrozyten (0 Minuten, Kontrolle) wurde gleich eins gesetzt und Volumenänderungen nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (n≥4) (aus Lachmann *et al.*, 2013).

Von der NADPH-Oxidase gebildete Superoxidradikale können durch die Superoxiddismutase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> überführt werden, in dessen Folge die intrazelluläre Konzentration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ansteigt (Bedard *et al.*, 2007). Daher wurde der Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf das Astrozytenvolumen untersucht. Wie in Abb. 30 gezeigt, steigerte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mmol/l) in einem Beobachtungszeitraum von 20 Minuten das Astrozytenvolumen auf 120 % des Ausgangsvolumens.



**Abbildung 30: Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Spe-NO auf das Zellvolumen kultivierter Rattenastrozyten.** Kultivierte Rattenastrozyten blieben entweder unbehandelt oder wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 µmol/l) oder Spe-NO (400 µmol/l) inkubiert. Das Zellvolumen unbehandelter Astrozyten (0 Minuten, Kontrolle) wurde gleich eins gesetzt und Volumenänderungen nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant unterschiedlich zu unbehandelten Kontrollen (n=3) (aus Lachmann *et al.*, 2013).

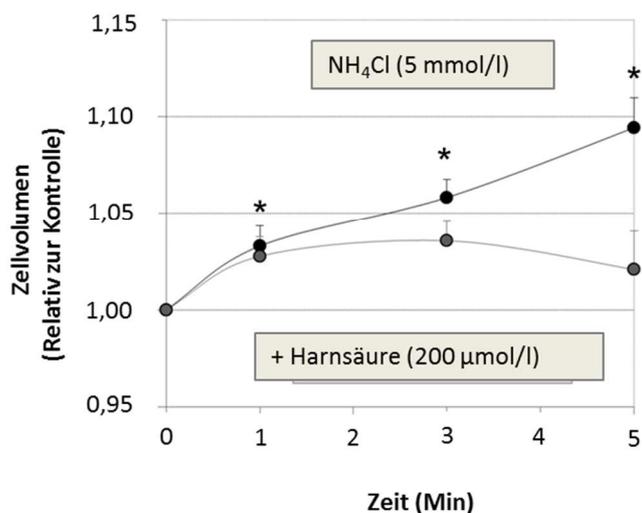
Die Behandlung kultivierter Rattenastrozyten mit dem NO-Donor Spermin-NONOate (Spe-NO, 400 µmol/l) steigerte das Astrozytenvolumen auf 120 % des Ausgangsvolumens innerhalb von 20 Minuten (Abb. 30).

Die Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> steigerte die Laktatdehydrogenase-Aktivität (LDH) im Überstand nicht, was darauf hindeutet, dass die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Astrozytenschwellung nicht auf einem Verlust der Zellintegrität beruht (Tab. 6).

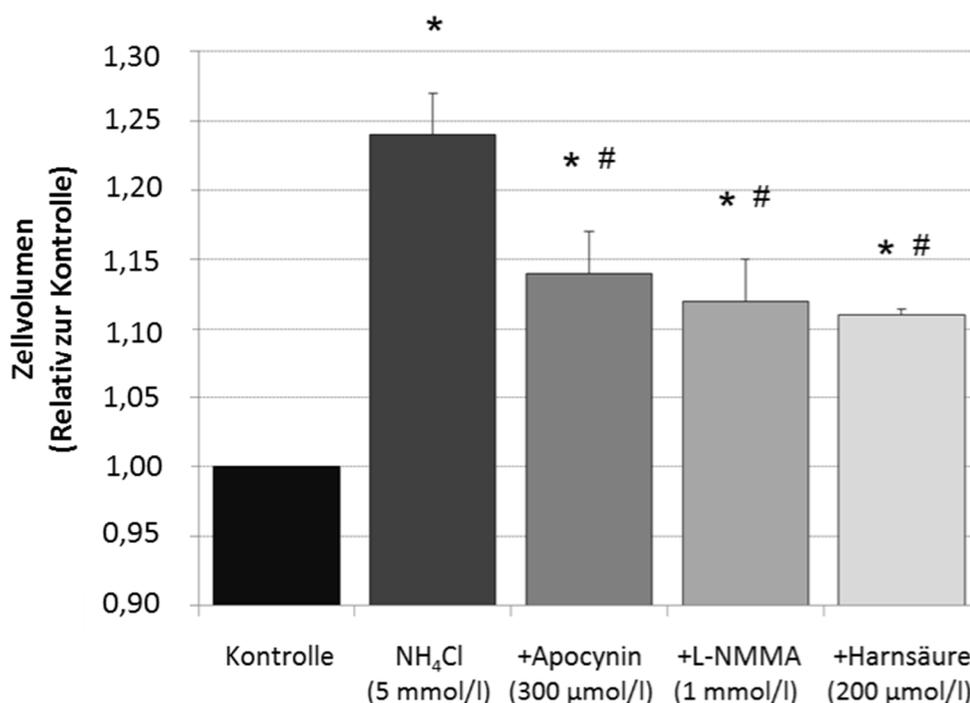
**Tabelle 6: Laktatdehydrogenase-Aktivität im Zellkulturüberstand H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelter Astrozyten.**

| Astrozyten blieben entweder unbehandelt oder wurden mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100 µmol/l, 500 µmol/l, 10 mmol/l) für 20 Minuten inkubiert. Die Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität wurde nachfolgend im Überstand des Zellkulturmediums gemessen. Die LDH-Aktivität im Überstand unbehandelter Zellen wurde gleich eins gesetzt und die LDH-Aktivität nach Behandlung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Relation dazu ausgedrückt. n.s.: nicht signifikant. * : statistisch signifikant im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (n=3) (aus Lachmann <i>et al.</i> , 2013). |  |  |   |
|---|--|--|---|
| Unbehandelt   | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100 µmol/l) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (500 µmol/l) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10 mmol/l) |
| 1   | 0,92±0,16 n.s.                             | 0,87±0,05 n.s.                             | 2,16±0,07*                                |

Superoxid und Stickstoffmonoxid können unter Bildung von Peroxynitrit, welches effektiv durch Harnsäure eingefangen wird, rekombinieren (Crow und Ischiropoulos, 1996). Harnsäure (200  $\mu\text{mol/l}$ ) hemmte die durch  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5  $\text{mmol/l}$ ) induzierte Astrozytenschwellung innerhalb der ersten 5 Minuten vollständig (Abb. 31) und reduzierte die durch  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 Minuten nach Behandlung induzierte Zellvolumenzunahme um 55 % (Abb. 32).



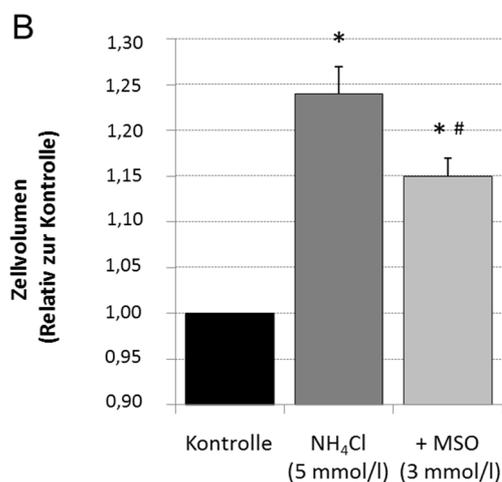
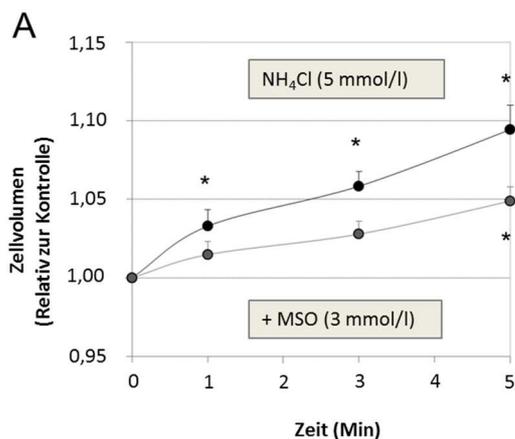
**Abbildung 31: Wirkung von Harnsäure auf die durch  $\text{NH}_4\text{Cl}$  induzierte Astrozytenschwellung *in vitro*.** Kultivierte Rattenastrozyten blieben entweder unbehandelt oder wurden 30 Minuten lang mit Harnsäure (200  $\mu\text{mol/l}$ ) vorbehandelt, bevor die Zellen in Gegenwart von Harnsäure mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5  $\text{mmol/l}$ ) inkubiert wurden. Das Zellvolumen unbehandelter Astrozyten (0 Minuten, Kontrolle) wurde gleich eins gesetzt und Volumenänderungen nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen ( $n \geq 4$ ) (aus Lachmann *et al.*, 2013).



**Abbildung 32: Wirkung von Apocynin, L-NMMA und Harnsäure auf die durch NH<sub>4</sub>Cl induzierte Astrozytenschwellung *in vitro*.** Relatives Zellvolumen kultivierter Astrozyten 20 Minuten nach Inkubation mit NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l) in An- oder Abwesenheit von Apocynin (300 μmol/l), L-NMMA (1 mmol/l) oder Harnsäure (200 μmol/l). In jedem Experiment wurde das Zellvolumen unbehandelter Astrozyten (0 Minuten, Kontrolle) gleich eins gesetzt und Volumenänderungen 20 Minuten nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant unterschiedlich zu unbehandelten Kontrollen (n≥4). # statistisch signifikant verschieden im Vergleich zur Behandlung mit NH<sub>4</sub>Cl (5mmol/l) (aus Lachmann *et al.*, 2013).

Die Behandlung kultivierter Astrozyten mit NH<sub>4</sub>Cl steigert die Glutaminbildung (Jayakumar *et al.*, 2006) und die durch NH<sub>4</sub>Cl induzierte ROS-Bildung kann durch den Glutaminsynthetase-Hemmstoff MSO blockiert werden (Albrecht *et al.*, 2010; Jayakumar *et al.*, 2004; Murthy *et al.*, 2001). Daher wurde die Wirkung von MSO auf die durch NH<sub>4</sub>Cl induzierte Astrozytenschwellung untersucht.

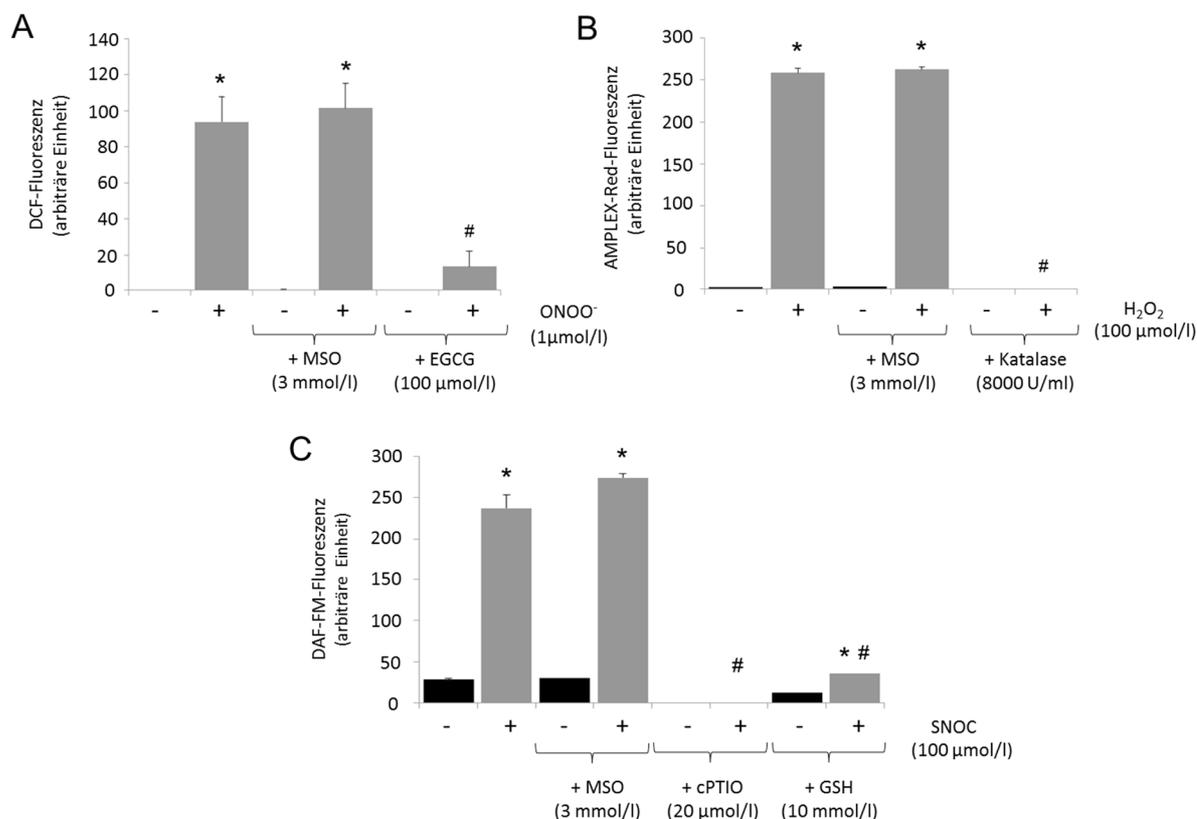
Wie in Abb. 33 gezeigt, wurde die durch Ammoniak induzierte Astrozytenschwellung ebenfalls signifikant durch den Glutaminsynthetasehemmstoff Methioninsulfoximin (MSO, 3 mmol/l) verhindert.



**Abbildung 33: Wirkung des Glutaminsynthetase-Hemmstoffs MSO auf die durch NH<sub>4</sub>Cl induzierte Astrozytenschwellung.** Relatives Zellvolumen kultivierter Astrozyten 20 Minuten nach Inkubation mit NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l) in An- oder Abwesenheit von MSO (3 mmol/l). In jedem Experiment wurde das Zellvolumen unbehandelter Astrozyten (0 Minuten, Kontrolle) gleich eins gesetzt und Volumenänderungen 20 Minuten nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant unterschiedlich zu unbehandelten Kontrollen (n≥4). # statistisch signifikant verschieden im Vergleich zur Behandlung mit NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l) (aus Lachmann *et al.*, 2013).

Um auszuschließen, dass der inhibitorische Effekt von MSO auf die durch Ammoniak induzierte Astrozytenschwellung durch antioxidative Eigenschaften von MSO vermittelt wird, wurde die Reaktivität von Indikatorfarbstoffen, die mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Amplex Red),  $\text{ONOO}^-$  (DCF) oder  $\text{NO}^-$  (DAF-FM) unter Bildung eines Fluoreszenzprodukts reagieren, in Gegenwart von MSO getestet. Die Farbstoffe wurden *in vitro* mit dem jeweiligen Oxidans ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$  oder  $\text{NO}^-$  Donor S-Nitrosocystein (SNOC)) in An- oder Abwesenheit von MSO behandelt und die Fluoreszenzemission fluorimetrisch bestimmt. Wie in Abb. 34 gezeigt, wurde die *in vitro* Oxidation keiner der verwendeten Fluoreszenzindikatoren durch MSO gehemmt, jedoch effektiv verhindert durch Radikalfänger für  $\text{ONOO}^-$  (EGCG),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Katalase) oder  $\text{NO}^-$  (cPTIO, reduziertes Glutathion).

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Hemmung der durch  $\text{NH}_4\text{Cl}$  induzierten Astrozytenschwellung durch MSO nicht auf antioxidativen Eigenschaften von MSO beruht.



**Abbildung 34: Wirkung von Methioninsulfoximin auf die *in vitro*-Oxidation von Fluoreszenzindikatoren reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies.** Dichlorodihydrofluoreszein (DCF, 100  $\mu\text{mol/l}$ ), Amplex Red (50  $\mu\text{mol/l}$ ), Diaminodifluorofluoreszein (DAF-FM, 1  $\mu\text{mol/l}$ ) wurden mit  $\text{ONOO}^-$  (1  $\mu\text{mol/l}$ , 5 Minuten),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{mol/l}$ , 5 Minuten) oder S-Nitrosocystein (SNOC, 100  $\mu\text{mol/l}$ , 60 Minuten) in An- oder Abwesenheit von Methioninsulfoximin (MSO) oder den RNOS-Fängern Epigallocatechingallat (EGCG, 100  $\mu\text{mol/l}$ ), Katalase (8000U/ml), Carboxyphenyltetramethylimidazolinoxyloxid (cPTIO, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) oder reduziertem Glutathion (GSH, 10 mmol/l) inkubiert. Der Fluoreszenzanstieg nach Behandlung mit  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder SNOC ist relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben (aus Lachmann *et al.*, 2013).

