

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

**Expression von Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden
in mit Ammoniak behandelten, kultivierten
Rattenastrozyten und in post mortem Hirnproben von
Leberzirrhosepatienten mit hepatischer Enzephalopathie**

Dissertation

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

vorgelegt von
Karmela Hirsch (geborene Sobczyk)

2018

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

gez.:

Dekanin/Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Referentin/Referent: Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

Korreferentin/Korreferent: Prof. Dr. Schnitzler

Widmung

Ich widme die Arbeit meiner Mutter Ewa Sobczyk, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt hat. Ich möchte diese Gelegenheit nutzen und mich für ihre uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung bedanken.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Sobczyk K., Jördens S.M., Karababa A., Görg B., Häussinger D. Ephrin/Ephrin receptor expression in ammonia-treated rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. *Neurochem Res.* 2015; Band 40; S.274–283.

Zusammenfassung

Die hepatische Enzephalopathie (HE) ist ein prinzipiell reversibles Syndrom neuropsychiatrischer Störungen, welches bei Patienten mit akutem oder chronischem Leberversagen auftreten kann. Nach heutigem Kenntnisstand ist die hepatische Enzephalopathie Folge eines geringgradigen Gliaödems, dass begleitet wird von zerebralem oxidativem Stress. Die in neuronalen und glialen Zellen lokalisierten Ephrin-Rezeptoren (Eph-R) und ihre Liganden (Ephrine) regulieren unter anderem die Expression von astroglialen Glutamattransportern und beeinflussen hierüber die Neurotransmission. Ihre Rolle in der Pathogenese der HE ist bislang unklar. In der vorliegenden Arbeit wurden Effekte von Ammoniak, einem Haupttoxin der HE, auf die Genexpression von Eph-R/Ephrin-Isoformen (EphA1-5-R, -A7-R, EphB1-3-R, -B6-R, Ephrin-A1-5 und Ephrin-B1-3) in kultivierten Rattenastrozyten untersucht. Die Inkubation mit NH_4Cl (5mmol/l) für 24, 48 und 72 Stunden beeinflusste das mRNA-Expressionsniveau verschiedener Eph-R/Ephrin-Isoformen. Hierunter befand sich auch EphA4-R, der nach 72 Stunden auf mRNA- und Proteine-Ebene um ca. das 1,8-fache der Kontrolle hochreguliert war. Einige der durch NH_4Cl herbeigeführten mRNA-Expressionsänderungen wurden durch Hemmstoffe der Glutaminsynthetase (Methioninsulfoximin, 3mmol/l), der NADPH-Oxidase (Apocynin, 300 $\mu\text{mol/l}$) und von Stickstoffmonoxid-Synthasen (L-NAME, 1mmol/l) gehemmt. Die durch NH_4Cl induzierte verringerte Genexpression der Glutamat-Transporter (GLAST) -mRNA war sensitiv gegenüber Hemmstoffen der NADPH-Oxidase und der Glutaminsynthetase, wurde jedoch nicht durch einen siRNA herbeigeführten *Knockdown* von EphA4-R blockiert.

Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der Astrozyten mit NH_4Cl (5mmol/l, 72h) sowie dem N-Glykosylierungshemmstoff Tunicamycin (1 $\mu\text{g/ml}$, 18h) gleichsam die molekulare Masse von EphA4-R verringert. NH_4Cl sowie der N-Glykosylierungshemmstoff Tunicamycin oder der *Knockdown* von EphA4-R hemmten gleichsam die durch Fibroblastenwachstumsfaktor-vermittelte und EphA4-R-abhängige Proliferation kultivierter Rattenastrozyten.

Expressionsänderungen von Eph-R/Ephrin-mRNA wurden in *Genarray*-Datensätzen in *post mortem* Hirnbiopsien von Leberzirrhose-Patienten mit sowie ohne HE im Vergleich zu Kontroll-Patienten untersucht. Das mRNA-Expressionsniveau der Rezeptoren EphA3 und EphB3 sowie der Liganden Ephrin-A3 und -B3 wurde in Leberzirrhose-Patienten mit HE, aber nicht in denen ohne HE signifikant herunterreguliert gefunden. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass Eph-R/Ephrine in mit Ammoniak behandelten Astrozyten *in vitro* und in *post mortem* Hirngewebe von Patienten mit Leberzirrhose und HE verändert exprimiert sind. Die Resultate lassen vermuten, dass bei HE gestörte zerebrale Funktionen in Zusammenhang mit Eph-R/Ephrin-Genexpressionsänderungen stehen können (1).

Abstract

Hepatic encephalopathy (HE) represents a neuropsychiatric syndrome, which is seen in patients with acute and chronic liver failure. According to latest knowledge HE is considered a consequence of a low grade cerebral edema that is accompanied by cerebral oxidative stress. Ephrin-receptors (Eph-R) and their ligands (ephrins) are expressed in neurons and glial cells and are known to modulate the expression levels of astroglial glutamate transporters. Thereby Eph-R and ephrins modulate neurotransmission in brain. However, a role of Eph-R and ephrins for the pathogenesis of HE is currently unclear. We therefore tested effects of ammonia, a main toxin of HE, on gene expression levels of Eph-R/ephrin isoforms (EphA1-5-R, -A7-R, EphB1-3-R, -B6-R, Ephrin-A1-5 und Ephrin-B1-3) in cultured rat astrocytes. Exposure to NH₄Cl (5mmol/l) for 24, 48 und 72 hours changed the mRNA-expression levels of several Eph-R/ephrin isoforms. Compared to control EphA4-R mRNA was upregulated to about 1.8-fold in astrocytes exposed to NH₄Cl (5mmol/l, 72h). Some of the NH₄Cl-induced mRNA expression changes were blocked by inhibitors of glutamine synthetase, NADPH oxidase or NO synthase. Downregulation of the glial glutamate/aspartate transporter (GLAST) mRNA by NH₄Cl (5mmol/l, 72h) was prevented by inhibitors of NADPH oxidase and glutamine synthetase, but not by siRNA-mediated knockdown of EphA4-R.

Both, exposing the astrocytes to NH₄Cl (5mmol/l, 72h) or to the N-glycosylation inhibitor tunicamycin (1µg/ml, 18h) decreased the molecular mass of EphA4-R as shown by Western blot analysis.

NH₄Cl, the N-glycosylation inhibitor tunicamycin as well as EphA4-R knockdown concordantly blocked fibroblast growth factor-induced and EphA4-R-dependent proliferation of cultured rat astrocytes.

Eph-R/ephrin mRNA expression changes were also examined in *post mortem* brain samples of cirrhotic patients without or with HE compared to healthy patients by gene array analysis. The mRNA expression levels of EphA3-R and EphB3-R as well as Ephrin-A3 and -B3 were found to be downregulated in patients with liver cirrhosis with HE, but not in those without HE.

The results of the present work show gene expression changes of several Eph-R/ephrins in astrocytes *in vitro* and in *post mortem* brain tissue of patients with liver cirrhosis and HE. The data suggests that Eph-R/ephrin gene expression changes may be involved in cerebral dysfunction in HE (1).

Abkürzungsverzeichnis

AMPA;	Aminomethylphosphonsäure
Apo;	Apocynin
ATP;	Adenosintriphosphat
DNA;	Desoxyribonukleinsäure
EAAC;	Exzitatorischer Aminosäuren Transporter (<i>excitatory amino acid carrier 1</i>)
EDTA;	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG;	Elektroenzephalografie
EGTA;	Ethylenglykol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Eph-R;	Ephrin-Rezeptor
EphA-R;	Ephrin-Rezeptor Subklasse A
EphB-R;	Ephrin-Rezeptor Subklasse B
FGF;	Fibroblasten-Wachstums-Faktor (<i>fibroblast growth factor</i>)
FGFR1;	Fibroblasten-Wachstums-Faktor Rezeptor (<i>fibroblast growth factor receptor 1</i>)
GAPDH;	Glyzeraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFAP;	saures Gliafaserprotein (<i>Glial fibrillary acidic protein</i>)
GLAST;	Glialer Glutamat/Aspartat Transporter
GLT1;	Glialer Glutamat-Transporter 1
GluR1;	Glutamat Rezeptor 1 (AMPA-Rezeptor Untereinheit)
GPI ;	Glykosylphosphatidylinositol
GS;	Glutaminsynthetase
GTP;	Guanosintriphosphat
HE;	Hepatische Enzephalopathie
HPRT1;	Hypoxanthin-Ribosyl-Transferase 1
Hz;	Hertz
L-NAME;	L-NG-Nitroarginin-Methyl-Ester
mGlu1 ;	Metabotroper Glutamat Rezeptor 1
MPT;	<i>Mitochondrial permeability transition</i>
MSO;	L-Methionin-S-Sulfoximin
MT1/2;	Metallothionein 1/2
NMDA;	N-Methyl-D-Aspartat
miRNA;	MikroRNA
NaCl;	Natriumchlorid
NaF;	Natriumfluorid

NADPH;	Nikotinamidadeninukleotidphosphat
nNOS;	Neuronale Stickoxid-Synthase
NO;	Stickstoffmonoxid
NOS;	Stickstoffmonoxid-Synthase
O ₂ ⁻ ;	Superoxid-Anionradikal
PAK;	<i>Protein-activated kinase</i> (Serin/Threonin Kinase)
PDZ;	<i>Post synaptic density protein; Septate junction protein disc large; Tight junction protein zonula occludentes-1</i>
PBR;	Peripherer Benzodiazepin-Rezeptor
PICK1;	<i>protein interacting with C-kinase 1</i>
PKC α ;	Proteinkinase C alpha
RNA;	Ribonukleinsäure
RNOS;	Reaktive Stick- und Sauerstoffspezies
ROS;	Reaktive Sauerstoffspezies
SR;	Serin-Razemase
VGLUT;	Vesikulärer Glutamattransporter
Zn;	Zink
ZNS;	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Definition und Diagnostik der hepatischen Enzephalopathie.....	1
1.2 HE-auslösende Faktoren und therapeutische Ansätze.....	3
1.3 Ammoniak in der Pathogenese der HE.....	4
1.4 Oxidativer Stress bei hepatischer Enzephalopathie.....	6
1.5. Entgiftung von Ammoniak durch Astrozyten.....	9
1.6 Aufnahme von Glutamat durch Astrozyten.....	9
1.7. Bedeutung von Ephrin-Rezeptoren und -Liganden für neuronale/astrogliale Kommunikation	
1.7.1 Vorkommen, Isoformen und Interaktionen von Ephrin-Rezeptoren.....	10
1.7.2 Struktureller Aufbau der Ephrin-Rezeptoren.....	12
1.7.3 Struktureller Aufbau der Ephrin-Liganden.....	13
1.7.4 Ephrin-Rezeptor- und -Liganden-vermittelte Signaltransduktion.....	14
1.7.5 Funktionen von Ephrin-Rezeptoren und -Liganden im Nervensystem.....	17
1.8 Der EphA4-Rezeptor	
1.8.1 Funktionen des EphA4-Rezeptors.....	18
1.8.2 Bedeutung von EphA4-Rezeptoren für die Glutamat-Freisetzung aus Astrozyten.....	20
1.8.3 Bedeutung von EphA4-Rezeptoren für die Freisetzung von D-Serin aus Astrozyten.....	21
1.8.4 Bedeutung von EphA4-Rezeptoren für die Zellproliferation.....	22
1.8.5 Ziele der Arbeit.....	22

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte.....	23
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.3 Chemikalien.....	25
2.1.4 Molekularbiologische Kits.....	26
2.1.5 Antikörper.....	26
2.1.6 Oligonukleotide.....	27
2.1.7 siRNA.....	29
2.1.8 Puffer und Lösungen.....	30

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation und Kultivierung zerebrokortikaler Astrozyten aus der Ratte.....	31
2.2.2 Experimentelle Behandlung kultivierter Rattenastrozyten.....	32
2.2.3 Genexpressionsanalyse und <i>Realtime</i> -PCR	
2.2.3.1 RNA-Isolation.....	33
2.2.3.2 Bestimmung von Konzentration und Reinheit der isolierten RNA.....	33
2.2.3.3 Reverse Transkriptase (cDNA Synthese).....	34
2.2.3.4 <i>Realtime</i> -PCR.....	34
2.2.3.5 <i>Realtime</i> -PCR Versuchsauswertung.....	35
2.2.3.6 <i>Agilent Microarray Assay</i>	36
2.2.4 Proteinanalyse	
2.2.4.1 Proteinisolation.....	37
2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	37
2.2.4.3 Western-Blot.....	37
2.2.5 Zellproliferationsmessung.....	38
2.2.6 Statistische Auswertung.....	39

3 Ergebnisse

3.1 Ammoniumchlorid-induzierte Ephrin-Rezeptor und -Liganden Expressionsänderungen in kultivierten Astrozyten.....	40
3.2 Zeitabhängigkeit der durch NH ₄ Cl induzierten mRNA-Expressionssteigerung des EphA4-Rezeptors in kultivierten Astrozyten.....	42
3.3 Einfluss einer experimentell herbeigeführten Zellschwellung auf die mRNA-Expression von Ephrin-Rezeptoren und -Liganden in kultivierten Astrozyten.....	43
3.4 Effekte von Ammoniumchlorid und einer experimentell herbeigeführten Zellschwellung auf die EphA4-Rezeptor-Proteinexpression in kultivierten Astrozyten.....	46
3.5 Effekt von Ammoniumchlorid auf die GLAST-Expression in kultivierten Astrozyten.....	48
3.6 Bedeutung von Glutamin und reaktiven Stick- und Sauerstoffspezies für Ammoniumchlorid-induzierte Ephrin-Rezeptor- und -Liganden-Expressionsänderungen in kultivierten Astrozyten.....	49

3.7 Rolle des EphA4-Rezeptors, der Glutamin-Synthetase, der NADPH-Oxidase und von Stickstoffmonoxid-Synthasen für die durch NH ₄ Cl vermittelte Expressionserniedrigung des GLAST in kultivierten Astrozyten.....	51
3.8 Effekte von Ammoniumchlorid auf die FGF-vermittelte und EphA4-R-abhängige Astrozytenproliferation.....	53
3.9 Eph-R/Ephrin-Expression in <i>post mortem</i> Hirnproben von Patienten mit Leberzirrhose mit oder ohne HE.....	56
3.10 Wirkung von Zytokinen auf die mRNA-Expression von Ephrin-Rezeptoren, -Liganden und des GLAST	
3.10.1 Effekt von Interferon- γ auf die mRNA-Expression von EphA4-R, Ephrin-A3 und des GLAST.....	58
3.10.2 Effekt von TNF- α auf die mRNA-Expression von EphA4-R, Ephrin-A3 und des GLAST.....	58
 4 Diskussion	
4.1. Ammoniak induziert Expressionsänderungen von Ephrin-Rezeptoren und -Liganden Glutamin-Synthetase- und RNOS-vermittelt.....	60
4.2 Bedeutung der durch Ammoniak vermittelten EphA4-Rezeptor-Expressionssteigerung für die Expression des Glutamatttransporters GLAST.....	63
4.3 Effekte proinflammatorischer Zytokine auf die Expression von Ephrin-Rezeptoren, -Liganden und des GLAST in Ammoniak-behandelten Astrozyten.....	64
4.4 Ammoniak hemmt die N-Glykosylierung des EphA4-Rezeptors.....	65
4.5 HE-spezifische mRNA-Expressionsänderungen von Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden im <i>post mortem</i> Hirngewebe von Zirrhosepatienten.....	66
4.6 Schlussfolgerungen.....	66
 5 Danksagung.....	68
 6 Literaturverzeichnis.....	69

1 Einleitung

1.1 Definition und Diagnostik der hepatischen Enzephalopathie

Die hepatische Enzephalopathie (HE) ist ein prinzipiell reversibles Syndrom neuropsychiatrischer Störungen, welches bei Patienten mit akutem oder chronischem Leberversagen auftreten kann. Nach heutigem Kenntnisstand ist die hepatische Enzephalopathie Folge eines geringgradigen Gliaödems, das begleitet wird von zerebralem oxidativem Stress (2).

In etwa 97% der Fälle tritt die HE im Rahmen einer chronischen Lebererkrankung auf, z.B. als Folge einer Leberzirrhose (2). Dabei umfasst das Symptomspektrum emotional/affektive, intellektuelle und psychomotorische Beeinträchtigungen sowie kognitive Einbußen unterschiedlicher Schwere. In nur ca. 3% der Fälle tritt die HE als Folge einer fulminanten Lebererkrankung auf. Hierbei ist die führende Komplikation ein erhöhter intrakranieller Druck (3).

Die Schwere der Erkrankung wird nach den so genannten West-Haven-Kriterien in die Stadien 0-IV unterteilt (4–6). Das Stadium 0 kennzeichnet den gesunden Patienten (7). Das Stadium I nach den West-Haven-Kriterien ist charakterisiert durch leichtgradige mentale Verlangsamung: hier treten neuropsychiatrische Symptome wie reduzierte Aufmerksamkeit und Dysphorie sowie eine gestörte Feinmotorik auf. Im Stadium II verschlechtert sich die Bewusstseinslage, es kommt zu Persönlichkeitsveränderungen und Desorientiertheit, Ataxie und Flapping Tremor. Stadium III ist gekennzeichnet durch Somnolenz, ausgeprägte Desorientiertheit, Rigor und Krämpfe. Endstadium ist Stadium IV, welches durch Koma und Anzeichen von Hirndruck gekennzeichnet ist (s. Abb. 1) (4–7).

Die minimale hepatische Enzephalopathie (MHE), ist ein latentes Stadium, welches durch klinisch-neurologische Untersuchungen nicht erkannt werden kann, jedoch mit Defiziten in kognitiven Teilbereichen verbunden ist, die durch psychomotorische Tests erfasst werden können. Unter anderem zählen hierzu Zahlenverbindungstests, der Liniennachfahrttest und der Zahlensymboltest. Zur Verbesserung der Objektivierbarkeit und Reproduzierbarkeit wurde ein Untersucher-unabhän-

giges Testverfahren entwickelt, der so genannte kritische Flimmerfrequenz-Test (4,5). Dem Patienten werden dabei Lichtimpulse mit einer initialen Frequenz von 60Hz präsentiert, welche er als Dauerlicht wahrnimmt. Schrittweise wird die Frequenz um 0,1 Hz reduziert, bis er erstmalig ein Flimmerlicht erkennt. Diese Frequenz wird als kritische Flimmerfrequenz bezeichnet. Als *cut off* Frequenz werden dabei 39Hz zu Grunde gelegt. Ein erniedrigter Wert kennzeichnet eine Beeinträchtigung des Patienten (5). Weitere neurophysiologische Tests zur Bestimmung der MHE sind die Elektroenzephalografie (EEG) und Messung evozierter Potentiale. Einschränkungen dieser Tests sind eine niedrige Sensitivität von 35% im EEG bei im Stadium I erkrankter Patienten und die Abhängigkeit der evozierten Potentiale durch die Eigenschaft des Stimulus und nicht durch die Aufmerksamkeit des Patienten. Vorteile sind, dass die Tests durch Wiederholungen nicht trainierbar sind oder durch *Fatigue* beeinflusst werden (7).

Durch West-Haven-Kriterien können die Stadien II und III abgegrenzt werden. Das Stadium I ist klinisch jedoch kaum abgrenzbar von Stadium 0 oder der MHE. Eine genaue Einteilung ist aber Voraussetzung für die Therapie sowie damit verbundene Prognose und Bewertung des Therapie-Erfolgs (7). Aufgrund dessen wurde 2005 beim 12. ISHE Kongress in Schloss Burg (Deutschland) eine neue Graduierung der HE-Schwere vorgenommen. Dabei wird die HE in eine *Low Grade* und eine *High Grade* unterteilt. *Low Grade* umfasst die Stadien 0, MHE sowie Stadium I und II. Hierbei wird ein kontinuierliches Symptomspektrum angenommen. Zur Diagnostik werden objektive, physikalische Parameter herangezogen: Evozierte Potentiale, Flimmerfrequenzanalysen und Computer-psychometrische Tests. Die *High Grade* HE wird unterteilt in eine HE ohne Koma (Stadium III nach den West-Haven-Kriterien) und mit Koma (Stadium IV nach den West-Haven-Kriterien). Hierbei erfolgt die Einteilung nach dem *Glasgow Coma Scale* (7).

	Bewusstseinslage	Neuropsychiatrische Symptome	Neurologische Symptome
Stadium 0 = keine HE	normal	keine	keine
MHE	normal	Störungen nur durch psychometrische Tests zu erfassen	keine
Stadium 1	leichtgradige mentale Verlangsamung	Eu-/Dysphorie, Reizbarkeit und Angst, reduzierte Aufmerksamkeit	gestörte Feinmotorik (beeinträchtigt Schreibvermögen, Fingertremor)
Stadium 2	verstärkte Müdigkeit, Apathie oder Lethargie	leichte Persönlichkeitsstörung, minimale Desorientiertheit bzgl. Ort und Zeit	Flapping-Tremor, Ataxie, verwaschene Sprache
Stadium 3	Somnolenz	Aggressivität, ausgeprägte Desorientiertheit bzgl. Ort und Zeit	Rigor, Krämpfe, Asterixis
Stadium 4	Koma	-	Hirndruckzeichen

Abb. 1: Stadieneinteilung der hepatischen Enzephalopathie nach den West-Haven-Kriterien [modifiziert nach (2) und (6)].

MHE= minimale hepatische Enzephalopathie.

1.2 HE-auslösende Faktoren und therapeutische Ansätze

Leberfunktionsstörungen können zum einem fulminant innerhalb weniger Tage zum akuten Leberversagen führen, zum anderen kann sich aber auch der Funktionsverlust chronisch über Monate bis Jahre erstrecken.

Sowohl das akute Leberversagen, als auch eine Leberzirrhose vermindern die Entgiftungsfunktion der Leber. Die Entstehung der HE ist somit u.a. Folge eines beeinträchtigten Abbaus von neurotoxischen Substanzen, wie insbesondere dem Ammoniak. Weitere Verbindungen, die in diesem Zusammenhang diskutiert wurden sind Merkaptane, Phenole und Fettsäuren (8). Beim chronischen Leberversagen bewirken erhöhte Blutammoniakspiegel und die damit einhergehende zerebrale Glutaminbildung in Astrozyten eine Hydratationsstörung der Astrozyten, die über die Freisetzung von Osmolyten, wie dem myo-Inositol, nur partiell kompensiert werden kann. In Folge dessen bildet sich ein geringgradiges gliales Ödem aus, welches unter dem Einfluss von weiteren HE-auslösenden Faktoren exazerbieren kann (9). Daher können pathologische Prozesse, welche die Ammoniak-Konzentration im Blut zusätzlich erhöhen (z.B. Blutungen im Magen-Darm-Trakt, Eiweißexzesse, operative

Eingriffe) eine HE exazerbieren. Auch eine konsekutive Minderdurchblutung der Leber bei Hypovolämie oder die Hemmung der Harnstoffsynthese durch einige Diuretika können die Ammoniakentgiftung in der Leber weiter vermindern (8). Daneben kann eine mit einer Störung des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts einhergehende Hyponatriämie, wie sie z.B. durch Diuretika ausgelöst werden kann, eine HE induzieren (3,10). Auch Benzodiazepine und bei Entzündungsprozessen freigesetzte Zytokine können eine HE exazerbieren (11,12).

Therapeutische Ansätze zielen insbesondere auf eine Reduktion der Blutammoniakspiegel durch diätische und medikamentöse Maßnahmen. Akute HE-Episoden werden mit L-Ornithin-L-Aspartat und Laktuloseeinläufen behandelt. L-Ornithin-L-Aspartat stimuliert die Harnstoff- und Glutaminbildung und wandelt auf diese Weise das toxische Ammoniak in nicht toxische Stoffwechselprodukte um (3). Nicht-resorbierbare Disaccharide, wie Laktulose, werden durch die Bakterienflora im Dickdarm zu organischen Säuren abgebaut. Die Senkung des pH-Wertes führt einerseits zur Laxation, andererseits verändert es den bakteriellen Stoffwechsel, indem vermehrt Stickstoff in bakteriellen Proteinen fixiert wird (8). Als Sekundärprophylaxe werden Rifaximin und Laktulose oral verabreicht. Bei proteinintoleranten Patienten kann eine Diät mit verzweigtkettigen Aminosäuren und eine pflanzliche Diät angezeigt sein (3) (13).

1.3 Ammoniak in der Pathogenese der HE

Für die Pathogenese der HE wird dem Ammoniak eine wichtige Rolle zugewiesen (3,14). Ammoniak ist ein Abbauprodukt von Aminosäuren im Darm und wird überwiegend in der Leber im Harnstoffzyklus und dem Glutaminstoffwechsel entgiftet. Diese halten den Ammoniakspiegel im peripheren Blut des Menschen konstant niedrig bei $30\mu\text{M}$ (8). Ist diese Funktion, z.B. aufgrund einer Leberzirrhose, gestört, kommt es zur toxischen Anreicherung von Ammoniak im Blut und in der Folge zu einem vermehrtem Übertritt in das Gehirn (15,16). Dort erfolgt die Ammoniakentgiftung durch die Astrozyten (17,18). Diese können mit Hilfe der nahezu exklusiv von ihnen exprimierten Glutaminsynthetase (GS) Glutamat und Ammoniak in Glutamin überführen (19,20).

Bei hohen Ammoniakkonzentrationen im Blut kommt es zu einer verstärkten Bildung und intrazellulären Akkumulation von osmotisch wirksamen Glutamin und damit zu einer Astrozytenschwellung sowie der Ausbildung eines geringgradigen Hirnödems (s. Abb. 2) (20–23).

Während beim Leberzirrhosepatienten ein geringgradiges zerebrales Ödem beobachtet wird, kann es beim akuten Leberversagen zur Ausbildung eines klinisch offenkundigen Hirnödems kommen, welches unbehandelt einen Anstieg des intrakraniellen Drucks bewirkt (23). Die Kompression des Hirnstamms kann in der Folge zum Tod führen (24).

Weitere Wirkungen des Ammoniaks die zur Ausbildung einer HE beitragen sind Störungen des zerebralen Energiestoffwechsels, neuronale Funktionsstörungen, Änderungen der Neurotransmitterrezeptorexpression und Permeabilitätsstörungen der Blut-Hirn-Schranke (s. Abb. 3) (8,25,26).

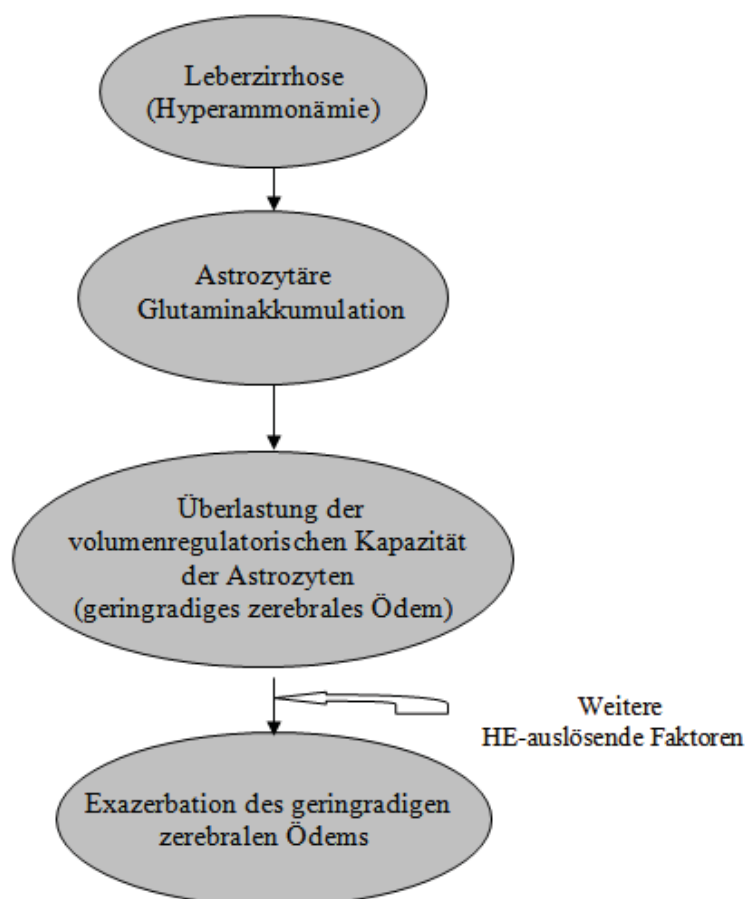


Abb. 2: Geringgradiges zerebrales Ödem bei HE [modifiziert nach (23)].

Eine Folge der Leberzirrhose ist eine Hyperammonämie. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Bildung und intrazellulären Akkumulation von osmotisch wirksamen Glutamin in Astrozyten. Hierdurch wird das volumenregulatorische Potential der Astrozyten erschöpft. Weitere HE-auslösende Faktoren, die ebenfalls eine Astrozytenschwellung induzieren, können dann die HE exazerbieren.

