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

CD95 Ligand-induzierte CD95-Tyrosin-Nitrierung in Astrozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Katrin Molavi Tabrizi

2017

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

gez.:

Dekan:	UnivProf. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter:	Prof. Dr. med. Roland M. Reinehr
Zweitgutachterin:	Prof. Dr. rer. nat. Olga A. Sergeeva

Zusammenfassung

Dass Astrozyten den Todesrezeptor CD95 exprimieren, ist in der Literatur hinreichend beschrieben. Doch welche physiologische Rolle dieser Rezeptor in Astrozyten spielt, wurde in dieser Arbeit genauer analysiert. Normalerweise wird nach Bindung des CD95 Liganden (CD95L) ein primär apoptotischer Signalweg eingeleitet. Astrozyten gelten aber gemeinhin als apoptoseresistente Zellen mit Stammzellcharakter. So wurde in der vorliegenden Arbeit das Zellverhalten nach Stimulation mit CD95L und weiteren Liganden dieser Todesrezeptorfamilie, wie Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-[] und *Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand* (TRAIL), untersucht.

Die Eigenschaft der Apoptoseresistenz wurde unterstrichen, indem mittels *Terminal deoxynucleotidyl transferasemediated X-dUTP nick end labeling* (TUNEL)-Technik eine fehlende Apoptoseinduktion nach verschiedenen Todesstimuli aufgezeigt werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte über Natriumdodecylsulfat (SDS)/ Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western Blot nach CD95L-Stimulation eine Aktivierung der als apoptotisch geltenden Stresskinase c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) in Astrozyten detektiert werden. Dies könnte darin begründet liegen, dass gleichzeitig aktivierte anti-apoptotische Signalwege das JNK-vermittelte Apoptosesignal unterdrücken oder nur eine transiente und damit nicht kontinuierliche Aktivierung zu verzeichnen ist. Für einen simultan aktivierten inflammatorischen Signalweg spricht die mittels SDS/PAGE und Western Blot nachgewiesene CD95L-induzierte Aktivierung der p38-Mitogen-aktivierten Proteinkinase. Dass eine CD95-Tyrosin-Nitrierung (CD95-Y-NO₂) als möglicher Grund für die Resistenz der Astrozyten gegenüber der CD95Linduzierten Apoptose sein könnte, wurde bislang noch nicht untersucht. In dieser Arbeit konnte nun über ein Gesamtnitrierungsprofil gezeigt werden, dass CD95L Protein-Tyrosin-Nitrierungen (PTN) in Astrozyten induziert, Immunpräzipitationsexperiente detektierten sogar zeit- und konzentrationsabhängige CD95L-induzierte CD95-Y-NO₂. Neben CD95L führten auch TNF-[] und TRAIL zu einer CD95-Y-NO₂, was eine mögliche Verbindung zwischen den verschiedenen Todesrezeptorsystemen nahelegt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass es im Rahmen der hepatischen Enzephalopathie zur Astrozytenschwellung und zu PTN kommt. Basierend auf der vorliegenden Arbeit kann man die Hypothese aufstellen, dass diese Nitrierungen im Rahmen der Zellschwellung auch zu einer CD95-Y-NO2 führen könnten. Wäre das der Fall, könnte die Reversibilität der hepatischen Enzephalopathie unter anderem darin begründet liegen, dass Astrozyten durch die CD95-Y-NO2 vor CD95L-induzierter Apoptose geschützt werden. Um die zugrundeliegenden Mechanismen der CD95L-induzierten CD95-Y-NO2 zu analysieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit Inhibitorstudien durchgeführt. Es ist bekannt, dass die Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphatoxidase (NADPH-Oxidase) bei der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in Astrozyten beteiligt ist und zur kovalenten Modifikation von Proteinen führen kann. Übereinstimmend mit dieser Annahme, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine signifikante Hemmung der CD95-Y-NO2 durch Thiouracil oder Apocynin, einem Inhibitor der NADPH-Oxidase. Wie in der Literatur bereits beschrieben, konnte Thiouracil auch in hepatischen Sternzellen eine signifikante Hemmung der CD95L-induzierten CD95-Y-NO2 verzeichnen, was auf einen ähnlichen Mechanismus in Astrozyten und hepatischen Sternzellen hindeuten könnte. Wie bereits aus Hepatozyten bekannt, könnte freies Peroxynitrit auch in Astrozyten eine mögliche Quelle für die CD95-Y-NO2 darstellen, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen. Dagegen spricht allerdings, dass Superoxiddismutase/Katalase hier zu keiner Hemmung der CD95-Y-NO2 führten. Stickstoff scheint allerdings eine Rolle bei der CD95-Y-NO2 zu spielen, da der Stickstoff-Synthetase-Inhibitor N(G)-Monomethyl-L-Arginin zu einer Hemmung der CD95-Y-NO2 führte. In der vorliegenden konnte durch den intrazellulären Calcium-Chelator 1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Arbeit Tetraessigsäure (BAPTA) eine Hemmung der CD95-Y-NO2 erzielt werden. In Übereinstimmung damit zeigen verschiedene Ergebnisse aus der Literatur eine Hemmung von PTN durch BAPTA. Der als unselektiv geltende

Cyclooxygenase-Hemmer Indomethacin führte zu keiner Hemmung der CD95L-induzierten CD95-Y-NO₂; scheinbar spielt die Cyclooxygenase keine große Rolle bei der CD95-Y-NO₂.

Die Stimulation mit CD95L führte aber nicht nur zur fehlenden Apoptose und zur CD95-Y-NO₂, sondern sogar zur Zellproliferation, was die 5-Bromo-2'-desoxy-Uridin (BrdU)-Versuche aufzeigen und den Stammzellcharakter der Astrozyten untermauert. Aus der Literatur ist bekannt, dass Todesrezeptoren nicht nur an apoptotischen, sondern auch an zellproliferativen Prozessen beteiligt sind. In dieser Arbeit führt die Stimulation mit CD95L auch zur Aktivierung von wachstumsfördernden Kinasen wie *Extracellular-signal regulated kinase* (Erk). Die Proteinkinase Akt gilt als anti-apoptotische Kinase, die nach CD95L-Stimulation aktiviert wurde, wie diese Arbeit zeigt. In Übereinstimmung damit weist die Literatur auf, dass nach Blockade dieses Signalweges die CD95L-induzierte Astrozytenproliferation gehemmt wird. In hepatischen Sternzellen gilt eine c-Src-Aktivierung als wichtiges Element im mitogenen Signalweg. Auch in dieser Arbeit konnte eine CD95L-induzierte c-Src-Aktivierung beobachtet werden. Außerdem ist der Tyrosinrest 845 des Wachstumsrezeptors *Epidermal growth factor receptor* (EGFR) eine Zielstruktur der Src-Kinasen, sodass die Rolle des EGFR nach CD95L-Stimulation im Rahmen des mitogenen Signalweges in Zukunft analysiert werden sollte.

Abkürzungsverzeichnis

Α	Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor-1
	Akt	Proteinkinase B (PKB)
	ATP	Adenosintriphosphat
в	BAPTA	1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
	Bcl	B-cell lymphoma
	BDGF	brain derived neurotrophic growth factor
	BrdU	5-Bromo-2'-desoxy-Uridin
	BSA	Bovine serum albumin
С	Caspasen	Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen
	Ca ²⁺	Calcium
	ССМ	Complete cytokine mix
	CD	Cluster of Differentiation
	CD95	CD95-Rezeptor (Fas/Apo-1-Rezeptor)
	CD95L	CD95 Ligand
	CD95-Y-NO ₂	CD95-Tyrosin-Nitrierung
	c-FLIP	Cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1β-converting enzyme-inhibitory protein
	CFF	Kritische Flimmerfrequenz
	СНХ	Cycloheximid
	c-Src	Akronym aus cellular und sarcoma Kinase
	Cyclooxygenase	COX
	Су-3	Carbocyanin-3
D	DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
	DD	Death domain
	DED	Death-effector-domain

	DISC	Death-inducing signaling complex
	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
	DNS	Desoxyribonukleinsäure
	DTT	Dithiothreitol
	Duox	Duale Oxidase
Е	EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
	EGF	Epidermal growth factor
	EGF(R)	Epidermal growth factor (receptor)
	EGTA	Ethylenglycol-bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetat
	ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
	Erk	Extracellular-signal regulated kinase
F	FADD	Fas-associated death domain
	FAP-1	Fas-associated protein phosphatase-1
	FCS	Fetal calf serum
	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	GABA	Gamma-Aminobuttersäure
	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphodehydrogenase
	GFAP	Glial fibrillary acidic protein
	GS	Glutamin-Synthetase
н	HE	Hepatische Enzephalopathie
	Hsp	Heat-shock protein
	HSZ	Hepatische Sternzellen
	H_2O_2	Wasserstoffperoxid
I	ICC	Immunzytochemie
	ILGF	insulin-like growth factor
	IP	Immunpräzipitation

	ISHEN	International Society of Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism		
J	JNK	c-Jun-N-terminale Kinase		
к	kD	Kilodalton		
L	L-NMMA	N(G)-Monomethyl-L-Arginin		
	LSM	Laserscanning-Mikroskop		
М	МАРК	Mitogen-activated protein kinases; Mitogen-aktivierte Proteinkinasen		
	MHE	Minimale hepatische Enzephalopathie		
	mRNA	Mitochondriale Ribonukleinsäure		
	Mn	Mangan		
	MSO	Methionin-Sulfoximin		
N	NADPH-Oxidase	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphatoxidase		
	NGF	nerve growth-factor		
	NKCC1	Na-K-2CI-Kotransporter		
	NMDA	N-Methyl-D-Aspartat		
	NO	Nitric oxide, Stickstoff		
	NOS	NO-Synthetase		
	Nox	NADPH-Oxidase		
	n.s.	nicht signifikant		
Ρ	Ρ	Phosphorylierung		
	PAA	Polyacrylamid		
	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
	PBR	Peripherer Benzodiazepinrezeptor		
	PBS	Phosphate buffered saline		
	PDGF	platelet derived growth factor		
	PET	Positronen-Emissions-Tomographie		

	PFA	Paraformaldehyd
	PH Domäne	Pleckstrin-homologe Domäne
	РІЗК	Phosphoinositid-3-Kinasen
	РКВ	Proteinkinase B (Akt)
	PSN	Penicillin, Streptomycin, Neomycin
	PTN	Protein-Tyrosin-Nitrierung
	p38 ^{mapk}	p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase
R	rHSZ	Ruhende hepatische Sternzellen
	RNA	Ribonukleinsäure
	RNS	Reaktive Stickstoffspezies
	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
	rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
	RT	Raumtemperatur
S	SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
	SH	src homology
	SEM	Standard Error of the Mean
	SDS	Natriumdodecylsulfat
	SOD	Superoxiddismutase
	Sp1	Spezifitätsprotein-1
т	tBid	Trunktiertes Bid
	TBS-T	Tris-buffered saline with Tween
	TdT	Terminale-Desoxynucleotidyl-Transferase
	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
	ТМВ	Tetramethyl-Benzidin
	TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
	TRAIL	Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand

	TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated X-dUTP nick end labeling
	Tyr	Tyrosin(-rest)
z	ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

Z	usammer	nfassung	I
A	bkürzung	jsverzeichnis	
1	Einleitu	Ing	1
	1.1 Ph	ysiologie der Apoptose	1
	1.1.1	Charakterisierung des CD95-Rezeptors (CD95)	1
	1.1.2	CD95/CD95L-Signalweg	3
	1.2 Pro	otein-Tyrosin-Nitrierungen (PTN)	5
	1.3 Ph	ysiologie der Zellproliferation	6
	1.4 Pro	o- und anti-apoptotische Kinase-Wege	7
	1.4.1	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)	7
	1.4.1	1.1 Extracellular-signal regulated kinase (Erk)	8
	1.4.1	1.2 C-Jun-N-terminale Kinase (JNK)	8
	1.4.1	1.3 p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38 ^{MAPK})	8
	1.4.2	Proteinkinasen der Src-Familie	9
	1.4.3	Proteinkinase B (PKB, Akt)	9
	1.5 As	trozyten	10
	1.5.1	Charakterisierung von Astrozyten	10
	1.5.2	Klinische Integration am Beispiel der hepatischen Enzephalopathie (HE)	12
	1.5.2	2.1 Definition und Klassifizierung der HE	12
	1.5.2	2.2 Pathophysiologie der HE	13
	1.6 Fra	igestellung und Zielsetzung	18
2	Method	len und Material	19
	2.1 Me	thoden	19
	2.1.1	Isolierung und Kultivierung von Astrozyten	19
	2.1.2	Gewinnung von Proteinlysaten	19
	2.1.3	Proteinmengenbestimmung	19
	2.1.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	20
	2.1.5	Proteintransfer	20
	2.1.6	Western Blot-Hybridisierung und Detektion	20
	2.1.7	Immunpräzipitation	21
	2.1.8	Immunzytochemische Färbung	21
	2.1.9	Proliferationstest mittels BrdU-ELISA	22
	2.1.10	Apoptosequantifizierung mittels TUNEL-Markierung	22
	2.1.11	Statistische Methoden	22

	2.2	Mat	terial	.23
	2.2	2.1	Medien und Lösungen in der Zellkultur	.23
	2.2	2.2	Liganden für die Stimulation	.24
	2.2	2.3	Lösungen zur Proteinanalytik	.24
	2.2	2.4	Antikörper zur Proteinanalytik	.26
	2.2	2.5	Lösungen für die Immunzytochemie	.26
	2.2	2.6	Antikörper für die Immunzytochemie	.27
	2.2	2.7	Inhibitoren	.27
	2.2	2.8	Reagenzien	.27
3	Erg	ebn	isse	28
	3.1	Cha	arakterisierung von Astrozyten	28
	3.2	Feł	nlende Apoptose-Induktion in Astrozyten nach CD95L-Stimulation	.28
	3.3	CD	95L-induzierte JNK-Aktivierung und p38 ^{MAPK} -Aktivierung	29
	3.4	CD95L-induzierte Protein-Tyrosin-Nitrierung in Astrozyten		
	3.5	CD	95L-induzierte CD95-Tyrosin-Nitrierung in Astrozyten	.32
	3.6	Todesrezeptor-Liganden-induzierte CD95-Tyrosin-Nitrierung		
	3.7	Mechanismus der CD95L-induzierten CD95-Tyrosin-Nitrierung		
	3.8	8 CD95L stimuliert die Proliferation von Astrozyten		
4	Diskussion40			
	4.1	CD	95L als mitogenes, anti-apoptotisches Signal in Astrozyten	40
	4.2	Me	chanismus der CD95L-induzierten CD95-Tyrosin-Nitrierung	.45
	4.3	Scł	nlussfolgerung	49
5	Lite	rati	ryorzoichnis	51
J				
D	anksa	agur	ng	.65
Ei	idess	tattl	iche Versicherung	.66

1 Einleitung

1.1 Physiologie der Apoptose

Die Apoptose ist als programmierter Zelltod Teil des Stoffwechsels der Zelle und wird kontrolliert gesteuert, um die Gewebshomöostase zu bewahren (Jacobson et al., 1997; Steller, 1995).

Carl Vogt, ein deutsch-schweizerischer Naturwissenschaftler, beschrieb 1842 erstmals bei Untersuchungen über die Entwicklung von Kaulquappen das Phänomen der Apoptose, dessen Bedeutung aber erst im 20. Jahrhundert durch die Pathologen John F. R. Kerr, Andrew Wyllie und Alastair R. Currie geprägt wurde (Kerr et al., 1972).

Für die Entwicklung des Organismus ist Apoptose essentiell. So werden z.B. die Zellanzahl und somit die Gewebsgröße durch Apoptose kontrolliert, Keimzellen selektiert oder entartete Zellen möglichst eliminiert.

Im Unterschied zur Nekrose, dem pathologischen und passiven Untergang von Zellen z.B. infolge extrazellulärer Noxen, läuft die Apoptose geordnet ab und weist folgende morphologische und biochemische Kennzeichen auf: Sie wird durch Zellschrumpfung, Zellkernkondensation, Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Fragmentierung und Bildung sogenannter Apoptosekörperchen, die von der Zelloberfläche abgeschnürt werden, beschrieben (Kerr et al., 1972). Diese Apoptosekörperchen werden durch phagozytierende Zellen vernichtet, ohne jedoch einen Entzündungsprozess auszulösen (Devitt et al., 1998). Nekrose dagegen führt durch Zellschwellung, Einreißen der Zellmembran, Austreten von Zytoplasma und lysosomalen Enzymen und nach Freisetzen von inflammatorischen Mediatoren zur Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes (Wyllie, 1997).

Apoptose kann sowohl durch exogene Stimuli, z.B. durch einen Mangel an Wachstumsfaktoren oder über die Aktivierung Apoptose-vermittelnder Rezeptoren, sogenannten Todesrezeptoren, als auch durch endogene Reize ausgelöst werden. DNS-Schäden durch UV-Licht-Bestrahlung, Stress in Form reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) oder chemische Substanzen zählen zur Gruppe der endogenen Stimuli (Barr and Tomei, 1994). Je nach Stimulus unterscheidet man demnach einen extrinsischen (Apoptose vom Typ I) und einen intrinsischen Signalweg (Apoptose vom Typ II) (Ashkenazi and Dixit, 1999; Green and Reed, 1998), die beide in der Aktivierung der sogenannten Caspasen (Akronym für Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen), einer zur Apoptose führenden Signalkaskade, münden.

Diese Arbeit konzentriert sich auf die durch Todesrezeptoren vermittelte Reaktion in Astrozyten. Im folgenden Kapitel 1.1.1 wird einer der bekanntesten Todesrezeptoren, CD95, erläutert.

1.1.1 Charakterisierung des CD95-Rezeptors (CD95)

Der CD95 (Fas/Apo-1)-Rezeptor weist je nach Glykosylierungszustand ein Molekulargewicht von 45-52 Kilodalton (kD) auf und gilt als Prototyp der Todesrezeptoren. Er bildet mit dem Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-[] und den *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand* (TRAIL)-Rezeptoren 1 und 2 eine Untergruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie. Sie zeichnen sich alle durch eine intrazelluläre Todesdomäne (*death domain*, DD) aus (Schulze-Osthoff et al., 1998), an die sich Adaptermoleküle, die selbst eine DD besitzen, anlagern können und so eine Signalkaskade auslösen (s. Kapitel 1.1.2).

Die Signalkaskade des CD95-Rezeptors kann entweder durch Bindung seines Liganden oder durch Anheften eines agonistischen Antikörpers an den CD95-Rezeptor induziert werden (Locksley et al., 2001). Durch Zellinteraktion spielt CD95 als Induktor des apoptotischen Zelltodprogramms eine wichtige Rolle, gewährleistet so beispielsweise die Gewebshomöostase und die Kontrolle immunologischer Zellfunktionen (Ashkenazi and Dixit, 1998). Eine CD95-Apoptoseinduktion durch den CD95L wurde erstmals an einer B-lymphoblastischen Zelllinie beschrieben (Trauth et al., 1989). Zur gleichen Zeit beschrieben Yonehara et al. ein Molekül, welches sie als Fas bezeichneten und die gleichen Eigenschaften aufwies wie CD95 (Yonehara et al., 1989). Nach anschließender Sequenzierung wurde bewiesen, dass es sich um das gleiche Molekül handeln muss (Oehm et al., 1992), welches heutzutage nach der *Cluster of Differentiation* (CD)-Nomenklatur als CD95-Rezeptormolekül bezeichnet wird.

CD95 besitzt drei Tyrosinreste (Tyr) (Oehm et al., 1992): Innerhalb der Todesdomäne befinden sich Tyr²³² und Tyr²⁹¹, der dritte Tyrosinrest (Tyr⁹¹) liegt im Bereich des N-Terminus (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995), was in Abb. 1 schematisch dargestellt ist. Die Phosphorylierung der beiden Tyrosinreste innerhalb der Todesdomäne ist für die CD95-Aktivierung und Apoptoseeinleitung essentiell (Eberle et al., 2005).



Abb. 1: Schematische Darstellung des CD95 (Modifiziert nach Eberle et al., 2005; Oehm et al., 1992) CD95 besitzt drei Tyrosinreste: Im Extrazellularraum befindet sich Tyr⁹¹, intrazellulär innerhalb der Todesdomäne sind Tyr²³² und Tyr²⁹¹ lokalisiert. Die Phosphorylierung von Tyr²³² und Tyr²⁹¹ ist für die CD95-Aktivierung und Einleitung der Apopotse notwendig. Außerdem wurden extrazellulär zwei potentielle Glykosylierungsstellen beschrieben.

(CD95: CD95-Rezeptor; Tyr: Tyrosinrest)

Neben dem Vorkommen in der Leber wird CD95 auch bereits während der Embryonalentwicklung in Astrozyten exprimiert (Kim et al., 2007). Sein Ligand (CD95L) wurde u.a. in Astrozyten (Bechmann et al., 2002) und Mikroglia (Bonetti and Raine, 1997) detektiert. Dass CD95 also in Astrozyten nachzuweisen ist, wurde in der Literatur hinreichend beschrieben. Seine physiologische Rolle in diesen Zellen soll allerdings in dieser Arbeit genauer analysiert werden.

1.1.2 CD95/CD95L-Signalweg

Nach Bindung von CD95L oder eines agonistischen Antikörpers an den CD95-Rezeptor wird ein primär apoptotischer Signalweg ausgelöst, indem zunächst CD95 zur Stabilisierung trimerisiert und *Fas-associated death domain* (FADD) im Folgenden rekrutiert wird. FADD bindet mit einer Todesdomäne am C-Terminus an die intrazelluläre Todesdomäne von CD95. An einem N-terminalen Ende besitzt FADD eine Todeseffektordomäne (DED, *death-effector-domain*), die weitere Proteine, wie die inaktiven Initiatorcaspasen Procaspase-8 oder-10, bindet. Der gebildete Proteinkomplex aus CD95, FADD und angelagerter Caspase-8 wird als *death-inducing signaling complex* (DISC) bezeichnet (Sancho-Martinez and Martin-Villalba, 2009).

Nach Scaffidi et al. unterscheidet man abhängig vom Zelltyp grundlegend zwei Wege, die über Todesrezeptoren Apoptose auslösen (Scaffidi et al., 1998) und im Folgenden grafisch dargestellt werden (Abb. 2):

In Typ I-Zellen (z.B. Lymphozyten), die eine hohe Dichte an Caspase-8 am DISC aufweisen (Medema et al., 1997), spaltet und aktiviert die Initiatorcaspase direkt, unter Umgehung der Mitochondrien, die Effektorcaspase-3. Bei Typ II-Zellen (z.B. Hepatozyten) hingegen führt erst die Amplifikation durch Mitochondrien zur Caspase-8-Aktivierung. Caspase 8 spaltet daraufhin das pro-apoptotische Protein Bid, gefolgt von der Aktivierung weiterer Mitglieder der *B-cell lymphoma* (bcl)-2-Familie. Es folgt die Translokation des trunktierten Bid (tBid) zu den Mitochondrien, der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und eine Cytochrom c-Freisetzung (Gross et al., 1999). Über die Bildung des Apoptosoms, bestehend aus Cytochrom c, Adenosintriphosphat (ATP) und *apoptotic protease-activating factor-1* (Apaf-1), wird die Caspase-9 aktiviert, die anschließend als gemeinsame Endstrecke beider Wege die Aktivierung der Effektorcaspase-3 induziert (Malhi et al., 2006).