Zur Überprüfung von Eigeneffekten der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanzen auf das Zellvolumen kultivierter Rattenastrozyten wurde das Zellvolumen 30 Minuten nach Behandlung mit der jeweiligen Substanz gemessen. Wie in Tab. 7 gezeigt, hatte die Behandlung kultivierter Astrozyten mit den oben beschriebenen Hemmstoffen keinen Effekt auf das Astrozytenzellvolumen *per se*.

**Tabelle 7: Wirkung der in den Experimenten der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanzen auf das Astrozytenzellvolumen *in vitro*.** Kultivierte Rattenastrozyten blieben entweder unbehandelt oder wurden mit der angegebenen Substanz für 30 Minuten inkubiert, bevor das Zellvolumen mittels Volumenmikroskopie gemessen wurde. n.s.: nicht statistisch signifikant im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen ( $n \geq 6$  Zellen von  $n \geq 3$  verschiedenen Astrozytenpräparationen (aus Lachmann *et al.*, 2013). \*: statistisch signifikant unterschiedlich zu unbehandelten Kontrollen. pl: Pikoliter

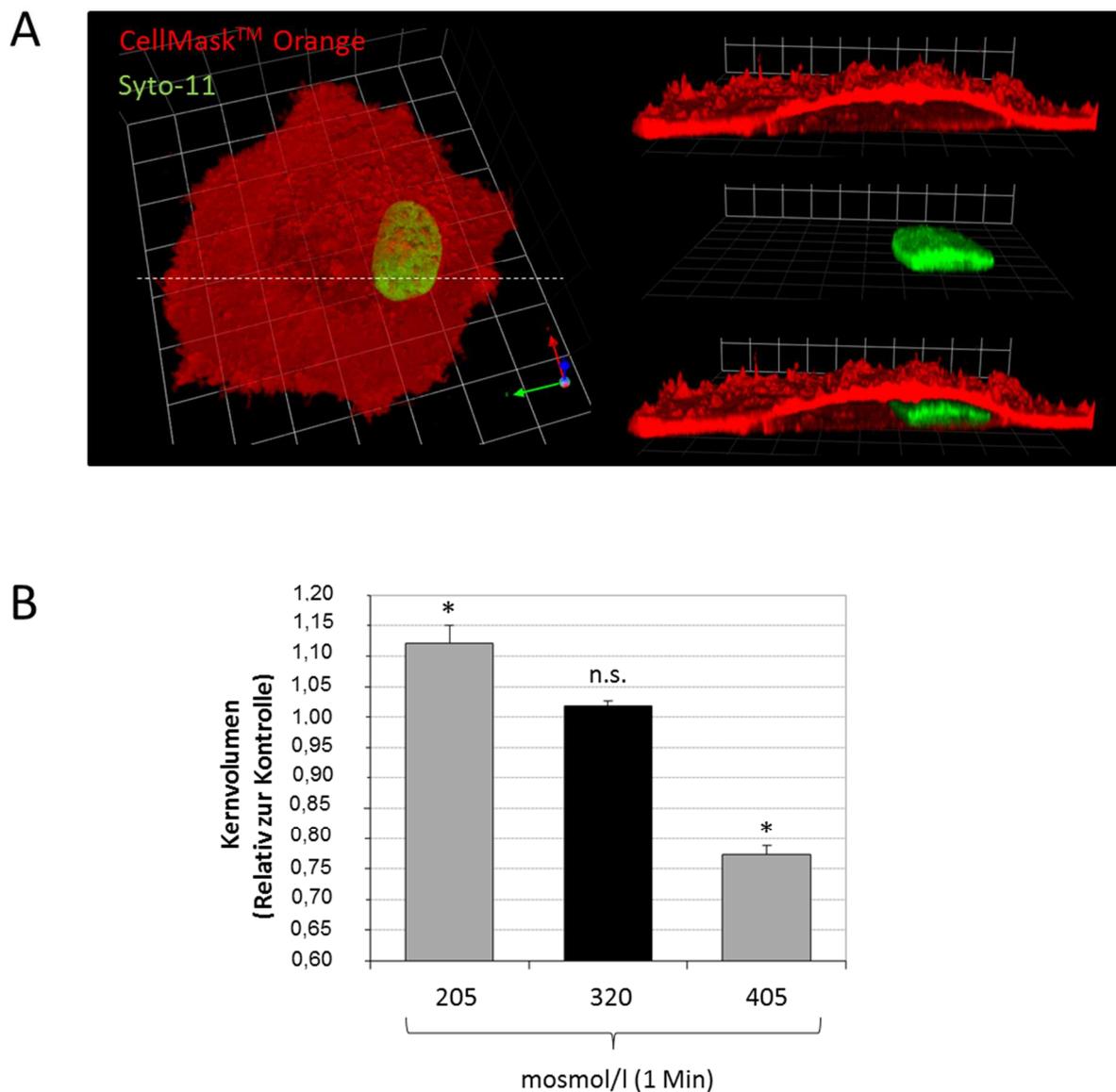
| Behandlung                           | Volumen (pl)         |
|--------------------------------------|----------------------|
| Unbehandelt                          | 5,39 $\pm$ 0,12      |
| BAPTA-AM (10 $\mu\text{mol/l}$ )     | 5,40 $\pm$ 0,47 n.s. |
| Indomethacin (10 $\mu\text{mol/l}$ ) | 4,90 $\pm$ 0,34 n.s. |
| Diclofenac (10 $\mu\text{mol/l}$ )   | 4,74 $\pm$ 0,52 n.s. |
| L-NMMA (1 mmol/l)                    | 5,38 $\pm$ 0,25 n.s. |
| EGCG (1 $\mu\text{mol/l}$ )          | 5,15 $\pm$ 0,43 n.s. |
| EGCG (100 nmol/l)                    | 4,97 $\pm$ 0,38 n.s. |
| Apocynin (300 $\mu\text{mol/l}$ )    | 5,03 $\pm$ 0,20 n.s. |
| MK801 (100 $\mu\text{mol/l}$ )       | 4,92 $\pm$ 0,23 n.s. |
| MSO (3 mmol/l)                       | 5,11 $\pm$ 0,21 n.s. |
| Harnsäure (200 $\mu\text{mol/l}$ )   | 5,65 $\pm$ 0,44 n.s. |
| DMSO (0,1 %)                         | 5,35 $\pm$ 0,47 n.s. |

---

|                      |               |
|----------------------|---------------|
| 405 mosmol/l (1 Min) | 4,32 ± 0,46 * |
| 205 mosmol/l (1 Min) | 7,86 ± 1,37 * |

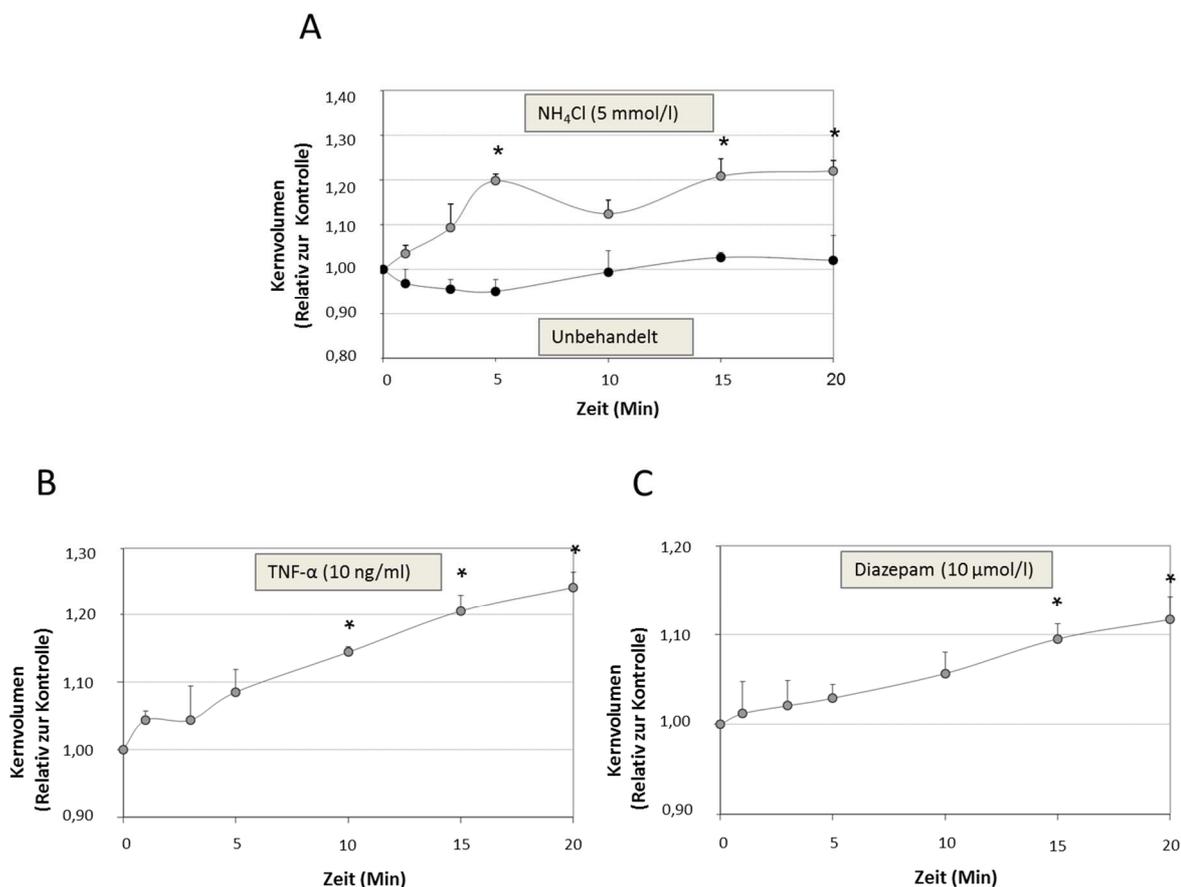
### 3.5 Wirkung HE-auslösender Faktoren auf das Kernvolumen kultivierter Astrozyten

Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten wurden mit Syto<sup>TM</sup>-11 visualisiert und deren Volumen mittels 3D-Volumenmikroskopie quantifiziert (Abb. 35 A). Wie in Abb. 35 B gezeigt erhöhte eine Behandlung der Astrozyten mit hypoosmotischem Zellkulturmedium (205 mosmol/l, 1 Minute) das Kernvolumen signifikant auf etwa 110 % des unter normoosmotischen Bedingungen gegebenen Ausgangsvolumens, während Hyperosmolarität (405 mosmol/l, 1 Minute) das Kernvolumen auf 75-80 % verminderte (Abb. 35 B).



**Abbildung 35: Kernvolumen kultivierter Rattenastrozyten.** Bestimmung des Zellkernvolumens in mit Syto™-11 angefärbten kultivierten Rattenastrozyten durch Volumenmikroskopie. (A) Visualisierung der Zellmembran (CellMask™-Orange) und des Zellkerns (Syto™-11). Die gestrichelte Linie in der linken Bildhälfte deutet auf die Schnittebene, in der die Zelle querschnitten wurde (rechte Bildhälfte). (B) Wirkung einer Behandlung mit hypo- (205 mosmol/l) oder hyperosmotischem (405 mosmol/l) Zellkulturmedium auf das Kernvolumen (1 Minute) (aus Lachmann *et al.*, 2013).

Die Behandlung mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mmol/l),  $\text{TNF-}\alpha$  (10 ng/ml) oder Diazepam (10  $\mu\text{mol/l}$ ) steigerte das Kernvolumen zeitabhängig auf bis zu 120 % des jeweiligen Kontrollvolumens (Abb. 36).

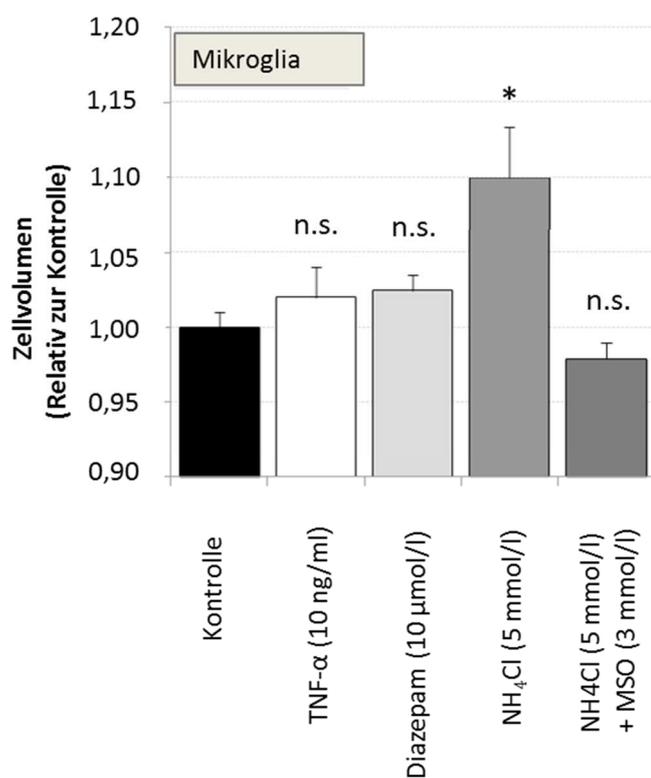


**Abbildung 36: Zeitabhängige Wirkung von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  oder Diazepam auf das Zellkernvolumen kultivierter Rattenastrozyten.** In mit Syto<sup>TM</sup>-11 angefärbten kultivierten Rattenastrozyten wurde das Kernvolumen mit der beschriebenen Volumenmikroskopie analysiert. Wirkung von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mmol/l),  $\text{TNF-}\alpha$  (10 ng/ml) oder Diazepam (10  $\mu\text{mol/l}$ ) auf das Kernvolumen. Das Kernvolumen unbehandelter Astrozyten (Kontrolle, 0 Minuten) wurde gleich eins gesetzt und Volumenänderungen nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant unterschiedlich zu unbehandelten Kontrollen ( $n \geq 4$ ) (aus Lachmann *et al.*, 2013).

### 3.6 Wirkung HE-auslösender Faktoren auf das Zellvolumen kultivierter Mikroglia

Die Wirkung der HE-auslösenden Faktoren  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mmol/l), Diazepam (10  $\mu\text{mol/l}$ ) oder dem *pro*-inflammatorischen Zytokin  $\text{TNF-}\alpha$  (10 ng/ml) wurde in kultivierten Mikroglia untersucht. Innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 20 Minuten hatten  $\text{TNF-}\alpha$  (10 ng/ml) und Diazepam (10  $\mu\text{mol/l}$ ) keinen Einfluss auf das Mikrogliaivolumen (Abb. 37).

Demgegenüber induzierte  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mmol/l, 20 Minuten) einen signifikanten Anstieg des Zellvolumens kultivierter Mikroglia um 10 % des Ausgangsvolumens (Abb. 37, Tab. 8).



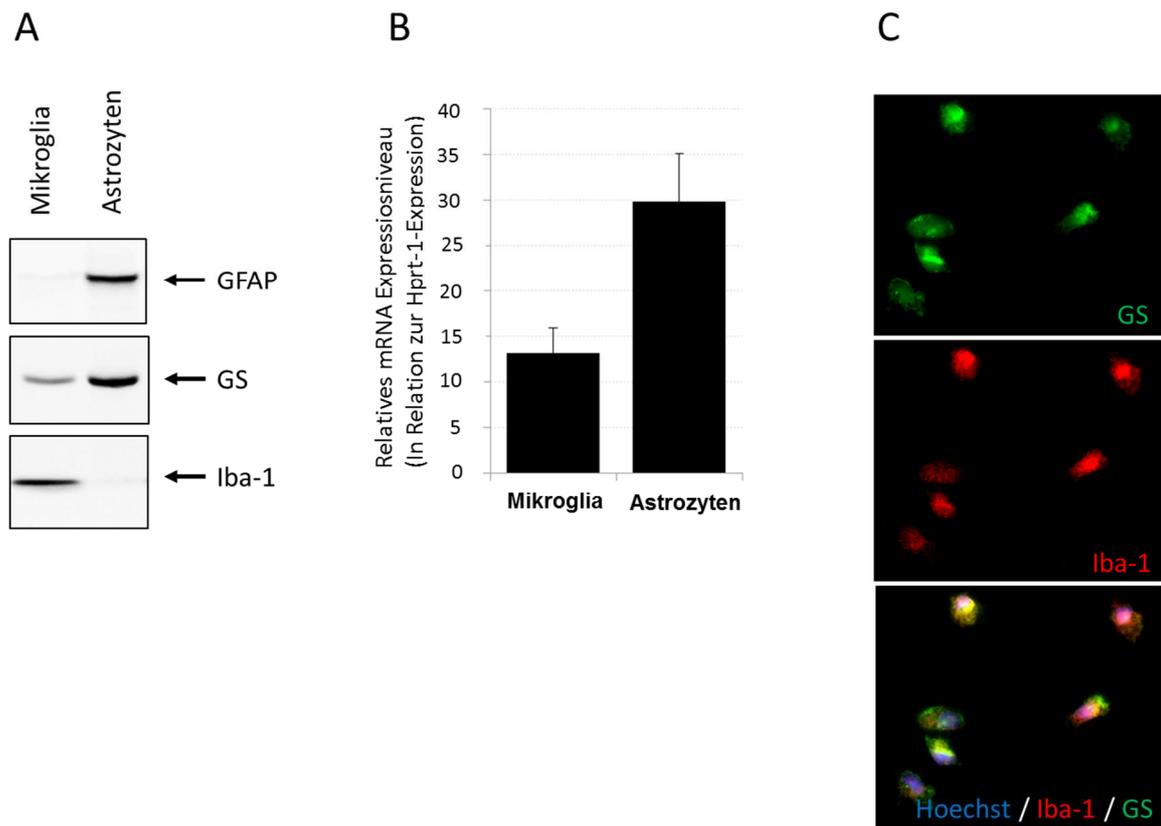
**Abbildung 37: Wirkung HE-relevanter Faktoren auf das Zellvolumen kultivierter Mikroglia.** Kultivierte Rattenmikroglia blieben entweder für 20 Minuten unbehandelt (Kontrolle) oder wurden mit  $\text{TNF-}\alpha$  (10 ng/ml), Diazepam (10  $\mu\text{mol/l}$ ) oder  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mmol/l) für 20 Minuten inkubiert. Wo angegeben, wurden Mikroglia 30 Minuten vor Zugabe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mmol/l, 20 Minuten) mit Methioninsulfoximin (MSO, 3 mmol/l) vorinkubiert. Das Zellvolumen unbehandelter Zellen (0 Minuten, Kontrolle) wurde gleich eins gesetzt und Volumenänderungen nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant unterschiedlich zu Kontrollen (n=3-4). n.s. nicht signifikant (aus Lachmann *et al.*, 2013).