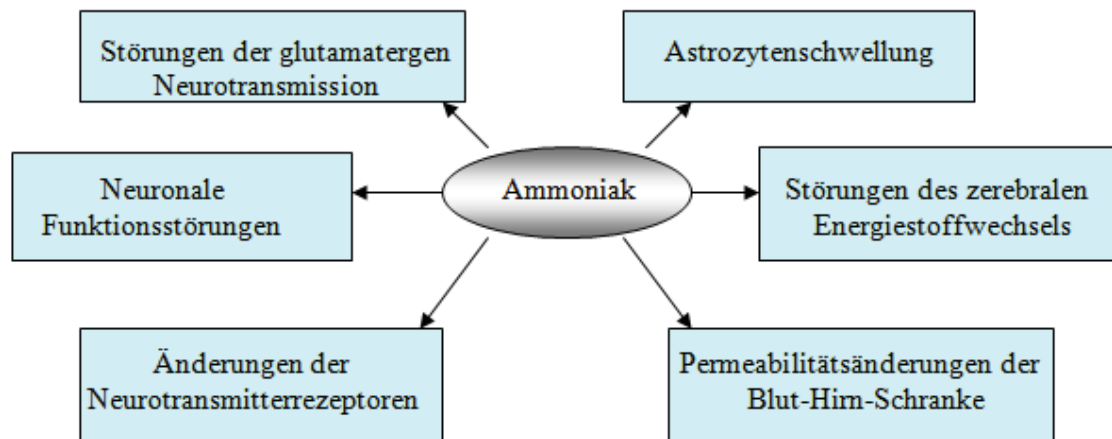


Abb.3: Wirkungen von Ammoniak auf das Gehirn [modifiziert nach (8)].
Zerebrale Wirkungen des Ammoniaks bei der HE.

1.4 Oxidativer Stress bei hepatischer Enzephalopathie

HE auslösenden Faktoren, wie Ammoniak, Zytokine, Sedativa und Hyponatriämie, ist gemeinsam, dass sie eine Schwellung und oxidativen Stress in Astrozyten induzieren (3,27–29). Da auch oxidativer Stress wiederum eine Astrozytenschwellung induzieren kann, wurde postuliert, dass osmotischer und oxidativer Stress sich wechselseitig verstärken können (3,11,27–29). Die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies (RNOS) wird dabei über eine NMDA-Rezeptor-abhängige Erhöhung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration in Astrozyten vermittelt. Diese wird durch eine Depolarisations-induzierte Aufhebung der Mg^{2+} -vermittelten NMDA-Rezeptor-Blockade ausgelöst und vermittelt nachfolgend die Bildung von Prostanoiden und die exozytotische Freisetzung von Glutamat, wodurch NMDA-Rezeptoren verstärkt aktiviert werden (30–32). Ca^{2+} stimuliert nachfolgend die Bildung von Superoxidanionradikalen ($O_2^{\cdot-}$) durch Aktivierung der NADPH-Oxidase (NOX), in dessen Folge RNA oxidiert wird. Die Bildung von Stickoxid über neuronale NO-Synthase (nNOS) mobilisiert Zink-Ionen aus Proteinen, worüber die Transkription verschiedener Gene reguliert wird (z.B. der Benzodiazepin-Rezeptor (PBR) oder Metallothionein 1 und 2 (MT 1/2)). Die Rekombination von Superoxidanionradikal mit NO induziert die Bildung von Peroxynitrit, welches Proteine tyrosinnitriert (30). HE-relevante Faktoren induzieren auch eine Zellkernschwellung mit bislang unbekannten funktionellen Konsequenzen (s. Abb. 4 und 5) (3).

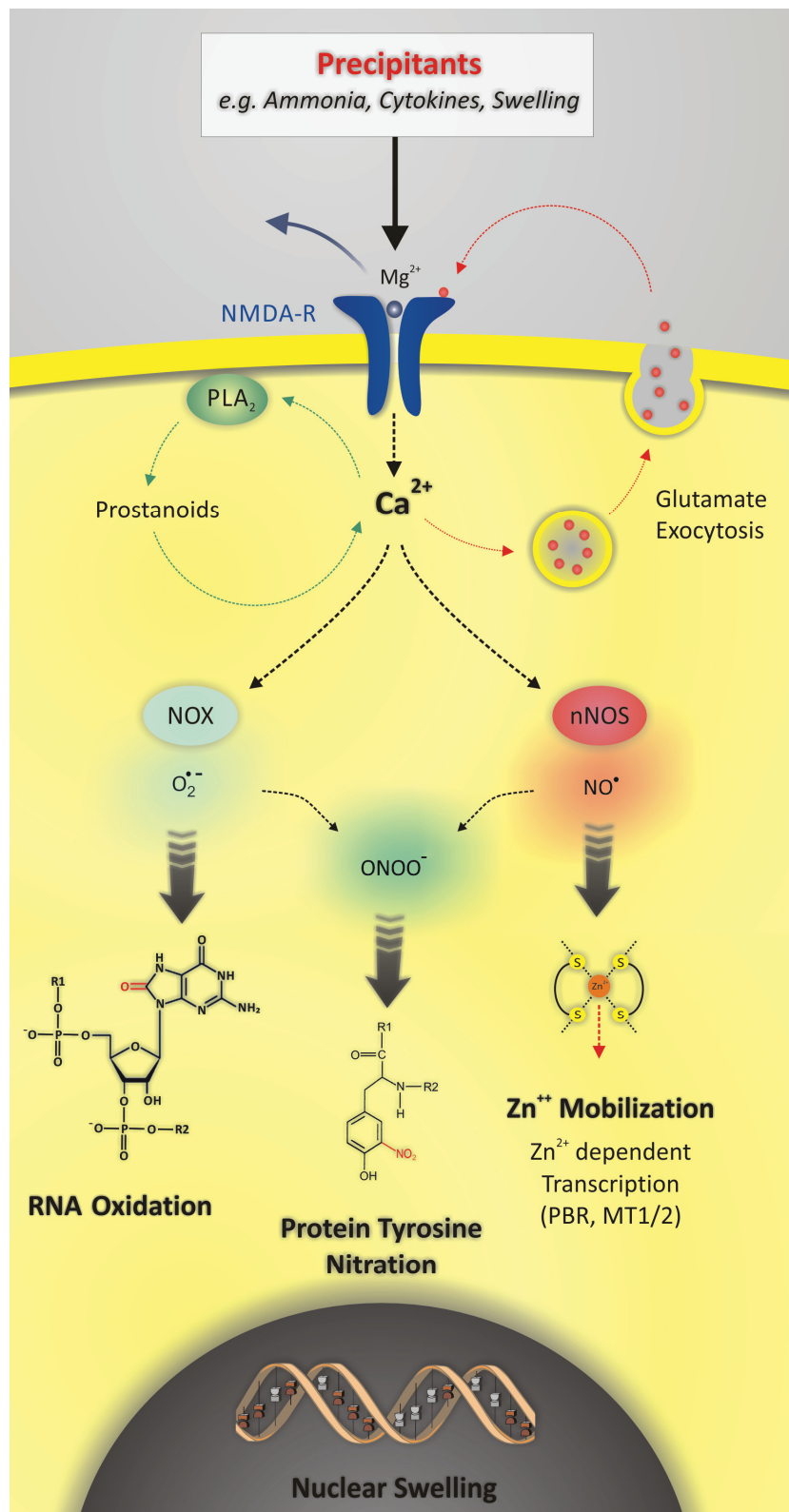


Abb.4: Mechanismen und funktionelle Konsequenzen von, durch HE-relevante Faktoren induzierten, oxidativem und nitrosativem Stress in Astrozyten [aus (30)].

HE-relevante Faktoren induzieren NOX- und nNOS-vermittelt oxidativen und nitrosativen Stress durch den RNA, Proteine und die Gentranskription modifiziert werden.

Die Ammoniak-vermittelte Synthese von Glutamin ist an der Induktion von oxidativem und nitrosativem Stress in Astrozyten beteiligt. Einerseits wurde gezeigt, dass Glutamin über die Induktion von osmotischem Stress die Bildung von RNOS induzieren kann (23). Zum anderen wurde postuliert, dass Glutamin über Induktion der *mitochondrial permeability transition* (MTP) die Synthese reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Mitochondrien induziert (33). Die ROS-Bildung soll dabei über den Transport von Glutamin in die Mitochondrien und durch Glutaminase-vermittelte Freisetzung von Ammoniak induziert werden (33).

Funktionelle Konsequenzen der Bildung von RNOS sind Oxidation von RNA, posttranslationale Proteinmodifikationen und eine Änderung der Zink-abhängigen Gen-transkription (31). Gegenwärtig wird angenommen, dass diese Veränderung der RNOS-Bildung eine Störung der Kommunikation zwischen Astrozyten und Neuronen, eine Beeinträchtigung der synaptischen Übertragung und eine Störung von oszillatorischen Netzwerken verursachen (s. Abb. 5) (3,23,34,35).

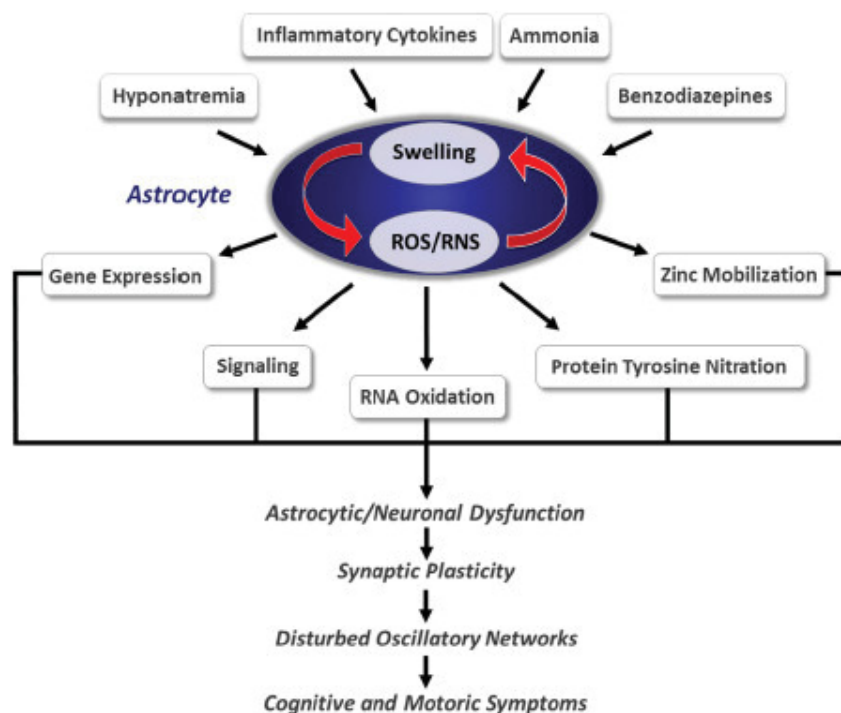


Abb. 5: Pathomechanismus der hepatischen Enzephalopathie [aus (3)].

HE-relevante Faktoren vermitteln die Bildung reaktiver Stick- (RNS) und Sauerstoff-Spezies (ROS) und führen zu einer Zellschwellung. Die Zellschwellung und die ROS/RNS-Bildung verstärken sich gegenseitig. Hierdurch werden die neuropsychiatrischen Symptome der HE vermittelt. Folge dieser wechselseitigen Beeinflussung ist Oxidation von RNA, Protein-Tyrosin-Nitrierung und eine veränderte Genexpression.

1.5 Entgiftung von Ammoniak durch Astrozyten

Astrozyten sind wesentlich an der Aufrechterhaltung der Wasser- und Ionenhomöostase, an der Ammoniakentgiftung sowie an der Aufnahme und Prozessierung von Neurotransmittern, wie dem Glutamat, im Gehirn beteiligt (36).

Die Ammoniakentgiftung erfolgt durch die Glutaminsynthetase (GS), welche aus Glutamat und Ammoniak Glutamin herstellt. Glutamin kann anschließend wieder in den Extrazellularraum abgegeben werden (37).

Eine intrazelluläre Glutaminanreicherung verstärkt den osmotischen Druck und bewirkt eine Diffusion von Wasser in das Zellinnere. Um einer Schwellung entgegen zu wirken, kontrollieren Astrozyten ihr Zellvolumen durch Abgabe osmotisch-wirksamer Substanzen, wie dem myo-Inositol (9). Umgekehrt kann die Zelle diese Substanzen über Transporter zur Erhaltung des Zellvolumens bei Zellschrumpfung aufnehmen (38).

In Experimenten von Tanigami *et al.* wurden Ratten, ähnlich wie bei einer HE, hyperammonämischen Bedingungen ausgesetzt. Mit dem GS-Inhibitor L-Methionin-sulfoximin (MSO) wurde gezeigt, dass durch Blockade der Glutaminsynthetase ein Anstieg des intrazellulären Glutaminspiegels und die folgende Zunahme des Wassergehalts in kortikalen Astrozyten verhindert werden konnte (39). Auch in mit Ammoniumazetat behandelten Ratten konnte durch MSO eine Hirnschwellung verringert und der intrakranielle Druck gesenkt werden (40).

1.6 Aufnahme von Glutamat durch Astrozyten

Astrozyten nehmen extrazelluläres Glutamat aus dem synaptischen Spalt über die Glutamat-Transporter EAAT (*excitatory amino acid transporter*) 1 (Synonym: GLAST, *glial-specific glutamate/aspartate transporter*) und 2 (Synonym: GLT-1, *glial glutamate transporter 1*) auf (27, 41). Das aufgenommene Glutamat kann durch die in Astrozyten lokalisierte Glutaminsynthetase in Glutamin umgewandelt werden, welches den Neuronen zur Herstellung von Glutamat dient. Eine Störung der Aufnahme kann über eine Erhöhung der extrazellulären, synaptischen Glutamatkonzentration neuronale Glutamatrezeptoren aktivieren und hierüber Neurone übererregen (42,43).

An kultivierten Astrozyten konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Ammoniak-Konzentration, wie sie auch bei einer HE beobachtet wird, die Aufnahme

von Glutamat reduziert. Der verminderte Glutamat-*Uptake* ist dabei Folge einer Herunterregulation der GLAST-mRNA und des -Proteins (41,44).

Daneben wurde gezeigt, dass Ammoniak über eine Membrandepolarisation, die Transportaktivität des GLAST vermindert (44-46).

Die Glutamataufnahme in Astrozyten kann außerdem auch durch reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) inhibiert werden (47). Die Glutamat-Aufnahme wird dadurch verhindert, dass Thiol-Gruppen und Na^+/K^+ -Pumpen in Astrozyten durch ROS nachhaltig oxidiert werden können (44,47-50).

1.7. Bedeutung von Ephrin-Rezeptoren und -Liganden für die neuronale/astrogliale Kommunikation

Astrozyten sind essentiell für die Bildung und Funktionalität von neuronalen Synapsen. Die hierfür zugrundeliegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig geklärt. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass Ephrin-Rezeptoren und ihre Ephrin-Liganden eine Rolle spielen (51).

1.7.1 Vorkommen, Isoformen und Interaktionen von Ephrin-Rezeptoren

Die Ephrin-Rezeptoren (Eph-R) bilden zusammen mit ihren Liganden (Ephrinen) die größte Unterfamilie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK). Sie wurden erstmals 1987 in der Erythropoetin-produzierenden-humanen-hepatozellulären-Karzinom-Zelllinie (ETL-1) entdeckt (52) und sind an einer Vielzahl (patho-) physiologischer Prozesse beteiligt (53-56).

Die Eph-R-/Ephrin-Proteine werden während der Embryonalentwicklung in allen Keimblättern exprimiert und sind verantwortlich für Wachstum, intrazelluläre Kommunikation und Differenzierung in nahezu allen Geweben. Sie steuern das Richtungswachstum neuronaler Axone und sind wesentlicher Bestandteil der Synapsen-Plastizität. Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden spielen eine wichtige Rolle bei der

Entwicklung von Karzinomen in verschiedenen Zelltypen und Organsystemen (53,54,57,58).

Die Ephrin-Rezeptoren werden in zwei Klassen unterteilt. Die neun EphA-Rezeptoren (EphA1-EphA8-R und EphA10-R) binden fünf membrangebundene glycosylphosphatidyl-inositol (GPI)-Anker gekoppelte Ephrin-A Liganden (Ephrin-A1-Ephrin-A5), während die sechs EphB-Rezeptoren (EphB1-EphB6-R) mit drei transmembranen Ephrin-B- Proteinen (Ephrin-B1-Ephrin-B3) interagieren (55,56,59).

Grundsätzlich kann jeder EphA-Rezeptor alle Ephrin-A Liganden binden und jeder EphB-Rezeptor alle Ephrin-B-Liganden (55,60). Eine Ausnahme bildet EphA1-R, welcher nur mit Ephrin-A1 signifikant interagiert (61,62). EphA4-R nimmt eine Sonderstellung ein, da er eine hohe Affinität sowohl zu den Ephrinen-A, als auch zu den Ephrinen-B2 und -B3 aufweist (55,56,63-71). Der EphB2-R bindet neben Ephrin-B-Liganden mit geringerer Affinität auch Ephrin-A5-Liganden (70-72) (s. Abb.6).

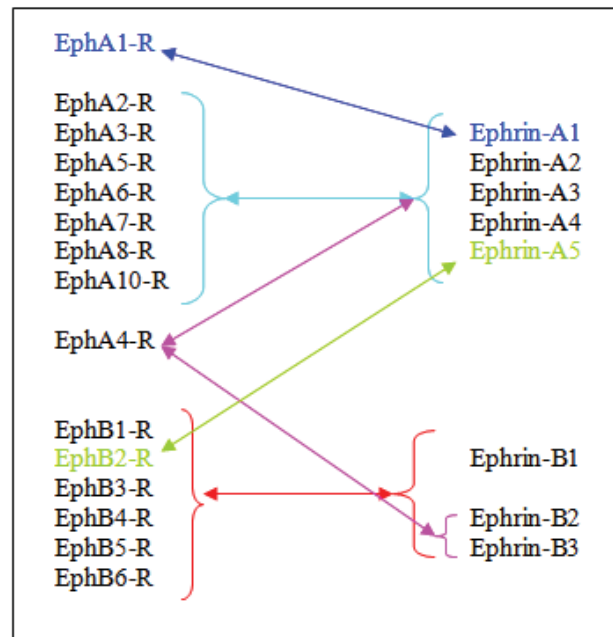


Abb.6: Die Interaktionen von Ephrin-Rezeptoren mit den dazugehörigen Ephrin-Liganden [modifiziert nach (61,62,71-73)].

EphA1-R bindet Ephrin-A1. Alle übrigen EphA-R binden alle Ephrine-A, alle EphB-R die Ephrine-B. Ausnahmen: EphA4-R hat zusätzlich eine Affinität zu Ephrin-B1 und -B2 und EphB2-R zu Ephrin-A5. Eph-R = Ephrin-Rezeptor; Ephrin = Ephrin-Ligand.

1.7.2 Struktureller Aufbau der Ephrin-Rezeptoren

Die Struktur der Ephrin-Rezeptor-Klassen A und B ist ähnlich (55).

Es sind transmembranäre Proteine, die eine extrazelluläre N-terminale globuläre Domäne mit starker Affinität zu den entsprechenden Liganden besitzen (57,74,75). Darauf folgen zwei weitere Domänen mit schwacher Affinität zu den Liganden, die aber für die spezifische Erkennung der Liganden von Bedeutung sind. Hierzu gehören eine cysteinreiche Region, die multiple Eph-R/Ephrin-Komplexe *clustern* kann und repetitive Fibronectin-Sequenzen (53,56,76). Im zytoplasmatischen Anteil findet sich eine zur Autophosphorylierung befähigte Kinase-Domäne und am zytoplasmatischen C-terminalen Ende des Rezeptors eine *sterile alpha motif* (SAM)-Domäne und ein PDZ-Bindemotiv. Beide vermitteln eine Interaktion mit Signalproteinen, die zur Homodimerisierung- und *Cluster*-Bildung der Rezeptoren führen (55,56,77-80) (s. Abb.7 und 8).

1.7.3 Struktureller Aufbau der Ephrin-Liganden

Extrazellulär besitzen die Ephrine der Gruppen A/B eine hochkonservierte Ephrin-Rezeptor-Erkennungsregion. Die Ephrine der Gruppe A sind über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker mit der Zellmembran verbunden. Die Ephrine-B besitzen hingegen eine transmembrane- und eine zytoplasmatische Dömane. Hier befindet sich ein PDZ-Bindemotiv, welches bedeutsam ist für die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden (81-83) (s. Abb. 7).

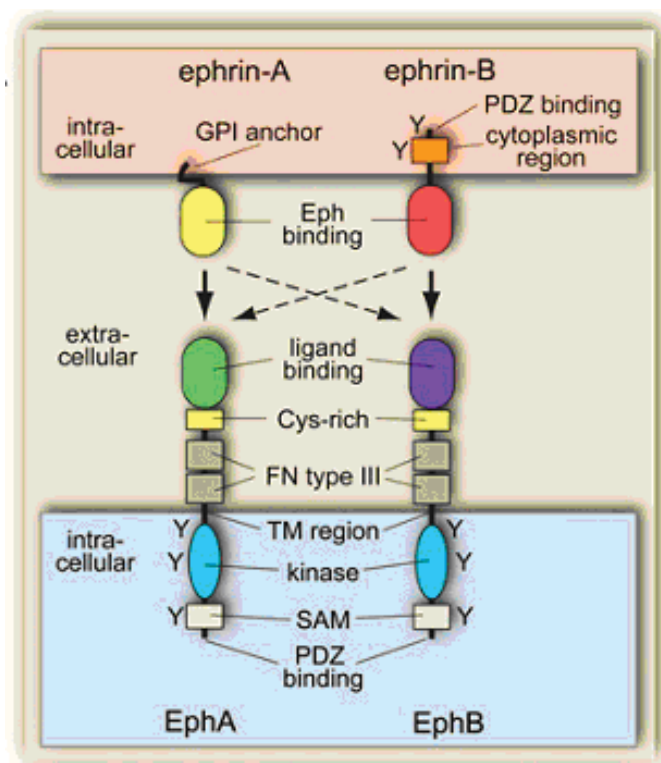


Abb.7: Schematischer Aufbau von Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden [aus Pitulescu *et al.* 2010, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. R. Adams (60)].

Cys rich = Cysteinreiche Region; FN typ III = Fibronectin-Sequenzen vom Typ III; *TM region* = Transmembran-Region; SAM = Steriles-α-Motiv; Y = *tyrosine phosphorylation site*.

1.7.4 Ephrin-Rezeptor- und Ephrin-Liganden- vermittelte Signaltransduktion

Die durch Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden vermittelte Signaltransduktion ist komplex. Voraussetzung hierfür ist eine direkte Interaktion benachbarter Zellen und ein *Clustering* vieler Rezeptoren bzw. vieler Liganden auf der jeweiligen Zellmembran. Zunächst bildet sich eine interzelluläre Brücke aus durch Bindung eines Ephrin-Rezeptordimers auf der einen Zelle an ein Ephrin-Ligandendimer auf einer benachbarten Zelle. Anschließend oligomerisieren viele dieser Rezeptoren und Liganden und es bildet sich ein zirkuläres Multimer aus. Die Bildung dieser *Cluster* erfolgt über die PDZ-Domäne der Eph-R, welche mit Sequenzmotiven am C-terminalen, intrazellulären Abschnitt der Liganden interagieren (63,82,84-86) (s. Abb. 8).

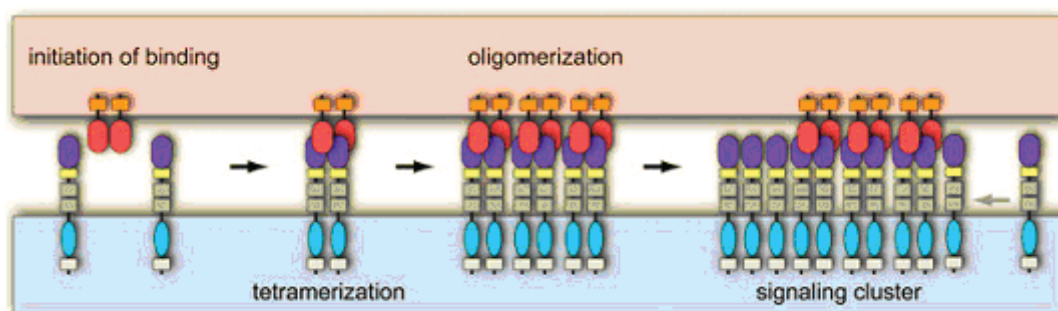


Abb. 8: Oligomerisierung von Ephrin-Rezeptoren und -Liganden [aus Pitulescu et al. 2010, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. R. Adams (60)].

Interzelluläre Brückenbildung zwischen jeweils zwei Eph-R einer Zelle und zwei Ephrinen einer benachbarten Zelle. Anschließend oligomerisieren viele dieser Rezeptoren und Liganden und es bildet sich ein zirkuläres Multimer aus.

(orange = intrazelluläre Domäne der Ephrine; rot= Eph-R-Erkennungsregion von Ephrinen; magenta= Liganden-Bindungsdomäne der Eph-R; gelb = cysteinreiche Region; grau = Fibronectin-Sequenzen; hellblau = Kinase-Domäne; weiß = Steriles- α -Motiv, schwarzer Punkt unterhalb des weißen Rechtecks = PDZ Bindemotiv.

Die Signaltransduktion zwischen Ephrin-Rezeptoren und -Liganden erfolgt bidirektional. Über die Multimerisierung wird die Kinase-Domäne der Eph-Rezeptoren autophosphoryliert, wodurch die Bindung von Adapterproteinen ermöglicht wird. Die nachfolgende Aktivierung verschiedener Signalproteine in der Rezeptorzelle nennt man *forward signaling* (63,87). Die ausgelöste Signaltransduktion in der Liganden-exprimierenden Zelle nennt man *reverse signaling*. Hierbei wird bei den Ephrinen der

Gruppe B durch Phosphorylierung und Aktivierung der PDZ-Domäne eine Signalkaskade in Gang gesetzt (81,82).

Die Ephrine der Gruppe A besitzen kein PDZ-Bindemotiv und *clustern* über spezifische Mikrodomänen auf ihrer Zellmembran. Diese sind reich an Glykosphingolipiden, Cholesterol und spezifischen Proteinen. Zu den Proteinen gehören unter anderem G-Proteine und Tyrosin-Kinasen der Src (*sarcoma*)-Familie (88-92). Eine Aktivierung der Liganden der Gruppe A führt zu einem *Crosslinking* der GPI-Anker der Liganden, der über einen unbekannten Mechanismus eine Aktivierung vermittelt und ein Signal in das Zellinnere propagiert (93).

Das *reverse signaling* verändert über eine Aktivierung von Integrinen das Zytoskelett und die Zellmigration (89,94-97). Sowohl das *forward*- als auch das *reverse signaling* beeinflussen die Motilität der Zelle (63).

Für die Signaltransduktion ist eine *Cluster*-Bildung der Eph-R/Ephrin-Komplexe obligat (63). Interessanterweise zeigen Experimente mit rekombinanten, nicht-geclusterten, löslichen Liganden eine Hemmung der Signaltransduktion (80,98-101). Die physiologische Bedeutung dieser Hemmwirkung ist Gegenstand einer Vielzahl von Untersuchungen.

Ein weiterer Faktor, welcher die Stärke der Signaltransduktion beeinflusst, ist die sogenannte *cis/trans*-Stellung. *Trans*-Stellung bedeutet, dass die Interaktion eines Eph-R mit seinem korrespondierenden Liganden zwischen zwei benachbarten Zellen stattfindet. Diese Interaktion aktiviert ein bidirektionales *Signaling*, wie oben beschrieben, in beiden benachbarten Zellen. In *cis*-Stellung erfolgt die Interaktion des Eph-R mit seinem korrespondierenden Liganden innerhalb einer einzigen Zelle (s. Abb. 9) (58). Yin *et al.* vermuten (102), dass bei dieser Interaktion das Signal nicht in das Zellinnere geleitet wird und eine Eph-Rezeptor-Aktivierung ausbleibt. Auf diese Weise könnte die Signalstärke der benachbarten Eph-Rezeptoren in *trans*-Stellung reguliert werden (58).