Abb. 2: Liganden-abhängige Apoptose in Typ I- und Typ-II Zellen

Nach Bindung des CD95 Liganden an den Todesrezeptor CD95 wird Letzterer zur Stabilisierung trimerisiert und die *Fas-associated death domain* (FADD) rekrutiert. Es folgt die Assoziation von FADD an die Todesdomänen von CD95 (DD). Im Folgenden lagern sich die inaktiven Procaspasen-8/-10 an die DED von FADD an. Diesen Komplex aus CD95, FADD und Caspase-8 bezeichnet man als *death-inducing signaling complex* (DISC). In sogenannten Typ I-Zellen wird direkt, unter Umgehung der Mitochondrien, die Effektorcaspase-3 aktiviert, die die Apoptose einleitet. In Typ II-Zellen hingegen benötigt es erst einer Amplifikation durch die Mitochondrien: Die Caspase-8 spaltet das pro-apoptotische Protein Bid zu tBid, dieses transloziert zu den Mitochondrien und setzt dort das Membranpotential herab. Gefolgt wird dies von einer mitochondrialen Cytochrom c-Freisetzung. Das Apoptosom, bestehend aus Cytochrom c, ATP und Apaf-1, führt zur Aktivierung der Caspase-9 und der Signalweg mündet in der gemeinsamen Endstrecke, der Aktivierung der Effektorcaspase-3.

(Apaf-1: *apoptotic protease-activating factor-1;* ATP: Adenosintriphosphat; CD95L: CD95 Ligand; DD: *death domain;* DED: *death-effector-domain;* DISC: *death-inducing signaling complex;* FADD: *Fas-associated death domain;* tBid: trunkiertes Bid)

CD95 wurde als membranständiger Todesrezeptor (Typ I-Transmembranprotein) bekannt (Sancho-Martinez and Martin-Villalba, 2009). In unstimulierten Hepatozyten wurde jedoch eine überwiegend intrazelluläre Lokalisation des CD95-Rezeptors beschrieben (Reinehr et al., 2002; Sodeman et al., 2000): Der größte Teil befindet sich im Golgi-Komplex und im Trans-Golgi-Netzwerk (Bennett et al., 1998). Modifikationen des CD95-Proteins lösen verschiedene Signalkaskaden und Reaktionen in der Zelle aus: In Hepatozyten kommt es nach Stimulation mit CD95L, hydrophoben Gallensäuren oder Hyperosmolarität zur Translokation des CD95 aus dem Inneren der Zelle zur Plasmamembran und somit zur Sensitivierung hinsichtlich CD95L-induzierter Apoptose (Graf et al., 2002; Reinehr et al., 2002). In einer speziellen Kultur von humanen Leberkrebszellen, sogenannten Huh7-Zellen, konnte ebenso unter hyperosmolaren Bedingungen eine Umverteilung des aktivierten CD95 aus dem Zellinneren an die Plasmamembran aufgezeigt werden (Eberle et al., 2005). Dabei spielt die CD95-Tyrosin-Phosphorylierung eine zentrale Rolle, die mit der CD95-Membrantranslokation assoziiert ist (Reinehr et al., 2003). Peroxynitrit hingegen induziert eine CD95-Tyrosin-Nitrierung (CD95-Y-NO₂) in Hepatozyten; diese Tyrosin-Nitrierung des CD95 verhindert eine hyperosmotisch- oder CD95Linduzierte CD95-Aktivierung in Hepatozyten (Reinehr et al., 2004). CD95-Tyrosin-Phosphorylierung und CD95-Tyrosin-Nitrierung scheinen sich demnach gegenseitig auszuschließen. Die CD95-Tyrosin-Phosphorylierung wurde als eine notwendige Voraussetzung für dessen Aktivierung und die Apoptoseeinleitung identifiziert (Reinehr et al., 2005b, 2003).

Hieraus ergibt sich die nächste Frage: Führt die Stimulation mit dem Todesligand CD95L in Astrozyten zur zu erwartenden Apoptose?

Neben pro-apoptotischen Signalwegen sind aber auch anti-apoptotische Funktionen über CD95 bekannt: So kann über das CD95-System auch die Proliferation humaner T-Lymphozyten (Alderson et al., 1993) oder von Fibroblasten (Aggarwal et al., 1995) induziert werden oder die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen in verschiedenen Zelltypen, wie beispielsweise in Astrozyten, generiert werden (Choi and Benveniste, 2004; Falsig et al., 2004). Abhängig von der zellulären Umgebung scheint CD95 also gewebespezifische Funktionen auszuüben und kann pro- oder anti-apoptotische Singalwege einleiten (Strasser et al., 2009). Dennoch sind die Mechanismen, die den anti-apoptotischen Prozessen zugrunde liegen, zum aktuellen Zeitpunkt weitgehend unbekannt. Interessanterweise wird in ruhenden hepatischen Sternzellen (rHSZ) nach Stimulation mit CD95L eine CD95-Tyrosin-Nitrierung ausgelöst, die die Zelle vor Apoptose schützt und dabei sogar als mitogenes Signal dient (Reinehr et al., 2008). Welche tyrosin-nitrierten Proteine bereits entdeckt wurden und welche funktionellen Folgen damit zusammenhängen, wird im nächsten Kapitel 1.2 dargestellt.

1.2 Protein-Tyrosin-Nitrierungen (PTN)

Bei einer Vielzahl von Proteinen wurde über eine spezifische Tyrosin-Nitrierung berichtet, dessen Folge eine Inaktivierung des Proteins sein kann (Souza et al., 1999). Von Bedeutung war die Identifizierung der Tyrosin-Nitrierung der Glutamin-Synthetase, deren Konsequenz in einer Inaktivierung des Enzyms liegt (Schliess et al., 2002): Dies resultiert in einer reduzierten intrazellulären Glutaminakkumulation, einer verminderten Astrozytenschwellung, weniger Ca²⁺-Einstrom und weniger NO- bzw. ROS-Produktion, sodass der Zustand erhöhter Ammoniak-Werte im

Blut beispielsweise bei der hepatischen Enzephalopathie (HE) dadurch verbessert wird. Weitere Benzodiazepinrezeptor Proteine wie der periphere (PBR), die Glycerinaldehyd-3phosphodehydrogenase (GAPDH), Extracellular-signal regulated kinase (Erk)-1 (Schliess et al., 2002) oder der Na-K-2CI-Kotransporter (NKCC1) (Jayakumar et al., 2008) können Tyrosin-nitriert werden. Eine PTN des NKCC1 scheint die Transportaktivität des Kanals sogar zu verstärken, ähnlich einer NKCC1-Phosphorylierung (Jayakumar et al., 2008). Die PTN der GAPDH durch Peroxynitrit geht mit einer Inaktivierung des Enzyms einher (Buchczyk et al., 2000). Während die PTN Enzyme wie die Glutamin-Synthetase demnach inaktivieren kann (Görg et al., 2007) und eine Hemmung der PTN mit einer Verbesserung einer Ammoniak-Intoxikation assoziiert ist (Kosenko et al., 2004), scheint die PTN Hepatozyten vor Apoptose zu schützen (Reinehr et al., 2004): Hier verhindert die CD95-Tyrosin-Nitrierung die CD95L-induzierte CD95-Aktivierung in Hepatozyten und es wird keine Apoptose eingeleitet, da sich CD95-Tyrosin-Nitrierung und CD95-Tyrosin-Phosphorylierung aus sterischen Gründen gegenseitig ausschließen. In ruhenden hepatischen Sternzellen ist nach Stimulation mit CD95L eine CD95-Tyrosin-Nitrierung zu detektieren, die die Zelle auch vor Apoptose schützt; CD95L fungiert hier sogar als Mitogen, die rHSZ proliferieren (Reinehr et al., 2008). Eine weitere Frage, die in diesem Zusammenhang in dieser Arbeit untersucht werden soll, lautet: Kann durch CD95L-Stimulation eine Protein-Tyrosin-Nitrierung, vielleicht sogar eine CD95-Tyrosin-Nitrierung nachgewiesen werden?

1.3 Physiologie der Zellproliferation

Dass CD95L über eine CD95-Tyrosin-Nitrierung in rHSZ als Mitogen funktioniert und zur Zellproliferation führt, wurde im vorherigen Kapitel 1.2 beschrieben. Führt eine Stimulation mit dem Todesrezeptorligand CD95L auch zu einer Proliferation von Astrozyten? Doch was genau bedeutet Proliferation und welche Signalwege und Rezeptoren spielen dabei eine Rolle?

Der Begriff Proliferation stammt aus dem Latein und leitet sich von *proles* – Nachwuchs und *ferre* – tragen ab. Die Zellproliferation spielt eine Rolle bei dem Ersatz von (Blut-)Zellen, der Entwicklung und Wachstum von Zellen, der Regeneration und Wundheilung und der Kanzerogenese. Die prinzipielle Aufgabe der Zellteilung versteht sich in der Replikation der chromosomalen DNS und die Verteilung auf zwei genetisch identische Tochterzellen. Eine unkontrollierte und ungehemmte Zellproliferation führt zu einem Tumor; dies kann ausgelöst werden durch virale Infektionen, Mutation von Protoonkogenen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen.

Wachstumsfaktoren, von denen ständig neue entdeckt werden, steuern die Proliferation. Neurotrophine, *nerve growth-factor* (NGF), *brain derived neurotrophic growth factor* (BDGF), *platelet derived growth factor* (PDGF), *insulin-like growth factor* (ILGF), *epidermal growth factor* (EGF), eine ansteigende Anzahl von Zytokinen und Hormone wie Insulin, Thrombopoietin, Erythropoietin und Somatotropin sind nur ein Ausschnitt der Stimuli, die die Proliferation regulieren.

Auch Calcium ist ein wichtiger intrazellulärer Botenstoff, der die Proliferation beeinflusst: Eine intrazelluläre Calcium-Erhöhung kann zur Zellproliferation führen, während eine Überladung proapoptotische Wirkung hat (Berridge et al., 2000).

Der Großteil der Rezeptoren für Wachstumsfaktoren sind Transmembranproteine mit einer eigenen Tyrosinkinaseaktivität (Schlessinger and Ullrich, 1992). Der epidermal growth factor receptor (EGFR) ist einer dieser Transmembranproteine und gehört zur sogennanten ErbB-Familie, zu denen auch HER2/c-neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) und HER4 (ErbB-4) zählen und kommt beim Menschen ubiquitär vor. EGFR besteht aus einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne, einer transmembranären Ankerstruktur und einer extrazellulären, glykosylierten Ligandenbindungsstelle (Schlessinger, 2002). Der Tyrosinrest Tyr⁸⁴⁵ des EGFR ist eine Zielstruktur der Src-Kinasen (Biscardi et al., 1999), der Tyrosinrest Tyr¹⁰⁴⁵ dient der Internalisierung und Tyr¹¹⁷³ der Autophosphorylierung. Die Bindung des Liganden EGF führt zur Rezeptordimerisierung. Daraus resultiert eine Autophosphorylierung von spezifischen Tyrosinresten in der intrazellulären Region des EGFR. Die nachgeschaltete Signaltransduktion führt dazu, dass andere Proteine mit dem Rezeptor beispielsweise über die src homology (SH)2-Domäne interagieren können. Diese Proteine können dann weitere Signalwege, wie den Mitogen-aktivierten-Proteinkinaseweg induzieren. Dessen Signalkaskade führt dazu, dass das Signal über Transkriptionsfaktoren in den Zellkern übermittelt wird und die Transkription von Genabschnitten reguliert werden kann (Voldborg et al., 1997). Welche Kinasewege in dieser Arbeit untersucht werden, wird in Kapitel 1.4 erläutert.

1.4 Pro- und anti-apoptotische Kinase-Wege

1.4.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

Die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen gehört zu den Serin-/Threoninkinasen und ist an Signaltransduktionenwegen beteiligt, die für die Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zelltod und inflammatorischen Prozessen mitverantwortlich sind. Sie transformieren extrazelluläre in intrazelluläre Signalwege. Zellulärer Stress, Wachstumsfaktoren und Zytokine gehören zu den Stimuli, die die Signalkaskade der MAPK induzieren können (Herlaar and Brown, 1999). **Diese Arbeit soll analysieren, welche Signalwege durch CD95L-Stimulation in Astrozyten beeinflusst werden.**

Eine Aktivierung der Kinasen erfolgt durch Phosphorylierungen an ihren Aminosäureresten. Es sind in der Regel mehrere Kinasen hintereinander geschaltet, um eine Aktivierung des MAPK-Signalweges zu erreichen (Errede et al., 1995; Gustin et al., 1998). Die Phosphorylierungskaskade beginnt mit einer Aktivierung einer MAP-Kinase-Kinase-Kinase, die eine nachgeschaltete MAP-Kinase-Kinase phosphoryliert und die wiederum die MAPK aktiviert. Die aktivierte MAPK ihrerseits kann nun beispielsweise Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und sie somit aktivieren. Die Proteinphosphorylierungen der MAPK können durch sogenannte Phosphatasen wieder entfernt und die MAPK auf diese Weise inaktiviert werden. Man unterscheidet drei Untergruppen der MAPK:

- Extracellular-signal regulated kinase (Erk)
- c-Jun-N-terminale Kinase (JNK)
- p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38^{MAPK})

1.4.1.1 Extracellular-signal regulated kinase (Erk)

Zu dieser Gruppe gehören mindestens acht Isoformen (Erk-1 bis Erk-8) (Abe et al., 2002, p. 8), wobei sich diese Arbeit mit der Charakterisierung von Erk-1 und Erk-2 beschäftigt, die entsprechend ihres Molekulargewichtes auch als p42^{MAPK} bzw. p44^{MAPK} bezeichnet werden (Sadoshima et al., 1995). Erk-1 und Erk-2 gehören außerdem zu den als erstes beschriebenen Kinasen dieser Familie und werden sehr ähnlich reguliert. Eine Aktivierung dieser MAPK erfolgt durch Phosphorylierung ihrer Tyrosin- und Threoninreste durch die übergeordnete MAP-Kinase-Kinase. Ausgelöst wird diese Signalkaskade durch Wachstumsfaktoren, Proonkogene, die eine Zellproliferation fördern und in geringem Umfang durch zellulären Stress (Widmann et al., 1999). Erk-1/-2 wirken demnach anti-apoptotisch.

1.4.1.2 C-Jun-N-terminale Kinase (JNK)

JNK ist eine Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK), da am Anfang der Signalkaskade Stressfaktoren wie beispielsweise Zytokine, Ultraviolettstrahlung (Keyse, 1995) oder Hyperosmolarität (Häussinger et al., 1999) stehen. Mindestens zehn Isoformen werden von drei verschiedenen Genen (Jnk 1-3) kodiert (Dérijard et al., 1994; Gupta et al., 1996; Kyriakis et al., 1994). Durch alternatives Spleißen unterscheidet man jeweils eine 46 kD und eine 54 kD Variante (Hibi et al., 1993). Eine JNK-Aktivierung erfolgt ebenfalls durch die Phosphorylierung ihrer Tyrosin- und Threoninreste (Dérijard et al., 1994). JNK selbst phosphoryliert dann eine Vielzahl von Proteinen, wie z.B. den Transkriptionsfaktor c-Jun. Eine Aktivierung von JNK und p38^{MAPK} und eine gleichzeitige Unterdrückung von Erk konnten bei der Apoptoseinduktion beobachtet werden (Xia et al., 1995), was die Auffassung unterstreicht, dass deren Aktivitäten zentrale Rollen bei der Apoptose auslösen. Außerdem ist JNK an der Translokation des CD95 zur Plasmamembran beteiligt (Reinehr et al., 2003). JNK ist also eine pro-apoptotisch wirkende Kinase.

1.4.1.3 p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38^{MAPK})

Zu der Familie der p38^{MAPK} gehören vier Isoformen (α , β , γ , δ) (Hu et al., 1999). Sie bilden neben den JNK eine weitere Gruppe der SAPK, die durch externe Stimuli wie Strahlung, Hitze, osmotischen Stress (Schliess et al., 1996) oder inflammatorische Prozesse aktiviert werden (Raman et al., 2007). Dies erfolgt ebenfalls durch Phosphorylierung an den Aminosäureresten durch übergeordnete Kinasen. Die Aktivierung von p38^{MAPK} hat eine pro-apoptotische und anti-proliferative Wirkung. Ferner dient p38^{MAPK} der Zellzyklusregulation (Cobb, 1999).

1.4.2 Proteinkinasen der Src-Familie

Zu den Proteinkinasen der Src-Familie gehören neun Tyrosinkinasen (c-Src, Fyn, Lyn, c-Yes, Lck, Hck, Fgr, Blk, Yrk), wobei sich diese Arbeit unter anderem auf die Analyse des Prototyps c-Src konzentriert. C-Src findet sich ubiquitär in fast jedem Zelltyp, allerdings sind hohe c-Src-Spiegel überwiegend in neuronalem Gewebe und in Blutplättchen zu finden (Bolen et al., 1991). Sie zählen zu den Protoonkogenen, die eine wichtige Rolle in der Zellmorphologie, Proliferation und im Überleben der Zellen spielen (Brown and Cooper, 1996). Sie leiten extrazelluläre Signale u.a. von Zytokin- oder Hormonrezeptoren weiter (Thomas and Brugge, 1997) und können als Tyrosinkinasen weitere Proteine, wie z.B. Transkriptionsfaktoren oder Adapterproteine, aktivieren und der intrazellulären Signalweiterleitung dienen.

Die Regulation der c-Src-Aktivität erfolgt über Phosphorylierung oder Dephosphorylierung an ihren Tyrosinresten. Eine Phosphorylierung am Tyrosinrest 416 oder 418 der katalytischen Tyrosinkinasedomäne in der sogenannten SH1-Domäne bedeutet eine Aktivierung, eine Phosphorylierung am Tyrosinrest 527 oder 529 am C-terminalen Ende dagegen eine Inaktivierung von c-Src (Brown and Cooper, 1996; Obergfell et al., 2002). Neben dem C-terminalen Ende und der SH1 Domäne werden die Mitglieder dieser Kinasenfamilie durch 4 weitere Domänen strukturiert, über die im Folgenden ein grober Überblick folgt: Die SH4 Domäne dient der Membranbindungsfähigkeit, die *unique* Domäne besitzt Bindungspotential für Zielproteine und ist die Domäne, in der sich die neun Mitglieder der Familie am stärksten unterscheiden. Die SH3 und SH2 Domäne dienen der Substraterkennung.

1.4.3 Proteinkinase B (PKB, Akt)

Im Jahr 1991 wurde die PKB von drei unabhängigen Forschungsgruppen identifiziert (Bellacosa et al., 1991; Coffer and Woodgett, 1991; Jones et al., 1991): Zwei von diesen Gruppen fielen eine große Sequenzhomologie zu den Proteinkinasen A und C auf, wohingegen die andere Gruppe das Produkt des retroviralen Onkogens Akt 8 identifizierte. Die Proteinkinase B (PKB) kommt in drei Isoformen vor und wird von den Genen Akt 1-3 codiert. Sie gehören zu den Onkogenen, da eine vermehrte Aktivität der PKB in Tumorzellen festgestellt wurde. Die PKB ist ubiquitär vorhanden und hat ihre Aufgabe hauptsächlich in der Regulation von Zellproliferation, Wachstum, Apoptose und Zellstoffwechsel.

PKB gehört zu den Serin-/Threoninkinasen und besitzt eine Pleckstrin-homologe (PH) Domäne, eine Kinase- und eine regulatorische Domäne (Franke et al., 1997). Eine Aktivierung von PKB erfolgt über den sogenannten Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)/Akt-Signalweg. Nachdem PI3K entweder G-Protein-gekoppelt oder über Rezeptorkinasen aktiviert worden sind, phosphorylieren sie Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat zum Membranlipid Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat. Letzteres führt dann über die PH Domäne zur Verankerung von Akt in der Zellmembran. Die 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 bewirkt anschließend eine Phosphorylierung an den Serin-/Threoinresten der PKB und somit die Aktivierung (Shelton et al., 2003). PKB selbst kann weitere Proteine phosphorylieren.

1.5 Astrozyten

1.5.1 Charakterisierung von Astrozyten

Der Begriff Astrozyt, auch bekannt als Stern- oder Spinnenzelle, setzt sich aus dem griechischen Kompositum *astron* – Stern und *kytos* – Zelle zusammen. Sie zählen zu den von Rudolf Virchow in der Mitte des 19. Jahrhunderts entdeckten Gliazellen des zentralen Nervensystems (ZNS), die dort zehnmal häufiger als Neuronen vorkommen und u.a. das Stützgewebe des ZNS bilden. Erst Ende des 19. Jahrhunderts gelang es den Wissenschaftlern Cajal, Hortega und Golgi mit Hilfe verschiedener Färbungen die Gliazellen in verschiedene Typen zu klassifizieren (Makro- und Mikroglia). Astrozyten zählen neben Oligodendrozyten und Ependymzellen zur Makroglia und kommen mechanischen und metabolischen Aufgaben nach. Die zu den Mikroglia gehörenden Zellen dienen hauptsächlich der Immunabwehr.



Abb. 3: Schematische Darstellung eines Astrozyten

Astrozyten besitzen ein 10-20 µm breites Soma mit Nucleus und Nucleolus. Mit ihren sternförmig verlaufenden Fortsätzen bilden sie u.a. Grenzschichten zur Pia mater und zu Blutgefäßen.

Astrozyten haben ein kleines, 10-20 µm breites Soma. Mit ihren radiär verlaufenden Fortsätzen (Abb. 3) bilden Astrozyten Grenzmembranen zur Pia mater (*Membrana limitans gliae superficialis*) und zu Blutgefäßen (*Membrana limitans gliae perivascularis*). Morphologisch unterscheidet man zwischen dem fibrillären Typ (*Astrocytus fibrosus*) mit zahlreichen, aber wenig verzweigten Dendriten und den protoplasmatischen Astrozyten (*Astrocytus protoplasmaticus*),

die verzweigte und dicke Fortsätze aufweisen. Während der fibrilläre Typ der Astrozyten vor allem in der weißen Substanz des ZNS vorkommt, ist die protoplasmatische Form für die graue Substanz charakteristisch.

Neben ihrer Funktion als Stützzellen unterstützen Astrozyten Austausch Nährstoffen und den von Stoffwechselendprodukten zwischen Neuronen und Blut und halten den Kalium-Haushalt und somit den extrazellulären pH-Wert im Gehirn aufrecht. Dazu dienen sowohl ein aus Nexus bestehendes enges Netzwerk als auch die mechanische Verknüpfung über Puncta adhaerentia. Sie können weder Aktionspotentiale noch postsynaptische Potenziale generieren und dienen somit nicht der Informationsverwertung. Astrozyten sind an der Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke beteiligt, allerdings ist die wesentliche Barrierefunktion durch sogenannte Tight junctions des Kapillarendothels bedingt (Paulsen and Lüllmann-Rauch, 2012). Astrozyten schirmen mit ihren Fortsätzen synaptische Regionen von der Umgebung ab und können so die Wirkung der Transmitter auf den synaptischen Spalt regulieren. Transmitter wie Glutamat, Gamma-Aminobuttersäure (GABA) und Serotonin können von Astrozyten aufgenommen werden, sodass diese nicht mehr an der Synapse wirken können. Astrozyten besitzen außerdem eine Glutamin-Synthetase (GS), was sie dazu befähigt einen großen Teil der Ammoniak-Detoxifikation zu übernehmen. Das entstandene Glutamin wird von den Astrozyten freigesetzt und von Neuronen aufgenommen, die daraus wieder Glutamat bilden (Fahlke, 2008).

Astrozyten besitzen eine Art Progenitor-/Stammzellfunktion: Unter in vitro Bedingungen konnte beobachtet werden, dass kultivierte Astrozyten sich unter alleiniger Zugabe des Transkriptionsfaktors Neurogenin zu Nervenzellen mit funktionsfähigen Synapsen transformieren (Heinrich et al., 2011).