**Tabelle 8: Wirkung von NH<sub>4</sub>Cl auf das Zellvolumen kultivierter Mikroglia.**

Mikroglia aus dem zerebralen Kortex der Ratte wurden auf ibidi<sup>TM</sup>-Schalen ausgesät, mit CellMask<sup>TM</sup>-Orange angefärbt und durch VivaTome<sup>TM</sup>-Fluoreszenzmikroskopie das Zellvolumen zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Das Zellvolumen unbehandelter Mikroglia (0 Minuten, Kontrolle) wurde gleich eins gesetzt und Volumenänderungen nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. \* statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle (n≥4) (aus Lachmann *et al.*, 2013).

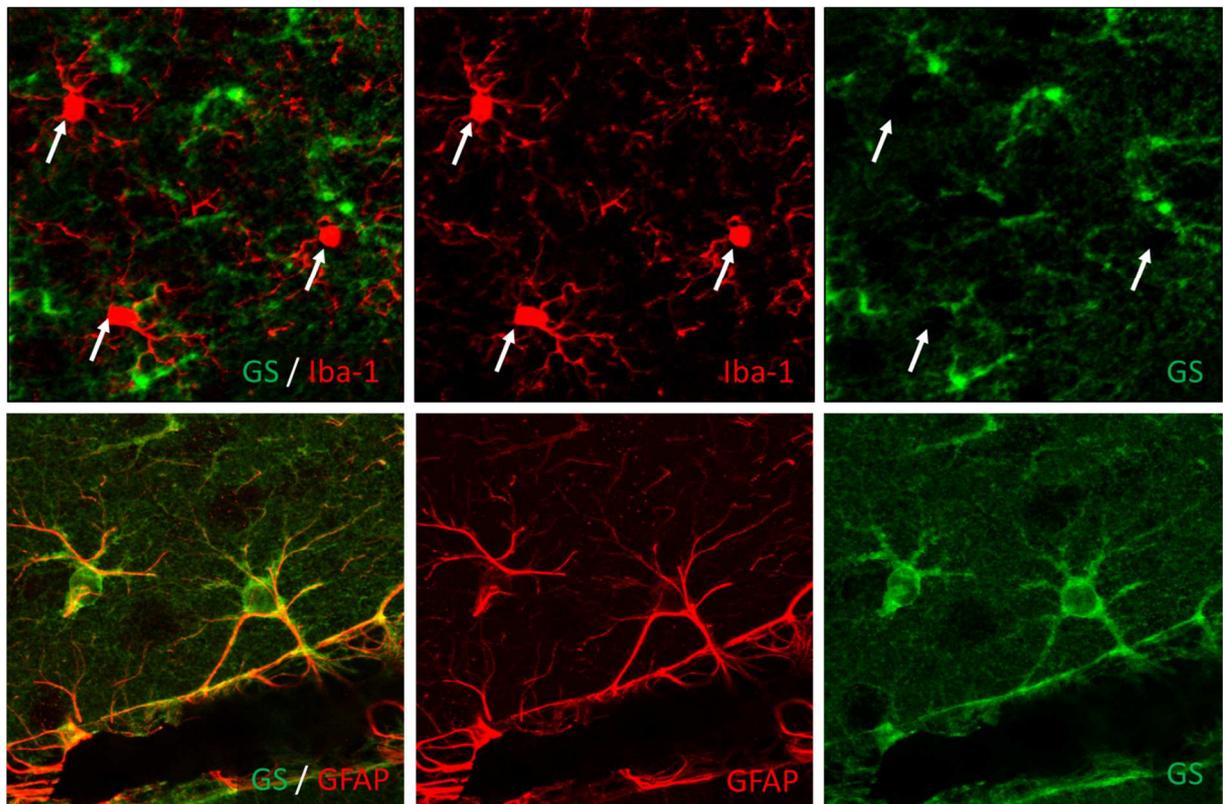
|                  | 0Min | 1Min      | 3Min      | 5Min      | 10Min     | 15Min     | 20Min      |
|------------------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| <b>Mikroglia</b> | 1    | 0,96±0,03 | 0,96±0,05 | 1,00±0,03 | 1,07±0,03 | 1,06±0,01 | 1,10±0,04* |

Die durch NH<sub>4</sub>Cl (5 mmol/l) induzierte Mikrogliaanschwellung ließ sich durch den Glutaminsynthetasehemmstoff Methioninsulfoximin (MSO) unterdrücken (Abb. 37). Daher wurde untersucht, ob Rattenmikroglia Glutaminsynthetase *in vitro* und im Rattenhirn *in vivo* exprimieren. Mittels Realtime-PCR, Western-Blot und Immunfluoreszenzanalyse wurde die GS auf mRNA- und Proteinebene in Mikroglia *in vitro* nachgewiesen (Abb. 38).



**Abbildung 38: Nachweis der Glutaminsynthetase in kultivierten Mikroglia und Astrozyten.** Mikroglia und Astrozyten wurden aus dem zerebralen Kortex der Ratte isoliert und die Glutaminsynthetase-Expression mittels (A) Western-Blot, (B) Realtime-PCR und (C) Immunfluoreszenz-Analyse untersucht. Saures Gliafaserprotein (GFAP) und ionisiertes kalziumbindendes Protein-1 (Iba-1) wurden als Markerprotein von Astrozyten bzw. Mikroglia kodetektiert. GAPDH diente als Beladungskontrolle im Western-Blot. Zellkerne wurden mit Hoechst34580 angefärbt (C) (aus Lachmann *et al.*, 2013).

Im zerebralen Rattenkortex konnte hingegen keine GS-Immunreaktivität in Iba1-positiven Mikroglia nachgewiesen werden. Eine ausgeprägte Anti-GS-Immunreaktivität wurde in GFAP-positiven Astrozyten im Rattenhirn *in situ* gefunden (Abb. 39).



**Abbildung 39: Immunfluoreszenzanalyse von GFAP, Iba-1 und GS im Rattenhirn.** Immunfluoreszenz-Analyse der Glutaminsynthetase (GS, grün)-Expression im zerebralen Kortex der Ratte. Mikroglia und Astrozyten wurden mit Iba-1 (rot) bzw. saurem Gliafaserprotein (GFAP, rot) angefärbt (aus Lachmann *et al.*, 2013).

### 3.7 Wirkung HE-auslösender Faktoren auf das Zellvolumen kultivierter Neurone

Keine signifikanten Zellvolumenänderungen wurden in mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mmol/l) behandelten kultivierten Neuronen aus dem zerebralen Rattenkortex innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 20 Minuten beobachtet (Tab. 9).

**Tabelle 9: Wirkung von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  auf das Zellvolumen kultivierter Neurone.**

|                | 0Min | 1Min      | 3Min      | 5Min      | 10Min     | 15Min     | 20Min     |
|----------------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Neurone</b> | 1    | 0,86±0,05 | 0,95±0,05 | 0,93±0,06 | 0,93±0,06 | 0,90±0,04 | 0,87±0,09 |

## 4. Diskussion

### 4.1 Wirkung HE-relevanter Faktoren auf das Astrozytenzellvolumen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe eines 3D-Volumenmikroskopieransatzes durch HE-relevante Faktoren ausgelöste Zellvolumenänderungen zeit- und konzentrationsabhängig zu untersuchen und der Zellschwellung zugrundeliegende Mechanismen in vitalen Astrozyten unter besonderer Berücksichtigung von oxidativ/nitrosativem Stress zu charakterisieren.

Ausgangspunkt der Untersuchungen waren Befunde aus der Arbeitsgruppe von Professor Häussinger, die darauf hindeuten, dass osmotischer und oxidativer Stress einen Konvergenzpunkt für die Wirkung HE-relevanter Faktoren wie  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , *pro*-inflammatorischer Zytokine, Benzodiazepine und Hypoosmolarität darstellen (Görg *et al.*, 2003, 2006; Kruczek *et al.*, 2009; Kruczek *et al.*, 2011; Reinehr *et al.*, 2007; Schliess *et al.*, 2002; Schliess *et al.*, 2004).

Da eine hypoosmotisch-vermittelte Astrozytenschwellung *per se* die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies (RNOS) auslöst (Schliess *et al.*, 2004) und diese wiederum eine Zellschwellung induzieren können, postulierte Professor Häussinger, dass osmotischer Stress und die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies sich wechselseitig verstärken und hierüber astrogliale und neuronale Funktionen gestört und oszillatorische Netzwerke beeinträchtigt werden (Häussinger und Schliess, 2008; Häussinger und Sies, 2013; Schliess *et al.*, 2006).

In Übereinstimmung mit der von Professor Häussinger aufgestellten Schwellungshypothese zur Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie zeigt die vorliegende Arbeit, dass die HE-relevanten Faktoren Ammoniak, die *pro*-inflammatorischen Zytokine  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IFN-}\gamma$  und das Benzodiazepin Diazepam über die Bildung von RNOS eine rasch einsetzende Astrozytenschwellung induzieren. Die Arbeit belegt damit die Annahme, dass oxidativem Stress für die Induktion der Astrozytenschwellung bei HE eine wichtige Rolle zukommt (Häussinger und Schliess, 2008; Häussinger und Sies, 2013; Schliess *et al.*, 2006).

Da HE-induzierende Faktoren synergistisch wirken bei der Induktion von oxidativem Stress (Görg *et al.*, 2003; Häussinger und Schliess, 2008), ist es denkbar, dass sie auch synergistisch eine Zellvolumenzunahme der Astrozyten bedingen. In der vorliegenden Arbeit

wurden synergistische Wirkungen HE-relevanter Faktoren auf Zellvolumenänderungen nicht untersucht.

Die Autoren Rama Rao *et al.* zeigten jedoch, dass die Langzeitbehandlung kultivierter Astrozyten mit Ammoniak (5 mmol/l) und den *pro*-inflammatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  (jeweils 10 ng/ml) synergistisch das Astrozytenzellvolumen erhöhen kann (Rama Rao *et al.*, 2010): Während sowohl Ammoniak und *pro*-inflammatorische Zytokine in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit alleinig das Astrozytenzellvolumen erhöhen, wurde bei gleichzeitiger Behandlung mit Ammoniak und *pro*-inflammatorischen Zytokinen kein additiver Effekt auf die Zellvolumenzunahme beobachtet. Wurden die Astrozyten hingegen 24 Stunden lang mit Ammoniak vorbehandelt und nachfolgend *pro*-inflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ +IL-1 $\beta$ +IL6+IFN- $\gamma$ ) zugegeben und für weitere 24 Stunden inkubiert, kam es zu einer Verdreifachung des Astrozytenvolumens (129 %) im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Ammoniak oder Zytokinen. Die Autoren erklären diesen Befund dadurch, dass Ammoniak und *pro*-inflammatorische Zytokine synergistisch NF- $\kappa$ B aktivieren und hierüber eine Astrozytenschwellung induziert wird. Über welchen Mechanismus Ammoniak über Aktivierung von NF- $\kappa$ B eine Astrozytenschwellung bewirkt, ist derzeit unklar. Bekannt ist aber, dass NF- $\kappa$ B die Gentranskription der induzierbaren NO-Synthase steigert (Griscavage *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1994) und die Zyklus-oxygenase-2 aktiviert (Chun *et al.*, 2004; Crofford *et al.*, 1997).

Da sowohl Prostanoiden wie auch NO eine Zellschwellung induzieren können (diese Arbeit, Lachmann *et al.*, 2013), könnte eine synergistische Expressionssteigerung von iNOS und COX<sub>2</sub> durch Ammoniak und *pro*-inflammatorische Zytokine ebenfalls die Schwellung synergistisch verstärken. In Einklang mit dieser Vermutung steigert die Behandlung kultivierter Astrozyten mit NH<sub>4</sub>Cl und IL-1 $\beta$  das Expressionsniveau der iNOS-mRNA synergistisch gegenüber der alleinigen Behandlung mit NH<sub>4</sub>Cl oder IL-1 $\beta$  (Chastre *et al.*, 2010).

In Übereinstimmung damit zeigt die Arbeit von Rama Rao *et al.*, dass eine Vorinkubation der Astrozyten mit Ammoniak die durch *pro*-inflammatorische Zytokine induzierbare NF- $\kappa$ B-Aktivierung potenziert (Rama Rao *et al.*, 2010).

Unklar bleibt jedoch, ob eine Astrozytenzellvolumenzunahme von bis zu 130 % auch *in vivo* auftreten kann. Auch die Eignung der von den Autoren verwendeten Volumen-

messtechnik, bei der der Zucker 3-O-Methyl-D-Glukose (3-OMG) als radioaktiv markierter Tracer verwendet wird, ist in diesem Zusammenhang unklar, da sowohl Ammoniak (Desjardins *et al.*, 2001) als auch Zytokine (Bédard *et al.*, 1997; Shikhman *et al.*, 2001) den Glukosetransport modulieren können.

Die vorliegende Arbeit zeigt weiterhin, dass eine Aktivierung des peripheren Benzodiazepinrezeptors durch Diazepam eine Astrozytenschwellung induziert (Abb. 19, 20; S. 44, 45). Demgegenüber bewirkte der Agonist des zentralen Benzodiazepinrezeptors Clonazepam keine Zellvolumenzunahme (Abb. 19; S. 44). Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass der zentrale Benzodiazepinrezeptor in Astrozyten nicht exprimiert wird (Bender and Norenberg, 1998) und dessen Ligand Clonazepam im Gegensatz zu Diazepam keine RNOS-Synthese in Astrozyten triggert (Görg *et al.*, 2003; Jayakumar *et al.*, 2002).

Kongruent zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit beobachteten Bender *et al.*, dass Diazepam, welches sowohl den peripheren als auch den zentralen Benzodiazepinrezeptor stimuliert, eine Zunahme des Astrozytenzellvolumens um 11-17 % nach 2 und 3 Tagen bewirkt (Bender und Norenberg, 1998). Die Arbeit von Bender *et al.* zeigt außerdem, dass spezifische Agonisten des PBR (Ro5-4864, DBI<sub>51-70</sub>, Octadecaneuropeptid) die ammoniak-induzierte Astrozytenschwellung nach 2 und 3 Tagen verstärken. Diese Ergebnisse weisen auf einen synergistischen Mechanismus bei der Induktion der Astrozytenschwellung durch Ammoniak und einer Aktivierung des peripheren Benzodiazepinrezeptors hin. Wurden die Astrozyten mit Flumazenil, einem Antagonisten des zentralen Benzodiazepinrezeptors behandelt, beobachteten die Autoren keine Änderung des Astrozytenvolumens (Bender und Norenberg, 1998).

Die molekularen Mechanismen, durch die Benzodiazepine oder *pro*-inflammatorische Zytokine eine Astrozytenschwellung auslösen, sind nicht verstanden. Die vorliegende Arbeit zeigt nun, dass die durch das Benzodiazepin Diazepam und *pro*-inflammatorische Zytokine auslösbare Astrozytenschwellung vollständig durch das Antioxidans EGCG unterdrückt wird (Abb. 21; S. 46). Diese Ergebnisse weisen auf eine wichtige Rolle von oxidativem Stress für die durch Diazepam und *pro*-inflammatorische Zytokine induzierte, rasch einsetzende Astrozytenschwellung.