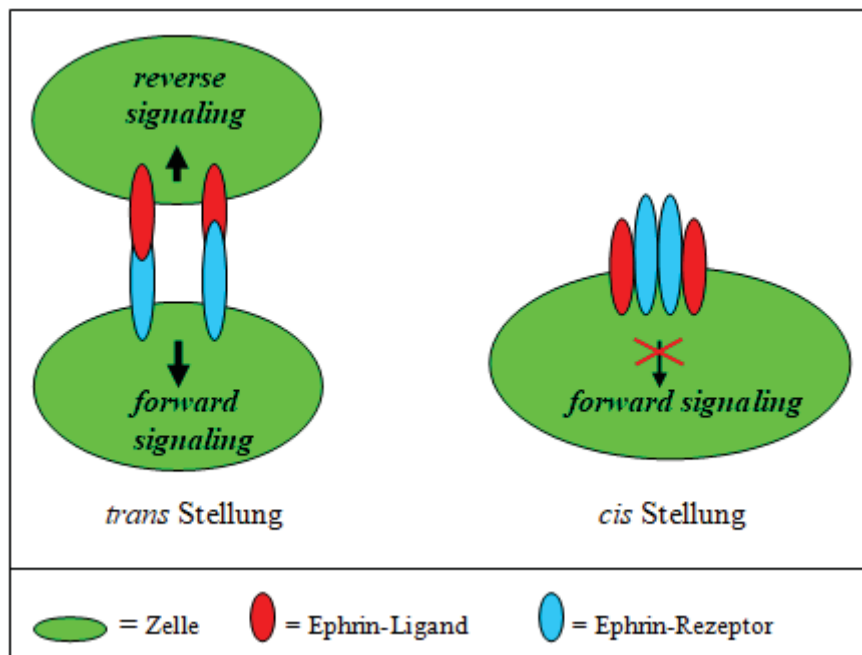


Abb. 9: Signaltransduktion in cis/trans-Stellung [modifiziert nach (60)].

In *trans*-Stellung erfolgt eine Interaktion von Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden zwischen zwei benachbarten Zellen. Hierdurch wird eine Signalkaskade in beiden beteiligten Zellen ausgelöst (bidirektionales *Signaling*). In *cis*-Stellung interagieren die Rezeptoren und Liganden auf der gleichen Zelle miteinander. Hierdurch wird die Aktivierung des hierüber vermittelten Signalweges gehemmt.

Komplexe aus Ephrin-Rezeptor und -Ligand können durch unterschiedliche Mechanismen wieder aufgelöst werden. Innerhalb einer Zelle können Eph-R, wie EphA3-R mit Metalloproteasen, wie z.B. Adam-10, koexprimiert werden (103). Eine Interaktion von EphA3-R mit Ephrin-A2 oder Ephrin-A5 in *trans*-Stellung aktiviert Adam-10, welche nachfolgend die extrazellulären Anteile der Liganden abspaltet und das *Signaling* unterbricht (60,103,104).

Ein anderer Mechanismus ein Eph-R/Ephrin-*Signaling* zu unterbrechen, kann über eine Endozytose des gesamten Eph-R/Ephrin-Komplexes erfolgen. Die Endozytose wird hierbei über eine Eph-B/Ephrin-B-Interaktion ausgelöst (60,105,106).

Die Stärke des *Signalings* ist abhängig vom Grad der *Cluster*-Bildung und der entgegenwirkenden Dephosphorylierung der Kinase-Domänen bzw. der Internalisierung der Rezeptoren (60,106,107,108). Je nach dem, welche Ephrin-Rezeptoren und -Liganden interagieren, können die ausgelösten Signalkaskaden eine verstärkte Adhäsion oder Repulsion der Zellen auslösen (60,107,109).

1.7.5 Funktionen von Ephrin-Rezeptoren und -Liganden im Nervensystem

Die Interaktion von Neuronen und Gliazellen im zentralen Nervensystem spielt eine entscheidende Rolle für die Funktion von Synapsen (109). Die Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden sind wesentlich an der Synapsenbildung, der Regulation der Synapsenfunktion und -plastizität beteiligt (109,110).

Während der Synapsenbildung in kortikalen und hippocampalen Neuronen aktivieren präsynaptische Ephrine der B-Klasse postsynaptische EphB-R, welche ein *Clustering* von NMDA-Rezeptoren hervorrufen. Auf diese Weise wird die Entwicklung von dendritischen *Spines* vermittelt (111,112). Dendritische *Spines* sind kleine Vorwölbungen auf der Oberfläche der Dendriten, die mit Axonen interagieren und Synapsen bilden. Entwicklungsstörungen von *Spines* und Synapsen induzieren schwere neurologische Defizite (113). Bei einer Mutation von EphB1-R, EphB2-R und EphB3-R kommt es jeweils zu einer verringerten Expression der *Spines* und zu einer gestörten Reifung von Synapsen (55,114).

EphA-R spielen auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der *Spine*-Morphologie und die damit verbundene spezifische Form von -Plastizität (109,111). Perisynaptische Astrozyten stabilisieren *Spines*, indem sie Synapsen mit ihren Fortsätzen umhüllen (55,109). Nach Murai *et al.* wird die Form der *Spines* durch Interaktion von EphA4-R/Ephrin-A3 reguliert, indem EphA4-R auf der Plasmamembran der *Spines* mit Ephrin-A3 auf Astrozyten interagiert (109,115). Eine Aktivierung von EphA4-R führt zu einer Retraktion der *Spines* und Reduktion ihrer Anzahl (111,113). Ein Verlust von EphA4-R hingegen führt zu einer Verlängerung und Desorganisation von *Spines* (116).

Auch Neurotraumen sind mit Expressionsänderungen von Eph-R und Ephrinen assoziiert. Willson *et al.* wiesen nach Rückenmarksschädigung eine erhöhte Expression des EphA3-R nach (117). Figueroa *et al.* indentifizierten EphA7-R als einen Regulator der Apoptose in der akuten Phase einer Rückenmarksschädigung (118).

Auch eine Neuroinflammation ist mit Expressionsänderungen der Eph-R und Ephrine assoziiert. Zytokine wirken entscheidend mit bei der Ausbildung einer Astroglie. Nach Goldshmit *et al.* induziert IFN- γ und der leukämiehemmende Faktor (LIF) in kultivierten Astrozyten eine erhöhte Protein-Expression von EphA4-R (119). EphA4-R induziert dann über eine Aktivierung von Astrozyten die Ausbildung einer Astroglie und Glianarbe. Demgegenüber wurde in EphA4-R *Knockout* Mäusen eine verminderte Astroglie beobachtet (119,120).

In der Arbeit von Li YY *et al.* wurde nach Ausschüttung inflammatorischer Zytokine bei einer Herzinsuffizienz, wie dem Interleukin-1 β (IL-1- β) oder dem Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α), eine signifikant verminderte Expression von EphA3-R auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen (121).

1.8. Der EphA4-Rezeptor

1.8.1 Funktionen des EphA4-Rezeptors

Der EphA4-Rezeptor besitzt eine hohe Affinität sowohl zu den Ephrinen der Gruppe A als auch der Gruppe B und wurde überwiegend im Zusammenhang mit der Entwicklung des Nervensystems untersucht, wo er in eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse involviert ist (51,55,68,70,107,116,122-127).

Im zentralen Nervensystem (ZNS) ist der EphA4-R ubiquitär exprimiert. Er findet sich präsynaptisch am Ort, an dem die Transmitterausschüttung erfolgt, in den sogenannten *pre-synaptic active zones* (PAZ), in postsynaptischen Dendriten und ist in perisynaptischen Regionen exprimiert, wo er z.B. via Ephrin-A3 mit Astrozyten interagieren kann. Zudem wird EphA4-R in neurotransmitterhaltigen Vesikeln exprimiert, was auf eine Bedeutung für die Neurotransmitterfreisetzung hindeutet (111,127-129). Mit der durch Depolarisation induzierten Erregung von kortikalen Neuronen steigt die Expressionsdichte von EphA4-R auf neuronalen Membranen (129). Der Rezeptor ist dadurch von großer Bedeutung für synaptische Plastizität und ist beteiligt an der Langzeitpotenzierung (55,129).

EphA4-R moduliert die Expression des Glutamat-Rezeptors 1 (GluR1), einer Untereinheit des Glutamat-Rezeptors vom α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-

propionic acid receptor type (AMPA-Typ). Eine Stimulation mit Ephrin-A1 ermöglicht eine Interaktion mit dem *Anaphase promoting complex* (APC), welcher eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität besitzt. Durch diese Ligase wird GluR1 ubiquitiniert und letztlich degradiert, wodurch synaptische Effizienz vermindert wird (130).

Furne *et al.* zeigten, dass EphA4-R in neuronalen Zellen der germinalen Zone die Apoptose moduliert. Über einen Caspase-abhängigen Mechanismus und DNA-Degradation vermittelt die Aktivierung von EphA4-R einen Zelluntergang (131). Die Apoptose kann durch eine spezifische Blockade des EphA4-R mittels Ephrin-B3 gehemmt werden (132,133).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass die in kortikalen Astrozyten exprimierten Rezeptoren EphA2-EphA7, EphB2 und insbesondere EphA4 durch geclustertes Ephrin-A5 aktiviert werden. Ephrin-A5 induziert dabei eine Phosphorylierung von EphA4-R in Neuronen und inhibiert hierüber das Wachstum von Axonen (71,119,133,134). Zytokine, wie IFN- γ , induzieren eine Phosphorylierung von EphA4-R und steigern außerdem die Expression von EphA4-R auf Proteinebene, ähnlich wie das geclusterte Ephrin-A5 (119,120,134).

Experimente mit synthetisch hergestellten, nicht-membrangebundenen und nicht-geclusterten Liganden, den sogenannten löslichen Ephrin-A5-Liganden zeigen hingegen eine antagonistische Wirkung und inhibieren die Phosphorylierung von EphA4-R. Über diesen Mechanismus kann *in vitro* eine verminderte Expression von GFAP in Astrozyten und demzufolge eine verminderte Astroglieose nachgewiesen werden (61,134-136).

Versuche in der EphA4-R *Knockout* Maus zeigen Expressionsänderungen der Rezeptoren EphA2, EphA5 und EphB2. In Abwesenheit von EphA4-R wird EphA2-R sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene hochreguliert. EphA5-R und EphB2-R werden lediglich auf mRNA-Ebene herunterreguliert und bleiben unverändert auf Proteinebene (62,71,137).

1.8.2 Bedeutung von EphA4-Rezeptoren für die Glutamat-Freisetzung aus Astrozyten

Eine wichtige Aufgabe von Astrozyten ist es bei neuronaler Aktivität an der Synapse freigesetztes Glutamat aus dem synaptischen Spalt wieder aufzunehmen und intrazellulär in Glutamin zu konvertieren. Auf diese Weise wird das Gehirn vor toxischen Wirkungen des Glutamats, das eine Übererregung induzieren kann, geschützt. Dies bewerkstelligen die Glutamattransporter GLAST und GLT-1, welche überwiegend in der Plasmamembran von Astrozyten exprimiert werden (109,116,135,138,139).

GLAST und GLT-1 werden in enger räumlicher Nähe zu Ephrin-A3 am synaptischen Spalt von Astrozyten exprimiert (111). Die Interaktion von postsynaptischem EphA4-R auf Neuronen und Ephrin-A3 auf Astrozyten hat einen bidirektionalen Effekt. Einerseits induziert das *forward signaling* des EphA4-R eine Retraktion von *Spines*. Andererseits verringert das *reverse signaling* des Ephrin-A3 die Expression der Glutamattransporter GLAST und GLT-1 und dadurch die Glutamataufnahme durch die Astrozyten (116). EphA4-R oder Ephrin-A3 *Knockout* Mäuse zeigen eine Hochregulation von GLAST und GLT-1 im Gehirn und damit ist eine Verringerung der Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt verbunden. Hieraus resultiert eine Reduktion der Langzeitpotenzierung und eine Beeinträchtigung von Lernprozessen (116,139). In Ephrin-A3 *Knockout* Mäusen wird EphA4-R durch andere Ephrine, z.B. die der Klasse B, phosphoryliert (55).

An Synapsen gesteigerter Aktivität werden EphA4-R-haltige Vesikel an die Synapse transportiert und dadurch die Interaktion von EphA4-R/Ephrin-A3 gesteigert. Hierdurch wird die Aufnahme von Glutamat gehemmt und die Konzentration von Glutamat im synaptischen Spalt erhöht. Im Gegensatz dazu kann an Synapsen gesteigerter Aktivität, aber auch die zytoplasmatische Domäne des EphA4-R mittels einer γ -Sekretase abgespalten werden, was in Folge die Anzahl der *Spines* erhöht (111). Murai *et al.* vermuten in diesem Zusammenhang, dass die abgespalteten Monomere an die angrenzenden Ephrin-A3-Liganden binden und das *reverse signaling* hemmen. Dies wiederum führt zu einer erhöhten Expression der Glutamattransporter und zu einer verstärkten Aufnahme von Glutamat in die Astrozyten. Auf diese Weise wird eine lokale Homöostase der Glutamat-Konzentration erreicht und Plastizität an Synapsen vermittelt (111).

1.8.3 Bedeutung von EphA4-Rezeptoren für die Freisetzung von D-Serin aus Astrozyten

Neuere Arbeiten lassen vermuten, dass neuronale Aktivität, die über NMDA-Rezeptoren vermittelt wird, durch Freisetzung von Neurotransmitter-ähnlichen Substanzen aus Gliazellen moduliert werden kann (140). Die NMDA-Rezeptor-Aktivierung wird durch Glutamat, D-Serin und Adenosintriphosphat (ATP) beeinflusst (141-145).

Im Gehirn wird D-Serin überwiegend von Astrozyten synthetisiert. Diese können mit Hilfe der Serin-Racemase (SR) L-Serin in das aktive D-Serin umwandeln (146,147). D-Serin ist ein Co-Agonist, der an die Strychnin-sensitiven Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors bindet. Astrozyten sezernieren D-Serin nach Glutamat-Rezeptor-Aktivierung über eine Kalzium- und SNARE-Komplex-abhängige Exozytose (147,151), welches nachfolgend die Langzeitpotenzierung an glutamatergen Synapsen beeinflusst (152).

Die Freisetzung von D-Serin aus Astrozyten wird durch Interaktion von Eph-Rezeptoren mit Ephrin-Liganden moduliert (145). Zhuang *et al.* zeigten, dass postsynaptisch exprimiertes Ephrin-B3 durch eine Phosphorylierung astrozytärer EphB3-R oder EphA4-R die D-Serin-Synthese steigert (145). Der Anstieg der D-Serin-Spiegel ist Folge einer verstärkten Interaktion von *Protein interacting with C-kinase 1* (PICK1) und SR. PICK 1 enthält eine PDZ-Domäne, welche sowohl die Proteinkinase-C-alpha (PKC- α), als auch Ephrin-Rezeptoren binden kann. Es wird vermutet, dass die Eph-R/Ephrin-Interaktion die PKC- α Aktivität vermindert, hierdurch die PICK1-SR-Interaktion verstärkt und in der Folge die D-Serin Freisetzung gesteigert wird (145).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch Ephrin-B1 eine Rolle bei der Freisetzung von D-Serin spielt. Dieser Mechanismus erfolgt jedoch EphB3-R/EphA4-R-unabhängig (145,153).

1.8.4 Bedeutung von EphA4-Rezeptoren für die Zellproliferation

Der EphA4-R kann mit Wachstumsfaktor-Rezeptoren der *Fibroblast growth factor* (FGF)-Familie interagieren (58). FGF-Rezeptoren (FGFR) gehören zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen, von denen bislang vier Isoformen bekannt sind. Die FGFR binden 23 unterschiedliche Liganden, die Wachstumsfaktoren FGF-1-23. Hierüber werden Signalkaskaden aktiviert, welche Zellproliferation, Angiogenese, Migration und Differenzierung steuern können. Mutationen der FGFR spielen eine Rolle bei der Entwicklung von Tumoren, wie z.B. von Glioblastomen (154-158). Dabei wird EphA4-R in Astrozyten im Glioblastom gegenüber gesunden Astrozyten verstärkt exprimiert (158). Yokote *et al.* untersuchten die Auswirkung der Überexpression von EphA4-R im Glioblastom auf die Zellproliferation. Sie wiesen nach, dass die erhöhte Expressionsdichte von EphA4-R eine gesteigerte Interaktion mit FGFR vermittelt, die wiederum eine verstärkte Zellproliferation induziert (159).

1.8.5 Ziele der Arbeit

Ephrin-Rezeptoren und ihre Liganden beeinflussen auf vielfältige Art und Weise die Neurotransmission. Ihre Bedeutung für die Pathogenese der HE ist bislang jedoch unklar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es Effekte von Ammoniak, einem Haupttoxin der HE, auf die Expression von Eph-R/Ephrin-Isoformen in kultivierten Rattenastrozyten zu untersuchen. Außerdem sollte untersucht werden, ob die durch Ammoniak-induzierten Expressionsänderungen im Zusammenhang mit der Bildung von Glutamin und/oder reaktiven Stick- und Sauerstoffspezies oder einer Zellschwellung stehen. Des Weiteren sollte geprüft werden, ob inflammatorische Zytokine ebenfalls die mRNA-Expression von Ephrin-Rezeptoren sowie deren Liganden beeinflussen. Mit Hilfe einer durch siRNA vermittelten Herunterregulation des EphA4-Rezeptors sollte geprüft werden, ob die bereits in der Literatur beschriebene Herunterregulation des Glutamattransporters GLAST durch Ammoniak durch den EphA4-Rezeptor vermittelt wird.

Weiterhin sollte an bereits vorhandenen Genarray-Datensätzen überprüft werden, ob Expressionsänderungen von Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden auch in *post mortem* Hirngewebe von Leberzirrhose-Patienten mit und ohne HE beobachtet werden können.

2 Material und Methoden

2.1.Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

Gerät	Firma/ Hersteller, Ort
7500 Realtime-PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Blotting-Kammer	Biorad, München, Deutschland
Brutschrank Hera Cell 150	Heraeus, Hanau, Deutschland
Elektrophorese-Kammer	Biometra, Biorad, Göttingen, München, Deutschland
Kodak Image Station 4000MM	Biostep GmbH, Burkhardtsdorf, Deutschland
Magnetrührer Modell MR2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mikroskop Axiovert 100 (invers)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Fluoscan Ascent FL	Thermo Electron Cooperation, Waltham, USA
Mikrotiterplatten MicroAmp Optical	Applied Biosystems, Foster City, CA
Nanodrop®ND-1000	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
pH-Meter 330	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetboy acu, Pipetboy comfort	IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipetten/Pipettenspitzen: 0,1-10µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spectrophotometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
PVDF Membran	Millipore, Eschborn, Deutschland
Sterilbank Antares	Heraeus, Berlin, Deutschland
Sterilfilter	Millipore, Eschborn, Deutschland
Thermoblock (Thermomixer) 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vakuum-Sicherheits-Absaugssystem HLC	Ditabis, Pforzheim, Deutschland
Vortex VM2	CAT, Staufen, Deutschland
Waage (Analyse) 770	Kern&Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland
Waage 440-47N	Kern&Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland
Wasserbad TW 20	Julabo, Seelbach, Deutschland

Schüttler, Roller SRT1	Stuart Scientific, Staffordshire, UK
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge AHT 35R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Beckmann GS-15-R	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Firma/ Hersteller, Ort
Cellstar® 24 Well Zellkulturplatte	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® T75-Zellkulturflasche	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Costar® Stripetten	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Einmalkanüle 20G-Mandrin	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Eppendorfgefäß (1,5ml und 2ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filtropur S 0,2-Spritzenfilter	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
MatTek-Glasboden-Petrischale 50mm	MatTek Corporation, Ashland, MA, USA
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Objektträger, geschnitten, mattrand, 72x22 mm	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Optical Adhesive Covers (Abdeck-Klebefolie)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Original Perfusor®-Spritze OPS 50ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Parafilm M Labfilm	Pechiney, Chicago, IL, USA
Plastikzellkulturschalen (60mm, 100mm)	BD Biosciences, Durham, NC, USA
QIAshredder	Qiagen, Hilden, Deutschland
Filterpapier	Whatman, Maidstone, UK
Blotting Nitrozellulosemembran	Whatman, Maidstone, UK

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.

Substanz	Firma/ Hersteller, Ort
Acrylamid (30%)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumazetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Apocynin	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA, Linz, Österreich
Beta (β)-Merkaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Glyzerolphosphat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DMEM, GlutaMAX, 1,0 g/l D-Glucose, Pyruvat	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
DMSO Hybri-Max®	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DNA-Längenstandard	Fermentas, St.- Leon-Rot, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EGTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
FCS	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hoechst34580	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Interferon gamma (IFN-γ)	Biosource International, Kalifornien, USA
L-Glutamat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Methionin-Sulfoximin (MSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-NG-Nitroarginin-methylester (L-NAME)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadat (Pervanadat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumpyrophosphat (10xH ₂ O)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (4%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ponceau S solution (0,2%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS Dulbecco mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom, Berlin, Deutschland
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
Precision Plus Proteinstandard	Bio-Rad, München, Deutschland
SDS (98,5%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

siRNA (EphA4-R)	Qiagen, Hilden, Deutschland
TAE Puffer, 50 x	S-Prime, Hamburg, Deutschland
TEMED	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)	Roche, Mannheim, Deutschland
Tunicamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris (Hydroxymethyl-aminomethan)	VWR Chemicals, Leuren, Belgien
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin/EDTA Lösung	Biochrom, Berlin, Deutschland
Tween-20	Serva, Heidelberg, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.1.4 Molekularbiologische Kits

Tabelle 4: Kommerziell erhältliche Kits.

KIT	Firma/ Hersteller, Ort
Bio-Rad Protein Assay Kit	Bio-Rad, Deutschland
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
ECL™ Western-Blotting Detection Kit	Perkin Elmer, Waltham, USA

2.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Primäre-Antikörper.

Antikörper gerichtet gegen:	Wirt	Molekulargewicht des detektierten Proteins in kDa	Hersteller/ Bestellnummer	Verdünnung in Western- Blot Experi- menten
EphA4-Rezeptor (monoklonal)	Maus	120kD	Santa Cruz Biotechnology, sc-135897	1:500 in 5% BSA (gelöst in TBST-Puffer)
GLAST (polyklonal)	Kaninchen	75kD	Tocris Bioscience, # 2064	1:1250 in 5% BSA (gelöst in TBST-Puffer)
GAPDH (monoklonal)	Maus	37kD	Meridian Life Science Inc., #486504M	1:5000 in 5% BSA (gelöst in TBST-Puffer)

Tabelle 6: HRPOD-gekoppelte, sekundäre Antikörper.

Sekundär-antikörper	Wirt	Hersteller	Bestell-Nr.
Anti- <i>mouse</i> (monoklonal)	Goat	Sigma	A4540
<i>Goat anti-rabbit</i> (polyklonal)	Goat Immunoglobulin HPR	Dako	P0448

2.1.6 Oligonukleotide

Primer für die quantitative *Realtime*-PCR wurden von der Firma MWG synthetisiert. Nachfolgend sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primersequenzen aufgelistet:

Tabelle 7: Primersequenzen. F= forward R= reverse

Gen / Genbank Entry Nr.	Basensequenz	Referenz	Produktgröße in bp	T _M in °C
EphA1-R NM_001107858.1	F: TTGCCAACTTTGACCCCTAGG R: CTAAATCCTTGAATACTGCAG	Ivanov 2005 (171)	248	51,85 47,23
EphA2-R NM_001108977.1	F: CCCGAGTGTCCATTCGGCTAC R: TCACTTGGTCTTTGAGTCCCAG	Buchert 1999 (79)	243	57,02 53,96
EphA3-R NM_031564.1	F: GAGTTACGGGATTGTACTCTG R: TGGCAATGGTGTACAGGAGC	Ivanov 2005 (171)	411	52,16 57,30
EphA4-R NM001162411.1	F: AGTTCAGACCGAACACAGCTTG R: GCCATGCATCTGCTGCATCTG	Biervert 2001 (172)	261	65,09 62,60
EphA5-R NM_024367.1	F: TCCACCTCACAGTTACACCC R: GCGATTTTCCCCTTCTTCAC	MWG BLAST	141	53,06 51,38
EphA7-R NM_134331.1	F: CCATAAGCCCTCTTCTGGACCA R: ACACTTGGATGCCGGTTCCGT	Biervert 2001 (172)	267	61,49 64,65
EphB1-R NM_001104528.1	F: AAGCCCCCTACCTCAAAGTTG R: CACCATCCACTCTCCATCTCC	Ivanov 2005 (171)	353	53,95 53,70
EphB2-R NM_001127319.1	F: CACTACTGGACCGCACGATAC R: TCTACCGACTGGATCTGGTTCA	Biervert 2001 (172)	247	54,84 54,31

Gen / Genbank Entry Nr.	Basensequenz	Referenz	Pro- dukt- größe in bp	T _M in °C
EphB3-R NM_001105868.1	F: GTAGGGTCAGGTGGGGATAAG R: GACAGCACCAAGGGTAGGCAG	Ivanov 2005 (171)	217	53,01 57,11
EphB6-R NM_001107857.1	F: GGACAGGCCTTCCCAGGCTCT R: TGGCAGGTCTTCCAGGCTGA	Biervert 2001 (172)	172	65,99 63,33
Ephrin-A1 NM_053599.2	F: ATCCCAAGTTCCGAGAGGAGG R: CTCCTTGCCCAAGGTGAAAGGC	Ivanov 2005 (171)	272	54,99 58,00
Ephrin-A2 NM_001168670.1	F: ATACATGGTGAACGGCGAG R: AGGGAAAAGGGGGTGAAGAG	MWG BLAST	141	51,96 52,93
Ephrin-A3 XM_001072657.2	F: TCGCCTTCTTCCTCATGACG R: CTGAGCACTGCCTTTATAGCC	Ivanov 2005 (171)	293	54,08 53,01
Ephrin-A4 NM_001107692.1	F: GCTCCCAATACTCCGTCTTC R: AAAGCTTCATCATGTCTGCC	MWG BLAST	151	52,04 50,63
Ephrin-A5 NM_053903.1	F: AACGGACCGCTGAAGTTCTCGG R: TTTGTGCCGCGTTCTCTCCGCG	Lai KO 1999 (173)	295	59,17 62,68
Ephrin-B1 NM_017089.2	F: AGGCCTCTGGGCTCTGTGGG R: GCAGGGCCAGGGGGCTATCT	Döbele 2011 (174)	91	65,96 66,14
Ephrin-B2 NM_001107328.2	F: TGGAAGTACTGTTGGGGACT R: TCACATCTTGGTCTGGTCTG	Zhuang 2010 (145)	301	51,91 51,04
Ephrin-B3 NM_001100980.2	F: : GGGACCGGCTAGATCTACTT R: GGCTGTATTCTGGAAGTTG	Zhuang 2010 (145)	201	52,12 50,36
GLAST NM_019225.2	F: GCGGAATAGAGTACAGCCCACATT R: GACAAAGCGTTTAGGCCAGCA	MWG BLAST	125	62,78 61,75
HPRT NM_012583.2	F: TGCTCGAGATGTCATGAAGGA R: CAGAGGGCCACAATGTGATG	MWG BLAST	51	53,02 53,13

Ephrin-Rezeptoren und ihre Liganden wurden in kultivierten Rattenastrozyten mittels quantitativer *Realtime*-PCR (qRT-PCR) nachgewiesen. Wie in Tabellen 8 und 9 zu sehen ist, konnten die Ephrin-Rezeptoren EphA1-A5-R und EphA7-R, EphB1-B3-R und EphB6-R sowie die Ephrine-A1-A5 und Ephrine-B1-B3 auf mRNA-Ebene detektiert werden.

Tabelle 8: Durchschnittliche CT-Werte der hier in der Arbeit verwendeten Primer.

Rezeptor	EphA1-R	EphA2-R	EphA3-R	EphA4-R	EphA5-R	EphA7-R
Ct-Mittelwert	28,602	26,270	25,949	24,401	27,507	28,378
Standardfehler	+/- 1,05	+/- 2,06	+/- 1,58	+/- 1,01	+/- 1,23	+/- 1,35
Anzahl	N=15	n=15	n=15	n=20	n=12	n=17

Rezeptor	EphB1-R	EphB2-R	EphB3-R	EphB6-R
Ct-Mittelwert	24,825	22,112	24,678	26,453
Standardfehler	+/- 1,68	+/- 1,22	+/- 1,05	+/- 0,86
Anzahl	n=14	n=16	n=12	n=11

Tabelle 9: Durchschnittliche CT-Werte der hier in der Arbeit verwendeten Primer.