Es konnte gezeigt werden, dass Astrozyten nicht nur diesbezüglich Ähnlichkeiten mit den sogenannten hepatischen Sternzellen in der Leber besitzen: Ruhende hepatische Sternzellen (Ito-Zellen, Fettspeicherzellen, perisinusoidale Lipozyten) gehören zu den nicht-parenchymatösen Zellen des Lebergewebes und liegen im perisinusoidalem Disse'schen Raum, umgeben von Endothelzellen. Sie sind allerdings nicht zu verwechseln mit den Kupffer'schen Sternzellen, die ebenfalls in der Leber lokalisiert sind, aber zum mononukleär-phagozytärem System zählen. Hepatische Sternzellen wurden kürzlich als mesenchymale Stammzellen charakterisiert: Neben ihrer Funktion in der extramedullären Hämatopoese, können sie sich je nach Stimulus in Adipozyten und Osteozyten differenzieren (Kordes et al., 2013). Außerdem dienen HSZ der Leberregeneration, da hepatische und pankreatische Sternzellen sich nach Zytokinbehandlung zu Hepatozyten differenzieren (Kordes et al., 2012). Weitere Gemeinsamkeiten zwischen Astrozyten und HSZ sind im Folgenden beschrieben. Als neuronaler und somit astrozytärer Marker dient das Intermediärfilament Glial fibrillary acidic protein (GFAP), welches eine zytoplasmatische Komponente darstellt und trotz neuronaler Herkunft auch bei hepatischen Sternzellen exprimiert wird (Gard et al., 1985). Somit ist eine gemeinsame neuroektodermale Herkunft der Astrozyten und HSZ naheliegend (Geerts, 2001). Interessanterweise weisen die sternförmigen Astrozyten auch eine morphologische Ähnlichkeit mit HSZ auf (Abb. 4). Aus ruhenden hepatischen Sternzellen ist außerdem bekannt, dass nach Stimulation mit CD95L eine CD95-Tyrosin-Nitierung zu detektieren ist und die Zellen so vor Apoptose geschützt sind (Reinehr et al., 2008). Es liegt also nahe, dass ein solcher molekularer Mechanismus auch in den als apoptoseresistent geltenden Astrozyten aufzudecken ist.





В

Abb. 4: Immunzytochemische Färbung von GFAP in primären HSZ nach 2 Tagen in Kultur (aus Reinehr et al., 2008) und Astrozyten

Primäre HSZ (**A**) und Astrozyten (**B**) wurden kultiviert, gewaschen, fixiert, permeabilisiert und abgesättigt. Über Nacht wurden die Zellen mit GFAP inkubiert und für weitere 60 min FITC ausgesetzt. Eine mikroskopische Analyse

erfolgte über das LSM. Durch die ICC konnte die GFAP-Expression (grün) in Astrozyten und HSZ gezeigt werden. Zwischen den Astrozyten und HSZ besteht eine morphologische Ähnlichkeit. Maßstabsbalken: 10 µm. Vergrößerung 630x. (*n*] 3). (HSZ: Hepatische Sternzellen; FITC: Fluoresceinisothiocyanat; GFAP: *Glial fibrillary acidic protein*; ICC: Immunzytochemie; LSM: Laserscanning-Mikroskop)

Bei moderatem Hirninsult werden Astrozyten reaktiv und setzen neurodegenerative und proinflammatorische Substanzen frei, die den Krankheitsprozess verschlimmern. Reaktive Astrozyten wurden mit folgenden Krankheiten, die inflammatorische Komponenten in ihrer Pathogenese besitzen, in Zusammenhang gebracht: HIV-assoziierte Demenz, Morbus Alzheimer, Multiple Sklerose und Apoplex (Minagar et al., 2002; Stoll et al., 1998). Interessant ist die Tatsache, dass Astrozyten sich in Folge von Schlaganfällen, Traumen oder neurodegenerativen Erkrankungen regenerieren können (Pekny and Nilsson, 2005) und im Gegensatz zu Neuronen und Oligodendrozyten keine Apoptose eingehen (Demjen et al., 2004). Astrozyten gelten gemeinhin als apoptoseresistente Zellen (Cassina et al., 2002; Knorpp et al., 2006). Möglicherweise liegt der Grund in der astrozytären Modulation von pro- und anti-inflammatorischen Effekten im Todesrezeptorsystem (Dietrich et al., 2003).

1.5.2 Klinische Integration am Beispiel der hepatischen Enzephalopathie (HE)

1.5.2.1 Definition und Klassifizierung der HE

Auch bei der hepatischen Enzephalopathie besitzen Astrozyten eine Schlüsselrolle. Die hepatische Enzephalopathie ist ein häufiges, komplexes, metabolisch bedingtes, neuropsychiatrisches Krankheitsbild mit potentiell reversibler Schädigung des ZNS auf der Basis einer akuten oder chronischen Lebererkrankung. Die HE ist hinsichtlich ihrer Symptomatik und Therapie bei akutem Leberversagen von der bei chronischen Lebererkrankungen zu unterscheiden. Je nach Ätiologie der HE wird zwischen drei verschiedenen Typen differenziert (Ferenci et al., 2002):

Beim akuten Leberversagen (Typ A) führt die unzureichende Elimination von toxischen Metaboliten aus dem Blut u.a. zu einer Hyperammonämie, die die im Vordergrund stehende Hirndruckproblematik bedingt. Folgen sind zytotoxische Ödeme der Astrozyten, ein erhöhter intrakranieller Druck und ein daraus resultierendes Hirnödem. Seltener tritt eine HE bei therapeutisch angelegten portosystemischen Shunts ohne parenchymatöse Lebererkrankung auf (Typ B), bei denen ein Teil des im Darm resorbierten Ammoniaks der Entgiftung in der Leber entgeht. Im Rahmen von chronischen Lebererkrankungen mit Ausbildung portokavaler Anastomosen (Typ C) kommt es wiederum häufig zu dem Krankheitsbild der HE, einem geringgradigen Gliaödem und einer Anflutung neurotopischer Subststanzen. Neben Ammoniak weisen Mercaptane, GABA, kurzkettige Fettsäuren und aromatische Aminosäuren Konzentrationsanstiege auf. Die HE Typ C kann wiederum in die episodisch auftretende (spontan, rekurrent oder durch auslösende Faktoren), die manifeste und die minimale Subform unterteilt werden. Der manifesten Form geht häufig das Stadium der minimalen HE (MHE, bisher: subklinische oder latente HE) voraus: Ein Stadium mit pathologischer Neuropsychometrie, aber ohne offensichtliche klinisch-neurologische Symptome (Ferenci et al., 2002). Die minimale Form der HE führt bei einem Großteil der Patienten schon zu einer Einschränkung der Leistungsfähigkeit und Beeinträchtigung der Lebensqualität (Groeneweg et al., 1998).

Die Diagnose der manifesten HE wird klinisch gestellt, wobei das gleichzeitige Vorliegen einer Leberfunktionsstörung und einer Funktionsstörung des ZNS vorausgesetzt wird; neurologische und psychiatrische Erkrankungen anderer Genese müssen im Vorfeld ausgeschlossen werden. Ergänzend können Labordiagnostik, bildgebende Verfahren und neurophysiologische Untersuchungen zur Diagnostik hinzugezogen werden.

Klinisch unterscheidet man nach der West-Haven-Klassifikation vier Schweregrade der manifesten HE, von leichten Persönlichkeitsveränderungen bis zum tiefen Koma reichend (Tabelle 1):

	Bewusstseinslage	Neuropsychiatrische	Neurologische	-
		Symptome	Symptome	
Grad 0 = MHE	normal	Störungen nur durch psychometrische Tests erfassbar	-	
Grad I	Leichtgradige mentale Verlangsamung	Eu-/Dysphorie, Reizbarkeit, Angst, reduzierte Aufmerksamkeit	Gestörte Feinmotorik (beeinträchtigtes Schreibvermögen, Fingertremor)	geringgradige HE
Grad II	Verstärkte Müdigkeit, Apathie, Lethargie	Leichte Persönlichkeitsstörung, minimale Desorientiertheit bzgl. Ort/Zeit	Asterixis, Ataxie, verwaschene Sprache	
Grad III	Somnolenz	Aggressivität, ausgeprägte Desorientiertheit bzgl. Ort/Zeit	Rigor, Krämpfe, Asterixis	hochgradige HE
Grad IV	Koma	-	Hirndruckzeichen	J

 Tabelle 1: Stadieneinteilung der hepatischen Enzephalopathie unter Berücksichtigung der West-Haven-Kriterien

 und der minimalen hepatischen Enzephalopathie (Modifiziert nach Conn and Bircher, 1993; Häussinger, 2006)

(HE: Hepatische Enzephalopathie; MHE: Minimale hepatische Enzephalopathie)

Die International Society of Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) teilt die HE bei Zirrhosepatienten in die Kategorien "geringgradig" und "hochgradig" ein: Dabei werden die MHE, Grad I und Grad II als geringgradige HE bezeichnet, bei denen eine Hospitalisierung nicht notwendig ist; Patienten mit der hochgradigen Form der HE (Grad III, IV) bedürfen einen Krankenhausaufenthalt (Häussinger, 2006).

Die sogenannte kritische Flimmerfrequenz dient der klinischen Objektivierung der HE und der Graduierung der MHE (Kircheis et al., 2002). Hierbei schaut der Patient auf ein spezielles Licht, das mit einer hohen Frequenz als kontinuierlich brennendes Licht wahrgenommen wird. Die Frequenz wird reduziert und der Patient gibt an, wann er ein Flimmern wahrnimmt.

Da 50-70 % (Gerok, 2007) der an Leberzirrhose erkrankten Patienten von der hepatischen Enzephalopathie unterschiedlicher Schweregrade betroffen sind, stellt die HE eine der wichtigsten Komplikationen chronischer Lebererkrankungen dar.

1.5.2.2 Pathophysiologie der HE

Relativ am Anfang der Pathogenese der HE steht das Abbauprodukt Ammoniak, dessen Neurotoxizität hauptsächlich auf Astrozyten abzielt. Der physiologische Ammoniakspiegel beträgt etwa 25-35 µmol/l im Serum (Häussinger, 1990). Da hohe Ammoniakkonzentrationen toxisch wirken und nicht in die systemische Zirkulation gelangen sollen, existieren unter physiologischen Bedingungen diverse Eliminationsmechanismen: So wird Ammoniak primär in den periportalen Leberzellen über den Harnstoffzyklus in ungiftigen, wasserlöslichen Harnstoff metabolisiert und renal ausgeschieden.

Die Glutaminsynthese durch azinusnahe, perivenöse Scavenger-Zellen (Häussinger, 1987) ist der Harnstoffsynthese nachgeschaltet und macht etwa 5-10 % der Ammoniumentgiftung aus. Bei akuten oder chronischen Leberfunktionsstörungen oder portosystemischen Shunts sind diese Funktionen beeinträchtigt. Die Ammoniak entgiftende Leberzellmasse ist reduziert, kann aber durch Stimulation des Harnstoffzyklus kompensiert werden. Von entscheidender Bedeutung ist die verminderte Funktion der perivenösen Glutamin synthetisierenden Scavenger-Zellen, sodass Ammoniak die Leber passieren kann (Häussinger, 1987). Dies resultiert in einer überwiegend extrahepatischen Metabolisierung durch Gehirn und Muskulatur (Cooper and Plum, 1987). Bei Patienten mit MHE konnte eine Akkumulation von Ammoniak im Gehirn mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) direkt gezeigt werden (Lockwood et al., 1991). Charakteristisch ist auch eine ansteigende Ammoniakkonzentration im Blut. Die Ammoniakkonzentration im Gehirn setzt sich zum einen aus der Diffusion aus dem Blut, zum anderen aus Produkten endogener Signalwege zusammen. Zum letzteren zählen Glutamin, Glutamat und Aspartat. Eine große Menge an Ammoniak wird auch in Neuronen produziert.

Interessanterweise sind Astrozyten die einzigen Zellen im Gehirn, die das Enzym Glutamin-Synthetase (GS) besitzen und so den größten Teil der Ammoniak-Detoxifikation übernehmen (Martinez-Hernandez et al., 1977). Sofern also Astrozyten zwischen Blutkapillaren und Neuronen geschaltet sind, wirken diese als "enzymatische Barriere" für Ammoniak (Cooper and Plum, 1987). Bei einem Überangebot von Ammoniak im Gehirn wird Ammoniak in einer energieabhängigen Reaktion unter Bildung von Glutamin an Glutamat gebunden. Demzufolge steigt der intrazelluläre Glutaminspiegel der Astrozyten. Durch die osmotische Wirkung des intrazellulären Glutamins kommt es zu einer Astrozytenschwellung. Die funktionellen Folgen sind abhängig von der Ätiologie der HE: Bei akutem Leberversagen führt die ausgeprägte Astrozytenschwellung zu einer charakteristischen Hirndrucksymptomatik (Vaquero et al., 2003), während das chronische Leberversagen durch ein geringgradiges Gliaödem ohne klinisch erfassbare Hirndrucksymptomatik gekennzeichnet ist (Häussinger et al., 2000). Außerdem zeigt sich die Kausalität zwischen Leberfunktionsstörungen und Hirnödem ebenfalls dadurch, dass Hirnödem und kognitive Beeinträchtigungen durch eine Lebertransplantation reversibel sind (Zhan and Stremmel, 2012). Auf Zellebene führt die Astrozytenschwellung zu einer Aktivierung der mitogen-activated protein kinases (MAPK) Erk und p38^{MAPK} (Schliess et al., 1996; Sinning et al., 1997; Xu et al., 2001). Um das ursprüngliche Zellvolumen der Astrozyten wiederherzustellen, kommt es kompensatorisch zur Freisetzung von Osmolyten wie myo-Inositol, Aminosäuren und Ascorbaten (Chamberlin and Strange, 1989; O'Connor and Kimelberg, 1993; Ordaz et al., 2004; Siushansian et al., 1996).

Die durch die Dysfunktion von Astrozyten verursachte Hyperammonämie stellt eine zentrale pathophysiologische Ursache zur Entstehung der MHE dar (Dhiman et al., 2010; Zhan and Stremmel, 2012). Folgen der Gliaschwellung sind gliale Funktionsänderungen und eine gestörte glioneuronale Kommunikation (Norenberg, 1996). Auch Veränderungen an der Blut-Hirn-Schranke stellen mögliche Konsequenzen dar. Aufgrund der beeinträchtigten Astrozytenfunktion wird die HE auch als primäre Gliopathie mit neurologischen Schäden als Folge betrachtet (Norenberg et al., 1992). Charakteristischerweise zeigt sich morphologisch eine Alzheimer-Typ-II-Degeneration der Astrozyten

14

(Norenberg, 1987), die sich durch große, helle Zellkerne mit prominenten Nucleoli und marginalem Chromatinmuster auszeichnet (Felipo and Butterworth, 2002).

Aber auch klinisch relevante Faktoren wie Agonisten des peripheren Benzodiazepinrezeptors (Bender and Norenberg, 1998), pro-inflammatorische Zytokine wie TNF-[] (Chang et al., 2001), extrazelluläres Glutamat (Bender et al., 1998) oder Elektrolytstörungen wie Hyponatriämie (Córdoba et al., 1999) können eine Astrozytenschwellung auslösen und so eine HE bedingen. Dies erklärt, weshalb beispielsweise gastrointestinale Blutungen, eine erhöhte Proteinaufnahme, Infektionen, Elektrolytentgleisungen, Obstipation, Traumata, Dehydratation, Urämie oder Medikamente (Sedativa, Diuretika) bei Zirrhosepatienten eine HE hervorrufen können (Häussinger and Schliess, 2008). Nicht-Zirrhotiker tolerieren scheinbar die genannten präzipitierenden Faktoren ohne HE-typische Symptome zu entwickeln, da der Osmolyte-Pool der Astrozyten nicht ausgeschöpft ist (Häussinger et al., 2000).

Studien aus den letzten Jahrzehnten beschäftigten sich weiter mit der Frage nach dem Pathomechanismus der Neurotoxizität von Ammoniak: Dabei wurde in Ammoniak ausgesetzten Astrozyten eine erhöhte Bildung von ROS detektiert (Murthy et al., 2001). Auch bei Patienten mit HE konnte eine erhöhte Konzentration freier Sauerstoffradikale im Blut nachgewiesen werden (Negru et al., 1999). Unter akuter Ammoniakintoxikation konnte sogar ein Aktivitätsverlust von antioxidativ wirkenden Enzymen, wie Glutathion-Peroxidase, Mangan-Superoxiddismutase (Mn-SOD) oder Katalase und eine gesteigerte Superoxidbildung beschrieben werden (Kosenko et al., 1999), was die Rolle des oxidativen Stress in der Pathogenese bei Ammoniak-Vergiftung unterstreicht.

Weitere Literatur bringt die HE nicht nur mit oxidativem, sondern auch mit nitrosativem Stress in Verbindung: Dabei sind Tyrosin-Nitrierungen von Proteinen ein bekannter Marker für den Nachweis von Peroxynitrit und anderen reaktiven Stickstoffspezies (RNS). So konnte in kultivierten Astrozyten eine durch Ammoniak (Schliess et al., 2002) oder durch Benzodiazepine (Görg et al., 2003) induzierte Protein-Tyrosin-Nitrierung (PTN) detektiert werden, was im Folgenden noch im Detail erklärt wird. Nitrosativer Stress führt zu einer Zinkmobilisation (Schliess et al., 2009) und folglich zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Spezifitätsprotein-1 (Sp1), die wiederum zu einer Heraufregulation des peripheren Benzodiazepinrezeptors (PBR) führt (Kruczek et al., 2009). Des Weiteren wurden bei HE-Patienten bilaterale Mangan-Ablagerungen im Globus pallidus beschrieben (Rose et al., 1999). Sowohl Mangan als auch Ammonium führen zu einer vermehrten Expression der peripheren Benzodiazepinrezeptoren in Astrozyten, die die Synthese von Neurosteroiden regulieren (Ahboucha and Butterworth, 2008). Die verstärkte Neurosteroidsynthese und die GABA-erge Wirkung der Substanzen führen zu einer potenten Neurodepression. Dies könnte den bei HE-Patienten beobachteten erhöhten GABA-ergen Tonus erklären (Butterworth, 2000).

Die Bildung von ROS/RNS erfolgt N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor-vermittelt: Die Bindung von Glutamat an den NMDA-Rezeptor resultiert nach Auflösung des Magnesium-Blocks in einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Schliess et al., 2002), einer Prostanoid-vermittelten Glutamat-Freisetzung (Kimelberg et al., 1990; Rose et al., 2005) und führt durch Aktivierung der Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphatoxidase (NADPH-Oxidase) (Reinehr et al., 2007) und der NO (*nitric oxide*, Stickstoff)-Synthetase (Kruczek et al., 2009) zu einer Bildung von oxidativem und nitrosativem Stress.

Verschiedene Studien zeigen, dass Astrozytenschwellung oxidativen Stress induziert (Reinehr et al., 2007; Schliess et al., 2004) und oxidativer Stress selbst eine Astrozytenschwellung bedingt (Norenberg et al., 2007; Zielińska et al., 2003). Dies deutet auf eine sich selbst verstärkende Signalschleife zwischen osmotischem und oxidativem Stress (Häussinger, 2006; Häussinger and Schliess, 2005), wie im Folgenden (Abb. 5) grafisch dargestellt wird. Auch frühere Studien zeigten, dass bei Ratten, die vermehrt Ammoniak ausgesetzt waren, ein Anstieg der NO-Produktion zu beobachten war, der durch die Astrozytenschwellung zu erklären sein könnte (Master et al., 1999). Die beschriebenen morphologischen Veränderungen konnten bei Neuronen nicht beobachtet werden.



Abb. 5: Pathophysiologie der HE bei chronischer Lebererkrankung (in Anlehnung an Häussinger und Schliess, 2008)

Präzipitierende Faktoren der HE wie Ammoniak, Benzodiazepine, Zytokine oder Hyponatriämie können zu einer Hydratationsstörung der Astrozyten führen. Die Astrozytenschwellung impliziert die Aktivierung des NMDA-R und die Bildung von oxidativem/nitrosativem Stress, die wiederum eine Schwellung der Gliazellen fördern. Dies resultiert insgesamt in einer Veränderung der glioneuronalen Kommunikation, einer Störung der synaptischen Plastizität und bedingt so die Symptome der HE.

(Ca²⁺: Calcium; HE: Hepatische Enzephalopathie; NMDA-R: N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor; RNA: Ribonukleinsäure; ROS: Reaktive Sauerstoffspezies; RNS: Reaktive Stickstoffspezies; PBR: Peripherer Benzodiazepinrezeptor)

Funktionelle Konsequenzen der Astrozytenschwellung und des oxidativen Stress sind u.a. eine intrazelluläre Freisetzung von Zink aus Proteinen, die Oxidation astrozytärer und neuronaler RNA oder kovalente, posttranslationale Protein- und Nukleinsäuremodifikationen, wie die Phosphorylierung oder Nitrierung von Tyrosinresten: So konnte eine Zunahme von PTN in Astrozyten durch Ammoniak-Stimulation (Schliess et al., 2002), Benzodiazepine (Görg et al., 2003), durch Hypoosmolarität

(Schliess et al., 2004) oder inflammatorische Zytokine (Görg et al., 2006) detektiert werden. Insbesondere perivaskulären PTN an Astrozyten wurden detektiert. was die Permeabilitätsveränderungen an der Blut-Hirn-Schranke bei HE erklären kann (Lockwood et al., 1984). Eine weitere Konsequenz der Astrozytenschwellung im Rahmen der HE ist die zerebrale RNA-Oxidation. Görg et al. konnten eine mitochondriale RNA (mRNA)- und eine ribosomale RNA (rRNA)-Oxidation durch akuten Ammoniak-Überschuss sowohl in kultivierten Astrozyten als auch im Rattenhirn in vivo und in vitalen Mäusehirnschnitten detektieren; diese RNA-Oxidation ist durch Elimination des Ammoniaks reversibel, was die Reversibilität der HE unterstreicht. Aber auch hypoosmolare Bedingungen, Benzodiazepine oder TNF- können in kultivierten Astrozyten und in Mäusehirnschnitten eine RNA-Oxidation induzieren (Görg et al., 2008). Die PTN und auch die RNA-Oxidation gelten als gut etablierte Marker für oxidativen Stress. Von besonderer Bedeutung war demnach der Nachweis eines signifikanten Anstiegs dieser Marker bei Menschen mit HE, jedoch nicht bei Leberzirrhotikern ohne HE (Görg et al., 2010b). Die HE beim Menschen geht also ebenfalls mit einer oxidativen Stressantwort, Tyrosin-Nitrierung und RNA-Oxidation einher.

In der Pathogenese der HE spielen also sowohl die Bildung von ROS/RNS als auch die PTN eine zentrale Rolle. Dabei scheinen Astrozyten aber resistent gegenüber ROS/RNS zu sein (Cassina et al., 2002; Knorpp et al., 2006). Nun ergibt sich die Frage: Ist der mögliche Mechanismus der Reversibilität der hepatischen Enzephalopathie möglicherweise unter anderem in der Apoptoseresistenz der Astrozyten begründet? Auf welchem molekularen Mechanismus könnte diese Apoptoseresistenz basieren?