#### **4.2 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der durch Ammoniak induzierten Astrozytenschwellung**

Es ist allgemein anerkannt, dass Ammoniak ein Schlüsseltoxin für die Pathogenese der HE ist (Butterworth *et al.*, 1987; Albrecht und Norenberg, 2006) und in die Ausbildung eines geringgradigen glialen Ödems bei HE involviert ist (Häussinger, 1994; Häussinger *et al.*, 2000; Häussinger, 2006).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine nahezu sofortig einsetzende, zeit- und konzentrationsabhängige Volumenzunahme kultivierter Rattenastrozyten nach Behandlung mit Ammoniak (Abb. 17; S. 41-42). Demgegenüber konnte in Untersuchungen unter Verwendung der Kletziens-Technik eine durch Ammoniak induzierte Astrozytenschwellung erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt (12-48 Stunden) festgestellt werden (Jayakumar, 2006; Jayakumar *et al.*, 2006; Pichili *et al.*, 2007; Rama Rao *et al.*, 2003).

Die Kletziens-Zellvolumenmessung bietet verglichen mit der VivaTome-Mikroskopie eine deutlich geringere zeitliche Auflösung. Rasche Zellvolumenänderungen, die innerhalb von wenigen Minuten erfolgen, können mit Hilfe dieser Technik nicht erfasst werden (Kapitel 2.2.11; S. 27) (Walz, 1999).

Während in der vorliegenden Arbeit bereits nach 1 Minute nach Behandlung mit 5 mmol/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$  eine geringfügige, aber signifikante Volumenzunahme um etwa 4 % beobachtet wurde (Abb. 17; S. 41-42), fanden Rama Rao *et al.*, und Jayakumar *et al.*, unter Verwendung der Kletziens-Technik 30 Minuten nach Stimulation mit Ammoniak keine Zunahme des Astrozytenzellvolumens (Jayakumar *et al.*, 2006; Rama Rao *et al.*, 2003). Demgegenüber wurde in verschiedenen Untersuchungen unter Verwendung der Kletziens-Technik eine Zellvolumenzunahme mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mmol/l) behandelter Astrozyten zwischen 41 % bis zu 127 % innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 12 Stunden bis zu 3 Tagen beschrieben (Jayakumar, 2006; Jayakumar *et al.*, 2006; Pichili *et al.*, 2007; Rama Rao *et al.*, 2003). Die Angaben zu der durch  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mmol/l) induzierten Zellvolumenzunahme kultivierter Astrozyten, die nach 24 Stunden beobachtet wurde, schwankten zwischen 100 % (Rama Rao *et al.*, 2003) und 59 % (Jayakumar *et al.*, 2006) oder 44 % (Pichili *et al.*, 2007). Nach 12 Stunden wurde in mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mmol/l) behandelten Astrozyten keine (Jayakumar, 2006) oder eine 50 %ige Zunahme des Astrozytenzellvolumens unter Verwendung der Kletziens-Technik beobachtet (Rama Rao *et al.*, 2003).

Diese heterogenen Befunde zur Kinetik der durch Ammoniak induzierten Astrozytenschwellung könnten technische Ursachen haben oder können auf unterschiedliche Eigenschaften der individuellen primären Rattenastrozytenkulturen zurückzuführen sein.

Veränderungen des intrazellulären pH-Werts können die Aktivität von Glukosetransportern und die Aufnahme von Glukose beeinträchtigen (Kristiansen *et al.*, 1994). Daher ist es denkbar, dass die durch Ammoniak sofortig einsetzenden pH-Wert-Änderungen in Astrozyten die Aufnahme von radioaktiv markiertem 3-OMG beeinträchtigen.

Daüberhinaus ist die N-Glykosylierung des Glukosetransporters GLUT-1 bedeutsam für seine Aktivität (Asano *et al.*, 1991). Da Ammoniak die N-Glykosylierung von Proteinen beeinträchtigt (Görg *et al.*, 2015; Jördens *et al.*, 2015; Sobczyk *et al.*, 2015), kann spekuliert werden, dass dies auch einen Effekt auf den Glukosetransport ausübt.

Auch die Expression von Glukosetransportern könnte durch Ammoniak beeinflusst werden. So konnten Desjardins *et al.* zeigen, dass eine durch hepatische Devaskularisation erzeugte systemische Hyperammoniämie die Expression von GLUT-1 in Astrozyten im Gehirn steigert (Desjardins *et al.*, 2001).

Die Eignung der Kletziens-Technik für die Messung von Zellvolumenveränderungen wurde bereits von anderen Autoren kritisch hinterfragt: So beobachteten Faff-Michalak *et al.* sowohl in mit Ammoniumchlorid als auch mit hypoosmotischem Medium behandelten Astrozyten eine rasche Freisetzung des Osmolyts Taurin (Faff-Michalak *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu mit hypoosmotischem Medium behandelten Astrozyten der Retina, gelang es den Autoren nicht, Volumenänderungen in mit Ammoniumchlorid behandelten Zellen mit der Kletziens-Technik zu messen. Die Autoren führten dies auf eine unspezifisch in der Probe verbliebene Radioaktivität zurück (Faff-Michalak *et al.*, 1994).

Isaacks *et al.* fanden, dass Ammoniak nach 6 Stunden den *Myo*-Inositolgehalt kultivierter Astrozyten signifikant verminderte (Isaacks *et al.*, 1999). Zu diesem Zeitpunkt konnte mit der Kletziens-Technik jedoch keine Zellvolumenänderung festgestellt werden. Dabei muss bedacht werden, dass die Freisetzung von Osmolyten in mit Ammoniak behandelten Astrozyten die osmotische Imbalance kompensiert haben könnte.

Es wurde vermutet, dass hohe Zellvolumenzunahmen von bis 50-130 % erforderlich sind, um den Pathomechanismus der HE auszulösen (Jayakumar, 2006; Norenberg *et al.*, 2005; Rama Rao *et al.*, 2003). Diese Vermutung erscheint unplausibel, da derartig hohe

Volumenzunahmen der Astrozyten den Hirndruck stark ansteigen ließen und eine Kompression des Hirnstamms herbeiführten. Darüberhinaus sind bereits geringfügige Volumenänderungen von wenigen Prozent ausreichend für die Initiierung osmotischer Signalkaskaden in verschiedenen Zelltypen (Schliess und Häussinger, 2003).

Im Vergleich zu der Kletziens-Technik kann die VivaTome<sup>TM</sup>-Volumenmikroskopie Volumenänderungen nicht nur sehr rasch und dynamisch erfassen, sondern auch das Volumen einzelner Zellen messen. Die Kletziens-Technik kann hingegen Volumenänderungen nur in einer gesamten Population und nur indirekt durch Kalkulation des 3-O-Methyl-D-Glukose-Gehalts der Zellen erfassen. Da bei der VivaTome<sup>TM</sup>-Volumenmikroskopie Volumenänderungen einzelner Zellen erfasst werden können, wird es möglich zu erkennen, ob innerhalb der Astrozytenkultur Subpopulationen vorhanden sind, die gegenüber anderen in der Kultur vorhandenen Astrozyten verschiedenartig reagieren. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit reagierten die Astrozyten jedoch einheitlich mit einer Zellvolumenzunahme auf die Stimulation mit Ammoniumchlorid.

In Übereinstimmung mit den in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten zeigen Untersuchungen anderer Autoren unter Verwendung von fluoreszenzfarbstoffbasierten Zellvolumenesstechniken, dass Ammoniak innerhalb von Minuten eine Schwellung kultivierter Astrozyten oder Astrozytomzellen hervorruft (Alvarez-Leefmans *et al.*, 2006; Andersson *et al.*, 2009; Reinehr *et al.*, 2007).

Alvarez-Leefmans *et al.* und Reinehr *et al.* haben hierfür den Fluoreszenzfarbstoff BCECF verwendet und die durch Wassereinstrom vermittelten Konzentrationserniedrigungen des intrazellulär eingeschlossenen Fluoreszenzfarbstoffs an seinem isosbestischem Punkt beobachtet (Alvarez-Leefmans *et al.*, 2006; Reinehr *et al.*, 2007). Bei Beobachtung eines definierten Bereiches in einer Zelle (*Region Of Interest*) stellten die Autoren nach Ammoniakbehandlung durch die Zellschwellung und damit einhergehender Verdünnung des Farbstoffs eine Abschwächung des Fluoreszenzsignals fest. Wurde jedoch die Fluoreszenz der gesamten Zelle erfasst, fanden die Autoren nach Ammoniakbehandlung kein verändertes Fluoreszenzsignal gegenüber unbehandelten Kontrollen. Dies bedeutet, dass der Abfall der Farbstoffkonzentration im „*Region Of Interest*“ nach Ammoniakbehandlung nicht Folge einer Freisetzung des Farbstoffs aus der Zelle ist. Bei einer Ammoniakkonzentration von 20 mmol/l beobachteten Alvarez-Leefmans *et al.* innerhalb von weniger als 10 Minuten eine

Volumenzunahme von 6 %. In Übereinstimmung mit Leefmanns *et al.* beobachteten Reinehr *et al.* unter Verwendung der gleichen Messtechnik eine durch 5 mmol/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$  induzierte, innerhalb von 10 Minuten rasch einsetzende Astrozyschwellung (Reinehr *et al.*, 2007).

Auch die Ergebnisse von Andersson *et al.*, welche an Stelle von BCECF den Fluoreszenzfarbstoff und Kalziumchelator Fura-2 verwendeten, konnten eine durch Ammoniak induzierte Volumenzunahme innerhalb von 30 Minuten bestätigen (Andersson *et al.*, 2009). Fura-2 bindet freie Kalziumionen und bei Anregung am isosbestischen Punkt ist die Fura-Fluoreszenz unabhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration und kann daher herangezogen werden zur Erfassung von Farbstoffverdünnungseffekten in der Zelle (Grynkiewicz *et al.*, 1985). In den Experimenten von Andersson *et al.* erfolgten die Volumenmessungen jedoch nicht an Einzelzellen, sondern an einem nahezu konfluenten, auf Deckgläsern ausgesäten Astrozytenlayer. Dabei war der Abstand zwischen den einzelnen Zellen groß genug, um die Zellgrenzen zu identifizieren. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit fanden Andersson *et al.* ebenfalls eine rasche einsetzende durch Ammoniumchlorid induzierbare Volumenzunahme: 30 Minuten nach Behandlung mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mmol/l) beobachteten sie auf 35 % der untersuchten Deckgläser eine signifikante Zunahme geschwollener Astrozyten. Bei kürzeren Inkubationszeiten mit Ammoniak fanden die Autoren hingegen keine signifikant erhöhte Anzahl geschwollener Astrozyten. Die Erfassung von Zellvolumenänderungen von konfluenten Astrozytenkulturen ist als ungenau anzusehen, da Zellgrenzen nicht immer eindeutig voneinander abgegrenzt werden können. Dennoch kommen die Autoren bezüglich Zeitabhängigkeit der durch  $\text{NH}_4\text{Cl}$  induzierten Zellschwellung zu ähnlichen Ergebnissen wie in der vorliegenden Arbeit.

Auch die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde zur Erfassung durch Ammoniak induzierter Zellvolumenänderungen genutzt. Konopacka *et al.* beobachteten 24 Stunden nach Behandlung mit Ammoniumchlorid (1 oder 5 mmol/l) eine Astrozytenvolumenzunahme um 50 bzw. 80 % (Konopacka *et al.*, 2009). Diese Untersuchungen wurden an fixierten Zellen durchgeführt. Da das Fixieren der Zelle den Wassergehalt beeinflusst und dadurch das Volumen der Zelle verändert wird, ist diese Technik anfällig für Messfehler und darüberhinaus auch ungeeignet, um dynamische Volumenänderungen einzelner Zellen zu messen.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurden Zellvolumenänderungen im Gehirn von mit Ammoniumazetat infundierten vitalen Mäusen mit Hilfe der Zweiphotonenmikroskopie *in vivo* untersucht (Rangroo Thrane *et al.*, 2013). In dieser Arbeit wurde in einem Zeitraum von 30 Minuten nach Perfusion von Ammoniumazetat keine Astrozytenschwellung beobachtet. Demgegenüber wurde eine Volumenzunahme von Neuronen und damit einhergehend eine Hyperexzitation beobachtet, die mit Krampfanfällen einherging. Derzeitig ist unklar, warum nach Perfusion mit Ammoniumazetat in dieser Arbeit keine Astrozytenschwellung im Gehirn *in vivo* beobachtet werden konnte. Denkbar ist, dass in dem Beobachtungszeitraum von 30 Minuten eine durch Glutaminbildung induzierte osmotische Imbalance im Astrozyten durch Osmolytdepletion kompensiert werden konnte.

Kongruent zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit fanden Zielińska *et al.* durch spektrometrische Volumenmessung an Rattenhirnschnitten nach Behandlung mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mmol/l) eine mittlere Volumenzunahme von 37,5 % nach 60 Minuten (Zielińska *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zu *in vivo*-Messungen, sind *in vitro*-Messungen an kultivierten Zellen technisch einfacher durchführbar, jedoch können die Messergebnisse durch Kulturartefakte verfälscht werden. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass in der Astrozytenmonokultur fehlende interzelluläre Wechselwirkungen das Schwellungsverhalten der Astrozyten beeinflusst.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die VivaTome™-Volumenmikroskopie eine geeignete Methode für die Erfassung rasch einsetzender Volumenänderungen *in vitro* ist. Messungen können mit hoher zeitlicher Auflösung und hoher Sensitivität durchgeführt werden. Im Vergleich zur Kletziens-Technik, der konfokalen Laserscanning- und Zweiphotonen-Mikroskopie handelt es sich um eine kostengünstige und einfach anwendbare Methode, die nicht den Einsatz von Radioaktivität und kostenaufwändigen Lasern erfordert.

Ungeklärt bleibt derzeitig, über welchen Zeitraum Volumenänderungen mit dieser Technik gemessen werden können. Da die Zellmembran einem *Turnover* unterliegt, wird auch der Farbstoff inkorporiert und dadurch möglicherweise einerseits die Physiologie der Zelle beeinflusst, sowie andererseits das Fluoreszenzsignal an der Membran abgeschwächt. Ebenfalls unklar bleibt, ob die Anfärbung der Membran selbst einen Einfluss auf die durch HE-relevante Faktoren ausgelöste Zellschwellung hat.

### 4.3 Molekulare Mechanismen der durch Ammoniak induzierten Astrozytenschwellung

Zu den molekularen Mechanismen, durch die Ammoniak die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies vermittelt, gehören eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und eine Steigerung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration wird durch Ammoniak induzierte Prostanoidbildung amplifiziert. Hierüber bewirkt Ammoniak eine Freisetzung von Glutamat, eine Aktivierung von NO-Synthasen und der NADPH-Oxidase, welche reaktive Stick- und Sauerstoffspezies bilden (Görg *et al.*, 2013b; Kruczek *et al.*, 2011; Reinehr *et al.*, 2007; Schliess *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die gleichen Signalwege, welche die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies induzieren, auch eine Astrozytenschwellung vermitteln. Hierfür wurden Elemente dieses Signalweges durch Hemmstoffe blockiert.

#### 4.3.1 Rolle von NMDA-Rezeptoren, $[Ca^{2+}]_i$ und Prostanoiden für die durch Ammoniak induzierte Astrozytenschwellung *in vitro*

Die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren spielt eine wichtige Rolle bei vielen neurologischen Erkrankungen wie z.B. bei Schlaganfall, Hyperexzitation (Chan und Butterworth, 1999; Rose, 2006) und insbesondere bei der zerebralen Ödembildung (Lipton und Rosenberg, 1994; Taghibiglou *et al.*, 2009).

Vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Professor Häussinger zeigten, dass Ammoniak über eine NMDA-Rezeptor-vermittelte Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  die Bildung von RNOS stimuliert (Görg *et al.*, 2013b; Häussinger und Schliess, 2008; Kruczek *et al.*, 2011, 2009; Schliess *et al.*, 2006, 2002). In Übereinstimmung mit einer durch RNOS getriggerten Astrozytenschwellung hemmte die Antagonisierung von NMDA-Rezeptoren durch MK-801 in der vorliegenden Arbeit die Ammoniak-vermittelte Volumenzunahme signifikant (Abb. 22 B, 24; S. 47, 49). Kongruent dazu erhöhte eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren durch NMDA sowie eine Behandlung mit Glutamat konzentrationsabhängig das Astrozytenzellvolumen (Abb. 23, 24; S. 48, 49).