Ligand	Ephrin-A1	Ephrin-A2	Ephrin-A3	Ephrin-A4	Ephrin-A5
Ct-Mittelwert	26,651	29,608	28,130	23,611	28,527
Standardfehler	+/- 1,23	+/- 0,68	+/- 1,02	+/- 0,85	+/- 0,96
Anzahl	n=4	n=4	n=15	n=6	n=8

Ligand	Ephrin-B1	Ephrin-B2	Ephrin-B3
Ct-Mittelwert	26,651	29,608	28,130
Standardfehler	+/- 1,23	+/- 0,68	+/- 1,02
Anzahl	n=4	n=4	n=15

2.1.7 siRNA

Tabelle 10: Komponenten/Oligonukleotide für siRNA-Versuche

Komponenten/ Konzentration	Katalog-Nummer	Firma/ Hersteller, Ort
Flexi Tube siRNA EphA4-R (Ratte) Rn LOC316539_1 NM_001162411, XM_244186, XR_007714	SI01759443	Qiagen, Hilden, Deutschland
AllStars Negativ Kontrolle siRNA	1027281	Qiagen, Hilden, Deutschland
HiPerFect Transfektions- Reagenz	301705	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.8 Puffer und Lösungen

Tabelle 11: Rezepte für die Herstellung von Puffern und Lösungen.

Puffer/Lösung	Bestandteile/ pH-Wert
5% BSA Lösung (Bovine Serum Albumin)	5g BSA auf 100ml TBS-T Puffer
Elektrophorese-Puffer (pH = 8)	100 mM Tris 100 mM Hepes 3 mM SDS
RL- Puffer	10ml 2M Tris 28ml 5M NaCl 420mg NaF 4400mg Na-Pyrophosphat (x10H ₂ O) 2ml EDTA (0,5M) 2ml EGTA (0,5M) 200mg Na-Vanadat 4,4ml β -Glycerolphosphaht 10ml Triton-X 100
10 x TBS (pH = 7,6)	24,23g Tris 80,06g NaCl ad 1000ml dH ₂ O
1x TBS-T	200ml TBS-T 1800ml AquaDest 2ml Tween
5 x Transferpuffer (pH = 8,3)	28,4 mM Tris 192 mM Glycin
1 x Transferpuffer	200ml 5 x Blotpuffer 100ml Methanol ad 1000 ml dH ₂ O
1M Tris-Puffer	121,14 g/l pH= 6,8
1,5M Tris-Puffer	184,71 g/l pH= 8,8
SDS-Laufpuffer für die Gelelektrophorese	1,75ml 1M Tris (pH=6,8) 1,5ml Glycerin 5ml 10% SDS 0,24g DTT 1,75ml dH ₂ O Spatelspitze Bromphenolblau

Puffer/Lösung	Bestandteile/ pH-Wert
SDS-Polyacrylamid Gel (10%) (40ml Ansatz)	15,9ml H ₂ O 13,3ml Acrylamid (30%) 10ml 1,5M Tris- Puffer (pH = 8,8) 0,4ml 10% SDS 0,4ml 10% Ammoniumpersulfat 0,016ml TEMED
Waschpuffer (PBST/TBST)	0,1% Tween 20 in PBS oder TBS

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation und Kultivierung zerebrokortikaler Astrozyten aus der Ratte

Astrozyten wurden aus dem Gehirn von 0-3 Tage alten Wistar-Ratten präpariert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) GlutaMAX-Medium mit 1,0g/l D-Glukose, welches mit 10% FCS versetzt wurde. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem mit 10%-CO₂ begastem Brutschrank unter Wasserdampfsättigung und konstanter Temperatur von 37°C. Bis zum Erreichen der Konfluenz der Zellen auf 100mm unbeschichteten Plastik-Zellkulturschalen wurde dreimal wöchentlich ein Nährmediumwechsel unter einer Sterilbank durchgeführt. Zur Subkultivierung wurden die Zellen mit 5ml einer Trypsin/EDTA-Lösung für 5min bei 37°C inkubiert und vom Untergrund abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Kulturmedium mit 10% FCS im Verhältnis von 1:2 gemischt und auf neue Zellkulturschalen (100mm oder 60mm Durchmesser) ausplattiert. Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig am Phasenkontrast-Mikroskop kontrolliert.

(Aktenzeichen der Ethikkommission, Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Studiennr. 3576, Organentnahmeprojekt O78/08).

2.2.2 Experimentelle Behandlung kultivierter Rattenastrozyten

Zu Beginn des Versuchs wurde das Nährmedium der 100mm Kulturschalen abgesaugt und mit 5ml (bzw. 3ml bei 60mm Kulturschalen) eines FCS-freien DMEM GlutaMAX-Mediums dreimal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 10ml (bzw. 3ml) FCS-freien Medium versetzt um Effekte vom FCS auf die Astrozyten zu minimieren. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die Astrozyten für die jeweils angegebenen Zeiträume mit IFN- γ (100U/ml), TNF- α (10ng/l), L-Methioninsulfoximin (MSO) (3mmol/l), Apocynin (APO) (300 μ mol/l) oder L-NG-Nitroarginin-Methyl-Ester (L-NAME) (1mmol/l) inkubiert. Ausgewählte Kulturen wurden nachfolgend mit NH₄Cl (5mmol/l) inkubiert oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Während des gesamten Experiments blieb der entsprechende Inhibitor im Zellkulturmedium anwesend.

Eine Zellschwellung wurde experimentell durch Inkubation der Astrozyten mit hypoosmotischem Medium (205mosmol/l) für die jeweils angegebenen Zeiträume herbeigeführt. Zur Herstellung des Mediums wurde normoosmotisches DMEM Zellkulturmedium (ohne FCS, 320mosmol/l) mit NaCl-freiem DMEM verdünnt.

Mit Hilfe von siRNA wurde EphA4-R auf Proteinebene herunterreguliert. Hierfür wurden die Zellen in 60mm Zellkulturschalen zunächst dreimal mit FCS-freiem Zellkulturmedium gewaschen und nachfolgend für 30 Minuten mit FCS-freiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit gegen EphA4-R gerichteter- oder mit Kontroll-siRNA inkubiert.

Die Transfektion der Zellen mit siRNA erfolgte mit dem Transfektionsreagenz HiPerfect, welches aus kationischen und neutralen Lipiden besteht und mit der siRNA einen Komplex bildet. Nach Aufnahme des Komplexes in die Zelle wird die siRNA aus dem Komplex freigesetzt. Zur Herstellung der Transfektionsreagenz-Lösung wurden pro Milliliter Zellkulturmedium 2 μ l HiPerfect mit 23 μ l DMEM GlutaMAX-Medium in einem Reaktionsgefäß vorinkubiert. Zusätzlich wurden 4 μ l siRNA mit 21 μ l DMEM Zellkulturmedium in einem separaten Gefäß zusammenpipettiert. Beide Lösungen wurden vorsichtig für 1min invertiert und dann 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden beide Reaktionsgemische in ein gemeinsames Gefäß überführt und erneut 1min invertiert sowie 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Milliliter Zellkulturmedium wurden 50 μ l Transfektionsreagenz auf die Astrozytenkulturen gegeben.

2.2.3 Genexpressionsanalyse und *Realtime*-PCR

2.2.3.1 RNA-Isolation

Gesamt-RNA wurde aus kultivierten Astrozyten mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) isoliert. In diesem Verfahren werden Mikrosäulen verwendet, welche RNA selektiv an eine Silikagel-Membran binden.

Nachdem die Zellen 100mm Plastik-Zellkulturschalen konfluent bewachsen hatten, wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Mit Hilfe eines Zellschabers und einem Lysispuffer wurden die Zellen aufgeschlossen und homogenisiert. Der Lysispuffer enthielt Guanidium Isothiocyanat und β -Mercaptoethanol zur Inaktivierung ubiquitär exprimierter Ribonukleasen. Durch Zugabe von Ethanol wurde die RNA gefällt und anschließend mittels Silicagel-Membran-haltigen Säulen isoliert. In mehreren Waschschritten mit unterschiedlichen Pufferlösungen wurden Proteine, Salze und andere Bestandteile in der Lyseprobe von der Membran entfernt. Abschließend wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C aufbewahrt. Die genaue Durchführung erfolgte exakt nach den Vorgaben des Herstellers und ist dem RNeasy Mini Kit Handbuch von Qiagen zu entnehmen.

2.2.3.2 Bestimmung von Konzentration und Reinheit der isolierten RNA

Die Konzentration und die Reinheit der RNA wurde mittels NanoDrop[®]-ND-1000 (Fa. NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) spektrofluorimetrisch bestimmt. Die RNA-Konzentration wurde durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm ermittelt. Die Berechnung der Ribonukleinsäurekonzentration erfolgte nach der Formel: ssRNA ($\mu\text{g/ml}$) = $40 \times \text{OD}_{260}$.

Das Absorptionsmaximum von Proteinen im Photometer liegt bei 280nm. Der Quotient aus der RNA- und Protein-Absorption (A_{260}/A_{280}) gibt Auskunft über die Reinheit der Probe. Die RNA-Qualität der verwendeten Proben lag im Bereich von 1,8 bis 2,1.

2.2.3.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

cDNA wurde mit Hilfe des QuantiTect®Reverse Transcription Kit von Qiagen nach Protokoll des Herstellers synthetisiert.

Dabei wurde 1 µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Probenvolumen von 12 µl aufgefüllt. Durch Addition von 2 µl eines gDNA Wipeout-Puffers und anschließender Inkubation für 2 min bei 42° in einem Thermoblock, wurde in der Probe vorhandene DNA eliminiert. Nachfolgend wurde zu den Proben 6 µl Reverse-Transkription-Mastermix, bestehend aus 1 µl Reverse Transkriptase (RT), 4 µl RT-Puffer und 1 µl RT-Primer-Mix (dNTPs) hinzupipettiert und für 15 min bei 42° inkubiert. Die Reverse-Transkriptase wurde durch anschließende Inkubation der Proben für 3 min bei 95° inaktiviert. Die cDNA wurde nachfolgend 1:6 mit Wasser verdünnt und bei -20° aufbewahrt.

2.2.3.4 *Realtime*-PCR

Die *Realtime*-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur Quantifizierung von mRNA verwendet. Das Verfahren ermöglicht die Detektion und Qualifizierung von PCR-Produkten mit Hilfe eines Fluorochroms, dessen Fluoreszenz proportional ist zur gebildeten Menge des PCR-Produkts. Die *Realtime*-PCR wurde mit dem ABI 7500 *Realtime*-PCR Systems durchgeführt und die PCR-Produkte mit dem Fluoreszenz-Farbstoff SYBR *Green* nachgewiesen. Dabei handelt es sich um einen Cyanin-Farbstoff, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Der DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert Licht bei einer Wellenlänge $\lambda_{\text{max}} = 494 \text{ nm}$ und emittiert nach Anregung grünes Licht bei $\lambda_{\text{max}} = 521 \text{ nm}$. Da SYBR *Green* an doppelsträngige Nukleinsäuren bindet, musste ausgeschlossen werden, dass Fluoreszenzsignale durch unspezifisch amplifizierte Produkte oder Primer-Dimere verursacht wurden. Dazu wurde am Ende der PCR eine Schmelzpunkt-Kurven-Analyse durchgeführt, bei welcher das PCR-Produkt bei stetig steigender Temperatur von 40 bis 95°C degradiert wurde. Dabei wurde der Farbstoff aus dem Produkt freigesetzt und das emittierte Fluoreszenz-Signal kontinuierlich gemessen.

Bei geringen Temperaturen ist das Signal am stärksten, da hier die DNA als Doppelstrang vorliegt. Wird hingegen die Schmelztemperatur der DNA erreicht und der Doppelstrang aufgelöst, kommt es zu einem Abfall des Signals. PCR-Produkte

unterschiedlicher Größe besitzen unterschiedliche Schmelztemperaturen. Besteht eine Verunreinigung mit unspezifisch amplifizierten Produkten, treten mehrere Peaks in der Analyse auf (175).

Bei der praktischen Durchführung wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Primer-Paare auf eine Konzentration von 10pmol/ μ l verdünnt. Als endogene Gen-Referenz diente das Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)-Gen. Für jede 25 μ l PCR-Reaktion wurden 2 μ l cDNA (50ng/ μ l), 2,5 μ l Primer-Mix (1,25 μ l von je 10 pM Strang- und Antistrang-Primer), 12,5 μ l 2xSYBR *Green* Master Mix Kit von Applied Biosystems (bestehend aus SYBR-*Green*-1-Farbstoff, AmpliTaq Gold®-DNA-Polymerase, dNTPs mit dUTP, passiver Referenz-1 und optimiertem Puffer) zusammen mit 8 μ l RNase freiem Wasser zusammenpipettiert.

Die in dieser Arbeit durchgeführte PCR erfolgte unter folgenden Versuchsbedingungen: (s. Tabelle 12):

Tabelle 12: PCR- Bedingungen am ABI 7500 Cycler

In der Phase I erfolgt die Aktivierung der Omniscript- und der Sensiscript Reversen Transkriptase. In Phase II werden die Reversen Transcriptasen inaktiviert und die AmpliTaq Gold- DNA Polymerase aktiviert. In Phase III wird der DNA-Doppelstrang denaturiert. Es folgt eine Primer-Hybridisierung an den Einzelstrang und anschließende Verlängerung durch Anlagerung der komplementären DNA-Nukleotide. In Phase IV, dem Dissoziationsstadium, wird eine Schmelzpunkt-Kurven-Analyse durchgeführt.

	Phase 1	Phase 2	Phase 3		Phase 4		
Wdhl.	-	-	40	-	-		
Temp.	50	95	95	60	95	-	-
Dauer	2min	10min	15sec	1min	15sec	60	95

2.2.3.5 Realtime-PCR Versuchsauswertung

Das gemessene Fluoreszenzsignal zeigte in einer Amplifikationsgraphik einen zweiphasigen Kurvenverlauf. In der ersten Phase, der exponentiellen Phase, wurde die DNA-Menge in jedem Zyklus verdoppelt. Dabei nahm das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge der PCR-Produkte zu. In der zweiten Phase, der nicht-exponentiellen Phase, wurden die Komponenten der PCR-Reaktion allmählich aufgebraucht und die PCR-Reaktion verlief ineffektiv und langsamer. Schließlich kam es durch die hohe

Amplifikation zur Hybridisierung der Produktfragmente, welche die PCR hemmten, sodass ein Plateau erreicht wurde (160).

Da bereits zu Beginn der PCR, aufgrund der verwendeten Materialien, eine Hintergrundfluoreszenz existiert, musste festgelegt werden, ab welchem Intensitätsniveau das Signal der amplifizierten Nukleinsäuren gemessen wird. Diesen Schwellenwert nennt man *Cycle of quantification* (Cq)-Wert. Er errechnet sich aus der Standardabweichung der Hintergrundfluoreszenz zwischen den Zyklen 3 und 15, multipliziert mit dem Faktor 10. Der Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal signifikant übersteigt, wird Ct-Wert genannt (cycle threshold) (161).

Um die Varianz der Expressionsergebnisse, die auf Unterschieden in der Probenaufbereitung und RNA-Extraktion beruhen können, zu reduzieren, wurde in dieser Arbeit eine relative Quantifizierung durchgeführt. Hierfür wurde die Expression des Zielgens auf die des *Houskeeping*-Gens HPRT-1 bezogen, welches homogen exprimiert und nicht durch die experimentelle Behandlung reguliert wurde. Die relative Expression des Zielgens in einer experimentell behandelten Probe, wurde mit der Kontrollprobe verglichen. Die genaue Berechnung der relativen Expressionsänderung erfolgte dann nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Hierzu wurde zunächst der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$). Anschließend wurde vom ΔCt -Wert der experimentell behandelten Probe der ΔCt -Wert der entsprechenden Kontrollprobe subtrahiert ($\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct Behandlung} - \Delta\text{Ct Kontrolle}$). Relative Expressionsunterschiede wurden wie nachfolgend errechnet:

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

2.2.3.6 Agilent Microarray Assay

Die *Microarray*-Analysen wurden von der Firma Miltenyi-Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland) durchgeführt (162). Dabei wurde RNA aus humanem *post mortem* Hirngewebe aus Autopsien von vier Kontrollpatienten sowie von vier Leberzirrhose-Patienten mit HE und vier Patienten mit Leberzirrhose ohne HE isoliert und die Qualität der isolierten RNA mittels dem Agilent™ *Bioanalyzer* überprüft. Gene mit einer relativen Expressionsänderung von mindestens dem zweifachen der Expression in der Kontrollgruppe und einem p-Wert < 0,05 ((ANOVA) Tukey Post hoc Test) wurden als statistisch signifikant verändert betrachtet.

2.2.4 Proteinanalyse

2.2.4.1 Proteinisolation

Proteine wurden aus Astrozyten, die auf 60mm oder 100mm Kulturschalen konfluent gewachsen waren, isoliert. Die auf Eis gelagerten Zellkulturschalen wurden dafür mit 300µl eines Lysis-Puffers (RL-Puffer) versetzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zusammensetzung des Puffers bewirkte einen Aufschluss der Zellen und vorhandener zellulärer Komponenten. Durch Protease-inhibitoren im RL-Puffer wurden die Proteine vor Degradation geschützt. Anschließend wurde das Lysat bei 20000g und 4°C zentrifugiert und der Überstand mit den darin befindlichen löslichen Proteinen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Aufbewahrung der Proteinlysate erfolgte bei -20°C.

2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer jeden Probe wurde das Bio-Rad Protein Assay Kit verwendet, welches auf dem Messprinzip von Bradford beruht.

Die Kit-Lösung enthält einen sauren Farbstoff, dessen Absorptionseigenschaft sich durch Reaktion mit Peptidbindungen in Proteinen ändert. Gemessen wurde die Änderung der Absorption in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595nm.

Hierzu wurde zunächst die Kit-Lösung 1:5 mit Bidest verdünnt. Anschließend wurden 995µl der verdünnten Kit-Lösung mit 5µl der Proteinlösung zusammengemischt und im Photometer gemessen. In jeder Probe wurde dreimal individuell der Proteingehalt bestimmt und der Mittelwert gebildet.

2.2.4.3 Western-Blot

Zum Nachweis spezifischer Proteine in Proteinlysaten wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt.

Hierzu wurden die Proteine mittels Gelelektrophorese in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel dem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Dazu wurde eine

Proteinmenge von 50-100µg in einem Volumen-Verhältnis von 1:1 mit einem SDS-haltigen Laufpuffer gemischt und 5min bei 95°C in einem Heizblock denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte anschließend in einer mit Elektrophorese-Puffer gefüllten, vertikalen Gelkammer für zwei Stunden bei 150V. Als Größenstandard wurde der *Precision Plus* Proteinstandard von Bio-Rad aufgetragen.

Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Membran erfolgte nach dem *semidry*-Blotting Verfahren. Dafür wurde das Gel in einer Kammer auf eine Nitrozellulose-Membran gegeben, welche zuvor für 1min in einem Blotting-Puffer (1x) equilibriert wurde. Der Transfer erfolgte unter Verwendung des gleichen Puffers für zwei Stunden bei einer Stromstärke, die sich wie folgt errechnet: Länge x Breite der Membran x 0,8 = mA.

Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden in einem Rollschüttler durchgeführt. Nach einminütigem Waschen der Membran in TBS-T-Puffer wurde die Membran für 15min mit einer 5%-igen BSA-Lösung blockiert um freie Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Anschließend folgte die Inkubation des in TBS-T-Puffer mit 5% BSA gelösten Primärantikörpers über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 15min in TBS-T-Puffer gewaschen und für eine Stunde mit einem Sekundär-Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert und erkennt den bereits gebundenen Erst-Antikörper. Nach erneutem dreimaligem Waschvorgang wurde die Immundetektion durchgeführt.

Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECLTM (*Enhanced chemiluminescence*) *Western Blotting Detection Kit*. Hierzu wurde eine Luminol-Lösung mit einem Oxidationsmittel im Verhältnis von 1:1 gemischt und auf die Membran pipettiert. Luminol ist eine gelb-grüne, chemische Verbindung, die, wenn sie oxidiert wird, bläuliches Licht emittiert. Die an den Antikörper gebundene Meerrettichperoxidase katalysiert dabei diesen Prozess.

2.2.5 Zellproliferationsmessung

Die praktische Durchführung der Zellproliferationsmessungen erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. Ayse Karababa.

Die Proliferation kultivierter Astrozyten wurde durch fluorimetrische Messung des DNA-Gehaltes bestimmt. Für die Messung wurden Zellen mit NH₄Cl (5mmol/48h),

EphA4-R-siRNA (80nmol/l, 48h), Kontroll-siRNA oder Tunicamycin-siRNA (1µg/ml, 16h) behandelt oder blieben unbehandelt. Diese Zellen blieben nachfolgend unbehandelt oder wurden mit FGF (*fibroblast growth factor*) (50ng/ml) für 24 Stunden inkubiert. Die über die gleichen Zeiträume unbehandelten Astrozyten dienten als Kontrolle.

Zu Beginn wurden Astrozyten nach einer fünfminütigen Inkubation mit einer Trypsin/EDTA Lösung vom Zellkulturboden abgelöst und mit einer Dichte von 12500 Zellen pro ml und pro *Well* auf einer 24-*Well*-Platte ausgesät und nach sechs Stunden experimentell behandelt. Am Ende des Experiments wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (4%, 5min) fixiert und die DNA mit Hoechst34580 gefärbt (1:10000, 15min). Nachdem die Färbelösung wieder entfernt wurde, wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Hoechst-34580-Fluoreszenz wurde bei Anregungs-/Emissionswellenlängen von 380nm bzw. 460nm detektiert. Für jede Untersuchungsbedingung wurden jeweils vier Messungen durchgeführt. Die mittlere Fluoreszenzintensität wurde nachfolgend durch Abzug der Hintergrundfluoreszenz nicht-gefärbter Zellen korrigiert. Die relative Proliferation wurde errechnet durch Bildung des Quotienten aus Fluoreszenzintensität in den behandelten und unbehandelten Astrozyten.

2.2.6 Statistische Auswertung

Jedes der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde mit Zellen von mindestens drei verschiedenen, unabhängigen Zellpräparationen durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert und dem dazugehörigen Standardfehler (SEM) angegeben. Ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Ammoniumchlorid-induzierte Expressionsänderungen von Ephrin-Rezeptoren und -Liganden in kultivierten Astrozyten

Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit NH_4Cl (5mmol/l) für 24, 48 oder 72 Stunden inkubiert oder blieben für die gleichen Zeiträume unbehandelt (Kontrolle). Nach Präparation der mRNA und reverser Transkription wurde die Expression von Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden mittels qRT-PCR und spezifischen Primer quantifiziert.

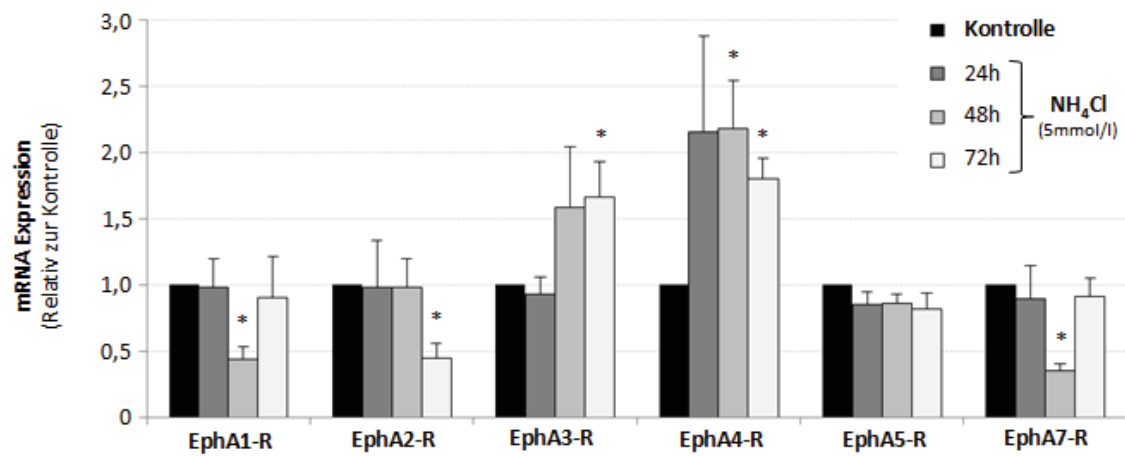
24 Stunden nach NH_4Cl -Exposition sank die mRNA-Expression von Ephrin-B2 auf das 0,6-fache der Kontrolle (s. Abb. 10D).

48 Stunden nach NH_4Cl -Exposition wurde die mRNA-Expression von EphA1-R auf das 0,44-fache, von EphA7-R auf das 0,35-fache, von EphB1-R auf das 0,53-fache, von Ephrin-A1 auf das 0,46-fache, von Ephrin-A4 auf das 0,6-fache, von Ephrin-A5 auf das 0,51-fache, von Ephrin-B1 auf das 0,56-fache und von Ephrin-B3 auf das 0,29-fache der Kontrolle verringert. Demgegenüber stieg die mRNA-Expression von EphA4-R auf das 2,18-fache und von Ephrin-A3 auf das 1,29-fache der Kontrolle an (s. Abb. 10 A-D).

72 Stunden nach NH_4Cl -Exposition wurde die mRNA-Expression von EphA2-R auf das 0,45-fache und von Ephrin-A2 auf das 0,63-fache der Kontrolle verringert. Eine Expressionssteigerung wurde bei EphA3-R auf das 1,66-fache und bei EphB3-R auf das 1,28-fache der Kontrolle beobachtet (s. Abb. 10 A-C).

Keine statistisch signifikanten Expressionsänderungen zeigten EphA5-R sowie EphB2-R über einen Beobachtungszeitraum von 72 Stunden nach Inkubation mit NH_4Cl (5mmol/l) (s. Abb. 10 A, B).

A



B

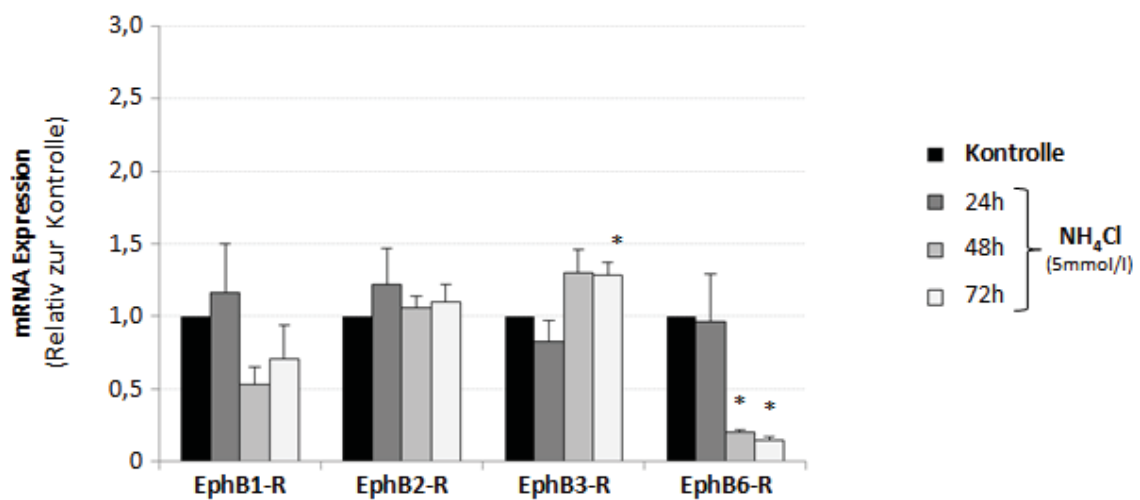
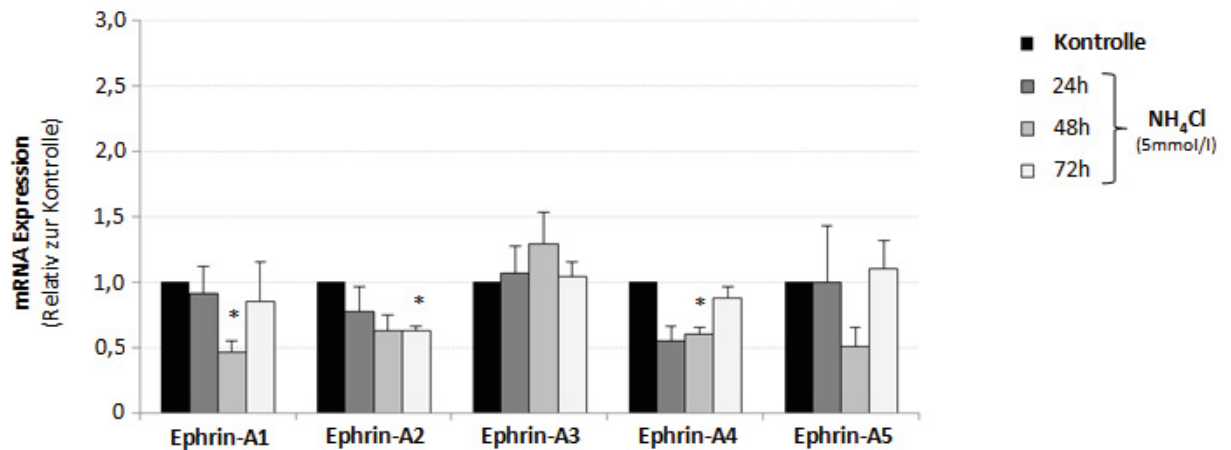


Abb 10A+B: Einfluss von Ammoniumchlorid auf die Expression von Ephrin-Rezeptoren in kultivierten Rattenastrozyten.

Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit NH_4Cl (5mmol/l) für 24, 48 oder 72 Stunden inkubiert und die Ephrin-Rezeptor-mRNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert. *: Statistisch signifikant verändert gegenüber der Kontrolle [nach Sobczyk *et al.* (1)].

C



D

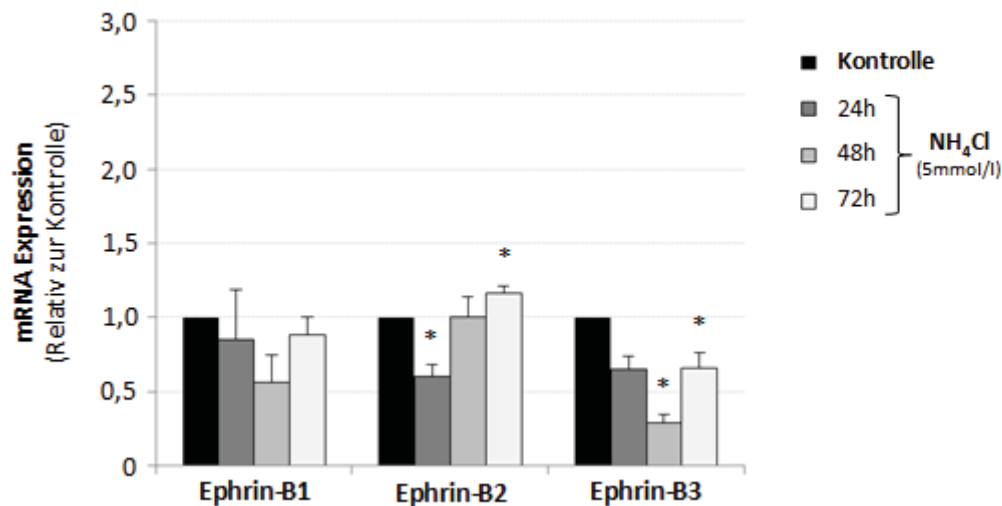


Abb 10C+D: Einfluss von Ammoniumchlorid auf die Expression von Ephrin-Liganden kultivierter Rattenastrozyten.

Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit NH_4Cl (5mmol/l) für 24, 48 oder 72 Stunden inkubiert und die Ephrin-Liganden-mRNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert. *: Statistisch signifikant verändert gegenüber der Kontrolle [nach Sobczyk *et al.* (1)].

3.2 Zeitabhängigkeit der durch NH_4Cl -induzierten mRNA-Expressionssteigerung des EphA4-Rezeptors in kultivierten Astrozyten

Wie in Abb. 10A gezeigt, steigert NH_4Cl (5mmol/l) nach 24, 48 und 72 Stunden die mRNA-Expression des EphA4-Rezeptors. In weiteren Experimenten wurden

Astrozyten für 3, 6 oder 9 Stunden mit NH_4Cl inkubiert, mRNA präpariert und die mRNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert.

Wie in Abb. 11 dargestellt, steigert NH_4Cl (5mmol/l) die EphA4-R-mRNA-Expression nach 3, 6, und 9 Stunden nicht signifikant gegenüber unbehandelten Kontrollen.

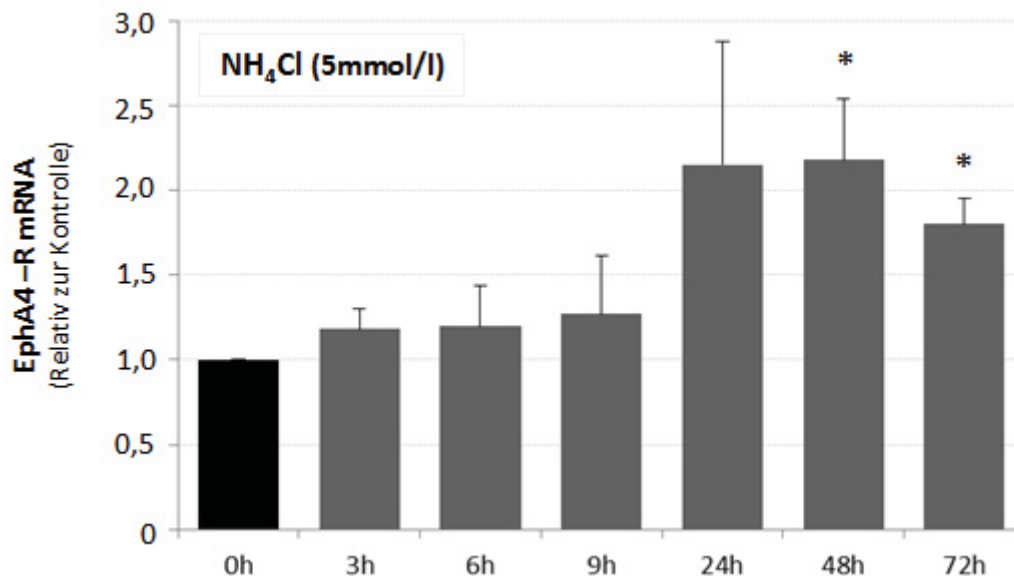


Abb. 11: Einfluss von Ammoniumchlorid auf die mRNA-Expression des EphA4-Rezeptors in kultivierten Astrozyten.

Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit NH_4Cl (5mmol/l) für 3, 6, 9, 24, 48 und 72 Stunden inkubiert und die EphA4-R-mRNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert. *: Statistisch signifikant verändert gegenüber der Kontrolle [nach Sobczyk *et al.* (1)].

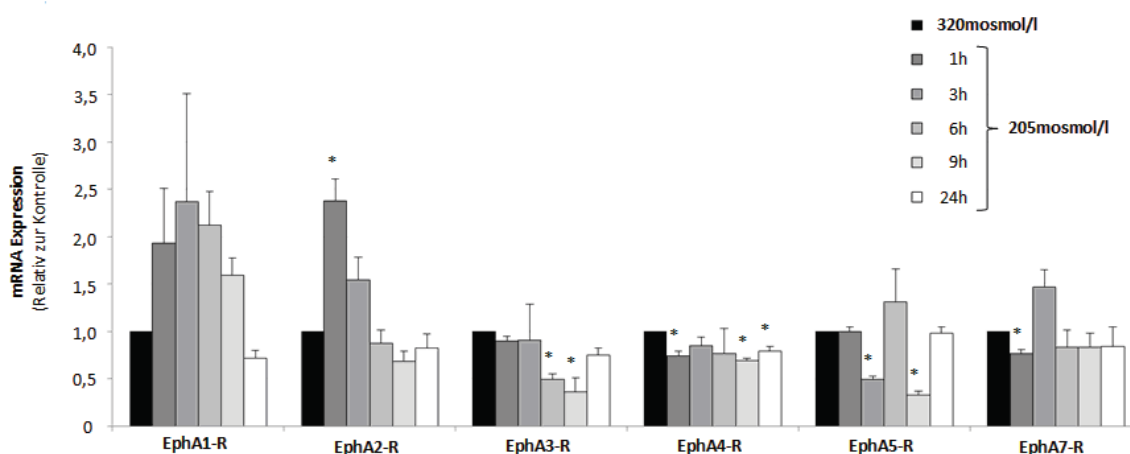
3.3 Einfluss einer experimentell herbeigeführten Zellschwellung auf die mRNA-Expression von Ephrin-Rezeptoren und -Liganden in kultivierten Astrozyten

Der Einfluss einer Zellvolumenzunahme auf die mRNA-Expression von Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden wurde in mit hypoosmotischem (205mosmol/l) Zellkulturmedium für unterschiedliche Zeiträume kultivierter Astrozyten untersucht. Die Kontrollen wurden für den gleichen Zeitraum in normoosmotischem Medium (320mosmol/l) kultiviert. Nachfolgend wurde die Eph-R/Ephrin-mRNA-Expression mittels qRT-PCR bestimmt.

Die Inkubation kultivierter Astrozyten mit hypoosmotischem Medium (205mosmol/l) bewirkte innerhalb eines Beobachtungszeitraums zwischen 1-24 Stunden gegenüber mit isoosmotischem Medium inkubierten Zellen, eine Veränderung des mRNA-

Expressionsniveaus verschiedener Ephrin-Rezeptoren sowie deren Liganden (s. Abb. 12A/B, 13). Drei Stunden nach hypoosmotischer Stimulation war die mRNA-Expression der Ephrin-Rezeptoren EphA1 (2,4-fach), -A2 (1,5-fach), -A7 (1,5-fach), von EphB1 (1,9-fach), -B2 (1,2-fach), -B3 (1,4-fach) sowie der Liganden Ephrin-A1 (1,7-fach), -A2 (1,7-fach), -A3 (1,8-fach), -A5 (1,2-fach), Ephrin-B1 (1,3-fach) und -B3 (1,7-fach) gegenüber normoosmotischen Kontrollen tendentiell gestiegen. Das mRNA-Expressionsniveau der Ephrin-Rezeptoren EphA3 (0,9-fach), -A4 (0,8-fach) und EphB6 (0,8-fach) war tendentiell und das mRNA-Expressionsniveau von EphA5-R (0,5-fach), Ephrin-A4 (0,1-fach) und Ephrin-B2 (0,2-fach) signifikant gegenüber normoosmotischen Kontrollen erniedrigt. Weitere signifikante mRNA-Expressionsänderungen wurden bei EphA2-R (2,4-fach nach einer Stunde), bei EphA3-R (0,5-fach nach sechs- und 0,4-fach nach neun Stunden), bei EphA4-R (0,7-fach nach einer- und nach neun Stunden sowie 0,8-fach nach 24 Stunden), bei EphA5-R (0,3-fach nach neun Stunden), bei EphA7-R (0,7-fach nach einer Stunde), bei EphB1-R (0,9-fach nach neun Stunden), bei EphB2-R (0,7-fach nach einer- und nach 24 Stunden), bei Ephrin-A2 (1,9-fach nach sechs Stunden), bei Ephrin-A4 (0,3-fach nach neun- und 0,6-fach nach 24 Stunden), bei Ephrin-B2 (0,7-fach nach einer Stunde) und bei Ephrin-B3 (0,4-fach nach neun Stunden) gemessen (s. Abb. 12+13).

A



B

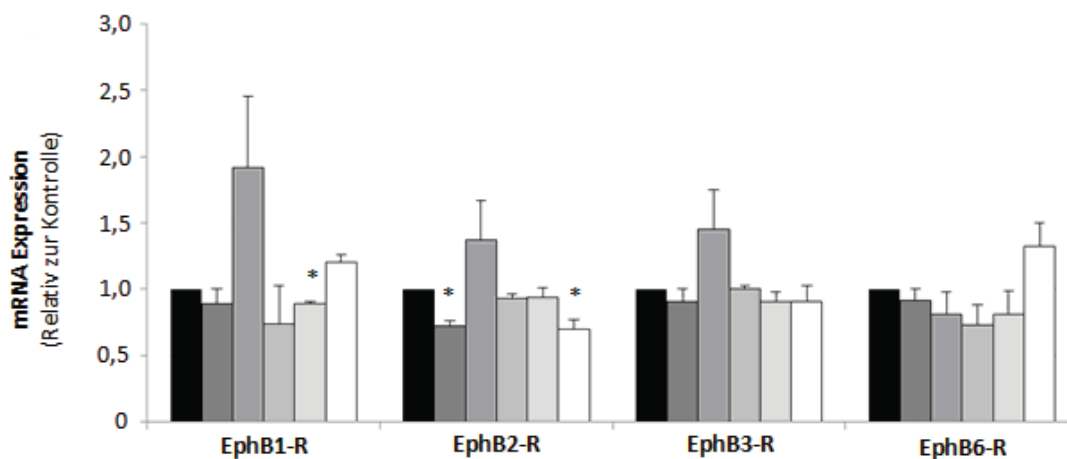


Abb. 12 A+B: Einfluss der Behandlung kultivierter Rattenastrozyten mit hypoosmotischem Zellkulturmedium auf die mRNA-Expression von Ephrin-Rezeptoren.

Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit hypoosmotischem Zellkulturmedium (205mosmol/l) für die angegebenen Zeiträume (1, 3, 6, 9 oder 24 Stunden) inkubiert und die Ephrin-Rezeptor-mRNA-Expression mittels *Realtime*-PCR gemessen. Die mRNA-Level der Ephrin-Rezeptoren sind relativ zu den ausgedrückt, welche in der mit normoosmotischen Medium behandelten Kontrolle gefunden wurden. *: Statistisch signifikant verändert gegenüber der mit normoosmotischem Medium behandelten Kontrolle des entsprechenden Zeitpunktes [nach Sobczyk *et al.* (1)].

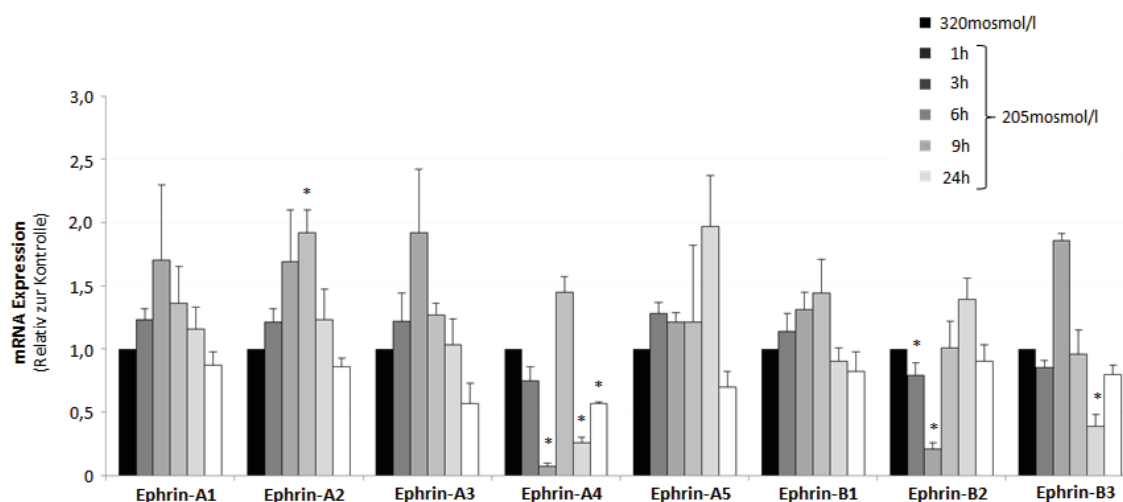


Abb. 13: Einfluss der Behandlung kultivierter Rattenastrozyten mit hypoosmotischem Zellkulturmedium auf die mRNA-Expression von Ephrin-Liganden.

Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit hypoosmotischem Zellkulturmedium (205mosmol/l) für die angegebenen Zeiträume (1, 3, 6, 9 und 24 Stunden) inkubiert und Ephrin-mRNA-Expressionslevel mittels *Realtime*-PCR gemessen. Das mRNA-Expressionsniveau eines jeden Ephrins ist relativ ausgedrückt zur mit normoosmotischem Medium behandelten Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes. *: Statistisch signifikant verändert gegenüber der mit normoosmotischem Medium behandelten Kontrolle des entsprechenden Zeitpunktes [nach Sobczyk *et al.* (1)].

3.4 Effekte von Ammoniumchlorid und einer experimentell herbeigeführten Zellschwellung auf die EphA4-Rezeptor-Proteinexpression in kultivierten Astrozyten

Mittels Western-Blot-Analysen wurden Effekte von NH_4Cl (5mmol/l, 72h) und einer experimentell herbeigeführten Zellschwellung (205 mosmol/l, 72h) auf die EphA4-R-Proteinexpression analysiert.

Wie Abb. 14 zeigt, steigerte NH_4Cl (5mmol/l) in Astrozyten die EphA4-Rezeptor-Expression nach 72h signifikant um das 1,75-fache gegenüber unbehandelten Kontrollen.

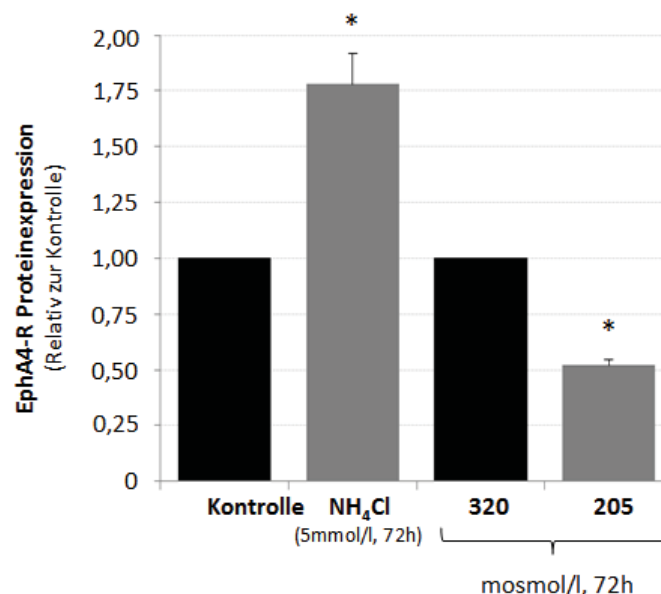


Abb. 14: Densitometrische Analyse der EphA4-Rezeptor-Proteinexpression in mit NH_4Cl oder normo- und hypoosmotischem Zellkulturmedium behandelten Rattenastrozyten.

Astrozyten wurden für 72 Stunden mit NH_4Cl (5mmol/l) sowie normoosmotischem (320 mosmol/l) und hypoosmotischem Medium (250 mosmol/l) kultiviert. Die EphA4-R-Proteinexpression wurde mittels Western-Blot analysiert und die Bandenstärke densitometrisch quantifiziert. *: Statistisch signifikant verändert gegenüber der jeweiligen Kontrolle [nach Sobczyk *et al.* (1)].

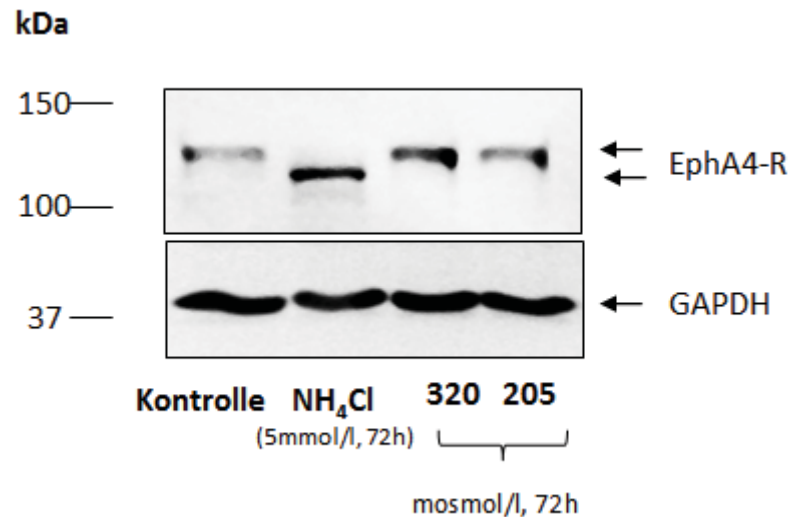


Abb. 15: Einfluss von NH₄Cl sowie von normo- und hypoosmotischem Zellkulturmedium auf die EphA4-Rezeptor-Proteinexpression in kultivierten Rattenastrozyten.

Rattenastrozyten wurden mit NH₄Cl (5mmol/l, 72h), hypoosmotischem Medium (205mosmol/l, 72h) oder normoosmotischem Medium (320 mosmol/l, 72h) inkubiert oder blieben unbehandelt. Die Proteinexpression von EphA4-R wurde mittels Western-Blot detektiert. Als Beladungskontrolle diente GAPDH [nach Sobczyk *et al.* (1)].

In den mit NH₄Cl (5mmol/l), jedoch nicht in den mit hypoosmotischem Medium inkubierten Astrozytenkulturen wurde eine verringerte molekulare Masse des EphA4-R-Proteins gefunden (s. Abb. 15). Eine ähnliche Verringerung des molekularen Gewichts von EphA4-R wurde in Astrozyten gefunden, welche mit dem N-Glykosylierungs-Inhibitor Tunicamycin (1µg/ml, 18h) inkubiert worden waren (s. Abb. 16).

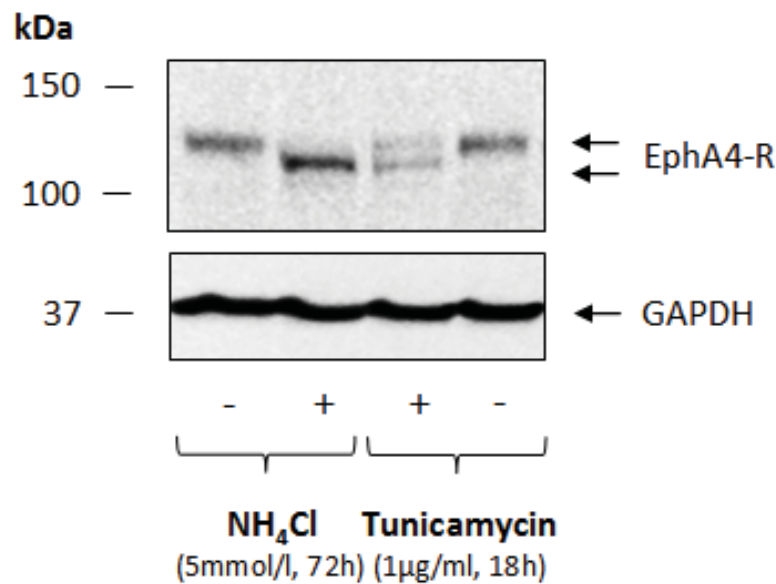


Abb. 16: Einfluss von NH_4Cl und Tunicamycin auf die EphA4-Rezeptor-Proteinexpression in kultivierten Rattenastrozyten.

Rattenastrozytenkulturen wurden mit NH_4Cl (5mmol/l, 72h) oder Tunicamycin (1µg/ml, 18h) inkubiert oder blieben unbehandelt für den jeweiligen Zeitraum. Die Proteinexpression von EphA4-R wurde mittels Western-Blot analysiert. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. [nach Sobczyk *et al.* (1)].

Die Inkubation mit hypoosmotischem Zellkulturmedium verringerte die EphA4-Rezeptor-Proteinexpression auf ca. das 0,6-fache mit normoosmotischem Medium behandelter Astrozyten (s. Abb. 14).

Die Ergebnisse zeigen, dass NH_4Cl aber nicht eine durch hypoosmotisches Medium induzierte Zellschwellung die EphA4-Rezeptor-Proteinexpression erhöht und das NH_4Cl , ähnlich wie Tunicamycin, das Molekulargewicht des EphA4-Rezeptors verringert.

3.5 Effekt von Ammoniumchlorid auf die GLAST-Expression in kultivierten Astrozyten.

Die Wirkung von NH_4Cl auf die mRNA-Expression des glialen Glutamattransports (GLAST) wurde mittels *Realtime*-PCR untersucht.

48 Stunden nach NH_4Cl -Exposition wurde eine ca. 34% verminderte und nach 72 Stunden eine um 47% verringerte GLAST-mRNA-Expression beobachtet (s. Abb. 17).

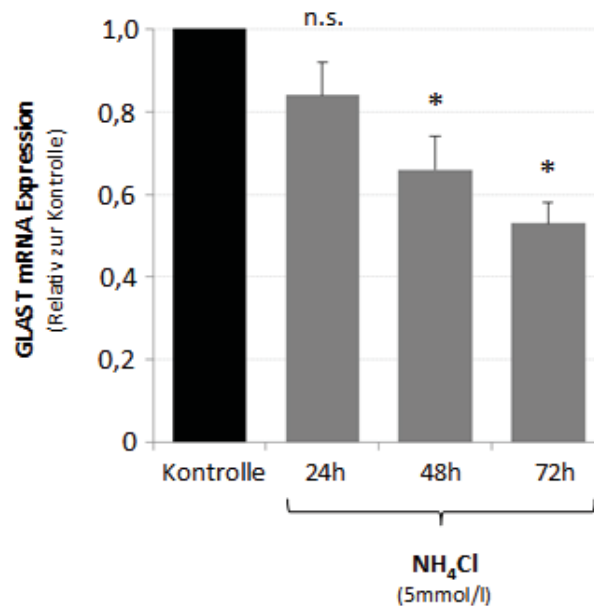


Abb. 17: Effekt von NH₄Cl auf die mRNA-Expression von GLAST in kultivierten Rattenastrozyten.

Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit NH₄Cl (5mmol/l) für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert und die GLAST-mRNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert. *: Statistisch signifikant verändert gegenüber unbehandelten Kontrollen [nach Sobczyk *et al.* (1)].

3.6 Bedeutung von Glutamin und reaktiven Stick- und Sauerstoffspezies für Ammoniumchlorid-induzierte Ephrin-Rezeptor- und -Liganden-Expressionsänderungen in kultivierten Astrozyten

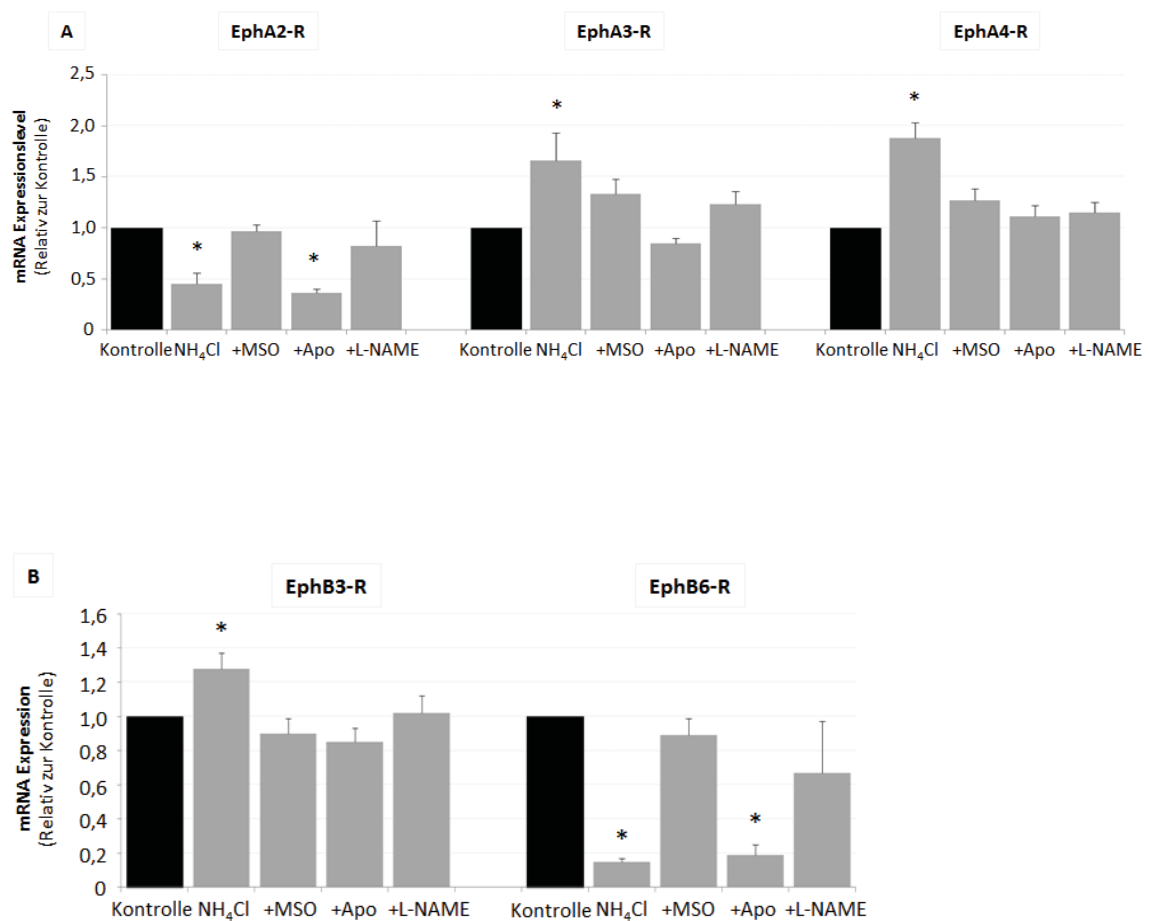
Zur Überprüfung der Bedeutung durch NH₄Cl-vermittelter Bildung von Glutamin und reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies für durch NH₄Cl induzierte (5mmol/l, 72h) Eph-R/Ephrin-mRNA-Expressionsänderungen, wurde der Glutaminsynthetase-Inhibitor Methioninsulfoximin (MSO) (3mmol/l), der NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin (300µmol/l) und der Breitband-Stickstoffmonoxid-Synthase-Inhibitor L-NAME (1mmol/l) verwendet.