Zusammenfassend ein Zitat des Hepatologen Herrn Professor Dr. D. Häussinger: "Es ist allgemein anerkannt, dass der HE eine primäre Störung der Gliazellfunktion als Folge der astrozytären Zellschwellung und des oxidativen/nitrosativen Stress zugrunde liegt, was sowohl die astrozytäre und neuronale Kommunikation als auch die synaptische Plastizität und die oszillatorische Hirnaktivität stört und somit zum klinischen Symptome der HE führt." (Häussinger und Görg, 2010; Häussinger und Schliess, 2008; Zemtsova et al., 2011)

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Der CD95 (Fas/Apo-1)-Todesrezeptor gehört neben TNF-α- und den TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 zur TNF-Superfamilie und induziert nach Bindung seines Liganden (CD95L) oder eines agonistischen Antikörpers einen primär apoptotischen Signalweg. Voraussetzung dafür ist, dass CD95 an zwei seiner drei Tyrosinreste phosphoryliert wird. In Hepatozyten vermittelt CD95L beispielsweise einen programmierten Zelltod, indem CD95 an Tyrosinresten innerhalb der Todesdomäne phosphoryliert und somit aktiviert wird. In ruhenden hepatischen Sternzellen hingegen, die ein Stamm-/Progenitorzell-Kompartiment der Leber darstellen, wird durch CD95L eine Tyrosin-Nitrierung induziert. Hier kann keine CD95-Tyrosin-Phosphorylierung mehr erfolgen, da sich CD95-Tyrosin-Nitrierung und Tyrosin-Phosphorylierung aus sterischen Gründen gegenseitig ausschließen. Die Zelle ist also vor Apoptose geschützt.

Astrozyten sind Gliazellen im Gehirn und spielen neben metabolischen und mechanischen Funktionen eine wichtige Rolle bei der hepatischen Enzephalopathie. Ein wesentliches und interessantes Merkmal dieses Krankheitsbildes ist seine Reversibilität, die jedoch noch unzureichend erforscht ist. Astrozyten sind Zellen mit Stammzellcharakter und gelten als apoptoseresistent. Ist der mögliche Mechanismus der Reversibilität der hepatischen Enzephalopathie unter anderem möglicherweise in der Apoptoseresistenz der Astrozyten begründet?

Da Astrozyten ebenso wie HSZ einen Stammzellcharakter besitzen, sie morphologische und funktionelle Ähnlichkeiten aufweisen, stellt sich die Frage, ob auch in Astrozyten eine CD95 Ligandinduzierte CD95-Tyrosin-Nitrierung nachzuweisen ist, die die Zellen vor der CD95L-induzierten Apoptose schützt.

Das Ziel dieser Arbeit ist daher, eine etwaige CD95-Tyrosin-Nitrierung aufzudecken und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen nach CD95L-Stimulation in Astrozyten zu analysieren.

Als Modellsystem wurde die CD95 Ligand-induzierte Apoptose in isolierten und kultivierten Astrozyten der Ratte gewählt.

2 Methoden und Material

2.1 Methoden

2.1.1 Isolierung und Kultivierung von Astrozyten

Primäre Astrozyten wurden freundlicherweise routinemäßig durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Häussinger (Aktenzeichen O78/08) aus den Großhirnhemisphären neugeborener Wistarratten isoliert und kultiviert. Nach Erhalt dieser Zellen, 2-3 wöchiger Kultivierung im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ –Begasung und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit und nach Erreichen einer 90 %-igen Konfluenz wurden die Zellen zur Stimulation auf neue Zellkulturflaschen bzw. –schalen ([] 6 oder 10 cm) passagiert (Splitvorgang). Dazu diente Trypsin, das extrazelluläre Proteine spaltet, sodass die Zellen von den Zellkulturflaschen gelöst werden können. Das Zellkulturmedium wurde sowohl am 1. Tag nach Aussaat als auch alle darauffolgenden 2-3 Tage ausgetauscht. Als Medium diente *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit einem *fetal calf serum* (FCS)-Anteil von 10 % und einem 5 %-igen Anteil von Penicillin, Streptomycin, Neomycin (PSN) gegen bakterielle Kontamination. Passage 0 war die der Isolation, Passagen 2-4 Zeitpunkte der Stimulation. Einen Tag vor den Stimulationen wurden die Astrozyten über Nacht mit FCS-freiem Medium kultiviert, damit die Zellen in die sogenannte G0-Phase des Zellzyklus übergehen und zyklusunabhängige Stimulationseffekte erzielt werden können. Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig unter einem Lichtmikroskop kontrolliert.

2.1.2 Gewinnung von Proteinlysaten

Das Medium wurde nach erfolgter Stimulation und Ablauf der Inkubationszeit entfernt, die Zellen vorsichtig mit 3 ml gekühltem *phosphate buffered saline* (PBS)-Puffer gewaschen und das Proteinlysat mit Lysis-Puffer auf Eis gewonnen. Nach Zentrifugation (5 min, 4 °C, 8000 rpm) wurden die Überstände der Zelllysate bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

2.1.3 Proteinmengenbestimmung

Zur Quantifizierung des Proteingehalts diente die photometrische Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Durch den Trimethylenfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250, der sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren lagert und somit Proteine unspezifisch anfärbt, verschiebt sich das Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm. Je stärker die Absorptionsrate, desto mehr Protein ist vorhanden. Je 3 µl Zelllysat wurden auf einer 96-Well-Platte mit jeweils 300 µl *Bradford Reagenz* (Bio-Rad-Protein-Assay, Bio-Rad, München, Deutschland) ergänzt. Der Proteingehalt wurde für jede Probe dreimal mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-Reader bei 570 nm Wellenlänge gemessen. Mit Hilfe einer Eichgeraden wurden die Werte standardisiert.

2.1.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nachdem die Zelllysate mit je 20 µl von dem 2x Auftragspuffer versetzt worden sind, wurden sie in einem Wasserbad 3 min bei 95 °C denaturiert. Durch die Hitze wird eine Entfaltung der Proteine erzielt, wobei ihre Primärstruktur unverändert bleibt. Auf 10 %-igem Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid (SDS-PAA)-Gel wurden die Proben aufgetragen und nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Abschätzung der Lauflängen wurde der Standardproteingrößenmarker All Blue (Bio-Rad, München, Deutschland) mit Proteinen bekannten Molekulargewichts aufgetragen. Zur optimalen elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden 240 V und unterschiedliche Lauflängen je nach Antikörper genutzt. Gleiche Moleküle, die sich in einer Zone sammeln, werden als Banden bezeichnet. Als Modell diente ein diskontinuierliches Puffersystem.

2.1.5 Proteintransfer

Als Western Blot bezeichnet man den Proteintransfer auf eine Trägermembran, der mittels Diffusion, Kapillarwirkung oder Elektrophorese durchgeführt werden kann. In dieser Arbeit wurde die Elektrophorese genutzt, um die Proteine von dem SDS-PAA-Gel auf eine Nitrozellulose-Transfer-Membran wandern zu lassen. Dabei bleibt die Morphologie der elektrophoretischen Auftrennung die gleiche. Somit wurden nach Abschluss der SDS-PAGE die aufgetrennten Proteine 2 h bei einer Stromstärke von 1,25 mA/cm² mittels einer *Hofer semi dry transfer unit* (Amersham Biotech, Großbritannien) auf eine Nitrozellulose-Transfer-Membran übertragen.

Es folgte die Inkubation der Membran mit Ponceau-Rot-Färbelösung, um die Transferqualität zu kontrollieren. Anschließend wurde die Membran mit *Tris-buffered saline with Tween* (TBS-T) gewaschen.

2.1.6 Western Blot-Hybridisierung und Detektion

Freie Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulose-Transfer-Membran wurden unter Schütteln für 1 h bei Raumtemperatur (RT) in 5 % BSA (*bovine serum albumin*) abgesättigt und anschließend mit dem verdünnten primären Antikörpern ebenfalls unter Schütteln über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Nach Entfernen des Erstantikörpers und dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1:5000) für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die nicht gebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt und die Antikörperkonjugate mittels Chemilumineszenz (ECL, Amersham Biotech, Großbritannien) auf Röntgenfilmen (Amersham Biotech, Großbritannien) detektiert. Die Intensität der Banden dient als quantitatives Maß für das zu detektierende Protein.

Eine densitometrische Analyse der detektierten Banden erfolgte durch LabImage Software.

2.1.7 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) dient als eine molekularbiologische Methode der selektiven Isolation von Proteinen aus Zelllysaten mittels im Überschuss verwendeter spezifischer Antikörper. Mit Hilfe dieser Methode können posttranslationale Modifikationen an Proteinen, wie beispielsweise Protein-Tyrosin-Nitrierungen, nachgewiesen und untersucht werden.

Nach Herstellung des Zelllysats und Aliquotieren gleicher Proteinmengen wurden diese mit Lysispuffer auf identische Probenvolumina gebracht, mit den gegen das Zielprotein gerichteten spezifischen Antikörpern versetzt und für 2 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Nach Zugabe von je 15 µl Agarose A/G wurden die Proben über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert.

Agarose A/G enthält die sogenannten Proteine A und G, welche aus der Zellwand der Bakterien *Staphylococcus aureus* bzw. *Streptococcus* stammen und mit hoher Spezifität an die Fc-Region der Immunglobuline binden. Diese Proteine sind bei der Immunpräzipitation an Sepharose-Kügelchen gebunden, die nach Bildung des Antikörper-Protein-Komplexes über Zentrifugation abgetrennt werden können. Nach dreimaligem, vorsichtigem Waschen mit je 200 µl Lysispuffer und anschließender Zentrifugation (3 min, 4 °C, 5000 g) wurden unspezifische Proteine entfernt und die Komplexe konnten isoliert werden. Der Nachweis des Präzipitats erfolgte nach dreiminütiger Denaturierung bei 95 °C und nach Ergänzung mit je 20 µl von dem 2x Auftragspuffer über SDS-PAGE und Western Blot.

2.1.8 Immunzytochemische Färbung

In der Immunzytochemie (ICC) wird die Antigen-Antikörper-Reaktion genutzt, um gewünschte Zellkomponenten anzufärben. Bei der Immunfluoreszenz sind diese Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dabei handelt es sich um eine indirekte Färbung, da ein sekundärer Antikörper, der mit einem fluoreszierenden Marker gekoppelt ist, gegen die Fc-Region des primären Antikörpers gerichtet ist.

Astrozyten wurden auf Glas-Cover Slips (ø 12 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) ausgesät. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 20 min bei RT fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Astrozyten für weitere 2 min mit 0,1 % Triton X-100 in PBS auf Eis permeabilisiert. Die Zellen wurden dreimal gewaschen und unspezifische Bindungen wurden mit 5 % FCS in PBS 30 min bei RT abgesättigt. Es folgte die Inkubation mit den entsprechenden Primärantikörpern CD95 (1:100 in PBS) und GFAP (1:250 in PBS) über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal gewaschen und mit einem Carbocyanin-3 (Cy-3)- bzw. Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierten Sekundärantikörper (1:500 in PBS) für weitere 60 min bei RT inkubiert. Das an den Sekundärantikörper gebundene Cy3 diente als roter Fluoreszenzmarker für CD95, das an den Sekundärantikörper konjugierte FITC ließ GFAP grün fluoreszieren. Nach drei Waschschritten wurden die Zellen in *Vectashield Mounting Medium* mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) eingedeckt. DAPI ist ebenfalls ein Fluoreszenzmarker. Er färbt die Zellekerne blau an, indem er adeninreiche Regionen der DNS bindet.

Die mikroskopische Analyse wurde mit Hilfe eines Laserscanning-Mikroskops (LSM 510, Zeiss, Jena, Deutschland) und der *Software LSM 5 Image* (Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt.

2.1.9 Proliferationstest mittels BrdU-ELISA

Der Proliferationstest mittels 5-Bromo-2'-desoxy-Uridin (BrdU)–ELISA wird zur Markierung proliferierender Zellen verwendet. Dabei wird BrdU, ein chemisches Analogon des Nucleosids Thymidin bzw. Desoxyuridin, in die zelluläre DNS eingebaut und die erfolgte DNS-Synthese mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen BrdU spektrophotometrisch nachgewiesen.

Die Astrozyten wurden nach zweimaligem Waschen mit FCS-freiem Medium für 48 h in 96-Well-Platten stimuliert und mit BrdU inkubiert. Mit jeweils 200 µl Methanol wurden die Zellen 30 min bei RT lang permeabilisiert, denaturiert und fixiert. Anschließend wurden sie dem Antikörper gegen BrdU (1:100) 2 h bei RT ausgesetzt. Nach mehrmaligem Waschen mit Waschpuffer wurde über einen Tetramethyl-Benzidin (TMB)-Substratumsatz die Menge an eingebautem BrdU mittels ELISA-Reader bei 450 nm bestimmt. Durchgeführt wurde dieser Test gemäß des Herstellerprotokolls (Roche, Mannheim, Deutschland).

2.1.10 Apoptosequantifizierung mittels TUNEL-Markierung

Als Apoptosecharakteristikum von Zellen gilt die DNS-Fragmentierung, die durch Endonucleasen induziert wird. Die Detektion dieser DNS-Strangbrüche macht sich die *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated X-dUTP nick end labeling* (TUNEL)-Methode zu nutze, die dem Nachweis des apoptotischen Zelltods dient.

Die bei den Strangbrüchen durch die Endonucleasen entstandenen freien 3'-OH-Enden wurden durch das Enzym Terminale-Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) mit modifizierten Nucleotiden versehen. In dem verwendeten Assay dient das fluoreszierende Desoxyuridintriphosphat als Substrat für die TdT. Der Anteil der apoptotischen Zellen wurde unter dem LSM ermittelt.

Dieser Test wurde gemäß des Herstellerprotokolls durchgeführt (*In situ cell death detection kit,* Roche, Mannheim, Deutschland).

2.1.11 Statistische Methoden

Die statistischen Auswertungen erfolgten nach den densitometrischen Analysen der Bandenintensität. Jeder Versuch wurde mindestens in 3 voneinander unabhängigen Ansätzen (n = Anzahl der Ansätze) durchgeführt.

In den abgebildeten Diagrammen sind die Daten als Mittelwerte \pm SEM (*Standard Error of the Mean*) dargestellt. Die Signifikanzen wurden mit dem *Student t-Test* errechnet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von α = 5 % mit einem Signifikanzniveau von p < 0,05 wurde festgelegt (* p < 0,05).

2.2 Material

2.2.1 Medien und Lösungen in der Zellkultur

DMEM

- 1 g/l D-Glucose
- L-Glutamine
- Pyruvate
- + 10 % FCS
- + 5 % PSN

Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

FCS

PAA, Pasching, Österreich

PSN 100x

5 mg/ml Penicillin

5 mg/ml Streptomycin

10 mg/ml Neomycin

Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

PBS 1x

pH 7,4

 $[-] CaCl_2$

[-] MgCl₂

Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

Trypsin-ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) 0,05 %

Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

2.2.2 Liganden für die Stimulation

CD95L	Alexis, Grünberg, Deutschland
TRAIL	Alexis, Grünberg, Deutschland
TNF-[]	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland

2.2.3 Lösungen zur Proteinanalytik

Lysispuffer

20 mM Tris pH 7,4

140 mM Natriumchlorid

10 mM Natriumfluorid

10 mM Natrium-Pyrophosphat

1 % Triton X-100

1 mM EDTA

1 mM Ethylenglycol-bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetat (EGTA)

1 mM Natrium-Vanadat

20 mM ß-Glycerolphosphat

20 Tabl./L Proteaseinhibitor (CompleteTM, Boehringer)

Auftragspuffer (2x)

220 mM Tris/HCl pH 6,8

9 % SDS

40 % Glycerin

0,125 % Bromphenolblau

1 M Dithiothreitol (DTT)

Sammelgel

1 M Tris/HCI pH 6,8

Trenngel

1,5 M Tris/HCl pH 8,8

Polyacrylamid/SDS Sammelgel (5 ml)

3,4 ml H₂O 0,83 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 0,63 ml Sammelgelpuffer 0,05 ml 10 % SDS 0,05 ml 10 % Ammoniumpersulfat

0,005 ml N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

10 % Polyacrylamid/SDS Trenngel (25 ml)

- 9,9 ml H₂O
- 8,3 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid 29:1
- 6,3 ml Trenngelpuffer
- 0,25 ml 10 % SDS
- 0,25 ml 10 % Ammoniumpersulfat
- 0,01 ml TEMED

Elektrophoresepuffer

5 g/I SDS

- 15,1 g/l Tris
- 95 g/l Glycin

Transferpuffer

- 40 mM SDS
- 10 mM Glyzin
- 10 mM Tris
- 25 % Methanol

TBS-T

20 mM Tris pH 7,4 150 mM Natriumchlorid 0,1 % Tween 20
Als Lösungsmittel diente vollentsalztes oder destilliertes Wasser (NANOpure).

2.2.4 Antikörper zur Proteinanalytik

rabbit anti-Phospho-JNK-1/-2	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
mouse anti-JNK-1/-2	Cell Signaling, Beverly, MA, USA
rabbit anti-CD95 (C-20)	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
mouse anti-Nitrotyrosin (Klon 1A6)	Millipore, Billerica, MA, USA
rabbit anti-CD95 (M-20)	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
mouse anti-Phospho-Erk-1/-2	Cell Signaling, Beverly, MA, USA
rabbit anti-Erk-1/-2	Millipore, Billerica, MA, USA
rabbit anti-Phospho-p38 ^{MAPK}	Cell Signaling, Beverly, MA, USA
rabbit anti-p38 ^{MAPK}	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
rabbit anti-Phospho-Akt	Cell Signaling, Beverly, MA, USA
rabbit anti-Akt	Cell Signaling, Beverly, MA, USA
mouse anti-Phospho-Src-Y ⁴¹⁸	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
rabbit anti-Src	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Meerrettich-konj. mouse IgG	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Meerrettich-konj. rabbit	Dako, Hamburg, Deutschland

2.2.5 Lösungen für die Immunzytochemie

PBS

- 137 mM Natriumchlorid
- 2,7 mM Kaliumchlorid
- 10 mM NaH₂PO₄
- 1,8 mM KH₂PO₄

PFA 4 % (w/v)

45 ml H₂O auf 60 °C erhitzen

2 g PFA + 1 Tropfen NaOH (1 M) zugeben, filtrieren

5 ml 10 x PBS; mit H₂O auf 50 ml auffüllen

2.2.6 Antikörper für die Immunzytochemie

rabbit anti-CD95	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
mouse anti-GFAP	Millipore, Billerica, MA, USA
Cy-3-konj. donkey anti-rabbit IgG	Millipore, Billerica, MA, USA
FITC-konj. donkey anti-mouse IgG	Millipore, Billerica, MA, USA

2.2.7 Inhibitoren

Indomethacin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
ВАРТА	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Harnsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
L-NMMA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Thiouracil	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Apocynin	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Katalase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
SOD	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.2.8 Reagenzien

30 % Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Agarose A/G	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
All Blue Protein Marker	Bio-Rad, München, Deutschland
Bradford-Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
Bromphenolblau	Bio-Rad, München, Deutschland
BSA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cell proliferation ELISA, BrdU	Roche, Mannheim, Deutschland
Enhanced Chemiluminescent Substrate	GE Healthcare, Braunschweig, Deutschland
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Braunschweig, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Prolong Gold Antifade Reagent mit DAPI	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
In situ cell death detection kit	Roche, Mannheim, Deutschland

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Astrozyten

Eine CD95-Expression in kultivierten Astrozyten konnte mit Hilfe immunzytochemischer Färbungen gezeigt werden (Abb. 6). Wie bereits gezeigt wurde, exprimieren auch humane Astrozyten CD95 (Becher et al., 1998). Die CD95-Expression in Astrozyten wurde in der Literatur bereits ausreichend dokumentiert, die physiologische Rolle des Rezeptors aber sollte noch genauer analysiert werden.



Abb. 6: CD95-Expression in kultivierten Astrozyten

Kultivierte Astrozyten wurden gewaschen, fixiert, permeabilisiert und abgesättigt. Anschließend wurden die Zellen über Nacht mit CD95 (rot) und GFAP (grün) inkubiert und dann weitere 60 min Cy-3 und FITC ausgesetzt. Die Zellkernfärbung wurde mit DAPI durchgeführt. (blau) Eine mikroskopische Analyse erfolgte mit Hilfe des LSM. Durch die ICC konnte eine CD95-Expression in Astrozyten gezeigt werden. Maßstabsbalken: 100 µm. Vergrößerung 400x. (*n* = 3). (Cy-3: Carbocyanin-3; DAPI: 4',6-Diamidin-

2-phenylindol, FITC: Fluoresceinisothiocyanat; GFAP: *Glial fibrillary acidic protein*; ICC: Immunzytochemie; LSM: Laserscanning-Mikroskop)

3.2 Fehlende Apoptose-Induktion in Astrozyten nach CD95L-Stimulation

Es ist bekannt, dass nach CD95L-Bindung ein primär apoptotischer Signalweg eingeleitet wird. Um zu untersuchen, ob CD95L in Astrozyten Apoptose auslöst, wurde mittels TUNEL-Technik unter Zugabe von CD95L, TNF-[] oder TRAIL der Anteil apoptotischer Zellen dargestellt (Abb. 7). Interessanterweise induzierte CD95L in Astrozyten keine Apoptose. Auch TNF-[] oder TRAIL, weitere Liganden der TNF-Superfamilie, konnten keine Apoptose in den Zellen auslösen. In der Positivkontrolle erscheinen die apoptotischen Astrozyten grün fluoreszierend.



Abb. 7: Fehlende Apoptose-Induktion nach Todesrezeptorstimuli in kultivierten Astrozyten

Astrozyten wurden isoliert, kultiviert und über einen Zeitraum von 18 h mit CD95L (100 ng/ml), TRAIL (100 ng/ml), TNF-[] (10 ng/ml) oder TNF-[] (1 µg/ml) stimuliert. Als Positivkontrolle diente die Zugabe von Desoxyribonuklease. Die Zellen wurden mittels TUNEL-Assay bearbeitet und der Anteil der apoptotischen Zellen (grün) wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops dargestellt. Weder CD95L, noch TRAIL oder TNF-[] konnten eine Apoptose-Induktion in den Astrozyten auslösen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Maßstabsbalken: 100 µm. Vergrößerung: 200x. (*n* = 3).

(CD95L: CD95 Ligand; h: Stunde; DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; TNF-[]: Tumor-Nekrose-Faktor-[]; TRAIL: *Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand;* TUNEL: *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated X-dUTP nick end labeling*)

3.3 CD95L-induzierte JNK-Aktivierung und p38^{MAPK}-Aktivierung

Die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) ist als Stresskinase bekannt, die bei apoptotischen (Guo et al., 1998) oder inflammatorischen Signalwegen (Whitmarsh and Davis, 1996) aktiviert wird. Da, wie bereits mittels TUNEL-Methode beschrieben, CD95L keine Apoptose auslöst, liegt es nahe, dass auch JNK unter CD95L-Zugabe nicht aktiviert wird.

Um diesen Sachverhalt zu analysieren, wurden Zeit- und Konzentrationsreihen mit CD95L an Astrozyten durchgeführt und über SDS/PAGE und Western Blot mit spezifischem Antikörper für die phosphorylierte (P) JNK dargestellt. Wider Erwarten führte CD95L nach 120 min oder ab 50 ng/ml zu einer signifikanten Aktivierung und vermehrten Phosphorylierung von JNK-2 (Abb. 8). Obwohl demnach unter CD95L eine Aktivierung der pro-apoptotischen Kinase JNK stattfindet, wird in Astrozyten keine Apoptose eingeleitet.

JNK wird durch drei Gene kodiert: JNK-1/-2 kommen ubiquitär vor, wohingegen JNK-3 größtenteils im Gehirn und auch im Herzen und Hoden exprimiert wird (Davis, 2000). JNK-1/-2 werden gleich reguliert und aktiviert, für die Auswertung wurde JNK-2 ausgewählt.