Die vorliegenden Befunde zeigen, dass eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren für die Induktion der Astrozytenschwellung bedeutsam ist. Dies lässt einen extrazellulären

Kalziumeinstrom über NMDA-Rezeptoren vermuten. Demgegenüber zeigt eine Arbeit an hippokampalen Mäuseastrozytenkulturen, dass Ammoniak eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration über eine Freisetzung von Kalziumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum induziert (Rose *et al.*, 2005). Dieser Unterschied könnte darauf beruhen, dass Astrozyten im Hippocampus (Krebs *et al.*, 2003; Lalo *et al.*, 2011; Matthias *et al.*, 2003; Steinhäuser und Gallo, 1996) im Gegensatz zu denen in der vorliegenden Arbeit untersuchten kortikalen Astrozyten (Conti *et al.*, 1999, 1997) keine NMDA-Rezeptoren exprimieren. Auch die intrazelluläre Pufferung freier Kalziumionen durch den Kalziumchelator BAPTA-AM hemmte die ammoniakvermittelte Zellschwellung (Abb. 22 A, 24; S. 47, 49) und eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch das Kalziumionophor Ionomycin induzierte eine rasch einsetzende Volumenzunahme kultivierter Astrozyten (Abb. 24; S. 49).

Prostaglandine induzieren eine intrazelluläre Kalziumerhöhung in Astrozyten durch vesikuläre Freisetzung von Glutamat (Bezzi *et al.*, 1998) und dieser Mechanismus ist bedeutsam für die Bildung von oxidativ/nitrosativem Stress in mit Ammoniak behandelten Astrozyten (Görg *et al.*, 2010a; Häussinger und Görg, 2010). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine Hemmung der Prostanoidsynthese auch die durch Ammoniak vermittelte Astrozytenschwellung vermindert (Abb. 25 A, B, 26; S. 50, 51) und dass Prostanoiden *per se* eine Astrozytenschwellung auslösen (Abb. 25 C, D, 26; S. 50, 51).

#### **4.3.2 Rolle von oxidativ/nitrosativem Stress bei der durch Ammoniak und weiteren HE-relevanten Faktoren induzierten Schwellung kultivierter Rattenastrozyten**

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass Ammoniak, *pro*-inflammatorische Zytokine und das Benzodiazepin Diazepam eine rasch einsetzende Astrozytenschwellung induzieren, die durch Bildung von RNOS vermittelt wird (Abb. 17-20; S. 41-45).

Ammoniak induziert über Aktivierung der NADPH-Oxidase und von NO-Synthasen die Bildung von RNOS und in Übereinstimmung hiermit wurde die durch Ammoniak induzierte Astrozytenschwellung durch Hemmstoffe der NADPH-Oxidase (Apocynin) und von Stickstoffsynthasen (L-NMMA) sowie den Peroxynitritfänger Harnsäure verhindert (Abb. 27, 28, 29, 31, 32; S. 52-57). Interessanterweise hemmten Apocynin, L-NMMA sowie der

Peroxynitritfänger Harnsäure die Astrozytenschwellung quantitativ vergleichbar um ca. 50 % 20 Minuten nach Behandlung mit Ammoniak (Abb. 32; S. 57). Dies lässt vermuten, dass sowohl NO und Superoxidanionen *per se*, aber auch das durch deren Rekombination gebildete Peroxynitrit eine Astrozytenschwellung auslösen können. In Übereinstimmung damit wurde die durch Ammoniak induzierte rasch einsetzende Astrozytenschwellung vollständig durch gleichzeitige Hemmung von NADPH-Oxidase und NO-Synthasen unterdrückt (Abb. 29; S. 54).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen außerdem, dass die zeitliche Kinetik der durch HE-relevante Faktoren induzierten Astrozytenschwellung geringfügig variiert (Abb. 20; S. 44), obwohl diese prinzipiell die gleichen Signalmechanismen, die zur Bildung von RNOS führen, in Astrozyten aktivieren (Häussinger und Schliess, 2008). In diesem Zusammenhang wurde eine signifikante Schwellung in mit TNF- $\alpha$  behandelten Astrozyten erst nach 10 Minuten, aber in mit Ammoniak behandelten Astrozyten bereits nach 1 Minute nachgewiesen. Diese Unterschiede sind höchstwahrscheinlich auf zeitliche Aktivierungsvorgänge beteiligter Signalwege zurückzuführen. In diesem Zusammenhang steigert TNF- $\alpha$  die intrazelluläre Kalziumkonzentration deutlich langsamer (Görg *et al.*, 2006) als dies bei Ammoniak beobachtet wurde (Görg *et al.*, 2010a; Schliess *et al.*, 2002).

Es muss außerdem davon ausgegangen werden, dass die unterschiedlichen HE-relevanten Faktoren zusätzlich zu den gemeinsamen auch eine Vielzahl unterschiedlicher Signalwege aktivieren, die ebenfalls das Zellvolumen beeinflussen können.

#### **4.3.3 Bedeutung der Ammoniak-vermittelten Glutaminbildung für die rasch einsetzende Astrozytenschwellung *in vitro***

Die in dieser Arbeit vorgestellten Beobachtungen legen nahe, dass Ammoniak eine rasch einsetzende Astrozytenschwellung über die Bildung von oxidativ/nitrosativem Stress, aber auch über Glutaminakkumulation im Astrozyten vermittelt. Dies zeigten Experimente, in denen der Glutaminsynthetase-Hemmstoff L-Methionin-S-Sulfoximin (MSO) die durch Ammoniak induzierte Astrozytenschwellung signifikant verminderte (Abb. 33; S. 58). Gleichzeitig wirkte MSO in der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentration in *in*

*in vitro* Experimenten nicht antioxidativ (Abb. 34; S. 59). Daher scheint es unplausibel, dass die durch Ammoniak induzierte Astrozytenschwellung durch antioxidative Eigenschaften von MSO vermittelt wird.

Eine neuere Untersuchung von Jayakumar *et al.* stellt die ursächliche Bedeutung der Glutaminsynthese für die durch Ammoniak induzierte Astrozytenschwellung in Frage, da unter Verwendung der Kletziens-Technik eine Zellschwellung erst zu einem Zeitpunkt gemessen werden konnte, als die intrazellulären Glutaminspiegel sich bereits normalisiert hatten: Während der Glutaminspiegel in dieser Untersuchung nach Behandlung der Astrozyten mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mmol/l) ein Maximum 2 Stunden nach Behandlung mit Ammoniak erreichte und nach 12 Stunden wieder auf das Ausgangsniveau abfiel, wurde eine Astrozytenschwellung erst 24 Stunden nach Ammoniakbehandlung beobachtet (Jayakumar *et al.*, 2006).

Jayakumar *et al.* interpretierten die Astrozytenschwellung als „späte“ Folge einer durch Glutamin induzierten mitochondrialen Dysfunktion (Jayakumar *et al.*, 2006). Nach der sog. „Trojan Horse“ Hypothese gelangt Glutamin in die Mitochondrien, wo es nach Spaltung durch die Glutaminase wieder Ammoniak freisetzt, welcher die Mitochondrienfunktion beeinträchtigt und die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies in Mitochondrien trigert (Albrecht und Norenberg, 2006).

Frühere Arbeiten der gleichen Arbeitsgruppe zeigen in Übereinstimmung mit weiteren Befunden aus der Literatur (Jayakumar *et al.*, 2004; Kruczek *et al.*, 2011), dass Ammoniak über die Bildung von Glutamin, aber auch Glutamin selbst nahezu unmittelbar nach Behandlung die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies (RNOS) in Astrozyten *in vitro* steigert.

Da Norenberg *et al.* (Norenberg *et al.*, 2007) die spät einsetzende Astrozytenschwellung über die Bildung von RNOS erklären, aber die Bildung von RNOS bereits innerhalb weniger Minuten nach Behandlung mit Ammoniak auftritt (Jayakumar *et al.*, 2004; Kruczek *et al.*, 2011) und diese zudem durch Glutaminsynthesehemmung blockiert werden kann (Kruczek *et al.*, 2011; Murthy *et al.*, 2001), bleibt unklar, warum Jayakumar erst nach 24 Stunden eine signifikante Zunahme des Astrozytenzellvolumens beobachtete, nachdem die Glutaminspiegel wieder auf Kontrollniveau abgesunken waren (Jayakumar, 2006).

#### 4.4 Kernschwellung durch HE-auslösende Faktoren

Die Untersuchungen der vorliegenden Dissertation zeigen, dass die durch Ammoniak, TNF- $\alpha$ , Diazepam und hypoosmotisches Medium induzierte Astrozytenschwellung von einer Kernschwellung begleitet wird (Abb. 35, 36; S. 62, 63). Eine Kernschwellung kann mit einer Chromatin-Dekondensation einhergehen, in dessen Folge die Gentranskription regulierende Proteine Promotorbereiche in Genabschnitten leichter erreichen können und dadurch die mRNA-Synthese aktivieren (Oberleithner *et al.*, 2000). In Übereinstimmung damit aktiviert eine durch hypoosmotisches Medium induzierte Astrozytenschwellung die Transkription vieler Gene und man beobachtet eine Translokation der Transkriptionsfaktoren SP-1 und NTF-1 in den Zellkern (Häussinger und Görg, 2010; Kruczek *et al.*, 2009; Warskulat *et al.*, 2001).

Eine Kernschwellung in Astrozyten wurde auch im Gehirn von Ratten nach portokavaler Anastomose (PCA) mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen. Diese Kernschwellung wurde zwei Wochen nach PCA-Operation beobachtet, vier Wochen nach der Operation normalisierte sich das Kernvolumen wieder (Pilbeam *et al.*, 1983). Interessanterweise korrelierte das Auftreten geschwollener Kerne in dieser Arbeit mit dem Blutammoniakspiegel.

Ob diese Zellkernschwellung Genexpressionsänderungen im Gehirn von PCA-Tieren induziert, ist jedoch unbekannt. Auch in *postmortem* Hirnproben von Zirrhose-Patienten mit HE wurden Expressionsänderungen zahlreicher Gene beobachtet, die interessanterweise im Zusammenhang mit oxidativem Stress stehen (Görg *et al.*, 2013a).

Inwieweit Genexpressionsänderungen bei hepatischer Enzephalopathie durch eine Kernschwellung vermittelt werden, ist derzeit unbekannt. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Bedeutung der Kernschwellung für durch HE-auslösende Faktoren vermittelte Genexpressionsänderungen bei HE zu verstehen.

#### 4.5 Wirkung von Ammoniak auf das Zellvolumen kultivierter Mikroglia

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmalig, dass Ammoniak das Zellvolumen kultivierter Mikroglia steigert (Abb. 37, Tab. 8; S. 64, 65). Die durch Ammoniak induzierte

Mikrogliazellvolumenzunahme war hemmbar durch den Glutaminsynthetase-Hemmstoff MSO. In Übereinstimmung mit einer durch Glutamin vermittelten Zellvolumenzunahme konnte in den Untersuchungen der vorliegenden Dissertation gezeigt werden, dass kultivierte Mikroglia *in vitro* die Glutaminsynthetase sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene exprimieren (Abb. 38; S. 66). Demgegenüber konnte keine GS-Expression im Rattenhirnkortex in Mikroglia gefunden werden (Abb. 38, 39; S. 66, 67). Dieser Befund steht in Einklang mit Untersuchungen von Martinez-Hernandez *et al.* und Norenberg *et al.*, die eine GS-Expression exklusiv in Astrozyten im Gehirn zeigen (Martinez-Hernandez *et al.*, 1977; Norenberg und Martinez-Hernandez, 1979). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Mikroglia sich in Kultur anders verhalten als *in vivo*, und die Glutaminsynthetaseexpression *in vitro* ein Kulturartefakt darstellt.

Während die Beeinträchtigungen von astroglialen und neuronalen Funktionen bei HE gut dokumentiert sind, ist die Rolle der Mikroglia in der Pathogenese der HE bislang nicht verstanden. Eine experimentell herbeigeführte Hyperammoniämie durch akute Verabreichung von Ammoniumazetat oder durch toxininduziertes Leberversagen (Azoxymethan), hepatische Devaskularisierung der *Arteria hepatica* oder Gallengangligatur induziert eine Mikrogliaaktivierung (Chastre *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2009; Rodrigo *et al.*, 2010). Die durch Lebertoxine im Tiermodell induzierte Hyperammoniämie induziert darüberhinaus einen reaktiven Mikroglia-Phänotyp, der *pro*-inflammatorische Zytokine sezerniert und der in diesem experimentellen Setting dadurch an der Entstehung eines klinisch offenkundigen Hirnödems beteiligt sein soll (Bémeur *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2009). Eine Mikroglia-Schwellung selbst ist in diesen Tiermodellen jedoch bislang nicht nachgewiesen worden. Der reaktive Mikroglia-Phänotyp wie er bei Jiang *et al.* gezeigt wurde (Jiang *et al.*, 2009), geht bekanntermaßen mit morphologischen Veränderungen einher. Derzeit ist unklar, ob diese Veränderungen auch mit einer Mikroglia-Schwellung verbunden sind.

#### **4.6 Wirkung von Ammoniak auf das Zellvolumen kultivierter Neurone**

Ob Neurone bei chronischem Leberversagen mit hepatischer Enzephalopathie schwellen, ist derzeit unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde keine Schwellung der

Neurone bei einer  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Konzentration von 5 mmol/l über einen Beobachtungszeitraum von 20 Minuten beobachtet (Tab. 9; S. 68).

Generell finden sich nur wenige Hinweise auf morphologische Veränderungen von Neuronen im Gehirn bei Hyperammoniämie in der Literatur. Eine kürzlich erschienene Arbeit von Chen *et al.* zeigt, dass eine durch Gallengangsligatur induzierte Hyperammoniämie das Zellkörpervolumen kortikaler Pyramidenneurone und hippocampaler CA1-Pyramidenneurone nicht beeinflusst, jedoch die Dichte dendritischer Fortsätze vermindert (Chen *et al.*, 2014). Es ist denkbar, dass die beeinträchtigte Neurotransmission bei HE und auch verminderte motorische und intellektuelle Fähigkeiten bei HE-Patienten Folge einer verminderten Dendritendichte sind.

#### 4.7 Limitationen der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde die durch HE-relevante Faktoren induzierte Astrozytenschwellung *in vitro* untersucht. In diesem System können komplexe Interaktionen unterschiedlicher Zelltypen, wie sie im Gehirn stattfinden, nicht erfolgen. Es ist daher möglich, dass HE-relevante Faktoren die Astrozytenschwellung *in vivo* mit einer anderen zeitlichen Kinetik oder Intensität induzieren, da Mikroglia, Neurone und andere Zelltypen ebenfalls in ihrer Aktivität durch HE-relevante Faktoren beeinflusst werden könnten.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden Zellvolumenänderungen einzelner Zellen gemessen, die in keinem unmittelbaren Kontakt zu benachbarten Astrozyten standen. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass direkte Zellinteraktionen wie sie z.B. durch *gap junctions* zwischen Astrozyten vermittelt werden (Dermietzel *et al.*, 1991; Fischer und Kettenmann, 1985), einen Einfluss auf die durch Ammoniak induzierte Zellschwellung haben können.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war der Beobachtungszeitraum auf die ersten 20 Minuten nach Zugabe von Ammoniak und weiteren HE-relevanten Faktoren in das Zellkulturmedium beschränkt und es wurden keine darüber hinaus gehenden Veränderungen des Zellvolumens erfasst. Da die Membran einem ständigen *Turnover* unterliegt und dadurch die angefärbte Membran internalisiert wird, ist davon auszugehen, dass der

Beobachtungszeitraum bei der Volumenmikroskopiertechnik wie sie hier angewendet wurde, begrenzt ist. Alternativ könnten in zukünftigen Untersuchungen Zellvolumenmessungen mit Astrozyten durchgeführt werden, die mit einem cDNA Konstrukt transfiziert werden, welches für ein fluoreszierendes Protein kodiert, das mit einem Farnesylmembrananker gekoppelt ist. Diese Methode hat jedoch den Nachteil, dass die Transfektion *per se* einen enormen Stressfaktor für die Zelle darstellt und die Schwellungskinetik dadurch beeinflusst werden könnte. Auch eine Übertransfektion von Zellen mit Proteinen könnte die Zellphysiologie erheblich beeinträchtigen. Somit bleibt derzeitig unklar, ob das Astrozytenvolumen zu einem Zeitpunkt nach 20 Minuten gegenüber dem bei 20 Minuten beobachteten Volumen von mit HE-relevanten Faktoren behandelten Astrozyten verändert ist.

Für die Darstellung der Zellgrenzen bzw. des Zellkerns wurden der fluoreszierende Membranfarbstoff CellMask™-Orange und der Kernfarbstoff Syto™-11 verwendet. Es kann derzeitig nicht ausgeschlossen werden, dass diese Farbstoffe *per se* die durch HE-relevante Faktoren vermittelte Schwellungskinetik beeinflussen. Zuvor wurde in Kontrollexperimenten keine signifikante Volumenänderung der in mit den Farbstoffen gefärbten Zelle bzw. des Zellkerns beobachtet, aber die Wirkung der Farbstoffe selbst auf Volumenänderungen der Zelle und des Zellkerns konnte nicht überprüft werden. Hierfür müssten vergleichbare Untersuchungen mit einer andersartigen Technik an Farbstoff-beladenen Zellen durchgeführt werden.