Hierzu wurden die Zellen für 30min mit den oben genannten Inhibitoren vorbehandelt und anschließend in Gegenwart des jeweiligen Inhibitors für 72 Stunden mit NH₄Cl (5mmol/l) inkubiert. Die mRNA-Expression der Eph-R und Ephrine erfolgte mittels qRT-PCR.

Wie in Abb. 18 A-C gezeigt, hob MSO durch NH₄Cl induzierte mRNA-Expressionsänderungen von EphA2-R, -A3, -A4, -B3, -B6 sowie Ephrin-A2 und -A3 annähernd

vollständig auf. Weiterhin waren die NH_4Cl -induzierten mRNA-Expressionsänderungen von EphA3-R, -A4-R, -B3-R, aber nicht von EphA2-R, -B6-R, Ephrin-A2 oder -B3 hemmbar durch den NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin. Eine Inhibition von Stickstoffmonoxid-Synthasen durch L-NAME verhinderte die NH_4Cl -induzierte mRNA-Expressionsänderung von EphA2-R, -A3-R, -A4-R, -B3-R und -B6-R, nicht jedoch die NH_4Cl -induzierten Expressionsänderungen von Ephrin-A2 und -B3 (s. Abb. 18 A-C).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Glutaminsynthetase, die NADPH-Oxidase und die Stickstoffmonoxid-Synthase an den durch NH_4Cl vermittelten mRNA-Expressionsänderungen von EphA2-R, -A3, -A4, -B3, -B6 sowie Ephrin-A2 und -A3 beteiligt sind.



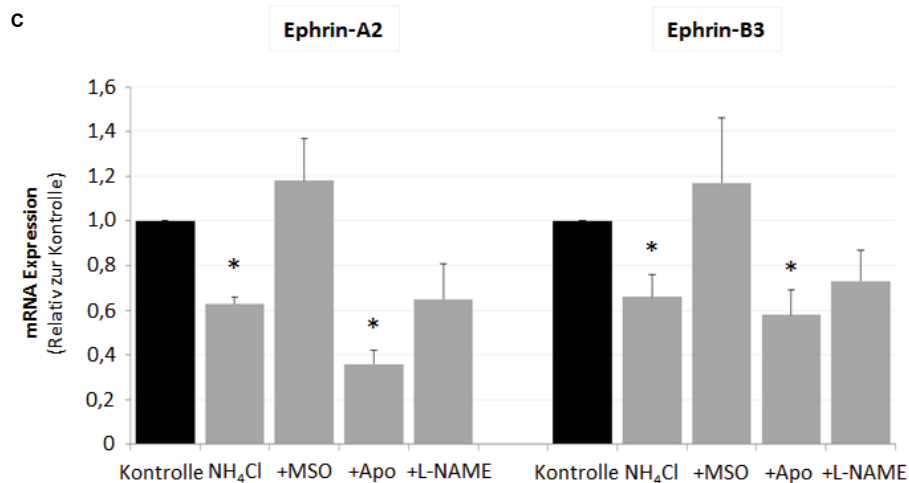


Abb. 18: Bedeutung der Glutamin-Synthetase, der NADPH-Oxidase und der Stickstoffmonoxid-Synthase für durch NH₄Cl vermittelte Eph-R/Ephrin-mRNA- Expressionsänderungen in kultivierten Astrozyten.

A-C: Astrozyten wurden entweder 72 Stunden mit NH₄Cl (5mmol/l) inkubiert oder blieben unbehandelt. Dort wo angegeben, wurden die Zellen mit Methioninsulfoximin (MSO, 3mmol/l), Apocynin (APO, 300µmol/l) oder L-NAME (1mmol/l) für 30min vorbehandelt, bevor NH₄Cl hinzugegeben wurde. Die Kontrollen blieben in Gegenwart des Inhibitors unbehandelt. Die Inhibitoren blieben während des gesamten Experiments im Zellkulturüberstand anwesend. Eph-R/Ephrin-mRNA-Expressionsänderungen wurden mittels *Realtime*-PCR quantifiziert. Die mRNA-Expressionen der mit NH₄Cl behandelten Astrozyten sind relativ zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollen angegeben (unbehandelt oder Inhibitor ohne NH₄Cl). *: Statistisch signifikant verändert gegenüber unbehandelten Kontrollen [nach Sobczyk *et al.* (1)].

3.7 Rolle des EphA4-Rezeptors, der Glutamin-Synthetase, der NADPH-Oxidase und von Stickstoffmonoxid-Synthasen für die durch NH₄Cl vermittelte Expressionserniedrigung des GLAST in kultivierten Astrozyten.

Mittels siRNA wurde die Expression des EphA4-Rezeptors herunterreguliert und die Effizienz des EphA4-Rezeptor-*Knockdowns* mittels Western-Blot überprüft.

Wie in Abb. 19 gezeigt, führt eine Behandlung der Astrozyten mit spezifisch gegen den EphA4-Rezeptor gerichteten siRNA, jedoch nicht mit einer Kontroll-siRNA, zu einer Herunterregulation des EphA4-Proteins und verhindert die Hochregulation von EphA4-R durch NH₄Cl (5mmol/l, 72h) in kultivierten Astrozyten.

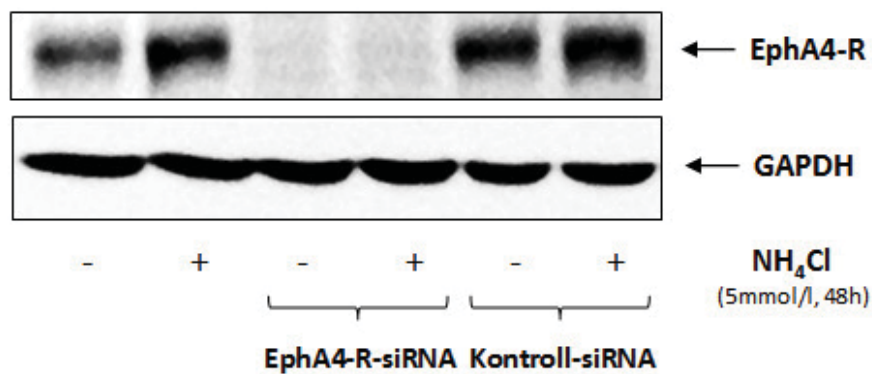


Abb. 19: siRNA-vermittelter *Knockdown* des EphA4-R in unbehandelten und mit NH₄Cl - behandelten Astrozyten.

Astrozyten wurden entweder mit EphA4-Rezeptor-spezifischer-siRNA oder Kontroll-siRNA für 48 Stunden behandelt oder blieben unbehandelt. Nach weiteren 24 Stunden Kultur in siRNA-freiem Medium wurden die Zellen mit NH₄Cl (5mmol/l, 48h) inkubiert oder blieben unbehandelt [nach Sobczyk *et al.*(1)].

Die Inkubation kultivierter Astrozyten mit NH₄Cl (5mmol/l) verminderte die GLAST-mRNA-Expression nach 72 Stunden auf 53% des Kontrollniveaus. NH₄Cl (5mmol/l) steigerte in mit EphA4-siRNA-behandelten Zellen die EphA4-R-mRNA-Expression nicht (s. Abb. 20).

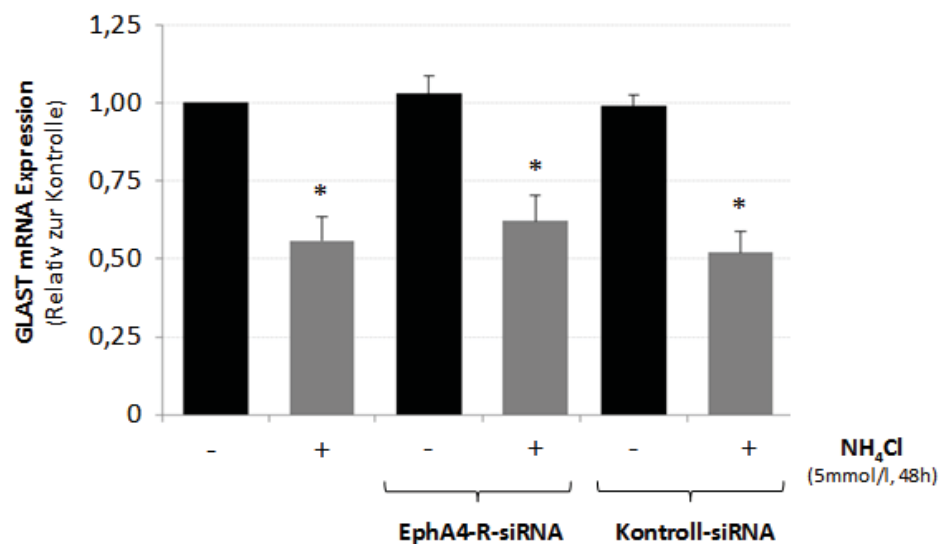


Abb. 20: Effekt von NH₄Cl auf die GLAST-mRNA-Expression nach EphA4-Rezeptor *Knockdown* in kultivierten Astrozyten.

Astrozyten wurden entweder mit EphA4-Rezeptor-spezifischer-siRNA oder Kontroll-siRNA für 48 Stunden inkubiert oder blieben unbehandelt. Nach weiteren 24 Stunden Kultur in siRNA-freiem Medium, wurden die Zellen mit NH₄Cl inkubiert (5mmol/l, 48h) oder blieben unbehandelt. Die GLAST-mRNA-Expression wurde mittels *Realtime*-PCR quantifiziert.

*: Statistisch signifikant verändert gegenüber unbehandelten Kontrollen [nach Sobczyk *et al.*(1)].

Eine Hemmung der Glutamin-Synthetase mittels MSO (3mmol/l) oder der NADPH-Oxidase mittels Apocynin (300µmol/l) verhinderte die NH_4Cl -induzierte (5mmol/l, 48h) Expressionserniedrigung der GLAST-mRNA vollständig. In Gegenwart des Stickstoffmonoxid-Synthase-Inhibitors L-NAME (1mmol/l) verminderte NH_4Cl die GLAST-mRNA Expression zwar tendenziell, aber statistisch nicht signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle (s. Abb. 21).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die durch NH_4Cl vermittelte Herunterregulation der GLAST-mRNA in kultivierten Rattenastrozyten nicht EphA4-Rezeptor-abhängig verläuft, sondern Glutamin-Synthetase- und NADPH-Oxidase-vermittelt erfolgt.

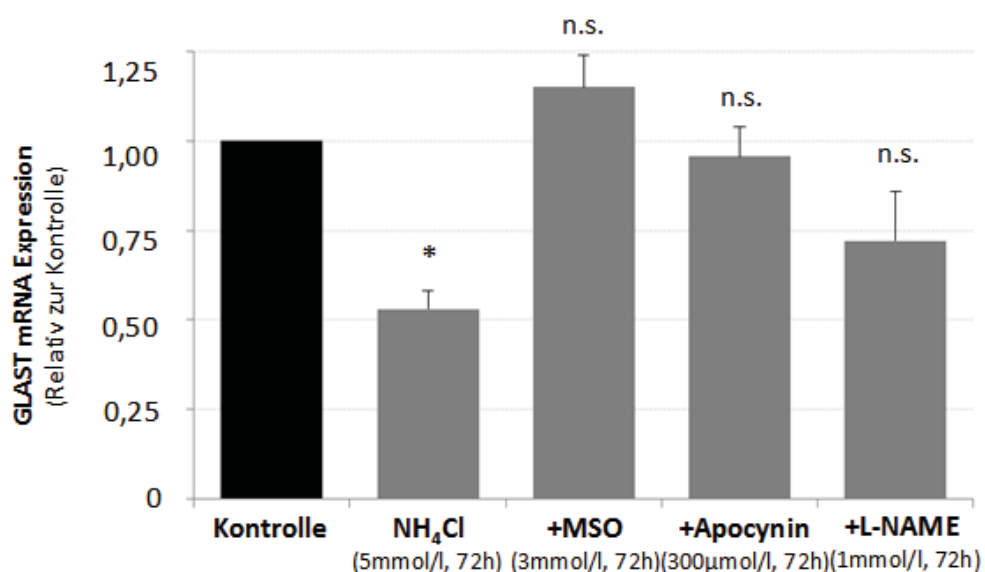


Abb. 21: Effekte von NH_4Cl auf die GLAST-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten.

Kultivierte Astrozyten wurden entweder 72 Stunden mit NH_4Cl (5mmol/l) inkubiert oder blieben unbehandelt. Dort wo indiziert, wurden die Zellen mit Methioninsulfoximin (MSO, 3mmol/l), Apocynin (APO, 300µmol/l) oder L-NAME (1mmol/l) für 30min behandelt und nachfolgend mit NH_4Cl (5mmol/l) inkubiert oder blieben unbehandelt. Die Inhibitoren verblieben während des gesamten Experiments im Zellkulturmedium. Die GLAST-mRNA-Expression wurde mittels *Realtime-PCR* quantifiziert. Die GLAST-mRNA-Expression der mit NH_4Cl (5mmol/l) inkubierten Astrozyten ist relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. *: Statistisch signifikant verändert gegenüber unbehandelten Kontrollen [nach Sobczyk *et al.* (1)].

3.8 Effekte von Ammoniumchlorid auf die FGF-vermittelte und EphA4-R-abhängige Astrozytenproliferation.

Arbeiten von Görg *et al.* (2015) zeigten, dass Ammoniak die Proliferation kultivierter Astrozyten hemmt (s. Abb. 22) (163). In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des EphA4-Rezeptors für die Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF)-abhängige

Astrozytenproliferation in mit EphA4-R-siRNA behandelten Astrozytenkulturen getestet.

Wie in Abb. 23A gezeigt, induziert FGF (50ng/ml, 24h) eine Astrozytenproliferation in mit Kontroll-siRNA-transfizierten Astrozyten. In Astrozytenkulturen, deren EphA4-Rezeptor zuvor durch Transfektion mit für EphA4-R spezifischer siRNA herunterreguliert wurde, war die durch FGF-induzierbare Proliferation nicht nur gehemmt, sondern FGF inhibierte gegenüber der Kontrolle die Proliferation. Gleichmaßen verhinderte die Inkubation der Astrozyten mit NH_4Cl (5mmol/l, 72h) oder mit dem N-Glykosylierungs-Hemmstoff Tunicamycin (1 $\mu\text{g/ml}$, 18h) die durch FGF-induzierbare (50ng/ml, 24h) Astrozytenproliferation (Abb. 23B). Die FGFR-1-Proteinexpression wurde mittels Immunofluoreszenz gemessen und wurde durch Ammoniak in den Astrozytenkulturen nicht beeinflusst (Abb. 24).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der EphA4-Rezeptor eine Rolle in der FGF-induzierten Astrozytenproliferation spielt und dass NH_4Cl (5mmol/l) eine Inhibition der N-Glykosylierung von EphA4-R sowie die durch FGF-induzierbare Astrozytenproliferation blockiert.

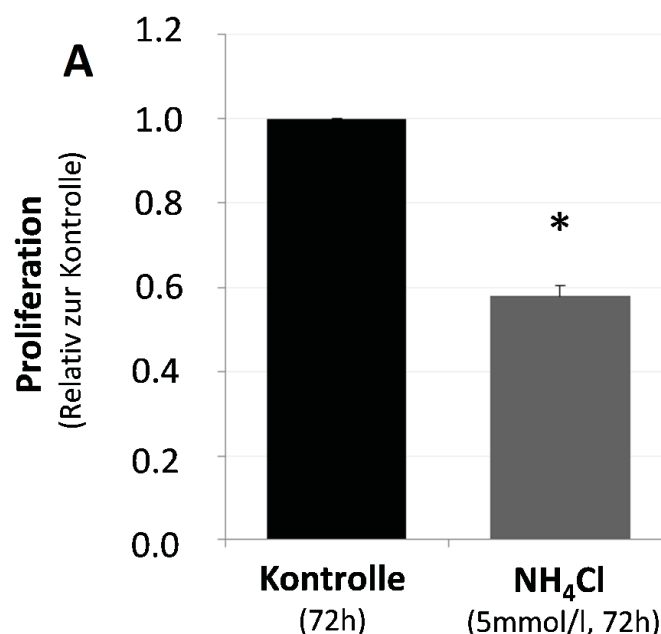


Abb. 22: Wirkung von NH_4Cl (5mmol/l, 72h) auf die Proliferation kultivierter Rattenastrozyten [modifiziert nach (164)]. *: Statistisch signifikant verändert gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

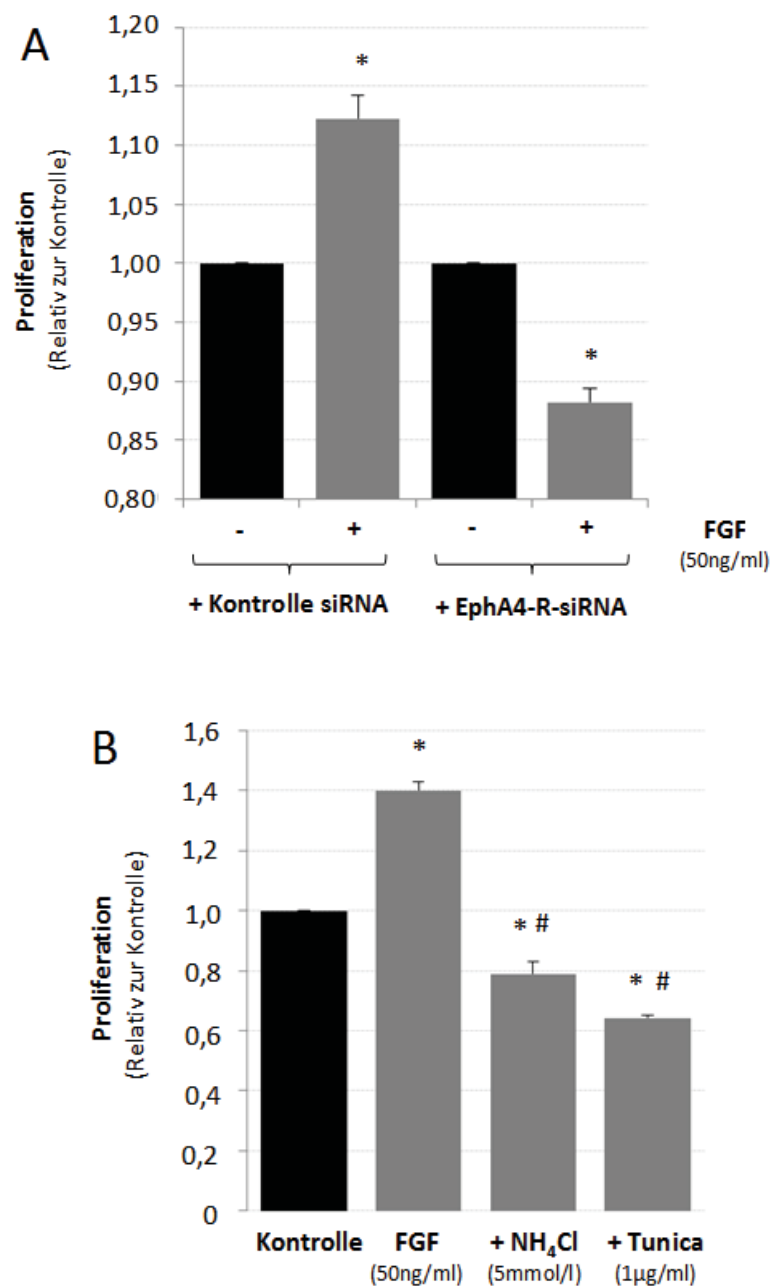


Abb. 23: Effekte eines EphA4-Rezeptor-Knockdowns (A) sowie von NH₄Cl und Tunicamycin auf die Fibroblasten-Wachstumsfaktor-induzierte Astrozytenproliferation (B).

A: Die Proliferation kultivierter Astrozyten wurde durch fluorimetrische Erfassung des DNA-Gehalts der Kultur, wie in „Material und Methoden“ beschrieben, gemessen. Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF, 50ng/ml, 24h)-induzierte Astrozytenproliferation in mit Kontroll-siRNA oder spezifisch gegen den EphA4-Rezeptor gerichteten siRNA behandelter Astrozyten.

B: Effekt von NH₄Cl (5mmol/l, 72h) oder von Tunicamycin (1µg/ml, 18h) auf die FGF (50ng/ml, 24h)-induzierte Astrozytenproliferation. Die Proliferation FGF-behandelter Astrozyten ist relativ zur Kontrolle angegeben (unbehandelte, Ammoniak- oder Tunicamycin-behandelte Astrozyten)

*: Statistisch signifikant verändert gegenüber der jeweiligen Kontrolle.

#: Statistisch signifikant verändert gegenüber FGF-behandelten Astrozyten. [nach Sobczyk *et al.*(1)].

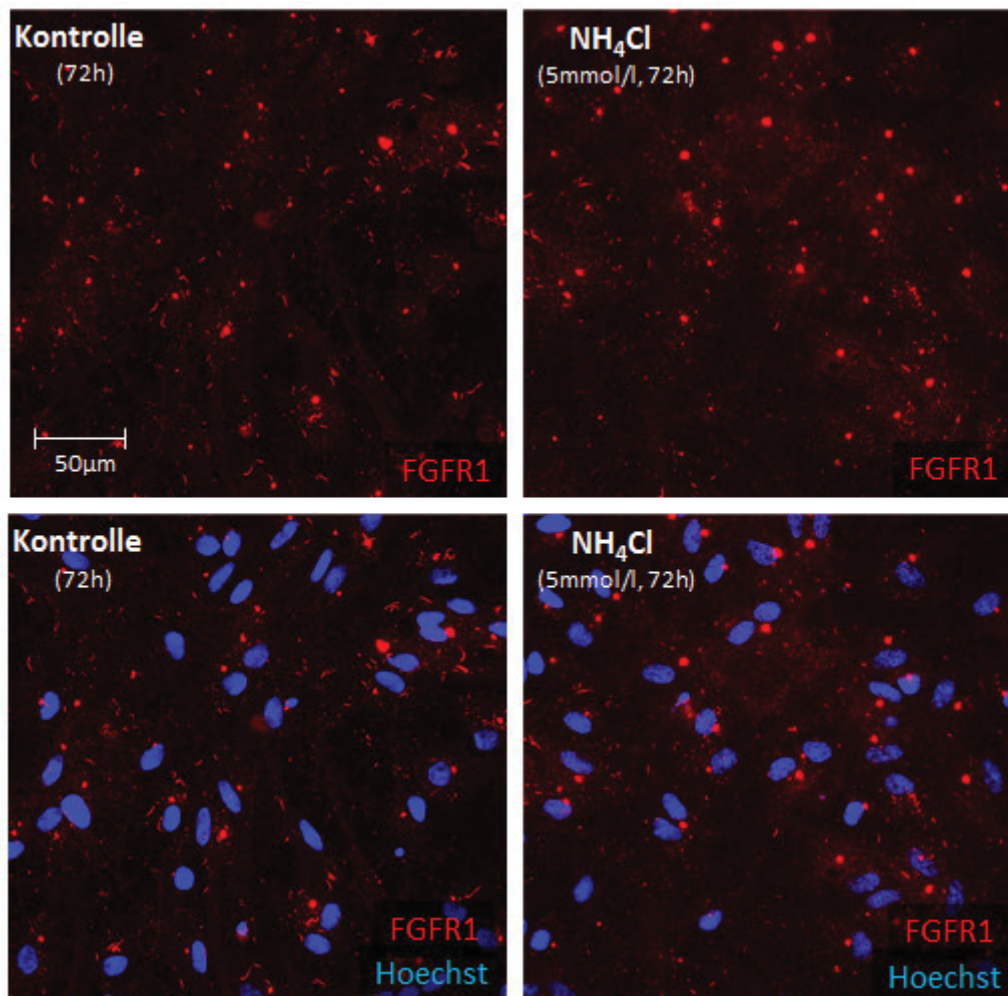


Abb. 24: FGF1-Rezeptor-Expression in kultivierten Astrozyten.

Astrozyten wurden mit NH₄Cl (5mmol/l, 72h) inkubiert oder blieben unbehandelt (Kontrolle) für 72h bevor die Zellen fixiert wurden und der FGF1-Rezeptor mittels Immunfluoreszenz-Analyse detektiert und die Kerne mit Hoechst 34580 angefärbt wurden.

3.9 Eph-R/Ephrin-Expression in *post mortem* Hirnproben von Patienten mit Leberzirrhose mit oder ohne HE

Die Expression von Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden wurde in mRNA-Präparationen aus *post mortem* Hirnbiopsien von vier Kontrollpatienten, von vier Patienten mit Leberzirrhose mit HE und von vier Patienten mit Leberzirrhose ohne HE mittels Microarray-Analysen untersucht.

Wie in Abb. 25 gezeigt, ist die mRNA-Expression des EphA2-Rezeptors und von Ephrin-A4 in Patienten mit Leberzirrhose mit und ohne HE im Vergleich zu Kontrollpatienten konkordant hochreguliert. Die mRNA der Rezeptoren EphA3- und

-B3 sowie der Ephrin-Liganden A3- und -B3 ist in Leberzirrhose-Patienten mit HE herunterreguliert, aber nicht in Patienten mit Leberzirrhose ohne HE. Diese Ergebnisse deuten auf spezifische Genexpressionsänderungen von Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden in Zirrhosepatienten mit und ohne HE hin.

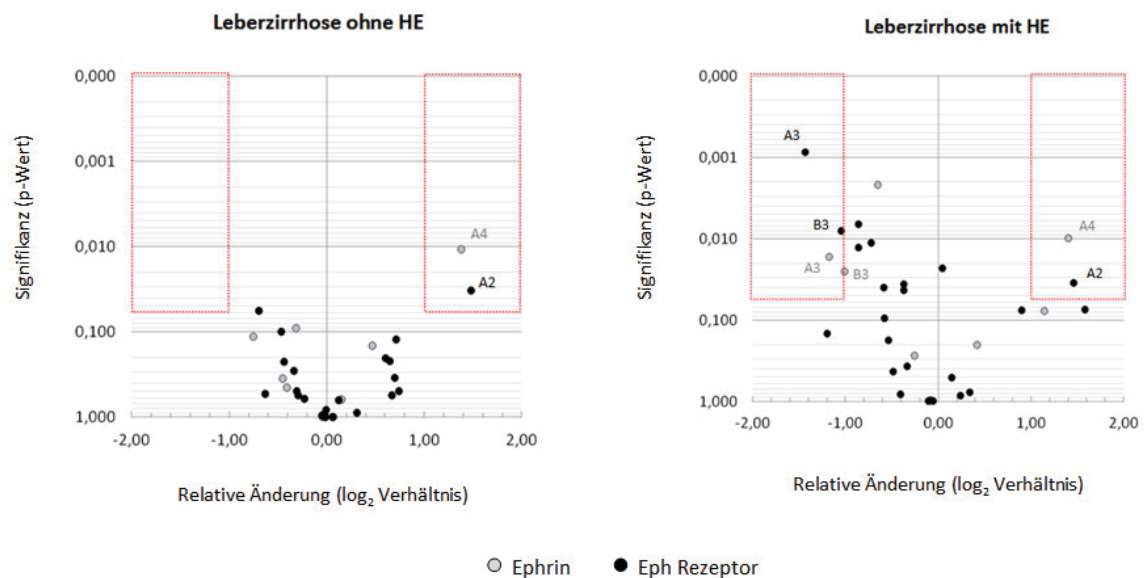


Abb. 25: Genexpressionsänderungen von Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden in *post mortem* Hirngewebe aus dem zerebralen Kortex von Leberzirrhose-Patienten mit und ohne HE.

mRNA wurde aus humanen *post mortem* Hirngewebe-Biopsien von vier Leberzirrhose-Patienten mit HE, von vier Leberzirrhose-Patienten ohne HE und von vier Kontroll-Patienten isoliert. Die Genexpression wurde mittels *Agilent Microarray*, wie in „Material und Methoden“ beschrieben, analysiert. Die Abbildung zeigt im Volcano Plot mRNA-Expressionsanalysen von Eph-R/Ephrin-mRNA in Leberzirrhose-Patienten mit und ohne HE relativ zu Kontroll-Patienten. Eine relative Expressionsänderung von mindestens dem zweifachen und einem p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet (siehe eingerahmte Fläche). Signifikante Eph-R/Ephrin-Expressionsänderungen wurden jeweils mit ihrem zugehörigen Subtyp und ihrer zugehörigen Nummer gekennzeichnet [nach Sobczyk *et al.* (1)].