Abb. 8: CD95L-induzierte Aktivierung von JNK-2

Astrozyten wurden isoliert, kultiviert und über einen Zeitraum von 0-180 min mit CD95L (100 ng/ml) (**A**) oder 3 h mit verschiedenen Konzentrationen von CD95L (0-100 ng/ml) stimuliert (**C**). Die Phosphorylierung wurde mittels Western Blot analysiert. Gesamt JNK diente als Beladungskontrolle. Abbildung (**B**) und (**D**) zeigen die densitometrischen Auswertungen von P-JNK-2 unter Stimulation mit CD95L. CD95L führte innerhalb von 120 min oder ab 50 ng/ml zu einer signifikanten Zunahme von P-JNK-2. ($n \square 3$).

(CD95L: CD95 Ligand; h: Stunden; JNK: c-Jun-N-terminale Kinase; min: Minuten; ng/ml: Nanogramm pro Milliliter; P: Phosphorylierung)

Neben JNK-1/-2 und Erk-1/-2 gehört die p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38^{MAPK}) zu den MAPK. Um zu prüfen, wie CD95L p38^{MAPK} beeinflusst, wurde eine SDS/PAGE- und Western Blot-Analyse der mit CD95L behandelten Astrozyten durchgeführt (Abb. 9). In der Zeitreihe ist innerhalb von 120 min eine signifikante p38^{MAPK}-Phosphorylierung/Aktivierung zu beobachten; CD95L-Konzentrationen ab 50 ng/ml zeigen ebenfalls eine signifikante p38^{MAPK}-Aktivierung/Phosphorylierung.



Abb. 9: CD95L-induzierte Aktivierung von p38^{MAPK}

Astrozyten wurden kultiviert und mit CD95L (100 ng/ml) über einen Zeitraum von 0-180 min (**A**) oder 3 h mit Konzentrationen von 0-100 ng/ml (**C**) stimuliert. Die Aktivierung/Phosphorylierung von p38^{MAPK} wurde mittels Western Blots analysiert. Gesamt-p38^{MAPK} diente als Beladungskontrolle. Die Aktivierung von p38^{MAPK} wurde densitometrisch ausgewertet (**B**, **D**). Es konnte innerhalb von 120 min nach CD95L-Stimulation eine signifikante p38^{MAPK}-Aktivierung beobachtet werden. CD95L-Konzentrationen ab 50 ng/ml zeigten eine signifikante p38^{MAPK}-Aktivierung. ($n \square$ 3).

(CD95L: CD95 Ligand; MAPK: *Mitogen-activated protein kinases;* min: Minuten; ng/ml: Nanogramm pro Milliliter; p38^{MAPK}: p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase)

3.4 CD95L-induzierte Protein-Tyrosin-Nitrierung in Astrozyten

Über Hepatozyten ist bekannt, dass eine CD95-Tyrosin-Phosphorylierung als Voraussetzung für die CD95-Aktivierung, die DISC-Bildung und die Apoptoseeinleitung gilt (Reinehr et al., 2003). Diese Tyrosin-Phosphorylierung wird durch eine Tyrosin-Nitrierung gehemmt, eine CD95-Aktivierung kann nicht mehr ausgelöst werden und die Zelle ist so vor CD95L-induzierter Apoptose geschützt. Diese beiden Vorgänge, CD95-Tyrosin-Phosphorylierung und CD95-Tyrosin-Nitrierung, schließen sich gegenseitig aus (Reinehr et al., 2004). Erstaunlicherweise induzierte CD95L in ruhenden HSZ innerhalb von 15 min eine CD95-Tyrosin-Nitrierung (Reinehr et al., 2008).

Ist diese aus den Hepatozyten und rHSZ bekannte Nitrierung möglicherweise auch für die Todesrezeptor-Liganden-induzierte Apopotoseresistenz in Astrozyten verantwortlich?

Um zu untersuchen, ob überhaupt Proteine in Astrozyten als Reaktion auf CD95L tyrosin-nitriert werden, wurde nach Zugabe von CD95L mit Hilfe der Immunpräzipitation, SDS/PAGE und Western Blot eine Gesamt-Protein-Tyrosin-Nitrierung dargestellt. Astrozyten wurden CD95L in unterschiedlich langen Inkubationszeiten (0-180 min) oder verschiedenen Konzentrationen (0-100 ng/ml) ausgesetzt (Abb. 10).





Astrozyten wurden kultiviert und entweder mit CD95L (100 ng/ml) über einen Zeitraum von 0-180 min (**A**) oder 3 h mit Konzentrationen von 0-100 ng/ml (**B**) stimuliert. Die Proteine wurden immunpräzipitiert und eine Protein-Tyrosin-Nitrierung mittels Western Blot dargestellt. GAPDH diente als Beladungskontrolle. Bei etwa 50 kD konnte nach CD95L-Stimulation entweder nach 15 min (100 ng/ml) oder nach 50 ng/ml (3 h) eine Protein-Tyrosin-Nitrierung detektiert werden. (n = 3)

(CD95L: CD95 Ligand; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphodehydrogenase; h: Stunden; kD: Kilodalton; min: Minuten; ng/ml: Nanogramm pro Milliliter; Protein-Y-NO₂: Protein-Tyrosin-Nitrierung)

Tatsächlich konnte in Abhängigkeit von CD95L eine Bande bei ca. 50 kD detektiert werden; diese Bande spiegelt wahrscheinlich CD95 wider, was im Folgenden durch Immunpräzipitation getestet werden sollte. Stimulationszeiten von 15 min oder CD95L-Konzentrationen von 50 ng/ml waren schon ausreichend, um eine Protein-Tyrosin-Nitrierung bei 50 kD nachzuweisen.

3.5 CD95L-induzierte CD95-Tyrosin-Nitrierung in Astrozyten

Ob CD95L in Astrozyten eine CD95-Tyrosin-Nitrierung hervorruft, wurde mittels Immunpräzipitation, SDS/PAGE und Western Blot untersucht. Die Zellen wurden mit CD95L stimuliert und eine zeit- und konzentrationsabhängige CD95-Y-NO₂ wurde gezeigt: Inkubationszeiten ab 30 min mit CD95L oder

Konzentrationen ab 25 ng/ml genügten für eine signifikante Zunahme der CD95-Y-NO2 (Abb. 11). Außerdem zeigten Proteinsequenzierungen, dass es sich bei der 50 kD schweren Bande (Abb. 10) um CD95 handelt (nicht gezeigt).



Abb. 11: CD95L-induzierte CD95-Tyrosin-Nitrierung

Astrozyten wurden kultiviert und über einen Zeitraum von 0-180 min mit CD95L (100 ng/ml) (**A**) oder 3 h mit unterschiedlichen CD95L-Konzentrationen (0-100 ng/ml) (**C**) stimuliert. CD95 wurde immunpräzipitiert und die CD95-Tyrosin-Nitrierung mittels Western Blot analysiert. CD95 diente als Beladungskontrolle. Die CD95-Tyrosin-Nitrierung unter Stimulation mit CD95L wurde densitometrisch ausgewertet (**B**, **D**). Bereits nach 30 min oder nach 10 ng/ml konnte eine CD95L-induzierte CD95-Tyrosin-Nitrierung detektiert werden. (*n* [4).

(CD95L: CD95 Ligand; CD95-Y-NO₂: CD95-Tyrosin-Nitrierung; h: Stunden; min: Minuten; ng/ml: Nanogramm pro Milliliter; Tyr: Tyrosinrest)

3.6 Todesrezeptor-Liganden-induzierte CD95-Tyrosin-Nitrierung

Auch weitere Todesrezeptorliganden aus der TNF-Superfamilie, wie TRAIL oder TNF-[], induzieren in rHSZ eine CD95-Y-NO₂ (Reinehr et al., 2008). Nun ergibt sich die Frage, ob in Astrozyten ebenfalls eine Todesrezeptor-Liganden-induzierte CD95-Y-Nitrierung zu beobachten ist. Dazu wurden die Zellen 60 min mit CD95L, TRAIL oder TNF-[] stimuliert, CD95 immunpräzipitiert und per Western Blot

detektiert und analysiert (Abb. 12). Dieser Versuch wurde analog zur Todesrezeptorreihe bei ruhenden HSZ durchgeführt (Reinehr et al., 2008).

Auch in Astrozyten induzierten CD95L, TRAIL und TNF-[] eine signifikante Zunahme der CD95-Y-NO₂, was eine mögliche Verbindung zwischen den Todesrezeptorsystemen nahelegt.



Abb. 12: CD95L-, TRAIL- und TNF-[]-induzierte CD95-Tyrosin-Nitrierung in Astrozyten

Astrozyten wurden isoliert, kultiviert und 60 min mit CD95L (100 ng/ml), TRAIL (100 ng/ml) oder TNF-[] (10 ng/ml oder 1 μ g/ml) stimuliert. (**A**) CD95 wurde immunpräzipitiert und per Western Blot-Analyse detektiert. Gesamt-CD95 diente als Beladungskontrolle. (**B**) Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Analyse der CD95-Tyrosin-Nitrierung im Vergleich zu Kontrollexperimenten (gleich 1 gesetzt). CD95L, TRAIL und TNF-[] induzierten eine signifikante Zunahme der CD95-Tyrosin-Nitrierung. (*n* = 5).

(CD95L: CD95 Ligand; CD95-Y-NO₂: CD95-Tyrosin-Nitrierung; ng/ml: Nanogramm pro Milliliter; TNF-[]: Tumor-Nekrose-Faktor-[]; TRAIL: *Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*; Tyr: Tyrosinrest)

3.7 Mechanismus der CD95L-induzierten CD95-Tyrosin-Nitrierung

Um den molekularen Mechanismus der CD95L-induzierten CD95-Tyrosin-Nitrierung in Astrozyten zu analysieren, wurde ein Inhibitorprofil mit neun Hemmstoffen erstellt (Abb. 13), die bereits in der Literatur in Zusammenhang mit Protein-Tyrosin-Nitrierungen in Astrozyten gebracht werden.

Die höchst zu verzeichnende und siginifikante Hemmung wurde mit Thiouracil, einem Hemmstoff der dualen Oxidase (Duox) als NADPH-Oxidasen (Nox)-Untereinheit, erreicht. Apocynin, ein Inhibitor der katalytischen Untereinheit der NADPH-Oxidase, verzeichnete eine ähnlich hohe und signifikante Hemmung der CD95-Y-NO₂. Die NADPH-Oxidase katalysiert die Reduktion von Sauerstoff zum Hyperoxid-Anion.

In Anwesenheit von Harnsäure, einem potenten Peroxynitrit-Radikalfänger (Whiteman and Halliwell, 1996), konnte eine Inhibierung der CD95L-induzierten CD95-Y-NO₂ beobachtet werden. Unter experimentellen HE-Bedingungen wurden eine erhöhte Aktivität der NO-Synthetase (NOS) und eine vermehrte Genexpression gefunden (Rao et al., 1997, 1995). Um die Aktivität der NOS bei der CD95L-induzierten CD95-Y-NO₂ zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit der weit verbreitete NOS-

Inhibitor N(G)-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) (Knowles and Moncada, 1994) verwendet. L-NMMA führte zu einer Reduzierung der CD95-Y-NO₂. Ferner konnte durch die Zugabe von Katalase, die Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zu Sauerstoff und Wasser umsetzt, eine Hemmung der Nitrierung erreicht werden. Die Superoxiddismutase (SOD), die Hyperoxid-Anionen zu H₂O₂ umwandelt, zeigte ebenfalls eine Hemmung der Tyrosin-Nitrierung. Doch weder die Kombination aus Katalase/SOD noch der nichtselektive Cyclooxygenase (COX)-Hemmer Indomethacin konnten eine Hemmung der CD95L-induzierten CD95-Y-NO₂ erreichen.

Der extrazelluläre Ca²⁺-Chelator EGTA konnte zu keiner Inhibierung der CD95L-induzierten CD95-Y-NO₂ führen. Im Gegensatz dazu fand unter Hinzugabe des intrazellulären Ca²⁺-Chelators 1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (BAPTA) eine Hemmung der CD95-Y-NO₂ statt, deren statistischer Wert im *Student t-Test* mit 0,078 knapp über der festgelegten Signifikanz (p < 0,05) lag.



Abb. 13: Charakterisierung der CD95L-induzierten CD95-Tyrosin-Nitrierung in Astrozyten

Astrozyten wurden isoliert und kultiviert. CD95 wurde immunpräzipitiert, die CD95-Tyrosin-Nitrierung mittels Western Blot detektiert (**B**) und anschließend densitometrisch ausgewertet (**A**), wobei die CD95-Tyrosin-Nitrierung unter Kontrollbedingungen gleich 1 gesetzt wurde. Gesamt-CD95 diente als Beladungskontrolle. Astrozyten wurden 3 h mit CD95L (50 ng/ml) stimuliert. Indomethacin (10 μ M), BAPTA (20 μ M), Harnsäure (200 μ M), L-NMMA (1 mM), Thiouracil (1 mM), Apocynin (300 μ M), Katalase (8000 U/ml), SOD (6000 U/ml) oder Katalase/SOD (8000/6000 U/ml) wurden 30 min vorinkubiert. EGTA (3 mM) wurde 3 min vorinkubiert. Eine signifikante Hemmung der CD95L-induzierten CD95-Tyrosin-Nitrierung konnte durch Thiouracil und Apocynin erreicht werden. BAPTA konnte mit $p \approx$ 0,078 die Tyrosin-Nitrierung inhibieren. Die Nitrierung wurde ebenfalls durch Harnsäure, L-NMMA, Katalase oder SOD gehemmt. (*n* = 5).

(BAPTA: 1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure; CD95L: CD95 Ligand; CD95-Y-NO₂: CD95-Tyrosin-Nitrierung; EGTA: Ethylenglycol-bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetat; h: Stunden; L-NMMA: N(G)-Monomethyl-L-Arginin; min: Minuten; ng/ml: Nanogramm pro Milliliter; mM: Millimolar; μM: Mikromolar; n.s.: nicht signifikant; SOD: Superoxiddismutase; U/ml: Units pro Milliliter)

3.8 CD95L stimuliert die Proliferation von Astrozyten

Um zu analysieren, ob Astrozyten unter Zugabe von Todesrezeptor-Liganden nicht nur vor Apoptose geschützt sind, sondern möglicherweise sogar proliferieren, wurde der BrdU-Einbau nach Stimulation mit CD95L, TRAIL oder TNF-[] gemessen.

Tatsächlich führte die Stimulation mit CD95L (100 ng/ml) oder TNF-[] (1 µg/ml) zu einer signifikanten BrdU-Zunahme (Abb. 14). Aus der Literatur ist bekannt, dass rHSZ unter Zugabe verschiedener Todesstimuli ebenso proliferieren (Reinehr et al., 2008). Dies unterstützt die Annahme, dass rHSZ und Astrozyten ähnliche Charakteristika teilen.





(BrdU: 5-Bromo-2'-desoxy-Uridin; CD95L: CD95 Ligand; FCS: *fetal calf serum*; h: Stunden; ng/ml: Nanogramm pro Milliliter; TNF-[]: Tumor-Nekrose-Faktor-[]; TRAIL: *Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*)

Nun stellt sich die Frage, ob in Astrozyten nach CD95L-Stimulation wachstumsfördernde Wege, wie z.B. die Erk-1/-2-Aktivierung, eingeschaltet werden. Dazu wurden Western Blot-Analysen mit spezifischem Antikörper für die phosphorylierte Form von Erk-1/-2 anhand von Zeit- und Konzentrationsreihen von CD95L untersucht und anschließend densitometrisch ausgewertet (Abb. 15). Die Zugabe von CD95L führte spätestens nach 180 min oder ab einer Konzentration von 50 ng/ml zu einer signifikanten Erk-1/-2-Phoshporylierung. Eine Erk-1/-2-Phosphorylierung bedeutet eine Erk-1/-2-Aktivierung.



Abb. 15: CD95L-induzierte Aktivierung von Erk-1/-2

Astrozyten wurden isoliert, kultiviert und mit CD95L entweder über einen Zeitraum von 0-180 min (100 ng/ml) (**A**) oder 3 h mit unterschiedlichen Konzentrationen (0-100 ng/ml) (**C**) stimuliert. P-Erk-1/-2 wurde mittels Western Blot detektiert. Gesamt Erk-1/-2 diente als Beladungskontrolle. Es folgte eine densitometrische Auswertung von P-Erk-1 unter Stimulation mit CD95L (**B**, **D**). CD95L führte nach 180 min oder ab 50 ng/ml zu einer signifikanten Erk-1-Phosphorylierung. (*n*] 3).

(CD95L: CD95 Ligand; Erk: *Extracellular-signal regulated kinase*; h: Stunden; min: Minuten; ng/ml: Nanogramm pro Milliliter; P: Phosphorylierung)

Die Proteinkinase B (PKB, Akt) wird mit anti-apoptotischen Signalwegen assoziiert. In Übereinstimmung mit der fehlenden Apoptose und der Zunahme von BrdU zeigten die Western Blot-Ergebnisse eine signifikante CD95L-induzierte Akt-Phosphorylierung/Aktivierung innerhalb von 180 min oder ab einer Konzentration von 50 ng/ml (Abb. 16).



Abb. 16: CD95L-induzierte Aktivierung von Akt

Nach Isolation und Kultivierung von Astrozyten wurden diese über einen Zeitraum von 180 min mit CD95L (100 ng/ml) (**A**) oder 3 h mit verschiedenen CD95L-Konzentrationen (0-100 ng/ml) stimuliert (**C**). P-Akt wurde anhand von Western Blots detektiert, gesamt-Akt diente als Beladungskontrolle. Die Akt-Aktivierung wurde densitometrisch ausgewertet (**B**, **D**). Innerhalb von 180 min konnte unter CD95L-Stimulation eine signifikante Akt-Phosphorylierung beobachtet werden. Eine konzentrationsabhängige signifikante Akt-Aktivierung konnte ab 50 ng/ml detektiert werden. ($n \square$ 3).

(Akt: Proteinkinase B; CD95L: CD95 Ligand; h: Stunden; min: Minuten; ng/ml: Nanogramm pro Milliliter; P: Phosphorylierung)

Die als anti-apoptotische geltende Proteinkinase c-Src (Akronym aus *cellular* und *sarcoma Kinase*) als Prototyp der Kinasen der Src-Familie stellt einen weiteren Kinasesignalweg dar.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Angiotensin II in Astrozyten eine Src-Phosphorylierung induziert und folglich über Erk-1/-2-Aktivierung das Zellwachstum angeregt wird (Clark and Gonzalez, 2007). Daraus könnte man suggerieren, dass CD95L auch Einfluss auf diesen Mechanismus haben könnte.

Um zu prüfen, ob CD95L Einfluss auf c-Src hat, wurden Western Blots mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper durchgeführt (Abb. 17). Unter CD95L-Stimulation kommt es innerhalb von 120 min zu einer signifikanten c-Src-Aktivierung am Tyrosinrest 418. Um zu analysieren, ob dabei eine

Konzentrationsabhängigkeit besteht, wurden Astrozyten mit CD95L-Konzentrationen von 0-100 ng/ml stimuliert. Eine signifikante c-Src-Aktivierung wurde ab 50 ng/ml detektiert. Als Kinase mit antiapoptotischen Eigenschaften unterstützen diese Ergebnisse der c-Src-Aktivierung die durch CD95Linduzierte, fehlende Apoptose.



Abb. 17: CD95L-induzierte c-Src-Aktivierung

Astrozyten wurden isoliert, kultiviert und mit CD95L (100 ng/ml) über einen Zeitraum von 0-180 min (**A**) oder 3 h mit verschiedenen Konzentrationen von CD95L (0-100 ng/ml) stimuliert (**C**). Die c-Src-Phosphorylierung wurde mittels Western Blot analysiert. Gesamt Src diente als Beladungskontrolle. Abbildung (**B**) und (**D**) zeigen die densitometrischen Auswertungen von P-Src unter CD95L-Stimulation. CD95L führte nach 120 min oder 50 ng/ml zu einem signifikanten Anstieg von P-Src. ($n \square 3$).

(CD95L: CD95 Ligand; h: Stunden; min: Minuten; ng/ml: Nanogramm pro Milliliter; P:Phosphorylierung; c-Src: cellular sarcoma Kinase)

4 Diskussion

4.1 CD95L als mitogenes, anti-apoptotisches Signal in Astrozyten

Eine CD95 Ligand-induzierte CD95-Tyrosin-Nitrierung in Astrozyten konnte in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden. Durch Inhibitorstudien gelang eine Analyse der hierfür zugrundeliegenden molekularen Mechanismen.

Interessanterweise leitet die Stimulation mit CD95L in Astrozyten nicht nur keine Apoptose ein, sondern fungiert sogar als mitogenes, anti-apoptotisches Signal. Auch die Stimulation mit anderen Liganden der TNF-Rezeptorfamilie resultierte in Astrozyten in einem erhöhten Einbau von BrdU. Diese überraschenden Ergebnisse als Antworten auf die Todesrezeptor-Liganden müssen im Kontext kürzlich erschienener Literatur gesehen werden. Erstaunlicherweise können sich Astrozyten allein unter Zugabe des Transkriptionsfaktors Neurogenin zu Nervenzellen mit funktionsfähigens Synapsen differenzieren (Heinrich et al., 2011), was den Stammzellcharakter dieser Zellen unterstreicht. In einer anderen Studie wurden Astrozyten als multipotente Zellen beschrieben, die in verletzten Gehirnregionen neuronale Reparaturmechanismen hervorrufen können (Buffo et al., 2008). Astrozyten haben außerdem eine wichtige Funktion in der Neurogenese; sie können die Stammzellen in bestimmten Hirnregionen anregen, sich zu Nervenzellen auszudifferenzieren (Song et al., 2002). Demnach könnten Astrozyten eine Rolle bei der Regeneration neurologischer Erkrankungen spielen. Ausgehend von Astrozyten können sich neuroepitheliale Hirntumoren, sogenannte Astrozytome bilden, die man nach WHO in vier Grade differenziert. WHO Grad I enstpricht dem heilbaren pilozytische Astrozytom, WHO Grad IV einem Glioblastom mit infauster Prognose. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Aktivierung des Todesrezeptors CD95 wider Erwarten auch nicht zu einer Regression, sondern zur Progression des Glioblastoms führt (Kleber et al., 2008a).

Während Neurone und Oligodendrozyten nach CD95L-Stimulation einen apoptotischen Signalweg eingehen, gelten Astrozyten gegenüber CD95L als apoptoseresistent (Choi et al., 1999; D'Souza et al., 1996; Le-Niculescu et al., 1999), wie auch die Ergebnisse dieser Arbeit mithilfe der TUNEL-Technik zeigen. In Übereinstimmung damit zeigten Lee et al. ebenfalls eine fehlende Apoptoseinduktion nach CD95L-Stimulation in Astrozyten, obwohl die Zellen CD95 exprimieren, und beschrieben zusätzlich eine inflammatorische Signalantwort durch CD95L (Lee et al., 2000). Die zur Makroglia gehörenden Astrozyten scheinen sich bedeutend von den Eigenschaften der Mikroglia zu unterscheiden: So konnte in Mikroglia ein CD95L-induzierter zytotoxischer Signalweg nachgewiesen werden (Lee et al., 2000). Die Aktivierung von p38^{MAPK} spielt im Rahmen inflammatorischer Krankheitsprozesse eine zentrale Rolle (Herlaar and Brown, 1999). Wie bereits in anderen Zelltypen beschrieben wurde, steht p38^{MAPK} auch mit CD95L-induziertem Zelltod in Verbindung (Chen et al., 1998; Davidson et al., 2002). Übereinstimmend mit der oben beschriebenen Beobachtung konnte hier eine CD95L-induzierte p38^{MAPK}-Phosphorylierung detektiert werden. Durch die Stimulation der Astrozyten mit CD95L wird in dieser Arbeit somit wahrscheinlich auch ein inflammatorischer Signalweg ausgelöst.