Obwohl die VivaTome™-Fluoreszenzmikroskopie eine detaillierte Darstellung der Morphologie von Astrozyten, Mikroglia und Neurone in 3D und eine dynamische Darstellung von Zellvolumenänderungen ermöglicht, sind Auflösung und Sensibilität der Technik durch die Grenzen der Lichtmikroskopie limitiert. Außerdem kann eine unterschiedlich intensive Anfärbung der Zellmembran und des Zellkerns die Sensitivität limitieren.

#### **4.8 Ausblick**

Die vorliegende Arbeit weist auf eine wichtige Bedeutung von oxidativ/nitrosativem Stress für die Astrozytenschwellung bei hepatischer Enzephalopathie und lässt vermuten, dass eine pharmakologische Blockierung eine Astrozytenschwellung auslösender Signalwege die HE-Symptomatik abmildern könnte. Insbesondere eine pharmakologische Hemmung der

Bildung von oxidativ/nitrosativem Stress könnte eine mögliche Therapieoption in der Zukunft darstellen. Bis jetzt wurde die Wirkung von Antioxidantien bei Patienten mit HE in keiner kontrollierten klinischen Studie untersucht. Die therapeutische Bedeutsamkeit für die Behandlung der HE wurde jedoch für Antioxidantien bereits in vielen Arbeiten diskutiert: Als möglicher Therapieansatz wird zum Beispiel das aus der Gelbwurzel (*Curcuma longa*) stammende antioxidativ und antiinflammatorisch wirksame Curcumin vorgeschlagen (Menon und Sudheer, 2007). Curcumin ist bekannt als Lebensmittelzusatzstoff und findet auch Verwendung in Kosmetika und Medizinprodukten (Menon und Sudheer, 2007). Für Curcumin konnte belegt werden, dass es die Zyklooxygenase-2, die Lipoxygenase und die induzierbare NO-Synthase hemmt und hierüberhinaus die NO- und Prostanoidbildung hemmt (Menon und Sudheer, 2007). Eine Arbeit von Rosello *et al.* belegt am Tiermodell, dass Curcumin oxidativ/nitrosativen Stress abmildert (Roselló *et al.*, 2008): Nach Curcumin-Gabe beobachteten die Autoren eine erhöhte Aktivität der Enzyme Glutathion-Peroxidase, Katalase und Superoxid-Dismutase im Ratten-Hippokampus. Gleichzeitig fanden sie eine verringerte Bildung von Malondialdehyd, welches beim Abbau ungesättigter Fettsäuren entsteht und als Biomarker für oxidativen Stress herangezogen wird (Roselló *et al.*, 2008). Da oxidativ/nitrosativer Stress eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der HE spielt (Görg *et al.*, 2013b; Häussinger und Schliess, 2008; Häussinger und Sies, 2013), wurde Curcumin von Roselló *et al.* als mögliche Therapieoption für die HE diskutiert (Roselló *et al.*, 2008).

Ein weiteres Antioxidans, dessen Wirksamkeit bisher nur in Tierversuchen überprüft wurde, ist das Bioflavonoid Morin (Subash und Subramanian, 2008). Neben antioxidativen Wirkungen im Gehirn werden auch ammoniaksenkende und hepatoprotektive Effekte vermutet. Die genauen Wirkmechanismen von Morin sind nicht vollständig verstanden. Es wird diskutiert, dass Morin eine Überaktivierung von NMDA-Rezeptoren und eine durch Glutamat vermittelte Neurotoxizität verhindern kann (Subash und Subramanian, 2008).

Auch Melatonin (Cruz *et al.*, 2007) und der Mikrogliaaktivierungshemmstoff Minoxidol (Jiang *et al.*, 2009) wurden als mögliche therapeutische Optionen für die Behandlung der HE aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften diskutiert.

Da RNOS bei Gesunden Signalmoleküle darstellen, könnte eine umfassende antioxidative Intervention unerwünschte Nebenwirkungen nach sich ziehen. Daher ist die

Eignung einer „unspezifisch“ antioxidativen Therapie für die Behandlung der HE derzeit fragwürdig.

Zusammenfassend stellen die in der vorliegenden Dissertation und vorangegangenen Untersuchungen in der Literatur ein konsistentes Bild dar, welches zeigt, dass Glutamin und die molekularen Mechanismen, die an der Ammoniak-induzierten RNOS-Bildung beteiligt sind, auch in Zusammenhang stehen mit der Astrozytenschwellung. Damit stärken die Befunde der vorliegenden Arbeit die Relevanz eines Wechselspiels zwischen osmotischem und oxidativem Stress für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie.

## 5. Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Übersicht zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien.....  | 15 |
| Tabelle 2: Übersicht zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern.....  | 16 |
| Tabelle 3: Übersicht zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Realtime-PCR Primern.<br>.....  | 17 |
| Tabelle 4: Übersicht zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien.<br>.....   | 17 |
| Tabelle 5: Übersicht zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräten.....  | 18 |
| Tabelle 6: Laktatdehydrogenase-Aktivität im Zellkulturüberstand mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> behandelter Astrozyten.....                  | 55 |
| Tabelle 7: Wirkung der in den Experimenten der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanzen auf das Astrozytenzellvolumen <i>in vitro</i> . .... | 60 |
| Tabelle 8: Wirkung von NH <sub>4</sub> Cl auf das Zellvolumen kultivierter Mikroglia.....  | 65 |
| Tabelle 9: Wirkung von NH <sub>4</sub> Cl auf das Zellvolumen kultivierter Neurone.....  | 68 |

## 6. Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Einteilung der hepatischen Enzephalopathie in Schweregrade nach den West-Haven-Kriterien.....   | 4  |
| Abbildung 2: Glutamat-Glutamin-Zyklus.....   | 6  |
| Abbildung 3: Ammoniakentgiftung in der Leber.....  | 9  |
| Abbildung 4: Pathogenese-Modell zur hepatischen Enzephalopathie.....   | 12 |
| Abbildung 5: Anregungs- und Emissionsspektren des Fluoreszenzfarbstoffs CellMask™-Orange.....  | 25 |
| Abbildung 6: Anregungs- und Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffs Syto™-11.....  | 26 |
| Abbildung 7: Aufbau des VivaTome™Mikroskops.....   | 29 |
| Abbildung 8: Darstellung der Strahlenwege des Anregungs-, des transmittierten und des reflektierten Lichts bei der VivaTome™-Mikroskopie.....                        | 31 |
| Abbildung 9: Im VivaTome™ verwendete Lochblendenscheibe.....   | 32 |
| Abbildung 10: Gegenüberstellung von „In-Focus“- und „Out-Of-Focus“-Informationen aufeinanderfolgender Schichten eines mit CellMask™-Orange gefärbten Astrozyten..... | 33 |
| Abbildung 11: Ergebnis der mathematischen Prozessierung der „In-“ und „Out-Of-Focus“-Bildinformationen.....  | 34 |
| Abbildung 12: Beziehung zwischen Objektiv-Öffnungswinkel und Lichteinfall.....   | 35 |
| Abbildung 13: Vergleich der Strahlenwege beim Trockenobjektiv und Ölimmersionsobjektiv.....  | 36 |
| Abbildung 14: Darstellung der Morphologie kultivierter Rattenastrozyten, Mikroglia und Neurone mittels VivaTome™-Fluoreszenzmikroskopie.....                         | 38 |

---

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 15: Darstellung kultivierter Rattenneurone mittels VivaTome™-Fluoreszenzmikroskopie. ....   | 39 |
| Abbildung 16: Einfluss von Anisoosmolarität auf das Zellvolumen kultivierter Rattenastrozyten. ....   | 40 |
| Abbildung 17: Effekte von NH <sub>4</sub> Cl auf das Zellvolumen kultivierter Rattenastrozyten.....   | 41 |
| Abbildung 18: Wirkung <i>pro</i> -inflammatorischer Zytokine auf das Zellvolumen kultivierter Rattenastrozyten. ....  | 43 |
| Abbildung 19: Wirkung der Benzodiazepine Diazepam und Clonazepam auf das Zellvolumen kultivierter Rattenastrozyten.....   | 44 |
| Abbildung 20: Wirkung HE-relevanter Faktoren auf das Zellvolumen kultivierter Rattenastrozyten.. ....   | 45 |
| Abbildung 21: Wirkung von Epigallocatechingallat auf die durch NH <sub>4</sub> Cl, TNF-α oder Diazepam induzierte Zellvolumenerhöhung kultivierter Rattenastrozyten.....                                | 46 |
| Abbildung 22: Bedeutung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration und des NMDA-Rezeptors für die durch NH <sub>4</sub> Cl induzierte Astrozytenschwellung. ....                                     | 47 |
| Abbildung 23: Wirkung von NMDA und Glutamat auf das Astrozytenzellvolumen.....  | 48 |
| Abbildung 24: Bedeutung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration und einer NMDA-Rezeptoraktivierung und -Antagonisierung für die durch NH <sub>4</sub> Cl induzierte Astrozytenschwellung.....     | 49 |
| Abbildung 25: Wirkung von Zykllooxygenaseinhibitoren auf die durch NH <sub>4</sub> Cl induzierte Astrozytenschwellung und Wirkung von Prostanoiden auf das Astrozytenzellvolumen <i>in vitro</i> . .... | 50 |
| Abbildung 26: Wirkung von Zykllooxygenaseinhibitoren auf die durch NH <sub>4</sub> Cl induzierte Astrozytenschwellung und Wirkung von Prostanoiden auf das Astrozytenvolumen <i>in vitro</i> . .        | 51 |

---

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 27: Bedeutung der NADPH-Oxidase für die NH <sub>4</sub> Cl-induzierte Astrozytenschwellung <i>in vitro</i> .....                               | 52 |
| Abbildung 28: Bedeutung von Stickstoffmonoxid für die NH <sub>4</sub> Cl-induzierte Astrozytenschwellung <i>in vitro</i> .....                           | 53 |
| Abbildung 29: Bedeutung der NADPH-Oxidase und NO-Synthasen für die durch NH <sub>4</sub> Cl induzierte Astrozytenschwellung <i>in vitro</i> . ....       | 54 |
| Abbildung 30: Wirkung von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und Spe-NO auf das Zellvolumen kultivierter Rattenastrozyten.. ....                              | 55 |
| Abbildung 31: Wirkung von Harnsäure auf die durch NH <sub>4</sub> Cl induzierte Astrozytenschwellung <i>in vitro</i> .....                               | 56 |
| Abbildung 32: Wirkung von Apocynin, L-NMMA und Harnsäure auf die durch NH <sub>4</sub> Cl induzierte Astrozytenschwellung <i>in vitro</i> .....          | 57 |
| Abbildung 33: Wirkung des Glutaminsynthetase-Hemmstoffs MSO auf die durch NH <sub>4</sub> Cl induzierte Astrozytenschwellung. ....                       | 58 |
| Abbildung 34: Wirkung von Methioninsulfoximin auf die <i>in vitro</i> -Oxidation von Fluoreszenzindikatoren reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies. .... | 60 |
| Abbildung 35: Kernvolumen kultivierter Rattenastrozyten.....   | 62 |
| Abbildung 36: Zeitabhängige Wirkung von NH <sub>4</sub> Cl, TNF- $\alpha$ oder Diazepam auf das Zellkernvolumen kultivierter Rattenastrozyten.....       | 63 |
| Abbildung 37: Wirkung HE-relevanter Faktoren auf das Zellvolumen kultivierter Mikroglia..  | 64 |
| Abbildung 38: Nachweis der Glutaminsynthetase in kultivierten Mikroglia und Astrozyten. .  | 66 |
| Abbildung 39: Immunfluoreszenzanalyse von GFAP, Iba-1 und GS im Rattenhirn.....  | 67 |

## 7. Literaturverzeichnis

- Abbott, N.J., Rönnebeck, L., Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41–53. doi:10.1038/nrn1824
- Aickin, C.C., Deisz, R.A., Lux, H.D., 1982. Ammonium action on post-synaptic inhibition in crayfish neurones: implications for the mechanism of chloride extrusion. *J. Physiol.* 329, 319–339.
- Albrecht, J., Bender, A.S., Norenberg, M.D., 1994. Ammonia stimulates the release of taurine from cultured astrocytes. *Brain Res.* 660, 288–292.
- Albrecht, J., Norenberg, M.D., 2006. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology*. Baltimore, Md 44, 788–794. doi:10.1002/hep.21357
- Albrecht, J., Zielińska, M., Norenberg, M.D., 2010. Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal. *Biochem. Pharmacol.* 80, 1303–1308. doi:10.1016/j.bcp.2010.07.024
- Alvarez-Leefmans, F.J., Herrera-Pérez, J.J., Márquez, M.S., Blanco, V.M., 2006. Simultaneous Measurement of Water Volume and pH in Single Cells Using BCECF and Fluorescence Imaging Microscopy. *Biophys. J.* 90, 608–618. doi:10.1529/biophysj.105.069450
- Andersson, A.K., Adermark, L., Persson, M., Westerlund, A., Olsson, T., Hansson, E., 2009. Lactate Contributes to Ammonia-Mediated Astroglial Dysfunction During Hyperammonemia. *Neurochem. Res.* 34, 556–565. doi:10.1007/s11064-008-9819-1
- Asano, T., Katagiri, H., Takata, K., Lin, J.L., Ishihara, H., Inukai, K., Tsukuda, K., Kikuchi, M., Hirano, H., Yazaki, Y., 1991. The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J. Biol. Chem.* 266, 24632–24636.
- Bajaj, J.S., Schubert, C.M., Heuman, D.M., Wade, J.B., Gibson, D.P., Topaz, A., Saeian, K., Hafeezullah, M., Bell, D.E., Sterling, R.K., Stravitz, R.T., Luketic, V., White, M.B., Sanyal, A.J., 2010. Persistence of cognitive impairment after resolution of overt hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 138, 2332–2340. doi:10.1053/j.gastro.2010.02.015
- Bak, L.K., Schousboe, A., Waagepetersen, H.S., 2006. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J. Neurochem.* 98, 641–653. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x
- Barres, B., 2008. The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. *Neuron* 60, 430–440. doi:10.1016/j.neuron.2008.10.013
- Bédard, S., Marcotte, B., Marette, A., 1997. Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem. J.* 325 ( Pt 2), 487–493.

- Bémeur, C., Qu, H., Desjardins, P., Butterworth, R.F., 2010. IL-1 or TNF receptor gene deletion delays onset of encephalopathy and attenuates brain edema in experimental acute liver failure. *Neurochem. Int.* 56, 213–215. doi:10.1016/j.neuint.2009.11.010
- Bender, A.S., Norenberg, M.D., 1998. Effect of benzodiazepines and neurosteroids on ammonia-induced swelling in cultured astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 54, 673–680.
- Benjamin, A.M., Quastel, J.H., 1972. Locations of amino acids in brain slices from the rat. Tetrodotoxin-sensitive release of amino acids. *Biochem. J.* 128, 631–646.
- Bernuau, J., Rueff, B., Benhamou, J.P., 1986. Fulminant and subfulminant liver failure: definitions and causes. *Semin. Liver Dis.* 6, 97–106. doi:10.1055/s-2008-1040593
- Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B.L., Pozzan, T., Volterra, A., 1998. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391, 281–285. doi:10.1038/34651
- Bosman, D.K., Deutz, N.E., Maas, M.A., van Eijk, H.M., Smit, J.J., de Haan, J.G., Chamuleau, R.A., 1992. Amino acid release from cerebral cortex in experimental acute liver failure, studied by in vivo cerebral cortex microdialysis. *J. Neurochem.* 59, 591–599.
- Brown, A.M., Ransom, B.R., 2007. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55, 1263–1271. doi:10.1002/glia.20557
- Butterworth, R.F., 2002. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. *Metab. Brain Dis.* 17, 221–227.
- Butterworth, R.F., Giguère, J.F., Michaud, J., Lavoie, J., Layrargues, G.P., 1987. Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem. Pathol.* 6, 1–12.
- Canbay, A., Tacke, F., Hadem, J., Trautwein, C., Gerken, G., Manns, M.P., 2011. Acute liver failure: a life-threatening disease. *Dtsch. Ärztebl. Int.* 108, 714–720. doi:10.3238/arztebl.2011.0714
- Cash, W.J., McConville, P., McDermott, E., McCormick, P.A., Callender, M.E., McDougall, N.I., 2010. Current concepts in the assessment and treatment of Hepatic Encephalopathy. *QJM* 103, 9–16. doi:10.1093/qjmed/hcp152
- Castell, D.O., Moore, E.W., 1971. Ammonia absorption from the human colon. The role of nonionic diffusion. *Gastroenterology* 60, 33–42.
- Cauli, O., Rodrigo, R., Llansola, M., Montoliu, C., Monfort, P., Piedrafita, B., El Mlili, N., Boix, J., Agustí, A., Felipo, V., 2009. Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.* 24, 69–80. doi:10.1007/s11011-008-9115-4
- Cavanagh, J.B., Kyu, M.H., 1971. Type II Alzheimer change experimentally produced in astrocytes in the rat. *J. Neurol. Sci.* 12, 63–75.