3.10 Wirkung von Zytokinen auf die mRNA-Expression von Ephrin-Rezeptoren, -Liganden und des GLAST

3.10.1 Effekt von Interferon- γ auf die mRNA-Expression von EphA4-R, Ephrin-A3 und des GLAST

Kultivierte Astrozyten wurden mit Interferon- γ (100U/ml, 24h) inkubiert und die GLAST-mRNA-Expressionsänderungen mittels *Realtime*-PCR quantifiziert.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verringert die Behandlung mit IFN- γ die Expression von EphA4-R um 18%, von Ephrin-A3 um 37% und von GLAST um 17% (s. Abb. 26).

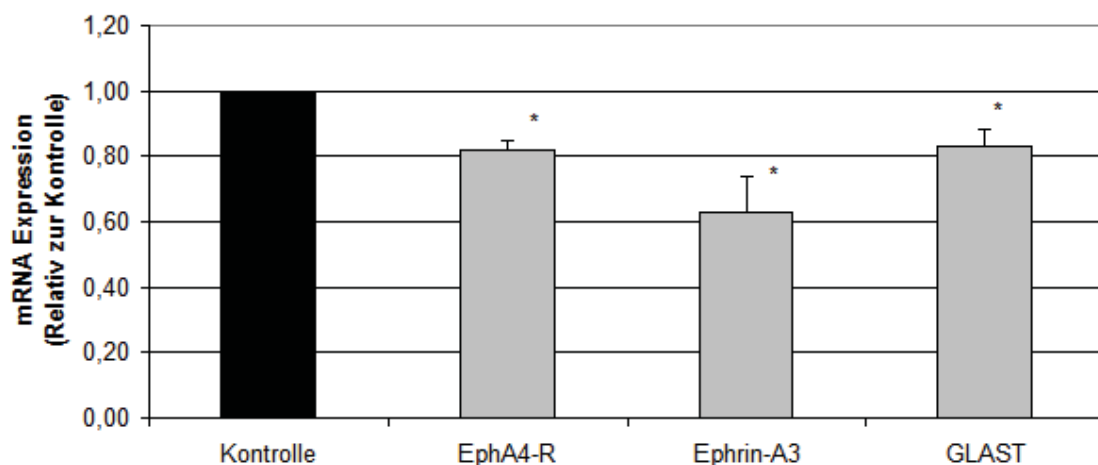


Abb. 26: Effekt von Interferon- γ auf die Expression von Ephrin-Rezeptoren, Ephrin-Liganden und des GLAST in kultivierten Astrozyten.

Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit Interferon- γ (100U/ml, 24h) inkubiert und die mRNA-Expression von EphA4-R/Ephrin-A3- sowie GLAST mittels qRT-PCR analysiert. *: Statistisch signifikant verändert gegenüber der jeweiligen unbehandelten Kontrolle.

3.10.2 Effekt von TNF- α auf die mRNA-Expression von EphA4-R, Ephrin-A3 und des GLAST

Kultivierte Astrozyten wurden mit TNF- α (10ng/ μ l) für 3, 6, 9, 24, 48 oder 72 Stunden inkubiert und die mRNA-Expression von EphA4-R, Ephrin-A3 und GLAST mittels *Realtime*-PCR analysiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass TNF- α sowohl die EphA4-R-/EphrinA3- als auch die GLAST-mRNA-Expression verringert. TNF- α verringerte nach drei Stunden die mRNA-Expression von EphA4-R um 60%, nach sechs Stunden um 53%, nach neun Stunden um 55%, nach 24 Stunden um 30% und nach 48 Stunden um 18%. 72 Stunden nach Inkubation mit TNF- α war die EphA4-R-Expression wieder auf Basalniveau. Die Ephrin-A3-mRNA-Expression wurde nach drei Stunden um 38% verringert, nach sechs Stunden um 35%, nach neun Stunden um 58%, nach 24 Stunden um 62%, nach 48 Stunden um 50% und nach 72 Stunden um 26%. Die GLAST-mRNA-Expression wurde nach drei Stunden um 9%, nach sechs Stunden um 15%, nach neun Stunden um 22%, nach 24 Stunden um 44%, nach 48 Stunden um 55% und nach 72 Stunden um 33% verringert (s. Abb. 27).

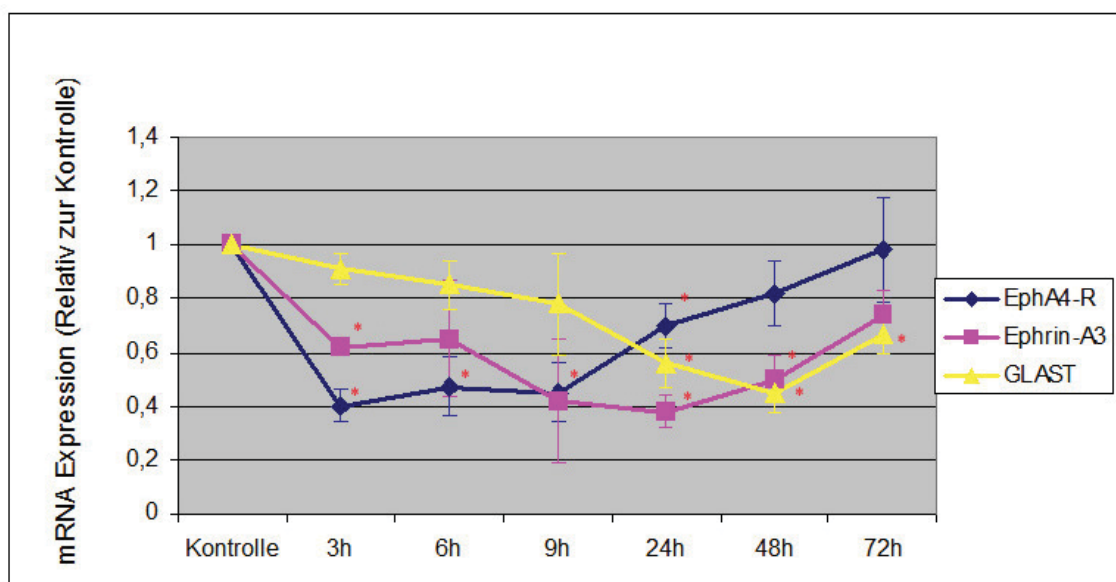


Abb. 27: Einfluss von TNF- α auf die Expression von EphA4-R, Ephrin-A3 und des GLAST in kultivierten Astrozyten.

Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit TNF- α (10ng/ μ l) 3, 6, 9, 24, 48 oder 72 Stunden inkubiert oder blieben unbehandelt für den jeweils angegebenen Zeitraum. Die EphA4-R-/Ephrin-A3- sowie GLAST-mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR analysiert und ist relativ zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle ausgedrückt. *: Statistisch signifikant verändert gegenüber der jeweiligen unbehandelten Kontrolle des jeweiligen Zeitpunkts.

4.0 Diskussion

4.1 Ammoniak induziert Expressionsänderungen von Ephrin-Rezeptoren und -Liganden Glutamin-Synthetase- und RNOS-vermittelt.

Die hepatische Enzephalopathie ist die Manifestation eines geringgradigen zerebralen Ödems, welches mit der zerebralen Bildung von oxidativem und nitrosativem Stress assoziiert ist (4,10,29).

Ob die zerebrale Expression von Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden bei der HE verändert ist, wurde bislang nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen von Ammoniak, einem Haupttoxin der HE, auf die Expression von Ephrin-Rezeptoren und deren Liganden in kultivierten Rattenastrozyten untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass Ammoniak eine Hochregulation des EphA4-Rezeptors, sowohl auf mRNA- (Abb. 10A) als auch auf Proteinebene (Abb. 14) vermittelt. Eine Hochregulation des EphA4-R wurde jedoch nicht nach Induktion einer Zellschwellung durch hypoosmotisches Medium beobachtet (Abb. 12A). Dies spricht gegen eine durch Ammoniak induzierte Astrozytenschwellung als Mechanismus der Expressionssteigerung der EphA4-R-mRNA.

Demgegenüber konnte durch den Glutaminsynthetasehemmstoff Methioninsulfoximin die Ammoniak-induzierte Hochregulation der EphA4-R-mRNA verhindert werden (Abb.18A). Dies spricht dafür, dass Ammoniak über eine gesteigerte Glutaminbildung den EphA4-R auf mRNA-Ebene hochreguliert. Da eine vermehrte Glutaminbildung wiederum reaktive Sauerstoffspezies induziert, ist wahrscheinlich, dass die Transkriptionssteigerung Folge von oxidativem Stress ist.

Weiterhin wurde geprüft inwieweit durch Ammoniak vermittelter oxidativer bzw. nitrosativer Stress eine Expressionssteigerung des EphA4-Rezeptors induziert. Da Ammoniak in Astrozyten die NADPH-Oxidase und die NO-Synthase aktiviert (35,164), wurde untersucht, ob die Expressionssteigerung von EphA4-R durch Inhibitoren der NADPH-Oxidase- und von Stickstoff-Synthase verhindert werden kann.

Tatsächlich hemmen sowohl der NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin, als auch der NO-Synthase-Inhibitor L-NAME die durch Ammoniak induzierte EphA4-Rezeptor-mRNA-Hochregulation nahezu vollständig (Abb. 18A).

Dabei bleibt gegenwärtig unklar, über welchen molekularen Mechanismus reaktive Stickstoff- und Sauerstoff-Spezies (RNOS) die EphA4-Rezeptor-mRNA hochregulieren. Es ist denkbar, dass die Hochregulation der EphA4-R mRNA Folge einer Herunterregulation von EphA4-R mRNA degradierenden microRNA (miRNA)-Spezies ist. MikroRNAs sind kleine, nicht kodierende RNAs, welche die Genexpression hochspezifisch auf post-transkriptioneller Ebene regulieren (165). Chen et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass die miRNA miR-93 in kultivierten Rattenneuronen spezifisch an die drei untranslatierten Regionen der EphA4-R-mRNA bindet und die EphA4-R Expression verhindert (166). Untersuchungen von Oernato et al. zeigten, dass Ammoniak die Expression verschiedener miRNA-Spezies in kultivierten Rattenastrozyten herunterreguliert und dies einhergeht mit einer verstärkten Expression von potentiellen Zielgenen. Ähnlich der hier beschriebenen Ammoniak-vermittelten Expressionssteigerung des EphA4-R wurden die durch Ammoniak-induzierten miRNA-Expressionsänderungen auch durch den Glutaminsynthetasehemmstoff Methionin-sulfoximin (MSO, 3mmol/l) und den NADPH-Oxidase Inhibitor Apocynin (300µmol/l) verhindert. Aufgrund der RNOS-abhängigen Expressionsänderung konnten diese miRNA-Spezies erstmalig der Gruppe der sogenannten „RedoximiRs“ zugeordnet werden (167).

Ob die EphA4-R-mRNA-Expressionserhöhung Folge einer durch Ammoniak vermittelten Herunterregulation von EphA4-R-mRNA degradierenden miRNA-Spezies ist, bleibt gegenwärtig unklar. MiR-93 wurde in den Untersuchungen von Oenarto zum Zeitpunkt 48h nach Ammoniakexposition nicht herunterreguliert gefunden. Dennoch könnte dies zu einem späteren Zeitpunkt der Fall sein und eine verminderte miR-93-Expression damit zur Hochregulation von EphA4-R beitragen. Daneben könnten auch andere durch Ammoniak induzierte miRNA-Expressionsänderungen indirekt eine Hochregulation von EphA4-R vermitteln. Z.B. wäre es denkbar, dass die Expression von Transkriptionsfaktoren positiv moduliert wird, die wiederum die EphA4-R Transkription steigern. Weitere Untersuchungen sind erforderlich um die Bedeutung von miRNA-Expressionsänderungen im Zusammenhang mit durch Ammoniak induzierter EphA4-R-Expressionsänderungen herauszufinden.

Neben EphA4-R wurde auch das mRNA-Expressionsniveau weiterer Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden durch Ammoniak, Glutamin und RNOS beeinflusst (Abb. 10+18). Unter den durch Ammoniak vermittelten Expressionsänderungen von Ephrin-Rezeptoren wurde auch EphB3-R identifiziert, dessen mRNA-Expression signifikant gesteigert wurde (Abb. 10B).

Wie in Arbeiten von Zhuang *et al.* gezeigt wurde, sind EphA4-R und EphB3-R an der vesikulären Freisetzung von D-Serin in Astrozyten beteiligt. D-Serin bindet an eine Untereinheit des NMDA-Rezeptors und erhöht dadurch die Affinität des Rezeptors für Glutamat. Hierdurch kann die Neurotransmission potenziert werden (145).

Ephrin-B3, welches in den mit Ammoniak behandelten Astrozyten herunterreguliert wurde (s. Abb 10D), steigert die EphA3-R/-A4-R-abhängige Glutamin-Freisetzung aus Astrozyten über einen noch unbekannten Mechanismus und es wurde postuliert, dass so der Glutamin-Glutamat-Zyklus zwischen Neuronen und Astrozyten beeinflusst wird (153).

Man kann daher vermuten, dass die genannten Expressionsänderungen von EphA4-R und Ephrin-B3 Ammoniak-behandelter Astrozyten die Neurotransmission prinzipiell beeinflussen könnten.

In den vorliegenden Experimenten wurde nicht untersucht, welche Faktoren den individuellen Zeitkinetiken durch Ammoniak und Hypoosmolarität vermittelten mRNA-Expressionsänderungen von Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden zugrunde liegen. Dabei wurden transiente (z.B. EphA2-R, Abb. 12A), permanente (z.B. EphA4-R, Abb. 12B) und mehrphasische (z.B. EphB2-R, Abb. 12B oder EphA4-R, Abb. 13) Expressionsänderungen beobachtet. Insbesondere beim Ephrin-A4-Ligand wurde eine auffällige Regulation beobachtet: Hier wurde sechs Stunden nach hypoosmotischer Stimulation ein Anstieg der Ephrin-A4-mRNA auf das 1,45-fache gegenüber den normoosmotischen Kontrollen beobachtet. Zuvor (nach 3h) sowie danach (9 und 24h) wurde jedoch eine Herunterregulation beobachtet (s. Abb. 13). Die Ursachen für die beschriebenen kinetischen Verläufe sind gegenwärtig unklar. Es ist jedoch denkbar, dass in die Regulation der entsprechenden mRNAs involvierte Transkriptionsfaktoren einer Gegenregulation unterliegen und hierüber die Transkription temporär reprimiert wird.

4.2 Bedeutung der durch Ammoniak vermittelten EphA4-Rezeptor-Expressionssteigerung für die Expression des Glutamatttransporters GLAST.

Experimente an *Knockout* Mäusen zeigten, dass auf Astrozyten exprimierte Ephrin-A3-Liganden über Interaktion mit EphA4-Rezeptoren auf Neuronen die Expression der Glutamat-/Aspartat-Transporter (GLAST) in Astrozyten herunterregulieren (51). Zhou und Norenberg zeigten außerdem, dass Ammoniak die GLAST-mRNA in kultivierten Rattenastrozyten herunterreguliert (41). Daher wurde in dieser Arbeit in weiteren Untersuchungen mit gegen EphA4-R gerichteter siRNA untersucht, ob die Ammoniak-induzierte Expressionserhöhung des EphA4-Rezeptors eine Expressionserniedrigung der GLAST vermittelt.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein EphA4-R-*Knockdown* weder die GLAST-mRNA-Expression beeinflusst, noch die durch Ammoniak induzierte GLAST-Expressionserniedrigung verhindert (Abb. 20).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die in der Literatur beschriebene Interaktion von EphA4-R und Ephrin-A3 die Expression des GLAST möglicherweise nur auf Proteinebene regulieren. Auch könnte nach *Knockdown* des EphA4-Rezeptors in Astrozyten die Funktion des EphA4-Rezeptors von anderen Eph-R/Ephrinen übernommen werden. In diesem Zusammenhang wurde in einer Arbeit von Carmona *et al.* gezeigt, dass auch eine Aktivierung von EphA2-R durch Ephrin-A3 in hippocampalen Neuronen die Expression des GLAST und GLT-1 verringert und die Glutamataufnahme dadurch senkt (116).

In Experimenten von Puschmann *et al.* wurde nach EphA4-Rezeptor-*Knockout* im Gehirn von Mäusen eine Hochregulation des EphA2-Rezeptors auf Proteinebene beobachtet (137). Derzeit bleibt unklar, ob ein EphA4-Rezeptor-*Knockdown* in Rattenastrozyten die EphA2-R-Expression verändert und ob eine Aktivierung von EphA2-Rezeptoren die GLAST-Expression beeinflusst. In zukünftigen Versuchen könnte daher untersucht werden, ob ein *Knockdown* des EphA2-Rezeptors die GLAST-Expressionserniedrigung in mit Ammoniak behandelten Astrozyten beeinflusst. In kultivierten Astrozyten induziert hingegen Ammoniak eine Herunterregulation der EphA2-R-mRNA (s. Abb. 10A).

Yu *et al.* wiesen im Kortex von Mäusen eine Kollokalisierung von Ephrin-A2 mit GLAST und GLT-1 nach. In weiteren Experimenten mit Ephrin-A2-*Knockout* Mäusen zeigten sie im Vergleich zu den Wildtypen eine verringerte Expression des GLAST-Proteins (168). Reduzierte Ephrin-A2-mRNA-Level wurden ebenfalls in mit Ammoniak behandelten (5mmol/l) Astrozytenkulturen nachgewiesen (Abb. 10C). Eine durch Ephrin-A2 vermittelte Herunterregulation der GLAST-mRNA-Expression in mit Ammoniak behandelten Astrozytenkulturen scheint jedoch unwahrscheinlich, da eine Hemmung der NADPH-Oxidase mit Apocynin eine Herunterregulation der GLAST-mRNA verhinderte (Abb. 21), jedoch nicht die von Ephrin-A2 (Abb. 18). Ob der GLAST auf Protein- oder mRNA-Ebene durch Ephrin-Rezeptor/Ephrin-Liganden-Interaktion in mit Ammoniak behandelten Astrozyten moduliert wird, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Demgegenüber konnte durch Inhibition der Glutamin-Synthetase oder der NADPH-Oxidase, die durch Ammoniak induzierte Herunterregulation von GLAST-mRNA nahezu vollständig verhindert werden (Abb. 21). Dies stimmt nicht nur mit Befunden Anderer überein, die eine Hemmung der durch Ammoniak vermittelten Herunterregulation des GLAST-Proteins in Astrozyten im Rattengehirn gezeigt haben (44), sondern auch mit Befunden, die zeigen, dass Antioxidantien die Inhibition der Glutamataufnahme in mit Ammoniak behandelten Astrozytenkulturen verhindern (27). Die Abnahme der GLAST-mRNA Expression in mit Ammoniak behandelten kultivierten Rattenastrozyten könnte aber auch, wie von Görg *et al.* gezeigt, auf eine Oxidation der GLAST-mRNA zurück zu führen sein. Die Oxidation könnte in diesem Zusammenhang einen Abbau der betroffenen mRNA-Spezies vermitteln und hierüber die GLAST-mRNA-Level vermindern. Dies könnte auch die beobachtete verringerte Proteinexpression des GLAST erklären (167).

4.3 Effekte proinflammatorischer Zytokine auf die Expression von Ephrin-Rezeptoren, -Liganden und des GLAST in Ammoniak-behandelten Astrozyten

Proinflammatorische Zytokine können die Symptomatik der hepatischen Enzephalopathie exazerbieren (2). Daher wurden Effekte von IFN- γ und TNF- α auf die mRNA- Expression von EphA4-R/Ephrin-A3 und von GLAST untersucht.

In den Arbeiten von Goldshmit *et al.* wurde gezeigt, dass IFN- γ , nicht jedoch TNF- α die Phosphorylierung des EphA4-Rezeptors auf Proteinebene steigert und damit das *forward signaling* aktiviert (119).

In vorliegender Arbeit wurden Astrozytenkulturen mit IFN- γ oder TNF- α inkubiert und die mRNA-Expression von EphA4-R, Ephrin-A3 und des GLAST analysiert. Beide Zytokine verringerten die mRNA-Expression von EphA4-R/Ephrin-A3 sowie des GLAST signifikant unter anderem nach 24 Stunden (Abb. 26+27). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass TNF- α die GLAST-mRNA nicht über eine verstärkte Phosphorylierung des EphA4-Rezeptors verringert, da nach Goldshmit TNF- α den EphA4-Rezeptor nicht phosphoryliert. Weiterhin bleibt unklar, inwiefern die Zytokin-induzierte Herunterregulation der EphA4-R/Ephrin-A3-mRNA Einfluss auf die Expressionserniedrigung der GLAST-mRNA hat oder ob diese über einen EphA4-R-unabhängigen Mechanismus erfolgt.

4.4 Ammoniak hemmt die N-Glykosylierung des EphA4-Rezeptors

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmalig, dass die Behandlung kultivierter Astrozyten mit Ammoniak die molekulare Masse von EphA4-R reduziert und dies in ähnlicher Weise nach Inkubation der Astrozyten mit Tunicamycin beobachtet werden konnte (Abb. 16). Die Funktion der N-Glykosylierung des EphA4-Rezeptors ist derzeit nicht vollständig verstanden. In einer Arbeit von Xu *et al.* wurde gezeigt, dass EphA4-R in der extrazellulären Domäne N-glykosyliert wird. Modellierungsexperimente zeigten, dass diese Domäne mit benachbarten EphA4-R-Molekülen interagieren kann und dadurch ein *Clustering* der EphA4-Rezeptoren induziert werden könnte (169). Da die Oligomerisierung von EphA4-R Voraussetzung für eine effiziente Aktivierung ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass Ammoniak die EphA4-Rezeptor-Aktivierung durch Hemmung der Oligomerisierung beeinträchtigen könnte (1,170).

Diese Hypothese wurde durch Messung der durch FGF induzierbaren Proliferation, welche durch EphA4-R/FGFR-1-Komplexe vermittelt wird, indirekt überprüft (158). Die Ergebnisse zeigen, dass ein EphA4-R-*Knockdown* (Abb. 23A) wie auch eine durch Ammoniak oder Tunicamycin herbeigeführte Inhibierung der N-Glykosylierung (Abb. 23B) die FGF-induzierbare Proliferation vollständig hemmt (1).

Die FGFR-1-Proteinexpression wurde dabei durch Ammoniak in den Astrozytenkulturen nicht beeinflusst (Abb. 24). Diese Ergebnisse sprechen für eine durch Ammoniak vermittelte Hemmung der EphA4-Rezeptor-Aktivierung und dies könnte auf einer Störung der N-Glykosylierung des EphA4-R beruhen. Zur Aufklärung der Rolle der N-Glykosylierung für die Aktivierung von EphA4-Rezeptoren sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, da z.B. die Interaktion von FGFR-1 und von EphA4-R durch Ammoniak gehemmt werden könnte. Es kann darüber hinaus auch nicht ausgeschlossen werden, dass Ammoniak weitere Elemente der durch FGFR-1 induzierten Signalkaskade inhibiert.

4.5 HE-spezifische mRNA-Expressionsänderungen von Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden im *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten

Auch in *post mortem* Hirngewebe von Leberzirrhose-Patienten mit und ohne HE wurde die Eph-R/Ephrin-mRNA-Expression überprüft (Abb. 25). Im Vergleich zu Kontroll-Patienten wurde EphA2-R und Ephrin-A4 auf mRNA-Ebene in Leberzirrhose-Patienten ohne HE hochreguliert. Darüber hinaus wurde die mRNA-Expression der Eph-A3/-B3-Rezeptoren und der Ephrin-A3/-B3-Liganden in Leberzirrhose-Patienten mit, aber nicht ohne HE, herunterreguliert (Abb. 25). Diese Ergebnisse zeigen HE-spezifische Expressionsänderungen von Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden im Gehirn von Zirrhosepatienten. Aufgrund der strukturellen Komplexität des Gehirns ist es notwendig regionale Expressionsänderungen von Eph-R/Ephrinen in weiteren Experimenten genauer zu untersuchen. Es bleibt gegenwärtig unklar, ob die beobachteten mRNA-Expressionsänderungen auch auf Proteinebene sichtbar werden.

4.6 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Ammoniak in kultivierten Rattenastrozyten die mRNA-Expression von Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden Glutaminsynthetase-vermittelt und über die Bildung von oxidativ/nitrosativem Stress moduliert. Unklar bleibt dabei über welchen molekularen Mechanismus reaktive Stick- und Sauerstoffspezies (RNOS) die beobachteten mRNA-Expressionsänderungen regulieren. Dies muss in weiteren Experimenten untersucht werden. Darüber hinaus

hemmt Ammoniak die N-Glykosylierung von EphA4-R, was mit einer Störung der EphA4-R-abhängigen und durch FGFR-1 vermittelten Proliferation einhergeht.

Genexpressionsänderungen von Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden wurden auch in *post mortem* Hirnproben von Zirrhosepatienten mit und ohne HE gefunden. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass Expressionsänderungen von Ephrin-Rezeptoren und Ephrin-Liganden für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie bedeutsam sind. Weitere Untersuchungen sind erforderlich zur Abklärung, ob die gefundenen mRNA-Expressionsänderungen auch auf Proteinebene sichtbar werden und ob hierdurch die Funktion von Astrozyten beeinflusst und die Neurotransmission gestört wird.

5.0 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. med. Dieter Häussinger, der Direktor der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Universität Düsseldorf, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, die Arbeit unter seiner Leitung anzufertigen. Weiterhin danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die über den Sonderforschungsbereich SFB 974 „Kommunikation und Systemrelevanz bei Leberschädigung und Regeneration“ (Düsseldorf) bereitgestellte finanzielle Unterstützung.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. oec. troph. Boris Görg für die hervorragende Betreuung und seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Zudem danke ich Markus S. Jördens für die technische Unterstützung bei Western-Blot und *Realtime*-PCR Messungen sowie Dr. rer. nat. Ayse Karababa für die technische Hilfe und Durchführung der Proliferationsmessungen.

Für die Bereitstellung von Proben bedanke ich mich bei Jessica Oenarto und für die technische Unterstützung bei Torsten Janssen und Ursula Kristek.

Besonders danken möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe für die stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Des Weiteren danke ich für die Bereitstellung von Gewebeproben durch das *Australian Brain Donor Programs NSW Tissue Resource Center*, welche von der Universität Sydney unterstützt wird, dem *National and Medical Research Council of Australia*, dem *Schizophrenia Research Institute* und dem *National Institut of Alcohol Abuse and Alcoholism und NSW Department of Health*. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Jan Schäferhordt und Frau Dr. Jutta Kolle von der Firma Miltenyi-Biotech für die technische Durchführung der Array- und der bioinformatischen Analysen.

6.0 Literaturverzeichnis

1. Sobczyk K, Jördens MS, Karababa A, Görg B, Häussinger D. Ephrin/Ephrin receptor expression in ammonia-treated rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. *Neurochem Res.* 2015; Band 40; S.274–283.
2. Häussinger D, Blei A.T. Hepatic Encephalopathy. In: Rodés J. (Ed.), *Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice*. Blackwell Malden: Mass; 2007. S.728–760.
3. Häussinger D, Schliess F. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut.* 2008; Band 57; S.1156–65.
4. Häussinger D. Hepatic encephalopathy. *Acta Gastroenterol Belg.* 2010; Band 73; S.457–64.
5. Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology.* 2002; Band 35; S.716–721.
6. Zhan T, Stremmel W. The diagnosis and treatment of minimal hepatic encephalopathy. *Dtsch Arztebl Int.* 2012; Band 109; S.180–207.
7. Häussinger D, Córdoba J, Kircheis G, Vilstrup V, Fleig W, Jones E A, Schliess F, Blei A.T. Definition and assessment of low-grade hepatic encephalopathy. In: Häussinger D, Kircheis D, Schliess F (Eds.). *Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism*. Springer Verlag Dodrecht; 2006. S.423–432.
8. Häussinger D, Gerok W. Rückwirkungen von Lebererkrankungen auf das Zentralnervensystem: Hepatogene Enzephalopathie. In: Gerok W, Blum E (Eds.). *Hepatology*. 2. Aufl., Urban & Schwarzenberg; 1995. S.845–859.
9. Häussinger D, Lang F, Bauers K, Gerok W. Interactions between glutamine metabolism and cell-volume regulation in perfused rat liver. *Eur J Biochem.* 1990; Band 188; S. 689–695.
10. Häussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, vom Dahl S. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J Hepatol.* 2000; Band 32; S.1035–1038.
11. Ciećko-Michalska I, Szczepanek M, Słowik A, Mach T. Pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Gastroenterol Res Pract.* 2012; Band 2012 Artikel 642108.
12. Lachmann V, Görg B, Bidmon HJ, Keitel V, Häussinger D. Precipitants of hepatic encephalopathy induce rapid astrocyte swelling in an oxidative stress dependent manner. *Arch Biochem Biophys.* 2013; Band 536; S.143–151.
13. Bass NM, Mullen KD, Sanyal A, Poordad F, Neff G, Leevy CB, u. a. Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *N Engl J Med.* 2010; Band 362; S.1071–1081.