Dass Astrozyten resistent gegenüber ROS/RNS sind, ist aus der Literatur bekannt (Cassina et al., 2002; Knorpp et al., 2006). Ähnlich wie die Astrozyten sterben auch HSZ unter milden ROS-

Bedingungen nicht; es konnte gezeigt werden, dass ROS die Proliferation der HSZ begünstigt (Lee et al., 1995). Hepatozyten hingegen leiten im Gegensatz zu Astrozyten und HSZ unter dem Einfluss von ROS eine CD95-abhängige Apoptose ein (Reinehr et al., 2006). Dies legt nahe, dass Ähnlichkeiten zwischen HSZ und Astrozyten bestehen könnten.

Auch wenn die Gründe für die Apoptoseresistenz der Astrozyten nach CD95L-Stimulation nicht komplett verstanden werden, liegt es nahe, dass die hier nachgewiesene CD95-Tyrosin-Nitrierung dafür mitverantwortlich sein könnte. Wie im Folgenden ausführlich beschrieben, schützt die CD95L-induzierte CD95-Tyrosin-Nitrierung HSZ vor Apoptose und CD95L fungiert sogar als mitogenes Signal, was eine wichtige Bedeutung für die Leberregeneration darstellen könnte.

Interessant war außerdem die Erkenntnis, dass Todesrezeptoren nicht nur den Zelltod, sondern auch Zellproliferation vermitteln können (Budd, 2002). Die ersten Ansätze dazu lieferten bereits Lipsky et al., die nach TNF-[]-Stimulation in T- und B-Lymphozyten ein Zellwachstum detektierten (Jelinek and Lipsky, 1987; Yokota et al., 1988). Publikationen aus den letzten Jahren zeigen, dass nach CD95L-Stimulation der MAPK-Signalweg (p38^{MAPK}, JNK, Erk) aktiviert wird (Barnhart et al., 2004; Desbarats et al., 2003; Lenczowski et al., 1997; Tourian et al., 2004; Toyoshima et al., 1997). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen löst CD95L auch in Astrozyten eine Phosphorylierung und somit Aktivierung der wachstumsfördernden Kinase Erk aus, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Eine JNK-Aktivierung hingegen scheint ein entscheidender Auslöser für Apoptose bei verschiedenen Stimuli zu sein (Guo et al., 1998). So wurde in Hepatozyten ein CD95L-induziertes oxidatives Stresssignal beschrieben, das zu einer JNK-Aktivierung, einer EGFR/CD95-Assoziation, einer EGFR-katalysierten CD95-Tyrosin-Phosphorylierung und somit zu einer DISC-Bildung und Apoptoseeinleitung führt (Eberle et al., 2005; Reinehr et al., 2005a, 2003). In ruhenden und aktivierten HSZ wird nach CD95L-Stimulation keine JNK-Aktivierung induziert; erst die simultane Stimulation mit CD95L/Cycloheximid (CHX), einem Translationshemmer, führt in aktivierten, nicht aber in ruhenden HSZ, zu einer CD95Linduzierten kontinuierlichen JNK-Aktivierung, EGFR/CD95-Assoziation und Apoptose-Induktion (Reinehr et al., 2008). In ruhenden HSZ war sowohl nach Stimulation mit CD95L als auch nach simultaner CHX-Stimulation keine CD95-Tyrosin-Phosphorylierung, sondern eine CD95-Tyrosin-Nitrierung zu beobachten, die den pro-apoptotischen Signalweg hemmt (Reinehr et al., 2008). Gleichzeitig führte die Stimulation mit CD95L in ruhenden HSZ über einen Src- und Matrixmetalloproteinasen (MMP)-abhängigen Mechanismus zu einer liganden-abhängigen EGFR-Aktivierung, die den mitogenen Signalweg einleitet (Reinehr et al., 2008). Diese CD95L-induzierte CD95-Y-NO₂ konnte hier auch in Astrozyten nachgewiesen werden und könnte ein Grund für die Apoptoseresistenz der Zellen sein. CD95L löst sogar in Astrozyten eine Proliferation der Zellen aus, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Ob eine EGFR-Aktivierung für den mitogenen Signalweg Voraussetzung ist und somit eine weitere Gemeinsamkeit mit ruhenden HSZ darstellt, müssen weitere Studien zeigen. Abb. 18 stellt nach CD95L-Stimulation die verschiedenen Signalkaskaden von Astrozyten, ruhenden HSZ, aktivierten HSZ und Hepatozyten schematisch gegenüber. Paradoxerweise wird in der vorliegenden Arbeit nach CD95L-Stimulation auch die Stresskinase JNK aktiviert, obwohl keine Apoptose durch CD95L ausgelöst wurde, sondern im Gegensatz dazu sogar eine Proliferation der Astrozyten zu verzeichnen war. Möglicherweise wird der pro-apoptotische Signalweg durch simultan aktivierte anti-apoptotische Signalwege, wie beispielsweise der Erk- und

Akt-Aktivierung, unterdrückt (Davis, 2000). Eine andere Möglichkeit liegt in einer evtl. transienten und damit nicht kontinuierlichen JNK-Aktivierung. Bekanntermaßen verursachen verschiedene Zytokine eine transiente JNK-Aktivierung, die aber keine Apoptose auslöst (Liu et al., 1996). Eine kürzlich erschienene Publikation bringt die JNK-Aktivierung sogar in Zusammenhang mit Zellproliferation (Ma et al., 2012).

Weitere Gründe für die Apoptoseresistenz der Astrozyten gegenüber CD95L werden im Folgenden diskutiert. In anderen Studien konnte gezeigt werden, warum humane Astrozyten einen apoptotischen, CD95L- oder TRAIL-vermittelten Insult überleben: Das *cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1β-converting enzyme-inhibitory protein* (c-FLIP) wird in diesen Zellen exprimiert und phosphoryliert, inhibiert die Caspase-8 und verhindert so die CD95L-induzierte Apoptose (Song et al., 2006). In einer anderen Studie wird FLIP als Modulator zwischen apoptotischem und proliferativen Signalweg nach CD95L-Stimulation beschrieben: Durch FLIP wird nicht nur die DISC-Bildung unterdrückt, sondern über eine Erk-Aktivierung Proliferation ausgelöst (Budd, 2002). Eine weitere, kürzlich erschienene Studie beschreibt neonatale Astrozyten aufgrund der noch inaktivierten Caspase-8 als resistent gegenüber CD95L-induzierter Apoptose (Barca et al., 2010). Wahrscheinlich exprimieren Astrozyten eine hohe Dichte an FLIP, sodass kein Zelltod, sondern ein proliferativer Signalweg über Erk eingeleitet wird. Allerdings ist zu betonen, dass es sich in dieser Studie um neonatale (1-5 Tage alte) Astrozyten handelt, die in dieser Arbeit verwendeten Astrozyten aber maximal ein Tag alt waren.

In Übereinstimmung damit konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Erk-Aktivierung als notwendige Voraussetzung für die CD95L-induzierte Proliferation von Astrozyten gilt (Barca et al., 2013). Allerdings beschreibt die gleiche Studie, dass die Erk-Phosphorylierung und die Zellproliferation eine aktivierte Caspase-8 voraussetzt. Dem Gedanken entsprechend konnte diese Arbeitsgruppe in neonatalen Astrozyten, die eine inaktivierte Caspase-8 besitzen, nach CD95L-Stimulation kein Wachstum verzeichnen (Barca et al., 2013). Die Arbeitsgruppe von Barca et al. vergleichen allerdings embryonale und neonatale Astrozyten aus Ratten. Wie bereits beschrieben, wurden in der vorliegenden Arbeit maximal einen Tag alte Astrozyten analysiert. Durch die Hemmung der Caspase-8 konnte eine CD95L-induzierte Proliferation sowohl in myeloiden Progenitorzellen (Pellegrini et al., 2005) als auch in T-Zellen (Kennedy et al., 1999) verhindert werden. Die Rolle der Caspase-8 bezüglich der CD95L-induzierten Astrozytenproliferation sollte demnach weiter analysiert werden, möglicherweise gibt es Unterschiede in der Caspase-8-Aktivierung innerhalb des DISC.

Ein weiterer Grund für die Apoptoseresistenz könnte in der möglichen Anwesenheit der *Fas-associated protein phosphatase-1* (FAP-1) liegen: So wurde bereits eine fehlende CD95L-induzierte Apoptose in Ovarialkarzinom-Zellen (Meinhold-Heerlein et al., 2001) und in myeloiden Progenitorzellen (Huang et al., 2013) detektiert, die auf FAP-1 zurückzuführen ist.

Der PI3K/Akt-Signalweg ist ein anderer zentraler Mechanismus, der in anti-apoptotische Funktionen im Rahmen des CD95-Systems involviert ist. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, führt die Stimulation mit CD95L zu einer signifikanten Akt-Phosphorylierung und somit zur Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs, der bei Zellwachstum von Bedeutung ist, aber noch nicht vollständig verstanden wird. Die Proteinkinase B (Akt) ist dafür bekannt pro-apoptotische Proteine zu inhibieren und die Proliferation zu enthemmen: Akt wirkt somit anti-apoptotisch und indirekt stimulierend. PI3K wurde außerdem als wichtiger Mediator des CD95-Systems in Gliomazellen identifiziert (Kleber et al., 2008b). In rHSZ konnte CD95L jedoch keine Akt-Aktivierung auslösen (Reinehr et al., 2008). In der Studie von Barca et al. konnte ebenfalls keine Akt-Phosphorylierung nach CD95L-Stimulation in Astrozyten nachgewiesen werden (Barca et al., 2013), was aber möglicherweise an der zu geringen Konzentration des Liganden lag (5 ng/ml). Allerdings demonstrierten sie, dass die Blockade des PI3K-Signalwegs die CD95L-induzierte Astrozytenproliferation hemmt.

Auch das proliferative Signal nach CD95L-Stimulation in Astrozyten scheint dosisabhängig aufzutreten: Niedrige (5 µg/ml) Konzentrationen induzieren eine Proliferation, bei hohen Ligand-Konzentrationen (10 µg/ml) ist dagegen eine Apoptose zu verzeichnen (Barca et al., 2013). Eine ähnliche Dosisabhängigkeit wurde bereits in T- und B-Lymphozyten beschrieben (Lavrik et al., 2007; Paulsen and Janssen, 2011). Ob die CD95-Tyrosin-Nitrierung bei höheren als in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen (> 100 ng/ml) wieder rückläufig ist, können weitere Studien untersuchen. Allerdings ist es fraglich, ob so hohe Konzentrationen unter physiologischen oder speziellen pathologischen Bedingungen überhaupt vorkommen und die Ergebnisse so von physiologischer Relevanz sind.

Die zur Src-Kinase-Familie gehörenden Kinasen c-Src, Fyn und Yes sind als vor- oder nachgeschaltete Elemente der EGFR-Signaltransduktion bekannt (Carpenter, 1992; Werneburg et al., 2003). In rHSZ führt die Stimulation mit CD95L, TNF-[] und TRAIL zu einer Phosphorylierung von c-Src; diese Aktivierung scheint ein vorgeschaltetes Ereignis der EGFR-Phosphorylierung zu sein und stellt so ein wichtiges Element im mitogenen Signalweg dar (Reinehr et al., 2008). Auch in dieser Arbeit resultierte eine CD95L-Stimulation der Astrozyten in einer c-Src-Aktivierung. Die antiapoptische Wirkung von c-Src scheint demnach auch hier in der mitogenenen Signalkaskade eine Rolle zu spielen. Außerdem ist der Tyrosinrest 845 (Tyr⁸⁴⁵) des EGFR eine Zielstruktur der Src-Kinasen (Biscardi et al., 1999). Welche Rolle EGFR in der CD95L-Stimulation spielt, sollte in ergänzenden Studien unbedingt untersucht werden.

Erwähnenswert ist zudem die Tatsache, dass Astrozyten zwar generell als apoptoseresistent gelten, sie sich aber innerhalb von Krankheitsprozessen durch inflammatorische Mediatoren in reaktive Astrozyten umwandeln können und inflammatorische Zytokine bei reaktiven Astrozyten die Apoptoseresistenz brechen können (Falsig et al., 2004). Bei verschiedenen Pathologien wird sowohl die Expression von CD95L als auch von CD95 in Astrozyten heraufreguliert (Bechmann et al., 2000), so auch bei jenen, die mit einem Zytokingemisch (CCM, *complete cytokine mix*) vorbehandelt wurden (Falsig et al., 2004). Diese Heraufregulation von CD95 konnte allerdings durch gleichzeitige Gabe von CHX gehemmt werden (Falsig et al., 2004). Andere Studien hingegen konnten eine Heraufregulation von CD95 durch Zytokine nicht bestätigen (Becher et al., 1998; D'Souza et al., 1996; Lee et al., 2000), ebenso konnte eine Aufhebung der Apoptoseresistenz durch alleinige Vorbehandlung mit Interferon-γ und CD95L-Stimulation nicht detektiert werden (Lee et al., 2000). Die Zugabe von CHX/CD95L zu CCM-vorbehandelten und dadurch aktivierten Astrozyten führt zur Auflösung der Apoptoseresistenz und induziert den programmierten Zelltod; dies deutet darauf hin, dass protektive Prozesse in aktivierten Astrozyten in Abhängigkeit von der Proteinsynthese vorliegen (Falsig et al., 2004) und man

vielleicht ebenso wie bei HSZ zwischen ruhenden und aktivierten Astrozyten unterscheiden muss. Dass keine CD95-Tyrosin-Nitrierung in aktivierten Astrozyten, die mit CCM vorbehandelt werden, nachzuweisen ist, liegt nahe, muss aber durch weitere Studien untersucht werden.





Astrozyten: CD95L-Stimulation resultiert nicht in einem apoptotischen Signalweg, da CD95 Tyrosin-nitriert und eine pro-apoptotische Signaltransduktion verhindert wird. Gleichzeitig wird eine mitogene Signalkaskade ausgelöst, da die wachstumsfördernden Proteinkinasen Erk-1/-2 und die anti-apoptotisch wirkenden Kinasen c-Src und Akt aktiviert werden. Die Aktivierung von p38^{MAPK} deutet darauf hin, dass außerdem ein inflammatorischer Signalweg

eingeleitet wird. Ruhende HSZ: CD95L induziert über einen c-Src- und MMP-vermittelten Mechanismus eine EGFR-Aktivierung, die einen mitogenen Signalweg einleitet. Über eine gleichzeitig induzierte CD95-Tyrosin-Nitrierung wird die pro-apoptotische Signaltransduktion gehemmt. Aktivierte HSZ: Die Stimulation mit CD95L induziert wie in ruhenden HSZ eine EGFR-Aktivierung und leitet einen proliferativen Signalweg ein. Eine simultan induzierte inaktivierende CD95-Tyrosin-Nitrierung hingegen konnte in aktivierten HSZ nicht nachgewiesen werden. Erst die gleichzeitige Zugabe von CHX induziert die fehlende JNK-Aktivierung, sodass CD95 nach einer Assoziation von EGFR/CD95 tyrosin-phosphoryliert und eine Apoptose ausgelöst wird. Hepatozyten: CD95L induziert eine ROS-Bildung und Yes-vermittelt eine EGFR-Phosphorylierung. Die gleichzeitige JNK-Aktivierung führt dazu, dass EGFR und CD95 assoziieren, CD95 tyrosin-phosphoryliert wird und über die DISC-Bildung ein apoptotischer Signalweg eingeleitet wird.

(Akt: Proteinkinase B; CD95L: CD95 Ligand; CD95-Y-NO₂: CD95-Tyrosin-Nitrierung; CD95-Y-P: CD95-Tyrosin-Phosphorylierung; CHX: Cycloheximid; c-Src: *cellular sarcoma Kinase*; DISC: *Death-inducing signaling complex*; Duox: Duale Oxidase; EGF: *epidermal growth factor;* EGFR: *epidermal growth factor receptor*, Erk: *Extracellular-signal regulated kinase*; HSZ: Hepatische Sternzellen; JNK: c-Jun-N-terminale Kinase; MMP: Matrixmetalloproteinasen; Nox: Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphatoxidase; P: Phosphorylierung; p38^{MAPK}: p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase; ROS: Reaktive Sauerstoffspezies)

4.2 Mechanismus der CD95L-induzierten CD95-Tyrosin-Nitrierung

Bislang sind die Mechanismen, die der CD95L-induzierten CD95-Tyrosin-Nitrierung in Astrozyten zugrunde liegen, noch nicht vollständig aufgedeckt. Die Inhibitorstudien suggerien, dass die NADPH-Oxidase an diesem Prozess beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass kultivierte Astrozyten mRNA für folgende Untereinheiten der NADPH-Oxidase exprimieren: Nox 1, 2 und 4, Duox 1 und 2, p47^{phox} (Reinehr et al., 2007). Die Bildung von ROS konnte in hypoosmolar behandelteten Astrozyten durch den NADPH-Oxidase in Astrozyten bei der ROS-Bildung eine Rolle spielt (Reinehr et al., 2007). Die NADPH-Oxidase in Astrozyten bei der ROS-Bildung eine Rolle spielt (Reinehr et al., 2007). Die NADPH-Oxidase-vermittelte ROS-Bildung könnte unter HE-Bedingungen zur kovalenten Modifikation von Proteinen in Astrozyten beitragen. Es ist also naheliegend, dass die NADPH-Oxidase für die CD95L-induzierten CD95-Y-NO₂ mitverantwortlich ist. Übereinstimmend mit dieser Vermutung reduzieren die Hemmstoffe Thiouracil (Duox-Inhibitor) und Apocynin (Nox-Inhibitor) die CD95-Y-NO₂ signifikant, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, auch wenn die Spezifität des Thyreostatikums Thiouracil nicht sehr hoch ist. In HSZ konnte Thiouracil ebenfalls die CD95L-induzierte CD95-Y-NO₂ signifikant verringern (Reinehr et al., 2008), was auf einen ähnlichen Mechanismus der CD95L-induzierten CD95-Y-NO₂ bei HSZ und Astrozyten schließen lässt.

Der Peroxynitrit-Radikalfänger Harnsäure verhindert eine Ammoniak-induzierte (Schliess et al., 2002), TNF-[]-induzierte (Görg et al., 2006) oder eine hypoosmolar-bedingte PTN in Astrozyten (Schliess et al., 2004), nicht jedoch die Benzodiazepin-induzierte PTN (Görg et al., 2003). Freies Peroxynitrit, ein sehr potenter RNS (Ischiropoulos, 1998), könnte möglicherweise für die CD95-Y-NO₂ in Astrozyten verantwortlich sein. In dieser Arbeit konnte nämlich gezeigt werden, dass Harnsäure eine CD95Linduzierte CD95-Y-NO₂ reduziert. Dies wurde bereits in Hepatozyten beschrieben (Reinehr et al., 2004).

In Übereinstimmung damit konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Kombination von SOD/Katalase sowohl eine Peroxynitrit-Bildung als auch eine Ammoniak-induzierte PTN in Astrozyten verhindern kann (Brunelli et al., 2001; Schliess et al., 2002). Auch eine hyposmolar-

bedingte PTN kann durch SOD/Katalase inhibiert werden (Schliess et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit hingegen ist unter Zugabe von SOD/Katalase keine Hemmung der CD95L-induzierten CD95-Y-NO₂ zu verzeichnen, was gegen freies Peroxynitrit als Nitrierungsquelle spricht.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führt die Zugabe von Katalase zu einer herabgesetzten CD95L-induzierten CD95-Y-NO₂. Demzufolge scheint die Anwesenheit von H₂O₂ oder das Fehlen von O₂ bei der CD95L-induzierten CD95-Y-NO₂ eine Rolle zu spielen. Gegen die erste Vermutung spricht allerdings die Tatsache, dass der CD95-Nitrierungsprozess auch durch Hinzugabe von SOD gehemmt wird, obwohl die SOD die Bildung von H₂O₂ katalysiert. Übereinstimmend mit der Vermutung, dass sauerstofffreie Bedingungen für die CD95L-induzierten CD95-Y-NO₂ notwendig sein könnten, entsteht auch bei der durch SOD katalysierten Reaktion Sauerstoff. Allerdings scheinen Sauerstoffradikale für den Nitrierungsprozess notwendig zu sein, wie die durch SOD gehemmte CD95-Y-NO₂ hier zeigt. Paradoxerweise ist bei simultaner Anwesenheit von Katalase/SOD keine Inhibierung der CD95-Y-NO₂ zu detektieren. Dafür könnte aber die hohe Standardabweichung verantwortlich sein.

L-NMMA (NOS-Inhibitor) konnte sowohl eine NH₄CI-induzierte PTN (Schliess et al., 2002) als auch eine durch hypoosmolare Bedingungen verursachte (Schliess et al., 2004) und eine durch TNF-[] bedingte PTN (Görg et al., 2006) in Astrozyten reduzieren. Im Gegensatz dazu führte L-NMMA zu keiner Inhibierung der Benzodiazepin-induzierten PTN (Görg et al., 2003). Die der Ammoniak-, Hypoosmolarität-, Zytokin- und Benzodiazepin-induzierten PTN zugrundeliegenden Nitrierungswege scheinen sich also zu unterscheiden. Die CD95L-induzierte CD95-Y-NO₂, die in dieser Arbeit analysiert wurde, scheint Übereinstimmungen mit dem Ammoniak-, dem durch hypoosmolare Bedingungen bzw. dem TNF-[]-induzierten Nitrierungsweg zu haben: So führt L-NMMA auch hier zu einer Hemmung der Tyrosin-Nitrierung. NO scheint demnach eine Rolle bei der CD95-Y-NO₂ zu spielen.

Eine NO-induzierte Glutamat-Freisetzung in Astrozyten konnte entweder durch BAPTA oder EGTA verhindert werden, sodass es naheliegt, dass die Glutamat-Freisetzung calciumabhängig erfolgt (Bal-Price et al., 2002). Eine mögliche Calciumabhängigkeit der CD95L-induzierten CD95-Y-NO₂ wurde in dieser Arbeit untersucht, wie im Folgenden beschrieben wird.

Durch den intrazellulären Ca²⁺-Chelator BAPTA konnte in kultivierten Astrozyten die Diazepaminduzierte Bildung von oxidativem Stress verhindert werden (Görg et al., 2003). Außerdem wurde eine NH₄Cl- (Schliess et al., 2002), Benzodiazepin-induzierte (Görg et al., 2003), Zytokin- (Görg et al., 2006) oder hypoosmolar-bedingte PTN (Schliess et al., 2004) in Astrozyten durch BAPTA verhindert. In den Studien wurde außerdem gezeigt, dass in NH₄Cl- bzw. Diazepam-ausgesetzten Astrozyten ein intrazellulärer Ca²⁺-Anstieg zu detektieren ist. Dies spricht dafür, dass auch unter hyperammonämischen Bedingungen in der Pathogenese der HE ein erhöhter intrazellulärer Ca²⁺-Anstieg für die PTN und somit für die CD95-Y-NO₂ in Astrozyten verantwortlich sein könnte. Es stellte sich die Frage, ob BAPTA Einfluss auf die CD95L-induzierte CD95-Y-NO₂ nehmen kann. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Hemmung der CD95-Y-NO₂ ($p \approx 0.078$) durch BAPTA erreicht werden, sodass intrazelluläres Ca²⁺ für den vorliegenden Nitrierungsprozess eine Rolle spielen könnte. Die Rolle des extrazellulären Ca²⁺ in der CD95L-induzierten CD95-Y-NO₂ wurde hier durch den extrazellulären Ca²⁺-Chelator EGTA untersucht. Allerdings führte EGTA zu keiner Hemmung der CD95-Y-NO₂. Eine hypoosmolar-bedingte PTN konnte durch EGTA allerdings gehemmt werden (Schliess et al., 2004).