- Chan, H., Butterworth, R.F., 1999. Evidence for an astrocytic glutamate transporter deficit in hepatic encephalopathy. *Neurochem. Res.* 24, 1397–1401.
- Chan, H., Hazell, A.S., Desjardins, P., Butterworth, R.F., 2000. Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurochem. Int.* 37, 243–248.
- Chastre, A., Bélanger, M., Beauchesne, E., Nguyen, B.N., Desjardins, P., Butterworth, R.F., 2012. Inflammatory cascades driven by tumor necrosis factor-alpha play a major role in the progression of acute liver failure and its neurological complications. *PLoS One* 7, e49670. doi:10.1371/journal.pone.0049670
- Chastre, A., Jiang, W., Desjardins, P., Butterworth, R.F., 2010. Ammonia and proinflammatory cytokines modify expression of genes coding for astrocytic proteins implicated in brain edema in acute liver failure. *Metab. Brain Dis.* 25, 17–21. doi:10.1007/s11011-010-9185-y
- Chen, J.-R., Wang, B.-N., Tseng, G.-F., Wang, Y.-J., Huang, Y.-S., Wang, T.-J., 2014. Morphological changes of cortical pyramidal neurons in hepatic encephalopathy. *BMC Neurosci.* 15, 15. doi:10.1186/1471-2202-15-15
- Chun, K.-S., Cha, H.-H., Shin, J.-W., Na, H.-K., Park, K.-K., Chung, W.-Y., Surh, Y.-J., 2004. Nitric oxide induces expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through activation of NF-kappaB. *Carcinogenesis* 25, 445–454. doi:10.1093/carcin/bgh021
- Conti, F., Barbaresi, P., Melone, M., Ducati, A., 1999. Neuronal and glial localization of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in the human cerebral cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 9, 110–120.
- Conti, F., Minelli, A., DeBiasi, S., Melone, M., 1997. Neuronal and glial localization of NMDA receptors in the cerebral cortex. *Mol. Neurobiol.* 14, 1–18. doi:10.1007/BF02740618
- Cordoba, J., Gottstein, J., Blei, A.T., 1996. Glutamine, myo-inositol, and organic brain osmolytes after portocaval anastomosis in the rat: implications for ammonia-induced brain edema. *Hepatology* 24, 919–923. doi:10.1002/hep.510240427
- Crofford, L.J., Tan, B., McCarthy, C.J., Hla, T., 1997. Involvement of nuclear factor kappa B in the regulation of cyclooxygenase-2 expression by interleukin-1 in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum.* 40, 226–236.
- Crow, J.P., Ischiropoulos, H., 1996. Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in proteins: in vivo marker of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* 269, 185–194.
- Cruz, A., Túnez, I., Martínez, R., Muñoz-Castañeda, J.R., Ramírez, L.M., Recio, M., Ochoa, L., Arjona, A., Montilla, P., Muntané, J., Padillo, F.J., 2007. Melatonin prevents brain oxidative stress induced by obstructive jaundice in rats. *J. Neurosci. Res.* 85, 3652–3656. doi:10.1002/jnr.21436

- Dam, G., Keiding, S., Munk, O.L., Ott, P., Vilstrup, H., Bak, L.K., Waagepetersen, H.S., Schousboe, A., Sørensen, M., 2013. Hepatic encephalopathy is associated with decreased cerebral oxygen metabolism and blood flow, not increased ammonia uptake. *Hepatology*. Baltimore, Md 57, 258–265. doi:10.1002/hep.25995
- Deitmer, J.W., Rose, C.R., 2010. Ion changes and signalling in perisynaptic glia. *Brain Res. Rev.* 63, 113–129. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.10.006
- de Kneegt, R.J., Schalm, S.W., van der Rijt, C.C., Fekkes, D., Dalm, E., Hekking-Weyma, I., 1994. Extracellular brain glutamate during acute liver failure and during acute hyperammonemia simulating acute liver failure: an experimental study based on in vivo brain dialysis. *J. Hepatology*. 20, 19–26.
- Dermietzel, R., Hertberg, E.L., Kessler, J.A., Spray, D.C., 1991. Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 11, 1421–1432.
- Desjardins, P., Bélanger, M., Butterworth, R.F., 2001. Alterations in expression of genes coding for key astrocytic proteins in acute liver failure. *J. Neurosci. Res.* 66, 967–971.
- Dietrich, P.-Y., Walker, P.R., Saas, P., 2003. Death receptors on reactive astrocytes: a key role in the fine tuning of brain inflammation? *Neurology* 60, 548–554.
- Faff-Michalak, L., Reichenbach, A., Dettmer, D., Kellner, K., Albrecht, J., 1994. K(+)-, hyposmolarity-, and NH<sub>4</sub>(+)-induced taurine release from cultured rabbit Müller cells: role of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions and relation to cell volume changes. *Glia* 10, 114–120. doi:10.1002/glia.440100205
- Felipo, V., Butterworth, R.F., 2002. Neurobiology of ammonia. *Prog. Neurobiol.* 67, 259–279.
- Ferenci, P., Lockwood, A., Mullen, K., Tarter, R., Weissenborn, K., Blei, A.T., 2002. Hepatic encephalopathy—definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology*. Baltimore, Md 35, 716–721. doi:10.1053/jhep.2002.31250
- Fischer, G., Kettenmann, H., 1985. Cultured astrocytes form a syncytium after maturation. *Exp. Cell Res.* 159, 273–279.
- Görg, B., Bidmon, H.-J., Häussinger, D., 2013a. Gene expression profiling in the cerebral cortex of patients with cirrhosis with and without hepatic encephalopathy. *Hepatology*. Baltimore, Md 57, 2436–2447. doi:10.1002/hep.26265
- Görg, B., Bidmon, H.J., Keitel, V., Foster, N., Goerlich, R., Schliess, F., Häussinger, D., 2006. Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 449, 104–114. doi:10.1016/j.abb.2006.02.012

- Görg, B., Foster, N., Reinehr, R., Bidmon, H.J., Höngen, A., Häussinger, D., Schliess, F., 2003. Benzodiazepine-induced protein tyrosine nitration in rat astrocytes. *Hepatology* 37, 334–342. doi:10.1053/jhep.2003.50061
- Görg, B., Karababa, A., Shafigullina, A., Bidmon, H.J., Häussinger, D., 2015. Ammonia-induced senescence in cultured rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. *Glia* 63, 37–50. doi:10.1002/glia.22731
- Görg, B., Morwinsky, A., Keitel, V., Qvarthava, N., Schrör, K., Häussinger, D., 2010a. Ammonia triggers exocytotic release of L-glutamate from cultured rat astrocytes. *Glia* 58, 691–705. doi:10.1002/glia.20955
- Görg, B., Qvarthava, N., Bidmon, H.-J., Palomero-Gallagher, N., Kircheis, G., Zilles, K., Häussinger, D., 2010b. Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Hepatology* 52, 256–265. doi:10.1002/hep.23656
- Görg, B., Qvarthava, N., Keitel, V., Bidmon, H.J., Selbach, O., Schliess, F., Häussinger, D., 2008. Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo. *Hepatology* 48, 567–579. doi:10.1002/hep.22345
- Görg, B., Qvarthava, N., Voss, P., Grune, T., Häussinger, D., Schliess, F., 2007. Reversible inhibition of mammalian glutamine synthetase by tyrosine nitration. *FEBS Lett.* 581, 84–90. doi:10.1016/j.febslet.2006.11.081
- Görg, B., Schliess, F., Häussinger, D., 2013b. Osmotic and oxidative/nitrosative stress in ammonia toxicity and hepatic encephalopathy. *Arch. Biochem. Biophys.* 536, 158–163. doi:10.1016/j.abb.2013.03.010
- Görg, B., Wettstein, M., Metzger, S., Schliess, F., Häussinger, D., 2005. Lipopolysaccharide-induced tyrosine nitration and inactivation of hepatic glutamine synthetase in the rat. *Hepatology* 41, 1065–1073. doi:10.1002/hep.20662
- Gotthardt, D., Riediger, C., Weiss, K.H., Encke, J., Schemmer, P., Schmidt, J., Sauer, P., 2007. Fulminant hepatic failure: etiology and indications for liver transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22, viii5–viii8. doi:10.1093/ndt/gfm650
- Gregorios, J.B., Mozes, L.W., Norenberg, M.D., 1985. Morphologic effects of ammonia on primary astrocyte cultures. II. Electron microscopic studies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44, 404–414.
- Griscavage, J.M., Wilk, S., Ignarro, L.J., 1996. Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 3308–3312.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440–3450.

- Gupta, R.K., Saraswat, V.A., Poptani, H., Dhiman, R.K., Kohli, A., Gujral, R.B., Naik, S.R., 1993. Magnetic resonance imaging and localized in vivo proton spectroscopy in patients with fulminant hepatic failure. *Am. J. Gastroenterol.* 88, 670–674.
- Häussinger, D., 2006. Low grade cerebral edema and the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 43, 1187–1190. doi:10.1002/hep.21235
- Häussinger, D., 1990. Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. *Biochem. J.* 267, 281–290.
- Häussinger, D., Gerok, W., 1983. Hepatocyte heterogeneity in glutamate uptake by isolated perfused rat liver. *Eur. J. Biochem. FEBS* 136, 421–425.
- Häussinger, D., Görg, B., 2010. Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 13, 87–92. doi:10.1097/MCO.0b013e328333b829
- Häussinger, D., Görg, B., Reinehr, R., Schliess, F., 2005. Protein Tyrosine Nitration in Hyperammonemia and Hepatic Encephalopathy. *Metab. Brain Dis.* 20, 285–294. doi:10.1007/s11011-005-7908-2
- Häussinger, D., Kircheis, G., 2002. [Hepatic encephalopathy]. *Praxis* 91, 957–963. doi:10.1024/0369-8394.91.22.957
- 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? *J. Hepatol.* 32, 1035–1038.
- 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.; Blei, A.T., 2007: Hepatic Encephalopathy. In: Rodes J., Benhamou J.P., Blei A.T., Reichen J., Rizzetto M., editors. *Textbook of Hepatology*. Oxford, S. 728–760
- Häussinger, D., Schliess, F., 2008. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut* 57, 1156–1165. doi:10.1136/gut.2007.122176
- Häussinger, D., Schliess, F., 2005. Astrocyte swelling and protein tyrosine nitration in hepatic encephalopathy. *Neurochem. Int.* 47, 64–70. doi:10.1016/j.neuint.2005.04.008
- Häussinger, D., Sies, H., 2013. Hepatic encephalopathy: clinical aspects and pathogenetic concept. *Arch. Biochem. Biophys.* 536, 97–100. doi:10.1016/j.abb.2013.04.013
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986–994.

- Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A., Robinson, S.R., 1999. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J. Neurosci. Res.* 57, 417–428.
- Hertz, L., McFarlin, D.E., Waksman, B.H., 1990. Astrocytes: auxiliary cells for immune responses in the central nervous system? *Immunol. Today* 11, 265–268.
- Isaacs, R.E., Bender, A.S., Kim, C.Y., Shi, Y.F., Norenberg, M.D., 1999. Effect of ammonia and methionine sulfoximine on myo-inositol transport in cultured astrocytes. *Neurochem. Res.* 24, 51–59.
- Jayakumar, A.R., 2006. Oxidative Stress and Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation Mediate Ammonia-Induced Cell Swelling and Glutamate Uptake Inhibition in Cultured Astrocytes. *J. Neurosci.* 26, 4774–4784. doi:10.1523/JNEUROSCI.0120-06.2006
- Jayakumar, A.R., Panickar, K.S., Norenberg, M.D., 2002. Effects on free radical generation by ligands of the peripheral benzodiazepine receptor in cultured neural cells. *J. Neurochem.* 83, 1226–1234.
- Jayakumar, A.R., Rama Rao, K.V., Schousboe, A., Norenberg, M.D., 2004. Glutamine-induced free radical production in cultured astrocytes. *Glia* 46, 296–301. doi:10.1002/glia.20003
- Jayakumar, A.R., Rao, K.V.R., Murthy, C.R.K., Norenberg, M.D., 2006. Glutamine in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Neurochem. Int.* 48, 623–628. doi:10.1016/j.neuint.2005.11.017
- Jiang, W., Desjardins, P., Butterworth, R.F., 2009. Minocycline attenuates oxidative/nitrosative stress and cerebral complications of acute liver failure in rats. *Neurochem. Int.* 55, 601–605. doi:10.1016/j.neuint.2009.06.001
- Jördens, M.S., 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*. doi:10.1002/glia.22879
- Kaiser, S., Gerok, W., Häussinger, D., 1988. Ammonia and glutamine metabolism in human liver slices: new aspects on the pathogenesis of hyperammonaemia in chronic liver disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 18, 535–542.
- Kelly, T., Kafitz, K.W., Roderigo, C., Rose, C.R., 2009. Ammonium-evoked alterations in intracellular sodium and pH reduce glial glutamate transport activity. *Glia* 57, 921–934. doi:10.1002/glia.20817
- Kircheis, G., Wettstein, M., Timmermann, L., Schnitzler, A., Häussinger, D., 2002. Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopathy. *Hepatology*. Baltimore, Md 35, 357–366. doi:10.1053/jhep.2002.30957

- Knecht, K., Michalak, A., Rose, C., Rothstein, J.D., Butterworth, R.F., 1997. Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neurosci. Lett.* 229, 201–203.
- Konopacka, A., Konopacki, F.A., Albrecht, J., 2009. Protein kinase G is involved in ammonia-induced swelling of astrocytes. *J. Neurochem.* 109, 246–251. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05802.x
- Kosenko, E., Kaminski, Y., Lopata, O., Muravyov, N., Felipo, V., 1999. Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1369–1374.
- Krebs, C., Fernandes, H.B., Sheldon, C., Raymond, L.A., Baimbridge, K.G., 2003. Functional NMDA receptor subtype 2B is expressed in astrocytes after ischemia in vivo and anoxia in vitro. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 3364–3372.
- Kristiansen, S., Wojtaszewski, J.F., Juel, C., Richter, E.A., 1994. Effect of glucose-6-phosphate and pH on glucose transport in skeletal muscle plasma membrane giant vesicles. *Acta Physiol. Scand.* 150, 227–233. doi:10.1111/j.1748-1716.1994.tb09680.x
- Kruczek, C., Görg, B., Keitel, V., Bidmon, H.J., Schliess, F., Häussinger, D., 2011. Ammonia increases nitric oxide, free Zn(2+), and metallothionein mRNA expression in cultured rat astrocytes. *Biol. Chem.* 392, 1155–1165. doi:10.1515/BC.2011.199
- Kruczek, C., Görg, B., Keitel, V., Pirev, E., Kröncke, K.D., Schliess, F., Häussinger, D., 2009. Hypoosmotic swelling affects zinc homeostasis in cultured rat astrocytes. *Glia* 57, 79–92. doi:10.1002/glia.20737
- Lachmann, V., Görg, B., Bidmon, H.J., Keitel, V., Häussinger, D., 2013. Precipitants of hepatic encephalopathy induce rapid astrocyte swelling in an oxidative stress dependent manner. *Arch. Biochem. Biophys.* 536, 143–151. doi:10.1016/j.abb.2013.05.004
- Lalo, U., Pankratov, Y., Parpura, V., Verkhratsky, A., 2011. Ionotropic receptors in neuronal-astroglial signalling: what is the role of “excitable” molecules in non-excitable cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 992–1002. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.09.007
- Laubenberger, J., Häussinger, D., Bayer, S., Gufler, H., Hennig, J., Langer, M., 1997. Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain in symptomatic and asymptomatic patients with liver cirrhosis. *Gastroenterology* 112, 1610–1616.
- Lipton, S.A., Rosenberg, P.A., 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* 330, 613–622. doi:10.1056/NEJM199403033300907
- Lockwood, A.H., Yap, E.W., Wong, W.H., 1991. Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy. *J. Cereb. Blood Flow*

- Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab. 11, 337–341. doi:10.1038/jcbfm.1991.67
- Lowenstein, J.M., 1972. Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle. *Physiol. Rev.* 52, 382–414.
- Marcaida, G., Felipo, V., Hermenegildo, C., Miñana, M.-D., Grisolia, S., 1992. Acute ammonia toxicity is mediated by the NMDA type of glutamate receptors. *FEBS Lett.* 296, 67–68. doi:10.1016/0014-5793(92)80404-5
- Martinez-Hernandez, A., Bell, K.P., Norenberg, M.D., 1977. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 195, 1356–1358.
- Master, S., Gottstein, J., Blei, A.T., 1999. Cerebral blood flow and the development of ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology*. Baltimore, Md 30, 876–880. doi:10.1002/hep.510300428
- Matthias, K., Kirchhoff, F., Seifert, G., Hüttmann, K., Matyash, M., Kettenmann, H., Steinhäuser, C., 2003. Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 1750–1758.
- Mattson, M.P., 2008. Glutamate and Neurotrophic Factors in Neuronal Plasticity and Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1144, 97–112. doi:10.1196/annals.1418.005
- Mayer, M.L., Westbrook, G.L., Guthrie, P.B., 1984. Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309, 261–263.
- Menet, V., Giménez Y Ribotta, M., Sandillon, F., Privat, A., 2000. GFAP null astrocytes are a favorable substrate for neuronal survival and neurite growth. *Glia* 31, 267–272.
- Menon, V.P., Sudheer, A.R., 2007. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 595, 105–125. doi:10.1007/978-0-387-46401-5\_3
- Michalak, A., Rose, C., Butterworth, J., Butterworth, R.F., 1996. Neuroactive amino acids and glutamate (NMDA) receptors in frontal cortex of rats with experimental acute liver failure. *Hepatology*. Baltimore, Md 24, 908–913. doi:10.1002/hep.510240425
- Monfort, P., Muñoz, M.-D., ElAyadi, A., Kosenko, E., Felipo, V., 2002. Effects of hyperammonemia and liver failure on glutamatergic neurotransmission. *Metab. Brain Dis.* 17, 237–250.
- Montgomery, D.L., 1994. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Vet. Pathol.* 31, 145–167.
- Mousseau, D.D., Butterworth, R.F., 1994. Current theories on the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* N 206, 329–344.