14. Norenberg MD. Astrocytic-ammonia interactions in hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis.* 1996; Band 16; S.245–253.
15. Swain M, Butterworth RF, Blei AT. Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology.* 1992; Band 15; S.449–453.
16. Jover R, Rodrigo R, Felipe V, Insausti R, Sáez-Valero J, García-Ayllón MS, u. a. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology.* 2006; Band 43; S.1257–1266.
17. Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science.* 1977; Band 195; S.1356–1358.
18. Cooper AJ, Plum F. Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol Rev.* 1987; Band 67; S.440–519.
19. Watanabe A, Takei N, Higashi T, Shiota T, Nakatsukasa H, Fujiwara M, u. a. Glutamic acid and glutamine levels in serum and cerebrospinal fluid in hepatic encephalopathy. *Biochem Med.* 1984; Band 32; S.225–231.
20. Häussinger D, Laubenberger J, vom Dahl S, Ernst T, Bayer S, Langer M, u. a. Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. *Gastroenterology.* 1994; Band 107; S.1475–1480.
21. Albrecht J, Jones EA. Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J Neurol Sci.* 1999; Band 170; S. 138–146.
22. Lockwood AH, Yap EW, Wong WH. Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991; Band 11; S.337–341.
23. Häussinger D, Sies H. Hepatic encephalopathy: clinical aspects and pathogenetic concept. *Arch Biochem Biophys.* 2013; Band 536; S.97–100.
24. Shawcross D, Jalan R. The pathophysiologic basis of hepatic encephalopathy: central role for ammonia and inflammation. *Cell Mol Life Sci.* 2005; Band 62; S.2295–2304.
25. Butterworth RF, Giguère JF, Michaud J, Lavoie J, Layrargues GP. Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol.* 1987; Band 6; S.1–12.
26. Skowrońska M, Albrecht J. Alterations of blood brain barrier function in hyperammonemia: an overview. *Neurotox Res.* 2012; Band 21; S.236–244.
27. Jayakumar AR, Panickar KS, Murthy CRK, Norenberg MD. Oxidative stress and mitogen-activated protein kinase phosphorylation mediate ammonia-induced cell swelling and glutamate uptake inhibition in cultured astrocytes. *J Neurosci.* 2006; Band 26; S.4774–4784.

28. Staub F, Winkler A, Peters J, Kempfski O, Baethmann A. Mechanisms of glial swelling by arachidonic acid. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*. 1994; Band 60; S.20–33.
29. Schliess F, Görg B, Häussinger D. Pathogenetic interplay between osmotic and oxidative stress: the hepatic encephalopathy paradigm. *Biol Chem*. 2006; Band 387; S.1363–1370.
30. Görg B, Schliess F, Häussinger D. Osmotic and oxidative/nitrosative stress in ammonia toxicity and hepatic encephalopathy. *Arch Biochem Biophys*. 2013; Band 536; S.158–163.
31. Murthy CR, Rama Rao KV, Bai G, Norenberg MD. Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res*. 2001; Band 66; S.282–288.
32. Görg B, Foster N, Reinehr R, Bidmon HJ, Höngen A, Häussinger D, u. a. Benzodiazepine-induced protein tyrosine nitration in rat astrocytes. *Hepatology*. 2003; Band 37; S.334–342.
33. Albrecht J, Norenberg MD. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology*. 2006; Band 44; S.788–794.
34. Oenarto J, Görg B, Moos M, Bidmon H-J, Häussinger D. Expression of organic osmolyte transporters in cultured rat astrocytes and rat and human cerebral cortex. *Arch Biochem Biophys*. 2014; Band 560; S.59–72.
35. Reinehr R, Görg B, Becker S, Qvartskhava N, Bidmon HJ, Selbach O, u. a. Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. *Glia*. 2007; Band 55; S.758–771.
36. Blackburn D, Sargsyan S, Monk PN, Shaw PJ. Astrocyte function and role in motor neuron disease: a future therapeutic target? *Glia*. 2009; Band 57; S.1251–1264.
37. Hertz L, Schousboe A, Boechler N, Mukerji S, Fedoroff S. Kinetic characteristics of the glutamate uptake into normal astrocytes in cultures. *Neurochem Res*. 1978; Band 3; S.1–14.
38. Lang F, Madlung J, Uhlemann AC, Risler T, Gulbins E. Cellular taurine release triggered by stimulation of the Fas(CD95) receptor in Jurkat lymphocytes. *Pflugers Arch*. 1998; Band 436; S.377–383.
39. Tanigami H, Rebel A, Martin LJ, Chen T-Y, Brusilow SW, Traystman RJ, u. a. Effect of glutamine synthetase inhibition on astrocyte swelling and altered astroglial protein expression during hyperammonemia in rats. *Neuroscience*. 2005; Band 131; S.437–449.
40. Blei AT, Olafsson S, Therrien G, Butterworth RF. Ammonia-induced brain edema and intracranial hypertension in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology*. 1994; Band 19; S.1437–1444.
41. Zhou BG, Norenberg MD. Ammonia downregulates GLAST mRNA glutamate transporter in rat astrocyte cultures. *Neurosci Lett*. 1999; Band 276; S.145–148.

42. Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* 1979; Band 161; S.303–310.
43. Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem.* 2006; Band 98; S.641–653.
44. Norenberg MD, Huo Z, Neary JT, Roig-Cantesano A. The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission. *Glia.* 1997; Band 21; S.124–133.
45. Walz W, Klimaszewski A, Paterson IA. Glial swelling in ischemia: a hypothesis. *Dev Neurosci.* 1993; Band 15; S.216–225.
46. Sarantis M, Attwell D. Glutamate uptake in mammalian retinal glia is voltage- and potassium-dependent. *Brain Res.* 1990; Band 516; S.322–325.
47. Volterra A, Trotti D, Racagni G. Glutamate uptake is inhibited by arachidonic acid and oxygen radicals via two distinct and additive mechanisms. *Mol Pharmacol.* 1994; Band 46; S.986–992.
48. Barbour B, Szatkowski M, Ingledew N, Attwell D. Arachidonic acid induces a prolonged inhibition of glutamate uptake into glial cells. *Nature.* 1989; Band 342; S.918–920.
49. Yu AC, Chan PH, Fishman RA. Effects of arachidonic acid on glutamate and gamma-aminobutyric acid uptake in primary cultures of rat cerebral cortical astrocytes and neurons. *J Neurochem.* 1986; Band 47; S.1181–1189.
50. Pogun S, Dawson V, Kuhar MJ. Nitric oxide inhibits 3H-glutamate transport in synaptosomes. *Synapse.* 1994; Band 18; S.21–26.
51. Filosa A, Paixão S, Honsek SD, Carmona MA, Becker L, Feddersen B, u. a. Neuron-glia communication via EphA4/ephrin-A3 modulates LTP through glial glutamate transport. *Nat Neurosci.* 2009; Band 12; S.1285–1292.
52. Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, Nishida J, Takaku F. A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science.* 1987; Band 238; S.1717–1720.
53. Boyd AW, Lackmann M. Signals from Eph and ephrin proteins: a developmental tool kit. *Science's STKE.* 2001; Band 112; S. re20.
54. Klein R. Eph/ephrin signalling during development. *Development.* 2012; Band 139; S.4105–4109.
55. Klein R. Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/ephrin signaling. *Nat Neurosci.* 2009; Band 12; S.15–20.
56. Pasquale EB. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell.* 2008; Band 133; S.38–52.
57. Himanen J-P, Saha N, Nikolov DB. Cell-cell signaling via Eph receptors and ephrins. *Curr Opin Cell Biol.* 2007; Band 19; S.534–542.

58. Arvanitis D, Davy A. Eph/ephrin signaling: networks. *Genes Dev.* 2008; Band 22; S.416–429.
59. Himanen J-P, Nikolov DB. Eph receptors and ephrins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; Band 35; S.130–134.
60. Pitulescu ME, Adams RH. Eph/ephrin molecules--a hub for signaling and endocytosis. *Genes Dev.* 2010; Band 24; S.2480–2492.
61. Flanagan JG, Vanderhaeghen P. The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci.* 1998; Band 21; S.309–345.
62. Zimmer G. Die Rolle von EphrinA5 bei der Aggregation und Migration kortikaler Neurone während der Entwicklung des Telencephalons. Dissertation, Jena 2007.
63. Davy A, Soriano P. Ephrin signaling in vivo: look both ways. *Dev Dyn.* 2005; Band 232; S.1–10.
64. Singla N, Goldgur Y, Xu K, Paavilainen S, Nikolov DB, Himanen JP. Crystal structure of the ligand-binding domain of the promiscuous EphA4 receptor reveals two distinct conformations. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; Band 399; S.555–559.
65. Qin H, Noberini R, Huan X, Shi J, Pasquale EB, Song J. Structural characterization of the EphA4-Ephrin-B2 complex reveals new features enabling Eph-ephrin binding promiscuity. *J Biol Chem.* 2010; Band 285; S.644–654.
66. Aoto J, Ting P, Maghsoodi B, Xu N, Henkemeyer M, Chen L. Postsynaptic ephrinB3 promotes shaft glutamatergic synapse formation. *J Neurosci.* 2007; Band 27, S.7508–7519.
67. Du J, Fu C, Sretavan DW. Eph/ephrin signaling as a potential therapeutic target after central nervous system injury. *Curr Pharm Des.* 2007; Band 13, S.2507–2518.
68. Klein R. Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol.* 2004; Band 16; S.580–589.
69. Kullander K, Klein R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; Band 3; S.475–486.
70. Pasquale EB. Eph-ephrin promiscuity is now crystal clear. *Nat Neurosci.* 2004; Band 7; S. 417–418.
71. Himanen J-P, Chumley MJ, Lackmann M, Li C, Barton WA, Jeffrey PD, u. a. Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat Neurosci.* 2004; Band 7; S.501–509.
72. Bush JO, Soriano P. Eph/ephrin signaling: genetic, phosphoproteomic, and transcriptomic approaches. *Semin Cell Dev Biol.* 2012; Band 23; S.26–34.
73. Davis S, Gale NW, Aldrich TH, Maisonpierre PC, Lhotak V, Pawson T, u. a. Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science.* 1994; Band 266; S.816–819.

74. Pasquale EB. The Eph family of receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1997; Band 9; S.608–615.
75. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000; Band 103; S.211–225.
76. Wimmer-Kleikamp SH, Lackmann M. Eph-modulated cell morphology, adhesion and motility in carcinogenesis. *IUBMB Life.* 2005; Band 57; S.421–431.
77. Labrador JP, Brambilla R, Klein R. The N-terminal globular domain of Eph receptors is sufficient for ligand binding and receptor signaling. *EMBO J.* 1997; Band 16; S.3889–3897.
78. Hock B, Böhme B, Karn T, Yamamoto T, Kaibuchi K, Holtrich U, u. a. PDZ-domain-mediated interaction of the Eph-related receptor tyrosine kinase EphB3 and the ras-binding protein AF6 depends on the kinase activity of the receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; Band 95; S.9779–9784.
79. Buchert M, Schneider S, Meskenaite V, Adams MT, Canaani E, Baechli T, u. a. The junction-associated protein AF-6 interacts and clusters with specific Eph receptor tyrosine kinases at specialized sites of cell-cell contact in the brain. *J Cell Biol.* 1999; Band 144; S.361–371.
80. Qiao F, Bowie JU. The many faces of SAM. *Sci STKE.* 2005; Band 2005; S.re7.
81. Janes PW, Nievergall E, Lackmann M. Concepts and consequences of Eph receptor clustering. *Semin Cell Dev Biol.* 2012; Band 23; S.43–50.
82. Holland SJ, Gale NW, Mbamalu G, Yancopoulos GD, Henkemeyer M, Pawson T. Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature.* 1996; Band 383; S.722–725.
83. Brückner K, Pasquale EB, Klein R. Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science.* 1997; Band 275; S.1640–1643.
84. Cowan CA, Henkemeyer M. The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature.* 2001; Band 413; S.174–179.
85. Torres R, Firestein BL, Dong H, Staudinger J, Olson EN, Huganir RL, u. a. PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron.* 1998; Band 21; S.1453–1463.
86. Egea J, Nissen UV, Dufour A, Sahin M, Greer P, Kullander K, u. a. Regulation of EphA 4 kinase activity is required for a subset of axon guidance decisions suggesting a key role for receptor clustering in Eph function. *Neuron.* 2005; Band 47; S.515–528.
87. Toth J, Cutforth T, Gelinas AD, Bethoney KA, Bard J, Harrison CJ. Crystal structure of an ephrin ectodomain. *Dev Cell.* 2001; Band 1; S.83–92.
88. Kalo MS, Pasquale EB. Multiple in vivo tyrosine phosphorylation sites in EphB receptors. *Biochemistry.* 1999; Band 38; S.14396–14408.

89. Brown DA, Rose JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*. 1992; Band 68; S.533–544.
90. Davy A, Gale NW, Murray EW, Klinghoffer RA, Soriano P, Feuerstein C, u. a. Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes Dev*. 1999; Band 13; S.3125–3135.
91. Varma R, Mayor S. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*. 1998; Band 394; S.798–801.
92. Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell*. 1998; Band 93; S.741–753.
93. Friedrichson T, Kurzchalia TV. Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature*. 1998; Band 394; S.802–805.
94. Brown D. The tyrosine kinase connection: how GPI-anchored proteins activate T cells. *Curr Opin Immunol*. 1993; Band 5; S.349–354.
95. Himanen JP, Rajashankar KR, Lackmann M, Cowan CA, Henkemeyer M, Nikolov DB. Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. *Nature*. 2001; Band 414; S.933–938.
96. Palmer A, Zimmer M, Erdmann KS, Eulenburg V, Porthin A, Heumann R, u. a. EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol Cell*. 2002; Band 9; S.725–737.
97. Pawson T, Bernstein A. Receptor tyrosine kinases: genetic evidence for their role in *Drosophila* and mouse development. *Trends Genet*. 1990; Band 6; S.350–356.
98. van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol*. 1994; Band 10; S.251–337.
99. Lackmann M, Oates AC, Dottori M, Smith FM, Do C, Power M, u. a. Distinct subdomains of the EphA3 receptor mediate ligand binding and receptor dimerization. *J Biol Chem*. 1998; Band 273; S.20228–20237.
100. Carter N, Nakamoto T, Hirai H, Hunter T. EphrinA1-induced cytoskeletal reorganization requires FAK and p130(cas). *Nat Cell Biol*. 2002; Band 4; S.565–573.
101. Dobrzanski P, Hunter K, Jones-Bolin S, Chang H, Robinson C, Pritchard S, u. a. Antiangiogenic and antitumor efficacy of EphA2 receptor antagonist. *Cancer Res*. 2004; Band 64; S.910–919.
102. Yin Y, Yamashita Y, Noda H, Okafuji T, Go MJ, Tanaka H. EphA receptor tyrosine kinases interact with co-expressed ephrin-A ligands in cis. *Neurosci Res*. 2004; Band 48; S.285–296.
103. Janes PW, Saha N, Barton WA, Kolev MV, Wimmer-Kleikamp SH, Nievergall E, u. a. Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell*. 2005; Band 123; S.291–304.

104. Hattori M, Osterfield M, Flanagan JG. Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science*. 2000; Band 289; S.1360–1365.
105. Marston DJ, Dickinson S, Nobes CD. Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. *Nat Cell Biol*. 2003; Band 5; S.879–888.
106. Zimmer M, Palmer A, Köhler J, Klein R. EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat Cell Biol*. 2003; Band 5; S.869–878.
107. Pasquale EB. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; Band 6; S.462–475.
108. Poliakov A, Cotrina M, Wilkinson DG. Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. *Dev Cell*. 2004; Band 7; S.465–480.
109. Murai KK, Nguyen LN, Irie F, Yamaguchi Y, Pasquale EB. Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci*. 2003; Band 6; S.153–160.
110. Murai KK, Pasquale EB. Can Eph receptors stimulate the mind? *Neuron*. 2002; Band 33; S.159–162.
111. Murai KK, Pasquale EB. Eph receptors and ephrins in neuron-astrocyte communication at synapses. *Glia*. 2011; Band 59; S.1567–1578.
112. Grunwald IC, Korte M, Wolfer D, Wilkinson GA, Unsicker K, Lipp HP, u. a. Kinase-independent requirement of EphB2 receptors in hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*. 2001; Band 32; S.1027–1040.
113. Bagnard D. *Axon Growth and Guidance*, Springer-Verlag New York; 2007; Band 621; Seite 43
114. Henkemeyer M, Itkis OS, Ngo M, Hickmott PW, Ethell IM. Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *J Cell Biol*. 2003; Band 163; S.1313–1326.
115. Thompson SM. Ephrins keep dendritic spines in shape. *Nat Neurosci*. 2003; Band 6; S.103–104.
116. Carmona MA, Murai KK, Wang L, Roberts AJ, Pasquale EB. Glial ephrin-A3 regulates hippocampal dendritic spine morphology and glutamate transport. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; Band 106; S.12524–12529.
117. Willson CA, Irizarry-Ramírez M, Gaskins HE, Cruz-Orengo L, Figueroa JD, Whittemore SR, u. a. Upregulation of EphA receptor expression in the injured adult rat spinal cord. *Cell Transplant*. 2002; Band 11; S.229–239.
118. Figueroa JD, Benton RL, Velazquez I, Torrado AI, Ortiz CM, Hernandez CM, u. a. Inhibition of EphA7 up-regulation after spinal cord injury reduces apoptosis and promotes locomotor recovery. *J Neurosci Res*. 2006; Band 84; S.1438–1451.

119. Goldshmit Y, Galea MP, Wise G, Bartlett PF, Turnley AM. Axonal regeneration and lack of astrocytic gliosis in EphA4-deficient mice. *J Neurosci.* 2004; Band 24; S.10064–10073.
120. Goldshmit Y, McLenachan S, Turnley A. Roles of Eph receptors and ephrins in the normal and damaged adult CNS. *Brain Res Rev.* 2006; Band 52; S.327–345.
121. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. IL-1 beta alters the expression of the receptor tyrosine kinase gene r-EphA3 in neonatal rat cardiomyocytes. *Am J Physiol.* 1998; Band 274; S. H331-341.
122. Henderson JT, Georgiou J, Jia Z, Robertson J, Elowe S, Roder JC, u. a. The receptor tyrosine kinase EphB2 regulates NMDA-dependent synaptic function. *Neuron.* 2001; Band 32; S.1041–1056.
123. Armstrong JN, Saganich MJ, Xu N-J, Henkemeyer M, Heinemann SF, Contractor A. B-ephrin reverse signaling is required for NMDA-independent long-term potentiation of mossy fibers in the hippocampus. *J Neurosci.* 2006; Band 26; S.3474–3481.
124. Contractor A, Rogers C, Maron C, Henkemeyer M, Swanson GT, Heinemann SF. Trans-synaptic Eph receptor-ephrin signaling in hippocampal mossy fiber LTP. *Science.* 2002; Band 296; S.1864–1869.
125. Grunwald IC, Korte M, Adelmann G, Plueck A, Kullander K, Adams RH, u. a. Hippocampal plasticity requires postsynaptic ephrinBs. *Nat Neurosci.* 2004; Band 7; S.33–40.
126. Irie F, Yamaguchi Y. EPHB receptor signaling in dendritic spine development. *Front Biosci.* 2004; Band 9; S.1365–1373.
127. Tremblay M-E, Riad M, Bouvier D, Murai KK, Pasquale EB, Descarries L, u. a. Localization of EphA4 in axon terminals and dendritic spines of adult rat hippocampus. *J Comp Neurol.* 2007; Band 501; S.691–702.
128. Bouvier D, Corera AT, Tremblay M-E, Riad M, Chagnon M, Murai KK, u. a. Pre-synaptic and post-synaptic localization of EphA4 and EphB2 in adult mouse forebrain. *J Neurochem.* 2008; Band 106; S.682–695.
129. Bouvier D, Tremblay M-E, Riad M, Corera AT, Gingras D, Horn KE, u. a. EphA4 is localized in clathrin-coated and synaptic vesicles in adult mouse brain. *J Neurochem.* 2010; Band 113; S.153–165.
130. Fu AKY, Hung K-W, Fu W-Y, Shen C, Chen Y, Xia J, u. a. APC(Cdh1) mediates EphA4-dependent downregulation of AMPA receptors in homeostatic plasticity. *Nat Neurosci.* 2011; Band 14S. 181–189.
131. Furne C, Ricard J, Cabrera JR, Pays L, Bethea JR, Mehlen P, u. a. EphrinB3 is an anti-apoptotic ligand that inhibits the dependence receptor functions of EphA4 receptors during adult neurogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2009; Band 1793; S.231–238.

132. Ricard J, Salinas J, Garcia L, Liebl DJ. EphrinB3 regulates cell proliferation and survival in adult neurogenesis. *Mol Cell Neurosci.* 2006; Band 31; S.713–722.
133. Wahl S, Barth H, Ciossek T, Aktories K, Mueller BK. Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *J Cell Biol.* 2000; Band 149; S.263–270.
134. Goldshmit Y, Spanevello MD, Tajouri S, Li L, Rogers F, Pearse M, u. a. EphA4 blockers promote axonal regeneration and functional recovery following spinal cord injury in mice. *PLoS ONE.* 2011; Band 6; S.e24636.
135. Ohta K, Iwamasa H, Drescher U, Terasaki H, Tanaka H. The inhibitory effect on neurite outgrowth of motoneurons exerted by the ligands ELF-1 and RAGS. *Mech Dev.* 1997; Band 64; S.127–135.
136. Stein E, Lane AA, Cerretti DP, Schoecklmann HO, Schroff AD, Van Etten RL, u. a. Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses. *Genes Dev.* 1998; Band 12; S.667–678.
137. Puschmann TB, Turnley AM. Eph receptor tyrosine kinases regulate astrocyte cytoskeletal rearrangement and focal adhesion formation. *J Neurochem.* 2010; Band 113; S.881–894.
138. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 2001; Band 65; S.1–105.
139. Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J. Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron.* 1995; Band 15; S.711–720.
140. Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E. Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci.* 2004; Band 24; S.6920–6927.
141. Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO Jr, Linden DJ, Ferris CD, u. a. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; Band 97; S.4926–4931.
142. Newman EA. Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci.* 2003; Band 23; S.1659–1666.
143. Gordon GRJ, Baimoukhametova DV, Hewitt SA, Rajapaksha WRAKJS, Fisher TE, Bains JS. Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat Neurosci.* 2005; Band 8; S.1078–1086.
144. Zhang J, Wang H, Ye C, Ge W, Chen Y, Jiang Z, u. a. ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron.* 2003; Band 40; S.971–982.
145. Zhuang Z, Yang B, Theus MH, Sick JT, Bethea JR, Sick TJ, u. a. EphrinBs regulate D-serine synthesis and release in astrocytes. *J Neurosci.* 2010; Band 30; S.16015–16024.

146. Wolosker H, Sheth KN, Takahashi M, Mothet JP, Brady RO Jr, Ferris CD, u. a. Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; Band 96; S.721–725.
147. Stevens ER, Esguerra M, Kim PM, Newman EA, Snyder SH, Zahs KR, u. a. D-serine and serine racemase are present in the vertebrate retina and contribute to the physiological activation of NMDA receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; Band 100; S.6789–6794.
148. Schell MJ, Brady RO Jr, Molliver ME, Snyder SH. D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J Neurosci*. 1997; Band 17; S.1604–1615.
149. Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, u. a. Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; Band 100; S.15194–15199.
150. Shleper M, Kartvelishvily E, Wolosker H. D-serine is the dominant endogenous coagonist for NMDA receptor neurotoxicity in organotypic hippocampal slices. *J Neurosci*. 2005; Band 25; S.9413–9417.
151. Mothet J-P, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G. Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; Band 102; S.5606–5611.
152. Henneberger C, Papouin T, Oliet SHR, Rusakov DA. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature*. 2010; Band 463; S.232–236.
153. Zhuang Z, Huang J, Cepero ML, Liebl DJ. Eph signaling regulates gliotransmitter release. *Commun Integr Biol*. 2011; Band 4; S.223–226.
154. Klagsbrun M. The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. *Prog Growth Factor Res*. 1989; Band 1; S.207–235.
155. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, u. a. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem*. 1996; Band 271; S.15292–15297.
156. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol*. 2001; Band 2; review 3005; S.1-12
157. Wang W, Zhu N-L, Chua J, Swenson S, Costa FK, Schmitmeier S, u. a. Retargeting of adenoviral vector using basic fibroblast growth factor ligand for malignant glioma gene therapy. *J Neurosurg*. 2005; Band 103; S.1058–1066.
158. Fukai J, Yokote H, Yamanaka R, Arao T, Nishio K, Itakura T. EphA4 promotes cell proliferation and migration through a novel EphA4-FGFR1 signaling pathway in the human glioma U251 cell line. *Mol Cancer Ther*. 2008; Band 7; S.2768–2778.

159. Yokote H, Fujita K, Jing X, Sawada T, Liang S, Yao L, u. a. Trans-activation of EphA4 and FGF receptors mediated by direct interactions between their cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; Band 102; S.18866–18871.
160. Eissler J. Detection and quantification of Chilean strains of infectious pancreatic necrosis virus by real-time RT-PCR assays using segment B as a target. *Lat Am J Aquat Res*. 2011; Band 39; S.544–552.
161. Rawer D. Real-Time PCR: Optimierung und Evaluation, Etablierung von Housekeeping-Genen und die Expressionsanalyse bei Fallotscher Tetralogie, Dissertation, Gießen 2005.
162. Görg B, Bidmon H-J, Häussinger D. Gene expression profiling in the cerebral cortex of patients with cirrhosis with and without hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 2013; Band 57, S. 2436–2447.
163. Görg B, Karababa A, Shafigullina A, Bidmon HJ, Häussinger D. Ammonia-induced senescence in cultured rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. *Glia*. 2015; Band 63; S.37–50.
164. Kruczek C, Görg B, Keitel V, Bidmon HJ, Schliess F, Häussinger D. Ammonia increases nitric oxide, free Zn(2+), and metallothionein mRNA expression in cultured rat astrocytes. *Biol Chem*. 2011; Band 392; S.1155–1165.
165. Kim VN, Nam J-W. Genomics of microRNA. *Trends Genet*. 2006; Band 22; S.165–173.
166. Chen X, Yang H, Zhou X, Zhang L, Lu X. MiR-93 Targeting EphA4 Promotes Neurite Outgrowth from Spinal Cord Neurons. *J Mol Neurosci*. 2016; Band 58; S.517–524.
167. Oenarto J, Karababa A, Castoldi M, Bidmon HJ, Görg B, Häussinger D. Ammonia-induced miRNA expression changes in cultured rat astrocytes. *Sci Rep*. 2016; Band 6; Artikelnummer 18493.
168. Yu X, Wang G, Gilmore A, Yee AX, Li X, Xu T, u. a. Accelerated experience-dependent pruning of cortical synapses in ephrin-A2 knockout mice. *Neuron*. 2013; Band 80; S.64–71.
169. Xu K, Tzvetkova-Robev D, Xu Y, Goldgur Y, Chan Y-P, Himanen JP, u. a. Insights into Eph receptor tyrosine kinase activation from crystal structures of the EphA4 ectodomain and its complex with ephrin-A5. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; Band 110; S.14634–14639.
170. Nikolov DB, Xu K, Himanen JP. Eph/ephrin recognition and the role of Eph/ephrin clusters in signaling initiation. *Biochim Biophys Acta*. 2013, Band 1834, S.2160-2165.
171. Ivanov AI, Steiner AA, Scheck AC, Romanovsky AA. Expression of Eph receptors and their ligands, ephrins, during lipopolysaccharide fever in rats. *Physiol Genomics*. 2005; Band 21; S.152–160.

172. Biervert C, Horvath E, Fahrig T. Semiquantitative expression analysis of ephrine-receptor tyrosine kinase mRNA's in a rat model of traumatic brain injury. *Neurosci Lett.* 2001; Band 315; S.25–28.
173. Lai KO, Ip FC, Ip NY. Identification and characterization of splice variants of ephrin-A3 and ephrin-A5. *FEBS Lett.* 1999; Band 458; S.265–269.
174. Döbele C. Functional characterization of members of the microRNA-17-92 cluster in the vascular system. Dissertation, Frankfurt; 2011.
175. van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJM. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia.* 2003; Band 17; S.1013–1034.