Des Weiteren gilt ein septischer Zustand als präzipitierender Faktor für die Entwicklung der HE. So könnten zusätzlich auftretende Inflammationen und Prostanoide, die bei entzündlichen Prozessen als Immunmodulatoren wirken, unter hyperammonämischen Bedingungen eine Rolle bei der HE-Pathogenese spielen (Shawcross and Jalan, 2005). Ferner ist die Glutamatfreisetzung bei der HE von Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass der unspezifische COX-Inhibitor Indomethacin die NH₄Cl-induzierte Glutamatfreisetzung herabsetzt (Görg et al., 2010a). Allerdings konnte Indomethacin eine NO-induzierte Glutamat-Freisetzung nicht verhindern (Bal-Price et al., 2002). In Übereinstimmung mit letzterem Ergebnis zeigte Indomethacin auch in dieser Arbeit keinen hemmenden Effekt auf die CD95L-induzierte CD95-Y-NO₂. Indomethacin gilt zwar als unselektiver COX-Inhibitor, es konnte aber gezeigt werden, dass die Affinität zu COX-1 höher ist als zu COX-2 (Warner et al., 2006) und reaktive Astrozyten überwiegend COX-2 exprimieren (Maślińska et al., 1999). Hierzu sind weitere Studien mit einem selektiver COX-2-Inhibitor notwendig, um den möglichen Effekt von Prostanoiden auf die CD95L-vermittelte CD95-Y-NO₂ zu untersuchen.

In verschiedenen Studien konnte durch die Hemmung der Glutamin-Synthetase mittels Methionin-Sulfoximin (MSO) sowohl eine Ammoniak-induzierte PTN (Schliess et al., 2002), eine Astrozytenschwellung (Tanigami et al., 2005) als auch die NO-Produktion (Master et al., 1999) nahezu verhindert werden. Interessant wäre die Analyse, ob die Glutamin-Synthetase die CD95L-induzierten CD95-Y-NO₂ beeinflusst und welche Rolle ihr gegebenenfalls zukommt. Dies könnte in weiteren Inhibitorstudien untersucht werden.

Außerdem konnte bei akuter Ammoniakvergiftung ein Aktivitätsverlust von antioxidativ wirkenden Enzymen wie Glutathion-Peroxidase, Mn-SOD oder Katalase und eine gesteigerte Superoxidbildung beschrieben werden; dies konnte durch MK-801, einem NMDA-Rezeptor-Antagonisten, verhindert werden. Diese Ergebnisse weisen auf, dass der durch Ammoniak-induzierte oxidative Stress im Gehirn durch eine Aktivierung des NMDA-Rezeptors vermittelt wird und oxidativer Stress eine wichtige Rolle bei Ammoniakintoxikationen spielt (Kosenko et al., 1999). Astrozyten exprimieren NMDA-Rezeptoren, wie sowohl in kultivierten Astrozyten (Görg et al., 2003) als auch *in vivo* (Schipke et al., 2001) nachgewiesen werden konnte. Eine NMDA-Rezeptor-Aktivierung wurde als vorgeschaltetes Ereignis in der durch Diazepam- (Görg et al., 2003), der Ammoniak-induzierten (Schliess et al., 2002) und der hypoosmolar-bedingten (Schliess et al., 2004) PTN in Astrozyten identifiziert. Um zu untersuchen, ob der CD95L-induzierten CD95-Y-NO₂ ebenfalls eine NMDA-Rezeptor-Aktivierung vorausgeht, sind weitere Studien notwendig.

Ferner könnte von Interesse sein, an welchem der drei Tyrosinreste die CD95-Tyrosin-Nitrierung überhaupt stattfindet. Die Tyrosin-Phosphorylierung der Tyrosinreste Tyr²³² und Tyr²⁹¹, die intrazellulär innerhalb der Todesdomäne lokalisiert sind, ist für die Apoptoseinduktion eine notwendige Voraussetzung (Eberle et al., 2005).

Welche Rolle die Tyrosin-Nitrierung in Zellen spielen kann, wurde unter anderem auch durch Franco et al. untersucht: *Heat-shock protein* (Hsp)-90-Tyrosin-Nitrierung induziert eine P2X7 Rezeptor-vermittelte Aktivierung des CD95-Signalwegs und führt zum Untergang von Motoneuronen. Dabei erhält das nitrierte Hsp-90 eine toxische Funktion, sodass angenommen werden kann, dass die Nitrierung eines einzelnen Proteins den Zelltod triggert (Franco et al., 2013).

Eine Inhibierung der Tyrosin-Nitrierung in Motoneuronen und PC12-Zellen verhindert außerdem eine Peroxynitrit-induzierte Apoptose (Ye et al., 2007). Dass die CD95-Tyrosin-Nitrierung in Astrozyten keine Apoptose einleitet, sondern sie sogar davor schützt, scheint eine Besonderheit in diesen Zellen darzustellen. Kamisaki et al. haben beschrieben, dass Denitrasen Protein-Tyrosin-Nitrierungen reduzieren können (Kamisaki et al., 1998), sodass Denitrasen für die Reversibilität einer Nitrierung verantwortlich wären. Möglicherweise ist die CD95L-induzierte CD95-Y-NO₂ in Astrozyten auch reversibel.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit der mitogene und anti-apoptotische Signalweg nach CD95L-Stimulation in Astrozyten untersucht. Welchen Ausblick diese Ergebnisse für Folgeprojekte geben, wird im anschließenden Teil der Schlussfolgerung erläutert.

4.3 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine CD95L-induzierte CD95-Tyrosin-Nitrierung in Astrozyten nachgewiesen und der dafür zugrundeliegende Mechanismus analysiert werden.

Wie aus der Literatur bekannt, kommt es innerhalb der HE zur Astrozytenschwellung (Häussinger, 1998). Präzipitierende Faktoren wie beispielsweise Infektionen verstärken dies oder induzieren selbst ein Gliaödem (Häussinger and Schliess, 2008). Biochemische Folgen der Astrozytenschwellung sind neben oxidativem Stress auch Protein-Tyrosin-Nitrierungen (Schliess et al., 2002). Doch es ist unklar, welches Maß die astrogliale PTN zur Apoptoseresistenz von Astrozyten beiträgt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach CD95L-Stimulation in Astrozyten eine CD95-Tyrosin-Nitrierung nachzuweisen ist, die die Zellen vor Apoptose schützt. Es könnte also sein, dass die Astrozytenschwellung im Rahmen der HE zu einer CD95-Tyrosin-Nitrierung führt und diese der Grund dafür ist, dass Astrozyten in der HE keine Apoptose durchlaufen, was wiederum unter anderem zur Reversibilität des Krankheitsbildes beitragen könnte. Ein weiterer Grund für die Reversibilität der HE könnte sein, dass die Neurone an der Pathogenese nicht beteiligt sind. Denn im Gegensatz zu den Astrozyten können sich Neurone in Folge von Schlaganfällen, Traumen oder neurodegenerativen Erkrankungen nicht regenerieren (Demjen et al., 2004; Pekny and Nilsson, 2005), sie gelten nicht als apoptoseresistent. Nach ischämischen Gehirnschäden wird vermehrt CD95L freigesetzt, was erklären könnte, warum Neurone einen apoptotischen Zelltod sterben, Astrozyten aber nicht (Martin-Villalba et al., 1999). Die Apoptoseresistenz der Astrozyten könnte demnach einen weiteren Grund für die Reversibilität der HE darstellen.

Als wichtiges Signaltransduktionselement für die CD95L-induzierte CD95-Tyrosin-Nitrierung in Astrozyten kommt die NADPH-Oxidase in Frage, die möglicherweise die CD95-Tyrosin-Nitrierung vermittelt und so den pro-apoptotischen Signalweg hemmt. Diese Vermutung basiert auf der Annahme, dass ein ähnlicher molekularer Mechanismus der CD95L-induzierten CD95-Y-NO₂ in Astrozyten und ruhenden HSZ vorliegt (Reinehr et al., 2008). Des Weiteren ist bekannt, dass Astrozyten den NMDA-Rezeptor exprimieren (Görg et al., 2003) und dessen Aktivierung als vorgeschaltetes Ereignis in der durch Benzodiazepine-, Ammoniak- und der hypoosmolar-bedingten Protein-Tyrosin-Nitrierung in Astrozyten CD95-Tyrosin-Nitrierung vorausgeht, kann in Folgestudien analysiert werden.

Interessant ist auch die Analyse, an welchem Tyrosinrest die CD95-Tyrosin-Nitrierung stattfindet. CD95 bestitzt drei Tyrosinreste, wobei die Phosphorylierung der Tyr²³² und Tyr²⁹¹ innerhalb der Todesdomäne für die CD95-Aktivierung und Apoptoseeinleitung essentiell ist.

Gleichzeitig konnte die Aktivierung eines mitogenen Signalweges nach CD95L-Stimulation in Astrozyten nachgewiesen werden, dessen Analyse für weitere Studien von Bedeutung sein könnte. Es stellt sich die Frage, ob eine Liganden-abhängige EGFR-Aktivierung für die proliferative Signalkaskade verantwortlich ist, wie es in hepatischen Sternzellen bereits nachgewiesen werden konnte (Reinehr et al., 2008). Es ist zumindest naheliegend, da das in HSZ vorgeschaltete Ereignis

der c-Src-Aktivierung bereits in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte und eine Zielstruktur der Src-Kinasen der Tyrosinrest 845 (Tyr⁸⁴⁵) des EGFR ist.

Eine Studie zeigt, dass niedrige Konzentrationen von CD95L zwar proliferativ wirken, höhere hingegen Apoptose in Astrozyten einleiten (Barca et al., 2013). Es stellt sich die Frage, ob eine CD95-Tyrosin-Nitrierung bei höheren als in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von CD95L auch noch auftritt, allerdings ist es fraglich, ob so hohe CD95L-Konzentrationen unter pathologischen Bedingungen überhaupt vorkommen, sodass die medizinische Relevanz unter Umständen nicht gegeben ist.

Die CD95-Tyrosin-Nitrierung scheint ein Schutzmechanismus der Zellen vor dem apoptotischen Zelltod zu sein. Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass Todesrezeptor-Liganden wie CD95L in Astrozyten als Mitogene wirken und gleichzeitig den apoptotischen Signalweg inaktivieren. Dies könnte im Hinblick auf neurologische Erkrankungen mit regenerierenden Potential von Bedeutung sein und die Rolle der Astrozyten als Zellen mit Stammzellcharakter untermauern.

5 Literaturverzeichnis

Abe, M.K., Saelzler, M.P., Espinosa, R., Kahle, K.T., Hershenson, M.B., Le Beau, M.M., Rosner, M.R., **2002**. ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. J. Biol. Chem. 277, 16733–16743. doi:10.1074/jbc.M112483200

Aggarwal, B.B., Singh, S., LaPushin, R., Totpal, K., **1995**. Fas antigen signals proliferation of normal human diploid fibroblast and its mechanism is different from tumor necrosis factor receptor. FEBS Lett. 364, 5–8.

Abboucha, S., Butterworth, R.F., **2008**. The neurosteroid system: implication in the pathophysiology of hepatic encephalopathy. Neurochem. Int. 52, 575–587. doi:10.1016/j.neuint.2007.05.004

Alderson, M.R., Armitage, R.J., Maraskovsky, E., Tough, T.W., Roux, E., Schooley, K., Ramsdell, F., Lynch, D.H., **1993**. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. J. Exp. Med. 178, 2231–2235.

Ashkenazi, A., Dixit, V.M., **1999**. Apoptosis control by death and decoy receptors. Curr. Opin. Cell Biol. 11, 255–260.

Ashkenazi, A., Dixit, V.M., **1998**. Death receptors: signaling and modulation. Science 281, 1305–1308.

Bal-Price, A., Moneer, Z., Brown, G.C., **2002**. Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes. Glia 40, 312–323. doi:10.1002/glia.10124

Barca, O., Carneiro, C., Costoya, J.A., Señarís, R.M., Arce, V.M., **2010**. Resistance of neonatal primary astrocytes against Fas-induced apoptosis depends on silencing of caspase 8. Neurosci. Lett. 479, 206–210. doi:10.1016/j.neulet.2010.05.057

Barca, O., Seoane, M., Señarís, R.M., Arce, V.M., **2013**. Fas/CD95 ligation induces proliferation of primary fetal astrocytes through a mechanism involving caspase 8-mediated ERK activation. Cell. Physiol. Biochem. 32, 111–120. doi:10.1159/000350129

Barnhart, B.C., Legembre, P., Pietras, E., Bubici, C., Franzoso, G., Peter, M.E., **2004**. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. EMBO J. 23, 3175–3185. doi:10.1038/sj.emboj.7600325

Barr, P.J., Tomei, L.D., **1994**. Apoptosis and its role in human disease. Biotechnology (N.Y.) 12, 487–493.

Becher, B., D'Souza, S.D., Troutt, A.B., Antel, J.P., **1998**. Fas expression on human fetal astrocytes without susceptibility to fas-mediated cytotoxicity. Neuroscience 84, 627–634.

Bechmann, I., Lossau, S., Steiner, B., Mor, G., Gimsa, U., Nitsch, R., **2000**. Reactive astrocytes upregulate Fas (CD95) and Fas ligand (CD95L) expression but do not undergo programmed cell death during the course of anterograde degeneration. Glia 32, 25–41.

Bechmann, I., Steiner, B., Gimsa, U., Mor, G., Wolf, S., Beyer, M., Nitsch, R., Zipp, F., **2002**. Astrocyte-induced T cell elimination is CD95 ligand dependent. J. Neuroimmunol. 132, 60–65.

Bellacosa, A., Testa, J.R., Staal, S.P., Tsichlis, P.N., 1991. A retroviral oncogene, akt, encoding a

serine-threonine kinase containing an SH2-like region. Science 254, 274-277.

Bender, A.S., Norenberg, M.D., **1998**. Effect of benzodiazepines and neurosteroids on ammoniainduced swelling in cultured astrocytes. J. Neurosci. Res. 54, 673–680.

Bender, A.S., Schousboe, A., Reichelt, W., Norenberg, M.D., **1998**. Ionic mechanisms in glutamateinduced astrocyte swelling: role of K+ influx. J. Neurosci. Res. 52, 307–321.

Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S.W., Luzio, J.P., Simari, R., Weissberg, P., **1998**. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. Science 282, 290–293.

Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D., **2000**. The versatility and universality of calcium signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1, 11–21. doi:10.1038/35036035

Biscardi, J.S., Maa, M.C., Tice, D.A., Cox, M.E., Leu, T.H., Parsons, S.J., **1999**. c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. J. Biol. Chem. 274, 8335–8343.

Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H., Wallach, D., **1995**. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. J. Biol. Chem. 270, 7795–7798.

Bolen, J.B., Thompson, P.A., Eiseman, E., Horak, I.D., **1991**. Expression and interactions of the Src family of tyrosine protein kinases in T lymphocytes. Adv. Cancer Res. 57, 103–149.

Bonetti, B., Raine, C.S., **1997**. Multiple sclerosis: oligodendrocytes display cell death-related molecules in situ but do not undergo apoptosis. Ann. Neurol. 42, 74–84. doi:10.1002/ana.410420113

Bradford, M.M., **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.

Brown, M.T., Cooper, J.A., **1996**. Regulation, substrates and functions of src. Biochim. Biophys. Acta 1287, 121–149.

Brunelli, L., Yermilov, V., Beckman, J.S., **2001**. Modulation of catalase peroxidatic and catalatic activity by nitric oxide. Free Radic. Biol. Med. 30, 709–714.

Buchczyk, D.P., Briviba, K., Hartl, F.U., Sies, H., **2000**. Responses to peroxynitrite in yeast: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a sensitive intracellular target for nitration and enhancement of chaperone expression and ubiquitination. Biol. Chem. 381, 121–126. doi:10.1515/BC.2000.017

Budd, R.C., **2002**. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. J. Clin. Invest. 109, 437–441. doi:10.1172/JCI15077

Buffo, A., Rite, I., Tripathi, P., Lepier, A., Colak, D., Horn, A.-P., Mori, T., Götz, M., **2008**. Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 3581–3586. doi:10.1073/pnas.0709002105

Butterworth, R.F., **2000**. The astrocytic ("peripheral-type") benzodiazepine receptor: role in the pathogenesis of portal-systemic encephalopathy. Neurochem. Int. 36, 411–416.

Carpenter, G., **1992**. Receptor tyrosine kinase substrates: src homology domains and signal transduction. FASEB J. 6, 3283–3289.

Cassina, P., Peluffo, H., Pehar, M., Martinez-Palma, L., Ressia, A., Beckman, J.S., Estévez, A.G., Barbeito, L., **2002**. Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. J. Neurosci. Res. 67, 21–29.

Chamberlin, M.E., Strange, K., **1989**. Anisosmotic cell volume regulation: a comparative view. Am. J. Physiol. 257, C159–173.

Chang, R.C., Stadlin, A., Tsang, D., **2001**. Effects of tumor necrosis factor alpha on taurine uptake in cultured rat astrocytes. Neurochem. Int. 38, 249–254.

Chen, J.J., Sun, Y., Nabel, G.J., **1998**. Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). Science 282, 1714–1717.

Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., Dixit, V.M., **1995**. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. Cell 81, 505–512.

Choi, C., Benveniste, E.N., **2004**. Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. Brain Res. Brain Res. Rev. 44, 65–81.

Choi, C., Park, J.Y., Lee, J., Lim, J.H., Shin, E.C., Ahn, Y.S., Kim, C.H., Kim, S.J., Kim, J.D., Choi, I.S., Choi, I.H., **1999**. Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF-alpha, or IFN-gamma. J. Immunol. 162, 1889–1895.

Clark, M.A., Gonzalez, N., **2007**. Src and Pyk2 mediate angiotensin II effects in cultured rat astrocytes. Regul. Pept. 143, 47–55. doi:10.1016/j.regpep.2007.02.008

Cobb, M.H., 1999. MAP kinase pathways. Prog. Biophys. Mol. Biol. 71, 479–500.

Coffer, P.J., Woodgett, J.R., **1991**. Molecular cloning and characterisation of a novel putative proteinserine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. Eur. J. Biochem. 201, 475–481.

Conn, H., Bircher, J., **1993**. Quantifying the severity of hepatic encephalopathy: syndromes and therapies (Hrsg), In: Conn H.O. und Bircher J. (Hrsg) Hepatic encephalopathy: syndromes und therapies. East Lansing M1:Medi Ed Press. 1993:13-26.

Cooper, A.J., Plum, F., **1987**. Biochemistry and physiology of brain ammonia. Physiol. Rev. 67, 440–519.

Córdoba, J., Crespin, J., Gottstein, J., Blei, A.T., **1999**. Mild hypothermia modifies ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. Gastroenterology 116, 686–693.

Davidson, W.F., Haudenschild, C., Kwon, J., Williams, M.S., **2002**. T cell receptor ligation triggers novel nonapoptotic cell death pathways that are Fas-independent or Fas-dependent. J. Immunol. 169, 6218–6230.

Davis, R.J., 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. Cell 103, 239–252.

Demjen, D., Klussmann, S., Kleber, S., Zuliani, C., Stieltjes, B., Metzger, C., Hirt, U.A., Walczak, H.,

53

Falk, W., Essig, M., Edler, L., Krammer, P.H., Martin-Villalba, A., **2004**. Neutralization of CD95 ligand promotes regeneration and functional recovery after spinal cord injury. Nat. Med. 10, 389–395. doi:10.1038/nm1007

Dérijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., Davis, R.J., **1994**. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. Cell 76, 1025–1037.

Desbarats, J., Birge, R.B., Mimouni-Rongy, M., Weinstein, D.E., Palerme, J.-S., Newell, M.K., **2003**. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. Nat. Cell Biol. 5, 118–125. doi:10.1038/ncb916

Devitt, A., Moffatt, O.D., Raykundalia, C., Capra, J.D., Simmons, D.L., Gregory, C.D., **1998**. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. Nature 392, 505–509. doi:10.1038/33169

Dhiman, R.K., Saraswat, V.A., Sharma, B.K., Sarin, S.K., Chawla, Y.K., Butterworth, R., Duseja, A., Aggarwal, R., Amarapurkar, D., Sharma, P., Madan, K., Shah, S., Seth, A.K., Gupta, R.K., Koshy, A., Rai, R.R., Dilawari, J.B., Mishra, S.P., Acharya, S.K., **2010**. Minimal hepatic encephalopathy: consensus statement of a working party of the Indian National Association for Study of the Liver. J. Gastroenterol. Hepatol. 25, 1029–1041. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06318.x

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.

D'Souza, S.D., Bonetti, B., Balasingam, V., Cashman, N.R., Barker, P.A., Troutt, A.B., Raine, C.S., Antel, J.P., **1996**. Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. J. Exp. Med. 184, 2361–2370.

Eberle, A., Reinehr, R., Becker, S., Häussinger, D., **2005**. Fluorescence resonance energy transfer analysis of proapoptotic CD95-EGF receptor interactions in Huh7 cells. Hepatology 41, 315–326. doi:10.1002/hep.20564

Errede, B., Cade, R.M., Yashar, B.M., Kamada, Y., Levin, D.E., Irie, K., Matsumoto, K., **1995**. Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. Mol. Reprod. Dev. 42, 477–485. doi:10.1002/mrd.1080420416

Fahlke, C., 2008. Taschenatlas Physiologie: mit 26 Tabellen. Elsevier, Urban& Fischer Verlag.

Falsig, J., Latta, M., Leist, M., **2004**. Defined inflammatory states in astrocyte cultures: correlation with susceptibility towards CD95-driven apoptosis. J. Neurochem. 88, 181–193.

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 35, 716–721. doi:10.1053/jhep.2002.31250

Franco, M.C., Ye, Y., Refakis, C.A., Feldman, J.L., Stokes, A.L., Basso, M., Melero Fernandez de

54

Mera, R.M., Sparrow, N.A., Calingasan, N.Y., Kiaei, M., Rhoads, T.W., Ma, T.C., Grumet, M., Barnes, S., Beal, M.F., Beckman, J.S., Mehl, R., Estevez, A.G., **2013**. Nitration of Hsp90 induces cell death. Proc Natl Acad Sci U S A 110, E1102–E1111. doi:10.1073/pnas.1215177110

Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., Toker, A., **1997**. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. Science 275, 665–668.

Gard, A.L., White, F.P., Dutton, G.R., **1985**. Extra-neural glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in perisinusoidal stellate cells of rat liver. J. Neuroimmunol. 8, 359–375.

Geerts, A., **2001**. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. Semin. Liver Dis. 21, 311–335. doi:10.1055/s-2001-17550

Gerok, W., 2007. Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt. Schattauer Verlag.

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., Morwinsky, A., Keitel, V., Qvartskhava, N., Schrör, K., Häussinger, D., **2010a**. Ammonia triggers exocytotic release of L-glutamate from cultured rat astrocytes. Glia 58, 691–705. doi:10.1002/glia.20955

Görg, B., Qvartskhava, N., Bidmon, H.-J., Palomero-Gallagher, N., Kircheis, G., Zilles, K., Häussinger, D., **2010b**. Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. Hepatology 52, 256–265. doi:10.1002/hep.23656

Görg, B., Qvartskhava, 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., Qvartskhava, 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

Graf, D., Kurz, A.K., Fischer, R., Reinehr, R., Häussinger, D., **2002**. Taurolithocholic acid-3 sulfate induces CD95 trafficking and apoptosis in a c-Jun N-terminal kinase-dependent manner. Gastroenterology 122, 1411–1427.

Green, D.R., Reed, J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. Science 281, 1309–1312.