- Müller, M.S., 2014. Functional impact of glycogen degradation on astrocytic signalling. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 1311–1315. doi:10.1042/BST20140157
- Murthy, C.R., Rama Rao, K.V., Bai, G., Norenberg, M.D., 2001. Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 66, 282–288.
- Nagaraja, T.N., Brookes, N., 1998. Intracellular acidification induced by passive and active transport of ammonium ions in astrocytes. *Am. J. Physiol.* 274, C883–891.
- Norenberg, M., 2003. Oxidative and nitrosative stress in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 37, 245–248. doi:10.1053/jhep.2003.50087
- Norenberg, M.D., 1987. The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochem. Pathol.* 6, 13–33.
- Norenberg, M.D., Huo, Z., Neary, J.T., Roig-Cantesano, A., 1997. The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission. *Glia* 21, 124–133.
- Norenberg, M.D., Jayakumar, A.R., Rama Rao, K.V., 2004. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.* 19, 313–329.
- Norenberg, M.D., Jayakumar, A.R., Rama Rao, K.V., Panickar, K.S., 2007. New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab. Brain Dis.* 22, 219–234. doi:10.1007/s11011-007-9062-5
- Norenberg, M.D., Martinez-Hernandez, A., 1979. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* 161, 303–310.
- Norenberg, M.D., Rao, K.V.R., Jayakumar, A.R., 2005. Mechanisms of Ammonia-Induced Astrocyte Swelling. *Metab. Brain Dis.* 20, 303–318. doi:10.1007/s11011-005-7911-7
- Oberleithner, H., Reinhardt, J., Schillers, H., Pagel, P., Schneider, S.W., 2000. Aldosterone and nuclear volume cycling. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 10, 429–434. doi:16379
- Ottersen, O.P., Zhang, N., Walberg, F., 1992. Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neuroscience* 46, 519–534.
- Pekny, M., Nilsson, M., 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50, 427–434. doi:10.1002/glia.20207
- Pichili, V.B.R., Rao, K.V.R., Jayakumar, A.R., Norenberg, M.D., 2007. Inhibition of glutamine transport into mitochondria protects astrocytes from ammonia toxicity. *Glia* 55, 801–809. doi:10.1002/glia.20499

- Pilbeam, C.M., Anderson, R.M., Bhathal, P.S., 1983. The brain in experimental portal-systemic encephalopathy. I. Morphological changes in three animal models. *J. Pathol.* 140, 331–345. doi:10.1002/path.1711400403
- Powell, E.M., Geller, H.M., 1999. Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension. *Glia* 26, 73–83.
- Rama Rao, K.V., Chen, M., Simard, J.M., Norenberg, M.D., 2003. Suppression of ammonia-induced astrocyte swelling by cyclosporin A. *J. Neurosci. Res.* 74, 891–897. doi:10.1002/jnr.10755
- Rama Rao, K.V., Jayakumar, A.R., Norenberg, M.D., 2012. Glutamine in the pathogenesis of acute hepatic encephalopathy. *Neurochem. Int.* 61, 575–580. doi:10.1016/j.neuint.2012.01.012
- Rama Rao, K.V., Jayakumar, A.R., Tong, X., Alvarez, V.M., Norenberg, M.D., 2010. Marked potentiation of cell swelling by cytokines in ammonia-sensitized cultured astrocytes. *J. Neuroinflammation* 7, 66. doi:10.1186/1742-2094-7-66
- Rama Rao, K.V., Norenberg, M.D., 2012. Brain energy metabolism and mitochondrial dysfunction in acute and chronic hepatic encephalopathy. *Neurochem. Int.* 60, 697–706. doi:10.1016/j.neuint.2011.09.007
- Rangroo Thrane, V., Thrane, A.S., Wang, F., Cotrina, M.L., Smith, N.A., Chen, M., Xu, Q., Kang, N., Fujita, T., Nagelhus, E.A., Nedergaard, M., 2013. Ammonia triggers neuronal disinhibition and seizures by impairing astrocyte potassium buffering. *Nat. Med.* 19, 1643–1648. doi:10.1038/nm.3400
- Record, C.O., 1991. Neurochemistry of hepatic encephalopathy. *Gut* 32, 1261–1263.
- Reinehr, R., Görg, B., Becker, S., Qvartskhava, N., Bidmon, H.J., Selbach, O., Haas, H.L., Schliess, F., Häussinger, D., 2007. Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. *Glia* 55, 758–771. doi:10.1002/glia.20504
- Rodrigo, R., Cauli, O., Gomez-Pinedo, U., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., Garcia-Verdugo, J., Felipo, V., 2010. Hyperammonemia Induces Neuroinflammation That Contributes to Cognitive Impairment in Rats With Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology* 139, 675–684. doi:10.1053/j.gastro.2010.03.040
- Román, E., Córdoba, J., Torrens, M., Guarner, C., Soriano, G., 2013. Falls and cognitive dysfunction impair health-related quality of life in patients with cirrhosis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 25, 77–84. doi:10.1097/MEG.0b013e3283589f49
- Rose, C., 2006. Effect of ammonia on astrocytic glutamate uptake/release mechanisms. *J. Neurochem.* 97 Suppl 1, 11–15. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03796.x

- Rose, C., Kresse, W., Kettenmann, H., 2005. Acute insult of ammonia leads to calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes, an effect of pH. *J. Biol. Chem.* 280, 20937–20944. doi:10.1074/jbc.M412448200
- Rose, C.R., Ransom, B.R., 1996. Mechanisms of H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> changes induced by glutamate, kainate, and D-aspartate in rat hippocampal astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 5393–5404.
- Roselló, D.M., Balestrasse, K., Coll, C., Coll, S., Tallis, S., Gurni, A., Tomaro, M.L., Lemberg, A., Perazzo, J.C., 2008. Oxidative stress and hippocampus in a low-grade hepatic encephalopathy model: protective effects of curcumin. *Hepatology. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatology.* 38, 1148–1153. doi:10.1111/j.1872-034X.2008.00377.x
- Rudman, D., DiFulco, T.J., Galambos, J.T., Smith, R.B., Salam, A.A., Warren, W.D., 1973. Maximal Rates of Excretion and Synthesis of Urea in Normal and Cirrhotic Subjects. *J. Clin. Invest.* 52, 2241–2249. doi:10.1172/JCI107410
- Santi, L., Maggioli, C., Mastroberto, M., Tufoni, M., Napoli, L., Caraceni, P., 2012. Acute Liver Failure Caused by *Amanita phalloides* Poisoning. *Int. J. Hepatology.* 2012, 1–6. doi:10.1155/2012/487480
- 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. doi:10.1002/glia.20019
- Schliess, F., Görg, B., Fischer, R., Desjardins, P., Bidmon, H.J., Herrmann, A., Butterworth, R.F., Zilles, K., Häussinger, D., 2002. Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 739–741. doi:10.1096/fj.01-0862fje
- Schliess, F., Görg, B., Häussinger, D., 2009. RNA oxidation and zinc in hepatic encephalopathy and hyperammonemia. *Metab. Brain Dis.* 24, 119–134. doi:10.1007/s11011-008-9125-2
- Schliess, F., Görg, B., Häussinger, D., 2006. Pathogenetic interplay between osmotic and oxidative stress: the hepatic encephalopathy paradigm. *Biol. Chem.* 387. doi:10.1515/BC.2006.171
- Schliess, F., Häussinger, D., 2003. Cell volume and insulin signaling. *Int. Rev. Cytol.* 225, 187–228.
- Schölmerich, J., Holstege, A., 1990. Aetiology and pathophysiology of chronic liver disorders. *Drugs* 40 Suppl 3, 3–22.
- Schomerus, H., Hamster, W., Blunck, H., Reinhard, U., Mayer, K., Dölle, W., 1981. Latent portasystemic encephalopathy. I. Nature of cerebral functional defects and their effect on fitness to drive. *Dig. Dis. Sci.* 26, 622–630.

- Shah, N.J., Neeb, H., Kircheis, G., Engels, P., Häussinger, D., Zilles, K., 2008. Quantitative cerebral water content mapping in hepatic encephalopathy. *NeuroImage* 41, 706–717. doi:10.1016/j.neuroimage.2008.02.057
- Shawcross, D.L., Wendon, J.A., 2012. The neurological manifestations of acute liver failure. *Neurochem. Int.* 60, 662–671. doi:10.1016/j.neuint.2011.10.006
- Shikhman, A.R., Brinson, D.C., Valbracht, J., Lotz, M.K., 2001. Cytokine regulation of facilitated glucose transport in human articular chondrocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 167, 7001–7008.
- Sobczyk, K., Jördens, M.S., Karababa, A., Görg, B., Häussinger, D., 2015. Ephrin/Ephrin receptor expression in ammonia-treated rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. *Neurochem. Res.* 40, 274–283. doi:10.1007/s11064-014-1389-9
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 7–35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
- Steinhäuser, C., Gallo, V., 1996. News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci.* 19, 339–345.
- Subash, S., Subramanian, P., 2008. Effect of morin on the levels of circulatory liver markers and redox status in experimental chronic hyperammonaemic rats. *Singapore Med. J.* 49, 650–655.
- Szerb, J.C., Butterworth, R.F., 1992. Effect of ammonium ions on synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 39, 135–153.
- Taghibiglou, C., Martin, H.G.S., Lai, T.W., Cho, T., Prasad, S., Kojic, L., Lu, J., Liu, Y., Lo, E., Zhang, S., Wu, J.Z.Z., Li, Y.P., Wen, Y.H., Imm, J.-H., Cynader, M.S., Wang, Y.T., 2009. Role of NMDA receptor-dependent activation of SREBP1 in excitotoxic and ischemic neuronal injuries. *Nat. Med.* 15, 1399–1406. doi:10.1038/nm.2064
- Tanigami, H., Rebel, A., Martin, L.J., Chen, T.-Y., Brusilow, S.W., Traystman, R.J., Koehler, R.C., 2005. Effect of glutamine synthetase inhibition on astrocyte swelling and altered astroglial protein expression during hyperammonemia in rats. *Neuroscience* 131, 437–449. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.10.045
- van den Berg, C.J., Garfinkel, D., 1971. A stimulation study of brain compartments. Metabolism of glutamate and related substances in mouse brain. *Biochem. J.* 123, 211–218.
- Vaquero, J., Butterworth, R.F., 2006. The brain glutamate system in liver failure. *J. Neurochem.* 98, 661–669. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03918.x

- Vince, A., Dawson, A.M., Park, N., O'Grady, F., 1973. Ammonia production by intestinal bacteria. *Gut* 14, 171–177.
- Walz, W., 1999: Cerebral Ischemia: Molecular and Cellular Pathophysiology. In: Springer Science & Business Media. S. 51
- Warskulat, U., Kreuels, S., Müller, H.W., Häussinger, D., 2001. Identification of osmosensitive and ammonia-regulated genes in rat astrocytes by Northern blotting and differential display reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Hepatol.* 35, 358–366.
- Weissenborn, K., Ennen, J.C., Schomerus, H., Rückert, N., Hecker, H., 2001. Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J. Hepatol.* 34, 768–773.
- Wettstein, M., Häussinger, D., 2003. [Hepatic encephalopathy--therapy]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 128, 2658–2660. doi:10.1055/s-2003-45477
- Wettstein, M., Häussinger, D., 1996. [Hepatic encephalopathy, diagnosis and therapy]. *Med. Klin. Munich Ger.* 91, 447–448.
- Willard-Mack, C.L., Koehler, R.C., Hirata, T., Cork, L.C., Takahashi, H., Traystman, R.J., Brusilow, S.W., 1996. Inhibition of glutamine synthetase reduces ammonia-induced astrocyte swelling in rat. *Neuroscience* 71, 589–599.
- Xie, Q.W., Kashiwabara, Y., Nathan, C., 1994. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 269, 4705–4708.
- Zamora, A.J., Cavanagh, J.B., Kyu, M.H., 1973. Ultrastructural responses of the astrocytes to portocaval anastomosis in the rat. *J. Neurol. Sci.* 18, 25–45.
- Zielińska, M., Law, R.O., Albrecht, J., 2003. Excitotoxic mechanism of cell swelling in rat cerebral cortical slices treated acutely with ammonia. *Neurochem. Int.* 43, 299–303. doi:10.1016/S0197-0186(03)00015-9

### **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Dieter Häussinger für die Möglichkeit, meine Promotion am Institut der Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie durchführen zu können und die Betreuung. Auch für die Gelegenheit, Teile der Arbeit auf nationalem und auch internationalem Niveau in Form einer Publikation vorstellen zu dürfen, bin ich sehr dankbar.

Herrn Dr. Boris Görg danke ich für die exzellente Betreuung meiner Doktorarbeit und für den mitreißenden Enthusiasmus für Wissenschaft und Forschung.

Ich danke Herrn Dr. Hans-Jürgen Bidmon aus dem C.u.O. Vogt-Institut für Hirnforschung für die Durchführung von Immunfluoreszenz-Analysen zur Darstellung der Glutaminsynthetase-Expression im Rattenhirn und Frau Prof. Dr. med. Verena Keitel für die Quantifizierung des Genexpressionsniveaus der Glutaminsynthetase mittels Realtime-PCR.

Den technischen Assistenten Herrn Torsten Janssen, Frau Ursula Kristek und Frau Brigida Ziegler danke ich für die Präparation und Kultivierung der Zellen.

Herrn Prof. Dr. Klaus Kröncke aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf möchte ich für die freundliche Bereitstellung von Spermin-NONOate danken.

Ich danke Herrn Dr. Dirk Heitbrink, Herrn Dr. Frank Josten, Herrn Dr. Jan Birkenbeil und Herrn Dr. Bodo Born von der Firma Zeiss für die Bereitstellung von jeglichen Informationen zur VivaTome™-Mikroskopie.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Dr. Andreas Kulawik für die Hilfe bei der grundsätzlichen Validierung der Volumenberechnung mit der VivaTome™-Mikroskopie durch *Microspheres* bedanken.

Ich danke der deutschen Forschungsgemeinschaft und den Sonderforschungsbereichen SFB 575 und SFB 974 für die ideelle und finanzielle Unterstützung meiner Doktorarbeit.

Auch möchte ich mich bei Frau Dr. Sandra Berger stellvertretend für das Graduiertenkolleg bedanken. Mitglied im Graduiertenkolleg und Sonderforschungsbereich zu sein, stellte eine große wissenschaftliche Bereicherung für mich dar.

## Danksagung

---

Der *Medical Research School* der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und Frau Dr. Ursula Kessen danke ich für die organisatorische Begleitung und Unterstützung meiner Promotionsarbeit.

Ich danke Frau Dr. Ayse Karababa und Dr. Jessica Oenarto für den gemeinsamen Weg zur Promotion und die nicht nur wissenschaftliche, sondern auch freundschaftliche Unterstützung.

Schließlich bedanke ich mich von Herzen bei meinen Eltern Dr. Rolf und Vera Lachmann und meinen beiden Geschwistern Mark und Eva Lachmann für die jahrelange ausdauerhafte, kontinuierliche Hilfe und den Zuspruch.

**Eidesstattliche Erklärung**

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

---

Datum, Vor- und Nachname