Groeneweg, M., Quero, J.C., De Bruijn, I., Hartmann, I.J., Essink-bot, M.L., Hop, W.C., Schalm, S.W., **1998**. Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. Hepatology 28, 45–49. doi:10.1002/hep.510280108

Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Korsmeyer, S.J., **1999**. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome

c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. J. Biol. Chem. 274, 1156–1163.

Guo, Y.L., Baysal, K., Kang, B., Yang, L.J., Williamson, J.R., **1998**. Correlation between sustained c-Jun N-terminal protein kinase activation and apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha in rat mesangial cells. J. Biol. Chem. 273, 4027–4034.

Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sluss, H.K., Dérijard, B., Davis, R.J., **1996**. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. EMBO J. 15, 2760–2770.

Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M., Davenport, K., **1998**. MAP kinase pathways in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 1264–1300.

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., **1998**. Pathogenesis and treatment of chronic hepatic encephalopathy. Digestion 59 Suppl 2, 25–27.

Häussinger, D., **1990**. Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. Biochem. J. 267, 281–290.

Häussinger, D., 1987. Hepatic glutamine metabolism. Beitr Infusionther Klin Ernahr 17, 144–157.

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., Kircheis, G., Fischer, R., Schliess, F., Dahl, S. vom, **2000**. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? Journal of Hepatology 32, 1035–1038. doi:10.1016/S0168-8278(00)80110-5

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., Schliess, F., Dombrowski, F., Dahl, S. Vom, **1999**. Involvement of p38MAPK in the regulation of proteolysis by liver cell hydration. Gastroenterology 116, 921–935.

Heinrich, C., Gascón, S., Masserdotti, G., Lepier, A., Sanchez, R., Simon-Ebert, T., Schroeder, T., Götz, M., Berninger, B., **2011**. Generation of subtype-specific neurons from postnatal astroglia of the mouse cerebral cortex. Nat Protoc 6, 214–228. doi:10.1038/nprot.2010.188

Herlaar, E., Brown, Z., **1999**. p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. Mol Med Today 5, 439–447.

Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., Karin, M., **1993**. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. Genes Dev. 7, 2135–2148.

Huang, W., Bei, L., Eklund, E.A., **2013**. Fas-associated phosphatase 1 mediates Fas resistance in myeloid progenitor cells expressing the Bcr-abl oncogene. Leuk. Lymphoma 54, 619–630. doi:10.3109/10428194.2012.720979

Hu, M.C., Wang, Y.P., Mikhail, A., Qiu, W.R., Tan, T.H., **1999**. Murine p38-delta mitogen-activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase that is activated by stress and proinflammatory cytokines. J. Biol. Chem. 274, 7095–7102.

Ischiropoulos, H., **1998**. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. Arch. Biochem. Biophys. 356, 1–11. doi:10.1006/abbi.1998.0755

Jacobson, M.D., Weil, M., Raff, M.C., **1997**. Programmed cell death in animal development. Cell 88, 347–354.

Jayakumar, A.R., Liu, M., Moriyama, M., Ramakrishnan, R., Forbush, B., 3rd, Reddy, P.V.B., Norenberg, M.D., **2008**. Na-K-Cl Cotransporter-1 in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. J. Biol. Chem. 283, 33874–33882. doi:10.1074/jbc.M804016200

Jelinek, D.F., Lipsky, P.E., **1987**. Enhancement of human B cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1. J. Immunol. 139, 2970–2976.

Jones, P.F., Jakubowicz, T., Pitossi, F.J., Maurer, F., Hemmings, B.A., **1991**. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 4171–4175.

Kamisaki, Y., Wada, K., Bian, K., Balabanli, B., Davis, K., Martin, E., Behbod, F., Lee, Y.C., Murad, F., **1998**. An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 11584–11589.

Kennedy, N.J., Kataoka, T., Tschopp, J., Budd, R.C., **1999**. Caspase activation is required for T cell proliferation. J. Exp. Med. 190, 1891–1896.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., **1972**. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer 26, 239–257.

Keyse, S.M., **1995**. An emerging family of dual specificity MAP kinase phosphatases. Biochim. Biophys. Acta 1265, 152–160.

Kimelberg, H.K., Goderie, S.K., Higman, S., Pang, S., Waniewski, R.A., **1990**. Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. J. Neurosci. 10, 1583–1591.

Kim, M.J., Lim, H.-S., Yoo, Y.B., Lee, Y.I., Hahm, D.-H., Lee, H.-J., Jung, K.W., Kim, J.-W., Yoe, S.M., Chung, D.C., Chang, Y.P., **2007**. Expression of CD95 and CD95L on astrocytes in the CA1 area of the immature rat hippocampus after hypoxia-ischemia injury. Comp. Med. 57, 581–589.

Kircheis, G., Wettstein, M., Timmermann, L., Schnitzler, A., Häussinger, D., **2002**. Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopathy. Hepatology 35, 357–366. doi:10.1053/jhep.2002.30957

Kleber, S., Sancho-Martinez, I., Wiestler, B., Beisel, A., Gieffers, C., Hill, O., Thiemann, M., Mueller, W., Sykora, J., Kuhn, A., Schreglmann, N., Letellier, E., Zuliani, C., Klussmann, S., Teodorczyk, M.,

57

Gröne, H.-J., Ganten, T.M., Sültmann, H., Tüttenberg, J., von Deimling, A., Regnier-Vigouroux, A., Herold-Mende, C., Martin-Villalba, A., **2008a**. Yes and PI3K bind CD95 to signal invasion of glioblastoma. Cancer Cell 13, 235–248. doi:10.1016/j.ccr.2008.02.003

Kleber, S., Sancho-Martinez, I., Wiestler, B., Beisel, A., Gieffers, C., Hill, O., Thiemann, M., Mueller, W., Sykora, J., Kuhn, A., Schreglmann, N., Letellier, E., Zuliani, C., Klussmann, S., Teodorczyk, M., Gröne, H.-J., Ganten, T.M., Sültmann, H., Tüttenberg, J., von Deimling, A., Regnier-Vigouroux, A., Herold-Mende, C., Martin-Villalba, A., **2008b**. Yes and PI3K bind CD95 to signal invasion of glioblastoma. Cancer Cell 13, 235–248. doi:10.1016/j.ccr.2008.02.003

Knorpp, T., Robinson, S.R., Crack, P.J., Dringen, R., **2006**. Glutathione peroxidase-1 contributes to the protection of glutamine synthetase in astrocytes during oxidative stress. J Neural Transm 113, 1145–1155. doi:10.1007/s00702-005-0389-y

Knowles, R.G., Moncada, S., **1994**. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem. J. 298 (Pt 2), 249–258.

Kordes, C., Sawitza, I., Götze, S., Häussinger, D., **2013**. Hepatic stellate cells support hematopoiesis and are liver-resident mesenchymal stem cells. Cell. Physiol. Biochem. 31, 290–304. doi:10.1159/000343368

Kordes, C., Sawitza, I., Götze, S., Häussinger, D., **2012**. Stellate cells from rat pancreas are stem cells and can contribute to liver regeneration. PLoS ONE 7, e51878. doi:10.1371/journal.pone.0051878

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.

Kosenko, E., Montoliu, C., Giordano, G., Kaminsky, Y., Venediktova, N., Buryanov, Y., Felipo, V., **2004**. Acute ammonia intoxication induces an NMDA receptor-mediated increase in poly(ADP-ribose) polymerase level and NAD metabolism in nuclei of rat brain cells. J. Neurochem. 89, 1101–1110. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02426.x

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

Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J., Woodgett, J.R., **1994**. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. Nature 369, 156–160. doi:10.1038/369156a0

Lavrik, I.N., Golks, A., Riess, D., Bentele, M., Eils, R., Krammer, P.H., **2007**. Analysis of CD95 threshold signaling: triggering of CD95 (FAS/APO-1) at low concentrations primarily results in survival signaling. J. Biol. Chem. 282, 13664–13671. doi:10.1074/jbc.M700434200

Lee, K.S., Buck, M., Houglum, K., Chojkier, M., **1995**. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myb expression. J. Clin. Invest. 96, 2461–2468. doi:10.1172/JCI118304

Lee, S.J., Zhou, T., Choi, C., Wang, Z., Benveniste, E.N., **2000**. Differential regulation and function of Fas expression on glial cells. J. Immunol. 164, 1277–1285.

Lenczowski, J.M., Dominguez, L., Eder, A.M., King, L.B., Zacharchuk, C.M., Ashwell, J.D., **1997**. Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. Mol. Cell. Biol. 17, 170–181.

Le-Niculescu, H., Bonfoco, E., Kasuya, Y., Claret, F.X., Green, D.R., Karin, M., **1999**. Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. Mol. Cell. Biol. 19, 751–763.

Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V., Karin, M., **1996**. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. Cell 87, 565–576.

Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J., **2001**. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell 104, 487–501.

Lockwood, A.H., Bolomey, L., Napoleon, F., **1984**. Blood-brain barrier to ammonia in humans. J. Cereb. Blood Flow Metab. 4, 516–522. doi:10.1038/jcbfm.1984.76

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. 11, 337–341. doi:10.1038/jcbfm.1991.67

Ma, J., Zhang, L., Han, W., Shen, T., Ma, C., Liu, Y., Nie, X., Liu, M., Ran, Y., Zhu, D., **2012**. Activation of JNK/c-Jun is required for the proliferation, survival, and angiogenesis induced by EET in pulmonary artery endothelial cells. J. Lipid Res. 53, 1093–1105. doi:10.1194/jlr.M024398

Malhi, H., Gores, G.J., Lemasters, J.J., **2006**. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? Hepatology 43, S31–44. doi:10.1002/hep.21062

Martinez-Hernandez, A., Bell, K.P., Norenberg, M.D., **1977**. Glutamine synthetase: glial localization in brain. Science 195, 1356–1358.

Martin-Villalba, A., Herr, I., Jeremias, I., Hahne, M., Brandt, R., Vogel, J., Schenkel, J., Herdegen, T., Debatin, K.M., **1999**. CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. J. Neurosci. 19, 3809–3817.

Maślińska, D., Woźniak, R., Kaliszek, A., Modelska, I., **1999**. Expression of cyclooxygenase-2 in astrocytes of human brain after global ischemia. Folia Neuropathol 37, 75–79.

Master, S., Gottstein, J., Blei, A.T., **1999**. Cerebral blood flow and the development of ammoniainduced brain edema in rats after portacaval anastomosis. Hepatology 30, 876–880. doi:10.1002/hep.510300428

Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., **1997**. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). EMBO J. 16, 2794–2804. doi:10.1093/emboj/16.10.2794

Meinhold-Heerlein, I., Stenner-Liewen, F., Liewen, H., Kitada, S., Krajewska, M., Krajewski, S., Zapata, J.M., Monks, A., Scudiero, D.A., Bauknecht, T., Reed, J.C., **2001**. Expression and Potential

59

Role of Fas-Associated Phosphatase-1 in Ovarian Cancer. Am J Pathol 158, 1335–1344.

Minagar, A., Shapshak, P., Fujimura, R., Ownby, R., Heyes, M., Eisdorfer, C., **2002**. The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. J. Neurol. Sci. 202, 13–23.

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.

Negru, T., Ghiea, V., Păsărică, D., **1999**. Oxidative injury and other metabolic disorders in hepatic encephalopathy. Rom J Physiol 36, 29–36.

Norenberg, M.D., **1996**. Astrocytic-ammonia interactions in hepatic encephalopathy. Semin. Liver Dis. 16, 245–253. doi:10.1055/s-2007-1007237

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

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., Neary, J.T., Bender, A.S., Dombro, R.S., **1992**. Hepatic encephalopathy: a disorder in glial-neuronal communication. Prog. Brain Res. 94, 261–269.

Obergfell, A., Eto, K., Mocsai, A., Buensuceso, C., Moores, S.L., Brugge, J.S., Lowell, C.A., Shattil, S.J., **2002**. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with [alpha]IIb[beta]3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. J. Cell Biol. 157, 265–275. doi:10.1083/jcb.200112113

O'Connor, E.R., Kimelberg, H.K., **1993**. Role of calcium in astrocyte volume regulation and in the release of ions and amino acids. J. Neurosci. 13, 2638–2650.

Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B.C., **1992**. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. J. Biol. Chem. 267, 10709–10715.

Ordaz, B., Tuz, K., Ochoa, L.D., Lezama, R., Peña-Segura, C., Franco, R., **2004**. Osmolytes and mechanisms involved in regulatory volume decrease under conditions of sudden or gradual osmolarity decrease. Neurochem. Res. 29, 65–72.

Paulsen, F., Lüllmann-Rauch, R., 2012. Taschenlehrbuch Histologie. Georg Thieme Verlag.

Paulsen, M., Janssen, O., **2011**. Pro- and anti-apoptotic CD95 signaling in T cells. Cell Commun. Signal 9, 7. doi:10.1186/1478-811X-9-7

Pekny, M., Nilsson, M., **2005**. Astrocyte activation and reactive gliosis. Glia 50, 427–434. doi:10.1002/glia.20207

Pellegrini, M., Bath, S., Marsden, V.S., Huang, D.C.S., Metcalf, D., Harris, A.W., Strasser, A., **2005**. FADD and caspase-8 are required for cytokine-induced proliferation of hemopoietic progenitor cells.

Blood 106, 1581-1589. doi:10.1182/blood-2005-01-0284

Raman, M., Chen, W., Cobb, M.H., **2007**. Differential regulation and properties of MAPKs. Oncogene 26, 3100–3112. doi:10.1038/sj.onc.1210392

Rao, V.L., Audet, R.M., Butterworth, R.F., **1997**. Increased neuronal nitric oxide synthase expression in brain following portacaval anastomosis. Brain Res. 765, 169–172.

Rao, V.L., Audet, R.M., Butterworth, R.F., **1995**. Increased nitric oxide synthase activities and L-[3H]arginine uptake in brain following portacaval anastomosis. J. Neurochem. 65, 677–678.

Reinehr, R., Becker, S., Braun, J., Eberle, A., Grether-Beck, S., Häussinger, D., **2006**. Endosomal acidification and activation of NADPH oxidase isoforms are upstream events in hyperosmolarity-induced hepatocyte apoptosis. J. Biol. Chem. 281, 23150–23166. doi:10.1074/jbc.M601451200

Reinehr, R., Becker, S., Eberle, A., Grether-Beck, S., Häussinger, D., **2005a**. Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. J. Biol. Chem. 280, 27179–27194. doi:10.1074/jbc.M414361200

Reinehr, R., Becker, S., Keitel, V., Eberle, A., Grether-Beck, S., Häussinger, D., **2005b**. Bile saltinduced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation. Gastroenterology 129, 2009–2031. doi:10.1053/j.gastro.2005.09.023

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

Reinehr, R., Görg, B., Höngen, A., Häussinger, D., **2004**. CD95-tyrosine nitration inhibits hyperosmotic and CD95 ligand-induced CD95 activation in rat hepatocytes. J. Biol. Chem. 279, 10364–10373. doi:10.1074/jbc.M311997200

Reinehr, R., Graf, D., Fischer, R., Schliess, F., Häussinger, D., **2002**. Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis. Hepatology 36, 602–614. doi:10.1053/jhep.2002.35447

Reinehr, R., Schliess, F., Häussinger, D., **2003**. Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. FASEB J. 17, 731–733. doi:10.1096/fj.02-0915fje

Reinehr, R., Sommerfeld, A., Häussinger, D., **2008**. CD95 ligand is a proliferative and antiapoptotic signal in quiescent hepatic stellate cells. Gastroenterology 134, 1494–1506. doi:10.1053/j.gastro.2008.02.021

Rose, C., Butterworth, R.F., Zayed, J., Normandin, L., Todd, K., Michalak, A., Spahr, L., Huet, P.M., Pomier-Layrargues, G., **1999**. Manganese deposition in basal ganglia structures results from both portal-systemic shunting and liver dysfunction. Gastroenterology 117, 640–644.

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
Sadoshima, J., Qiu, Z., Morgan, J.P., Izumo, S., **1995**. Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca(2+)-dependent signaling. Circ. Res. 76, 1–15.

Sancho-Martinez, I., Martin-Villalba, A., **2009**. Tyrosine phosphorylation and CD95: a FAScinating switch. Cell Cycle 8, 838–842.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E., **1998**. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. EMBO J. 17, 1675–1687. doi:10.1093/emboj/17.6.1675

Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Matyash, M., Nolte, C., Kettenmann, H., Kirchhoff, F., **2001**. Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. FASEB J. 15, 1270–1272.

Schlessinger, J., **2002**. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. Cell 110, 669–672.

Schlessinger, J., Ullrich, A., **1992**. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. Neuron 9, 383–391.

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. 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., Sinning, R., Fischer, R., Schmalenbach, C., Häussinger, D., **1996**. Calcium-dependent activation of Erk-1 and Erk-2 after hypo-osmotic astrocyte swelling. Biochem. J. 320 (Pt 1), 167–171.

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., Peter, M.E., **1998**. Apoptosis signaling by death receptors. Eur. J. Biochem. 254, 439–459.

Shawcross, D., Jalan, R., **2005**. The pathophysiologic basis of hepatic encephalopathy: central role for ammonia and inflammation. Cell. Mol. Life Sci. 62, 2295–2304. doi:10.1007/s00018-005-5089-0

Shelton, J.G., Steelman, L.S., Lee, J.T., Knapp, S.L., Blalock, W.L., Moye, P.W., Franklin, R.A., Pohnert, S.C., Mirza, A.M., McMahon, M., McCubrey, J.A., **2003**. Effects of the RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signal transduction pathways on the abrogation of cytokine-dependence and prevention of apoptosis in hematopoietic cells. Oncogene 22, 2478–2492. doi:10.1038/sj.onc.1206321

Sinning, R., Schliess, F., Kubitz, R., Häussinger, D., **1997**. Osmosignalling in C6 glioma cells. FEBS Lett. 400, 163–167.

Siushansian, R., Dixon, S.J., Wilson, J.X., **1996**. Osmotic swelling stimulates ascorbate efflux from cerebral astrocytes. J. Neurochem. 66, 1227–1233.

Sodeman, T., Bronk, S.F., Roberts, P.J., Miyoshi, H., Gores, G.J., **2000**. Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 278, G992–999.

Song, H., Stevens, C.F., Gage, F.H., **2002**. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. Nature 417, 39–44. doi:10.1038/417039a

Song, J.H., Bellail, A., Tse, M.C.L., Yong, V.W., Hao, C., **2006**. Human astrocytes are resistant to Fas ligand and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. J. Neurosci. 26, 3299–3308. doi:10.1523/JNEUROSCI.5572-05.2006

Souza, J.M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Raman, C.S., Ischiropoulos, H., **1999**. Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. Arch. Biochem. Biophys. 371, 169–178. doi:10.1006/abbi.1999.1480

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

Stoll, G., Jander, S., Schroeter, M., **1998**. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. Prog. Neurobiol. 56, 149–171.

Strasser, A., Jost, P.J., Nagata, S., **2009**. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. Immunity 30, 180–192. doi:10.1016/j.immuni.2009.01.001

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

Thomas, S.M., Brugge, J.S., **1997**. Cellular functions regulated by Src family kinases. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 13, 513–609. doi:10.1146/annurev.cellbio.13.1.513

Tourian, L., Jr, Zhao, H., Srikant, C.B., **2004**. p38alpha, but not p38beta, inhibits the phosphorylation and presence of c-FLIPS in DISC to potentiate Fas-mediated caspase-8 activation and type I apoptotic signaling. J. Cell. Sci. 117, 6459–6471. doi:10.1242/jcs.01573

Toyoshima, F., Moriguchi, T., Nishida, E., **1997**. Fas induces cytoplasmic apoptotic responses and activation of the MKK7-JNK/SAPK and MKK6-p38 pathways independent of CPP32-like proteases. J. Cell Biol. 139, 1005–1015.

Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Möller, P., Falk, W., Debatin, K.M., Krammer, P.H., **1989**. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. Science 245, 301–305.

Vaquero, J., Chung, C., Cahill, M.E., Blei, A.T., **2003**. Pathogenesis of hepatic encephalopathy in acute liver failure. Semin. Liver Dis. 23, 259–269. doi:10.1055/s-2003-42644

Voldborg, B.R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., Poulsen, H.S., **1997**. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. Ann. Oncol. 8, 1197–1206.

Warner, T.D., Vojnovic, I., Bishop-Bailey, D., Mitchell, J.A., 2006. Influence of plasma protein on the

potencies of inhibitors of cyclooxygenase-1 and -2. FASEB J. 20, 542–544. doi:10.1096/fj.05-4434fje

Werneburg, N.W., Yoon, J.-H., Higuchi, H., Gores, G.J., **2003**. Bile acids activate EGF receptor via a TGF-alpha-dependent mechanism in human cholangiocyte cell lines. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 285, G31–36. doi:10.1152/ajpgi.00536.2002

Whiteman, M., Halliwell, B., **1996**. Protection against peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and alpha 1-antiproteinase inactivation by ascorbic acid. A comparison with other biological antioxidants. Free Radic. Res. 25, 275–283.

Whitmarsh, A.J., Davis, R.J., **1996**. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. J. Mol. Med. 74, 589–607.

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L., **1999**. Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human. Physiological Reviews 79, 143–180.

Wyllie, A.H., 1997. Apoptosis: an overview. Br Med Bull 53, 451–465.

Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., Greenberg, M.E., **1995**. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. Science 270, 1326–1331.

Xu, D., Wang, L., Olson, J.E., Lu, L., **2001**. Asymmetrical response of p38 kinase activation to volume changes in primary rat astrocytes. Exp. Biol. Med. (Maywood) 226, 927–933.

Ye, Y., Quijano, C., Robinson, K.M., Ricart, K.C., Strayer, A.L., Sahawneh, M.A., Shacka, J.J., Kirk, M., Barnes, S., Accavitti-Loper, M.A., Radi, R., Beckman, J.S., Estévez, A.G., **2007**. Prevention of peroxynitrite-induced apoptosis of motor neurons and PC12 cells by tyrosine-containing peptides. J. Biol. Chem. 282, 6324–6337. doi:10.1074/jbc.M610800200

Yokota, S., Geppert, T.D., Lipsky, P.E., **1988**. Enhancement of antigen- and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor-alpha. J. Immunol. 140, 531–536.

Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., **1989**. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. J. Exp. Med. 169, 1747–1756.

Zemtsova, I., Görg, B., Keitel, V., Bidmon, H.-J., Schrör, K., Häussinger, D., **2011**. Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. Hepatology 54, 204–215. doi:10.1002/hep.24326

Zhan, T., Stremmel, W., **2012**. The diagnosis and treatment of minimal hepatic encephalopathy. Dtsch Arztebl Int 109, 180–187. doi:10.3238/arztebl.2012.0180

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.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. D. Häussinger für die Möglichkeit bedanken, die vorliegende Dissertation an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie am Uniklinikum Düsseldorf unter seiner Leitung verfassen zu können.

Mein besonderer Dank gilt meinem Promotionsbetreuer Herrn Prof. Dr. R. Reinehr, der mir durch sein versiertes Fachwissen, eine sehr gute wissenschaftliche Betreuung und eine stetige Erreichbarkeit beiseite stand. Durch seine konstruktive Kritik war es möglich die Arbeit in diesem Umfang anzufertigen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei dem gesamten Laborteam bedanken, insbesondere bei Frau Dr. A. Sommerfeld für ihre tatkräftige Unterstützung und die Weitergabe ihres Wissens im Labor, was maßgeblich zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Dr. B. Görg und seinen Kollegen danke ich für die Präparation und Bereitstellung der Astrozyten.

Von Herzen danke ich meiner Familie für ihre liebevolle und uneingeschränkte Unterstützung.

Eidesstattliche Versicherung

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

Katrin Molavi Tabrizi